JULIANA KAWANISHI BRAGA

Caracterização microbiana e degradação de surfactante aniônico em reator anaeróbio de leito fluidificado com água residuária de lavanderia

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche

Co-orientador: Edson Luiz Silva

VERSÃO CORRIGIDA

SÃO CARLOS

2014

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

B813c

Braga, Juliana Kawanishi
Caracterização microbiana e degradação de surfactante aniônico em reator anaeróbio de leito fluidificado com água residuária de lavanderia / Juliana Kawanishi Braga; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche; coorientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2014.

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

1. LAS. 2. Compostos orgânicos xenobióticos. 3. Areia. 4. Sacarose. 5. Pirosequenciamento. 6. Proteobacteria. 7. Zoogloea. 8. Desufobulbus. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **JULIANA KAWANISHI BRAGA**.

Título da tese: "Caracterização microbiana de degradação de surfactante aniônico em reator anaeróbio de leito fluidificado com água residuária de lavanderia".

Data da defesa: 28/02/2014

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Profa. Associada **Maria Bernadete Amâncio Varesche (Orientadora)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovada
Prof. Associado **Marcelo Zaiat** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovado
Profa. Dra. **Márcia Nitschke** (Instituto de Química de São Carlos/IQSC)	APROVADO
Prof. Dr. **Dib Gebara** (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP- Ilha Solteira)	APROVADA
Dra. **Valeria Maia de Oliveira** (Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)	APROVADA

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Dedico este trabalho aos meus pais Gaudio e Cleusa e a minha irmã Tati, com amor, admiração e gratidão pelo carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho. Por sempre me incentivarem nesta jornada e em outras que já passaram. Pelas inúmeras visitas a São Carlos e por nunca terem me deixado nada faltar. Não há palavras suficientes para descrever minha eterna gratidão.

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível, pois contou com a colaboração de inúmeras pessoas, que direta ou indiretamente participaram com pequenas e grandes contribuições, porém, igualmente valiosas. Gostaria de expressar minha gratidão a algumas instituições e pessoas, e pedir que aquelas aqui não mencionadas, sintam-se igualmente lembradas.

Quero agradecer esta conquista:

Á Deus, por instruir-me com sabedoria e discernimento perante as provas encontradas neste caminho, ajudando-me a encontrar forças suficientes para não sucumbir neste percurso.

Aos meus pais Gaudio Soares Braga e Cleusa Akemi Kawanishi, dos quais me orgulho intensamente e sempre recebi e ainda recebo tudo o que preciso na vida para ser feliz. Agradeço por serem a minha referência de amor, honestidade, generosidade e responsabilidade.

À minha querida irmã e grande artista Tatiana, com quem compartilho longas horas de alegria e aprendizado, que renovam minhas forças para continuar sempre em frente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio concedido por meio da bolsa de doutorado (Processo n° 2010/11531-9).

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio no início desta etapa acadêmica.

À Profª. Dra. Maria Bernadete A. Varesche que me recebeu de braços abertos no laboratório, me orientando e sempre contribuindo com valiosos ensinamentos que levarei para o resto de minha vida, e o mais importante, agradeço pela oportunidade e confiança em mim depositadas.

Ao professor Dr. Edson Luiz Silva (Tininho), por aceitar co-orientar-me neste precioso trabalho colaborando sempre que possível com seu tempo e precioso conhecimento.

À Lavanderia Vida Fácil situada em São Carlos-SP pela contribuição e apoio nos cedendo a água residuária necessária ao longo de todo estudo.

À Dra. Lorena Lima de Oliveira pelo apoio e ajuda com seus ensinamentos e sua amizade, sempre disposta a ajudar-me, e junto ao professor Tininho agradeço às sugestões perante a qualificação deste estudo.

Aos professores Eugênio Foresti, Marcelo Zaiat, Márcia Damianovic e Wyclef Dymurgo que muito me acrescentaram nessa longa jornada e que levarei eternamente comigo nos caminhos seguintes.

À Dra. Isabel K. Sakamoto (Bel) técnica do Laboratório de Processos Biológicos (LPB), pelo auxílio na realização das análises relativas à biologia molecular e microbiologia (DGGE, PCR, NMP) e na discussão dos resultados destas análises.

À Dra. Maria Ângela Adorno (Janja) pelas valiosas sugestões, conselhos e ensinamentos referentes às análises cromatográficas.

Às técnicas, Eloisa Pozzi (Elô), Carolina Sabatini e Juliana Custódio, pelas inúmeras ajudas e suportes técnicos ao longo desta jornada.

Ao Fernando Moura, técnico em informática do Engenharia Ambiental, pelas inúmeras e essenciais ajudas.

Ao Fabrício Motteran, companheiro de todos os momentos desde meus primeiro passos nessa jornada. Agradeço por ser a força que sempre me fez levantar nos momentos difíceis, o conforto que sempre me fez sentir acolhida quando a saudade de casa batia, a amizade sincera que sempre me amparou quando estava sozinha, a luz quando a fé já esmaecia, a risada quando a tristeza em meu peito aflorava, mas, acima de tudo, a leal companhia que me fez sentir sempre querida e muito amada.

Aos amigos que conheci ao longo destes anos no LPB; Adriana Maluf, Adys, Ana Cláudia Barana, Ariovaldo Silva, Bruna Moraes, Bruna Carrer, Camila, Caio Martins, Carla Diniz, Carol Gil, Carol Zampol, Dagoberto Okada, Daniel Moureira, Davi Andrade, Débora Fonseca, Djalma Ferraz, Eduardo Penteado, Filipe Vasconcelos Ferreira, Gleyce, Guilherme Oliveira, Gustavo Mockaitis, Henrique, Inês Tomita, José Alberto Corrêa Leite, Laís, Leandro Godói, Lênin, Lívia Botta, Lucas Marcon, Lucas Fuess, Luis Ricardo, Marcus Vinicius, Mariana Carosia, Matheus Souza, Mélida Del Pilar, Paulo Clairmont, Priscila Camiloti, Rachael Biancalana, Rafael Brito, Regiane Corrêa, Ricardo Almeida, Rogério Vilela, Samantha Santos, Sandra Maintinguer, Thaís Zaninetti, Tiago Martins, Tiago Palladino Delforno, Tiago (Cebola), Theo Souza, Túlio Siqueira.

À amizade mais especial que fiz quando cheguei no laboratório, Mara Rúbia, obrigada pela sincera amizade, pelos diversos conselhos e pelas contagiantes risadas que espantava até olho gordo. Agradeço por me receber como amiga no momento em que caí de para-quedas em uma multidão, você me acolheu e juntas nos divertimos muito.

À Zaryf K. A. D. Pacheco, pelos mais de 10 anos de amizade verdadeira. Foram tantos momentos de alegrias, risadas, tristezas, lágrimas, estudos, planos, viagens, comilanças,

distâncias, presenças, confidências, e muitos outros impossíveis de descrever. A amizade verdadeira é aquela que apesar das barreiras sempre se manteve de pé. Após todos esses anos, não tenho dúvidas da força que a estrutura da nossa amizade possui.

E em especial a Elisa, Milena, Fernando e Helena pelos agradáveis momentos de companhia e distração, ora nas noites de tapas ora nas noites de jogos.

Às amigas Carol Malheiros, Edna Hardoim, Marcela Rúbia, Érika Segóvia, Anielle Moraes, Karen Campos, Mônica Paelo, Paty Barros, Fabrícia Vieira, Rafaela Screnci agora distantes, porém sempre presentes em meu coração. Agradeço os momentos de risadas sem fim e amparo naqueles mais difíceis, com certeza a participação de todas em minha vida pessoal e profissional é muito estimada e eterna.

Aos funcionários do SHS pelo auxílio e gentileza. Em especial à Sá e Priscila da secretaria de Pós Graduação do Departamento de Hidráulica e Saneamento (PPG-SHS), e Silvana Celestine, secretária do curso de Engenharia Ambiental (campus II da USP) pela paciência, colaboração e ajuda quando necessária.

À Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) e ao departamento de Hidráulica e saneamento (SHS) pela oportunidade e apoio.

Finalmente, agradeço às centenas de outras pessoas que também contribuíram de uma forma ou de outra na realização deste trabalho e também na minha formação profissional.

A todos, obrigada!!!

"Se quiser triunfar na vida,
faça da perseverança a sua melhor amiga;
da experiência, o seu conselheiro;
da prudência, o seu irmão mais velho;
e da esperança; o seu anjo da guarda."

Joseph Addison

RESUMO

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

Neste estudo avaliou-se a remoção e degradação de surfactante aniônico linear alquilbenzeno sulfonado (LAS) e compostos orgânicos xenobióticos em água residuária de lavanderia comercial em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) preenchido com areia como material suporte, em escala de bancada (1,2 L), bem como a comunidade microbiana do biofilme e biomassa do separador de fases ao final da operação. O reator foi inoculado com lodo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura e alimentado com substrato sintético acrescido de água residuária de lavanderia comercial. Caracterização da água residuária, análises de monitoramento da concentração de LAS e matéria orgânica, além de outros parâmetros físico-químicos foram realizadas durante as etapas de operação do sistema. Essa operação foi dividida em cinco etapas: I – adaptação da biomassa (575±28mg.L^{-1} de DQO), II (9,5±3 mg.L^{-1} de LAS e 637±80mg.L^{-1} de DQO), III (23,3±8mg.L^{-1} de LAS e 686±92 mg.L^{-1} de DQO), IV (21,7±10mg.L^{-1} de LAS e 691±103 mg.L^{-1} de DQO), V (27,9±9,6mg.L^{-1} de LAS e 666±161mg.L^{-1} de DQO). Aplicação das técnicas de PCR/DGGE e pirosequenciamento da região do rRNA 16S foi realizada para constatar a diversidade microbiana nas etapas IV (com sacarose) e V (sem sacarose). Por meio da caracterização da água residuária de lavanderia comercial foi evidenciado grande variação na concentração de diversos parâmetros, principalmente matéria orgânica (704 mg.L^{-1} a 4.830 mg.L^{-1}) e LAS (12,2 mg.L^{-1} a 11.949 mg.L^{-1}). A eficiência média de remoção de matéria orgânica e LAS foi 88% e 60%, respectivamente, durante toda operação do reator. As populações dos Domínios Archaea e Bacteria foram 54% e 45%, similares, respectivamente, para a biomassa da Etapa IV e Etapa V. Por meio da análise de pirosequenciamento das amostras das Etapas IV e V da areia e separador de fases do reator foram identificados 92 gêneros dos quais 24 foram relacionados com a degradação de LAS (*Bdellovibrio*, *Ferruginibacter*, *Gemmatimonas*, etc.).

Palavras-chave: LAS, compostos orgânicos xenobióticos, areia, sacarose, pirosequenciamento, Proteobacteria, *Zoogloea*, *Desulfobulbus*.

ABSTRACT

BRAGA, J. K. (2014). **Microbial characterization and anionic surfactant degradation in an anaerobic fluidized bed reactor with laundry wastewater.** 2014. 257 f. Thesis (Ph.D.) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos. In 2014.

In this study the removal and degradation of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and xenobiotic organic compounds in a commercial laundry wastewater was evaluated in anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) filled with sand as support material, in a bench scale (1, 2 L), as well as the microbial community of the biofime and phase separator biomass at the end of the operation. The reactor was inoculated with sludge from a UASB reactor used in the swine manure treatment and fed with synthetic substrate plus commercial laundry wastewater. Wastewater characterisation, monitoring analyzes of LAS, organic matter and other physico-chemical parameters were performed during the stages of system operation. This operation was divided into five stages: Stage I - biomass adaptation (575 ± 28mg L^{-1} of COD), Stage II (9.5 ± 3 mg L^{-1} of LAS and 637 ± 80 mg L^{-1} of COD), Stage III (23.3 ± 8 mg L^{-1} of LAS and 686 ± 92 mg L^{-1} of COD), Stage IV (21.7 ± 10 mg L^{-1} of LAS and 691 ± 103 mg L^{-1} of COD), Stage V (27.9 ± 9.6 mg L^{-1} of LAS and 666 ± 161 mg L^{-1} of COD). Application of PCR/DGGE and pyrosequencing of the 16S rRNA region was performed to verify the microbial diversity in the operational phase IV (with sucrose) and V (without sucrose). Through the commercial laundry wastewater characterization a wide variation in several parameters concentration was shown, mainly organic matter (704mg L^{-1} to 4.830mg L^{-1}) and LAS (12.2mg L^{-1} to 11.949mg L^{-1}). The average removal efficiency of organic matter and LAS was 88% and 60%, respectively, throughout the reactor operation. The populations of the Archaea and Bacteria Domains were 54% and 45% similar, respectively, for Stages IV and V biomass. By pyrosequencing analysis of sand and phase separator samples from the Stages IV and V, 92 genera of which 24 were related to the degradation of LAS (*Bdellovibrio, Ferruginibacter, Gemmatimonas, Holophaga, Magnetospirillum, Zoogloea,* etc.) were identified.

Keywords: LAS, xenobiotic organic compounds, sand, sucrose, pyrosequencing, Proteobacteria, *Zoogloea*, *Desulfobulbus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Formação do agregado micelar..... 9
Figura 3.2 – Estrutura molecular do LAS..... 9
Figura 4.1 – Fluxograma da caracterização da água residuária de lavanderia..... 27
Figura 4.2 – Detergente utilizado na lavanderia comercial e coleta das amostras da água residuária..... 28
Figura 4.3 – Fluxograma experimental da operação do reator..... 29
Figura 4.4 – Diagrama esquemático do reator anaeróbio de leito fluidificado..... 33
Figura 4.5 – Resazurina em frasco de alimentação do reator..... 38
Figura 4.6 – Avaliação do potencial redox com resazurina..... 38
Figura 4.7 – Esquema das diluições e inoculações da técnica de NMP..... 42
Figura 5.1 – Exemplo de cromatograma referente ao LAS na água de lavanderia..... 52
Figura 5.2 – Variação da DQO bruta e filtrada nas amostras de água de lavanderia comercial..... 53
Figura 5.3 – Concentração do LAS e DQO nas amostras da água de lavanderia comercial..... 54
Figura 5.4 – Ácidos orgânicos da água de lavanderia..... 55
Figura 5.5 – Variação de sulfato e sulfeto em água de lavanderia comercial..... 57
Figura 5.6 – Concentração de sólidos suspensos totais em água de lavanderia..... 62
Figura 5.7 – Etapa de inoculação do reator de leito fluidificado: A1 - Reator de leito fluidificado, A2 - Frasco de alimentação; B - Separador de fases; C - Corpo do reator com biomassa aderida..... 69
Figura 5.8 – Variação temporal da DQO filtrada durante a fase de imobilização da biomassa..... 70
Figura 5.9 – Variação temporal de pH durante a etapa de imobilização da biomassa..... 70
Figura 5.10 – Distribuição de ácidos orgânicos na etapa de imobilização da biomassa..... 71
Figura 5.11 – Variação temporal da DQO filtrada afluente e efluente e eficiência de remoção..... 73
Figura 5.12 – Variação temporal da carga orgânica volumétrica (COV) afluente e eficiência de remoção..... 75

Figura 5.13 – Variação temporal do LAS afluente, efluente e eficiência de remoção..... 78
Figura 5.14 – Cromatograma do LAS afluente e efluente..... 79
Figura 5.15 – Variação temporal da carga de LAS aplicada e eficiência de remoção... 80
Figura 5.16 – Relação carga de LAS removida por carga de LAS aplicada..... 81
Figura 5.17 – Variação temporal do pH afluente e efluente..... 83
Figura 5.18 – Variação temporal da alcalinidade total afluente e efluente..... 85
Figura 5.19 – Distribuição dos ácidos orgânicos em cada etapa de operação do reator 87
Figura 5.20 – Variação temporal do LAS afluente e sulfato efluente..... 92
Figura 5.21 – Variação temporal do fosfato afluente e efluente..... 94
Figura 5.22 – 19◦ dia de operação do reator com água de lavanderia..... 96
Figura 5.23 – 41◦ dia de operação do reator com água de lavanderia..... 96
Figura 5.24 – 51◦ dia de operação com água de lavanderia..... 97
Figura 5.25 – 90◦ dia de operação com água de lavanderia..... 97
Figura 5.26 – Proporção da adsorção e degradação de LAS no reator de leito fluidificado..... 101
Figura 5.27 – Teste com resazurina no reator de leito fluidificado..... 107
Figura 5.28 – Teste com resazurina no reator de leito fluidificado..... 108
Figura 5.29 – (A-D) Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas na areia do reator no final da Etapa V: (a) endósporos, (b) estreptococos e endósporos, (c) bactéria filamentosa e diplococo, (d) bactéria filamentosa e bacilos..... 109
Figura 5.30 – (A-D) Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas no separador de fases do reator no final da Etapa V: (a) estreptococos e bacilo, (b) sarcina, (c) diatomácea, (d) carapaça de protozoário, (e) bacilo fluorescente, (f) bacilos..... 110
Figura 5.31 – MEV das morfologias observadas para a biomassa da areia ao final da operação (Etapa V): (a) bacilos e espiroquetas, (b) bacilos, (c) aglomerado de cocos e (d) bacilos (aumento A, B E C: 5000X e D: 2000X)..... 111

Figura 5.32 – MEV das morfologias observadas para biomassa do distribuidor do reator ao final da operação (Etapa V): (a) e (b) bacilos e exopolímero (5000X)..... 112
Figura 5.33 – MEV das morfologias observadas na biomassa do separador de fases do reator ao final da operação (Etapa V): (a) bacilos e exopolímero e (c) diplococos e filamentos (aumento 5000X)..... 113
Figura 5.34 – Microscopia eletrônica de varredura das morfologias observadas nos sólidos suspensos efluente do reator ao final da operação (Etapa V) (a) bacilos, espiroquetas e (b) sarcinas (aumento 5000X)..... 114
Figura 5.35 – Quantificação dos grupos microbianos pelo NMP: (A) bactérias anaeróbias totais e (B) arqueias metanogênica..... 116
Figura 5.36 – Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do rRNA 16S para o Domínio Bacteria de amostras do inóculo (I), distribuidor (D), biomassa da areia (A) e biomassa do separador de fases (SF) das etapas IV e V de operação do reator..... 118
Figura 5.37– Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do rRNA 16S para o Domínio Archaea de amostras do inóculo (I), distribuidor (D), biomassa da areia (A)e biomassa do separador de fases (SF) das etapas IV e V de operação do reator..... 119
Figura 5.38 – Histograma da distribuição do comprimento das sequências..... 120
Figura 5.39 – Curva de rarefação da biomassa da areia e do separador de fases na Etapa IV, com 97% (*cutoff* 0,03) e 95% (*cutoff* 0,05) de similaridade..... 124
Figura 5.40 – Curva de rarefação da biomassa da areia e do separador de fases na Etapa V, com 97% (*cutoff* 0,03) e 95% (*cutoff* 0,05) de similaridade..... 125
Figura 5.41 – Análise de Coordenadas Principais (*Principal coordinate analysis* - PCoA) baseada na composição da comunidade microbiana de cada amostra do RALF empregando o índice de Sorense e Software PAST..... 126
Figura 5.42 – Dendrograma baseado no índice de Bray-Curtis, para a biomassa da areia e do separador de fases do RALF, para similaridade de 97%..... 128
Figura 5.43 – Dendrograma baseado no índice de Morisita-Horn, para a biomassa da areia e do separador de fases do RALF, para similaridade de 97%..... 129

Figura 5.44 – Abundância relativa dos filos mais representativos (similaridade 97%) para a biomassa da Areia-IV, Separador de Fases-IV, Areia-V e Separador de Fases-V..... 134
Figura 5.45 – Abundância relativa das famílias mais representativos (similaridade 97%) nas amostras da Areia-IV, Separador de Fases-IV, Areia-V e Separador de Fases-V..... 140
Figura 5.46 – Abundância relativa das famílias em comuns com as amostras A-IV, SF-IV, A-V e SF-V..... 141
Figura 5.47 – Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra da biomassa da Areia da Etapa IV (similaridade 97%)..... 142
Figura 5.48 – Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na biomassa do Separador de fases da Etapa IV (similaridade 97%)..... 148
Figura 5.49 – Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na biomassa da areia da Etapa V (similaridade 97%)..... 155
Figura 5.50 – Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na biomassa do Separador de fases da Etapa V (similaridade 97%)..... 161
Figura 5.51 – Condição dos gêneros relacionados com a degradação de LAS, segundo a abundância relativa nas amostras da areia (A) e separador de fases (SF) das Etapas IV e V..... 170
Figura 5.52 – Árvore filogenética da biomassa A-IV do RALF com UTOs das sequencias representativas dos gêneros responsáveis pela degradação indireta do LAS. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta concilli* foi escolhida como outgroup. *Bootstrap* de 1000 amostragens. Entre parênteses está o número de acesso da seqüência no *GenBank*..... 173
Figura 5.53 – Árvore filogenética da biomassa SF-IV do RALF com UTOs das sequencias representativas dos gêneros responsáveis pela de gradação indireta do LAS. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta concilli* foi escolhida como outgroup. *Bootstrap* de 1000 amostragens. Entre parênteses está o número de acesso da seqüência no *GenBank*..... 176
Figura 5.54– Árvore filogenética da biomassa A-V do RALF com UTOs das sequencias representativas dos gêneros responsáveis pela degradação

indireta do LAS. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta concilli* foi escolhida como outgroup. *Bootstrap* de 1000 amostragens. Entre parênteses está o número de acesso da seqüência no *GenBank*..... 179

Figura 5.55 – Árvore filogenética da biomassa SF-V do RALF com UTOs das sequencias representativas dos gêneros responsáveis pela de gradação indireta do LAS. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta concilli* foi escolhida como outgroup. *Bootstrap* de 1000 amostragens. Entre parênteses está o número de acesso da seqüência no *GenBank*..... 181

Figura 5.56 – Ajuste da Produção acumulada de metano (µmol) para todas as séries experimentais: Controle (sem adição de água de lavanderia), 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS, 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS, 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS, após 600 horas de incubação..... 188

Figura 5.57 – Produção especifica de metano para todas as séries experimentais: Controle (sem adição de água de lavanderia), 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS, 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS, 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS, após 600 horas de incubação..... 189

Figura 5.58 – Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas padrões do DGGE dos fragmentos do rRNA 16S para o Domínio Bacteria de amostras do ensaio de potencial metanogênico para as amostras: C = controle; P1 = 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS; P2 = 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS; P3 = 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e P4 = 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS..... 193

Figura 5.59 – Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas padrões do DGGE dos fragmentos do rRNA 16S para o Domínio Archaea de amostras do ensaio de potencial metanogênico para as amostras: C = controle; P1 = 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS; P2 = 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS; P3 = 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e P4 = 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS..... 194

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Parâmetros físico-químicos para caracterização da água de lavanderia comercial..... 28
Tabela 4.2 – Composição do substrato sintético..... 31
Tabela 4.3 – Composição da solução de sais do substrato sintético..... 32
Tabela 4.4 – Análise para monitoramento do reator..... 35
Tabela 4.5 - Condições cromatográficas para quantificação do LAS..... 35
Tabela 4.6 – Soluções para água de diluição..... 40
Tabela 4.7 – Primers para amplificação da região 16S do rRNA para o Domínio Bacteria... 44
Tabela 4.8 – Programação do termociclador para amplificação do rRNA 16S para o Domínio Bacteria..... 45
Tabela 4.9 – Primers para amplificação da região 16S do rRNA para o Domínio Archaea... 45
Tabela 4.10 – Programação do termociclador para amplificação do rRNA 16S para o Domínio Archaea..... 45
Tabela 4.11 – Concentração do DNA das amostras de biomassa do reator..... 47
Tabela 4.12 – Barcode de referências das amostras da areia (A) e do separador de fases (SF) das etapas IV e V de operação do reator..... 47
Tabela 5.1 – Valores dos parâmetros físico-químicos da água de lavanderia..... 51
Tabela 5.2 – Ácidos orgânicos da água de lavanderia..... 55
Tabela 5.3 – Concentração de metais pesados em água de lavanderia comercial..... 59
Tabela 5.4 – Contribuição dos metais no esgoto doméstico..... 60
Tabela 5.5 – Compostos detectados na água de lavanderia por CG/MS (*Headspace*)..... 63
Tabela 5.6 – Compostos detectados na água de lavanderia por injeção da amostra..... 65
Tabela 5.7 – Razão de mistura e DQO da água residuária utilizada durante a operação do reator..... 66
Tabela 5.8 – Contribuição da água de lavanderia em DQO afluente..... 67
Tabela 5.9 – Classes dos compostos encontrados na água residuária de lavanderia..... 67
Tabela 5.10 – Valor afluente, efluente e eficiência de remoção do LAS..... 76
Tabela 5.11 – Contribuição do LAS na COV aplicada no reator..... 80

Tabela 5.12– Valores de parâmetro físico-químicos do afluente e efluente do reator de leito fluidificado..... 82
Tabela 5.13 – Relação entre a alcalinidade intermediária e parcial no reator..... 86
Tabela 5.14 – Diversidade de ácidos orgânicos nas etapas de operação do reator..... 89
Tabela 5.15 – Valores de sulfato nas etapas de operação do reator..... 91
Tabela 5.16 – Valores da concentração de fosfato, nitrito e nitrato..... 93
Tabela 5.17 – Valores da concentração de sólidos suspensos efluentes..... 99
Tabela 5.18 – Balanço de massa de LAS..... 100
Tabela 5.19 – Adsorção do LAS..... 100
Tabela 5.20 – Compostos detectados no efluente do reator na etapa IV (análise do *Headspace*)..... 103
Tabela 5.21 – Compostos detectados no efluente do reator por injeção da amostra..... 104
Tabela 5.22 – Compostos orgânicos xenobióticos encontrados no afluente, efluente e adsorvido na biomassa ao final da operação do reator..... 105
Tabela 5.23 – NMP de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas..... 115
Tabela 5.24 – Índice de Shannon-Wiener para as amostras do RALF nas Etapas IV e V..... 119
Tabela 5.25 – Quantidade de sequências e UTOs atribuídas para cada amostra..... 120
Tabela 5.26 – Índices de diversidade da biomassa do RALF..... 123
Tabela 5.27 – Comparação entre estimadores de riqueza Rarefação e Chao1..... 123
Tabela 5.28 – Índices de similaridade de Jaccard e Sorense da biomassa do RALF..... 126
Tabela 5.29 – Diversidade β de Whitakker das amostras do RALF..... 127
Tabela 5.30 – Porcentagem de UTOs (similaridade 97%) e sequências classificadas taxonomicamente em cada amostra..... 130
Tabela 5.31 – Quantidade de filos, classes, ordens, famílias e gêneros classificados em cada amostra (similaridade 97%)..... 130
Tabela 5.32 – Abundância relativa e UTOs dos filos classificados na biomassa do RALF... 132
Tabela 5.33 – Distribuição das famílias na biomassa do RALF da etapa IV..... 136
Tabela 5.34 – Distribuição das famílias na biomassa do RALF da etapa V..... 138
Tabela 5.35 – Descrição dos 20 gêneros de maior abundância relativa na biomassa da areia (Etapa IV) do RALF (similaridade 97%)..... 145
Tabela 5.36 – Descrição dos 20 gêneros de maior abundância relativa na biomassado separador de fases (Etapa IV) do RALF (similaridade 97%)..... 152

Tabela 5.37 – Descrição dos 20 gêneros de maior abundância relativa na biomassa da areia (Etapa V) do RALF (similaridade 97%)..... 158
Tabela 5.38 – Descrição dos 20 gêneros de maior abundância relativa na biomassa do separador de fases (Etapa V) do RALF (similaridade 97%)..... 164
Tabela 5.39 – Descrição e abundância relativa (%) de gêneros capazes de degradação de compostos aromáticos..... 168
Tabela 5.40 – Gêneros presentes em estudos com LAS em reatores anaeróbios..... 171
Tabela 5.41 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do LAS (Amostra A-IV) 174
Tabela 5.42 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do LAS (Amostra SF-IV) 177
Tabela 5.43 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do LAS (Amostra A-V) 180
Tabela 5.44 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do LAS (Amostra SF-V) 182
Tabela 5.45 – Produção acumulada de metano mensurada nas séries experimentais nas CNTP..... 185
Tabela 5.46 – Produção acumulada de metano pelo ajuste de Gompertz modificado nas séries experimentais nas CNTP..... 186
Tabela 5.47 – Valores inicial e final de DQO e eficiência de remoção de matéria orgânica em cada série experimental..... 190
Tabela 5.48 – Série de sólidos ao final do teste de potencial metanogênico..... 190
Tabela 5.49 – Balanço de massa de LAS do ensaio de potencial metanogênico..... 191
Tabela 5.50 – Ácidos Orgânicos do ensaio de potencial metanogênico..... 192
Tabela 5.51 – Índice de Shannon-Wiener para as amostras dos testes de potencial metanogênico..... 194

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-IV	Amostra do material suporte (areia) na etapa com sacarose (Etapa IV)
A-V	Amostra do material suporte (areia) na etapa sem sacarose (Etapa V)
A	Abundancia relativa
AI	Alcalinidade intermediaria
AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System
AOV	Ácidos orgânicos voláteis
AP	Alcalinidade parcial
APHA	American public health association
ASBR	Reator anaeróbio operado em bateladas seqüenciais
b	Bruta
CG	Cromatografia gasosa
C_H	Índice de Morisita-Horn
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CONAMA	Conselho nacional de meio ambiente
COV	Carga orgânica volumétrica
COXs	Compostos orgânicos xenobióticos
d'	Índice de Margalef
D’	Índice de Simpson
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis (eletroforese em gel de gradiente desnaturante)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (bases nitrogenadas)
DQO	Demanda química de oxigênio
DSM 1532	Cepa da bactéria *Acinetobarter junni*
e	Número de euler (2,71828)
E	Equitabilidade de Buzas e Gibson
EGSB	Expanded granular sludge bed (reator de leito granular expandido)

f	Filtrada
H’	Índice de Shannon
HAc	Equivalência de ácido acético
HERA	Human & environmental risk assessment
HMDS	Hexamethyldesilazane
HPLC	high performance/pressure liquide chromatography
IC_{50}	50% da concentração máxima de inibição
INDEAR	Instituto de Agrobiotecnologia Rosário
J’	Equitabilidade de Pielou
LAE	Álcool linear etoxilado – (linear alcohol ethoxylate)
LAS	Alquilbenzeno linear sulfonado
LD	Limite de detecção
LPB	Laboratório de processos biológicos
M	Produção acumulada de metano (µmol)
M	Molar
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NMP	Número mais provável
NTK	Nitrogen Total Kjeldhal
OAF	Organismos acumuladores de fósforo
P	Produção potencial de metano (µmol)
P.A.	Alto grau de pureza
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction (reação de polimerização em cadeia)
PCoA	Principal coordinate analysis
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial hidrogeniônico
QIIME	Quantitative insights into microbial ecology
RAHLF	Reator anaeróbio horizontal de leito fixo
RDP	Ribossomal database project
Rm	Taxa de produção de metano (µmol/h)
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal

SF-IV	Amostra do separador de fases na etapa com sacarose (Etapa IV)
SF-V	Amostra do separador de fases na etapa sem sacarose (Etapa V)
Sj	Índice de Jaccard
SPE	Coluna de extração em fase sólida
Ss	Índice de Sorensen
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
STF	Sólidos totais fixos
STV	Sólidos totais voláteis
t	Tempo (horas)
TDH	Tempo de detenção hidráulico
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic averages
UTO	Unidade taxonômica operacional
UV	Ultravioleta
V	Volt
Vmf	Velocidade de mínima fluidificação
λ	Fase *lag* (horas)
λ	Comprimento de onda

LISTA DE SIMBOLOS

°C	graus Celsius
°C.min^{-1}	graus centígrados por minuto
µg.Kg^{-1}	micrograma por kilograma
µg.L^{-1}	micrograma por litro
µL	microlitro
µm	micrômetro
µmol	micromol
µmol.h^{-1}	micromol por hora
C_{10-18}	cadeia alquílica com 10 a 18 carbonos
Cel.gSTV^{-1}	células por grama de sólidos voláteis totais
cm	centímetro
d	dia
g	grama
g.cm^{-1}	grama por centímetro
g.L^{-1}	grama por litro
h	hora
kg	quilograma
kgDQO.d^{-1}	kilograma de DQO por dia
L	litro
L.h^{-1}	litros por hora
m	metro
M	molar
m.s^{-1}	metros por segundo
Mg	miligrama
mg$CaCO_3$.L^{-1}	miligrama de carbonato de cálcio por litro
Mg.kg^{-1}	miligrama por kilograma
mg.L^{-1}	miligrama por litro
mgDQO/L.d	miligrama de DQO por litro por dia
mgHAc/L	miligrama de equivalência de ácido acético por litro

mL	mililitro
$mL.h^{-1}$	militros por hora
$mL.L^{-1}$	militros por litro
$mL.min^{-1}$	militros por minuto
mM	milimolar
Mm	milímetros
Mmol	milimol
mV	milivolt
Ng	nanograma
$ng.L^{-1}$	nanograma por litro
nm	nanômetros
R^2	coeficiente de determinação
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS..... vii
RESUMO..... xiiii
ABSTRACT..... xv
LISTA DE FIGURAS..... xvii
LISTA DE TABELAS..... xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... xxvii
LISTA DE SIMBOLOS..... xxxi
SUMÁRIO..... xxxiii
1- INTRODUÇÃO..... 1
2 - OBJETIVOS..... 5
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 7
3.1 - Surfactantes..... 7
3.2 - Alquilbenzeno Linear Sulfonado..... 9
3.3 - Efeitos inibitórios dos surfactantes..... 10
3.4 - Impacto ambiental causado pelos surfactantes..... 12
3.5 - Água residuária de lavanderia..... 13
3.6 - Biodegradação anaeróbia do LAS..... 15
3.7 - Microrganismos envolvidos na degradação de LAS..... 17
3.8 - Reator de Leito Fluidificado..... 20
3.9 - Técnicas de biologia molecular..... 21
3.10 - Pirosequenciamento..... 23
3.11 - Considerações finais..... 25
4 - MATERIAL E MÉTODOS..... 27
4.1 - Caracterização da água de lavanderia..... 27
4.2 - Fluxograma experimental..... 29
4.3 - Inóculo..... 30
4.4 - Material suporte..... 30
4.5 - Composição do Substrato Sintético..... 31
4.6 - DQO da água de lavanderia e sua razão de mistura..... 32
4.7 - Reator anaeróbio de leito fluidificado..... 32
4.8 - Etapas de operação do RALF..... 34

4.8.1 - Inoculação..... 34
4.8.2 - Adaptação (Etapa I) 34
4.8.3 - Etapas contendo água residuária de lavanderia (Etapas II, III, IV e V)..... 34
4.9 - Análises físico-químicas e cromatográficas..... 35
4.10 - Análise qualitativa por CG/MS..... 36
4.11 - Extração de LAS adsorvido e balanço de massa..... 36
4.12 - Avaliação do Potencial Redox..... 37
4.13 - Exames Microscópicos..... 38
4.13.1- Microscopia de contraste de fase..... 38
4.13.2 - Microscopia eletrônica de varredura..... 39
4.14 - Análise quantitativa de microrganismos..... 39
4.14.1 - Água de diluição..... 39
4.14.2 - Substrato sintético..... 40
4.14.3 - Inoculação e diluição seriada..... 41
4.14.4 - Leitura dos resultados..... 42
4.15 - Biologia Molecular..... 43
4.15.1 - Extração de DNA e PCR..... 43
4.15.2 - Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante..... 46
4.15.3 - Pirosequenciamento..... 46
4.16 - Potencial Metanogênico..... 49
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 51
5.1 - Caracterização da água residuária de lavanderia..... 51
5.1.1 - DQO e LAS..... 51
5.1.2 - Ácidos orgânicos e álcoois..... 54
5.1.3 - pH e alcalinidade..... 56
5.1.4 - Sulfato e sulfeto..... 57
5.1.5 - Compostos nitrogenados..... 58
5.1.6 - Fosfato, fluoreto e brometo..... 58
5.1.7 - Metais pesados..... 59
5.1.8 - Sólidos suspensos..... 61
5.1.9 - Compostos orgânicos xenobióticos..... 62
5.2 - Operação e monitoramento do reator de leito fluidificado..... 66

5.2.1 - DQO da água de lavanderia e sua razão de mistura..... 66
5.2.2 - Imobilização da biomassa..... 68
5.2.3 - Remoção de matéria orgânica..... 71
5.2.4 - Remoção de LAS..... 75
5.2.5 - Monitoramento do pH e alcalinidade..... 82
5.2.6 - Monitoramento de Ácidos Orgânicos..... 87
5.2.7 - Monitoramento do sulfato..... 90
5.2.8 - Monitoramento de fosfato, nitrito e nitrato..... 92
5.2.9 - Monitoramento dos sólidos suspensos totais..... 95
5.2.10 - Balanço de massa do LAS..... 99
5.2.11 - Caracterização qualitativa afluente e efluente dos COXs..... 102
5.2.12 - Anaerobiose no reator de leito fluidificado..... 106
5.2.13 - Análise da Diversidade de Microrganismos..... 108
5.2.13.1 - Exames Microscópicos..... 108
5.2.14 - Análise quantitativa de microrganismos..... 114
5.2.15 - Análise da diversidade por DGGE..... 117
5.2.16 - Pirosequenciamento das amostras do reator de leito fluidificado.. 120
5.2.16.1 - Índices ecológicos..... 121
5.2.16.2 - Classificação taxonômica..... 129
5.2.16.3 - Filos..... 130
5.2.16.4 - Famílias..... 135
5.2.16.5 - Gêneros..... 141
5.2.16.6 - Gêneros da biomassa da areia (Etapa IV)..... 142
5.2.16.7 - Gêneros da biomassa do separador de fases (Etapa IV)..... 148
5.2.16.8 - Gêneros da biomassa da areia (Etapa V)..... 155
5.2.16.9 - Gêneros da biomassa do separador de fases (Etapa V)..... 161
5.2.16.10 - Gêneros relacionados com a degradação de LAS..... 167
5.3 - Potencial Metanogênico..... 185
5.3.1 - DGGE das amostras do ensaio de potencial metanogênico..... 193
6 - CONCLUSÕES..... 195
7 - SUGESTÕES..... 197
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 199
APÊNDICES..... 233

1 – INTRODUÇÃO

A crescente demanda, escassez e uso inadequado, apontam a questão da água como um dos mais graves problemas da humanidade. Desse modo, as pesquisas que envolvem o tratamento de águas residuárias são importantes, com o objetivo de solucionar o problema da falta de água com qualidade para os mais diversos usos.

No caso específico da água residuária de lavanderia comercial, também conhecida por água cinza, pouco têm sido feito para avaliara possibilidade de reciclagem e tratamento especializado, apesar do elevado consumo de água e alta concentração de surfactantes, além de outros produtos químicos.

Entre esses compostos podem ser mencionados os surfactantes, amaciantes, alvejantes, tinturas, fibras de tecidos, enzima, gomas e contaminantes diversos. Desta forma, o efluente gerado contem elevada carga orgânica, sólidos suspensos, coloração, entretanto, baixa tensão superficial.

A utilização de surfactantes é amplamente distribuída por diversos setores, sendo encontrados em grandes quantidades em ambientes domésticos, comerciais e industriais, principalmente no que diz respeito à lavagem de roupas. Na composição dessas águas residuárias, o surfactante aniônico alquilbenzeno linear sulfonado (LAS - *Linear Alkylbenzene Sulphonate*) é o principal agente de limpeza.

Apesar do consumo expressivo de detergentes no Brasil, a falta de tratamento de esgoto doméstico nas regiões urbanas tem causado efeitos ambientais indesejáveis, como a formação de espumas nas águas fluviais. As espumas formadas acarretam problemas ambientais graves, tais como, a dispersão de poluentes pelos ventos espalhando produtos tóxicos a grandes distâncias e o comprometimento da aeração do lodo ativado, impedindo a floculação do material particulado mais pesado e o processo normal de decantação.

A lavagem de roupas de forma comercial em empresas de pequeno e médio porte é uma atividade comum nos dias atuais, sendo importante setor de serviços. Assim, estes estabelecimentos merecem atenção especial para suas águas residuárias, descarte e tratamento adequado.

São poucas lavanderias que fazem o tratamento de suas águas residuárias. Dentre os processos empregados estão o físico-químico (coagulação-floculação) ou biológico, muitas

vezes com resultados ineficientes. Entretanto, a falta de conhecimento sobre as características da água residuária e de alternativas de processos de tratamento, pouca área disponível (uma vez que a maioria das lavanderias se encontra em área urbana) e a falta de mão de obra especializada são as principais dificuldades encontradas.

O tratamento de águas residuárias de lavanderias é tema de grande desafio nos dias atuais, visto que o crescimento populacional intenso, notadamente em países em desenvolvimento como o Brasil, não é acompanhado pelas obras de infra-estrutura necessárias, em especial relacionadas ao saneamento básico.

Como consequência, é estabelecida situação de precariedade em relação à saúde da população e à conservação ambiental. Desta forma, é de extrema importância o desenvolvimento de tecnologias eficientes e econômicas que viabilizem a aplicação de sistemas de tratamento de forma ampla e satisfatória para a melhoria das condições de saneamento nessa área.

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2006, estima-se que, aproximadamente uma em cada seis pessoas não tem acesso à água potável e que a cada ano, morrem cerca de 1,6 milhão de pessoas no mundo devido ao consumo de água contaminada ou à falta de saneamento e higiene. Confirma-se assim, a importância do tratamento das águas residuárias como condição essencial para o bem estar da população e a manutenção da saúde pública e ambiental.

Nesse sentido, devem ser estudadas as possíveis fontes desses contaminantes, assim como, devem ser desenvolvidos melhores métodos analíticos para determinação e tratamento dos mesmos quando presentes no ambiente.

Estudos que visem desenvolver tecnologias eficientes para a remoção dos compostos presentes nessa água residuária e que permitam não somente a remoção, mas a degradação anaeróbia dos surfactantes em água residuária de lavanderia comercial justifica a relevância deste trabalho, buscando assim, alternativas a serem investigadas, uma vez que, estudos nessa linha de pesquisa ainda são escassos.

A motivação desse trabalho reside na possibilidade de avaliar a remoção e degradação do LAS com aplicação de tecnologia em reator anaeróbio de leito fluidificado com água residuária real, considerando-se que até o momento, a maioria dos trabalhos científicos nesta área está voltada para aplicação de reatores UASB e de leito fixo, além da utilização do LAS padrão (Sigma®) .

No Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP diferentes configurações de reatores foram avaliadas para remoção LAS, dentre elas, reator de fluxo ascendente e manta de

lodo (UASB) (OKADA, 2012), reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) (DUARTE *et al*., 2008), reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (ASBR) (DUARTE, 2006; BLANCO, 2012), reator anaeróbio de leito granulado expandido (EGSB) (DELFORNO, 2011) e reator anaeróbio de leito fluidificado (OLIVEIRA, 2010, CAROSIA, 2011; FERREIRA, 2012). As melhores eficiências de remoção de LAS padrão foram obtidas com esta última configuração de reator.

A aplicação do reator de leito fluidificado possibilita melhor transferência de massa, por conseguinte, maior contato dos microrganismos com o surfactante e remoção, em relação àquelas obtidas em reator de leito fixo, devido principalmente, ao maior controle da espessura do biofilme.

No presente trabalho foi operado reator de leito fluidificado em escala de bancada preenchido com areia como material suporte para remoção de LAS oriundo de água residuária de lavanderia comercial. Outros parâmetros foram também monitorados durante o período de operação do reator, tais como, pH, alcalinidade, ácidos orgânicos totais, sulfato, nitrito, nitrato e fosfato. Análises de Biologia molecular foram realizadas com a finalidade de caracterizar a comunidade microbiana envolvida no processo.

2 – OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a remoção e degradação do surfactante aniônico LAS de água residuária de lavanderia comercial em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF). Para isso os objetivos específicos abaixo foram propostos:

- Avaliar a remoção de matéria orgânica e LAS em diferentes condições operacionais e nutricionais do RALF;
- Avaliar a remoção e adsorção de compostos orgânicos xenobióticos da água residuária de lavanderia diluída no afluente do reator na última etapa de operação do RALF;
- Quantificar e caracterizar as bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas;
- Caracterizar a comunidade microbiana do RALF (etapas IV e V) por meio de PCR/DGGE e 454-Pirosequenciamento do rRNA 16S;
- Avaliar o potencial metanogênico do lodo na presença da água residuária de lavanderia em diferentes concentrações de LAS.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Surfactantes

Agentes de limpeza de diversas origens vêm sendo utilizados pelo ser humano ao longo do tempo. Na composição da maioria destes agentes de limpeza, são empregadas substâncias como surfactantes.

Dentre os agentes mais utilizados, estão o sabão e detergente, sendo que no primeiro caso refere-se a sais de ácidos graxos de cadeia longa, como o estearato de sódio. Uma desvantagem do sabão enquanto agente de limpeza, refere-se à formação de sais insolúveis com cátions divalentes, como o Ca^{2+} e Mg^{2+}, comumente presente em águas duras. A precipitação do sabão com estes íons dificulta o processo de formação de espuma e compromete o processo de limpeza (BIGARDI, 2003).

Os detergentes sintéticos são mais solúveis do que o sabão e, portanto, mais eficiente, aliando a vantagem de não formar compostos insolúveis com íons divalentes (BAIRD, 1995).

Detergentes contêm surfactantes (tensoativos), agentes clareadores e agentes auxiliares ou aditivos. Apesar dos surfactantes serem usados como substituto menos tóxico para o sabão (SMULDERS, 2002), eles são encontrados em numerosos produtos de limpeza doméstica e produtos de cuidados pessoais e, portanto, são fontes dominantes de compostos orgânicos xenobióticos (COXs) de águas cinza (ERIKSSON et al., 2003) e esgoto sanitário (BRUNNER et al., 1988).

Os tensoativos são compostos orgânicos que diminuem a tensão superficial da água, propiciam a limpeza de superfícies e emulsionam óleos formando suspensões. Estes compostos são usados por diversos setores da indústria, principalmente, de detergentes, indústria têxtil, indústria alimentícia, tinturarias, cosmética, manufatura de papel, mineração, entre outros (COSTA et al., 2007).

Dentre os detergentes empregados em lavanderias, os surfactantes são os mais importantes ingredientes, compreendendo de 15% a 40% do total da formulação do produto (SCHEIBEL, 2004).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, devido à preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com nova legislação de controle ambiental levou-se à procura por surfactantes naturais (biodegradáveis) como alternativas aos produtos existentes.

Os surfactantes são moléculas constituídas de uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. A parte apolar da molécula, frequentemente, é uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto, a parte polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não iônica ou anfotérica (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A parte hidrofílica e hidrofóbica dos surfactantes pode reagir facilmente com as subestruturas polar e apolar de macromoléculas de proteínas e celulose em misturas compostas. Devido a essas interações, os surfactantes aniônicos podem diminuir a energia de interação entre as interfaces de misturas heterogêneas pela adsorção em sistemas biológicos, na presença de água, óleo e polietileno (CSERHÁT et al., 2000). Devido a essa característica anfifílica, os surfactantes conseguem remover impurezas que a água sozinha não conseguiria (SOLOMONS, 1996).

No Brasil, a Portaria n° 112 de 14 de maio de 1982, do Ministério da Saúde, define que as substâncias tensoativas aniônicas utilizadas na composição de sabões e detergentes de qualquer natureza, devem ser biodegradáveis.

É importante enfatizar que os surfactantes estão entre os principais poluentes encontrados no esgoto sanitário (METCALF; EDDY, 2003). Segundo Piveli (2002), 3 $mg.L^{-1}$ a 6 $mg.L^{-1}$de surfactantes estão presentes em esgoto sanitário. Aparentemente, esses valores não interferem na eficiência da remoção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) da estação de tratamento de efluentes (ETE) e sua concentração é reduzida por adsorção às partículas que sedimentam nos decantadores primários ou por degradação biológica em reatores aeróbios e anaeróbios.

Bosquilha (2002) determinou as concentrações de surfactantes no sistema estuarino de Santos, São Vicente e baia de Santos. Segundo este autor, em mais de 30% das amostras obteve-se valores inferior a 0,1 $mg.L^{-1}$ no verão, provavelmente, devido ao efeito das altas temperaturas que favorecem a biodegradação do surfactante, além da maior carga hídrica do sistema. No inverno, a concentração média de surfactante foi inferior a 0,26 $mg.L^{-1}$.

Concentrações maiores de surfactante no meio líquido podem originar agregados moleculares chamados de micelas, possuindo ambas as regiões estruturais, hidrofílica e hidrofóbica, que dinamicamente se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de certa concentração crítica (CMC). As propriedades de limpeza dos surfactantes devem-se à formação dessas micelas (BORSATO et al., 1999).

Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros, quando a concentração de surfactante está abaixo, porém, próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas (MANIASSO, 2001) (Figura 3. 3.1). Em concentração

acima da CMC, as micelas possuem diâmetro entre 3-6 mm o que representa de 30-200 monômeros. A CMC depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, temperatura, etc.).

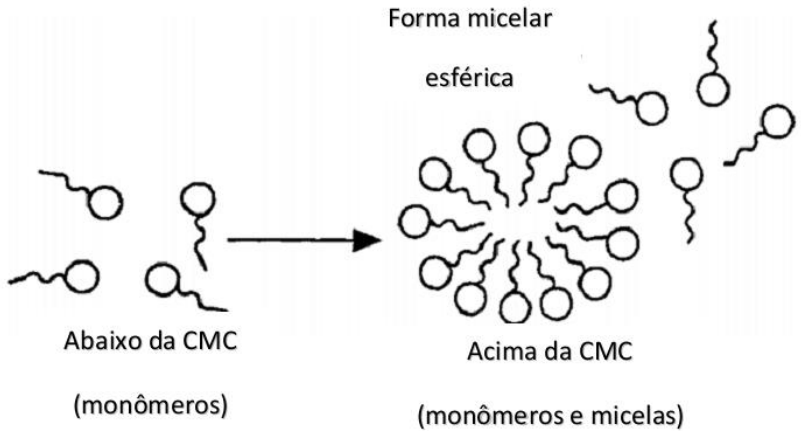

Figura 3.1 - Formação do agregado micelar (MANIASSO, 2001)

3.2 – Alquilbenzeno Linear Sulfonado

Dentre os surfactantes sintéticos, o LAS é o mais utilizado mundialmente e é empregado na produção da maioria dos detergentes, substituindo o ABS (alquilbenzenos ramificados) (MANIASSO, 2001).

O LAS é um tensoativo aniônico constituído de uma mistura de homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares com átomos de carbono de C_{10} a C_{16} e predominância de C_{10} a C_{13} (PENTEADO, 2006) (Figura 3.2).

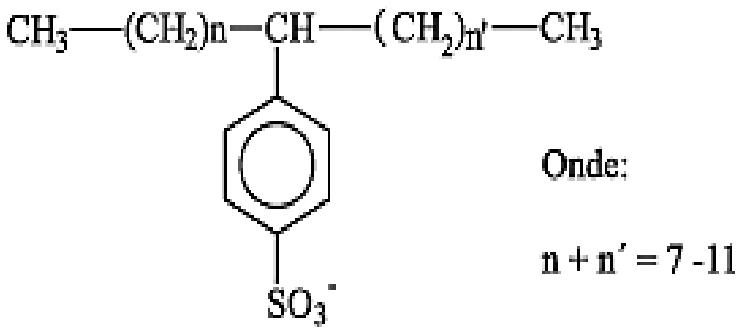

Figura 3.2 - Estrutura molecular do LAS (PENTEADO, 2006)

No grupo fenila do LAS pode ocorrer substituição em todas as posições dos átomos de carbono da cadeia linear, exceto na posição do carbono 1, podendo formar 26 moléculas diferentes (WOLF; FEIJTEL, 1998).

Todo surfactante aniônico é moderadamente solúvel devido a seu caráter anfifílico, tanto em água, quanto, em solvente orgânico, o que torna difícil sua detecção, identificação e quantificação no ambiente. Além disso, estes surfactantes não são voláteis e não são hidrolisados por ácidos ou bases (LI; SCHRÖDER, 2000).

No Brasil, entre 0,89 $mg.L^{-1}$ a 10,5 $mg.L^{-1}$de LAS foram obtidos em efluente proveniente da estação de tratamento de esgoto de Suzano no estado de São Paulo. (ZAGATTO; GOLDSTEIN, 1991).

Eichhom et al. (2002) monitoraram LAS no rio Macacu, em Niterói, Rio de Janeiro, com fornecimento de água para 2,5 milhões de pessoas. A determinação do LAS foi realizada por cromatografia líquida e espectrometria de massa. Segundo os autores, 0,01 $mg.L^{-1}$ a 0,15 $mg.L^{-1}$ de LAS foram detectados neste rio. Do ponto de vista ecológico, acima de 0,15 $mg.L^{-1}$ de LAS já pode ocasionar efeitos adversos à biota.

3.3 – Efeitos inibitórios dos surfactantes

Os surfactantes afetam células vivas provocando danos ao funcionamento e integridade da membrana plasmática. Segundo Lee (1970), o mecanismo que provoca essa toxicidade dá-se pelas reduções na absorção de nutrientes essenciais, no consumo de oxigênio e na liberação de produtos metabólitos tóxicos, causadas pela adsorção do surfactante na superfície celular.

Estes compostos podem ainda alterar a pigmentação e a morfologia dos microrganismos, além de ativar ou inibir enzimas, alterar a estrutura polipeptídica e mudar a carga superficial da molécula (HOUSAINDOKH et al., 1993).

A poluição por surfactantes aniônicos causa graves modificações à biota, uma vez que atividades de muitos organismos aquáticos dependem fundamentalmente da tensão superficial da água (RAND, 1995).

A presença desses compostos sintéticos nas águas naturais leva a prejuízos de ordem estética provocados pela formação de espumas, que podem causar efeitos tóxicos ao ecossistema aquático e provocar alteração na biodiversidade envolvida com a sua degradação (PIVELLI, 2002).

O processo de adsorção faz com que a toxicidade do LAS aumente conforme o aumento da cadeia alquílica ou aumento do peso molecular (VERGE et al., 2001). O efeito tóxico desse surfactante está também relacionado à posição do anel aromático; ou seja, quanto mais próximo da extremidade da cadeia alquílica, mais tóxica será a molécula (PRATS et al., 1997).

A inibição das atividades metanogênica e acidogênica pela presença entre 3 $mg.L^{-1}$ e 59 $mg.L^{-1}$de LAS foi avaliada para IC_{50} (concentração de inibição para 50% dos indivíduos testados) e a presença de LAS em até 10 $mg.L^{-1}$ inibiu 50% da atividade metanogênica (MADSEN; RASMUSSEN, 1996; GARCIA et al., 2006). Madsen e Rasmussen (1996) observaram inibição de 50% da atividade acidogênica a partir de 18,9 $mg.L^{-1}$ de LAS.

As membranas das células radiculares de plantas expostas ao LAS ficaram destruídas, além de alterações na permeabilidade e nos processos fisiológicos e fotossintéticos (MIEURE et al., 1990). Para organismos aquáticos, a toxicidade aguda de LAS varia entre 1,7 $mg.L^{-1}$ e 270 $mg.L^{-1}$, sendo *Daphnia magna* a espécie mais sensível (VERGE; MORENO, 2000).

O LAS provoca ainda impactos negativos a comunidade bentônica de ambiente marinho (QUIROGA et al., 1989), posto que a alta força iônica do meio faz a concentração micelar crítica diminuir, o que consequentemente, provoca diminuição na solubilidade do LAS. Os mesmos autores destacaram a toxicidade do LAS em larvas e alevinos marinhos.

A toxicidade do LAS em organismos aquáticos foi avaliada em *Daphnia magna* e no peixe *Cyprinuscarpio* (ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA, 1996), além da absorção deste tensoativo e seus intermediários de degradação em algumas espécies de algas (SÁEZ et al., 2001).

Além disso, Mauffret et al. (2010) verificaram em estudo de potencial toxicológico realizado com o molusco gastrópode *Hydrobia ulvae* que homólogos de cadeias maiores (13 carbonos) de LAS foram mais tóxicos que aqueles de cadeias menores (10 carbonos).

Garland e colaboradores (2004) verificaram a toxicidade dos surfactantes (Aniônico – lauril sulfato de sódio, anfotérico - cocamidopropilbetaíne e não iônico - álcool polietoxilado) com efeitos negativos em *Triticum aestivum* (trigo comum). Essa espécie foi considerada sensível ao surfactante aniônico (redução no crescimento em 20-25%), em concentração superior a 250 $mg.L^{-1}$

3.4 – Impacto ambiental causado pelos surfactantes

A importância dos surfactantes nos produtos de limpeza é indiscutível, entretanto, a utilização abusiva dos tensoativos causa prejuízo ao ambiente, tais como, inibição ou paralisação da depuração natural ou artificial dos rios.

Na década de 50 foi observado que a introdução dos novos surfactantes de uso doméstico (LAS) provocava excessiva formação de espuma nas Estações de tratamento de efluentes (ETEs) e nos rios (BERNA et al., 2007), além de provocar drástica mudança no ambiente para a vida dos seres aquáticos.

Este fato ocorre devido à formação de espumas estáveis em função da presença de tensoativos no meio líquido, levando assim a alteração da disponibilidade de oxigênio via membranas dos organismos aquáticos e eutrofização das águas superficiais devido à presença de fosfatos na sua composição (COSTA, 2006).

A partir do aumento indiscriminado da utilização de surfactantes sintéticos, nas últimas décadas têm aumentado os problemas ecológicos e de saúde pública. Muitas vezes os surfactantes são encontrados em concentração acima do permitido pela legislação. De acordo com a Resolução CONAMA n° 357 de 2005, o valor permitido do surfactante aniônico é de 0,5 $mg.L^{-1}$.

Entre os poluentes ambientais, os surfactantes são importante fonte de poluição industrial, comercial e doméstica, principalmente nos grandes centros urbanos. No mundo todo, a produção de surfactantes excede três milhões de toneladas ao ano (BARROS et al., 2007).

Quando presente no solo o surfactante pode provocar efeitos negativos por facilitar a liberação de poluentes ambientais polares e apolares, tais como, praguicidas, pentaclorofenol, triclorobenzeno, hidrocarbonetos poliaromáticos, produtos petroquímicos etc. Por outro lado, para que o surfactante depositado no solo seja degradado é necessária presença de consórcio microbiano (MORAES, 2004).

Além disso, pode ocorrer lixiviação e contaminação do lençol freático. Desse modo, não somente os surfactantes irão atingir a água subterrânea, como também poderão arrastar os poluentes orgânicos hidrofóbicos para os corpos d’água (DENTEL et al., 1993).

São importantes novas formulações de surfactantes que proporcionem menor impacto ao ambiente. Por fim, os esforços devem ser direcionados para que seja possível estabelecer métodos de controle mais eficientes e definir valores limites para determinados componentes

dentre esses surfactantes. Diante desses fatos, estudos envolvendo a degradação anaeróbia de surfactantes em águas residuárias de lavanderia são de extrema importância.

3.5 – Água residuária de lavanderia

A água cinza é geralmente originada pelo uso de sabão ou de outros produtos para lavagem do corpo, roupas ou limpeza em geral (JEFFERSON et al., 1999). Essa água residuária varia em qualidade de acordo com a localidade e nível de ocupação da residência, faixa etária, estilo de vida, classe social, costume dos moradores (NSW HEALTH, 2000), além da sua origem, ou seja, proveniente de lavatório, chuveiro, máquina de lavar, etc. (NOLDE, 1999).

O uso de água cinza para a fertirrigação têm se tornado prática comum especialmente nas regiões áridas e semi-áridas. Em muitos países não existem normas e guias específicas para o reuso de água cinza e, por isso, são comumente usadas sem tratamento adequado (GROSS et al., 2003).

Pesquisas visando o tratamento, reciclagem ou reuso deste tipo de água residuária tem ocorrido principalmente em países onde o custo da água é mais elevado (COSTA et al., 1997). Em muitos estados da Austrália e EUA, foram estabelecidas normas para o uso de água cinza. Entretanto, nessas diretrizes é especificado principalmente questões de saúde pública e pouco dos potenciais impactos ao ambiente (ADEQ, 2003).

Estima-se que 10% de toda água consumida no meio urbano, seja destinada a lavagem de roupas, o que torna importante o estudo dessa água residuária (MENEZES, 2005). O maior volume dessa água residuária é gerado nas etapas de lavagens, alvejamento, tingimento, desengomagem e acabamento. Possuem elevada carga poluidora aliada ao elevado teor de compostos orgânicos, como gomas, graxas, pectinas, álcoois, ácido acético, corantes, surfactantes e compostos inorgânicos como hidróxido de sódio, carbonatos, sulfetos e cloretos, resultante das várias etapas do processo. Adicionalmente, possuem cor intensa, alta salinidade e toxicidade à vida aquática, devido principalmente a diminuição da quantidade de oxigênio dissolvido (ERIKSSON; DONNER, 2009).

A concentração de produtos químicos nessa água residuária é alta devido ao surfactante empregado, o qual pode conter sódio, fosfato, boro, amônia e nitrogênio. Além de apresentar sólidos em suspensão e turbidez elevada e alta demanda por oxigênio. Assim, podem causar

danos ambientais e à saúde pública se forem lançados no solo sem tratamento (RAPOPORT, 2004).

Em uniformes industriais, cujos tecidos são mais resistentes e possuem contaminantes mais agressivos, os reagentes empregados muitas vezes são diferenciados. Algumas lavanderias realizam também o tingimento de roupas, liberando em seu efluente corantes orgânicos (anilinas) de difícil tratabilidade (MELLO, 2000).

A eficiência do surfactante e outros agentes aumentam com o emprego de álcalis. Os álcalis mais usados são carbonato de sódio, fosfato trissódico e silicatos alcalinos. A soda cáustica é utilizada em alguns casos, todavia, é mais empregada quando conjugada com álcalis menos ativo, os quais atuam como agentes de tamponamento. Já os fosfatos complexos e agentes de remoção têm seu emprego limitado como “amolecedores” da água e ajudam a desmanchar o sabão nos tecidos (BRAILE; CAVALCANTE, 1993).

Para água residuária de lavanderia geralmente emprega-se tratamento físico-químico (coagulação-floculação com sulfato de alumínio) seguido por sedimentação e filtração. A complementação do processo ocorre por meio do estágio de polimento por adsorção em carvão ativado ou processo biológico (MENEZES, 2005).

Segundo Matsuo e Nishi (2000), o uso de carvão ativado em águas residuárias de lavanderia tem como objetivo a remoção de compostos orgânicos solúveis, especialmente, surfactante. O uso do carvão ativado no tratamento de águas residuárias da indústria têxtil já foi bastante estudado, porém a quantidade de carvão ativado utilizada é bastante alta tornando o processo inviável.

O tratamento biológico de água cinza é requerido para remover o material biodegradável. A demanda por sistemas de tratamento biológicos estimulou a aplicação desse tipo de processo em substituição aos tradicionais processos físico-químicos, nos quais para sua aplicação tem-se consumo de energia, além da geração de lodo.

A adoção de lagoas de estabilização como alternativa para o tratamento de água cinza somente é válida em empresas que possuem área disponível para a sua construção, não sendo o caso da maioria das lavanderias (BRAILE; CAVALCANTE, 1993).

Ge et al. (2004) aplicaram processo de eletrocoagulação-eletroflotação em um mesmo reator em planta piloto para o tratamento de água residuária de lavanderia. Segundo os autores, ocorreu remoção de turbidez, DQO, fosfatos e surfactantes (avaliado pelo método de substâncias ativas ao azul de metileno). Os autores observaram eficiência de remoção de surfactantes acima de 90% para 8,3 a 72,3 $mg.L^{-1}$afluente.

Segundo Lima et al. (2005), em Toritama (Pernambuco), existem 60 lavanderias industriais, cuja principal atividade econômica é a fabricação de vestuário de “Jeans”. O tratamento da água residuária é feito por coagulação com sulfato de alumínio, seguido por filtração em areia. A água retorna ao processo em etapas preliminares do processamento do tecido, tais como a estonagem.

Um edifício na Universidade de Kalmar, na Suécia, com capacidade para 500 alunos, foi equipado com sistema de reuso de água cinza (GÜNTHER, 2000). O tratamento utilizado era composto por lagoas e *wetlands* (*wetparks*) e tinha como objetivo remoção de nutriente. A água residuária gerada no prédio, originada da lavagem de mão e de pratos, era disposta nas raízes da vegetação plantada e armazenada em uma lagoa. Esse processo repetia-se por três vezes. Após a última lagoa, a água seguia para um filtro de areia e era coletada em um reservatório. Ao final de um ano de tratamento observou-se remoção de 24,4% de nitrogênio total (13,5 $g.pess^{-1}.dia^{-1}$) e 95,2% de fósforo total (2,1 $g.pess^{-1}.dia^{-1}$).

Prats et al. (1997), avaliaram a remoção de surfactante aniônico (alquilbenzeno linear sulfonado) em unidade de tratamento de efluentes composta de sistema convencional de lodos ativados. Eficiência de até 95% (0,14 – 15,7 $mg.L^{-1}$) foi obtida no tratamento secundário, com grande parte sendo adsorvida no lodo (5,2 – 16 $mg.g^{-1}$).

O tratamento de água de lavanderia tem sido estudado por aplicação de lodo ativado (RIBEIRO; CORRÊA, 2013), reator de leito fluidificado (NOLDE, 1999), biorreator de membranas (JEFFERSON et al., 2000), filtro lento de areia (JEFFERSON et al., 1999) e *wetlands* (OTTERPOHL et al., 2003).

3.6 – Biodegradação anaeróbia do LAS

A aplicação de processo anaeróbio de tratamento de água residuária é notadamente vantajosa devido às reduzidas demanda energética, de área e por equipamentos sofisticados, aliadas a sua flexibilidade de aplicação em pequena e grande escala, bem como a baixa produção de lodo (PARKIN; OWEN, 1986).

Segundo Berna et al. (2007), a maioria dos surfactantes lançados no ambiente estará exposta à degradação em condição aeróbia e, apenas 20% serão potencialmente degradados por via anaeróbia.

Embora o LAS seja reconhecidamente degradado por processo aeróbio, na estação de tratamento boa parte dele fica associada aos sólidos suspensos e é conduzida ao processo de sedimentação primária, dessa forma, escapa do processo aeróbio (DENTEL et al.,1993).

Em 1987, já havia sido reportado estudo de degradabilidade de surfactantes aniônicos (álcool linear sulfato) e não iônicos (álcool etoxilado de cadeia linear e álcool etoxilado de cadeia ramificada) por culturas anaeróbias enriquecidas em reator de leito fixo (SALANITRO; DIAZ, 1995).

Todavia, a velocidade com que essa degradação ocorre está relacionada com o meio e, principalmente, com os microrganismos presentes. Esses organismos promovem sequencialmente, a oxidação da cadeia alquílica, dessulfonação, oxidação e ruptura do anel aromático (SCHÖRBERL, 1989).

A degradação desses compostos, em condição aeróbia, segue ordem cinética, cuja mineralização pode ocorrer entre 15 e 33 horas, da cadeia alquílica linear, em seguida no grupo sulfonado e termina no anel benzênico (RAND, 1995), sendo a etapa que abrange a ruptura da ligação do radical alquila com o anel aromático sulfonado a mais difícil (CAVALLI et al., 1993).

A biodegradação primária implica na perda das propriedades características da molécula. No caso dos surfactantes, refere-se a perda da sua capacidade espumante ou como redutor da tensão superficial. A biodegradabilidade secundária é obtida quando a molécula se divide em segmentos menores. Na biodegradação final ocorre redução à estrutura mais simples como CH_4, CO_2 e H_2O (MASTROTI et al., 1998).

As bactérias anaeróbias podem utilizar os sulfonados aromáticos como fonte de energia e carbono e como fonte de enxofre. Porém, as etapas da degradação anaeróbia do LAS não são ainda bem definidas (LARSON et al, 1994).

Alguns autores (STEBER; BERGER, 1995; BALSON; FÉLIX, 1995) discutiram rotas de biodegradação de surfactantes aniônicos e não-iônicos detalhadamente. Os pesquisadores detectaram que a biodegradabilidade de surfactantes, bem como a taxa de degradação e a toxicidade dos produtos metabolizados da degradação variavam dependendo do tipo de surfactante. Um exemplo disto é o LAS, cuja natureza linear implica em grande toxicidade, mesmo possuindo biodegradação relativamente rápida.

Brunner et al. (1998) estimaram a presença de LAS em 29 amostras de lodo de digestores anaeróbios e estabilizadores aeróbios em oito ETEs, localizadas na Suíça. Os autores observaram 0,95 $mg.L^{-1}$ a 3,9 $mg.L^{-1}$ de LAS no afluente e 0,07 $mg.L^{-1}$ a 0,33 $mg.L^{-1}$ no efluente.

A completa mineralização do LAS foi obtida em período de 48 a 72 horas pela utilização do consórcio microbiano com *Pantoea agglomerans* e *Serratia odorífera 2*, por meio do crescimento em meio mínimo e caldo nutriente utilizando LAS (200 $mg.L^{-1}$) como única fonte de carbono (KHLEIFAT, 2006).

Segundo Hera (2009), a remoção de LAS pode ocorrer pela combinação de três processos: precipitação, adsorção e biodegradação. A principal forma de remoção é a degradação microbiana, geralmente em torno de 80% (PAINTER; ZABEL, 1989).

Várias condições nutricionais utilizando culturas puras ou mistas têm sido empregadas na avaliação da degradação de surfactantes (CSERHÁTI et al., 2002). Gavala e Ahring (2002) estudaram o efeito inibitório de LAS nas etapas de metanogênese e acetogênese. LAS inibiu, tanto a acetogênese do propionato, quanto a metanogênese do acetato e hidrogênio.

Abboud et al. (2007) observaram aumento de 60% a 90% da degradação de LAS com a adição de outras fontes de carbono e nitrogênio, em consórcio de bactérias anaeróbias facultativas. Após 150 h de incubação, apenas 60% do LAS foi degradado, e com a adição de fontes alternativas de carbono (glicose, sacarose, maltose e manitol) e nitrogênio (nitrato de amônio, cloreto de amônio, caseína, extrato de levedura e triptona) todo o surfactante foi degradado.

A degradação anaeróbia do LAS têm sido avaliada em diversas configurações de reatores anaeróbios, tais como, de manta de lodo e fluxo ascendente (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* – UASB) (MOGENSEN et al., 2003; SANZ et al., 2003; LOBNER et al., 2005, OKADA, 2012), horizontal de leito fixo (DUARTE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009), bateladas sequenciais (DUARTE et al., 2010), reator de leito de manta de lodo granulado expandido (DELFORNO et al., 2012) e reator de leito fluidificado (OLIVEIRA, 2010; CAROSIA, 2011, FERREIRA, 2012). Vale ressaltar que em todos esses casos foi feita avaliação com LAS padrão (Sigma®) ou de detergente de uso doméstico, e no presente estudo foi utilizada água residuária real diluída em substrato sintético.

3.7 – Microrganismos envolvidos na degradação de LAS

No ambiente várias espécies de microrganismos interagem na degradação do LAS. Jimenez et al. (1991) estudaram consórcio microbiano constituído por espécies de

Pseudomonas sp. e *Aeromonas* sp. LAS (1 µg.L^{-1}) foi adicionado como única fonte de carbono, com degradação de mais de 25%.

Os microrganismos anaeróbios podem utilizar o grupo sulfonado de três formas: a) como receptor de elétron; b) como doador de elétron para a respiração anaeróbia e c) como substrato para a fermentação. A redução do grupo sulfonado foi descoberta em cultura pura de *Desulfovibrio desulfuricans*, isolada de sedimento marinho. Esse organismo foi capaz de reduzir o organossulfonado em combinação com lactato como doador de elétrons (DENGER; COOK, 1999).

Almendariz et al. (2001) estudaram a degradação do LAS em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) operado em dois estágio, um acidogênico e outro metanogênico. No reator acidogênico foi adicionado *Pseudomonas aeruginosa* que, sob condição aeróbia utiliza LAS como fonte de carbono. Observou-se 41% de degradação para 20 mg.L^{-1} de LAS afluente, que ocorreu principalmente no primeiro estágio pelas bactérias acidogênicas. No entanto, no reator metanogênico os microrganismos foram inibidos pela presença de LAS, porém recuperados quando o surfactante foi retirado da alimentação.

Khleifat (2006) investigou a biodegradação do LAS por consórcio de bactérias facultativas. Foram utilizadas as espécies *Pantoea agglomerans* e *Serratia odorífera 2* isoladas de lodo de estação de tratamento de esgoto. Estes microrganismos foram submetidos a duas condições de crescimento: (1) em meio mínimo M9 e (2) em caldo nutriente, separadamente e em consórcio, nas duas condições nutricionais e na presença de LAS.

Os reatores com células suspensas no estudo de Khleifat (2006) foram mantidos a 32°C e 250 rpm. Para 200 mg.L^{-1} de LAS como única fonte de carbono foi observada degradação de LAS de 70% em caldo nutriente e 36% em meio mínimo (M9). No entanto, outras condições foram estudadas, tais como, variação do co-substrato (glicose, sacarose, maltose, manitol e ácido succínico) e da fonte de nitrogênio (cloreto de amônio, triptona, extrato de levedura, nitrato de amônio e caseína). Em todos os casos, a degradação de LAS foi maior na presença do co-substrato de carbono e fonte de nitrogênio atingindo a mineralização em 48-72 horas. Esses trabalhos corroboram a hipótese de que é necessário consórcio de microrganismos para a degradação do surfactante aniônico LAS.

Oliveira et al. (2009) realizaram a caracterização filogenética do Domínio Bacteria da biomassa de reator de leito fluidificado usado na degradação anaeróbia de alquilbenzeno linear sulfonado (padrão Sigma®). Os autores caracterizaram a biomassa do biofilme da pérola de vidro e areia usados como materiais suportes. Os clones foram relacionados a diferentes classes, tais como, Anaerolineae, Acidobacteria, Actinobacteria, Sphingobacteria, Deinococci, Bacilli,

Clostridia, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Verrucomicrobia, e bactérias não cultivadas.

Duarte et al. (2010) identificaram os microrganismos presentes em reator operado em bateladas sequenciais usado na remoção de LAS, por meio do sequenciamento e análise filogenética do rRNA 16S. O inóculo foi proveniente de UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura. Os autores utilizaram amostra da última etapa de operação (22 $mg.L^{-1}$ de LAS) e alimentação sem co-substratos. Foi constatada ampla diversidade de microrganismos. Os clones foram relacionados a nove Filos, sendo eles Bacteroidetes (35%), Proteobacteria (18%), Verrucomicrobia (11%), Acidobacteria (5%), Chlorobi (3%), Firmicutes (3%), Actinobacteria (2%) e Chloroflexi (2%). A porcentagem de bactérias não classificadas representou 13% do total sequenciado. Segundo os autores supracitados, *Pseudomonas* spp., provavelmente foi responsável pelo degradação do LAS. Bactérias semelhantes a *Syntrophus* podem ter usado o enxofre da molécula de LAS, enquanto aquelas similares a *Dechloromonas* podem ter usado o anel aromático da molécula de LAS como fonte de carbono e energia.

Carosia (2011) ao operar reator de leito fluidificado para remoção de LAS oriundo de sabão em pó de uso doméstico obteve 88 clones referente à biomassa da areia, usada como material suporte. Dentre os clones relacionados ao Filo Proteobacteria, 38 pertenciam a Classes Betaproteobacteria, Ordem Rhodocyclales. Outros 27 clones foram relacionados à Classe Deltaproteobacteria, sendo 26 clones pertencentes à Ordem Desulfomonadales e um a Ordem Desulfovibrionales. Em relação à Classe Epsilonproteobacteria foram obtidos 11 clones e, apenas um relacionado à Classe Gammaproteobacteria.

Oliveira (2010) e Carosia (2011) encontraram bactérias semelhantes a *Sediminibacterium* (bacilos Gram negativos) em reator anaeróbio de leito fluidificado usado na remoção de LAS, sendo que a primeira autora usou o LAS padrão e a segunda detergente de uso doméstico. Embora, ainda sejam pouco conhecidas as características fisiológicas dessa bactéria, sua presença em reator anaeróbio com LAS sugere que pode estar associada às vias de degradação do surfactante ou participando da fermentação (OLIVEIRA, 2010).

É interessante notar que alguns filos foram constantes nas diferentes configurações de reatores estudadas para a remoção de LAS, entre eles foram constatados Firmicutes e Proteobacteria. Representantes pertencentes ao filo Proteobacteria foram observados por Delforno (2011), Oliveira et al. (2010) e Duarte et al. (2010), em reator EGSB, reator anaeróbio de leito fluidificado e reator operado em bateladas sequenciais, respectivamente. Todavia as classes predominantes em cada trabalho foram distintas.

Delforno (2011) constatou em reator EGSB similaridade de bactérias com a classe Deltaproteobacteria. Oliveira et al. (2010) observaram similaridade de bactérias com a classe Betaproteobacteria. Duarte et al. (2010) encontraram semelhança com microrganismos da classe Alfaproteobacteria. Provavelmente, as diferenças encontradas entre os trabalhos citados podem ser atribuídas às distintas configurações de reatores, características hidráulicas, composição nutricional e origem do inóculo.

3.8 – Reator de Leito Fluidificado

O reator de leito fluidificado é uma tecnologia que tem sido usada desde 1970 para tratamento de água residuária industrial. A partir de então muitos reatores em escala laboratorial e piloto foram construídos e passaram a ser estudados, principalmente, nos Estados Unidos e Europa (GONÇALVES et al., 2001). Essa configuração é considerada uma das mais recentes inovações tecnológicas para o tratamento de água residuária (MENDONÇA, 2004; SILVA, 1985).

Este reator possui concepção vertical com fluxo ascendente de massa líquida, que promove a dispersão das partículas sólidas que servem de suporte para adesão dos microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica (METCALF; EDDY, 2003).

A movimentação das partículas suporte é de fundamental importância para o controle operacional, formação dos consórcios microbianos e eficiência do reator (BRAGA, 1989). Nessa configuração ocorre a suspensão do sólido pela ascensão do fluido em velocidade suficientemente elevada para causar a flutuação e movimentação vigorosa das partículas e favorecer as transferências de calor e de massa (WEBER, 2006).

Oliveira et al. (2009) verificaram máximas eficiências de remoção de DQO e LAS de 97±2% e 99±2%, respectivamente, ao utilizarem a degradação anaeróbia do surfactante LAS em dois reatores de leito fluidificado preenchidos com pérolas de vidro e areia, para concentração afluente de 568±22 $mg.L^{-1}$e 18±4 $mg.L^{-1}$, respectivamente, para TDH de 12h.

Oliveira et al. (2010) avaliaram a remoção de LAS em reator de leito fluidificado preenchido com areia como material suporte e TDH de 18 horas. Os autores obtiveram remoção do LAS de 96±5% após 49 dias de operação para 24,4±3,7 $mg.L^{-1}$de surfactante afluente.

Carosia (2011) constatou ao trabalhar com reator de leito fluidificado que a presença do surfactante (LAS de sabão em pó de uso doméstico) não alterou significativamente a remoção

de DQO, cujos valores foram de 87,2±5,4% e 85,8±4,9%, antes e depois da adição de LAS, respectivamente, para 532±69 $mg.L^{-1}$ e 607±60 $mg.L^{-1}$de DQO afluente. Por meio do balanço de massa, a autora verificou que 42,4% do LAS adicionado no reator foram removido por degradação biológica, 0,9% ficou adsorvido na biomassa e 4,5% adsorvido na biomassa efluente. Nesse caso, o reator foi operado por 231 dias com 14,4±3,5 $mg.L^{-1}$de LAS.

A escolha dessa configuração de reator foi devido aos bons resultados de remoção de LAS padrão (Sigma®) obtidos por Oliveira (2010), Carosia (2011) e Ferreira (2012). Nesta pesquisa foi avaliada a remoção e degradação do surfactante aniônico LAS de água residuária de lavanderia comercial em reator anaeróbio de leito fluidificado. A aplicação deste modelo de reator ainda não foi estudada para a remoção e degradação desse surfactante de água residuária real. Outro fator importante deste estudo está relacionado às comunidades microbianas envolvidas no processo de degradação deste surfactante. A análise da diversidade microbiana é de fundamental importância, uma vez que, pode-se correlacionar a degradação do LAS a possíveis gêneros e espécies de bactérias presentes no biofilme do reator.

3.9 – Técnicas de biologia molecular

Por muitos anos, investigações microbiológicas em diversos ambientes foram feitas exclusivamente por microscopia e técnicas de cultivo em meios de cultura enriquecidos. No entanto, essas técnicas convencionais oferecem limitações quanto a análise da diversidade microbiana de um ecossistema, pois podem falhar ao simular as condições ambientais naturais dos microrganismos.

Além disso, muitos microrganismos não são detectáveis por microscopia convencional por permanecerem ligados a partículas de sedimentos (MUYZER et al, 1993), e muitos não são cultiváveis por exigirem condições ambientais difíceis de serem controladas em laboratórios. Amann et al. (1995) estimaram que aproximadamente 99% dos microrganismos não podem ser isolados de seus habitats naturais em culturas puras.

Desde meados de 1980, tem sido possível estudar a diversidade e ecologia de microrganismos em ambientes naturais por meio de técnicas de biologia molecular, alcançando-se assim, novas oportunidades para a análise da estrutura e da composição da comunidade microbiana nos mais diversos ecossistemas (HEAD et al., 1998).

Um dos métodos moleculares aplicados com sucesso é o uso de biomarcadores, moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e regiões variáveis, específicas de cada um. As regiões variáveis podem ser consideradas a impressão digital de um organismo (DEMIREV; FENSELAU, 2008).

O conceito de clonagem do DNA diretamente de uma amostra ambiental foi inicialmente sugerido por Pace et al. (1986) e primeiramente implementado por Schmidt *et al*. (1991). Os autores utilizaram fago λ para construir uma biblioteca de rRNA 16S a partir de amostras de água e comparou a diversidade picoplanctônica (organismos que medem entre 0,2 e 2 µm) do Oceano Pacífico com sequências de organismos cultivados do Oceano Atlântico.

O conhecimento da diversidade de microrganismos foi aprimorado com o estabelecimento da metagenômica. O termo metagenômica se refere a uma abordagem independente de cultivo baseada na investigação do DNA de muitas populações microbianas extraído diretamente de amostras ambientais (XU, 2006)

Com a aplicação dessas técnicas os pesquisadores passaram a ter acesso ao genoma de grande variedade de microrganismos que não haviam sido isolados em meio de cultura. Sendo assim, a abordagem metagenômica se caracteriza por contornar a necessidade de cultivo e, em função da vasta diversidade microbiana, ser conduzida em grande escala (HANDELSMAN, 1998).

Schloss (2004) avaliou a diversidade de procariotos por meio de 56.215 sequências do gene rRNA 16S depositadas no banco de dados de genes ribossômicos RDP (*Ribosomal Database Project*). Foram identificados mais de 50 filos, sendo metade deles compostos inteiramente por membros não cultivados.

O sequenciamento do gene rRNA 16S permite a identificação de células, mesmo em pequenas quantidades. Com isso, obtém-se informações sobre a composição taxonômica da comunidade microbiana. Desta maneira, a construção de bibliotecas genômicas de rRNA 16S representa uma excelente ferramenta para a análise da diversidade molecular de comunidades microbianas (JANSSEN, 2006; NOGALES et al., 2001).

A composição taxonômica das comunidades ambientais é um indicador importante da sua ecologia e função. Isto nos permite comparar a complexidade das comunidades e distingui-las em função do repertório metabólico representado pelas sequências dos metagenomas (TRINGE et al., 2005).

Desta forma, podemos correlacionar as características ambientais com os padrões de distribuição dos táxons microbianos (RAES et al., 2011).

A abordagem metagenômica é conduzida de forma que o DNA metagenômico seja analisado por meio de diversas ferramentas computacionais. Para isso, o desenvolvimento da bioinformática tem sido determinante, já que permite o processamento e análise da grande quantidade de dados como os gerados pelas técnicas de sequenciamento de segunda geração (454-Pirosequenciamento).

3.10 – Pirosequenciamento

O uso do sequenciamento por meio do método de Sanger e suas variações entre os anos 1990 e 2000, representou avanço significativo no estudo dos sistemas biológicos. A consolidação do sucesso da aplicação do método iniciou com o anúncio do sequenciamento do genoma humano (VENTER et al., 2001). Entretanto, limitações como a clonagem física de fragmentos e longos tempos de execução incentivaram o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento mais velozes, sensíveis e acuradas.

A técnica de pirosequenciamento vem sendo amplamente aplicada aos estudos da diversidade microbiana (TRINGE et al., 2005; EDWARDS et al., 2006; SOGIN et al., 2006; HUBER et al., 2007; DINSDALE et al., 2008; RODRIGUEZ-BRITO et al., 2010; RAES et al., 2011; OKADA, 2012; DELFORNO et al., 2014).

O pirosequenciamento é um método de sequenciamento de DNA, baseado no princípio do sequenciamento por síntese. A detecção da incorporação das bases difere do sequenciamento de Sanger, pois é baseada na detecção da liberação do pirofosfato, em vez de terminação da cadeia com dideoxinucleotídeos (NYRÉN, 1987). A abordagem desenvolvida para monitoramento do sequenciamento em tempo real sem a necessidade de eletroforese foi inicialmente proposto por Ronaghi *et al*. (1996).

De acordo com Nyrén (1987) o sistema de pirosequenciamento é constituído por um sistema enzimático que consiste de DNA polimerase, ATP (Trifosfato de adenosina) sulfurilase, luciferase e apirase.

Estas enzimas, de forma geral executam as seguintes funções: a DNA polimerase catalisa a polimerização de DNA. A produção de PPi (pirofosfato) liberado mediante ATP durante a polimerização é catalisada pela ATP sulfurilase. A luciferase catalisa a produção de luz a partir de ATP que é detectada durante o pirosequenciamento. Já a apirase é incluída no

pirosequenciamento para a degradação dos nucleotídeos não incorporados e ATP em excesso. O perfil de emissão da luz resultante da incorporação das bases pode ser observado através de um pirograma (NYRÉN, 1987).

Segundo Margulies et al. (2005), a ligação de adaptadores específicos aos fragmentos de DNA aliada a quantificação precisa do material genético, permitem a ligação da molécula a esferas de 28 nm. Esses fragmentos ligados às esferas são amplificados por meio de PCR em emulsão, permitindo a amplificação de milhares de fragmentos de DNA em uma única reação. As esferas são compartimentalizadas em uma emulsão de óleo, criando ambiente individualizado contendo os reagentes necessários para a amplificação.

Posteriormente, as emulsões são quebradas, os fragmentos de DNA fita dupla são desnaturados e as esferas contendo apenas fitas simples são depositadas em um slide de fibra ótica contendo aproximadamente 1,6 milhão de poços, onde ocorrem as reações de sequenciamento em paralelo (MARGULIES et al., 2005).

Os primeiros passos da análise de qualquer metagenoma envolvem comparar as sequências lidas de uma amostra com bases de dados de sequências conhecidas (MEYER et al. 2008).

O sequenciador 454 Genome sequencer FLX System (454 GS FLX - Roche, Life Sciences) é capaz de produzir sequências de até 300 pb, excedendo 1 milhão de pb por dia (DROEGE; HILL, 2008). Este melhoramento permitiu maior acurácia da tecnologia 454 de sequenciamento. De acordo Ronaghi (1998) a técnica de pirosequenciamento pode ser amplamente aplicada, sendo alternativa para a caracterização de comunidades microbianas de ambientes complexos.

Okada (2012) analisou por meio de pirosequenciamento, a diversidade filogenética da biomassa da manta de lodo e do separador de fases de reatores UASB usados na remoção de surfactante aniônico (LAS) em água residuária de lavanderia comercial. Este autor observou 147 gêneros, dos quais 32 gêneros foram relacionados com a degradação de LAS (*Comamonas, Dechloromonas, Desulfovibrio, Gemmatimonas, Holophaga, Pseudomonas, Rhodanobacter, Sporomusa, Zoogloea,* etc.).

Delforno et al. (2014) avaliaram o efeito da adaptação da biomassa para a degradação de LAS em água residuária de lavanderia em reatores EGSB. Por meio da análise de pirosequenciamento, os autores identificaram gêneros relacionados a degradação de compostos aromáticos e redução de sulfato (*Syntrophorhabdus* e *Desulfobulbus*).

3.11 – Considerações finais

Pôde-se notar com esta revisão que, muitos trabalhos estão sendo realizados a fim de se obter altos valores de remoção de surfactantes em diferentes sistemas de tratamento. Entretanto, trabalhos voltados para água residuária real, como é caso das lavanderias comerciais, ainda são escassos.

Esse tipo de água residuária merece especial atenção, visto que, sua composição engloba, além dos surfactantes, gama de outros compostos xenobióticos, os quais podem influenciar negativamente os processos em sistemas de tratamento de efluentes, a biota e saúde pública.

Logo, a água residuária de lavanderia comercial precisa passar por tratamento antes de ser descartada no ambiente, a fim de obedecer às normas ambientais. Nesse contexto, com este trabalho pretendeu-se empregar reator anaeróbio de leito fluidificado com areia como material suporte, a qual já foi observado ser eficiente na remoção do LAS padrão (Sigma®), todavia, ainda não testada para água residuária real. Bem como, avaliar a comunidade microbiana envolvida nesse processo empregando técnicas de biologia molecular.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Caracterização da água de lavanderia

A caracterização da água residuária de lavanderia foi realizada em três etapas: 1 - caracterização inicial, anterior à operação do reator; 2 - caracterização das amostras utilizadas ao longo da operação do reator de leito fluidificado (RALF) e 3 - caracterização da amostra utilizada no ensaio de potencial metanogênico (Figura 4.1).

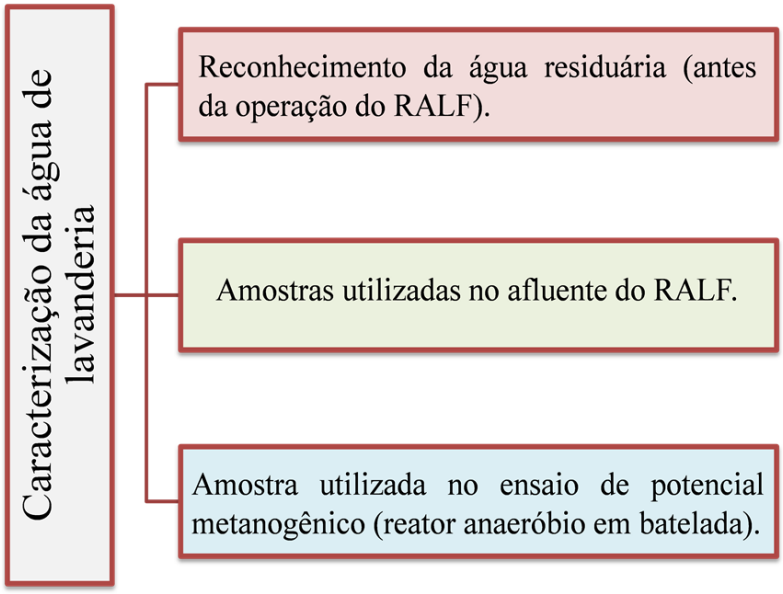

Figura 4.1 - Fluxograma da caracterização da água residuária de lavanderia

Anteriormente, à operação do reator de leito fluidificado foi realizada caracterização da água residuária de lavanderia comercial por meio de análises físico-químicas. Foram coletadas 30 amostras durante 60 dias em uma lavanderia comercial de São Carlos (SP).

Para tanto, padronizou-se a máquina de lavar roupas, tipo de roupa e período das coletas. Foram coletadas três vezes por semana amostras (1 litro), sempre após a primeira lavagem de roupas claras sem alvejante, antecedendo a adição do amaciante. Após a coleta, a água foi transferida para frasco de vidro âmbar e encaminhada imediatamente para o laboratório (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Detergente utilizado na lavanderia comercial e coleta das amostras da água residuária

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos/USP. Os parâmetros físico-químicos analisados estão listados na Tabela 4.1. Foi utilizado o pacote estatístico SPSS 17.0 para as análises de correlações de *Kendall* e *Spearman* entre a DQO e LAS da água de lavanderia comercial.

Tabela 4.1 - Parâmetros físico-químicos para caracterização da água de lavanderia comercial

Parâmetros	**Método/Referências**
pH e alcalinidade	DILLALO; ALBERTSON (1961) modificada por RIPLEY et al. (1986)
DQO, sulfato, sulfeto, N-NH_4^+, NTK, metais pesados*	APHA (2005)
NO_3, NO_2, fosfato, fluoreto, brometo	Cromatografia de íons
Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS)	DUARTE *et al*. (2006)
Ácidos orgânicos	PENTEADO (2012)
Álcoois	Cromatografia Gasosa
Sólidos suspensos	APHA (2005)

* Apenas analisado na caracterização inicial.

As análises de NO_3, NO_2, fosfato, fluoreto e brometo foram realizadas em Cromatógrafo de Íons da Marca Dionex modelo ICS 5000. As condições empregadas no cromatógrafo para análise dos ânions foram as seguintes: eluente de 4,5mM de Ca_2CO_3/0,8mM de $NaHCO_3$ com vazão de 1,0 mL.min^{-1}, coluna ION PAC® ânion exchange AG23 em temperatura de 30ºC, detector de condutividade, bomba supressora de auto regeneração de ânions.

4.2 – Fluxograma experimental

O fluxograma experimental da operação do reator no período de 469 dias encontra-se delineado na Figura 4.3. Nas etapas 2 a 5 foram empregadas água residuária de lavanderia diluída para as concentrações de LAS de 9,5±3 mg.L^{-1} a 27,9±9,6 mg.L^{-1}, respectivamente.

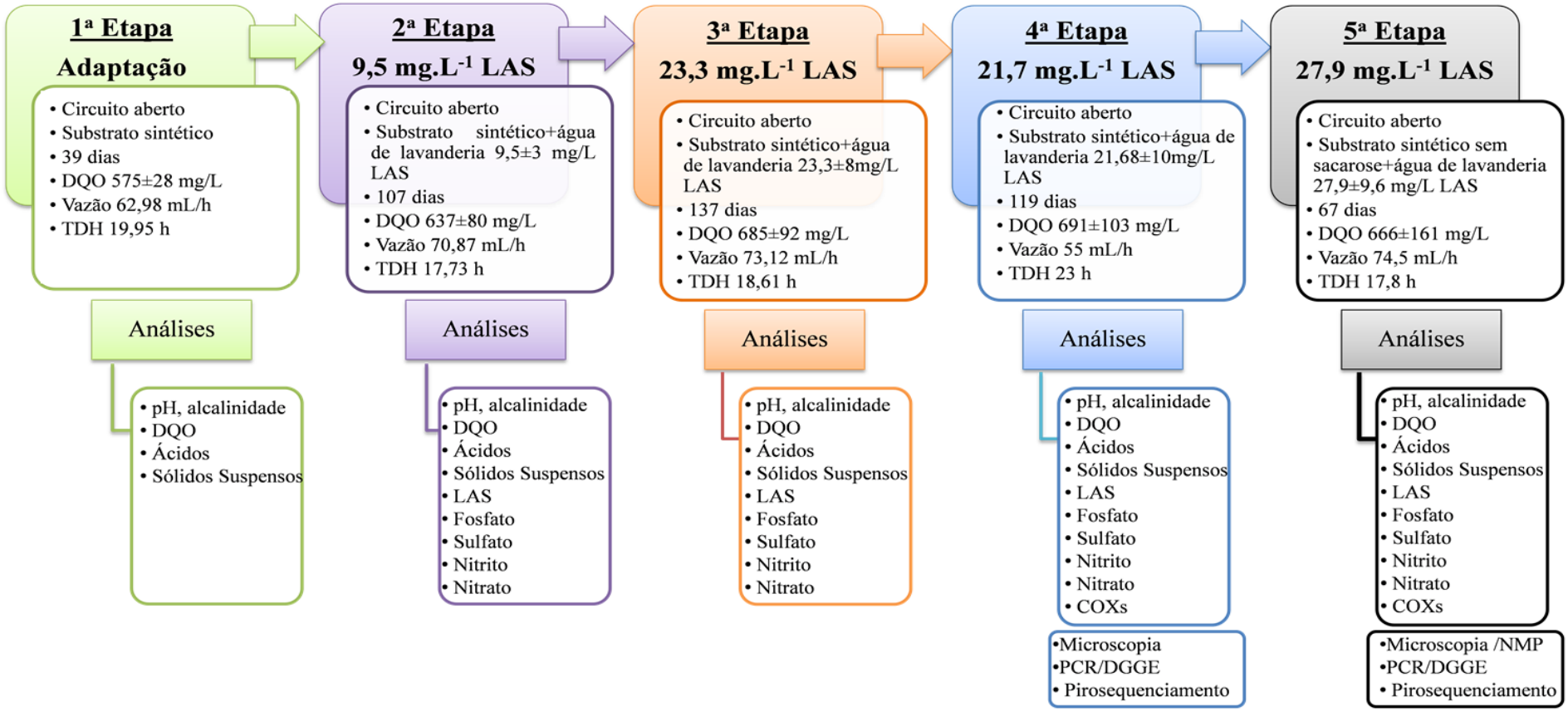

Figura 4.3 - Fluxograma experimental da operação do reator

4.3 – Inóculo

O reator foi inoculado com lodo anaeróbio proveniente de reator UASB usado no tratamento de resíduos de suinocultura, instalado no Departamento de Engenharia Rural, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Jaboticabal. Tal lodo foi escolhido devido aos bons resultados obtidos em trabalhos anteriores na degradação de surfactante aniônico (LAS) neste laboratório de pesquisa (DUARTE, 2006; OLIVEIRA, 2010). O lodo foi armazenado a 4°C antes de ser usado. Não houve necessidade de desestruturar os grânulos do lodo, uma vez que este se apresentava na forma floculenta, pastosa e homogênea.

O lodo utilizado neste trabalho foi submetido à determinação da quantidade de sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV) e fixos (SF) de acordo com a metodologia descrita em APHA (2005). A inoculação do reator foi efetuada mediante a adaptação da biomassa ao esgoto sintético. O sistema foi mantido em circuito fechado por 19 dias com temperatura controlada a 30ºC.

4.4 – Material suporte

Para a imobilização da biomassa no reator anaeróbio de leito fluidificado foi utilizado 306 g de areia como material suporte (1,4 – 1,7 mm de diâmetro) com 2,3 $g.cm^{-1}$ de densidade, devido aos bons resultados obtidos por Oliveira (2010).

Anteriormente, a sua utilização, a areia foi submetida a tratamento ácido com a finalidade de remoção de impurezas e para criar rugosidades em sua superfície que facilitassem a adesão da biomassa durante o período de inoculação do reator. Para isso a areia foi imersa em solução de ácido fluorídrico diluída 10%em água destilada, até completa limpeza. Em seguida este material foi levado à estufa de secagem (105ºC) por 24 horas (SILVA, 1985).

4.5. Composição do Substrato Sintético

O surfactante utilizado neste trabalho foi o LAS oriundo da água residuária de uma lavanderia comercial situada na cidade de São Carlos, São Paulo. A composição do detergente utilizado pela lavanderia consistiu de mistura de tensoativos aniônicos, enzimas, alcalinizantes, desengraxantes e branqueador óptico.

Amostra de água de lavanderia foi coletada periodicamente para sua utilização no afluente do reator. Após a determinação da concentração de LAS na água coletada, soluções estoques foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, congeladas e usadas a cada alimentação. Ao fim das soluções, nova água de lavanderia foi coletada e analisada previamente antes de sua utilização.

Esgoto sintético formulado por Torres (1992) e modificado por Duarte (2006) foi utilizado como base da alimentação do reator (Tabelas 4.2 e 4.3). A solução de sais (Tabela 4.3) foi preparada previamente e mantida em frasco âmbar de 1,0 L sob refrigeração, sendo que o volume da solução utilizada na alimentação (5 L) foi 25 mL. Os demais compostos foram preparados semanalmente e mantidos em frascos tampados sem umidade. A sacarose, extrato de levedura e bicarbonato de sódio foram dissolvidos em água da rede pública de abastecimento e por fim, foram acrescentados a água de lavanderia diluída. Essa diluição foi necessária para manter a concentração de LAS desejada em cada etapa.

Para armazenar o substrato durante a alimentação do reator utilizou-se frasco Duran® de 5 L que foi mantido sob refrigeração. Com a adaptação de bexiga de borracha no frasco de alimentação foi possível manter a anaerobiose nos frasco com atmosfera preenchida com N_2 (100%).

Tabela 4.2 – Composição do substrato sintético

Nutrientes	Massa (g)
Extrato de levedura	2,5
Sacarose	0,4
Bicarbonato de sódio	2

*q.s.p. 5000 mL de água de abastecimento (Duarte, 2006, modificado de Torres, 1992).

Tabela 4.3 – Composição da solução de sais do substrato sintético

Sais	Concentração ($g.L^{-1}$)
NaCl	50
$MgCl_2$. $6H_2O$	1,4
$CaCl_2$. $2H_2O$	0,9

*q.s.p. 1000 mL de água de destilada (Torres, 1992).

O extrato de levedura é um co-substrato muito utilizado no tratamento de compostos tóxicos por ser fonte rica de nitrogênio, carboidratos, vitaminas do complexo B e aminoácidos (KHLEIFAT, 2006). Por esse motivo foi empregado em associação à agua residuária de lavanderia comercial, uma vez que o nitrogênio é considerado fonte essencial para o crescimento celular, sendo de grande importância para a síntese de proteínas e enzimas.

4.6 – DQO da água de lavanderia e sua razão de mistura

Devido às altas concentrações de LAS observadas nas amostras de água de lavanderia foram necessárias diluições prévias para atingir a concentração de LAS desejada no afluente do reator (9,5±3 $mg.L^{-1}$, 23,3±8 $mg.L^{-1}$, 21,7±10 $mg.L^{-1}$ e 27,9±9,6 $mg.L^{-1}$). A concentração inicial de LAS foi baseada no estudo de Oliveira et al. (2010) que utilizaram 8.2±1.3 $mg.L^{-1}$ de LAS padrão em RALF. Foi mensurada a contribuição da água de lavanderia diluída na DQO afluente e comparada com a DQO do LAS padrão (Sigma®). Para isso a água residuária foi diluída para as concentrações de 5,2±0,9 $mg.L^{-1}$, 10,8±0,7 $mg.L^{-1}$, 21,1±1,5 $mg.L^{-1}$, 32,4±3,2 $mg.L^{-1}$ e 41,8±2,6 $mg.L^{-1}$ de LAS, bem como as soluções estoques de LAS padrão (5±0,3 $mg.L^{-1}$, 10±0,5 $mg.L^{-1}$, 20±3 $mg.L^{-1}$, 30±2,2 $mg.L^{-1}$ e 40±1,5 $mg.L^{-1}$).

4.7 – Reator anaeróbio de leito fluidificado

O RALF para tratamento de substrato sintético contendo água residuária de lavanderia foi construído em acrílico com 4,0 cm de diâmetro, 100 cm de altura, área de 12,566 cm^2 e

1.256 mL (Figura 4.4). Estas dimensões do reator foram as mesmas adotadas por Oliveira (2010), Carosia (2011) e Ferreira (2012).

Na base do reator foi instalado um distribuidor para garantir a uniformidade do fluxo dentro do reator e, no topo, um separador de fases para impedir que partículas sólidas fossem levadas do reator e garantir a saída do efluente. O reator foi instalado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) e mantido a 30ºC em câmara climatizada.

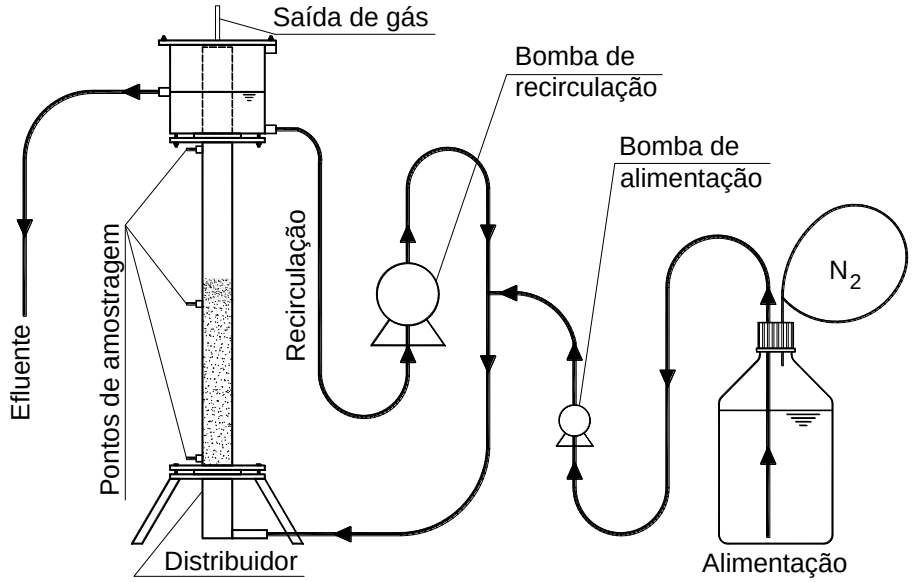

Figura 4.4 – Diagrama esquemático do reator anaeróbio de leito fluidificado

Fonte: Oliveira, 2010.

Para as etapas de operação do reator I, II, III e V, a vazão afluente foi de aproximadamente 0,07 $L.h^{-1}$ e tempo de detenção hidráulica (TDH) próximo de 18 horas. Para a etapa IV, a vazão foi de aproximadamente 0,05 $L.h^{-1}$ e TDH próximo de 23 horas. Oliveira et al. (2010) e Motteran et al. (2014) obtiveram altas eficiências de remoção de surfactante aniônico (LAS) e não-iônico (LAE), respectivamente ao empregarem TDH de 18 horas em RALF.

A vazão de alimentação foi controlada por bomba peristáltica de precisão, Provitec®, Modelo DM 5000/5900, com regulagem de vazão eletrônica. A vazão da bomba de recirculação necessária para atingir a velocidade mínima de fluidificação (Vmf) da areia (para todas as etapas) foi de aproximadamente 59 $L.h^{-1}$.

Silva (1985) recomenda fluidificação de pelo menos 30% acima do valor mínimo. No caso específico desse trabalho, a vazão com 30% acima seria de 77 $L.h^{-1}$, mas em função das características da bomba de recirculação padronizou-se a vazão de 106 $L.h^{-1}$, ou seja, 79,6%

superior a velocidade de mínima fluidificação. Com isso, o grau de mistura nesse reator foi de aproximadamente 1.512 vezes.

4.8 – Etapas de operação do RALF

4.8.1 – Inoculação

Para a imobilização da biomassa no material suporte (areia) foi utilizado substrato sintético anteriormente descrito. O sistema foi mantido em recirculação (circuito fechado) com substrato sintético e 25 mL de lodo (2% do volume total do reator) por 19 dias. A alimentação do reator foi mantida em frasco Duran® a 30±1ºC. Posteriormente, ao consumo do substrato, evidenciado por análise de DQO, nova solução era adicionada ao frasco de alimentação do reator.

4.8.2 – Adaptação (Etapa I)

Logo após a etapa de inoculação o sistema foi aberto (sistema contínuo), mantendo a mesma composição do substrato sintético (Tabelas 4.2 e 4.3). Nesta etapa iniciou-se a adição de N_2 (100%) à alimentação (frasco Duran® de 5,0 litros), a fim de diminuir os níveis de oxigênio dissolvido no meio. Para tanto, N_2 (100%) foi fluxionado ao *headspace* do frasco de alimentação durante 15 minutos. O frasco contendo a alimentação, a partir desta etapa, foi mantido refrigerado (4ºC).

4.8.3 – Etapas contendo água residuária de lavanderia (Etapas II, III, IV e V)

As etapas denominadas II, III, IV e V referem-se às concentrações de LAS de 9,5±3 $mg.L^{-1}$, 23,3±8 $mg.L^{-1}$, 21,7±10 $mg.L^{-1}$ e 27,9±9,6 $mg.L^{-1}$, respectivamente, adicionadas ao substrato sintético. Para estas etapas foram adicionados ao substrato sintético volumes

conhecidos da água residuária de lavanderia comercial diluída em 5 litros de alimentação, obtendo assim a concentração desejada para cada etapa operacional.

4.9 – Análises físico-químicas e cromatográficas

Amostras do afluente e efluente do reator foram analisadas seguindo a frequência e parâmetros apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Análise para monitoramento do reator

Parâmetros	Método	Frequência	Referências
pH	Potenciométrico	2X semana	APHA (2005)
Alcalinidade	Titulométrico	2X semana	DILLALO; ALBERTSON (1961) modificada por RIPLEY *et al*. (1986)
DQO	Espectrofotométrico	2X semana	APHA (2005)
Sólidos suspensos	Gravimétrico	1X semana	APHA (2005)
LAS	CLAE	2X semana	DUARTE *et al*. (2006)
Sulfato	CLAE	1X semana	APHA (2005)
Sulfeto	Espectrofotométrico	1X semana	APHA (2005)
Ácidos orgânicos	CLAE	1X semana	PENTEADO *et. al*. (2013)
Vazão (mL/h)	Volumétrico	Diariamente	-

A concentração do LAS foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseado em metodologia desenvolvida e validada por Duarte et al. (2006). As amostras foram previamente filtradas em membrana 0,2 µm para boa utilização e conservação do equipamento. As condições cromatográficas estão apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Condições cromatográficas para quantificação do LAS

Coluna	C-8 Supelco, 5µm, 15cm X 4,6 mm
Solvente A	MeOH puro
Solvente B	Solução de $NaClO_4$ 0,075 M em água ultrapurificada
Fluxo	0,5 $mL.min^{-1}$
Detector	Fluorescência com λ excitação 225nm e λ emissão 290 nm
Forno	35°C

As análises de NO_3, NO_2, fosfato, fluoreto e brometo foram realizadas em Cromatógrafo de Íons da Marca Dionex® modelo ICS 5000 nas mesmas condições citadas anteriormente para a caracterização da água de lavanderia.

4.10 – Análise qualitativa por CG/ES

Análises qualitativas, tanto da água de lavanderia empregada na etapa IV, bem como, de amostras do reator (Etapas IV e V) foram realizadas por CG/ES de forma terceirizada pela empresa Central Analítica localizada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas em Campinas, SP.

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

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

4.11 – Extração de LAS adsorvido e balanço de massa

A determinação de LAS adsorvido em biomassa foi baseada em método descrito por Duarte et al. (2008). Ao final da operação do RALF, foram retiradas amostras de biomassa do reator para determinação do LAS adsorvido e cálculo do balanço de massa de LAS.

Para isso, foram coletadas, em triplicata, as seguintes amostras: (1) areia com biofilme, (2) biomassa do separador de fases do reator, (3) biomassa aderida no distribuidor do reator e (4) biomassa efluente. Essas amostras foram transferidas para estufa a 110ºC por 24 horas para, posteriormente, ser realizada a extração.

Por três vezes a amostra seca foi imersa em metanol (50 mL) em banho de ultrassom por 30 min. A fase líquida era coletada e, por fim, a amostra foi imersa em água ultrapurificada seguida de banho em ultrassom por 30 min. A amostra foi centrifugada a 6.000 rpm

(temperatura: 4°C). Evaporou-se o extrato metanólico em placa aquecida (60˚C) até o volume ser reduzido a aproximadamente 20 mL. Em seguida as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm e sua concentração de LAS determinada por CLAE.

A eficiência desse método de extração de LAS já foi confirmada por Duarte et al., (2008), Oliveira et al., (2009), Oliveira (2010), Delforno (2011), Carosia (2011), Ferreira (2012) e Okada (2012).

O balanço de massa afluente e efluente refere-se à massa do surfactante LAS que entrou no reator de leito fluidificado durante toda operação e a massa presente no efluente. O cálculo foi feito com base na somatória das massas de LAS aplicadas ao reator e as recuperadas no efluente. Parte da massa de LAS pode ter ficado aderida ao material suporte ou ao biofilme no reator. Por isso, foi necessário calcular a concentração do LAS adsorvida ao material suporte, na biomassa presente no reator (areia, distribuidor e separador de fases) e na biomassa presente nos sólidos do efluente.

4.12 – Avaliação do Potencial Redox

A verificação do potencial redox foi realizada por meio de método indireto, conforme protocolo desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos (LPB – EESC/USP). Esse método se baseia na diferenciação da coloração do corante resazurina conforme o potencial redox do meio. A cor azul é característica de aerobiose e a cor branca corresponde à anaerobiose estrita. A cor rosa é característica de meios com potencial redox entre 100 e -100 mV, podendo ser relacionada à condições facultativas (GUSMÃO, 2005).

Essa avaliação consistiu na adição do corante resazurina (0,1%) na alimentação do reator, na proporção 1 $mL.L^{-1}$. O frasco com alimentação já acrescida de resazurina (Figura 4.5) foi submetido a atmosfera de N_2 (100%) durante aproximadamente 30 minutos e em seguida transferido para alimentação do reator. Além disso, foi injetado na forma de pulso 1 mL do corante na entrada da alimentação do reator como pode ser observado na Figura 4.6.

Figura 4.5 – Resazurina em frasco de alimentação do reator

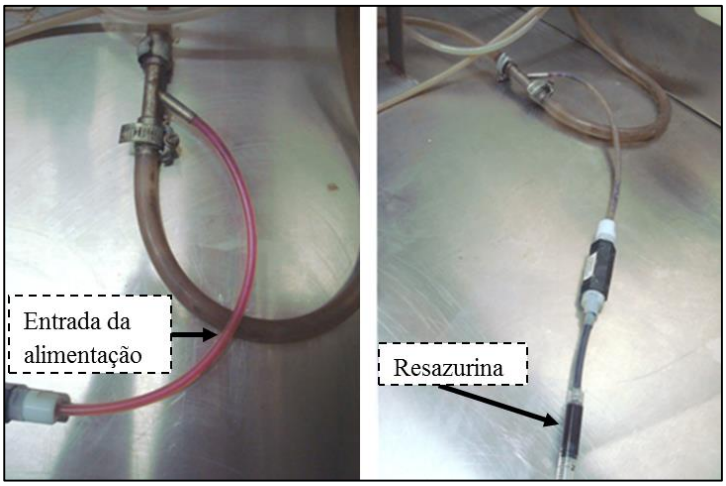

Figura 4.6 – Avaliação do potencial redox com resazurina

4.13 – Exames Microscópicos

4.13.1 – Microscopia de contraste de fase

As morfologias dos microrganismos foram avaliadas por meio de exames microscópicos, de luz comum, contraste de fase e fluorescência em microscópio Leica®. As imagens foram capturadas por meio de câmera Optronics® e software Image Pro-Plus®.

Pequena quantidade da amostra foi adicionada a uma lâmina previamente limpa com detergente e álcool, e foi adicionada fina camada de ágar (2%). Sob a gota foi colocada uma lamínula, também previamente lavada. Em seguida a amostra foi analisada em microscópio.

4.13.2 – Microscopia eletrônica de varredura

Exames em microscópio eletrônico de varredura (MEV) também foram realizados com amostras retiradas ao final da operação do reator. As amostras do biofilme foram preparadas de acordo com Nation (1983) modificado por Araujo (2004).

As amostras foram previamente fixadas em 0,1 M de tampão fosfato (pH = 7,3) contendo glutaraldeído a 2,5% por 12 horas à 4 °C. Em seguida, lavadas três vezes em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,3) por 10 minutos e desidratadas usando solução de etanol a 50%, 70%, 80%, 90% e 95% durante 10 minutos em cada concentração.

Cada amostra foi lavada três vezes em etanol 100% por 10 minutos e fixada por lavagem duas vezes durante 30 segundos com hexamethyldesilazane (HMDS). As amostras foram secas a temperatura inferior a 60 °C durante 2 horas e revestidas com ouro. As analises de MEV foram realizadas com o Digital Scanning Microscope da Zeiss modelo DSM 960.

4.14 – Análise quantitativa de microrganismos

A técnica de tubos múltiplos foi realizada para quantificação celular por Número Mais Provável (NMP) de amostra de biomassa do material suporte (areia) e separador de fases retiradas ao final da operação do reator (Etapa V com 27,9±9,6 $mg.L^{-1}$ de LAS). Esta técnica foi originalmente realizada por McCrady (1915), entretanto, foi modificada por Sakamoto (1996) para a quantificação de microrganismos anaeróbios.

O método consiste em diluições seriadas para a contagem indireta da densidade de microrganismos em um meio liquido. Para essa quantificação (NMP) foi utilizada o protocolo do Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

4.14.1 – Água de diluição

Para a preparação da água de diluição anaeróbia 300 mL de água ultrapurificada foi submetida ao aquecimento até entrar em ebulição. Essa água foi resfriada, durante 20 minutos,

sob atmosfera de N_2 (100%), acoplando-se uma seringa e pipeta ao sistema de distribuição de gás. Em seguida esta água foi utilizada para preparar a solução de diluição (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Soluções para água de diluição

Solução de água de diluição	Reagente	Volume*
1	K_2HPO_4 (0,2 M)	1 mL
2	KH_2PO_4 (0,2 M)	0,25 mL

*q.s.p 250 mL de água ultra purificada

Foram adicionados 9 mL de água de diluição em cada frasco de antibiótico (30 mL) com auxílio de pipeta automática. Em seguida os frascos foram submetidos à atmosfera de N_2 (100%) por 1 minuto, tampados com tampa de butila e lacres de alumínio. Todo este material foi esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos.

4.14.2 – Substrato sintético

O substrato sintético foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 μm em sistema Millipore de filtração. Todo material empregado para a filtração foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm de pressão durante 20 minutos. Em seguida, o substrato sintético acrescido de água de lavanderia foi submetido a atmosfera de N_2 (100%) durante 20 minutos. Por fim, foram adicionados 8,9 mL de substrato sintético estéril em frasco de antibiótico de 20 mL também estéril.

Anteriormente, a adição do substrato sintético, o frasco de antibiótico foi submetido a atmosfera de N_2 (100%), durante 1 minuto, para retirada de oxigênio. Após a adição do substrato sintético foi colocada a tampa de butila mantendo-se a troca de atmosfera por mais 1 minuto. Os frascos foram fechados com tampa de butila e lacre de alumínio. Em todos os frascos (de diluição e contagem) foram adicionado 0,1 mL de solução redutora de sulfeto de sódio (5%) (SAKAMOTO, 1996).

4.14.3 – Inoculação e diluição seriada

A técnica consistiu na inoculação dos microrganismos provenientes do material suporte e do separador de fases (Etapa V) em substrato sintético idêntico ao utilizado no reator, acrescido de 25 $mg.L^{-1}$ de LAS oriundo de água residuária de lavanderia. Procedeu-se a quantificação de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas.

Uma vez que a biomassa do material suporte encontrava-se aderida foi necessário fazer o desprendimento das células para inoculação nos frascos de diluição. Para isso areia mais biomassa foram transferidos para frasco de antibiótico, fechado com tampa de butila e agitado por tempo suficiente (cerca de 30 minutos) para que, visualmente, a biomassa se desprendesse do suporte e passasse para a fase líquida a fim de ser coletada com seringa.

Após a liberação das células foi realizada a diluição seriada da amostra. Para isso, 1 mL da biomassa foi transferida para o primeiro frasco de antibiótico com 9 mL de água de diluição. Realizou-se a homogeneização da amostra manualmente. Em seguida, retirou-se 1 mL dessa amostra diluída (10^{-1}) e adicionou-se no próximo frasco (10^{-2}). Esse procedimento foi repetido até a diluição 10^{-17} (Figura 4.7).

A seguir foi transferido 1 mL da amostra previamente diluída, para frasco de antibiótico que continha 9 mL de substrato sintético acrescido de água de lavanderia. Para cada diluição foram usados 3 frascos (triplicatas). Todo procedimento foi realizado em ambiente de assepsia (bico de Bunsen) e em condições de anaerobiose (nitrogênio 100%). O procedimento das diluições e inoculações da amostra, em meio específico, encontra-se esquematizado na Figura 4.7.

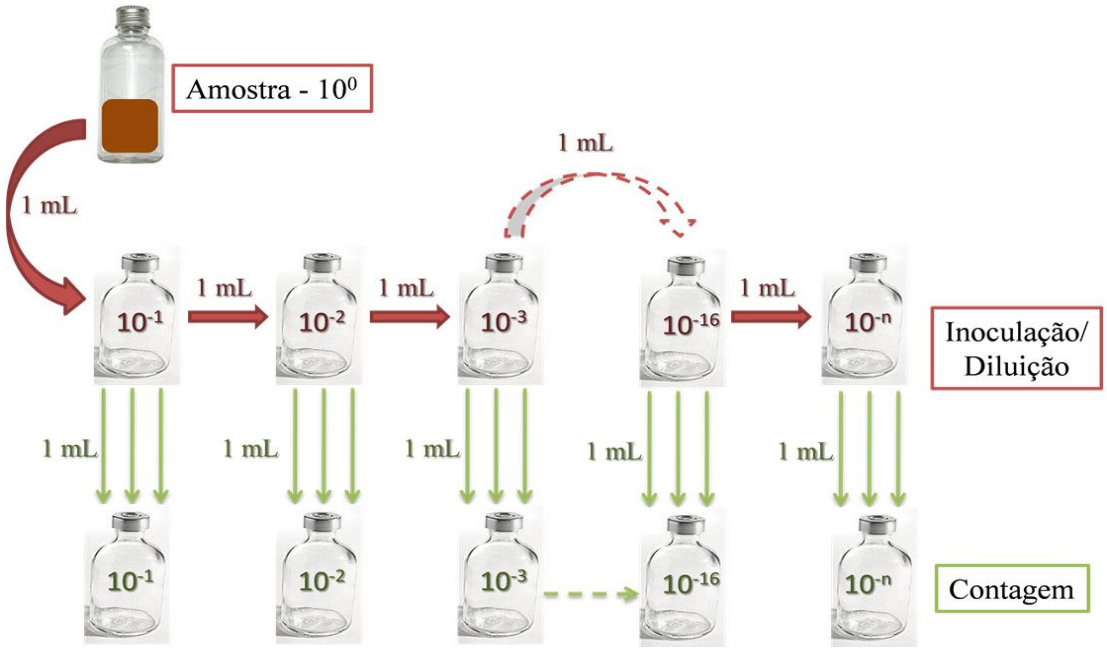

Figura 4.7 – Esquema das diluições e inoculações da técnica de NMP

4.14.4 – Leitura dos resultados

Os frascos de contagem (triplicata das diluições de 10^{-1} a 10^{-17}) foram transferidos para estufa sem agitação a 30±1° C durante 30 dias. Após este período de incubação foi constatado o crescimento dos seguintes grupos microbianos: (1) bactérias anaeróbias totais – avaliadas pela turvação do meio reacional e (2) arqueias metanogênicas – determinadas pela detecção de metano em cada frasco da contagem, por meio de análise em cromatografia gasosa (CG) (SAKAMOTO et al., 2012).

A composição do biogás gerado em cada frasco de contagem foi avaliada por meio da retirada de amostra (500 µL) do *headspace* de cada frasco. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso GC-2010 SHIMADZU®, equipado com detector de condutividade térmica (TCD), com coluna Carboxen® 1010 plot 30 m X 0,53 mm, sendo o argônio o gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 230°C, respectivamente, e na coluna a temperatura foi 130°C com aquecimento de 46°C min^{-1} até 135 °C.

Combinações de respostas positivas foram a base do cálculo para estimar o NMP, usando a tabela padrão de probabilidade (APHA, 1998), que confere o limite de confiança de 95% para cada valor determinado. Foi realizada a quantificação em NMP de células/g STV. A

análise de sólidos totais voláteis foi realizada segundo APHA (2005). Para os cálculos do NMP (NMP/100 mL) utilizou-se a Equação 1.

$$\text{Células/100 mL} = \frac{\text{fator da tabela APHA x 10}}{10^{y}}$$

$$\boxed{NMP(tabelaAPHA) \times \frac{10}{10^{y}} = NMP[celulas\ /100ml]} \qquad \text{(Equação 1)}$$

y = menor diluição da série de combinações selecionadas.

4.15 – Biologia Molecular

Para análise de biologia molecular foram utilizadas amostras das Etapas IV e V de operação do reator e do ensaio do potencial metanogênico. As amostras utilizadas do reator foram provenientes do biofilme aderido ao material suporte (areia) do reator, biomassa do distribuidor e biomassa do separador de fases do reator. As amostras do ensaio de potencial metanogênico foram oriundas do final de operação dos reatores em batelada, sendo que para esta última foi feita apenas PCR/DGGE.

4.15.1 – Extração de DNA e PCR

As amostras de biomassa do reator e do ensaio de potencial metanogênico foram coletadas, lavadas sucessivamente em tampão fosfato e centrifugadas. Os *pellets* foram armazenados a -20°C. A extração de DNA foi realizada utilizando *glass beads* e mistura de fenol tamponado com tris: clorofórmio: tampão PBS (1: 1: 1 v/v) e o procedimento descrito a seguir.

Na biomassa úmida (0,5g) foi adicionado 0,5g de *glass beads*, 1 mL de PBS,1 mL de fenol tamponado com Tris e 1 mL de clorofórmio. Após, realizou-se o vótex por aproximadamente 50” e centrifugou-se por 10 min. a 6.000 rpm a 4°C.

O sobrenadante (± 1mL) foi transferido para tubo de 2 mL (amostra mantida no gelo), foi adicionado 1 mL de fenol, homogeneizada em vórtex e centrifugada nas mesmas condições.

Aproximadamente, 800 µL do sobrenadante foram transeferidos para outro tubo e o mesmo volume foi adicionado de clorofórmio. A amosra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada nas mesmas condições iniciais.

Aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram novamente transeferidos para outro tubo e o mesmo volume foi adicionado de clorofórmio. A amosra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada nas mesmas condições iniciais. Por fim, aproximadamente 400 µL do sobrenadante foi transeferidopara outro tubo.

O DNA foi desidratado e precipitado em etanol 95%. Para isso, 1 mL de etanol 95% (4°C) foi adicionado à amostra purificada. A amostra foi homogeneizada manualmente em movimentos suaves e em seguida cetrifugada por 10 min. a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadanete foi descartado e, em seguida, foi adicionado 0,5 mL de etanol 70% (4°C) à amostra. A amostra foi homogeneizada e cetrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o restante do etanol foi evaporado naturalmente por 24h em capela. O DNA foi secado a temperatura ambiente (≈ 24 horas), e eluido com 100 µL de tampão TE (10 mM Tris HCl:1 mM EDTA) e armazenado a -20°C.

Para verificar a integridade e a concentração do DNA foi realizada eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), utilizando 5 µL do extrato de ácido nucléico homogeneizado com 1 µL de *loading dye* e como padrão foi utilizado 2 µL do *High DNA Mass Ladder Invitrogen*. As condições de corrida da eletroforese foram as seguintes: 75V (6 $V.cm^{-1}$) constante por 30 minutos. Após a corrida o gel foi transferido para câmara de trans-iluminador UV (*Stratagene – Eagle Eye II*) para observação das bandas do gel.

A purificação do DNA foi realizada com o Kit *Illustra GFX PCR DNA* e *Gel Band Purification (GE Healthcare)* seguindo seu protocolo. Em seguida realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando para o Domínio Bacteria os *primers* 968FGC e 1401R (NUBEL et al., 1996) (Tabela 4.7), cuja programação do termociclador (Eppendorf AG - 22331 Hamburg) está apresentada na Tabela 4.8.

Tabela 4.7 – Primers para amplificação da região 16S do rRNA para o Domínio Bacteria

Primers	**Seqüências (5'- 3')**
968FGC	5`- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGCGGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3`
1401R	5`- CGG TGT GTACAA GAC CC-3`

Fonte: Nubel et al. (1996)

Tabela 4.8 – Programação do termociclador para amplificação do rRNA 16S para o Domínio Bacteria

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
95°C 7’	94°C 45”	56°C 45”	72°C 1’	72°C 10’	4°C
	35 ciclos				

Fonte: Nubel et al. (1996) modificado.

Para o Domínio Archaea foram utilizados os *primers* 1100FGC e 1400R (KUDO et al., 1997) (Tabela 4.9) cuja programação do termociclador (Eppendorf AG - 22331 Hamburg) está apresentada na Tabela 4.10.

Tabela 4.9 – Primers para amplificação da região 16S do rRNA para o Domínio Archaea

Primers	**Sequências (5’- 3’)**
1100FGC	5`- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA G -3`
1400R	5`- CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC-3`

Fonte: Kudo et al. (1997)

Tabela 4.10 – Programação do termociclador para amplificação do rRNA 16S para o Domínio Archaea

Desnaturação inicial -	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
94°C 5’	94°C 1’	55°C 1’	72°C 1’	72°C 7’	4°C
	35 ciclos				

Fonte: Kudo et al. (1997)

O produto da PCR foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% (m/v), utilizando 5 µL do produto da PCR homogeneizado com 1 µL de *loading dye* e como

padrão 2 µL do *Low DNA Mass Ladder Invitrogen*. As condições de corrida da eletroforese foram de 75 V (6 $V.cm^{-1}$) constante por 30 minutos. Após a corrida o gel foi transferido para câmara de trans-iluminador UV (*Stratagene – Eagle Eye II*) para observação das bandas.

4.15.2 – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (m/v), em TAE 1X (Tris:Acetato: EDTA), com gradiente linear de desnaturante (uréia e formamida) variando de 45% a 65%, para Domínio Bacteria e 40% a 65% para o Domínio Archaea. A corrida foi realizada a 60º C com 75 V por 16 horas. O gel foi corado com o brometo de etídeo e a leitura dos padrões de bandas do DGGE foi feita em câmara de trans-iluminador UV (*Stratagene – Eagle Eye II*).

As análises multivariadas dos perfis de bandas do DGGE foram realizadas por meio da aplicação do software *BioNumeric 2.5* (*Applied Maths*, Bélgica), as quais foram analizadas utilizando a correlação Pearson. Os dendogramas foram construídos pelo método UPMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*).

4.15.3 – Pirosequenciamento

A partir do DNA das amostras do material suporte (areia) e separador de fases do final das Etapas IV e V foi realizado Pirosequenciamento da região V4 do rRNA 16S. O pirosequenciamento foi realizado no Instituto de Agrobiotecnologia Rosário (INDEAR, Rosário, Argentina) por meio de convênio com a Prof[a]. Dra. Claudia Arenas Etchebehere da Universidade de Montevidéu.

As amostras foram lavadas sucessivamente em tampão fosfato e centrifugadas 6000 rpm por 10 minutos. Os *pellets* foram armazenados a -20°C. A extração do DNA dos *pellets* foi baseada em protocolo como descrito no item 4.15.1.

O DNA extraído foi purificado com *Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (Nanodrop Inc.,

Wilmington, DE, USA). A concentração de DNA de cada amostra foi de no mínimo 10 ng/µL e pureza OD260/280 entre 1,80 e 2,0 (Tabela 4.11). A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X.

Tabela 4.11 – Concentração do DNA das amostras de biomassa do reator

Amostra	**Concentração (ng/µL)**	**Relação OD 260/280**
Areia Etapa IV	86	1,75
Separador de fases IV	154,7	1,8
Areia Etapa V	1275,3	1,88
Separador de fases V	1596	1,87

Após a desidratação com etanol do DNA a amotra foi enviada para o instituto de Agrobiotecnologia Rosário (INDEAR) para análise de pirosequenciamento em equipamento FLX GS-454 (Life Sciences, Roche).

Foram utilisados quatro barcodes com 10 pb, tag, além dos *primers forward*e *reverse* designados para cada amostra (Tabela 4.12). As amostras foram combinadas com microesferas magnéticas (*beads*) e amplificadas por meio de PCR em emulsão. As microesferas ligadas aos fragmentos de DNA foram depositadas em distintos poços. (MARGULIES et al., 2005).

Tabela 4.12 – Barcode de referências das amostras da areia (A) e do separador de fases (SF) das etapas IV e V de operação do reator

Amostra	**Barcode**	**Tag+Primer Forward**	**Primer Reverse**
A-IV	CTCGCGTGTC	CACGACGTTGTAAAACGACAY TGGGYDTAAAGNG	CAGGAAACAGCTA TGACC
SF-IV	CACGTGTCGC	CACGACGTTGTAAAACGACAY TGGGYDTAAAGNG	CAGGAAACAGCTA TGACC
A-V	TCTCTATGCG	CACGACGTTGTAAAACGACAY TGGGYDTAAAGNG	CAGGAAACAGCTA TGACC
SF-V	TGATACGTCT	CACGACGTTGTAAAACGACAY TGGGYDTAAAGNG	CAGGAAACAGCTA TGACC

Os dados do pirosequenciamento foram processado utilizando o Ribosomal Database Project (RDP) Pyrosequencing Pipeline (http://pyro.cme.msu.edu/index.jsp) (COLE, 2009) o qual permitiu análises estatísticas das amostras com menor número de pares de bases. O primeiro passo foi selecionar as sequencias baseado nos seguintes parâmetros: comprimento das seqüências maior que 200 pb e coeficiente de qualidade maior ou igual a 25.

As seqüências foram localizadas por meio dos barcodes dentre as outras amostras das placas, com tolerância de até duas bases, assim uma vez identificada as amostras os barcodes foram removidos das sequencias.

As leituras das sequencias que não corresponderam a sequência dos *primers forward* e *reverse* não foram atribuídas a nenhuma amostra e, portanto foram descartadas. Leituras menores que 200 pb ou que continham uma ou mais ambiguidades foram removidas, bem como as leituras que não foram relacionadas a nenhum domínio.

As quimeras foram removidas utilizando DECIPHER (http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimerasOutputs.html) de acordo com Wright *et al.* (2012). As sequências foram alinhadas com a ferramenta INFERNAL (*Inference of RNA alignments*) ALIGNER (NAWROCKI; EDDY, 2007) e atribuídas taxonômicamente com 97% (agrupamento hierárquico (EDGAR, 2010) similaridade empregando *RDP classifier* (*Ribossomal Database Project* - http://rdp.cme.msu.edu/).

As single UTO foram removidas de acordo com Medinger et al. (2010) e Tedersoo et al. (2010). Posteriormente as sequencias representativas de cada UTO foram selecionadas a partir do dereplicate (ferramento do RDP).

A classificação taxonomica das UTO foi realizada utilizando o *RDP-Classifier* (*Ribossomal Database Project* - http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp) adotando limite de confiança de 50% (WANG et al., 2007).

A curva de rarefação das amostras foi determinada usando a ferramenta de análise do *RDP-Pyrosequencinf Pypeline* (http://pyro.cme.msu.edu/). Medidas de alfa (α) e beta (β) diversidade foram calculadas utilizando o software PAST (Paleontological Statistics Software) como proposto por Hammer et al. (2001).

As sequências foram submetidas ao European Nucleotide Archive (http://www.ebi.ac.uk), com números de acessos: ERS377587 (amostra da biomassa da areia da etapa IV), ERS377589 (amostra da biomassa do separador de fases da etapa IV), ERS377588 (amostra da biomassa da areia da etapa V) e ERS377590 (amostra da biomassa do separador de fases da etapa V); o número de acesso do projeto é PRJEB5054.

4.16 – Potencial Metanogênico

Por meio do teste de potencial metanogênico é possível obter informações importante sobre a transformação da matéria orgânica à metano, principalmente no que diz respeito à substratos específicos (ESPOSITO et al., 2012). O teste de potencial metanogênico específico foi realizado em batelada em duplicata de frascos Duran® de 500 mL. Os reatores foram preenchidos com 225 mL de substrato sintético idêntico ao da alimentação do reator anaeróbio de leito fluidificado em escala de bancada, conforme as Tabelas 4.2 e 4.3 (item 4.5).

O inóculo dos reatores em batelada foi proveniente de lodo floculento de reator UASB no tratamento de água residuária de suinocultura. O lodo antes de ser utilizado foi acondicionado em câmara climatizada a 30±1˚C por sete dias, a fim de exaurir as fontes de carbono disponíveis no inóculo. Após este período 25 mL (10% do volume reacional) de lodo foi adicionado a cada reator, totalizando junto ao substrato sintético 250 mL. A concentração inicial média de sólidos voláteis totais (SVT) nas séries experimentais foi de 1,74 $g.L^{-1}$.

A adição de água de lavanderia foi baseada nas concentrações do LAS, presente nesta água residuária, que foram de 16,3±2,5$mg.L^{-1}$, 32±0,8 $mg.L^{-1}$, 47,2±3,9 $mg.L^{-1}$ e 75,4±7,5 $mg.L^{-1}$. O ensaio controle foi realizado com a adição de substrato sintético sem o acréscimo de água residuária de lavanderia.

Os reatores foram mantidos sob agitação de 130 rpm e temperatura de 30±1 ˚C. Este ensaio foi realizado com células em crescimento planctônico, sem adesão em material suporte no período de 579 horas (24 dias). Foram realizadas análises de DQO e sólidos no início e final de operação dos reatores seguindo a metodologia de APHA (2005) e técnica gravimétrica, respectivamente.

A produção de metano (CH_4) foi monitorada em cromatógrafo gasoso CG 2010 Shimadzu® equipado com detector de condutividade térmica e coluna Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm). Argônio foi empregado como gás de arraste (12 $mL.min^{-1}$), e temperatura do injetor de 220 °C, temperatura da coluna de 130 ºC, temperatura do detector de 230 ºC e volume de amostra de 500 µL.

Foi utilizado o ajuste pela equação de Gompertz modificada (Equação 2) (ZWIETERING, et al, 1990; PEIXOTO et al., 2012), a qual foi possível definir o potencial de produção de metano, produção acumulada de metano, taxa de produção de metano e fase *lag*.

Jeong et al. (2007) observaram excelentes resultados quando utilizaram a equação de Gompertz modificada para avaliação da produção de metano em reatores anaeróbios em batelada .

$$M = P \exp\left\{-\exp\left[\frac{Rm \cdot e}{P}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$$ (Equação 2)

Sendo: M = produção acumulada de metano (µmol),

P = produção potencial de metano (µmol),

Rm = taxa de produção de metano (µmol.h^{-1}),

λ = fase lag (horas),

t = tempo (horas) e

e = número de Euler (2,71828)

Os parâmetros P, Rm e λ foram estimados com o software Origin Pro® 8.1 e foram realizadas acima de 100 interações para convergir os dados usando o modelo matemático supracitado. A produção específica de metano foi obtida dividindo a produção acumulada (µmol) pela quantidade de sólidos voláteis totais (SVT) mensurados em cada série experimental.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização da água residuária de lavanderia

5.1.1 – DQO e LAS

O surfactante aniônico LAS foi observado em todas as amostras analisadas, variando de 12,2 mg.L^{-1} a 1.023,7 mg.L^{-1} (Tabela 5.1). O menor valor detectado neste estudo esteve na faixa de concentração observada por Gross et al. (2007). Esses autores registraram 4,7 a 15,6 mg.L^{-1} de surfactantes aniônicos e 839±47 mg.L^{-1} de DQO em água cinza utilizada para irrigação de cultura de alface. A variação da concentração de LAS observada no presente estudo foi maior que a relatada em estudo anterior de Okada (2012).

Elevada concentração de surfactante no tratamento biológico pode levar à ineficiência da estação de tratamento. Isso porque esses compostos irão reduzir a tensão superficial, podendo alterar a floculação, compactação e desidratação do lodo, diminuindo assim a eficiência da estação e, consequentemente, elevando os custos do tratamento do lodo (DENTEL et al., 1993).

Tabela 5.1 – Valores dos parâmetros físico-químicos da água de lavanderia

Parâmetros (mg.L^{-1})	**Valor**			
	Mínimo	**Máximo**	**Média**	**Desvio**
pH	3,32	6,85	5,63	0,95
Alcalinidade Total	0	82,15	22,51	19,1
DQOb	622	4796	1710	968,3
DQOf	415	4474	1471	915,7
LAS	12,24	1023,7	163,65	247,9
SST	10	290	80	60
SSF	10	270	10	40
SSV	10	260	70	50
Sulfato	1,43	102,64	21,06	19,1
Sulfeto	0,04	0,8	0,17	0,1
N-nitrato	1,03	25,68	8,37	6,8

continua...

continuação...

Parâmetros (mg.L^{-1})	Valor			
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio
Nitrito	1,07	3,29	2,1	0,8
N-amoniacal	0,32	54,8	7	10,8
NTK	1,2	136	32,44	26,2
Fosfato	9,8	278,98	94,65	75,4
Fluoreto	0,52	52,1	9,43	12,8
Brometo	1,02	4,38	3,27	2,1
Etanol	38,87	384,59	148,62	94,6

No presente estudo a concentração média do LAS (163,6±247,9 mg.L^{-1}) esteve muito acima do verificado por outros autores. Gross et al. (2005) ao estudarem a utilização de água cinza na irrigação constataram a presença de surfactantes aniônicos (29-60 mg.L^{-1}) na água residuária e 23±4,5 mg.Kg^{-1} no solo onde esta água foi utilizada.

Costa (2009) verificou de 44,2 a 484,4 mg.L^{-1} de LAS, diferente do verificado neste estudo em água de lavanderia comercial, também de São Carlos. De acordo com Abu-zreig et al. (2003), surfactantes podem ser tóxicos ao solo e as plantas nessas concentrações. Os altos desvios encontrados na análise de LAS, tanto, neste estudo como de Costa (2009), refletem a heterogeneidade deste composto na água de lavanderia comercial.

Notou-se a partir do cromatograma de LAS de uma amostra da água de lavanderia comercial estudada que, o detergente utilizado possuia predominânica do homólogo com 13 átomos de carbono (C13) na cadeia alquílica (Figura 5.1). Diferente do reportado por Duarte (2006) na molécula de LAS comercial Aldrich® (CAS 25155-30-0) que possuia a seguinte distribuição:18% para C10, 36% para C11, 28% para C12 e 18% para C13.

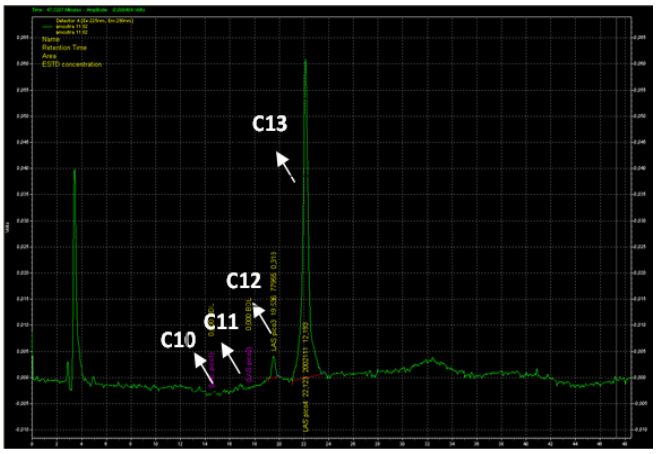

Figura 5.1 – Exemplo de cromatograma referente ao LAS na água de lavanderia

Wiel-Shafran et al. (2006) registraram, ao caracterizar água cinza para fertirrigação, concentração de 34±8,2 mg.L^{-1} de surfactante aniônico na água e 30±7,2 mg.L^{-1} no solo irrigado. Leal et al. (2010), ao estudarem sistemas biológicos para tratamento de água cinza doméstica observaram 43,5±6,5 mg.L^{-1} de surfactantes aniônicos e DQO de 827±204 mg.L^{-1}. Leal et al. (2011), ao caracterizarem água cinza de 32 residências constataram concentrações de surfactantes aniônico, catiônico e não iônico da ordem de 41,1±12,1 mg.L^{-1}, 1,7±0,8 mg.L^{-1} e 11,3±3,9 mg.L^{-1} respectivamente.

A DQO bruta e filtrada da água residuária em estudo foi de 622 mg.L^{-1} a 4.795 mg.L^{-1} e 415 mg.L^{-1} a 4.473 mg.L^{-1} , respectivamente (Tabela 5.1 e Figura 5.2). Verificou-se que não houve padrão desse efluente em relação à concentração de matéria orgânica. O valor médio de DQO no presente trabalho (1.471±915 mg.L^{-1}) foi muito superior (2,5 vezes maior) ao encontrado por Costa (2009) que verificou 590 ± 453 mg.L^{-1}. A DQO da água de lavanderia está diretamente relacionada com o tipo de peça lavada e quantos itens estavam sujos (TURK et al., 2005; LE, 2005).

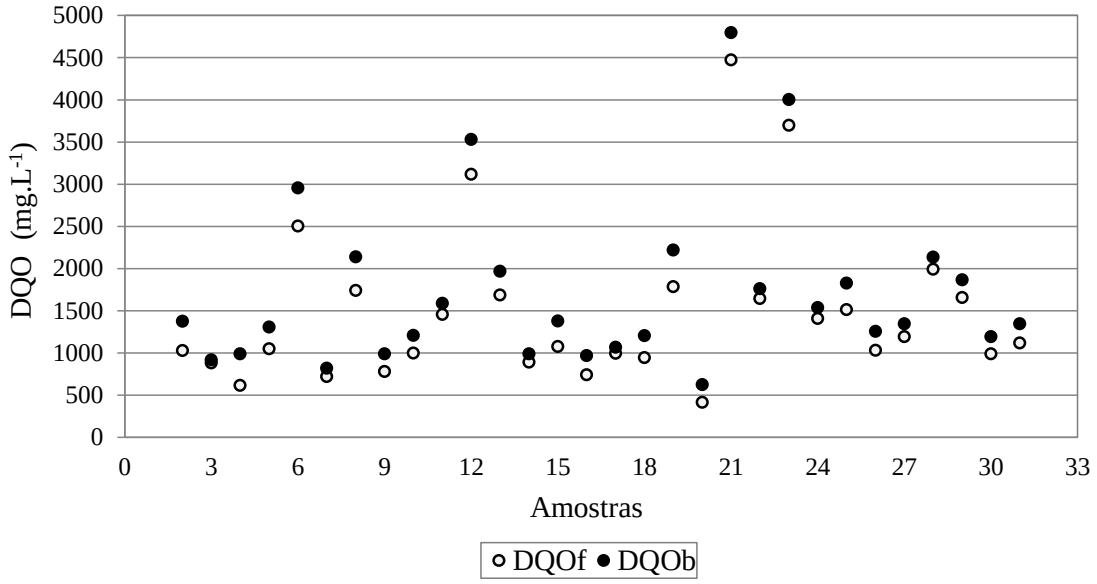

Figura 5.2 – Variação da DQO bruta e filtrada nas amostras de água de lavanderia comercial

Segundo Gray e Becker (2002), água cinza contribui com aproximadamente 39,1% da carga de DQO de uma residência. O efluente da cozinha, banheiro (excluindo o vaso sanitário) e lavanderia contribuem com 7,4%, 15,4% e 9%, respectivamente. Assim, quantia significativa do carbono orgânico no esgoto sanitário origina-se da água cinza (OTTERPOHL et al., 2003).

Por meio dos coeficientes de correlações de *Kendall* (0,313; *p*=0,05) e *Spearman* (0,465; *p*=0,01) verificou-se correlação positiva entre a DQO e LAS (Figura 5.3).

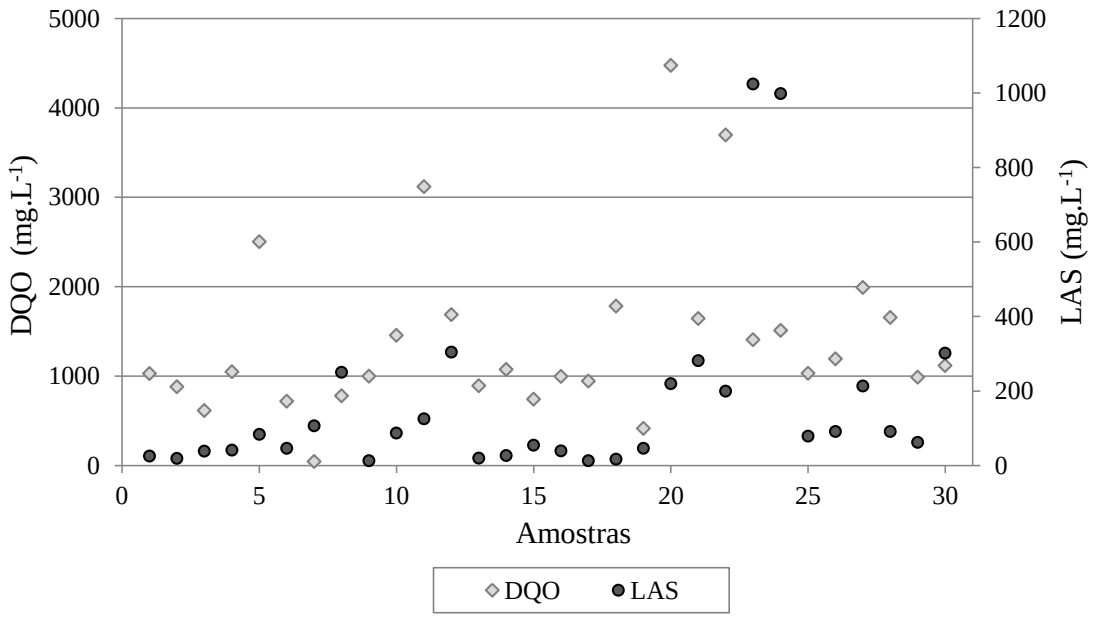

Figura 5.3 – Concentração do LAS e DQO nas amostras da água de lavanderia comercial

5.1.2 – Ácidos orgânicos e álcoois

Constatou-se neste estudo ampla variedade de AO (ácidos orgânicos); sendo os mais frequentes, ácido propiônico e ácido isobutírico (presentes em todas as amostras), ácido lático (96,6% das amostras); ácido fórmico e ácido acético (93% das amostras) e ácido málico (73,3% das amostras). Os menos frequentes foram ácido capróico e ácido succínico (16,6% das amostras); ácido valérico (26,6% das amostras), ácido cítrico e ácido butírico (33,3% das amostras).

Ácido lático (11,78 $mg.L^{-1}$ a 406,75 $mg.L^{-1}$) foi o mais representativo quantitativamente, seguido do ácido isobutírico (10,92 $mg.L^{-1}$ a 287,25 $mg.L^{-1}$) e ácido propiônico (10,66 $mg.L^{-1}$ a 279,75 $mg.L^{-1}$) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Ácidos orgânicos da água de lavanderia

	Parâmetros (mg.L^{-1})	Valor			
		Mínimo	**Máximo**	**Média**	**Desvio**
Ácidos orgânicos	Cítrico	8,34	307,5	50,89	95,18
	Málico	4,57	183,75	34,61	52,72
	Succínico	7,39	193,75	63,47	82,99
	Lático	11,78	406,75	92,23	103,39
	Fórmico	3,23	172	15,63	35,83
	Acético	7,76	329,25	24,24	61,95
	Propiônico	10,66	279,75	44,61	65,91
	Isobutírico	10,92	287,25	46,02	67,4
	Butírico	10,93	292	121,59	140,56
	Isovalérico	11,24	35,19	16,4	7,36
	Valérico	10	251	40,46	85,07
	Capróico	10,92	273,5	96,96	122,47

Embora, o ácido butírico tenha sido constato apenas em 33,3% das amostras de água de lavanderia, os valores foram acima de 200 mg.L^{-1} em 40% das amostras que continham tal ácido. Dentre os álcoois analisado apenas o etanol esteve presente em 77% das amostras.

Na Figura 5.4 é apresentado o gráfico *Box-plot* de distribuição dos ácidos orgânicos. Pôde se observar a heterogeneidade na concentração desses compostos no período de caracterização da água de lavanderia.

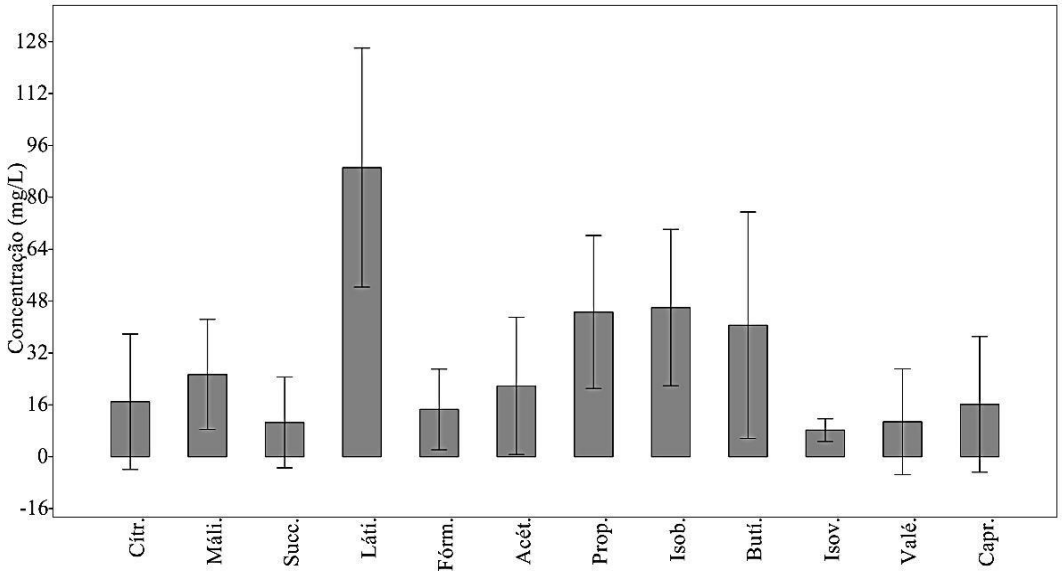

Figura 5.4 – Ácidos orgânicos da água de lavanderia

5.1.3 – pH e alcalinidade

Neste estudo observou-se pH de 5,6, sendo 3,3 e 6,8, os valores mínimo e máximo, respectivamente. Costa (2009) observou valores de pH de 9,8±0,1 em água de lavanderia,. Diferente do reportado na literatura, o pH teve característica ácida.

Segundo Eriksson (2002), o pH na água cinza é diretamente relacionado com valor da água de abastecimento. Entretanto, alguns produtos químicos, tais como, amaciante, alvejante e desinfetante podem contribuir para a variação deste parâmetro. Entretanto, na água residuária usada no presente estudo não foi adicionado amaciante ou alvejante no processo de lavagem.

De acordo com a Legislação Federal CONAMA 357/2005, o valor de pH aceitável para efluentes varia de 5 a 9. O valor médio registrado neste estudo se encaixa dentro desta resolução, embora, em algumas amostras tenham sido observados valores de pH abaixo do permitido (33,3% das amostras).

A Legislação Estadual do Estado de São Paulo (CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo Paulista), Decreto 8.468/1976, estabelece que efluente de qualquer fonte poluidora somente poderá ser lançado em sistema de esgoto sanitário, provido de tratamento e com pH entre 5,0 (cinco inteiros), e 9,0 (nove inteiros). Sendo assim, de acordo com essa legislação, 40% das amostras apresentaram pH insatisfatório.

Os valores de alcalinidade total (22±19,1 $mgCaCO_3.L^{-1}$) e parcial (3,38±3,7 $mgCaCO_3.L^{-1}$) observados foram baixas. Rose et al. (1991), registraram valores de alcalinidade variando de 149 a 198 $mgCaCO_3.L^{-1}$ em água cinza doméstica. Costa (2009), observou valores bem superiores aos deste trabalho, ou seja, 1.784,20 ± 1.693,4 $mgCaCO_3.L^{-1}$ para alcalinidade total em água de lavanderia comercial.

A alcalinidade é um parâmetro muito importante quando se pretende tratar água residuária com surfactantes pela digestão anaeróbia, visto que redução do pH pode prejudicar o crescimento de microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica (ERIKSSON et al., 2002). O acúmulo de ácidos orgânicos em processos anaeróbios de tratamento de efluentes pode causar o consumo da alcalinidade livre e, consequentemente, diminuir o pH do meio (MONTEGGIA; BEAL, 1994).

5.1.4 – Sulfato e sulfeto

Assim como, no esgoto sanitário, íon sulfato (SO_4^{-2}) está presente na água cinza. Foi detectada baixa concentração de sulfato e sulfeto, cujos valores médios foram de 21,06±18,7 mg.L^{-1} e 0,17±0,13mg.L^{-1}, respectivamente (Figura 5.5).

Rose et al. (1991), registraram valor semelhante de sulfato (22,9 mg.L^{-1}). Casanova et al. (2001) e Hypes (1974), registraram valores mais elevados desse composto, ou seja, 59 e 117 mg.L^{-1}, respectivamente.

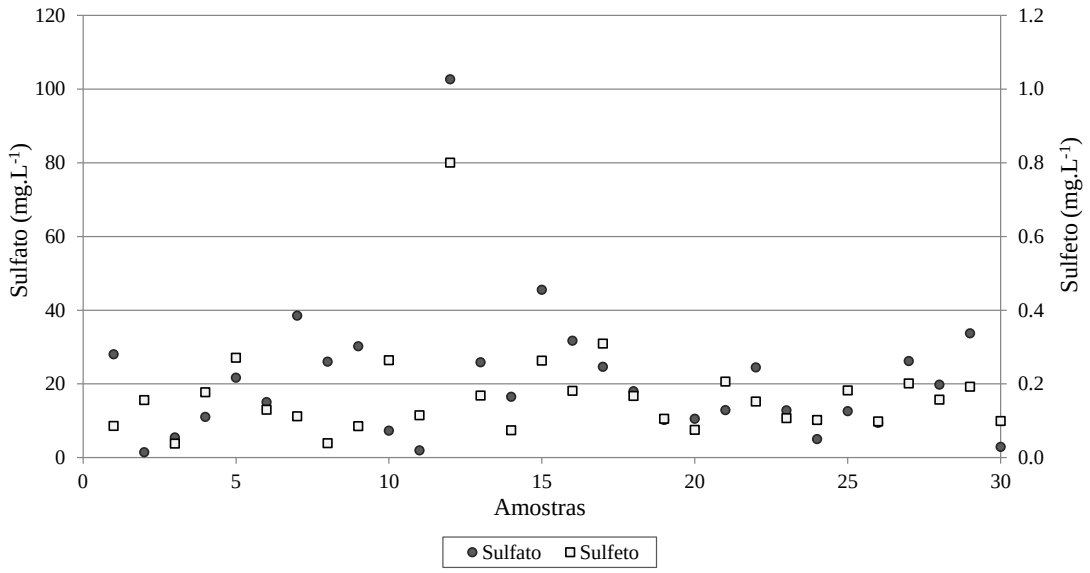

Figura 5.5 – Variação de sulfato e sulfeto em água de lavanderia comercial

Entretanto, nas águas cinza essas concentrações são pouco preocupantes em virtude da rapidez com que esta se torna anaeróbia. Em condição anaeróbia, sulfato é reduzido a sulfeto (METCALF; EDDY, 2003).

Por meio do Decreto Estadual de São Paulo n˚8.468/76 preconiza-se o lançamento máximo de até 1.000 e 1 mg.L^{-1} para o sulfato e sulfeto, respectivamente. Logo, ambos, os parâmetros estiveram muito abaixo do permitido.

5.1.5 – Compostos nitrogenados

Dentre os compostos nitrogenados observou-se maior valor de nitrato, 8,37±6,84 $mg.L^{-1}$, e superior aquele registrado na literatura. Rose et al. (1991) observaram até 4,9 $mg.L^{-1}$ em água cinza doméstica. Gerba et al. (1995) verificaram 1,8 a 3,0 $mg.L^{-1}$ de nitrato em sistema de tratamento de água residuária contendo surfactantes.

O valor encontrado para nitrogênio amoniacal foi inferior ao permitido pela Resolução CONAMA 357/2005 que é de 20 $mg.L^{-1}$ para lançamento de efluente. Nesse trabalho observou-se 7±10,8 $mg.L^{-1}$ para nitrogênio amoniacal. Christova-Boal et al. (1996) verificaram até 40 $mg.L^{-1}$ em água de lavanderia.

A água cinza contribui, em geral, com apenas 7,7% da carga de nitrogênio total e com 2,3% da carga de amônia de uma residência (GRAY; BECKER, 2002).

Jefferson et al. (2001) citam que a deficiência em ambos, macro e micronutrientes na água cinza pode limitar a eficiência do tratamento pelo processo biológico. Foram observados baixos valores de compostos nitrogenados (Tabela 5.1). A análise da série nitrogenada (nitrato, nitrito e nitrogênio amoniacal) foi negativa para a presença desses compostos nas amostras provenientes da caracterização da água de lavanderia realizada por Costa (2009).

5.1.6 – Fosfato, fluoreto e brometo

Em água de lavanderia geralmente observa-se baixa concentração de fósforo devido à presença de detergentes livre de fósforo (LI et al., 2009). Em locais onde o uso dos detergentes contendo fosfatos não é permitido, o conteúdo de fósforo na água cinza tende a ser 70% menor (OTTERPOHL, 2001).

Verificou-se 94±74 $mg.L^{-1}$de fosfato em 93,3% das amostras (28 do total de 30 amostras). A água cinza contribui, em geral, com 12,4% da carga de fósforo em uma residência (GRAY; BECKER, 2002).

O fluoreto (9,4±12,4 $mg.L^{-1}$) e brometo (3,3±1,9 $mg.L^{-1}$) foram detectados em 70% e 20% das amostras, respectivamente.

5.1.7 – Metais pesados

A concentração de metais pesados em água residuária é em geral baixa. Entretanto, metais solúveis podem ser adsorvidos em partículas orgânicas e concentrados em lodo de estação de tratamento de esgoto (AONGHUSA; GRAY, 2002). Na prática, mais de 96% de todos os metais que entram no sistema de tratamento de esgoto poderá ser retido no lodo (ERIKSSON; DONNER, 2009).

Verificou-se para todos os metais analisados valor abaixo daquele máximo permitido para lançamento de efluente segundo CONAMA 357/2005 (Tabela 5.3). Dentre os metais analisados neste estudo observou-se 0,56 $mg.L^{-1}$ e 0,22 $mg.L^{-1}$ para o zinco e ferro, respectivamente. Ambos foram detectados em 100% das amostras. Hypes (1974), detectou valor semelhante de zinco (0,62 $mg.L^{-1}$) e metade do valor de ferro (0,11 $mg.L^{-1}$) ao caracterizar água cinza doméstica.

Tabela 5.3 – Concentração de metais pesados em água de lavanderia comercial

	Valor				CONAMA	DECRETO
Metais Pesados ($mg.L^{-1}$)	**Mínimo**	**Máximo**	**Média**	**Desvio**	**357**	**8468**
Zinco	0,031	3,589	0,558	0,76	5,0	5,0
Chumbo	<0,01	0,17	0,057	0,05	0,5	0,5
Cádmio	<0,0006	0,08	0,023	0,02	0,2	0,2
Níquel	<0,008	0,083	0,04	0,02	2,0	2,0
Ferro	0,037	0,723	0,216	0,22	15,0	15,0
Manganês	<0,003	0,199	0,036	0,05	1,0	1,0
Cobre	<0,003	0,088	0,034	0,03	1,0	1,0
Cromo	<0,005	0,062	0,021	0,01	0,5	5,0

Apesar disso, os valores observados foram inferiores ao limite máximo permitido, tanto, pelo CONAMA 357/05 e 20/86, quanto, pelo Decreto Estadual n˚ 8.468/76, que é de 5 $mg.L^{-1}$ e 15 $mg.L^{-1}$ para o zinco e ferro, respectivamente.

O zinco tem muitas aplicações nas indústrias. Por exemplo, acetato de zinco, cloreto de zinco e sulfato de zinco são usados no tingimento de tecidos, indústrias de medicamentos, produção de bloqueador solar, desodorante, xampus anticaspa, e etc. (AGENCY FOR TOXIC

SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1994), justificando, assim, os maiores valores encontrados neste estudo.

No tratamento biológico, zinco por ser anti-séptico, quando em alta concentração, inibe o processo, sendo considerado tóxico para os microrganismos (BEYENAL, 1997).

Apenas quantidades relativamente baixas de metais pesados em água residuária cinza têm sido reportadas na literatura. Todavia, Jeppesen (1993), ao estudar reuso de água cinza doméstica, verificou 100 $mg.L^{-1}$ de zinco. Água residuária de lavanderia contém em média 0,09 – 0,34 $mg.L^{-1}$ de zinco (ERIKSSON et al., 2001), entretanto, foi registrado neste trabalho valor 10,5 vezes maior.

De acordo, com Moriyama et al. (1989), existem muitas fontes de metais pesados nas águas residuárias, incluindo água da cozinha, banheiros, lavanderias e encanamento. Cádmio oriundo de fontes domésticas tem sido detectado, com contribuição de 16% a 49% de toda carga presente na rede de esgoto sanitário (HUTTON et al., 1986).

Comber e Gunn (1996) têm destacado a importância do detergente doméstico, especialmente do sabão em pó, como fonte significativa de cádmio, cobre e zinco no esgoto sanitário.

Jenkins e Russel (1994) ressaltaram a contribuição de metais provenientes de produtos domésticos de limpeza para a carga total de metais nos esgotos domésticos: detergentes líquidos e em pó para lavanderia, para máquinas de lavar louça e para pia; branqueadores líquidos e em pó (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Contribuição dos metais no esgoto doméstico

Metal	**Contribuição (%)**
Arsênio	73
Cádmio	6,5
Cromo	5,6
Níquel	3,2
Chumbo	0,5
Zinco	0,5
Mercúrio	0,5
Prata	0,5
cobre	0,5

Fonte: Jenkins e Russel (1994)

Comber (1996) quantificou a contribuição de metais a serem lançados nas redes de esgotos, provenientes de esgotos domésticos, tomando amostras, para análise, de produtos de higiene, limpeza e cosméticos tais como, condicionadores de roupa e cabelo, banhos de espuma, xampus, limpadores de piso, detergentes, e outros.

A concentração de metais nesses produtos foi de pequeno significado; porém, no sabão em pó, evidenciou-se elevada concentração de Cu, Zn e Cd e, portanto, fonte significante de cádmio, presente como impureza nos compostos fosfatados usados como agentes coadjuvantes, que compõem até 30% dos detergentes, o que implicaria em significativa carga de cádmio no esgoto. Produtos pós-barba, xampus, pomadas, cremes para o corpo e maquiagem, desodorante e talco possuem zinco na sua formulação. Xampus medicinais, por exemplo, contém 1% de peritionato de zinco, como anti-séptico.

5.1.8 – Sólidos suspensos

No presente estudo a média de sólidos suspensos totais (SST) foi de 0,08 $g.L^{-1}$, valor inferior quando comparado com aquele obtido por Trujillo et al. (1998), ou seja, 0,16 $g.L^{-1}$ em água de reuso e reciclagem de água cinza (Figura 5.6).

Medidas de sólidos suspensos em água cinza têm sido reportadas na literatura na faixa de 0,017 a 0,33 $g.L^{-1}$, sendo os maiores valores originados de lavanderias e cozinhas (ERIKSSON et al., 2002). De acordo com Al-Jayyousi (2003) água cinza possui baixa concentração de sólidos suspensos, portanto, grande parcela dos contaminantes está na forma dissolvida.

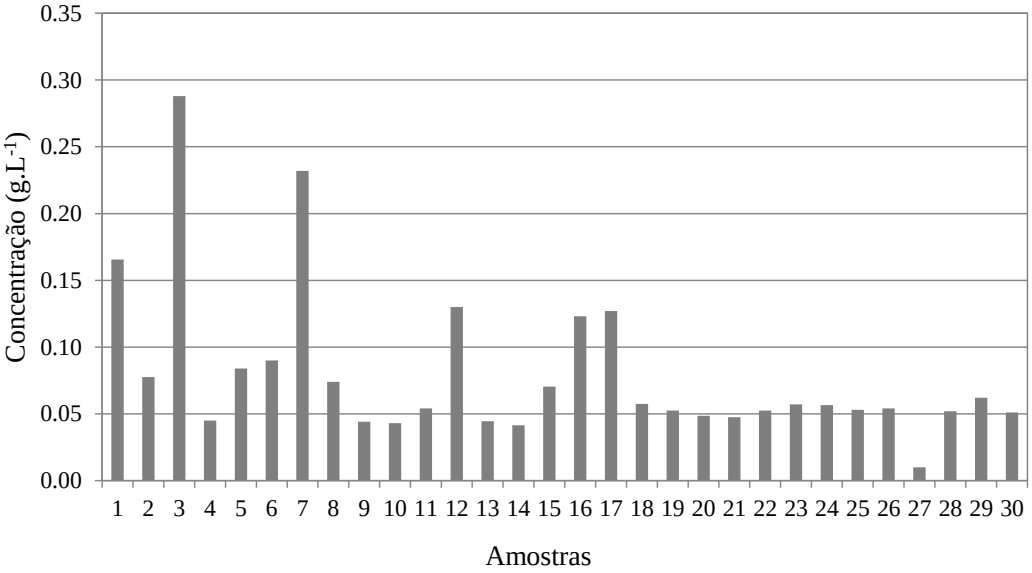

Figura 5.6 – Concentração de sólidos suspensos totais em água de lavanderia

Aproximadamente 32,7% da carga de sólidos do esgoto provêm de águas cinza (GRAY; BECKER, 2002). Essa quantidade poderá levar ao entupimento de tubulação e, por isso, não podem ser negligenciados. O processo de lavagem desprende fibras de tecidos, de tamanhos variados desde trapos até fibras visíveis, somente ao microscópio, o que contribui para o acúmulo de sólidos nas águas de lavanderias.

5.1.9 – Compostos orgânicos xenobióticos

Os principais grupos de compostos orgânicos xenobióticos (COXs) identificados na água residuária de lavanderia foram solventes (Butanol, Etanol, etc.), auxiliares na produção de produtos de limpeza (Cis-dimetil Cicloexanol, Dimetil Cicloexanol, etc.), fragrâncias (Limoneno, Linalol, etc.), preservativo e antioxidante (Fenóxi Etanol) e alguns agentes tensoativos (Tetrametil Butil Fenóxi Etoxilado e Nonil Fenol Etoxilado). Em menor quantidade repelente (Mercaptometano), preservativo/antioxidante (Fenóxi Etanol).

Os principais compostos detectados na água de lavanderia comercial pela análise do *Headspace* foram Butanol (70,96%) e Etanol (5,49%) seguido da fragrância Linalol (3,04%) (Tabela 5.5).

Três compostos do grupo dos terpenos foram encontrados na água de lavandaria, limoneno, linalol e terpineol. Terpenos são usados como fragrâncias em perfumes, detergentes, como constituintes de sabores para temperar alimentos, como medicamentos para o tratamento de numerosas doenças incluindo tumores (BREITMAIER, 2006), na indústria farmacêutica, como antifúngicos (PITAROKILI, 2002) e anti-séptico (KOBAYASHI, 2004).

Terpenos geralmente fazem parte da composição química dessa água devido a atividade inseticida. Alfa-terpineol, mentol, limoneno e linalol foram todos relatados como possuindo atividade inseticida (WILKINS JR, 1999).

O limoneno denominado isoprenil-4-metil-1-ciclo-hexeno, é um monoterpeno monocíclico, sendo produzido por mais de 300 plantas, principalmente, frutas cítricas. Existem várias aplicações do limoneno, tais como solventes para resinas, aplicações em borracha, tintas, agente dispersante para o óleo, além da utilização na síntese química de mentol (CHATTERJEE, 2001).

Limoneno tem sido utilizado em produtos de limpeza, tanto doméstico, como industrial (WILKINS JR, 1999). O efeito inibidor de limoneno em vários microrganismos foi relatado por Chatterjee (2001). Rodrigues et al. (2008) produziram microencapsulação de limoneno para aplicação têxtil.

Linalol é um monoterpeno descrito como sendo componente principal de óleos essenciais em várias espécies aromáticas. Terpineol é um monoterpeno com odor agradável e encontrado em ampla variedade de óleos essenciais com vasta aplicação industrial (BREITMAIER, 2006).

Tabela 5.5 – Compostos detectados na água de lavanderia por CG/MS (*Headspace*)

Composto	**% A**	**Qualidade**
Acetato de Butilcicloexila	3,52	AMDIS
Butanol	70,96	99
Cis-dimetil Cicloexanol	0,4	AMDIS
Decametil Ciclopentassiloxano	1,5	86
Dimetil Cicloexanol	0,89	AMDIS
Dodecametil Cicloexassiloxano	0,92	82
Etanol	5,49	99
Éter Difenila	0,52	78

continua...

continuação...

Composto	% A	Qualidade
Éter Octil Fenila	0,35	74
Etil Hexanol	2,14	89
Formato de Isobornila	1,18	AMDIS
Limoneno	1,82	AMDIS
Linalol	3,04	AMDIS
Mercaptometano	2,04	88
Octametil Ciclotetrassiloxano	0,47	75
Sulfito de Metila	0,6	92
Terpineol	0,93	AMDIS
Tetradeceno	0,37	AMDIS

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

Foram identificados 18 compostos pela injeção direta da amostra (Tabela 5.6). Os principais compostos observados na água de lavanderia foram os seguintes: Citrato de etila (5,88%), Etil hexil ftalato (4,97%) e Nonil fenol etoxilado (4,73%).

Quatro emulsificantes foram observados, sendo eles, Heptadecanol (1,37%), Dimetil Pentadecilamina (0,62%), Ácido octadecanóico (0,61%) e Dimetil etil cicloexeno (0,13%). Os agentes emulsionantes são utilizados para separação de gorduras e água em duas camadas, sendo normalmente caracterizados por uma porção polar e outra apolar, por exemplo, de cadeia longa, ácidos orgânicos e seus álcoois correspondentes (ERIKSSON, 2003).

Três amaciantes e plastificantes foram encontrados, como por exemplo, ftalatos etil hexil ftalato e isobutil ftalato. O ftalato é um composto sintético comumente usado como plastificante para conferir flexibilidade e durabilidade de polímeros, tais como, cloreto de polivinilo. Além disso, este composto é usado em ampla variedade de produtos, tais como tintas, adesivos e cosméticos (LING et al, 2007; HUANG et al, 2007).

Di (2-etil-hexil) ftalato pode ser obtido, em parte, a partir de canalizações de PVC. Fontes domésticas podem estar ligadas ao seu uso em cosméticos, perfumes, tintas, pesticidas, plásticos e indústria têxtil (ØKLAND et al., 2005).

Éter de bisfenol A de Diglicidil é usado como diluente para resinas, como agente de tratamento de têxteis e estabilizador para compostos orgânicos clorados. O bisfenol A é usado também na produção de policarbonato, podendo ser lixiviado de tais materiais se houver excesso de monômero na matriz polimérica (LEITE et al., 2010).

O colesterol foi o único esterol encontrado na água de lavanderia e tem sido previamente detectado em águas cinza (ERIKSSON et al., 2003; OTTOSON; STENSTRÖM, 2003).

Ambos, nonil fenol etoxilado e tetrametil butil fenóxi etoxilado estão presentes na água de lavanderia. O grupo de alquilfenóis inclui vários compostos desde nonilfenol que é um disruptor endócrino, ou seja, tóxico ao sistema reprodutor masculino e feminino (NTP, 2001). Nonilfenol é utilizado como agente de limpeza, amaciador e estabilizador, mas também como intermediário na indústria de processo (ERIKSSON, 2003).

Tabela 5.6 – Compostos detectados na água de lavanderia por injeção da amostra

Composto	**% A**	**Qualidade**
Ácido Octadecanóico	0,61	AMDIS
Ácido Palmítico	1,67	94
Citrato de Etila	5,88	94
Colesterol	1,2	84
Dimetil Etil Cicloexeno	0,13	81
Dimetil Pentadecilamina	0,62	95
Éter de Diglicidil Bisfenol A	0,4	79
Etil Hexil Ftalato	4,97	91
Fenóxi Etanol	0,39	91
Heptadecanol	1,31	AMDIS
Hexadecanol	1,8	97
Isobutil Ftalato	0,22	93
Metil Metóxi Etil Octadecanamina	3,15	72
Nonil Fenol Etoxilado	8,85	AMDIS
Terpineol 0,16 92	0,16	92
Tetrametil Butil Fenóxi Etoxilado	3,48	AMDIS

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

Qualidade = Índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registrados nas bibliotecas utilizadas. Foram adotados índices de qualidade > 70.

AMDIS = Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System.

5.2 – Operação e monitoramento do reator de leito fluidificado

5.2.1 – DQO da água de lavanderia e sua razão de mistura

A DQO bruta e LAS da água de lavanderia, utilizada na alimentação do reator, variaram de 704 a 4.830 $mg.L^{-1}$ e 426,2 a 11.949 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Os parâmetros avaliados da água residuária utilizada ao longo da operação do reator podem ser observados na Tabela A1 (Apêndice). Devido às altas concentrações de LAS na água de lavanderia foram necessárias diluições prévias para se obter a concentração desejada do surfactante. Com isso, pôde se observar reduzida contribuição da DQO da água de lavanderia no afluente do reator, com valores entre 0,1% (Etapa II) a 14,5% (Etapa IV) e baixas razões de misturas (volume de água de lavanderia/volume total de alimentação) (Tabela 5.7).

Os detergentes líquidos utilizados em lavanderias normalmente contém água para auxiliar a solubilização de outros aditivos que fazem parte da sua constituição, além do surfactante e álcool ou hidrótropos. Esses últimos aumentam a solubilidade de compostos hidrofóbicos e auxiliam a mistura dos aditivos (BAJPAI; TYAGI, 2007). Esses aditivos, as sujeiras e fibras das roupas contribuem com aumento da DQO da água residuária, não sendo, muitas vezes, o surfactante o principal responsável pelos elevados valores desse parâmetro.

Tabela 5.7 – Razão de mistura e DQO da água residuária utilizada durante a operação do reator

	Água Lav.	DQOb (mg/L)	LAS (mg/L)	Vol 5L (mL)	Tempo* (dias)	Razão Mistura	DQO (mg/L)	DQO (%)	LAS (mg/L)
Etapa II	1	3.070	1.094,8	40	19	0,008	24,56	3,8	9,5±3
	2	3.543	426,2	120	5	0,024	85,04	13,3	
	3	704	2.038,5	25	12	0,005	0,70	0,1	
	Média Ponderada					0,009	25,01	3,9	
Etapa III	3	704	2.038,5	75	10	0,015	10,56	1,5	23,3±8
	4	886	11.949	15	28	0,003	2,66	0,4	
	5	4.830	2.925	72	8	0,0144	69,55	10,1	
	Média Ponderada					0,0050	16	2,3	
Etapa IV	6	1654	573,5	300	37	0,06	99,22	14,5	21,7±10
	7	1922	1.195	150	20	0,03	57,64	8,6	
	Média Ponderada					0,066	84,63	12,8	
Etapa V	7	1922	1.195	150	20	0,03	57,64	8,6	27,9±10
	Média Ponderada					0,03	57,64	8,6	

DQOb = DQO bruta; * Dia de alimentação

A baixa razão de mistura foi relacionada às altas concentrações do surfactante na água de lavanderia. O LAS representa baixa contribuição na DQO (Tabela 5.8). Oliveira (2010) observou que o aumento da concentração afluente de LAS padrão (Sigma®) de 8,2±1,3 mg.L^{-1} para 45,8±5,4 mg.L^{-1} não correspondeu em aumento da DQO afluente de 644±39 mg.L^{-1} a 632±42 mg.L^{-1}, respectivamente.

Tabela 5.8 – Contribuição da água de lavanderia em DQO afluente

LAS (mg.L^{-1})		**DQO (mg.L^{-1})**		**Acréscimo na DQO (%)**
Padrão	**Água lav.[1]**	**LAS padrão**	**Água lav. [1]**	
5±0,3	5,2±0,9	-	5±1	-
10±0,5	10,8±0,7	13±3	15±4	15,4
20±3	21,1±1,5	33±5	42±15	27,3
30±2,2	32,4±3,2	37±11	61±18	64,8
40±1,5	41,8±2,6	61±21	88±±25	44,3

1 Água de lavanderia diluída para as concentrações específicas de LAS.

O LAS somado aos diversos constituintes da água de lavanderia, propiciou acréscimo no valor de DQO, cuja variação foi de 15,4% (10,8±0,7 mg.L^{-1} de LAS) a 64,8% (32,4±3,2 mg.L^{-1} de LAS) (Tabela 5.8). Trinta e quatro COXs foram identificados na água residuária de lavanderia. As substâncias identificadas foram agrupadas em nove classes de substâncias com base na sua finalidade (Tabela 5.9). Assim, a variedade de compostos observados na água residuária pode ter contribuído com o aumento da DQO afluente comparado com LAS padrão.

Tabela 5.9 – Classes dos compostos encontrados na água residuária de lavanderia

Surfactantes	**Solvente**	**Fragrâncias**
Nonil Fenol Etoxilado	Acetato de Butilcicloexila	Limoneno
Tetrametil Butil Fenóxi Etoxilado	Butanol	Linalol
Produção de Surfactantes	Cis-dimetil Cicloexanol	Sulfito de Metila
Cis-dimetil Cicloexanol	Dimetil Cicloexanol	Terpineol
Dimetil Cicloexanol	Etanol	Hexadecanol
Éter Difenila	Limoneno	**Preservativo e Antioxidante**
Tetradeceno	Sulfito de Metila	Fenóxi Etanol

continua...

continuação...

Produção de Surfactantes	Amaciante e Plastificante	Diversos
Ácido Palmítico	Etil Hexanol	Acetato de Butilcicloexila
Diglicidil Éter de Bisfenol A	Etil Hexil Ftalato	Éter Octil Fenila
Decametil Ciclopentassiloxano	Isobutil Ftalato	Formato de Isobornila
Dodecametil Ciclohexassiloxano	**Emulsificantes**	Colesterol
Octametil Ciclotetrassiloxano	Ácido Octadecanóico	Citrato de Etila
Tetradecametil Cicloheptassiloxano	Dimetil Etil Cicloexeno	Metil Metóxi Etil Octadecanamina
Pesticida/Repelente	Heptadecanol	
Limoneno	Dimetil Pentadecilamina	
Mercaptometano		
Diluente		
Diglicidil Éter de Bisfenol A		

5.2.2 – Imobilização da biomassa

O reator foi instalado em condição mesofílica com temperatura em torno de 30°C, visto que, a velocidade de degradação do LAS pode ser influenciada, tanto, pela origem e características dos microrganismos envolvidos, como pela temperatura e concentração inicial de LAS (QUIROGA et al., 1989; PERALES et al., 1999; SCOTT; JONES, 2000).

Durante a primeira etapa o reator foi mantido em circuito fechado para imobilização e adaptação da biomassa ao substrato sintético e às condições de operação do reator (Figura 5.7). Nessa etapa foram preparados 7 L de alimentação que consistiu em substrato sintético e lodo anaeróbio (5% em volume). A carga orgânica volumétrica aplicada nessa etapa foi de 1.173,11 $gDQO.L.d^{-1}$.

Observou-se para o inóculo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura 48,8 $g.L^{-1}$ de sólidos totais, 36,4 $g.L^{-1}$ de sólidos totais voláteis e 12,4 $g.L^{-1}$ de sólidos totais fixos, pH de 7,3 e -257,8 mV de potencial redox.

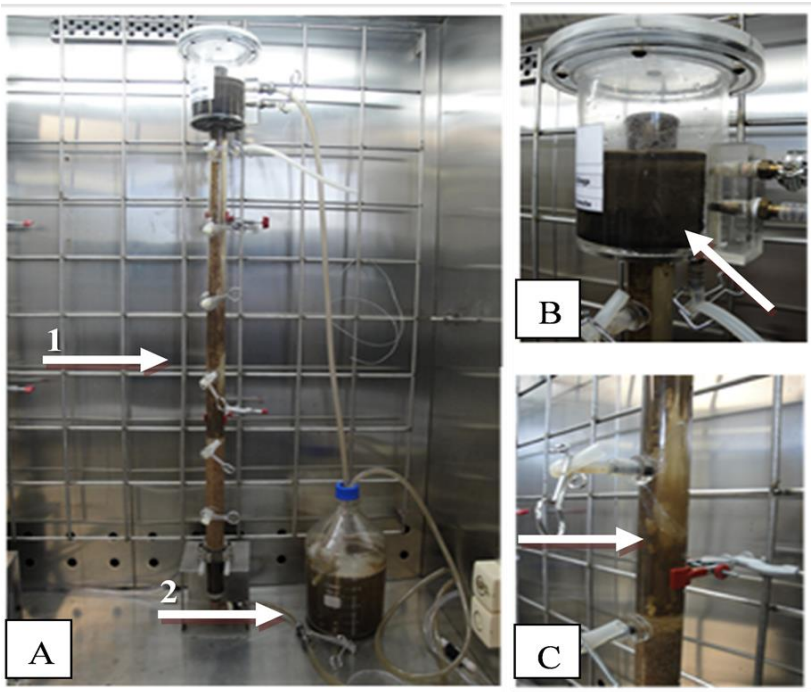

Figura 5.7 – Etapa de inoculação do reator de leito fluidificado: A1 - Reator de leito fluidificado, A2 - Frasco de alimentação; B - Separador de fases; C - Corpo do reator com biomassa aderida

Em cinco, dos setes dias que foram preparadas alimentação, foram realizadas duas análises por dia, tanto, de pH, quanto, de DQO, antes e depois da alimentação. A DQO filtrada foi monitorada diariamente. Ao longo dessa etapa de imobilização da biomassa quando ocorria o consumo da matéria orgânica pelos microrganismos presentes na fase líquida, no material suporte e na parede interna do reator, novo substrato sintético era adicionado ao frasco de Duran®. A suplementação era feita com o objetivo de manter o meio com DQO média de 500 $mg.L^{-1}$.

A DQO filtrada afluente (amostra coletada no frasco Duran® logo após suplementação com substrato sintético) foi de 480±143 $mg.L^{-1}$. O valor efluente (amostra coletada no frasco Duran® de um a quatro dias após suplementação com substrato sintético) foi de 125±54 $mg.L^{-1}$, o que resultou em eficiência média de remoção de matéria orgânica (DQO filtrada) de 71,9±12,9%, durante os 20 dias iniciais de operação (Figura 5.8).

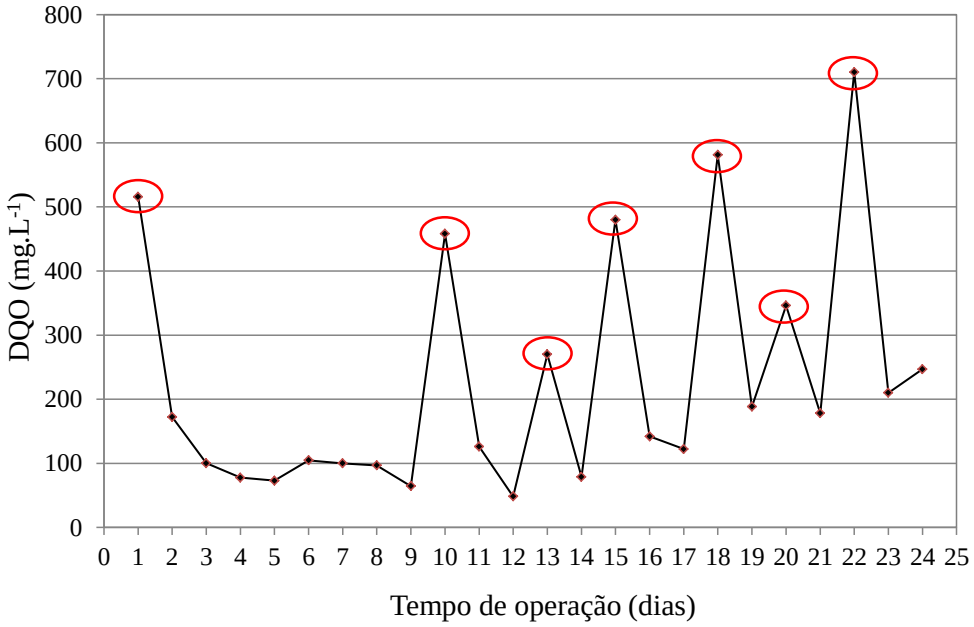

Figura 5.8 – Variação temporal da DQO filtrada durante a etapa de imobilização da biomassa (reator em circuito fechado), os círculos vermelhos representam o dia da alimentação do reator

Pôde-se observar que, o pH registrado logo após a alimentação (8,5±0,1) não diferiu consideravelmente do pH registrado nos dias posteriores, com o consumo do substrato (8,6±0,2), sendo que o pH do sistema nessa etapa variou de 7,83±0,2 a 8,77±0,2 (Figura 5.9). Esses valores foram maiores que os obtidos por Oliveira (2010), de 7,4 a 8,1 para etapa referente a inoculação do reator de leito fluidificado.

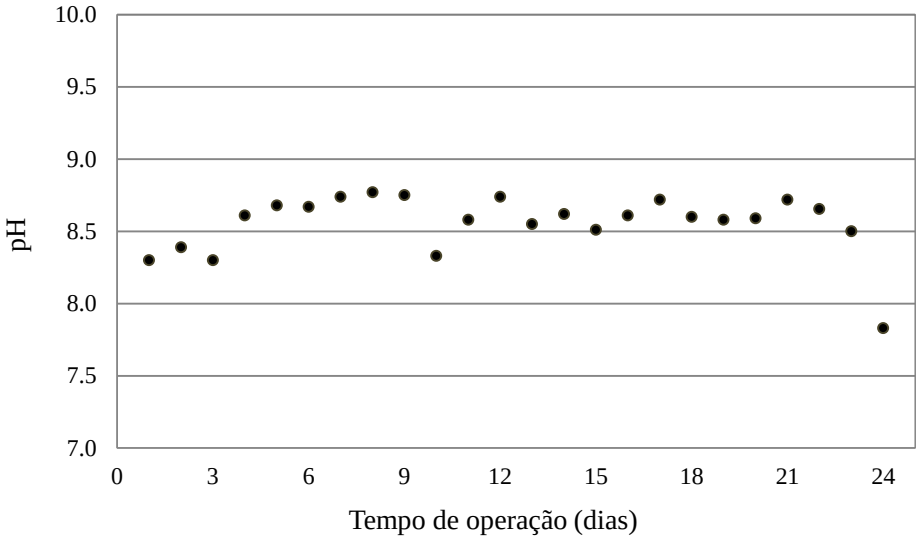

Figura 5.9 – Variação temporal de pH durante a etapa de imobilização da biomassa

A concentração de ácidos orgânicos nesta etapa foi de 67,8±34 mg.L^{-1}, portanto, superior aquele obtido por Ferreira (2012), de 44±34 mg.L^{-1} na etapa de imobilização do reator de leito fluidificado para o tratamento de LAS em sabão em pó comercial .

Neste estudo notou-se que houve grande diversidade de ácidos orgânicos (Figura 5.10), com predominância dos ácidos propiônico (11,7±13 mg.L^{-1}), isobutírico (10,5±6 mg.L^{-1}), succínico (10,1±10 mg.L^{-1}) e isovalérico (9,7±7,7 mg.L^{-1}).

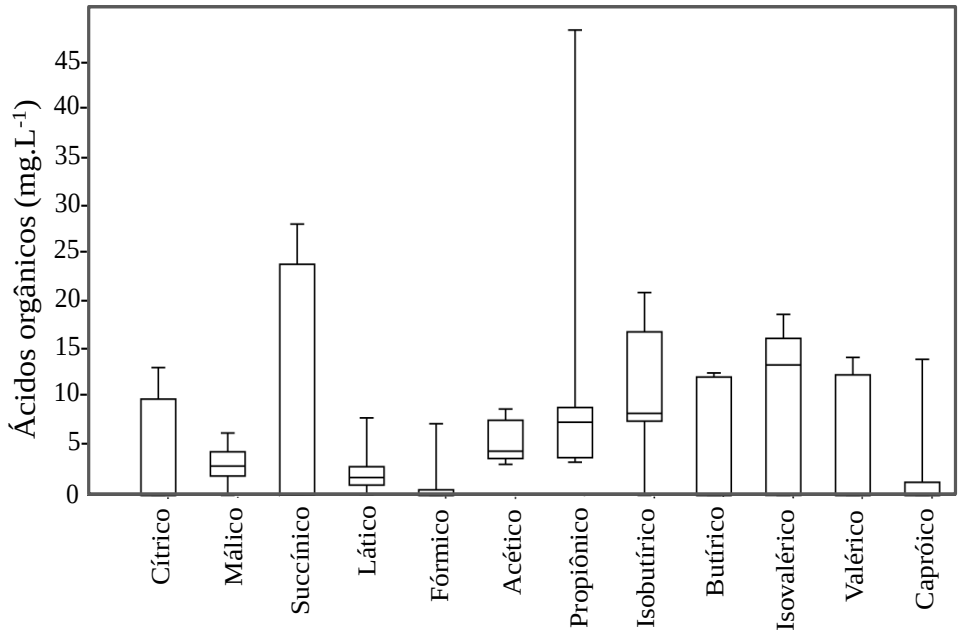

Figura 5.10 – Distribuição de ácidos orgânicos na etapa de imobilização da biomassa

Nesta etapa de imobilização observou-se maior porcentagem referente aos ácidos propiônico e isobutírico com 17,3% e 15,5%, respectivamente (Figura A1, apêndice). Foi verificado também nesta etapa 39,8±13 mg.L^{-1} de glicose. A geração destes compostos pode ser oriunda da intensa atividade microbiana e consequente quebra da molécula da sacarose.

5.2.3 – Remoção de matéria orgânica

O reator foi colocado em circuito aberto por 39 dias durante a primeira etapa de operação com substrato sintético (sem água residuária de lavanderia) e 575±28 mg.L^{-1} de DQO com TDH de 19,9 horas.

Nesta etapa obteve-se eficiência de remoção DQO filtrada de 89,8±1,8% (Figura 5.11) para 598±49 mg.L^{-1} afluente. Tal resultado foi similar ao obtido por Oliveira (2010) e Carosia (2011) que observaram eficiência de 89±2% e 87,2±5,4%, respectivamente, na remoção de matéria orgânica ao utilizarem o mesmo tipo de reator alimentado somente com substrato sintético (sem surfactante). A carga orgânica volumétrica aplicada nessa etapa foi de 1.209 gDQO.L.d^{-1}.

Durante a segunda etapa de operação do reator (107dias) passou a ser adicionada água de lavanderia com 9,5±3 mg.L^{-1} de LAS ao substrato (Etapa II). Nessa etapa obteve-se remoção de 83,3±9,8% de DQOf para 622±70 mg.L^{-1} afluente e TDH de 17,7h. Costa (2009), ao trabalhar com a mesma configuração de reator, para tratar água de lavanderia (13 mg.L^{-1} de LAS) obteve eficiência de remoção de matéria orgânica de 88,7±3%, para 793±67 mg.L^{-1} afluente e TDH de 18 horas.

Neste estudo, a eficiência de remoção da matéria orgânica declinou sensivelmente de 87,8% (36º dia; Etapa I) para 81% (37º dia; Etapa II) e, posteriormente, para 73,4% (39º dia; Etapa II). Pôde-se observar que, após a adição da água de lavanderia ao reator, a eficiência de remoção de DQO oscilou muito, com valores de 64% a 96,5% (Figura 5.11). Provavelmente, essa oscilação foi devido a possível influência dos compostos xenobióticos da água residuária de lavanderia à comunidade microbiana.

No decorrer da terceira etapa de operação do reator (Etapa III) pôde-se observar maior estabilidade na eficiência de remoção de matéria orgânica, comparada à etapa anterior. Nessa etapa para TDH de 18,6h foi adicionado 23±8 mg.L^{-1} de LAS em água de lavanderia e 686±93 mg.L^{-1} de DQOf afluente durante 137 dias de operação. Obteve-se nessa etapa 90,9±3,3% de remoção. Pôde se observar que o aumento da concentração de surfactante em 142,1% (de 9,5 para 23 mg.L^{-1}) não afetou negativamente a biomassa, uma vez que a eficiência de remoção da matéria orgânica aumentou de 83% para 91%.

Na quarta etapa de operação (Etapa IV) com 87 dias, houve acréscimo na eficiência de remoção de DQO, para 95±2,4%. A DQOf afluente foi de 666±54 mg.L^{-1} para TDH de 23h. O aumento do TDH foi necessário já que a eficiência de remoção de LAS estava muito baixa quando comparada com a da matéria orgânica.

Na última etapa de operação do reator (Etapa V) com duração de 67 dias observou-se remoção de 88±5% para 666±161 mg.L^{-1} de DQOf afluente. Nessa etapa foi adicionado 27,9±9,5 mg.L^{-1}de LAS afluente. Pode-se, assim observar que a retirada da sacarose da alimentação do reator nessa última etapa não interferiu negativamente na remoção, embora tenha sido ligeiramente menor quando comparada com a etapa anterior, com sacarose.

Durante toda operação do reator observou-se 72,9±55 mg.L^{-1}de DQOf efluente durante. Pode-se assim afirmar que o aumento gradual da concentração afluente de LAS (9,5±3 mg.L^{-1} até 27,9±9,6 mg.L^{-1}) não inibiu os microrganismos responsáveis pela remoção da matéria orgânica.

Oliveira (2010) avaliou a remoção de LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado e obteve eficiência próxima a observada neste estudo; ou seja, de 88% a 91% de remoção de matéria orgânica para 632 mg.L^{-1} de DQO afluente. Entretanto, diferente do presente estudo, a autora utilizou 8 mg.L^{-1} a 46 mg.L^{-1}de LAS padrão (Sigma®).

Ferreira (2012) utilizou sabão em pó como fonte de LAS em reator de leito fluidificado com sacarose como co-substrato. Ao contrário deste estudo, este autor verificou decréscimo da eficiência de remoção de matéria orgânica, quando aumentou a concentração de LAS de 6,8±2 mg.L^{-1} para 16,4 mg.L^{-1}. Esse autor observou redução de 85% para 77% para DQO afluente de 615± 99 mg.L^{-1} e 582 mg.L^{-1}, respectivamente. Carosia (2011) também usou a mesma configuração de reator e obteve para 14,4±3,5 mg.L^{-1}de LAS de sabão em pó de uso doméstico, eficiência máxima de 86% de remoção de matéria orgânica (607±60 mg.L^{-1} de DQO afluente).

Assim, água residuária deste estudo (lavanderia comercial) é mais complexa devida a variedade de compostos. Todavia, obteve-se alta eficiência de remoção de matéria orgânica com a aplicação do RALF durante toda operação do reator.

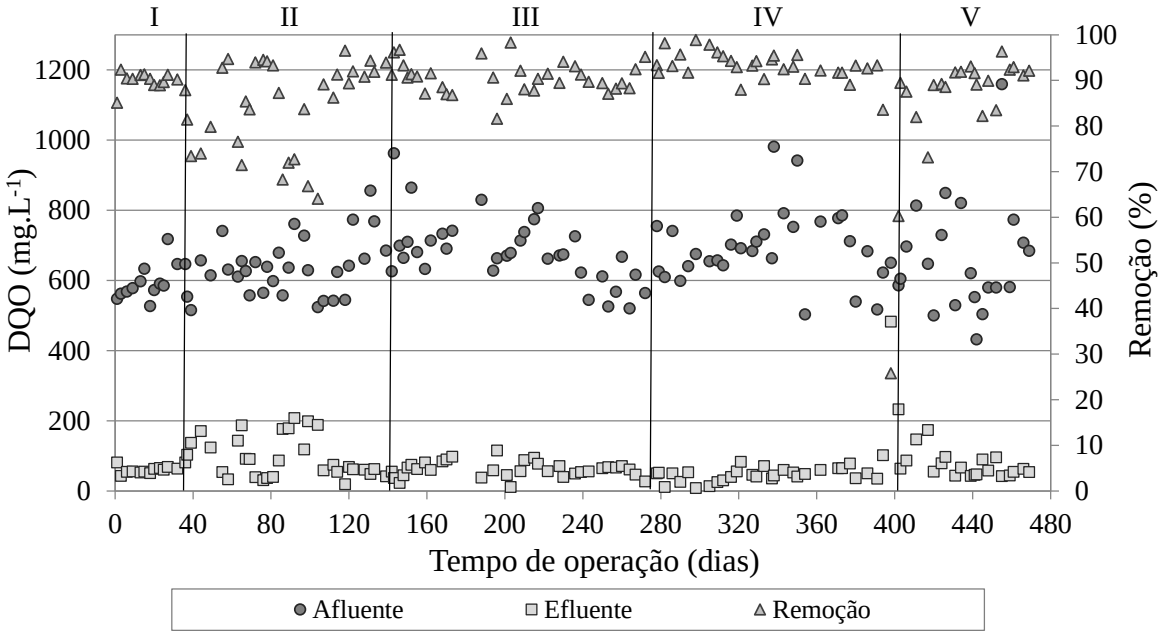

Figura 5.11 – Variação temporal da DQO filtrada afluente e efluente e eficiência de remoção

Na etapa I (adaptação), a COV aplicada ao reator foi de 704,8 a 960,5 mgDQO.L.dia^{-1} com valor médio de 799,9±65,8 mgDQO.L.dia^{-1} (Figura 5.12). Nessa etapa de operação a eficiência de remoção de matéria orgânica foi constante, embora a COV, ao longo do tempo, tenha aumentado sensivelmente. A adição da água de lavanderia ao sistema elevou 5,9% a COV aplicada ao reator. A eficiência de remoção de DQO diminuiu de 89,8±1,7% para 82,8±9,9% da etapa I para a II.

A COV aplicada na 2ª etapa de operação do reator foi de 689,4 mgDQO.L.dia^{-1} a 1.145,2 mgDQO.L.dia^{-1}, com valor médio de 852,9±108,9 mgDQO.L.dia^{-1}. Observou-se que o aumento da COV aplicada, na etapa II (com água de lavanderia) foi seguido do aumento da eficiência de remoção da matéria orgânica ao longo do período de operação do reator (Figura 5.12). Logo, o incremento dessa carga não influenciou negativamente na eficiência de remoção de matéria orgânica, uma vez que, verificou-se tendência linear crescente.

Na etapa III a COV aplicada foi de 696 mgDQO.L.dia^{-1} a 1.287 mgDQO.L.dia^{-1}, com valor médio de 917,5±124,2 mgDQO.L.dia^{-1}. Embora, tenha sido observado aumentado de 7,6% da COV aplicada da etapa II para a III, a eficiência de remoção da matéria orgânica não foi prejudicada, uma vez que houve aumento de 7,3% em relação a etapa anterior.

Na etapa IV (com sacarose) a COV aplicada foi de 577 mgDQO.L.dia^{-1}a 1550 mgDQO.L.dia^{-1}, com valor médio de 780±127 mgDQO.L.dia^{-1}. Observou-se decréscimo da carga aplicada e manutenção na eficiência de remoção da DQO de 90,9±3,2% (Etapa III) para 90±13,4% (Etapa IV). Apesar da variação da COV aplicada ao reator verificou-se a recuperação do sistema aos efeitos tóxicos dos compostos xenobióticos da água de lavanderia.

Observou-se na última etapa de operação do reator (Etapa V, sem sacarose) COV aplicada entre 529 mgDQO.L.dia^{-1} e 1.050 mgDQO.L.dia^{-1}, com valor médio de 893±213 mgDQO.L.dia^{-1}. Estes valores foram próximos ao verificado na etapa anterior, quando havia sacarose adicionada ao substrato sintético. Desse modo, verificou-se que a presença de sacarose ao substrato sintético não influenciou significativamente a carga orgânica aplicada ao reator.

Pode-se observar maior instabilidade da COV aplicada nas etapas III, IV e V (Figura 5.12). Essa instabilidade foi acompanhada de decréscimo na eficiência de remoção de matéria orgânica. O aumento da concentração do surfactante nas etapas III e V, a mudança do TDH na etapa IV e a retirada da sacarose também na etapa V podem ter contribuído com à diminuição dessa eficiência.

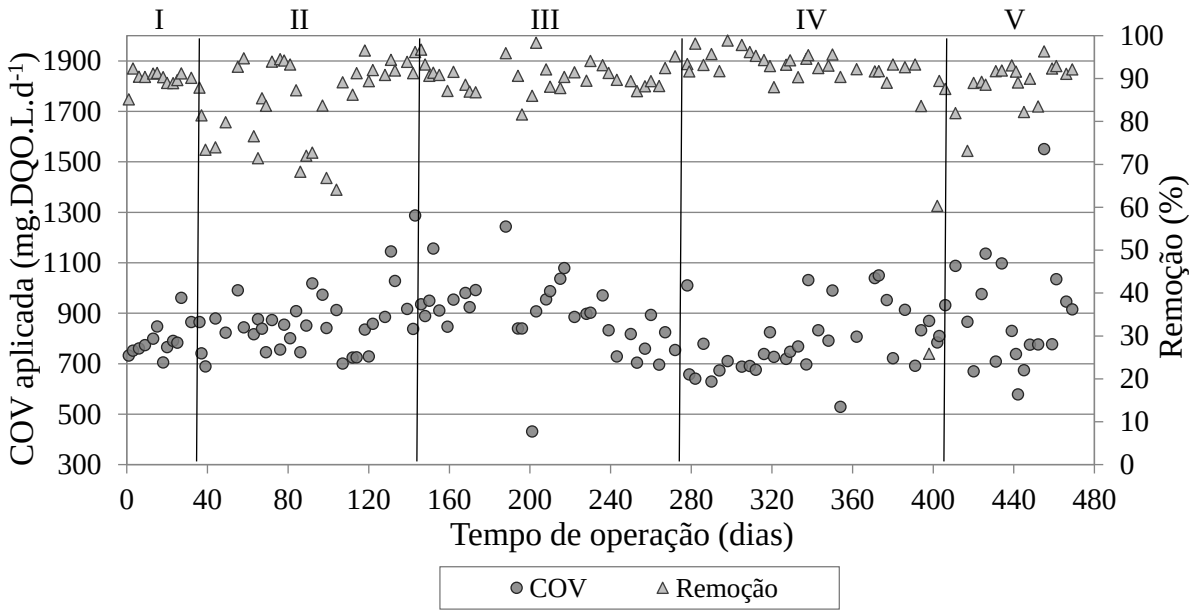

Figura 5.12 – Variação temporal da carga orgânica volumétrica (COV) afluente e eficiência de remoção

5.2.4 – Remoção de LAS

A variabilidade da concentração de LAS na água de lavanderia (Tabela A1, apêndice) dificultou sobremaneira a sua diluição para alimentação do reator, conforme previamente apresentado na caracterização analítica. Neste estudo observou-se variação na eficiência de remoção do LAS durante todo o período de operação do reator (Figura 5.13). Provavelmente, essa instabilidade do sistema foi devido ao surfactante e aos demais compostos xenobióticos da água de lavanderia. Entretanto, a diminuição da eficiência de remoção de LAS não correspondeu à diminuição da eficiência de remoção de matéria orgânica (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 – Valor afluente, efluente e eficiência de remoção do LAS e DQO

Etapa	Amostra	DQO ($mg.L^{-1}$)	Efic. DQO (%)	LAS ($mg.L^{-1}$)	Efic. LAS (%)
I	Afluente	598±49	89,8±1,8	-	-
	Efluente	61±15		-	
II	Afluente	622±70	83,3±9,8	9,51±3,08	74,6±14,1
	Efluente	96±58		2,44±1,37	
III	Afluente	686±93	90,9±3,3	23,34±5,49	65,3±14,3
	Efluente	61±22		8,27±4,45	
IV	Afluente	666±54	95±2,4	21,68±9,92	52,8±16
	Efluente	68±85		9,47±4,04	
V	Afluente	666±161	88±5	27,91±9,57	39,3±20,6
	Efluente	73±34		16,15±6,39	

Nas Etapas II, III e IV a composição do substrato sintético foi idêntica (extrato de levedura, sacarose e sais) variando a concentração de LAS de água de lavanderia. Todavia, na última etapa de operação (Etapa V) houve a retirada da sacarose do substrato sintético, bem como aumento da concentração de LAS afluente.

Na Etapa II de operação do reator (107 dias) a eficiência de remoção de LAS foi 74,6±14,1% para concentração afluente do surfactante de 9,51±3,08 $mg.L^{-1}$. Ao empregar 13,2±5,8 $mg.L^{-1}$ de LAS presente em água de lavanderia. Costa (2009) constatou 85,3±11,7% de remoção do surfactante ao utilizar o mesmo reator, o mesmo material suporte, sacarose no substrato sintético e o mesmo inóculo deste estudo.

Na Etapa III, com duração de 137 dias observou-se 65,3±14,3% de remoção de LAS para 23,3±5,5 $mg.L^{-1}$ afluente. A partir desse aumento da concentração de LAS a eficiência de remoção diminuiu em 9,3% em relação à etapa anterior. Ferreira (2012) utilizou sabão em pó como fonte de LAS em reator de leito fluidificado com sacarose como co-substrato. O autor verificou aumento da eficiência de remoção de LAS, quando aumentou a concentração de LAS afluente de 6,8±2 $mg.L^{-1}$ para 16,4 $mg.L^{-1}$. Esse aumento foi de 33,1±12% para 40,7±13%, respectivamente. As concentrações de LAS empregadas pelo autor foram inferiores aquelas do presente estudo (9,51±3,08 $mg.L^{-1}$ a 27,91±9,57 $mg.L^{-1}$). Devido à complexidade da água residuária empregada neste trabalho a eficiência de remoção de LAS diminuiu com o aumento

da concentração do surfactante afluente, embora, tenha sido observados maiores valores de remoção que Ferreira (2012).

Na Etapa IV de operação (125 dias), 23,6±10 $mg.L^{-1}$ de LAS foi adicionado ao afluente do reator e aumentou-se o TDH para 23 horas, com a finalidade de aumentar a eficiência de remoção de LAS. Entretanto, isso não foi observado. Ao contrário, houve decréscimo na eficiência em 14% e 24,7%, quando comparado às etapas III e II, respectivamente. Em reator anaeróbio de leito granular expandido (EGSB), observou-se decréscimo da remoção de LAS de 64% para 48%, com a diminuição do TDH de 32 h para 26h (DELFORNO et al., 2012), diferente do observado no presente estudo; ou seja, o aumento do TDH não correspondeu ao aumento na eficiência de remoção do surfactante.

Segundo Manousaki et al. (2004), entre 20 e 50 $mg.L^{-1}$ de LAS podem restringir as vias de sua degradação e concentrações maiores podem ainda ter efeito inibitório total em sistema anaeróbio de tratamento. Na última etapa de operação do reator (Etapa V) com duração de 67 dias e sem a sacarose como co-substrato, verificou-se remoção de 39,3±20,6% de LAS para 27,91±9,57 $mg.L^{-1}$ afluente. Pode-se assim observar que houve diminuição de 13,5% dessa eficiência comparada a Etapa IV.

De acordo com Abboud et al. (2007) os co-substratos são necessários para os microrganismos responsáveis pela degradação do LAS permanecerem com atividade enzimática estável. Na última etapa de operação, não foi adicionado sacarose na alimentação do reator. Sob tais condições observou-se diminuição da remoção de LAS. Todavia, Sanz et al. (2003) e Duarte et al. (2010), utilizando LAS padrão (Sigma®), mencionam aumento da eficiência de remoção de surfactante na ausência de co-substratos (acetato, propionato, butirato, lactato, metanol, etanol e sacarose).

A presença de co-substrato é relatada como benéfica aos microrganismos, pois contribui para diminuir a fase *lag*, período de adaptação ao meio (SINGH, 2006), devendo ser fonte de carbono e de energia de fácil assimilação e de reatividade elevada, entretanto, a variedade de compostos xenobióticos da água de lavanderia e a ausência de sacarose na ultima etapa de operação (Etapa V) podem ter sido prejudiciais ao sistema diminuindo a eficiência de remoção de LAS.

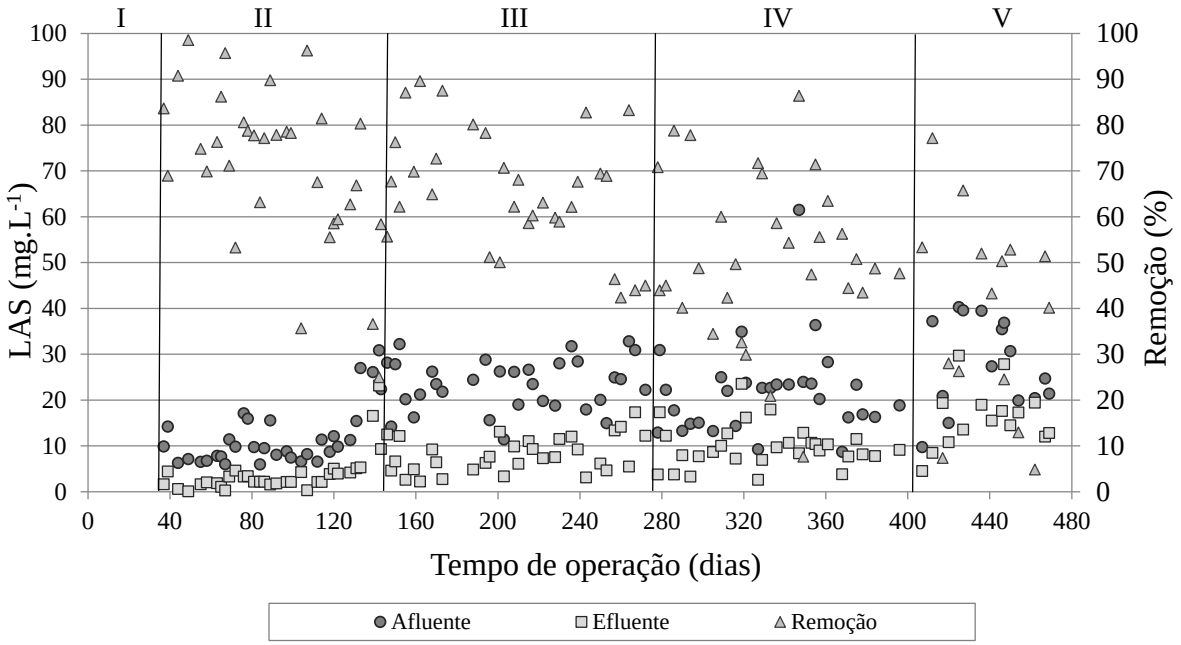

Figura 5.13 – Variação temporal do LAS afluente, efluente e eficiência de remoção

Oliveira (2010) verificou valores de eficiência de remoção de LAS padrão acima de 90% para 24,4 $mg.L^{-1}$ a 45,8 $mg.L^{-1}$ afluente, quando utilizou reator de leito fluidificado com areia como material suporte e substrato sintético contendo sacarose como co-substrato. Neste estudo, porém com água residuária de lavanderia como fonte de LAS, observou-se diminuição da remoção de LAS quando a sacarose foi retirada da alimentação.

Vale notar que a biodegradação primária do LAS ocorre mais favoravelmente na ausência de co-substratos, o que demonstra que o alquilbenzeno linear sulfonado pode ser usado como fonte de energia e carbono, não sendo usado apenas no co-metabolismo dos microrganismos. Essa observação é válida, tanto, para experimentos realizados sob condição anaeróbia (SANZ et al., 2003) e aeróbias (ELSGAARD et al., 2003). Entretanto, no presente trabalho a eficiência de remoção do LAS diminuiu na etapa em que a sacarose (co-substrato) foi retirada da alimentação. Vale ressaltar que nessa etapa foi utilizada maior concentração de LAS e, provavelmente, os xenobióticos da água residuária podem ter interferido nessa via de degradação do LAS.

Haagensen et al. (2002) afirmam ter observado correlação entre a degradação de matéria orgânica e transformação de LAS, ou seja, o aumento da eficiência da remoção biológica de LAS foi acompanhado por aumento na eficiência de degradação da matéria orgânica. Destaca-se que em todos esses trabalhos foi empregado LAS padrão. Portanto, totalmente diferente em relação a aplicação da água residuária de lavanderia.

O valor médio efluente (2,13±1,2 mg.L^{-1}) obtido durante toda operação do reator (Etapas II – V), foi superior aquele estabelecido pela resolução CONAMA n◦357/2005 de 0,5 mg.L^{-1} de LAS como “substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno”.

Observou-se que o LAS da água de lavanderia possuía apenas 2 homólogos, sendo aproximadamente 2% de C12 e 98% de C13 (Figura 5.14). No efluente (313°dia de operação) foi possível constatar os seguintes homólogos do LAS: 11% de C10, 70% de C11 e 19% de C13. Provavelmente ocorreu a quebra da molécula do LAS em cadeias menores como foi detectado no efluente do reator.

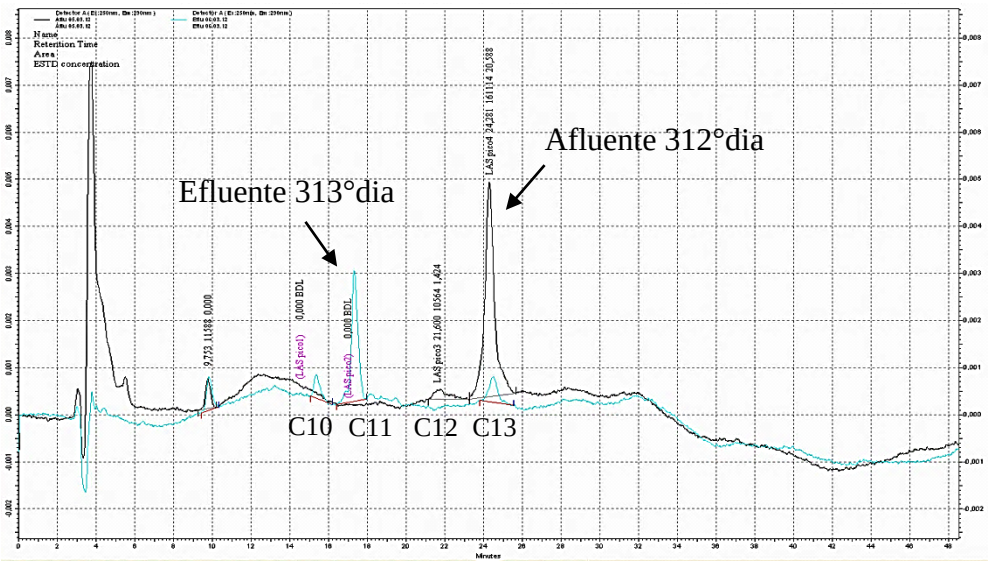

Figura 5.14 – Cromatograma do LAS afluente (em preto) e efluente (em azul)

Os isômeros de cadeia com maior número de átomos de carbono são mais facilmente degradados e há preferência por isômeros de posição próximos ao final da cadeia alquílica (SWISHER, 1987).

A carga de LAS aplicada ao reator, durante todo período de operação foi de 7,9 mgLAS.L.dia^{-1} a 58,7 mgLAS.L.dia^{-1} e valor médio de 26,12±13,2 mgLAS.L.dia^{-1}. A carga removida foi de 14,5±8,5 mgLAS.L.dia^{-1}. Para tanto, verificou-se diminuição da eficiência de remoção de LAS ao longo das etapas (Figura 5.15).

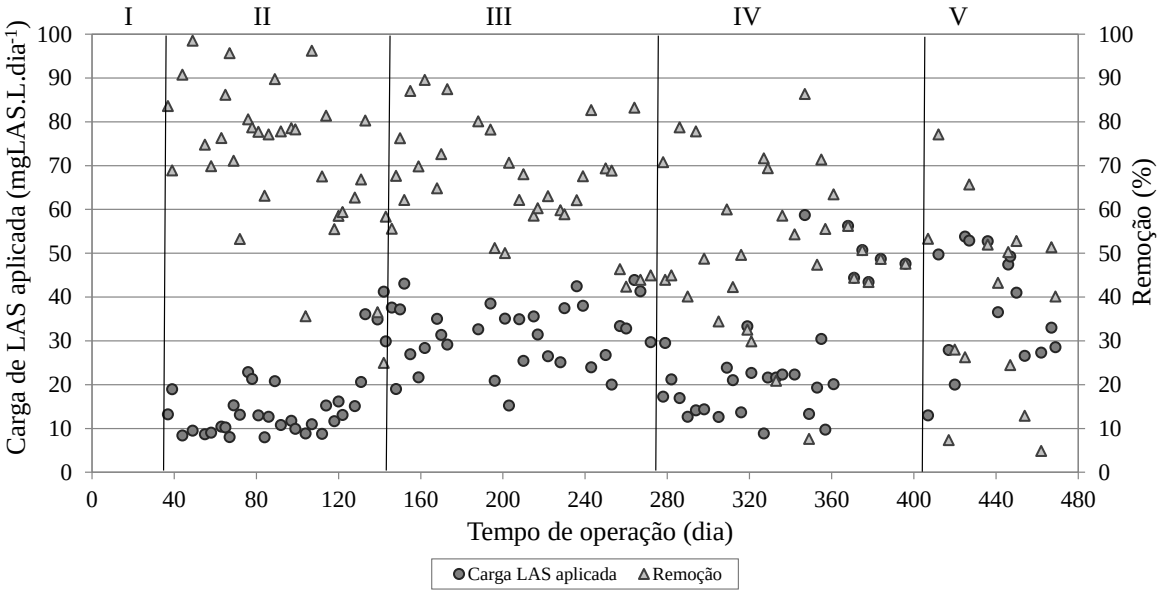

Figura 5.15 – Variação temporal da carga de LAS aplicada e eficiência de remoção

A carga de LAS aplicada ao reator, quando comparada à carga orgânica volumétrica foi menor, somado ao fato da configuração do reator de leito fluidificado possibilitar elevada diluição do afluente e minimização da toxicidade do surfactante. Portanto, pode-se inferir que a influência do surfactante na COV aplicada foi mínima.

Observou-se que a contribuição do LAS na COV aplicada ao reator foi de 12,7±4,1 mgLAS.L.dia^{-1}, 31,2±7,3 mgLAS.L.dia^{-1}, 22,5±9,9 mgLAS.L.dia^{-1} e 37,3 mgLAS.L.dia^{-1} nas Etapas II, III, IV e V, respectivamente. Em todas as etapas essa participação foi inferior a 5% (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 – Contribuição do LAS na COV aplicada no reator

Etapa	**COV aplicada mgDQO.L.dia^{-1}**	**Carga LAS aplicada mgLAS.L.dia^{-1}**	**Contribuição do LAS (%)**
I	799,9±65,8	-	-
II	852,5±107,4	12,7±4,1	1,5
III	917,5±124,2	31,2±7,3	3,4
IV	780,6±127,3	22,5±9,9	2,8
V	893,9±213,4	37,3±12,8	4,2

Observou-se variação entre a relação da carga de LAS removida por carga de LAS aplicada (CR/CA) que foi de 0,7±0,17 na Etapa II (9,5±3 mg.L^{-1} de LAS afluente), 0,65±0,14

na Etapa III (23,34±5,49 mg.L^{-1} de LAS afluente), 0,46±0,2 na Etapa IV (21,68±9,92 mg.L^{-1} de LAS afluente) e 0,39±0,2 na Etapa V (27,91±9,57 mg.L^{-1} de LAS afluente). Logo, para a maior relação obteve-se maior remoção de LAS, fato verificado na primeira etapa (Figura 5.16).

Delforno (2010) obteve relação entre 0,2 e 0,6 em reator EGSB com TDH de 26-32 horas para remoção de LAS padrão (14,4±1,0 mg.L^{-1}). O autor registrou, nessas condições, eficiência média de remoção de LAS de 48-73%. Neste trabalho, com RALF, LAS de água de lavanderia e TDH de 17-23h observou-se relação de 0,39-0,7 e eficiência de remoção de LAS de 39-75%, similar a observada por Delforno (2012) em reator EGSB.

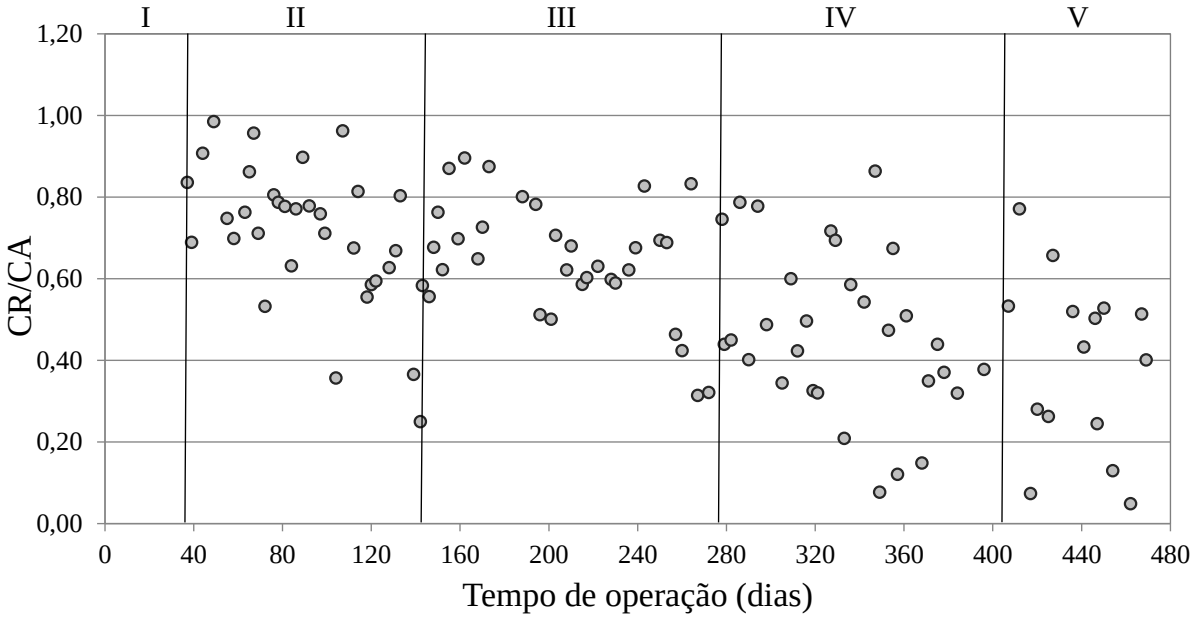

Figura 5.16 – Relação carga de LAS removida por carga de LAS aplicada

Em sistemas de tratamento biológico a eficiência de remoção de matéria orgânica está associada à presença da comunidade microbiana, que seja capaz de adaptar-se a flutuações de cargas orgânicas, a presença de materiais tóxicos aplicados ao substrato e as variações das condições ambientais inerentes ao sistema. Assim, neste estudo a eficiência de remoção de matéria orgânica não diminuiu com a presença de concentrações crescente de LAS de água residuária de lavanderia, embora tenha sido observado muitos COXs nessa água. Entretanto, a eficiência de remoção de LAS decresceu ao longo da operação do reator com concentrações de 9,5±3 mg.L^{-1} a 27,91±9,57 mg.L^{-1} de LAS afluente.

5.2.5 – Monitoramento do pH e alcalinidade

Observou-se que os valores de pH, durante toda operação do reator, foram entre 6 e 8,ou seja, em faixa ótima para a metanogênese. Após abertura do sistema verificou-se diminuição do valor médio de pH, tanto do afluente (7,4±0,5), quanto do efluente (7,9±0,1). (Tabela 5.12).

Tabela 5.12– Valores de parâmetro físico-químicos do afluente e efluente do reator de leito fluidificado.

Etapa	Amostra	pH	AP	AI	AT
I	Afluente	7,4±0,5	185±39	89±17	273±33
	Efluente	7,9±0,1	224±60	67±19	292±77
II	Afluente	7,1±0,3	186±33	103±21	289±33
	Efluente	7,9±0,1	299±38	89±26	388±51
III	Afluente	6,9±0,1	162±11	112±18	274±17
	Efluente	8,0±0,1	272±40	78±27	350±51
IV	Afluente	7,05±0,2	191±33	132±20	322±35
	Efluente	8,17±0,2	243±44	98±32	341±69
V	Afluente	7,2±0,2	205±26	120±30	325±35
	Efluente	8,2±0,2	182±68	69±27	251±92

AP = Alcalinidade parcial; AI = Alcalinidade intermediária; AT = Alcalinidade total

Na Etapa I de operação do reator (adaptação sem LAS), os valores de pH obtidos foram de 7,4±0,5 e 7,9±0,1 para afluente e efluente, respectivamente (Figura 5.17). Estes valores foram próximos ao encontrado por Carosia (2011), que verificou pH 7,7±0,3 e 7,5±0,2 para afluente e efluente da Etapa VI (substrato sintético sem LAS de sabão em pó de uso doméstico), respectivamente.

A partir da adição da água de lavanderia (Etapa II) observou-se pouca variação do pH efluente, quando comparado com a etapa anterior (Etapa I). Os valores observados para a Etapa II foram entre 7,7 e 8,2 (7,9±0,1) (Figura 5.17). Entretanto, valores inferiores (6,7 a 7,6) foram observados para o pH afluente (7,1±0,3). Desse modo, o acréscimo de água de lavanderia ao substrato sintético pode ter interferido no pH do meio, o qual pode influenciar negativamente na estabilidade do reator se este não estiver em condições de tamponamento adequado.

Entretanto, este equilíbrio de tamponamento foi favorecido pela adição de bicarbonato de sódio (400 mg.L^{-1}) ao substrato sintético e pela alta vazão de recirculação (106 L.h^{-1}) do efluente do reator.

Resultado semelhante foi verificado por Costa (2009) e Oliveira (2010), que verificaram pH efluente de 8,0±0,3 e 8,0±0,2, respectivamente, ao utilizarem reator de leito fluidificado para remoção de LAS (13,25±5,8 mg.L^{-1} e 24,4±3,7 mg.L^{-1} respectivamente) em água de lavanderia e LAS padrão (Sigma®), respectivamente.

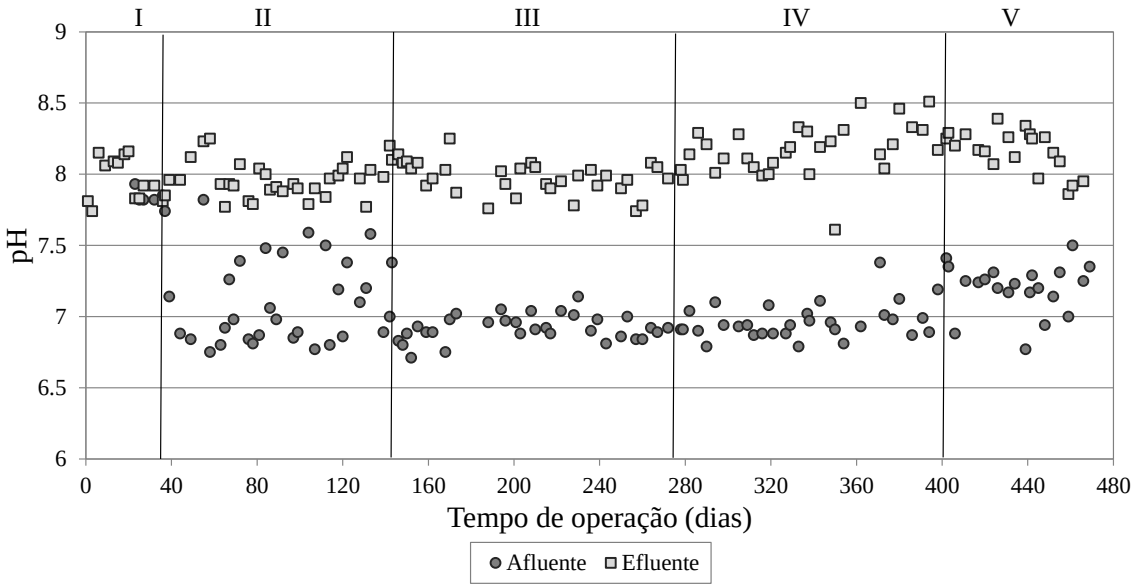

Figura 5.17 – Variação temporal do pH afluente e efluente

Foram observados baixos valores de desvio padrão para o parâmetro pH em todas as etapas de operação do reator, tanto para afluente, como para efluente. A ausência de sacarose ao substrato sintético não influenciou o pH do sistema, entretanto, notou-se que na Etapa V (sem sacarose) houve menor variação deste parâmetro, quando comparado com a etapa anterior com sacarose (etapa IV) (Figura 5.17). Esta oscilação ocorrida na Etapa IV pode ter ocorrido devido a fermentação da sacarose, alterando assim o pH afluente, fato não observado na Etapa V.

Observou-se valores médios similares de alcalinidade total (AT) afluente nas Etapas I, II e III, 273,9±33 mg CaCO3.L^{-1}, 289,4±33 mg CaCO3.L^{-1}; 274,5±17 mg CaCO3.L^{-1}, respectivamente. Quando iniciou-se a adição da água de lavanderia na Etapa II ocorreu aumento da alcalinidade total efluente (292±77 para 388±51 mg CaCO3.L^{-1}). Entretanto, este aumento persistiu nas Etapas III e IV mesmo aumentando o TDH na Etapa IV, reduzido novamentena

última etapa. Este fato deve ter ocorrido devido aos compostos presentes na água de lavanderia, uma vez que, as concentrações de LAS foram de 9,5±3 $mg.L^{-1}$, 23,3±5,5 $mg.L^{-1}$, 21,7±9,9 $mg.L-^{1}$ e 27,9±9,6 $mg.L^{-1}$, para as Etapas II, III, IV e V, respectivamente

Em relação a AT efluente verificou-se valores semelhantes a partir das etapas com adição de LAS. Desse modo, verificou-se 292,1±77 $mgCaCO_3.L^{-1}$, 388,5±52 $mgCaCO_3.L^{-1}$, 350,1±51 $mgCaCO_3.L^{-1}$ e 341,4±69 $mgCaCO_3.L^{-1}$, respectivamente, para as etapas I (sem LAS), II, III e IV.

Na Etapa V (sem adição de sacarose ao substrato sintético) observou-se diminuição da AT efluente para 251,6±92 mg $CaCO_3.L^{-1}$. Costa (2009) verificou em condição similar valores semelhantes aos encontrados neste trabalho utilizando RALF e TDH de 18 horas, quando a concentração de LAS de água de lavanderia era 29 $mg.L^{-1}$. Entretanto, a autora notou maior oscilação da AT afluente e efluente que foi de 205±116 $mgCaCO3.L^{-1}$ e 242±119 $mgCaCO3.L^{-1}$, respectivamente.

No presente estudo observou-se também, leve redução da AT efluente com o aumento da concentração de LAS afluente. Com estes fatos pode-se sugerir que concentração de LAS de água de lavanderia próxima a 28 $mg.L^{-1}$ pode interferir na alcalinidade total do sistema.

Oliveira (2010) observou valores inferiores aqueles observados neste trabalho, entre 164±14 $mgCaCO_3.L^{-1}$ para o afluente e 154±13 $mgCaCO_3.L^{-1}$para o efluente, quando foi adicionado 24,4±3,7 $mg.L^{-1}$ de LAS padrão.

O aumento da concentração de LAS padrão afluente não interferiu na AT afluente e efluente. Pode-se inferir que a presença dos compostos xenobióticos na água residuária de lavanderia pode ter interferido nessa alcalinidade do sistema. A variação temporal da alcalinidade total afluente e efluente do reator pode ser observada na Figura 5.18.

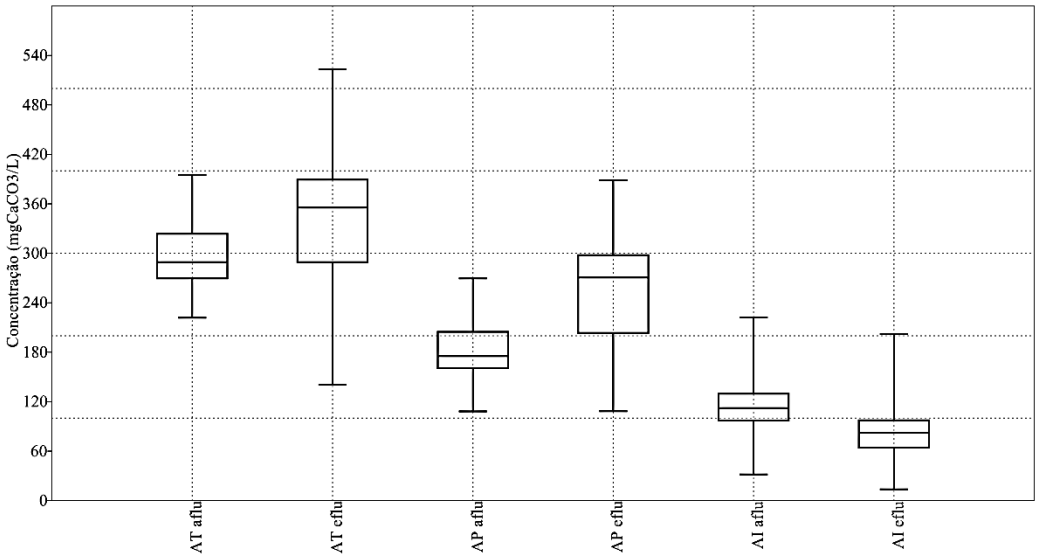

Figura 5.18 – Variação temporal da alcalinidade total afluente e efluente

Carosia (2011), verificou valores de alcalinidade total maiores no efluente (460±102 mg$CaCO_3$.L^{-1}) do reator em relação ao afluente (389±124 mg$CaCO_3$.L^{-1}), e semelhante ao registrado no presente estudo. A autora utilizou sabão em pó comercial como fonte de LAS, assim como, a água de lavanderia o sabão em pó possui outros componentes auxiliares de limpeza (coadjuvantes, sinergistas, tamponantes, branqueador óptico, corantes, enzimas, fragrância, etc.), portanto, condições próximas às deste trabalho.

Observou-se valores para alcalinidade parcial (AP) afluente de 185±39 mg $CaCO_3$.L^{-1}, 186,4±33 mg $CaCO_3$.L^{-1}, 162,4±11 mg$CaCO_3$.L^{-1}, 191,1±33 mg$CaCO_3$.L^{-1} e 205,2±26 mg $CaCO_3$.L^{-1} para as Etapas I, II, III, IV e V, respectivamente. Os valores observados para o efluente foram de 224,6±59 mg CaCO3.L^{-1}, 299±37 mgCaCO3.L^{-1}, 272,1±40 mg CaCO3.L^{-1}, 243,4±44 mg CaCO3.L^{-1} e 182,5±68 mg CaCO3.L^{-1} para as mesmas etapas operacionais, respectivamente. Notou-se pouca variação deste parâmetro no afluente e efluente. Entretanto, observou-se diminuição de 25% da AP média do efluente da Etapa IV em relação a Etapa V.

Em relação a alcalinidade intermediária (AI) observou-se 88,9±17 mg CaCO3.L^{-1}, 102,9±21 mg CaCO3.L^{-1}, 112,1±18 mg CaCO3.L^{-1}, 132,6±20 mg CaCO3.L^{-1} e 120,4±30 mg CaCO3.L^{-1}, para o afluente das etapas I, II, III, IV e V, respectivamente. Em relação ao efluente observou-se valores inferiores de AI, que foram de 67,5±19 mg CaCO3.L^{-1}, 89,5±26 mg CaCO3.L^{-1}, 78±27 mg CaCO3.L^{-1}, 98,1±32 mg CaCO3.L^{-1} e 69,1±27 mg CaCO3.L^{-1} para as Etapas I, II, III, IV e V, respectivamente. Observou-se na últma etapa (V) maiores concentrações de nitrito o nitrato no efluente (ítem 5.2.8, Tabela 5.16), a formação

desses compostos a partir da amônia gera H^+ e consequentemente consome a alcalinidade que foi de 98,1±32 mg CaCO3.L^{-1} na Etapa IV para 69,1±27 mg CaCO3.L^{-1}na Etapa V.

Segundo Fernandez et al. (2008) o tamponamento do sistema e a estabilidade do reator se deve à relação carbonato/bicarbonato, o qual protege o reator contra possível acidificação. Tanto, o bicarbonato adicionado ao substrato sintético, quanto a alta taxa de recirculação do reator anaeróbio de leito fluidificado favoreceram o tamponamento do sistema. Notou-se pequena elevação deste parâmetro no efluente das etapas IV e V. Assim pode-se considerar que a quantidade de bicarbonato de sódio adicionada à alimentação foi suficiente para prover o tamponamento necessário ao sistema.

A determinação da alcalinidade tem importante aspecto, no que se refere à relação Alcalinidade Intermediária/Alcalinidade Parcial (AI/AP). Segundo Ripley *et al.* (1986), relação acima de 0,3 indica ocorrência de distúrbios no processo de digestão anaeróbia. Entretanto, Foresti (1994), Chernicharo (2007) afirmam que, devido às particularidades de cada efluente, relação AI/AP superior a 0,3 pode não afetar o desempenho do sistema.

A relação média AI/AP afluente foi superior ao encontrado na literatura (Tabela 5.13 e Figura A2, apêndice), entretanto, os valores médios desta relação para o efluente estiveram na faixa estimada por Ripley et al. (1986), ou seja, estabilidade do reator perante ao tamponamento do sistema. Além disso, o baixo valor do desvio padrão do efluente sugeriu estabilidade do sistema, que é um fator chave para a remoção do LAS (LOBNER et al., 2005).

Tabela 5.13 – Relação entre a alcalinidade intermediária e parcial no reator

Etapa	Amostra	AI/AP
I	Afluente	0,52±0,04
	Efluente	0,30±0,08
II	Afluente	0,58±0,17
	Efluente	0,30±0,08
III	Afluente	0,70±0,14
	Efluente	0,29±0,10
IV	Afluente	0,73±0,25
	Efluente	0,40±0,10
V	Afluente	0,60±0,20
	Efluente	0,38±0,09

5.2.6 – Monitoramento de Ácidos Orgânicos

O processo de degradação anaeróbia é complexo, com formação de diversos produtos metabólicos intermediários que devem ser mantidos em equilíbrio dinâmico para evitar comprometimento do sistema (SPEECE, 1996). A instabilidade do processo anaeróbio ocorre quando a velocidade de produção de ácidos for maior que seu consumo, acarretando diminuição do pH e inibição das atividades de arqueias metanogênicas sensíveis as mudanças nas condições ambientais (RIBAS et al., 2007).

A concentração de ácidos orgânicos (AO) durante a etapa de inoculação foi de 115,4±48 $mg.L^{-1}$. Neste período o sistema permaneceu fechado e essa condição foi favorável ao crescimento de microrganismos, por conseguinte, consumo de substratos orgânicos para respiração e fermentação.

Quando o sistema foi aberto observou-se em média 66 $mg.L^{-1}$; 302,3 $mg.L^{-1}$; 34,6 $mg.L^{-1}$; 72,6 $mg.L^{-1}$; 59,1 $mg.L^{-1}$de AO para as Etapas I, II, III, IV e V, respectivamente (Figura 5.19). Notou-se que o acréscimo de água residuária de lavanderia provocou o aumento na concentração de ácidos no reator (Etapa II). Entretanto, estes valores foram inferiores na Etapa III, provavelmente, pela adaptação da biomassa à água residuária.

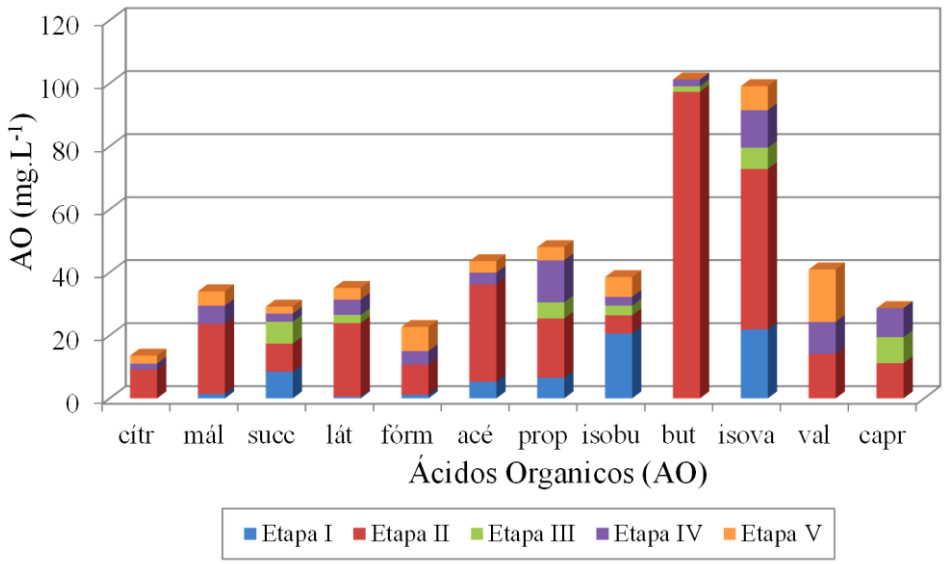

Figura 5.19 – Distribuição dos ácidos orgânicos em cada etapa de operação do reator

Na Etapa I, adaptação do reator ao substrato sintético, observou-se maior porcentagem de ácido isovalérico (33%), em relação aos demais ácidos orgânicos, seguido pelos ácidos isobutírico (31%) e succínico (13%). Após o acréscimo de água residuária de lavanderia ao substrato sintético (Etapa II) observou-se maior diversidade de ácidos orgânicos e, consequente aumento no valor total de ácidos nesta etapa. O longo tempo de exposição (107 dias) dos microrganismos aos compostos da água residuária pode ter afetado o crescimento e o metabolismo deles no reator. Nesta etapa observou-se maior prevalência dos ácidos succínico (32%), isovalérico (17%) e acético (10%). Provavelmente, ocorreu adaptação dos microrganismos ao novo constituinte do substrato sintético devido a manutenção de algumas populações em detrimento à outras.

Na Etapa III observou-se a prevalência do ácido capróico (24%), succínico (20%), isovalérico (19%) e propiônico (15%). Nesta etapa operacional o aumento do surfactante para 23 $mg.L^{-1}$, alterou a dinâmica de produção de ácidos orgânicos. Tanto, na Etapa IV (21,7 $mg.L^{-1}$ de LAS), quanto na Etapa V (27,9 $mg.L^{-1}$ de LAS) a diversidade de AO no reator foi maior quando comparada com a Etapa III (23 $mg.L^{-1}$ de LAS).

No entanto, nas duas últimas etapas operacionais notou-se mudanças na prevalência dos ácidos orgânicos, provavelmente ocorrida pelo aumento da concentração de surfactante e demais constituintes da água residuária de lavanderia, bem como em função da diminuição do TDH de 23 horas (Etapa IV) para 18 horas (Etapa V).

Embora, o acréscimo de água de lavanderia no sistema na Etapa II tenha ocasionado aumento na produção de ácidos, o aumento da concentração do surfactante na Etapa III não favoreceu a mesma tendência. Provavelmente, o tempo de exposição (107 dias) dos microrganismos à água de lavanderia na Etapa II foi suficiente para sua adaptação. Na Etapa IV observou-se maior abundância de ácido propiônico (18%), isovalérico (16%), valérico (14%) e capróico (13%) no reator. Na Etapa V observou a prevalência de ácido valérico (28%), isovalérico (13%), fórmico (13%) e isobutírico (11%).

Na última etapa de operação do reator (Etapa V), quando houve a retirada da sacarose da alimentação, observou-se diminuição de 8,8% na produção dos ácidos orgânicos comparados à Etapa IV (com sacarose) e menor alcalinidade intermediária dentre as etapas com LAS. Vale ressaltar que nessa última etapa, além da ausência da sacarose como fonte de co-substrato, manteve-se o LAS em maior concentração durante todo período de operação do reator (27,91±9,57 $mg.L^{-1}$ afluente). Após 430 dias de operação do reator com água de lavanderia (Etapas II – V) pode ter ocorrido, tanto seleção das populações microbianas especializadas na

utilização de LAS, bem como, mudanças nas suas rotas metabólicas e, consequentemente, menor produção de ácidos.

Neste estudo foram observados doze ácidos orgânicos ao longo das etapas de operação do reator. Mas, apenas cinco deles foram observados em todas as etapas, ou seja, ácido succínico, ácido lático, ácido propiônico, ácido isobutírico e ácido isovalérico (Tabela 5.14).

Tabela 5.14 – Diversidade de ácidos orgânicos nas etapas de operação do reator

Etapas	**I** Adaptação	**II** 9,5±3 mg.L^{-1*}	**III** 23,3±8 mg.L^{-1*}	**IV** 21,7±10 mg.L^{-1*}	**V** 27,9±9,6 mg.L^{-1*}
TDH (h)	19,9	17,7	18,6	23	17,8
Ácidos Orgânicos			**(mg.L^{-1})**		
Cítrico	<LD	<LD	<LD	<LD	2,54±0,6
Málico	<LD	<LD	<LD	5,74±1,7	4,55±1,8
Succínico	8,5±8	9,58±6,2	7,8±0,8	2,58±0,5	2,21±0,3
Lático	<LD	3,51±5,5	2,62±0,6	4,85±1,3	3,71±1
Fórmico	<LD	4,95±2,5	<LD	4,12±1,3	7,66±4,5
Acético	5.32±2,5	9,44±9,7	<LD	3,7±1,06	3,70±1,4
Propiônico	6,6±2	29,47±22,3	5,12±0,6	12,65±6,9	4,21±1,5
Isobutírico	20,6±17,6	6,25±2,8	3,06±1,8	2,96±1,13	6,31
Butírico	<LD	6,97±7,9	1,77±0,4	2,15±0,72	<LD
Isovalérico	21,9±13,1	59,48±66	10,06±9,9	11,9±12,2	7,64±2,1
Valérico	<LD	14,14±1,7	<LD	10,15±1,5	16,65±3,6
Capróico	<LD	11,77±8,9	8,18±1,2	9,22±1,7	<LD

*LAS; <LD: Abaixo do limite de detecção da curva de calibração

Ahring et al. (1995), observaram que o aumento da concentração de ácidos orgânicos voláteis foi indicador de instabilidade do processo anaeróbio. Logo, é essencial a estabilidade do reator para a obtenção de maiores taxas de remoção dos surfactantes em água de lavanderia. Esta estabilidade pode ser comprovada neste estudo pelos valores referentes à alcalinidade total, parcial e intermediária do sistema.

Delforno (2011), constatou predominância de ácido isobutírico seguido de acético ao trabalhar com reator EGSB com TDH de 26 horas e 14,4 mg.L^{-1} de LAS. Embora, neste trabalho tenham sido detectados alguns ácidos orgânicos no efluente, as concentrações foram baixas, portanto não ocorreu desestabilização do sistema devido à essa produção.

5.2.7 – Monitoramento do sulfato

Observou-se valores maiores de sulfato efluente nas Etapas II, III e IV (Tabela 5.15). Provavelmente, nessas etapas ocorreu a lise da molécula do LAS pelos microrganismos e liberação do grupo sulfonado ao meio liquido. Segundo Oliveira et al. (2009), o sulfato disponível também pode ser utilizado pelos microrganismos para o seu metabolismo como ocorreu em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, no qual, o comportamento observado pelos autores foi o oposto, ou seja, concentrações menores de sulfato efluente, em relação ao afluente (3 $mg.L^{-1}$ e 8 $mg.L^{-1}$ respectivamente). Entretanto, na última etapa foi observado o oposto, menor concentração de sulfato no efluente e consequentemente menor remoção de LAS em todo estudo (39%).

Ao longo da operação do reator pode ter ocorrido seleção de microrganismos consumidores de sulfato como por exemplo o gênero *Bosea* que está relacionada com a redução de sulfato ou tiossulfato a sulfeto (BRENNER et al., 2005). A presença desse gênero foi corroborada pela concentração de sulfato no afluente do RALF, sendo que a presença de representantes desse gênero foi maior (0,47%) na Etapa V, com maior concentração afluente de sulfato (16±20,2 $mg.L^{-1}$).

Carosia (2011), constatou no efluente de reator de leito fluidificado com 14,4±3,5 $mg.L^{-1}$ de LAS afluente, valores de sulfato próximos (15,9±15,5 $mg.L^{-1}$) aos observado no presente estudo (Tabela 5.15). Assim como Oliveira (2010) que ao trabalhar com a mesma configuração de reator e 8,2±1,3 $mg.L^{-1}$ de LAS afluente, detectou 16±5 $mg.L^{-1}$ de sulfato no efluente. Vale ressaltar que o método empregado neste trabalho (cromatográfico) foi diferente das autoras supracitadas (turbidimétrico).

Os compostos aromáticos sulfonados podem ser usados como fonte de carbono e energia ou como fonte de enxofre. No primeiro caso, há utilização da cadeia carbônica e liberação do grupo sulfonado como sulfito ou sulfato. No segundo caso, o grupo sulfonado é usado como fonte de enxofre e a cadeia carbônica dessulfonada é liberada como fenol correspondente (ELSGAARD et al., 2003).

Tabela 5.15 – Valores de sulfato nas etapas de operação do reator

Etapa	Amostra	Sulfato ($mg.L^{-1}$)
II	Afluente	8,0±4,7
	Efluente	16±8,5
III	Afluente	2,9±2,8
	Efluente	15,71±26,3
IV	Afluente	8,0±4,2
	Efluente	13,28±13,2
V	Afluente	16,04±20,2
	Efluente	9,66±4,6

II: 9,5 $mg.L^{-1}$ LAS; III:23 $mg.L^{-1}$ LAS; IV:23 $mg.L^{-1}$ LAS e V: 27,9 $mg.L^{-1}$ LAS

Denger e Cook (1999) relataram que o LAS pode ser usado como fonte de enxofre por bactérias anaeróbias sob condição limitada de sulfato. No tratamento de resíduos orgânicos, a presença do sulfato provoca uma série de alterações em reatores biológicos, uma vez que é estabelecida competição pelo mesmo substrato por parte de bactérias redutoras de sulfato e bactérias fermentativas, acetogênicas e arqueias metanogênicas dando origem a dois produtos finais: metano (por meio da metanogênese) e sulfeto via redução de sulfato.

No caso específico deste trabalho pôde-se observar relação direta entre o LAS afluente e sulfato efluente (Figura 5.20); ou seja, degradação do LAS e liberação do grupo sulfonado para o meio líquido.

Segundo Perales et al. (2003) a liberação do grupo sulfonado, proveniente da ruptura do anel aromático e, consequentemente dessulfonação são os estágios finais da rota de degradação do LAS. Por meio da análise de correlação de *Pearson* pôde-se verificar correlação positiva entre o LAS afluente e sulfato efluente, com R^2=0,804 com nível de significância p=0,01.

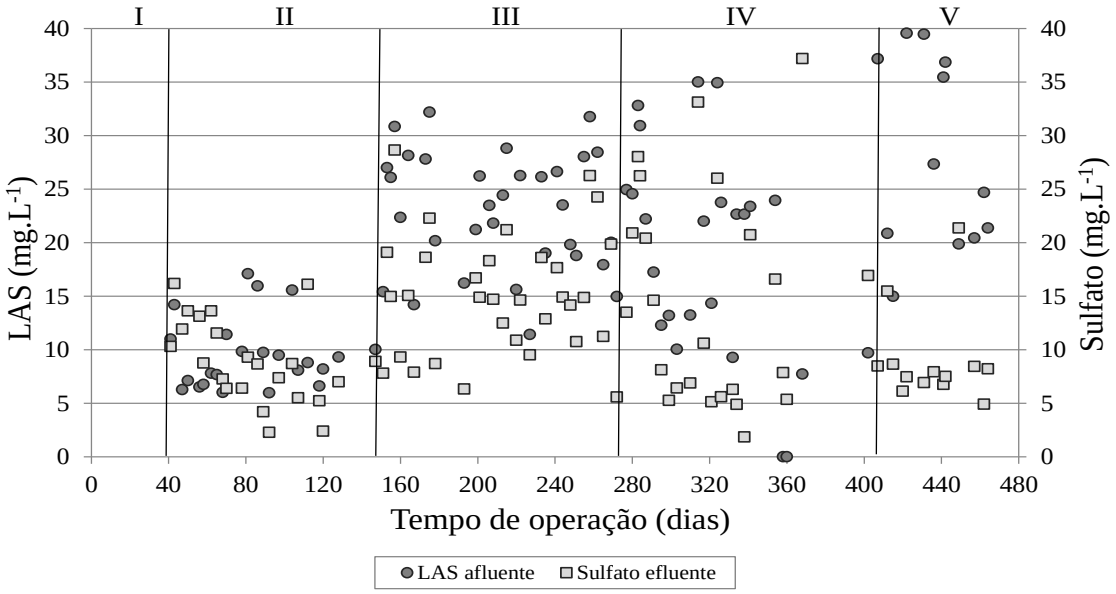

Figura 5.20 – Variação temporal do LAS afluente e sulfato efluente

Em concentrações reduzidas, o sulfato é suficiente apenas para que ocorra redução assimilativa e, portanto, sulfeto não é gerado. Todavia, o sulfeto pode ter sido produzido e, imediatamente consumido por outros microrganismos (DUARTE, 2006).

5.2.8 – Monitoramento de fosfato, nitrito e nitrato

Fosfatos inorgânicos são adicionados aos detergentes em pó, com o objetivo de complexar os íons metálicos responsáveis pela dureza das águas e torna o meio alcalino, melhorando assim a ação de limpeza (STOKER, 1989). De acordo com Jaworska et al. (2002), os fosfatos dificultam a decomposição dos agentes branqueadores do sabão em pó.

A remoção biológica de fósforo é obtida mediante a seleção de bactérias capazes de armazenar polifosfato, essa remoção é mais eficiente em condições alternadas de aerobiose e anaerobiose (OSADA et a*l*, 1991; VAN HAANDEL).

Em relação ao fosfato observou-se valores maiores para o afluente (14,5±14 mg.L^{-1}) em relação ao efluente (8,6±4 mg.L^{-1}) para as etapas II a IV de operação (Tabela 5.16). Contudo, na Etapa V de operação do reator notou-se maior concentração de fosfato efluente (6,47±2,7 mg.L^{-1}) em relação ao afluente (4,82±3,1 mg.L^{-1}). Provavelmente, houve sua

liberação do interior das células dos OAF para o meio líquido. Esse fato deve ter ocorrido na areia, ambiente anaeróbio evidenciado pelo teste com resazurina.

Tabela 5.16 – Valores da concentração de fosfato, nitrito e nitrato

Etapa	**Amostra**	**(mg.L^{-1})**		
		Fosfato	**Nitrito**	**Nitrato**
II	Afluente	24,12±21,2	-	-
	Efluente	9,7±6,7	11,51±12,5	9,06±8,1
III	Afluente	19,4±8,7	-	-
	Efluente	8,82±2,4	6,52±5,8	3,45±6
IV	Afluente	16,03±7,7	-	-
	Efluente	11,74±3,2	20,94±14,5	15,02±13,5
V	Afluente	4,82±3,1	2,59±0,5	3,45±0,91
	Efluente	6,47±2,7	32,61±27,8	23,18±24,1

Como já explicado anteriormente, no presente trabalho a parte superior do reator (separador de fases) foi mantida aberta, permitindo assim, pequena troca gasosa e manutenção de ambiente facultativo. Sob tais condições pode ter favorecido ambiente propício para o desenvolvimento de organismos acumuladores de fósforo (OAF). Este fato é corroborado pela análise de pirosequenciamento de amostra dessa região, na qual observou-se três gêneros com essa habilidade: *Aquabacterium*, *Cloacibacterium* e *Thiovirga* (KALMBACH, 1999; ITO et al., 2005; ALLEN, 2006; CERQUEIRA et al., 2012).

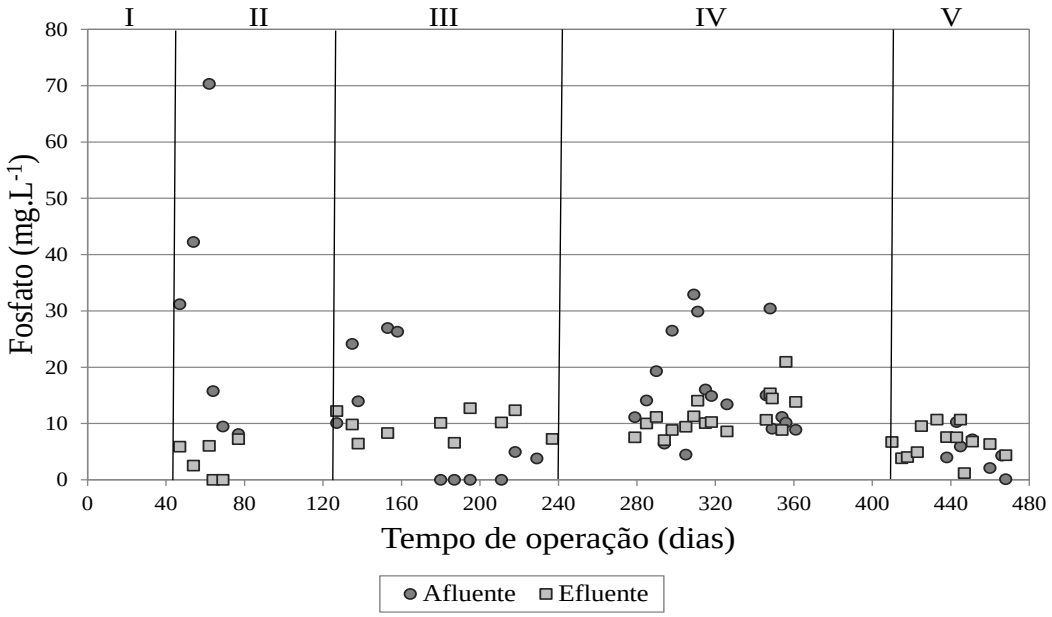

Figura 5.21 – Variação temporal do fosfato afluente e efluente

Dueñas et al. (2003) caracterizaram as diferentes formas de fósforo em duas estações de tratamento de esgoto municipal da Espanha, sendo fósforo particulado, fósforo solúvel, fosfato e fósforo total. De acordo com os autores, a maior parte do fósforo total presente no esgoto estava na forma de fósforo solúvel, sendo que o fosfato foi a forma predominante . No presente trabalho fosfato foi a única forma de fósforo analisada.

O processo de remoção de fósforo necessita de fonte de carbono, compostos de baixo peso molecular, como o ácido acético e ácido propiônico (FARIA et al., 2006). A maior remoção de fosfato no presente estudo foi observada na Etapa II, quando as concentrações dos ácidos acético e propiônico foram as maiores (Tabelas 5.14).

Zou et al. (2006) estudaram o papel do nitrato na remoção biológica de fósforo em RBS. Estes autores mostraram que maior remoção de fosfato (96%) foi alcançada em condição aeróbia (oxigênio), e usando nitrato como receptor (condição anóxica) obteve-se 87,1% de remoção de fosfato. Entretanto, no presente estudo nitrato só foi observado no afluente da etapa V, quando a concentração de fosfato efluente foi maior, não havendo, assim relação entre a utilização do nitrato como receptor de elétron e a remoção do fosfato.

A água residuária cinza (com surfactantes) contribui, em geral, com apenas 7,7% da carga de nitrogênio total e 2,3% da carga de amônia (GRAY; BECKER, 2002). Pôde-se observar durante a caracterização da água residuária de lavanderia, juntamente com o extrato de levedura, podem ter sido fontes de nitrogênio. Em relação a água residuária observou-se os

seguintes valores de compostos nitrogenados: NTK (23,2±8,9 $mg.L^{-1}$), N-amoniacal (10,2±6 $mg.L^{-1}$) e nitrato (9±4,7 $mg.L^{-1}$).

Foram detectados nitrito e nitrato no efluente de todas as Etapas de operação do reator. As maiores concentrações foram registradas na Etapa V, sendo 32,61±27,8 $mg.L^{-1}$ e 23,18±24,1 $mg.L^{-1}$ para nitrito e nitrato, respectivamente. Entretanto, na Etapa V, também observou-se os dois compostos no afluente do reator. Provavelmente, a maior concentração de LAS (27,91±9,57) dessa etapa correspondeu a maiores concentrações de outros compostos característicos dessa água residuária.

Maiores concentrações de nitrato corresponderam as maiores concentrações de nitrito no efluente do RALF. A presença de representantes do gênero *Nitrossomonas* na biomassa da Etapa IV propiciou a oxidação da amônia (água residuária de lavanderia) a nitrito e a presença de *Nitrospira* na biomassa da Etapa V a oxidação do nitrito a nitrato.

5.2.9 – Monitoramento dos sólidos suspensos totais

O fato do reator ser ligeiramente aberto na parte superior, proporcionou trocas gasosas com a atmosfera e, portanto, maior diversidade de microrganismos, aumentando a chance de degradação do surfactante no reator. Assim que a água de lavanderia foi adicionada ao sistema houve alteração macroscópica dessa biomassa ao longo do tempo de operação (Figuras 5.22 a 5.25).

Figura 5.22 – Biomassa representada pela seta vermelha (19◦ dia de operação do reator com água de lavanderia)

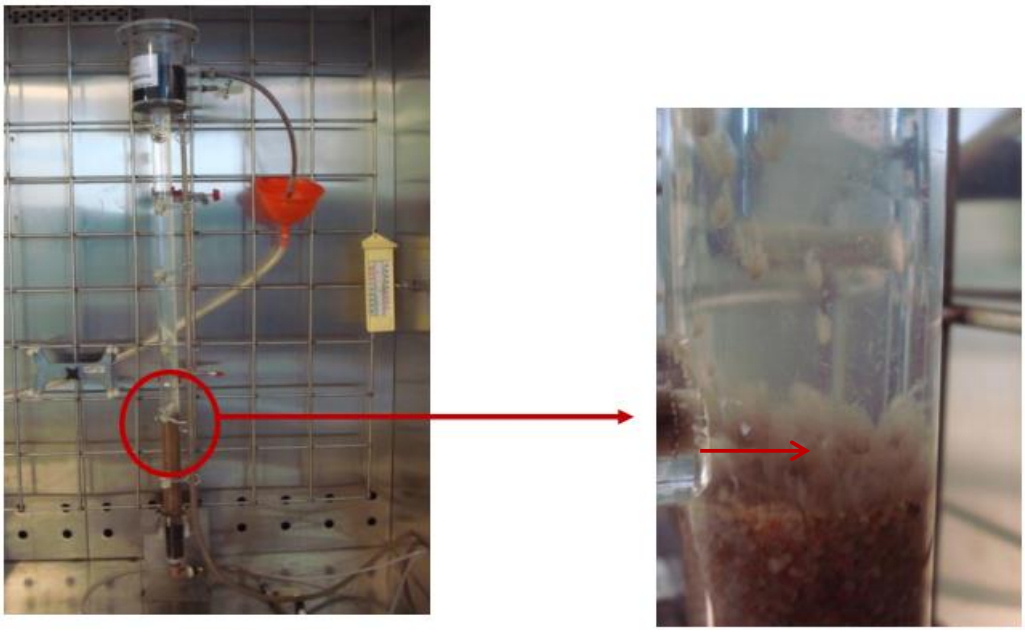

Figura 5.23 – Biomassa representada pela seta vermelha (41◦ dia de operação do reator com água de lavanderia)

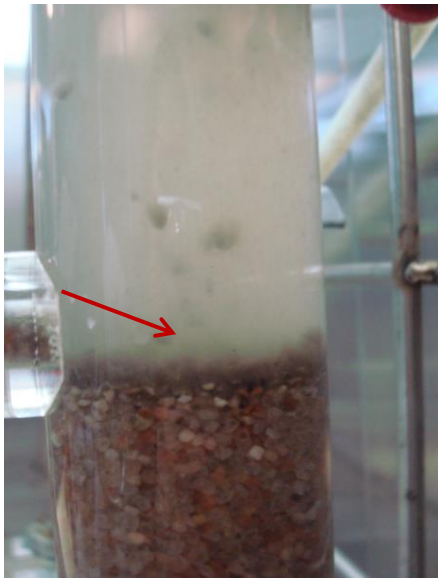

Figura 5.24 – Biomassa representada pela seta vermelha (51◦ dia de operação com água de lavanderia)

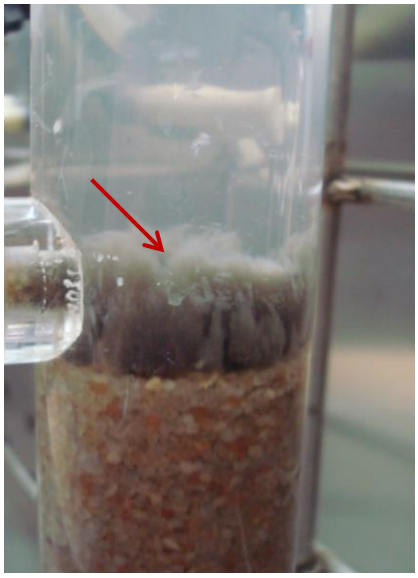

Figura 5.25 – Biomassa representada pela seta vermelha (90◦ dia de operação com água de lavanderia)

Essa alteração da biomassa no reator não influenciou negativamente na remoção de DQO. Provavelmente, ocorreu adaptação da biomassa aos compostos da água de lavanderia. Embora, a lavanderia e o surfactante usados tenham sido sempre os mesmos, mudou-se o tipo e característica das roupas, sujidade e adição de compostos auxiliares na remoção de determinadas manchas, os quais influenciaram a alteração de populações de microrganismos do reator.

Braile (1993) afirma que os despejos das lavanderias contêm sujeiras removidas das roupas e substâncias adicionadas na lavagem. Os surfactantes presentes na água produzem uma suspensão de sólidos e pedaços finos de fibras de tecidos. Os valores de sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) estão apresentados na Tabela 5.17.

Na Etapa I de operação do reator (adaptação) as concentrações de SST, SSF e SSV foram 0,036±0,01 $g.L^{-1}$, 0,002±0,002 $g.L^{-1}$ e 0,033±0,013 $g.L^{-1}$, respectivamente (Tabela 5.17). A adição de água de lavanderia na Etapa II acarretou em aumento de SST de 83,3% e maior produção de ácidos orgânicos. Essa maior concentração foi, provavelmente, devido à instabilidade operacional devido aos novos constituintes presentes na água de alimentação.

Pode-se inferir que, a adição da água de lavanderia ao sistema interferiu negativamente no metabolismo dos microrganismos ali presentes ocasionando sua liberação na forma de sólidos voláteis. No entanto, os constituintes dessa água residuária, inclusive o LAS, podem também, ter servido como substratos para alguns microrganismos.

Provavelmente, decorridos 107 dias de operação do reator com água de lavanderia (Etapa II) com 9,3±3 $mg.L^{-1}$ de LAS e TDH de 18 horas, a biomassa estava mais adaptada à presença do surfactante e demais constituintes da água residuária. Portanto, a concentração de sólidos efluente nas etapas seguintes (III e IV) foi menor. Este comportamento não foi prejudicado pelo aumento da concentração do surfactante nem pelo aumento do TDH.

Na Etapa III observou-se 0,027±0,02 $g.L^{-1}$de SST; ou seja, 59% menor que a etapa anterior. Decorridos 137 dias de operação com água de lavanderia e 23,3±8 $mg.L^{-1}$ de LAS, a biomassa, provavelmente, estava mais adaptada a tal condição, portanto a concentração de SST efluente foi menor.

Na Etapa IV foi possível observar redução mais acentuada de SST, com decréscimo em 62,9% da etapa anterior. Notou-se que o aumento do TDH de 18,6 horas na Etapa III, para 23 horas na Etapa IV favoreceu a retenção de biomassa e menor concentração de sólidos suspensos totais efluente. Segundo Sanz e Polanco (1990), o reator anaeróbio de leito fluidificado parece ser o mais promissor para tratamento de águas residuárias de baixa carga, como esgoto doméstico, uma vez que o processo mantém grande massa de microrganismos ativos e efetiva retenção de sólidos suspensos totais.

Na última Etapa (V) pôde-se observar aumento de 470% na concentração de SST efluente comparado a Etapa IV. A ausência do co-substrato (sacarose) no afluente do reator e maior concentração de LAS afluente nessa etapa podem ter influenciado no desprendimento da biomassa e, consequentemente, na menor eficiência de remoção de LAS (39,3±20,6%) em toda operação.

Delforno (2010) constatou valores de sólidos suspensos próximos ao observado neste estudo (0,064 $g.L^{-1}$ de SST e 0,045 $g.L^{-1}$de SSV), ao utilizar 14,4±1,0 $mg.L^{-1}$ de LAS e TDH de 26 horas em reator EGSB. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido à instabilidade que o surfactante ocasionou na comunidade presente no reator.

Vale ressaltar que a maior parte dos sólidos do efluente correspondeu ao SSV que representam em grande parte a biomassa. Essa mesma tendência foi observada por outros autores que empregaram, tanto o RALF como, EGSB para remoção de LAS (CAROSIA, 2012; DELFORNO, 2012; FERREIRA, 2012).

Tabela 5.17 – Valores da concentração de sólidos suspensos efluentes

ETAPA	(g.L^{-1})		
	SST	SSF	SSV
I – Adaptação sem LAS	0,036±0,01	0,002±0,002	0,033±0,01
II – 9,5±3 mg.L^{-1} LAS	0,066±0,05	0,007±0,01	0,059±0,04
III – 23,3±8 mg.L^{-1} LAS	0,027±0,02	0,0009±0,001	0,0275±0,01
IV – 21,7±10 mg.L^{-1} LAS	0,01±0,01	0,0001±0,001	0,0115±0,01
V – 27,9±9,6 mg.L^{-1} LAS	0,047±0,03	0,004±0,013	0,0428±0,024

5.2.10 – Balanço de massa do LAS

O balanço de massa do LAS foi realizado apenas no final da operação do reator. Este balanço refere-se à massa de LAS aplicada ao RALF, a massa de LAS recuperada no efluente e a massa de LAS adsorvida no reator.

Foi verificado que durante o período de operação, o reator recebeu 10.936,4 mg de LAS, sendo que 4.528,7 mg foram observados no efluente (Tabela 5.18). Por meio do balanço de massa foi verificado que 56,9% do LAS adicionado no reator foram removidos por degradação biológica e que 1,63% ficaram adsorvidos na areia, na biomassa do separador de fases, na biomassa do distribuidor e na biomassa efluente (Figura 5.26).

Dentre a quantidade adsorvida, 97,84% do LAS ficaram adsorvidos na biomassa efluente (0,174 g), 1,49% na biomassa do separador de fases (0,0026 g), 0,55% na areia (0,001 g) e 0,12 % na biomassa do distribuidor (Tabela 5.19).

A adsorção está relacionada à biodisponibilidade, toxicidade e destino do LAS (KNAEBEL et al., 1996; WOLF; FEIJTEL, 1998). A adsorção pode ser atribuída a forças químicas ou físicas, dependendo das propriedades físico-químicas, natureza do material e parâmetros ambientais (YING, 2006). No presente trabalho a adsorção do LAS foi considerada baixa (menos de 2%).

Tabela 5.18 – Balanço de massa de LAS

Concentração de LAS	**mg**	**%**
Adicionado	10.936,37	100
Efluente	4.528,68	41,41
Adsorvido	178,16	1,63
Removido	6407.69	58,59
Degradado	6.229,53	56,96

Tabela 5.19 – Adsorção do LAS

LAS adsorvido	**Mg**	**%(adsorvida)**	**% (total)**
Total adsorvido	178,16	100	1,63
Areia	0,97	0,55	0,008
Biomassa efluente	174,32	97,84	1,59
Biomassa do separador de fases	2,65	1,49	0,024
Biomassa do distribuidor	0,22	0,12	0,0019

Oliveira (2010) avaliou a remoção de LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado com areia como material suporte, TDH de 18 horas e sacarose e extrato de levedura como co-substratos. A autora observou em média 93% de biodegradação do surfactante para concentrações de 8 a 46 $mg.L^{-1}$ de LAS afluente. Provavelmente, essa alta eficiência foi devida a utilização somente de LAS padrão na composição do substrato sintético.

Neste trabalho, com adição de até 27,9±9,6 $mg.L^{-1}$de LAS a eficiência de biodegradação do surfactante foi de 56,9%. Deve-se ressaltar que nesse estudo foi usada água de lavanderia como fonte de LAS, a qual contém outros compostos, como coadjuvantes, enzimas, branqueadores ópticos, cargas, corantes, além do surfactante, como observado na caracterização da água residuária (Item 5.1.9).

A adição de co-substrato complexo (extrato de levedura) pode ter favorecido a formação de consórcios microbianos, necessários para degradação de LAS (JIMENEZ et al., 1991), além de fornecer os nutrientes necessários para manter a atividade de degradação do surfactante (KHLEIFAT, 2006; ABBOUD et al., 2007) e micronutrientes, aminoácidos e vitaminas para crescimento das arqueias metanogênicas.

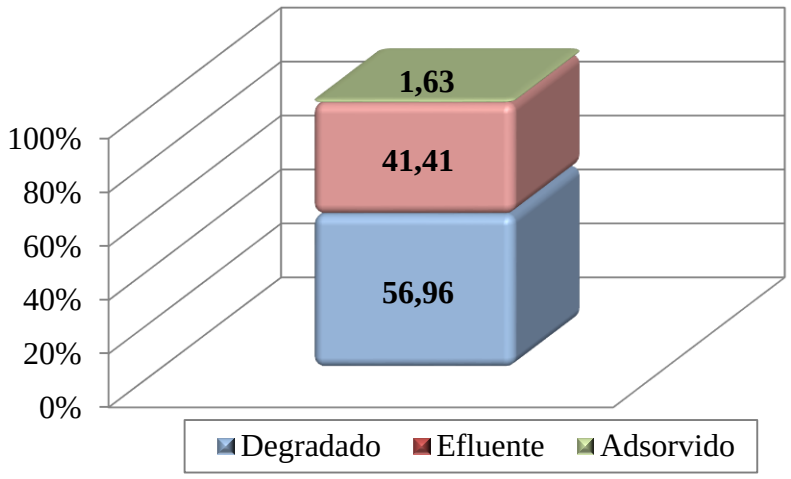

Figura 5.26 – Proporção da adsorção e degradação de LAS no reator de leito fluidificado

As maiores eficiências de degradação de LAS (85%) foram obtidas em reator UASB (SANZ et al., 2003) e em reator anaeróbio de leito fluidificado (81-99%) (OLIVEIRA et al., 2010). No reator UASB atribuiu-se a maior degradação de LAS (85%) à retirada de co-substratos da alimentação (SANZ et al., 2003).

Em reator anaeróbio de leito fluidificado observou-se maior eficiência de degradação de LAS (81-99%) em virtude da transferência de massa e diluição do afluente proporcionado pela alta vazão de recirculação (16-30 L/h) (OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, observou-se baixa concentração de ácidos voláteis (12-16 mg HAc/L) no reator anaeróbio de leito fluidificado (OLIVEIRA et al., 2010), corroborando a relação entre degradação de LAS e concentração de co-substratos (representado pelos ácidos voláteis).

Desse modo, o reator de leito fluidificado é opção excelente para remoção do surfactante LAS, quando comparado à outras configurações de reatores anaeróbios testados por outros pesquisadores (batelada, UASB, RAHLF) (ALMENDARIZ et al., 2001; SANZ et al., 2003; LOBNER et al., 2005; DUARTE, 2008).

A alimentação contínua e o elevado tempo de detenção hidráulica, aliados a recirculação do sistema, são possibilidades interessantes para degradação anaeróbia de LAS. O sistema de mistura homogênea proporciona maior disponibilidade de água residuária, quando comparado ao sistema pistonado. Além disso, por meio da alimentação contínua não se aplica de uma só vez grandes cargas dos compostos à biomassa aderida no material suporte.

5.2.11 – Caracterização qualitativa afluente e efluente dos COXs

Para verificar os intermediários de degradação do LAS e demais compostos presentes na água residuária utilizada no reator, foram analisados qualitativamente por CG/ES amostras das Etapas IV e V.

Foram identificados quinze compostos orgânicos xenobióticos (COXs) na amostra do efluente do reator da Etapa IV (Tabelas 5.20 e 5.21), com seis compostos em comum com a amostra de água de lavanderia (Item 5.1.9), sendo eles: decametil ciclopentassiloxano, dodecametil ciclohexassiloxano, octametil ciclotetrassiloxano, dimetil pentadecilamina, éter de diglicidil bisfenol A e etil hexil ftalato.

As substâncias identificadas foram agrupadas em seis classes com base na sua finalidade, sendo auxiliares na produção de produtos de limpeza, solvente, amaciante e plastificante, emulsionante, diluente e fragrância (Tabela 5.20 e 5.21).

De acordo com o perfil cromatográfico do efluente do reator, analisadas por *Headspace* foram detectados os seguintes compostos: Decametil ciclopentassiloxano (41,62%) e Dodecametil ciclohexassiloxano (32,22%). Em menor proporção foram observados Octametil ciclotetrassiloxano (13,53%) e Tetradecametil cicloheptassiloxano (12,63%).

Octametil ciclotetrassiloxano tem uso em ampla variedade de aplicações, incluindo os processos de fermentação, produção de café instantâneo, revestimentos de papel e cola, bebidas dietéticas, soluções de lavagem de resíduos alimentares, adesivos, têxteis, detergentes, soluções de limpeza, agentes tensoativos, produtos cosméticos e polimento (USEPA, 1985).

A produção de Decametil ciclopentassiloxano visa sua utilização como agentes nos produtos de cabelos, anti-transpirantes, cosméticos, bem como, sendo um subproduto da síntese de fluidos de silicone e resinas (BUTTS; KIRK, 2005)

Dodecametil ciclohexassiloxano é usado na produção de cosméticos, tintas, vernizes, utensílios de cozinha, produtos relacionados à saúde e eletrônicos, e também foi encontrado no efluente do reator (HORII et al, 2008).

Tabela 5.20 – Compostos detectados no efluente do reator na etapa IV (análise do *Headspace*)

Classe	Composto	% A	Qualidade
Produção de surfactantes	Octametil Ciclotetrassiloxano	13,53	83
Produção de surfactantes	Decametil Ciclopentassiloxano	41,62	87
Produção de surfactantes	Dodecametil Ciclohexassiloxano	32,22	87
Produção de surfactantes	Tetradecametil Cicloheptassiloxano	12,63	AMDIS

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

Compostos com estrutura química complexa são de difíceis remoção, sobretudo em sistemas de tratamento biológico. A presença de anéis aromáticos dificulta sobremaneira a degradação desses compostos, por conseguinte, tornam-se recalcitrantes ao tratamento biológico. Isso também é válido para compostos que contêm átomos de cloro (KIMURA et al., 2005) ou grupos nitro aromáticos, sabidamente recalcitrantes aos processos biológicos de tratamento (ANDREOZZI et al., 2006).

De acordo com o perfil cromatográfico do efluente do reator analisado por injeção direta (Tabela 5.21) foram detectados em maior proporção, o amaciante e plastificante etil hexil ftalato (13,39%), emulsificante dimetil nonadecanamina (11,41%) e emulsificante dimetil pentadecilamina (4,43%). Em menor proporção foram observados éster etil hexil do ácido hexanodióico (3,96%); metil fenol (3,44%); etil octeno (3,20%); acetato de etila (1,65%).

Ácido hexanodióico é muito utilizado na fabricação de produtos farmacêuticos, fixadores de perfumes, acidulantes na indústria de alimentos (FENAROLI, 1975; FURIA, 1972). Metil fenol é empregado na produção de desinfetantes, agentes de limpeza, surfactantes, pesticidas, corantes e antioxidantes ou pode ser originado como subproduto da degradação do LAS (LEWIS, 2001; O'NEIL, 2001).

Etil octeno é usado nas indústrias de surfactantes, polímeros e detergentes (LEWIS, 1993). Acetato de etila (1,65%) é muito usado como auxiliar farmacêutico (sabor), em essências de frutos artificiais, como solvente, na fabricação de fumo em pó, couro artificial, filmes fotográficos e na limpeza de produtos têxteis (BUDAVARI, 1996).

Tabela 5.21 – Compostos detectados no efluente do reator (Etapa IV) por injeção da amostra

Classe	Composto	% A	Qualidade
Produção de surfactantes	Etil Octeno	3,20	86
Fragrância	Metil Fenol	3,44	AMDIS
Solvente	Acetato de Butóxi Etila	1,65	AMDIS
-	Trimetil Cicloexenona	1,98	AMDIS
Amaciante e Plastificante	Dietil Ftalato	3,02	AMDIS
Emulsificante	Dimetil Pentadecilamina	4,43	94
-	Octatiocano	1,18	83
Emulsificante	Dimetil Nonadecanamina	11,41	AMDIS
-	Éster Etil Hexil do Ácido Hexanodióico	3,96	AMDIS
Amaciante e Plastificante	Etil Hexil Ftalato	13,39	97
Diluente	Éter de Diglicidil Bisfenol A	2,99	81

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

O destino de um composto no sistema de tratamento é ditado pela sua estrutura química, que influencia grandemente sua taxa de degradação e remoção (CIRJA et al., 2008). Um composto simples, que possui, por exemplo, uma cadeia alquílica curta, é passível de ser facilmente degradado em sistema de tratamento biológico. Por isso, a necessidade de conhecer todos os compostos presentes no efluente a ser tratado.

Ao final da operação do reator, 430 dias com água residuária de lavanderia como fonte de LAS, foi realizada análise mais completa com relação a caracterização qualitativa dos COXs das amostras afluente, efluente e adsorvido na biomassa do reator. Foram identificados nas amostras da última etapa (Etapa V) dez COXs, dentre esses compostos, oito foram observados no afluente, cinco na efluente e dois adsorvidos na biomassa do reator (Tabela 5.22).

Octiladipato (plastificante), metanotiol (pesticida/subproduto de degradação), e monoetil hexil ftalato (amaciante e plastificante) foram predominantes no afluente do reator. Os compostos octil adipato (plastificante) e monoctil ftalato (amaciante e plastificante) no efluente. Apenas trimetilborato e octil adipato (plastificante) foram detectados adsorvidos na biomassa ao final da operação.

Tabela 5.22 – COXs encontrados no afluente, efluente e adsorvido na biomassa ao final da operação do reator (Etapa V)

Classe	Composto	Afluente (%)	Efluente (%)	Adsorvido (%)
	Análise por Headspace	-	-	-
(subproduto)	Metanotiol	48,69	100	-
(subproduto)	Dimetil disulfito	23,88	-	-
Solvente/Desinfetante	Trimetilborato	-	-	100
-	Não determinado	27,42	-	-
	Análise por injeção direta			
Amaciante/Plastificante	Butil octil ftalato	4,52	5,14	-
Amaciante/Plastificante	Etil hexil maleato	1,97	5,61	-
Anti-espumante/ Amaciante/Plastificante	Citrato de butila	1,3	-	-
Amaciante/Plastificante	Adipato de octila	55,72	65,3	93,7
-	Eicosano metil	1,37	-	-
Amaciante/Plastificante	Monoetil hexil ftalato	35,1	-	-
Amaciante/Plastificante	Monoctil ftalato	-	14,49	-
-	Não determinado	-	7,41	6,29

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

Metanotiol (metil mercaptano) é encontrado na síntese de combustíveis para aviação, pesticidas e fungicidas (O'NEIL, 2006). Fontes de emissões potenciais incluem indústria de celulose, óleo de xisto, de processamento de petróleo, fabricação de amido, e estações de tratamento de esgoto (GRAEDEL, 1978; USEPA, 1987; KELLY; SMITH, 1990; BINGHAM, 2001;).

Metanotiol é produzido sob condição anaeróbia por bactérias redutoras de sulfato e bactérias produtoras de metano a partir da metionina ou a partir de dimetil sulfeto e dimetil dissulfeto. Este metil mercaptano pode ser mineralizado ao metano, dióxido de carbono e sulfeto de hidrogênio (NTP, 2001).

Sob condição anaeróbia ocorrerá dimerização de metil mercaptano para dimetil dissulfeto. Metil mercaptano não adsorve em sólidos em suspensão ou sedimentos. A

volatilização da superfície da água pode ser um destino importante, cujo processo é estimado por meio da lei de Henry (NTP, 2001).

A liberação de adipato de octila para o ar pode ocorrer durante a incineração de resíduos municipais, industriais e resíduos provenientes da produção de plástico e de outros processos que utilizam plastificantes. Lixiviados dos aterros municipais e industriais, que contêm materiais plásticos podem conter octil adipato. (ABRAMS et al. 1975). Este composto foi detectado nos efluentes de indústria de polpa e papel e no tratamento de efluentes de esgoto (SHACKELFORD; KEITH, 1976; BURSEY; PELLIZZARI, 1982).

Os ftalatos são usados principalmente como plastificantes em polivinil flexível de vinilo (PVC). Usos não poliméricos de ftalatos como fixadores, detergentes, óleos lubrificantes e solventes leva sua inclusão em diversos produtos, tais como, cosméticos e para acabamentos em madeira (HUANG et al., 2007).

Trimetilborato é obtido a partir da destilação de uma mistura de ácido bórico e metanol. Pode ser utilizado como solvente, fungicida, catalisador na indústria química, aplicações na indústria farmacêutica. Este composto é rapidamente hidrolisado a ácido bórico e metanol na presença de água (DOCKS, 1992; LEWIS, 1997).

Eriksson et al. (2002) relataram mais de 900 COXs comumente utilizados em produtos de higiene pessoal e limpeza e, portanto, potencialmente presentes em águas residuária de lavanderias. De acordo com Marcomini e Zanette (1996), mais de 2500 produtos químicos podem ser encontrados em efluentes de máquina de lavar roupas e, portanto, no esgoto doméstico.

Embora, a água residuária de lavanderia diluída em substrato sintético tenha contribuído com alguns compostos COXs, quatro deles não foram observados nem na amostra efluente nem adsorvido na biomassa (Dimetil disulfito, Butil citrato, Eicosanoe metil e Monoetil hexil ftalato).

5.2.12 – Anaerobiose no reator de leito fluidificado

O ensaio para constatar a anaerobiose do reator foi realizado ao final de sua operação. Para isso, realizou-se teste com corante resazurina no afluente do reator conforme descrito no item 4.12.

Após algumas horas de alimentação com resazurina, a coloração do reator adquiriu tonalidade rósea (potencial redox entre -200 e +200 mV). No entanto, na areia com biofilme, a resazurina tornou-se transparente, indicando anaerobiose estrita nesse trecho do reator (Figura 5. 27).

No biofilme (condição de anaerobiose estrita) e separador de fases (condição facultativa) foi possível observar arqueias metanogênicas, principalmente bacilos fluorescentes e morfologias semelhantes à sarcina. Essas arqueias são anaeróbias estritas, todavia, mantiveram-se também em condição intermediária de potencial redox. É importante destacar que tais células usam compostos finais da degradação anaeróbia, ou seja, H_2/CO_2, acetato, formiato, metanol, entre outros (BOONE et al., 1993).

A constatação de consórcio anaeróbio representado por bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas foi obtida por meio do NMP, cuja realização foi efetuada em condição de anaerobiose estrita.

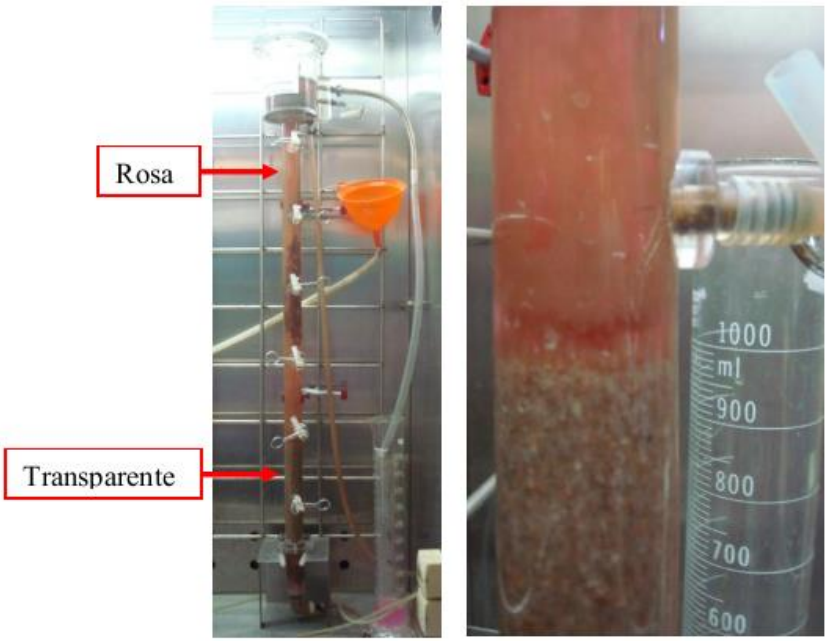

Figura 5.27– Teste com resazurina no reator de leito fluidificado

Na Figura 5.28 pode-se observar a região superior do reator (separador de fases) não vedada, portanto, ocorreu a formação de ambiente facultativo, proporcionando o desenvolvimento de uma microbiota diferenciada.

Figura 5.28 – Teste com resazurina no reator de leito fluidificado (região não vedada do separador de fases indicada pela seta vermelha)

5.2.13 – Análise da Diversidade de Microrganismos

5.2.13.1 – Exames Microscópicos

Ao final da Etapa V de operação do reator foram analisadas amostras da biomassa do leito de areia e do separador de fases com a finalidade de avaliar a diversidade morfológica dos microrganismos. Na biomassa do biofilme da areia foram observados estreptococos, bacilos, endósporos e bactérias filamentosas (Figura 5.29).

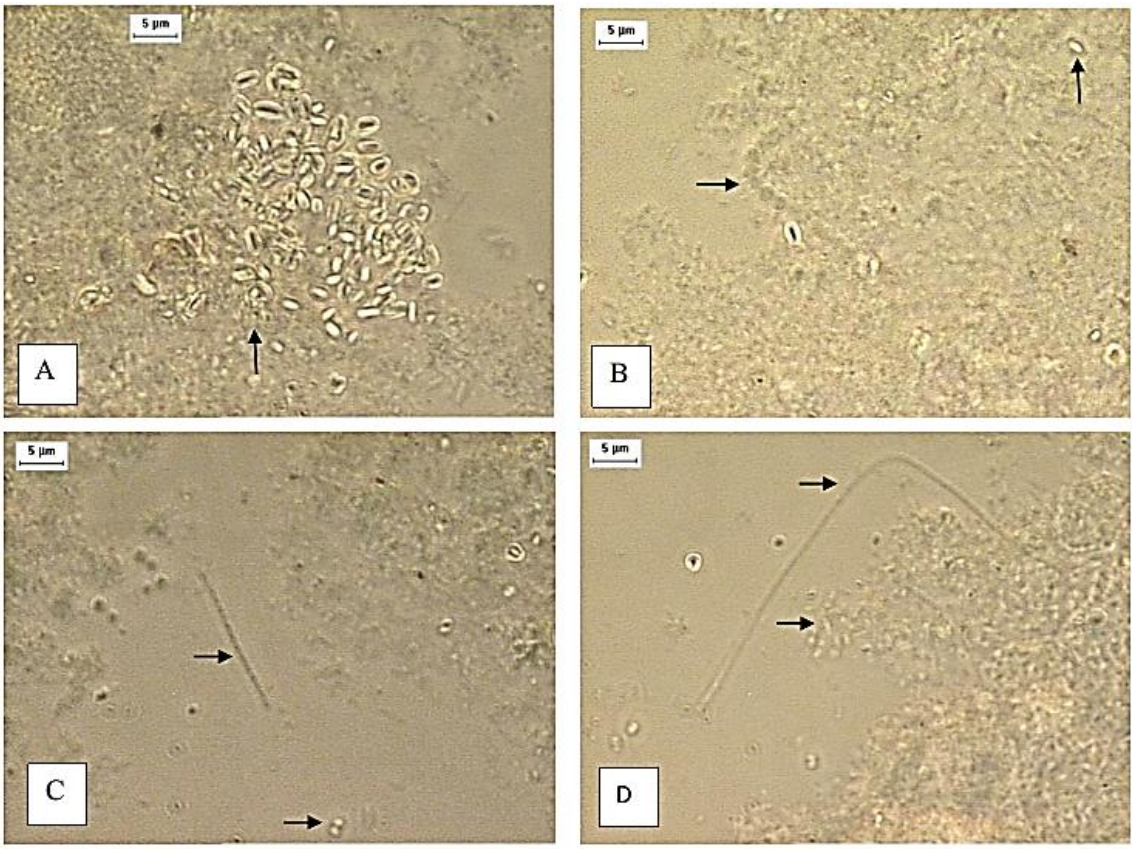

Figura 5.29 – (A-D) Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas na areia do reator no final da Etapa V: (a) endósporos, (b) estreptococos e endósporos, (c) bactéria filamentosa e diplococo, (d) bactéria filamentosa e bacilos

Na biomassa do separador de fases, ao final da Etapa V observou-se as mesmas morfologias verificadas para biomassa da areia, todavia nessa amostra foi encontrada, também, morfologia semelhante à sarcina; além de diatomáceas e carapaça de protozoário (Figura 5.30). Além disso, no separador de fases foram observados bacilos fluorescentes.

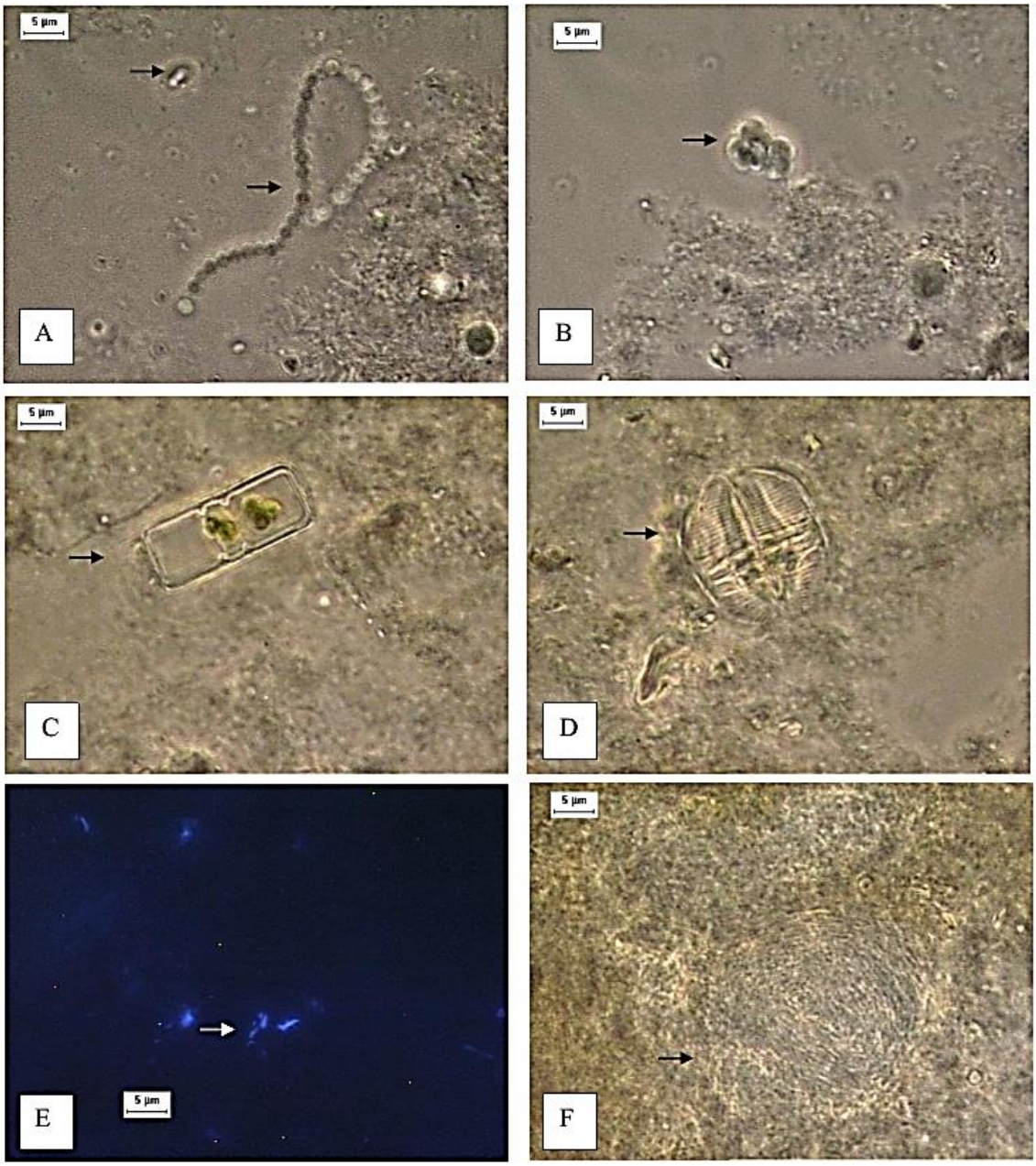

Figura 5.30 – (A-D). Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias observadas no separador de fases do reator no final da Etapa V: (a) estreptococos e bacilo, (b) sarcina, (c) diatomácea, (d) carapaça de protozoário, (e) bacilo fluorescente, (f) bacilos

Portanto, diferentes microrganismos foram favorecidos pelas condições encontradas em cada região do reator associadas as suas capacidades fisiológicas favorecendo a remoção dos compostos recalcitrantes.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada com a biomassa da Etapa V foi possível observar biofilme estabelecido na areia, elevada densidade de células microbianas e camada de exopolímero cobrindo o suporte, além de ampla diversidade de morfologias. Na areia foram observadas células com morfologias semelhantes a espiroquetas, bacilos de diversos tamanhos e cocos. Observou-se também a superfície da areia, cujas micro rugosidades foram devidas ao tratamento com ácido fluorídrico, possibilitando assim maior superfície de contato para os microrganismos e formação do biofilme (Figura 5.31).

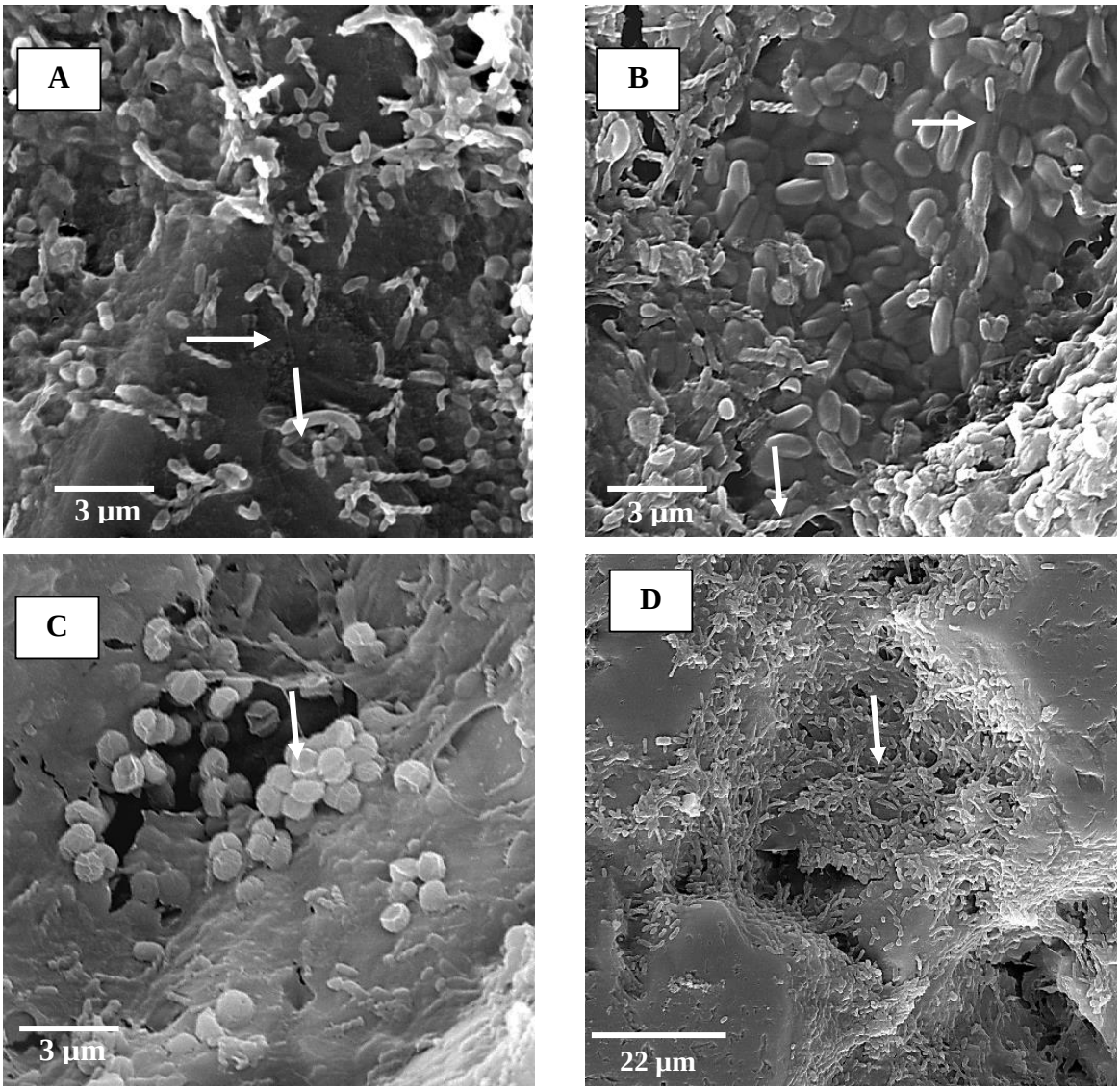

Figura 5.31 – MEV das morfologias observadas para a biomassa da areia ao final da operação (Etapa V): (a) bacilos e espiroquetas, (b) bacilos, (c) aglomerado de cocos e (d) bacilos (aumento A, B E C: 5000X e D: 2000X)

Na biomassa da região do distribuidor observou-se morfologias semelhantes às anteriores, todavia, com predominância de bacilos (Figura 5.32). Na parte superior do reator, no separador de fases, observou-se predominância de bacilos e em menor frequência as espiroquetas. Notou-se a presença de materiais inertes, bem como, exopolímeros, os quais são utilizados como material suporte para células. (Figura 5.32).

O biofilme é um sistema heterogêneos, nos quais as células bacterianas estão embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, parecidas com gel, sendo 98% do peso devido, principalmente, à água e sais (COSTERTON et al.,1995).

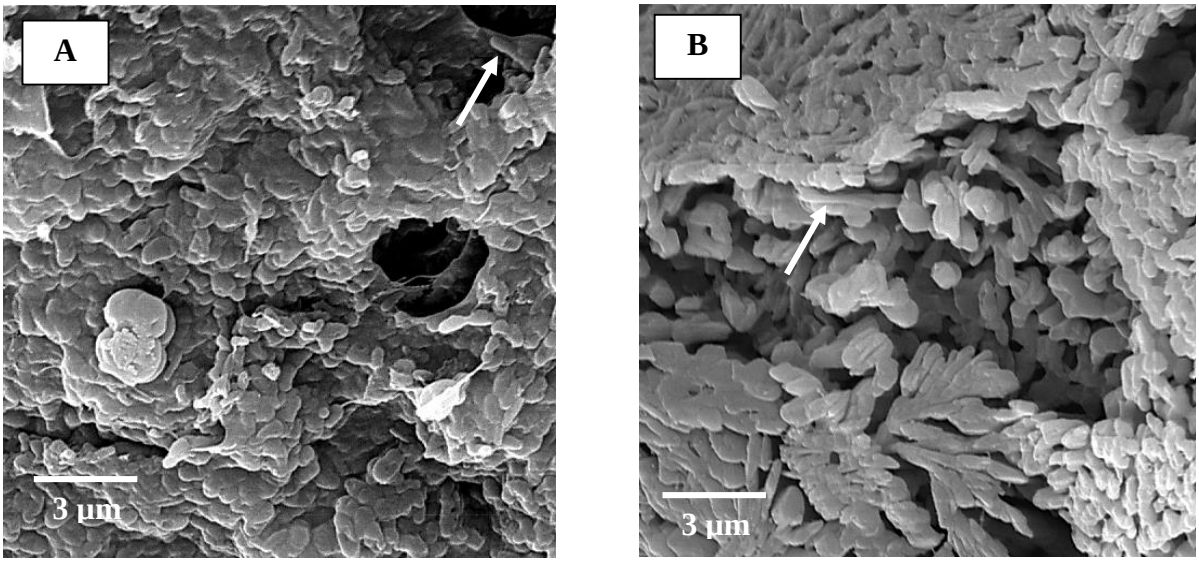

Figura 5.32 – MEV das morfologias observadas para biomassa do distribuidor do reator ao final da operação (Etapa V): (a) e (b) bacilos e exopolímero (5000X)

Para a biomassa do separador de fases foram observados bacilos de diferentes tamanhos, espiroquetas, diplococos e exopolímero (Figura 5.33).

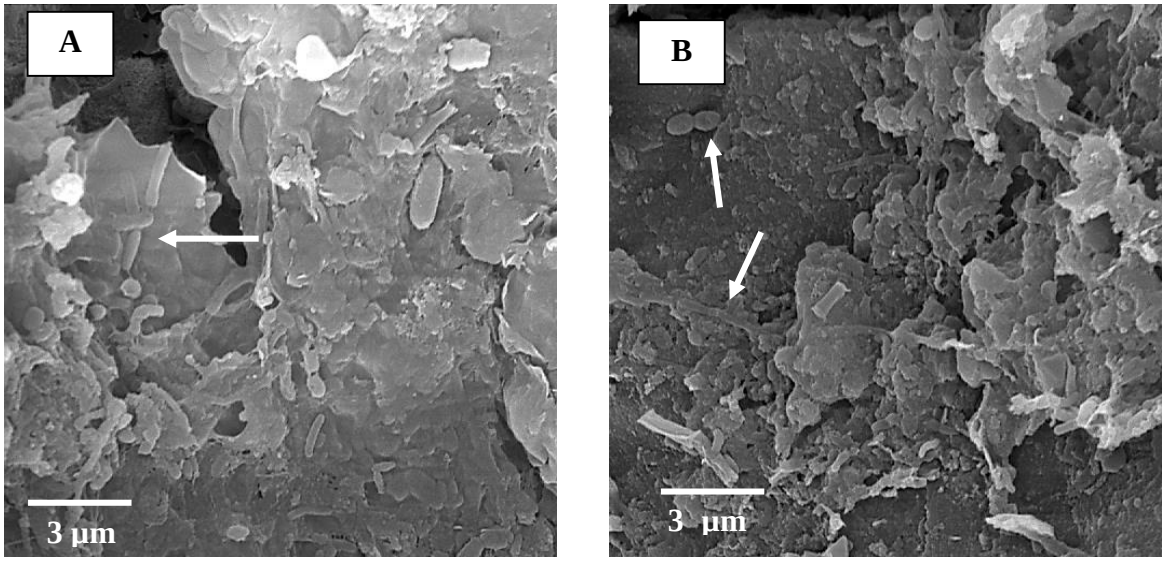

Figura 5.33 – MEV das morfologias observadas na biomassa do separador de fases do reator ao final da operação (Etapa V): (a) bacilos e exopolímero e (c) diplococos e filamentos (aumento 5000X)

Assim como, no biofilme da areia nos sólidos suspensos do reator a diversidade morfológica foi alta com células semelhantes à bacilos, cocos, sarcinas, espiroquetas e filamentos (Figura 5.34).

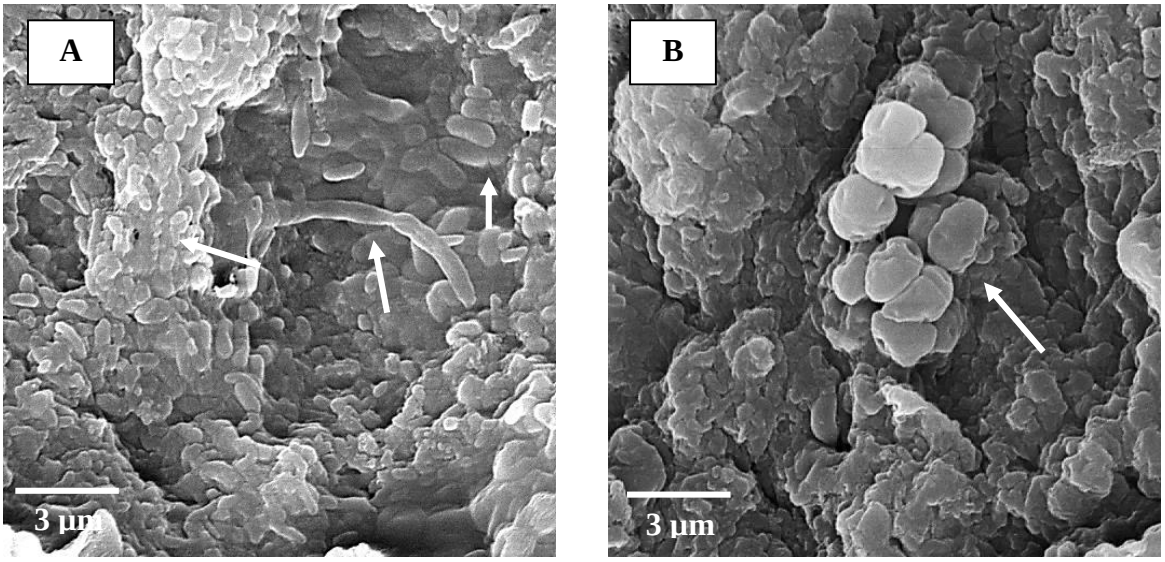

Figura 5.34 – Microscopia eletrônica de varredura das morfologias observadas nos sólidos suspensos efluente do reator ao final da operação (Etapa V) (a) bacilos, espiroquetas e (b) sarcinas (aumento 5000X)

Miqueleto (2010) afirma que a produção de exopolímeros em sistemas anaeróbios está relacionada a diversos fatores, tais como, fonte de carbono, altas relações carbono/nitrogênio, condições microaerofílicas entre outras. Este fato foi evidenciado principalmente na porção superior do reator (separador de fases), onde há um regime hidráulico com menor turbulência, o que favoreceu a manutenção de outras populações de microrganismo, bem como, a troca gasosa entre a fase liquida e a atmosfera. Todavia, especificamente neste trabalho não buscou-se avaliar os exopolímeros.

Logo, a grande diversidade de grupos bacterianos encontrados ao final da operação do reator corrobora a hipótese de que a degradação do LAS é decorrente de consórcio microbiano.

5.2.14 – Análise quantitativa de microrganismos (Número mais provável - NMP)

Observou-se maior quantidade de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas na areia, quando comparado com a biomassa do separador de fases. Obteve-se 2,1E11 e 1,2E7 células.mL^{-1}, respectivamente, para bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas referente à biomassa da areia. Para a biomassa do separador de fases foram observados 1,5E10 e 2,8E6 células.mL^{-1}, respectivamente (Tabela 5.23)

Tabela 5.23 – NMP de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas

	AREIA		SEPARADOR DE FASES	
	BAT*	**AM****	**BAT***	**AM****
Células.mL^{-1}	2,1E11	1,2E7	1,5E10	2,8E6
Células.gSTV^{-1}	3,6E13	2,0E9	8,9E11	1,6E8

*Bactérias anaeróbias totais; ** Arqueias metanogênicas.

Ao final da operação do reator observou-se 5,8.10^{-3} g.mL^{-1} e 1,68.10^{-2} g.mL^{-1} de sólidos totais voláteis (STV) para amostras da areia e do separador de fases, respectivamente. A quantificação de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas na areia foram de 3,62E13 cel.gSTV^{-1} e 2,06E9 cel.gSTV^{-1}, respectivamente.

Carosia (2011) e Oliveira (2010) verificaram para essa mesma configuração de reator na remoção de LAS, 2,34E6 cel.gSTV^{-1} e 1,94E4 cel.g STV^{-1}, para arqueias metanogênicas da biomassa da areia, respectivamente. O valor registrado neste trabalho foi superior ao verificado pelas autoras. Vale ressaltar que, ambas as autoras acima mencionadas usaram LAS padrão (OLIVEIRA, 2010) e LAS oriundo de sabão em pó de uso doméstico (CAROSIA, 2011).

Para a biomassa do separador de fases verificou-se 8,93E11 cel.gSTV^{-1} e 1,66E8 cel.gSTV^{-1} para as bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas, respectivamente. Semelhante ao observado para a areia, as arqueias metanogênicas representaram menos de 1%, dessa biomassa, quando comparado com as bactérias anaeróbias totais. Carosia (2011), por meio da técnica de NMP obteve 3,32E5 cel.gSTV^{-1} de arqueias metanogênicas para a biomassa do separador de fases. O valor registrado neste trabalho também foi superior ao verificado pela autora.

Neste estudo, a água residuária de lavanderia agrega muitos outros compostos, já discutidos no item 5.1.9, que pode ter contribuído para a seleção desses microrganismos; proporcionando também, diversidade biológica dada pela variedade de compostos presente na alimentação do reator. Essa diversidade será discutida posteriormente com os resultados obtidos das análises de biologia molecular (DGGE/Pirosequenciamento).

Por meio da quantificação dos grupos microbianos pôde-se observar predominância de ambos os grupos (bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas) na biomassa aderida na areia. O ambiente facultativo no separador de fases pode ter inibido o desenvolvimento de alguns microrganismos anaeróbios e, por isso sua representatividade foi menor comparada à areia (Figura 5.35).

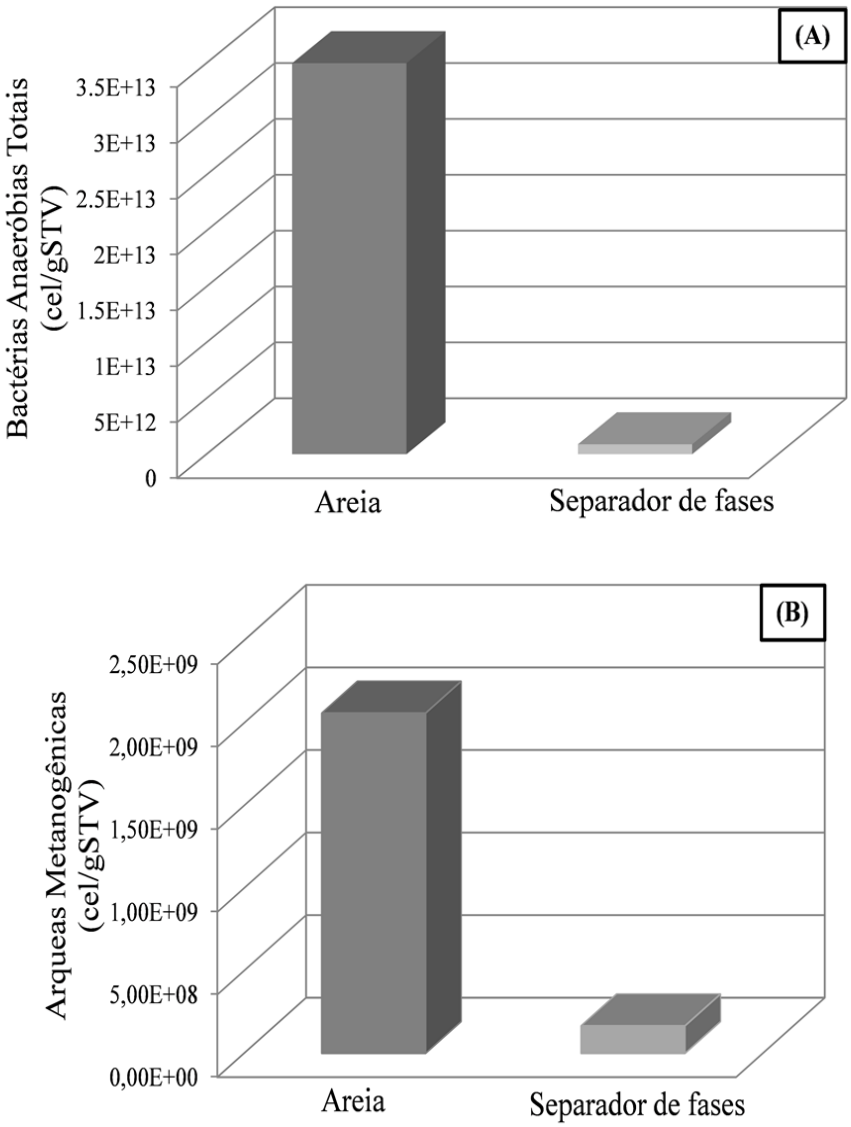

Figura 5.35 – Quantificação dos grupos microbianos pelo NMP: (A) bactérias anaeróbias totais e (B) arqueias metanogênica

Os maiores valores de NMP observados na areia, em relação à biomassa do separador de fases, para ambos os grupos, deveu-se, provavelmente, ao fato do separador não ser vedado, com isso favoreceu o desenvolvimento de microrganismos facultativos. Carosia (2011) observou maiores valores de biomassa no separador de fases comparado à areia. Entretanto, a autora trabalhou com o separador de fases totalmente fechado, não favorecendo sobremaneira o desenvolvimento de microrganismos facultativos.

De acordo com Hidalgo e Garcia-Encina (2002) a adesão dos microrganismos na porção inferior do reator de leito fluidificado é mais rápida que nas demais regiões. Estes autores citam também que a fricção e as forças abrasivas ocasionadas pela fluidificação do leito

controlam a acumulação da biomassa e renovação da mesma no material suporte. Entretanto, apesar destes fatos a concentração da biomassa aderida na areia foi bem superior à encontrada no separador de fases, provavelmente, devido a grande superfície de contato concedida pela areia e pelo tratamento ácido, a qual foi submetida.

5.2.15 – Análise da diversidade por DGGE

O uso combinado das técnicas de biologia molecular PCR-DGGE tem sido bastante aplicado para avaliar a diversidade microbiana em vários ambientes (MUYZER, 1999). Foram analisadas amostras provenientes das Etapas IV e V de operação do reator, dentre elas amostra da areia (A), do distribuidor (D) e do separador de fases (SF), bem como do inóculo (I).

Mediante análise de cluster do perfil de bandas do DGGE, mudanças nas populações microbianas foram observadas para os dois Domínios estudados (Archaea e Bacteria) quando comparadas com o padrão de bandas proveniente do inóculo, bem como, entre as regiões do reator e etapas de operação.

Observou-se maior variação dos coeficientes de similaridade para o Domínio Bacteria (45% a 91%) (Figura 5.36) do que para o Domínio Archaea (54% a 87%) (Figura 5.37). Por meio da comparação do perfil de bandas da biomassa do reator em relação ao inóculo observou-se maiores valores de similaridade na Etapa IV para o Domínio Bacteria (60% entre SF e D com I – 68% A com I) e na Etapa V para o Domínio Archaea (60% entre A, SF e D com I). Ao longo das Etapas IV e V de operação do RALF bem como entre as diferentes regiões do reator observou-se com isso que o Domínio Bacteria teve função mais importante na degradação do LAS do que o Domínio Archaea.

Algumas bandas que estavam presentes no inóculo foram favorecidas ao longo da operação. Por outro lado, outras desapareceram, provavelmente, em função das condições nutricionais e operacionais do reator (Figuras 5.36 e 5.37).

Coeficientes de similaridade de 90% e 58% foram observados entre as amostras do D e SF da Etapa IV (com sacarose) e V (sem sacarose), respectivamente, para o Domínio Bacteria. Para o mesmo Domínio observou-se similaridade de 45% entre as amostras da areia (A) das etapas IV e V. Ao se comparar todas as regiões do reator (A, D e SF) da Etapa IV com a Etapa V pôde-se notar similaridade de 45% para os perfis de bandas do domínio Bacteria.

Para o Domínio Archaea coeficientes de similaridade de 87% e 66% foram observados entre as amostras do D e SF da Etapa IV e V, respectivamente. Para o mesmo Domínio observou-se similaridade de 54% entre as amostras da areia (A) das Etapas IV e V. Ao se comparar todas as regiões do reator (A, D e SF) da etapa IV com a V pôde-se notar similaridade de 54% para o Domínio Archaea.

O tempo de operação na Etapa IV (119 dias) foi maior do que na Etapa V (67 dias). Sob tais condições, provavelmente, adaptação dos microrganismos foi favorecida na etapa de maior duração. Desse modo, propiciando similaridade maior entre as populações dessa etapa.

Os valores de similaridade observados entre as amostras do reator podem ser explicadas pela diferença na formação do biofilme em cada região (A, D e SF). Deve-se destacar que a fluidificação do leito de areia é assegurada pela vazão de recirculação. A vazão total de fluidificação provoca a turbulência, agitação e mistura do leito de areia, por conseguinte, favorecendo o cisalhamento na partícula de areia e estabelecimento de fina camada de biofilme.

Desse modo, a região do leito é diferente daquela do separador de fases, ambas mantidas com a mesma vazão, todavia, uma região com partícula para favorecer o desenvolvimento de biofilme e outra com crescimento celular planctônico. Assim sendo, populações distintas foram favorecidas em função das características de cada região do reator. Além disso, verificou-se alteração das populações em função da presença (Etapa IV) e ausência de sacarose (Etapa V) (Figuras 5.36 e 5.37).

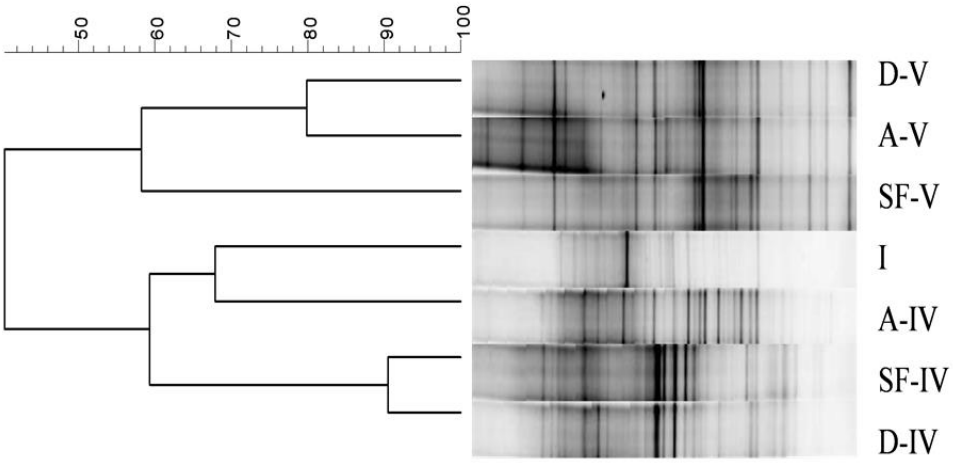

Figura 5.36 – Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do rRNA 16S para o **Domínio Bacteria** de amostras do inóculo (I), distribuidor (D), biomassa da areia (A) e biomassa do separador de fases (SF) das etapas IV e V de operação do reator

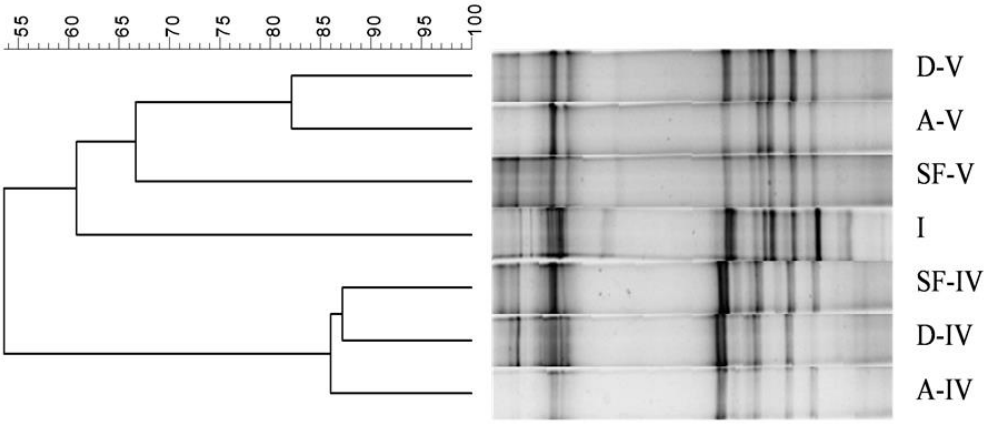

Figura 5.37– Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do rRNA 16S para o **Domínio Archaea** de amostras do inóculo (I), distribuidor (D), biomassa da areia (A) e biomassa do separador de fases (SF) das etapas IV e V de operação do reator

De acordo com o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') observou-se diversidade menor para as populações do Domínio Archaea (2,4 – 2,79) comparado às populações do Domínio Bacteria (3,1 – 3,96) (Tabela 5.24). Oliveira et al. (2009) observaram a mesma tendência; ou seja, menor diversidade para o Domínio Archaea.

Em relação ao domíno Archaea notou-se menores valores para o índice de Shannon-Wiener para as amostras do reator (2,4 – 2,79), em relação aquela do inóculo (2,95). Concluiu-se que os microrganismos pertencentes a este domínio foram mais sensíveis às mudanças na composição da água residuária aplicada ao reator, bem como, alteração do TDH.

Tabela 5.24 – Índice de Shannon-Wiener para as amostras do RALF nas Etapas IV e V

Índice de Shannon-Winner (H')							
Domínio	**Inóculo**	**A-IV**	**D-IV**	**SF-IV**	**A-V**	**D-V**	**SF-V**
Archaea	2,95	2,4	2,74	2,68	2,54	2,7	2,79
Bacteria	2,64	3,7	3,1	3,23	3,96	3,33	3,26

5.2.16 – Pirosequenciamento das amostras do reator de leito fluidificado

A análise de pirosequenciamento das amostras da areia e do separador de fases (Etapas IV e V) resultou em total de 18.523 sequências (somando as quatro amostras). Desse total, foram selecionadas 13.089 sequências, com 221-244pb (média ponderada: 225,4 pb). Por meio da análise do histograma de distribuição do comprimento das sequências (Figura 5.38) observou-se que a maior parte das sequências eram constituídas por 225 pb e 226 pb.

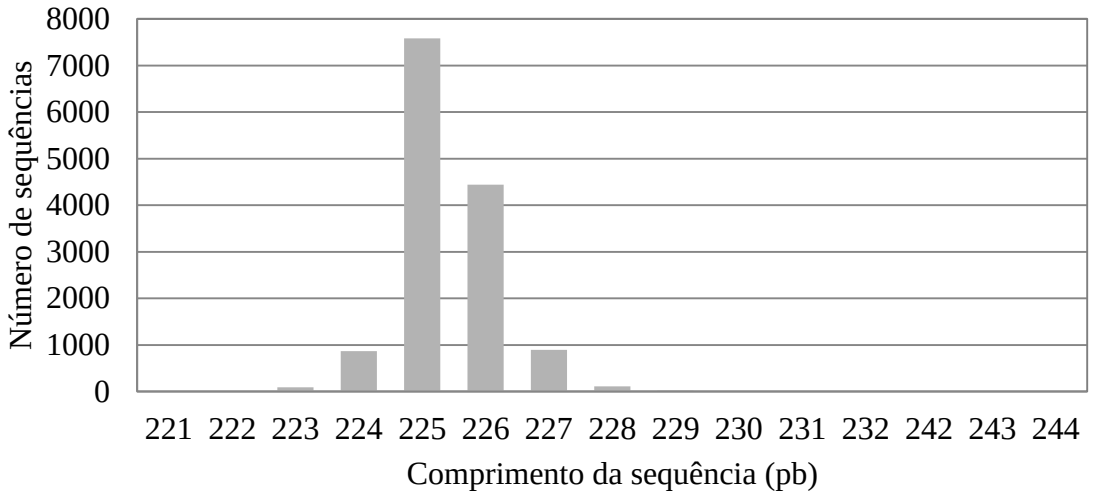

Figura 5.38 – Histograma da distribuição do comprimento das sequências

Foram obtidas, cerca de 2.971 a 3.771 sequências para cada amostra. Ao todo foram definidas 682 UTOs, porém 248 unidades taxonômicas organizacionais (UTOs) continham apenas uma sequência e, por isso, foram descartadas restando 434 UTOs. Sendo assim, 291 UTOs foram atribuídas às amostras da areia e 375 atribuídas às amostras do separador de fases (Tabela 5.25).

Tabela 5.25 – Quantidade de sequências e UTOs atribuídas para cada amostra

Amostra	Sequência	UTOs (Similaridade 97%)
Areia-IV	3.325	158
Areia-V	2.971	133
Separador de fases-IV	3.022	217
Separador de fases-V	3.771	158
Total	13.089	434

5.2.16.1 – Índices ecológicos

Para avaliar a complexidade da comunidade microbiana das amostras do RALF foram calculados índices ecológicos (diversidade, dominância, equitabilidade e riqueza) utilizando o software PAST. A diversidade foi expressa pelos índices de Shannon-Wiener (H`) e Alpha de Fisher.

O índice de Shannon-Wiener (H`) segundo Krebs (1999), é utilizada para determinar a diversidade em um sistema. De acordo com Bush *et al.* (1997) este índice atribui maior peso às espécies raras, cuja variação é de 0 (quando a amostra contém apenas uma espécie) a um valor máximo correspondente a S espécies (KREBS, 1999)

Neste estudo, observou-se de 3,47 a 4,59 para o índice H' entre as quatro amostras. Desse modo, verificou-se para biomassa do SF-IV (4,59±0,1) maior quantidade de UTOs (217).Todavia, para aquela da areia (A-IV) verificou-se maior número de UTOs (7) com maior quantidade de sequências (11 a 897, total de 1945 sequências), por conseguinte, menor diversidade devida alta dominância. Verificou-se para as amostras da Etapa V maior homogeneidade no que diz respeito a distribuição das UTOs cujos valores foram próximos; ou seja,3,98 e 3,87 para A-V e SF-V, respectivamente (Tabela 5.26).

Okada (2012) analisou por meio de pirosequenciamento, a diversidade filogenética da biomassa da manta de lodo e do separador de fases de reatores UASB usados na remoção de surfactante aniônico (LAS) em água residuária de lavanderia comercial. Este autor observou pouca variação no índice de Shannon (4,9 a 6,0), e maior diversidade para a biomassa da manta de lodo. Menor índice de Shannon foi atribuído à amostra com maior parcela de UTOs únicas (com apenas uma sequência).

As medidas de dominância e equitabilidade foram obtidas pelos índices de Berger-Parker e Equitabilidade de Pielou (J'). O Índice de Dominância representa a probabilidade de 2 indivíduos escolhidos ao acaso serem da mesma espécies. Quanto maior o índice, maior a dominância por uma ou poucas espécies e menor a diversidade (SIMPSON, 1949).

O índice de dominância de Berger-Parker descreve a importância da espécie mais dominante na amostra (MAGURRAN, 2004). Foram observados valores baixos referente à este índice no presente estudo (0,09 a 0,26) (Tabela 5.26), e consequentemente, distribuição mais uniforme dos táxons na comunidade microbiana em cada amostra (valores próximos de 0 indicam presença equilibrada de todos táxons, enquanto, valores próximos de 1 indicam

domínio de um táxon). Maior diversidade (maios número de espécies) de acordo com o índice H' correspondeu à menor dominância para a amostra SF-IV (Tabela 5.26).

A amostra A-IV apresentou menor índice de equitabilidade de Pielou (0,62), e consequentemente maior índice de Berger-Parker (0,26), devido a elevada abundância de *Desulfobulbus* representado com 1.945 sequências (58,5%).

A diversidade de espécies de uma amostra está relacionada com a relação entre o número de espécies (riqueza de espécies) e a distribuição do número de indivíduos entre as espécies (eqüitabilidade) (WALKER, 1989). Esta definição está explicitada nos índices de Shannon e de Pielou, que conjugam estas duas variáveis (ODUM, 1983; COLINVAUX, 1996).

O índice de equitabilidade de Pielou (J`) expressa a relação entre a diversidade real e a diversidade máxima teórica, e varia entre 0 e 1, atingindo o máximo quando todas as espécies estão representadas pelo mesmo número de indivíduos. É portanto uma medida de uniformidade da comunidade. (BRUNEL; CANCELA DA FONSECA, 1979). Observou-se pouca variação deste índice entre as amostras (0,62-0,78), indicando significativa uniformidade na distribuição da comunidade microbiana. A própria riqueza de espécies pode ser utilizada como medida geral da diversidade (CONNELL, 1978).

Para mensurar a riqueza das amostras o índice de Margalef foi calculado como pode ser observado na Tabela 5.26. O índice de riqueza de Margalef (d') é uma medida utilizada para estimar a abundância numérica de uma comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies. Quanto maior for o valor do índice maior é a diversidade das comunidades amostrada (MELO, 2009). Para as amostras do RALF este índice variou de 26,67 (A-V) a 42,84 (SF-IV). Estes valores corroboram com o índice H' que atribuiu maior diversidade para SF-IV e menor para A-V (Tabela 5.26).

Ao analisar a composição de UTOs e abundância relativa (número de sequências) observou-se para a amostra A-V menor número, tanto de UTOs (215), como de sequências (3053), justificando assim a baixa riqueza obtida por meio da aplicação do índices acima mencionados, vale ressaltar que houve retirada da sacarose do substrato sintético nessa etapa (Etapa V).

Para amostra SF-IV (com sacarose) observou-se maior número de UTOs (346),em relação as amostras A-V (215), SF-V (255) e A-IV (266). Maior riqueza dessa amostra (SF-IV) é justificada pelos maiores valores dos índices de dominância nas amostras A-IV (0,11±0,06 e 0,26±0,13), A-V (0,04±0,01 e 0,14±0,04) e SF-V (0,05±0,02 e 0,17±0,06) comparadas a SF-IV (0,02±0,001 e 0,09±0,01) diminuindo assim a equitabilidade das mesmas. Observou-se nas amostras da biomassa da Etapa IV (com sacarose) maior número de UTOs que na biomassa da

etapa sem a sacarose (Etapa V). Esses valores foram atribuídos, tanto à ausência desse co-substrato, como à maior concentração de LAS (27,9±9,6 mg.L^{-1}) e, consequentemente, outros compostos xenobióticos na Etapa V.

Tabela 5.26 – Índices de diversidade da biomassa do RALF

ÍNDICES (Diversidade alfa)		A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
UTOs		266	346	215	255
Sequências		3433	3151	3053	3868
Dominância	Berger-Parker	0,26±0,13	0,09±0,01	0,14±0,04	0,17±0,06
Equitabilidade	Pielou (J')	0,62±0,12	0,78±0,01	0,74±0,04	0,70±0,06
Diversidade	Shannon-Wiener (H`)	3,47±0,9	4,59±0,1	3,98±0,5	3,87±0,6
Riqueza	Margalef	32,55±11	42,83±3,5	26,67±14	30,75±13

O método Chao 1 estima a riqueza total utilizando o número de espécies representadas por apenas um indivíduo nas amostras (singletons), e o número de espécies com apenas dois indivíduos nas amostras (*doubletons*).

A comparação da riqueza das espécies entre as quatro amostras do RALF, a partir do método Chao1 (Tabela 5.27), além das curvas de rarefação (estima a riqueza no ambiente original), com nível de similaridade de 3% e 5%, foram geradas para as amostras da Etapa IV (Figura 5.39) e V (Figura 5.40). Por meio dessa análise observou-se maior riqueza para a biomassa do SF-IV. Este resultado também foi verificado por meio da aplicação do índice de Margalef.

Tabela 5.27 – Comparação entre estimadores de riqueza Rarefação e Chao1

Amostra	Rarefação	Chao1
A-IV	266	403±52
SF-IV	346	488±48
A-V	215	347±61
SF-V	255	360±42

(Similaridade 97%)

Ao comparar a biomassa das diferentes regiões do reator, notou-se menor riqueza para aquelas da areia, em relação a do separador de fases. Além disso, notou-se também que, essa riqueza diminuiu na etapa, sem a sacarose. Atribuiu-se a maior riqueza das amostras do

separador de fases a condição facultativa dessa região do reator e presença de sacarose, por conseguinte, favorecendo à manutenção e crescimento de populações diversas de bactérias.

Um conjunto de dados baseado em indivíduos ou amostras pode ser analisado como se fossem réplicas amostrais (ENGSTROM; JAMES 1981), quando se define a curva de rarefação como um método de interpolação que estima a riqueza de espécies (TIPPER, 1979).

Uma curva de rarefação é feita por repetidas re-amostragens aleatórias do conjunto total de N indivíduos ou N amostras, estimando o número esperado de espécies em uma amostra de dentro do ambiente real (SIMBERLOFF, 1978). Essa curva expressa a riqueza máxima esperada no ambiente quando há estabilização da curva, em todas as amostras analisada não observara-se essa estabilização. Consequentemente, espera-se mais espécies do que as amostradas pela técnica de Pirosequenciamento.

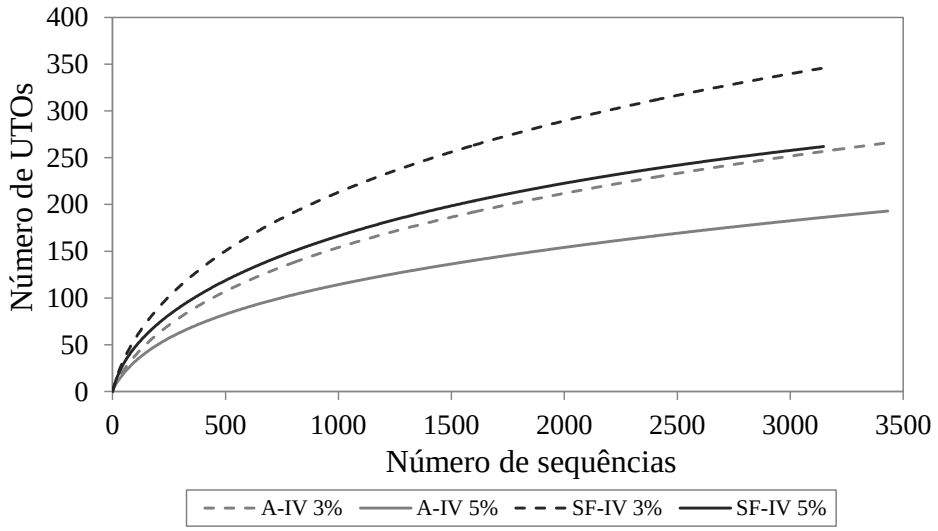

Figura 5.39 – Curva de rarefação da biomassa da areia e do separador de fases na Etapa IV, com 97% (*cutoff* 0,03) e 95% (*cutoff* 0,05) de similaridade

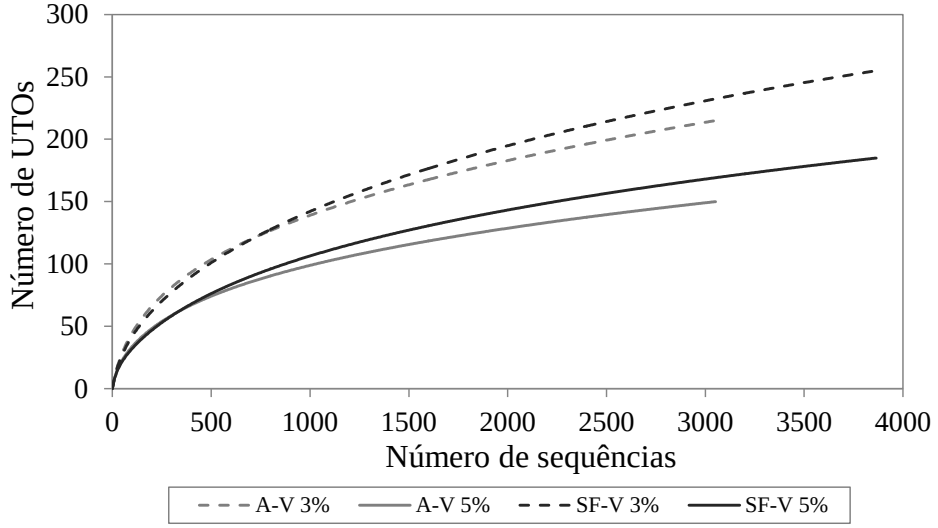

Figura 5.40 – Curva de rarefação da biomassa da areia e do separador de fases na Etapa V, com 97% (*cutoff* 0,03) e 95% (*cutoff* 0,05) de similaridade

Por meio dos índices mencionados anteriormente foi possível comparar diferentes comunidades em termos de diversidade ou riqueza, mas não foi possível avaliar o quanto as comunidades e eram distintas (ou similares) umas das a outras, em termos de composição de espécies. Para lidar com essa questão, é necessário utilizar medidas de diversidade beta (β) ou diversidade diferencial, que é uma medida de como a variedade (e em alguns casos a abundância) de espécies diferenciam-se entre comunidades ou amostras. Quanto menos espécies as amostras compartilham, mais alta é a diversidade β.

A maneira mais simples de medir a diversidade β é pelo uso dos coeficientes de similaridade. Estes coeficientes comparam comunidades de forma qualitativa ou quantitativa. Os índices qualitativos, ou coeficientes binários, mais utilizados são o índice de Jaccard (Sj) e o índice de Sorensen (Ss). A desvantagem destes índices é que eles não levam em conta as abundâncias das espécies.

De modo geral a diversidade β entre as amostras do RALF foi alta (Tabela 5.28), já que a similaridade entre as amostras avaliada pelos índices de Jaccard e de Sorense foram baixas, com exceção na comparação das amostras da Etapa V, quando foram obtidos 45% e 62% de similaridade de acordo com Jaccard e Sorense, respectivamente.

Tabela 5.28 – Índices de similaridade de Jaccard e Sorense da biomassa do RALF

ÍNDICE	Amostra	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Jaccard	A-IV	1			
	SF-IV	0,3218	1		
	A-V	0,1425	0,10433	1	
	SF-V	0,1326	0,12127	0,45511	1
Sorense	A-IV	1			
	SF-IV	0,4869	1		
	A-V	0,2495	0,18895	1	
	SF-V	0,2342	0,21631	0,62553	1

O valor médio do índice de similaridade de Sorense para este estudo foi 0,3235, considerado baixo, porém maior, quando comparado com o valor encontrado por Hu et al. (2012). Os autores verificaram em média 0,25 de similaridade de Sorense ao compararem a biomassa de 16 sistemas de tratamento de águas residuárias utilizando Pirosequenciamento-454. A disimiliaridade das amostras pôde ser demonstrada pelos resultados da análise de coordenadas principais, com essa análise as quatro amostras foram separadas uma das outras (Figura 5.41).

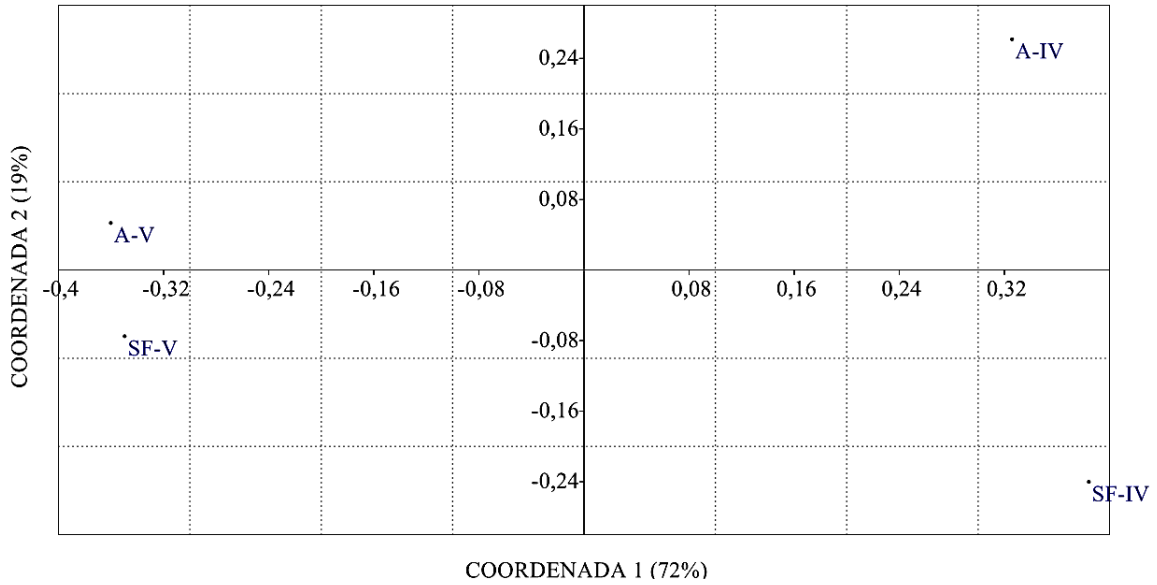

Figura 5.41 – Análise de Coordenadas Principais (*Principal coordinate analysis* - PCoA) baseada na composição da comunidade microbiana de cada amostra do RALF empregando o índice de Sorense e Software PAST

A diversidade beta foi calculada também pelo índice de Whittaker que mede a mudança ou taxa de substituição na composição de espécies de um local para outro. Este índice varia de zero, quando duas amostras não apresentam nenhuma diferença na composição de espécies e 2, quando esta diferença é máxima (WHITTAKER, 1960). Assim foi possível averiguar o quanto as comunidades microbianas foram distintas.

Para este índice, quanto menos UTOs as amostras compartilham entre si mais alto é o seu valor. Verificou-se 0,75 entre a biomassa da A-IV e A-V e 0,78 entre SF-IV e SF-V. Para as regiões do reator na mesma etapa operacional observou-se 0,51 entre A-IV e SF-IV e 0,37 entre A-V e SF-V, segundo a comparação por pares de Whittaker (Tabela 5.29).

Observou-se maiores valores de diversidade β entre a biomassa do mesmo compartimento do reator (areia ou separador de fases), porém de etapas diferentes (IV ou V). Sendo 0,7505 e 0,78369 para biomassas da areia (A-IV e A-V) e separador de fases (SF-IV e SF-V), respectivamente. Menores valores foram observados entre as amostras da mesma etapa de operação do RALF, 0,5131 e 0,37447, para amostras das Etapas IV (A-IV e SF-IV) e V (A-V e SF-V), respectivamente.

A alteração na composição do substrato pode ter influenciado nessa diversidade entre uma etapa e outra. Em ambientes heterogêneos, espécies com diferentes amplitudes de tolerância tendem a ter diferentes padrões de distribuição espacial. Assim, com o aumento da heterogeneidade ambiental as condições ficam favoráveis para que outras espécies possam se estabelecer no local, resultando em aumento da diversidade β (VEECH et al. 2002).

Tabela 5.29 – Diversidade β de Whitakker das amostras do RALF

Whittaker	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
A-IV	0			
SF-IV	0,5131	0		
A-V	0,7505	0,81105	0	
SF-V	0,7658	0,78369	0,37447	0

Quando há várias comunidades sendo comparadas simultaneamente a representação dessa diversidade β pode ser obtida através das análises de agrupamento (cluster analysis). Um dos índices propostos que considera as abundâncias das espécies é o índice de Morisita-Horn (C_H). O valor dos coeficientes de similaridade varia de 0 (nenhuma similaridade) a 1 (total similaridade).

Dentre os índices de similaridade, o de Morisita-Horn depende da riqueza de espécies e do tamanho da amostra, sendo sensível a abundância das espécies mais abundante, portanto, é quantitativo (MAGURRAN, 1988), bem como, o índice de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957). A aplicação desses índices foi baseada no software PAST, o qual também foi utilizado para a geração do dendograma para comparação entre os resultados obtidos nas quatro amostras.

Pela análise de grupamento das amostras gerada a partir desses índices de similaridade pode-se observar dois grupamentos distintos e com pouca diferença entre eles. Sendo 72-94% para as amostras da Etapa V e 6-17% para as amostras da Etapa IV (Figuras 5.42 e 5.43). Ficou demonstrado que a retirada da sacarose na última etapa propiciou alteração na comunidade microbiana, uma vez que a similaridade entre a biomassa da Etapa IV com aquela da Etapa V foi de apenas 4-6%.

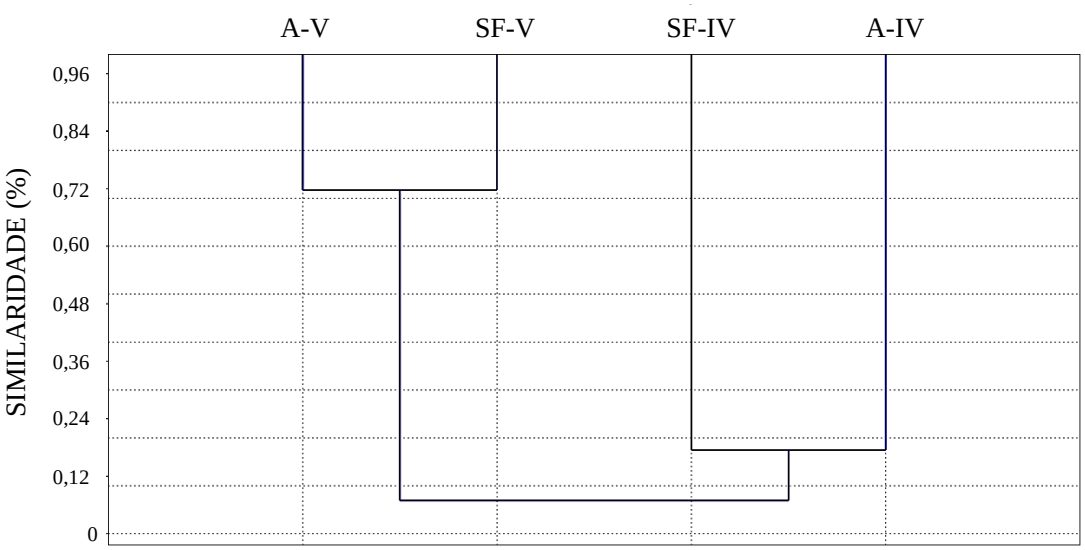

Figura 5.42 – Dendrograma baseado no índice de Bray-Curtis, para a biomassa da areia e do separador de fases do RALF, para similaridade de 97%

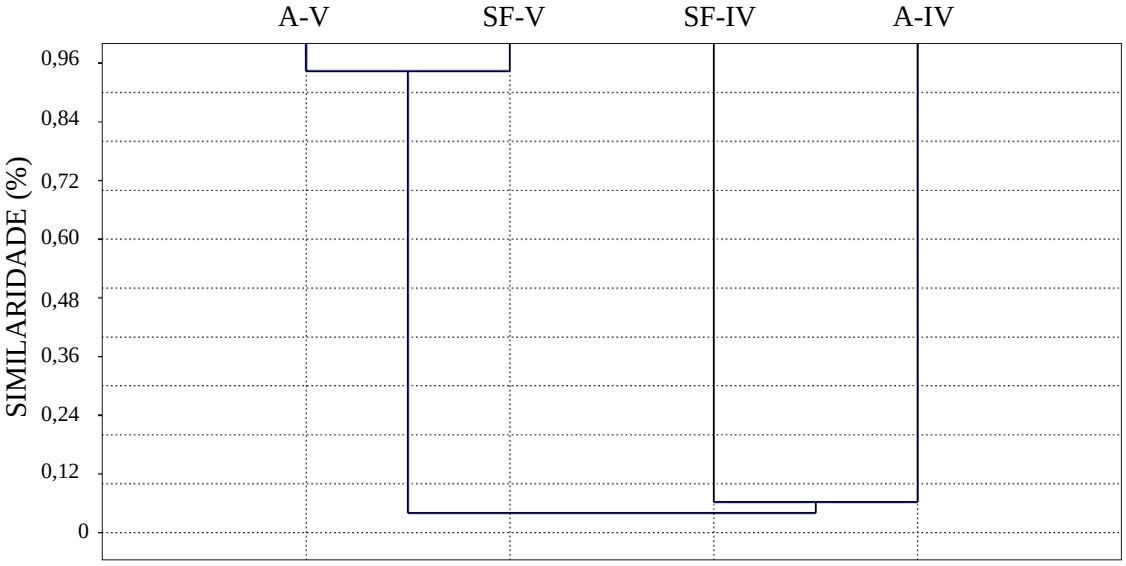

Figura 5.43 – Dendrograma baseado no índice de Morisita-Horn, para a biomassa da areia e do separador de fases do RALF, para similaridade de 97%

5.2.16.2 – Classificação taxonômica

Por meio da aplicação do RDP-Classifier obteve-se classificação em filos do domínio Bacteria de 77,9% a 89,5% das UTOs para cada amostra, correspondendo à abundância relativa entre 64,5% e 94,9% (Tabela 5.30).

Para as amostras da areia da Etapa IV (A-IV) obteve-se 3.325 sequências agrupadas em 158 UTOs, sendo que 4,1% destas não foram classificas a nível de filo. Para a amostra do separador de fases desta mesma etapa (SF-IV) obteve-se 3.022 sequência agrupadas em 217 UTOs, sendo que 35,5% destas não foram classificas a nível de filo.

Para as amostras da Etapa V, A-V e SF-V obteve-se 2.971 e 3.771 sequências, agrupadas em 133 e 158 UTOs, respectivamente, entretanto 5,1% e 3,7%, não foram classificas a nível de filo. Verificou-se menor parcela de UTOs classificadas em gênero na amostra SF-IV (23,76%) seguida da A-V (63,48%).

Tabela 5.30 – Porcentagem de UTOs (similaridade 97%) e sequências classificadas taxonomicamente em cada amostra

Nível Taxonômico	A-IV (%)		A-V (%)		SF-IV (%)		SF-V (%)	
	UTO	A	UTO	A	UTO	A	UTO	A
Filo	87,3	95,9	89,5	94,9	77,9	64,5	88,6	96,3
Classe	83,5	94,8	84,9	93,3	66,4	43,2	85,4	95,4
Ordem	81,0	94,5	83,5	91,3	62,7	40,6	82,9	94,2
Família	70,9	90,3	77,4	86,5	49,8	32,9	76,6	89,0
Gênero	55,1	82,2	56,4	63,5	34,1	23,8	53,2	72,9

A: Abundância relativa (número de sequências)

Ao todo, foram identificados 92 gêneros distintos para o Domínio Bacteria. Observou-se para a biomassa do separador de fases (SF-IV e SF-V) maior diversidade de gênero comparado com aquela da areia (A-IV e A-V), como pode ser verificado na Tabela 5.31.

Tabela 5.31 – Quantidade de filos, classes, ordens, famílias e gêneros classificados em cada amostra

Amostra	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
A-IV	10	22	36	42	44
A-V	9	16	26	32	38
SF-IV	14	22	35	42	45
SF-V	12	19	31	35	47

(Similaridade 97%)

5.2.16.3 – Filos

Ao todo, foram classificados 17 filos distintos, compreendendo 10 na amostra da areia (A) da Etapa IV, 9 na amostra da areia da Etapa V, 14 na amostra do separador de fases da Etapa IV e 12 na amostra do separador de fases da Etapa V, como pode ser observado na Tabela 5.32.

Observou-se maior porcentagem de filos Proteobacteria (25,8-83%), Gemmatimonadetes (2-34%), Bacterioidetes (3,1-19,2%) e Firmicutes (2,3-13,7%) para a

abundância relativa da biomassa da areia e separador de fases, em ambas as etapas. Em menor proporção observou-se os filos Acidobacteria (0,1-1,3%), Actinobacteria, Chlamydiae, Nitrospira, Planctomycetes e Synergistetes (0,1%) para a biomassa da areia e separador de fases, em ambas as etapas (Figura 5.44). A predominância de Proteobacteria é justificada pela grande diversidade de metabolismo presente nesse grupo além de muitos representantes.

Alguns filos foram observados em apenas uma das amostras, como é o caso dos filos Actinobacteria (0,1%), Euryarchaeota (0,4%) e Tenericutes (1,4%) na biomassa do SF-IV e filo Nitrospira (0,1%) na biomassa do SF-V.

Oliveira et al. (2013) caracterizaram o biofilme utilizado na degradação de LAS em reator anaeróbio de leito fluidificado. Assim como neste trabalho, os autores encontraram a predominância de populações semelhantes ao filo Proteobacteria (43,8%). Entretanto, verificou-se para os filos Firmicutes e Acidobacteria menor representatividade; ou seja, 1,9% e 2,9%, respectivamente.

Notou-se que a presença ou ausência de sacarose não afetou a prevalência do filo Proteobacteria nas amostras do separador de fases (SF-IV e SF-V). Porém, para a amostra da areia, na etapa sem co-substrato (Etapa V) houve redução de 54,7% da abundância relativa (Tabela 5.32).

Verificou-se que o filo Proteobacteria foi o mais representativo para todas as amostras do RALF, com exceção da biomassa do separador de fases da Etapa V (SF-V) (Figura 5.44). A maior representatividade desse filo foi observada para a biomassa da A-IV (83%).

O filo Gemmatimonadetes foi mais representativo nas amostras da Etapa V, 25,5% e 34% para a biomassa da areia e separador de fases, respectivamente. As bactérias pertencentes a esse filo foram assim classificadas, por Zhang e colaboradores, em 2003, a partir do isolamento de bactérias de reator anaeróbio-aeróbio operado em bateladas sequenciais usado na remoção de fósforo. São aeróbias e bacilos Gram-negativos. Crescem a temperatura ótima de 30ºC e pH 7,0. São capazes de utilizar alguns substratos como extrato de levedura, acetato e benzoato. A presença de bactérias pertencentes a esse filo ocorreu principalmente na região do separador de fases, uma vez que esse ambiente permitiu troca gasosa com a atmosfera mantendo ambiente facultativo. Sua presença na areia pode ter ocorrido próximo às mangueiras de alimentação e recirculação, devido a passagem de oxigênio pelas mangueiras de silicone.

Motteran (2013) observou representantes do filo Gemmatimonadetes nas proporções de 1%; 0,3% e 0,1% para as amostras da areia (com sacarose), separador de fases (com sacarose) e separador de fases (sem sacarose), respectivamente, em estudo de degradação de LAE em RALF.

Tabela 5.32 – Abundância relativa e UTOs dos filos classificados na biomassa do RALF

FILO	A-IV			SF-IV			A-V			SF-V		
	U	A	%	U	A	%	U	A	%	U	A	%
Unclassified	20	136	4,1	48	1073	35,5	14	150	5,0	18	141	3,74
Acidobacteria	6	22	0,7	4	38	1,3	3	6	0,2	2	5	0,1
Actinobacteria	-	-	-	1	2	0,1	-	-	-	-	-	-
Bacteroidetes	15	104	3,1	23	240	7,9	25	494	16,6	30	726	19,2
Chlamydiae	-	-	-	1	3	0,1	-	-	-	1	2	0,1
Chlorobi	3	17	0,5	2	20	0,7	-	-	-	-	-	-
Chloroflexi	10	92	2,8	15	170	5,6	-	-	-	-	-	-
Euryarchaeota	-	-	-	3	13	0,4	-	-	-	-	-	-
Firmicutes	15	75	2,3	50	414	13,7	6	51	1,7	7	45	1,2
Fusobacteria	-	-	-	-	-	-	2	14	0,5	2	5	0,1
Gemmatimonadetes	8	66	2,0	4	35	1,2	8	757	25,5	12	1283	34,0
Nitrospira	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	0,1
Planctomycetes	1	2	0,1	-	-	-	-	-	-	2	4	0,1
Proteobacteria	75	2760	83,0	52	779	25,8	60	1118	37,6	68	1090	28,9
Spirochaetes	-	-	-	1	7	0,2	6	77	2,6	6	72	1,9
Synergistetes	1	2	0,1	5	116	3,8	1	3	0,1	3	17	0,4
Tenericutes	-	-	-	2	42	1,4	-	-	-	-	-	-
Verrucomicrobia	4	49	1,5	6	70	2,3	-	301	10,1	-	379	10,0

A – Abundância relativa, U – UTO (Unidade taxonômica operacional), % - Porcentagem relativa à abundância relativa da amostra. A-IV – amostra da areia da etapa IV (com sacarose); SF-IV – amostra do separador de fases da etapa IV (SF-IV); A-V – amostra da areia da etapa V (sem sacarose) e SF-V – amostra do separador de fases da etapa V (sem sacarose).

Observou-se que o filo Bacteroidetes esteve presente em todas as amostras analisadas. A abundância relativa referente a este filo foi de 3,1%, 7,9%, 16,5% e 19,2% para as amostras A-IV, SF-IV, A-V e SF-V, respectivamente. As bactérias pertencentes a este filo são capazes de crescer em ampla variedade de substratos complexos. As espécies deste filo habitam solos, água doce e ambiente marinho, sedimentos em temperatura mesófila (KRIEG et al., 2010), e sistemas de lodos ativados (OSAKA et al., 2008).

No presente estudo verificou-se também sequências referentes ao filo Firmicutes (1,2-13,7%). Representantes pertencente a este filo foram encontradas em trabalhos com culturas

desnitrificantes (HEYLEN et al., 2006) e em população microbiana de fezes suínas e em fossas de armazenamento de estrume (WHITEHEAD; COSTA, trabalho não publicado). Sua presença no reator foi devido ao inóculo utilizado, proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura.

Observou-se também representantes do filo Verrucomicrobia; ou seja, 1,5%; 2,3%; 10% e 10,1%, na biomassa do A-IV, SF-IV, A-V e SF-V, respectivamente. Oliveira *et al*. (2013) também observaram sequencias similares a representantes desse filo Verrucomicrobia (3,8%), e também com baixa representatividade. Motteran (2013) observou 1%; 1,5%; 0,4% e 0,4%, para biomassa da areia (com sacarose), separador de fases (com sacarose), areia (sem sacarose) e separador de fases (sem sacarose), respectivamente para esse filo na degradação de LAE em RALF.

Carosia (2011) avaliou a degradação de LAS oriundo de sabão em pó em reator anaeróbio de leito fluidificado. A autora observou prevalência de 88% de sequencias similares ao filo Proteobacteria, além de 1% e 2% para Acidobacteria e Firmicutes, respectivamente, para amostras do material suporte (areia) do reator.

Ferreira (2012) avaliou a influência de co-substratos na degradação de LAS proveniente de sabão em pó em reator anaeróbio de leito fluidificado. Este autor também observou prevalência do filo Proteobacteria (72%). Os resultados para Acidobacteria (3%) e Firmicutes (6,3%), foram similares aos encontrados por Carosia (2011), para as amostras retiradas do material suporte (areia) do reator.

No presente trabalho observou-se também representantes do filo Acidobacteria em todas as amostras, sendo que a abundância relativa referente ao número de sequências foi maior para a etapa com sacarose (Etapa IV), sendo 0,7% e 1,3% para amostra da A-IV e SF-IV, respectivamente.

Representantes do filo Acidobacteria já foram observados em diversos ambientes, tais como, solos, águas termais, lodos ativados e sedimentos de lagos (QUAISER et al., 2003). Em estudos sobre a diversidade microbiana de solos verificou-se que representantes do filo Acidobacteria podem adaptar-se a limitação de recursos nutricionais (NAETHER et al., 2012). Estes microrganismos são oligotróficos e preferem solos pobres aos ricos em carbono, entretanto, há diminuição em seu número quando o ambiente é enriquecido com sacarose. (JONES et al., 2009). O oposto foi verificado no presente estudo; ou seja, na etapa sem adição de sacarose a abundância relativa foi menor.

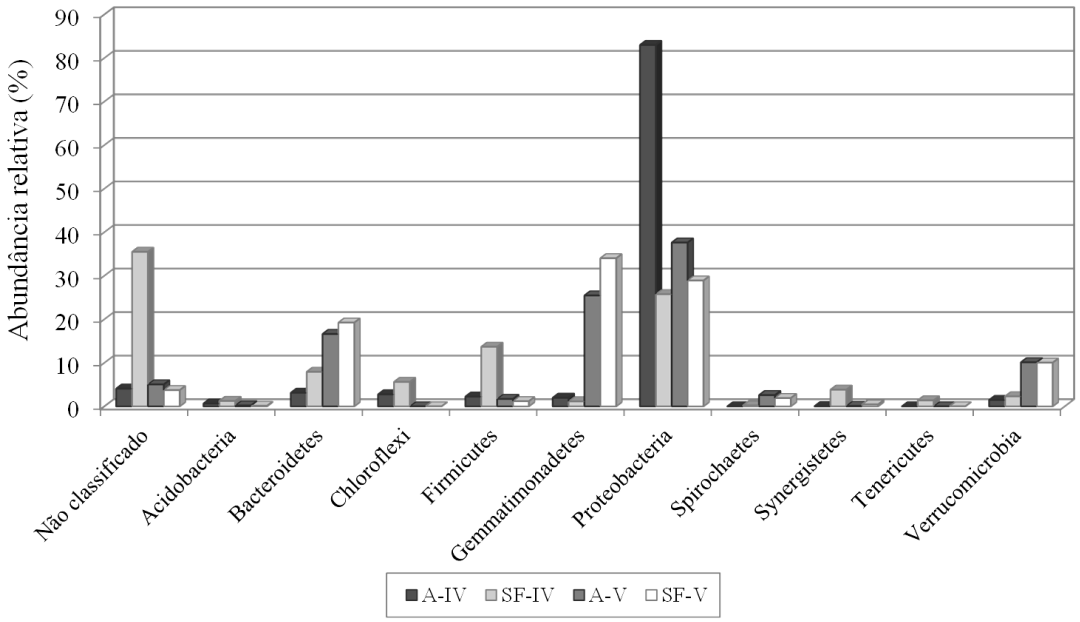

Figura 5.44 – Abundância relativa dos filos mais representativos (similaridade 97%) para a biomassa da Areia-IV, Separador de fases-IV, Areia-V e Separador de fases-V

Representantes do filo Synergistetes foram observados na biomassa da A-IV, SF-IV, A-V e SF-V, cujos valores de abundância relativa foram de 0,1%; 3,8%; 0,1% e 0,4%, respectivamente. Os microrganismos referentes a este filo são encontrados em reatores anaeróbios, solo e trato digestivo de suínos, aves e humanos. São bactérias Gram negativas, estritamente anaeróbias, móveis, mesofílicas, apresentam formato de bacilo ou vibrião e podem crescer em pH em torno de 7,0 (VARTOUKIAN et al., 2007).

Segundo Godon et al. (2005) representantes do filo Synergistetes degradam aminoácidos em condição anaeróbia, semelhante a observado no RALF do presente estudo, cuja fonte de aminoácidos era proveniente do extrato de levedura. Algumas espécies foram identificadas como contribuintes na degradação de matéria orgânica para a produção de biogás em reatores anaeróbios e têm potencial para uso na produção do gás hidrogênio (BAUMGARTNER et al., 2012). A identificação de representantes deste filo é justificada pela origem do inóculo proveniente de lodo de reator UASB usado no tratamento de águas residuárias de suinocultura.

Representantes deste filo também foram observados por Carosia (2011), Ferreira (2012) e Motteran (2013) cujas proporções foram de 2%, 3% e 8,1%,respectivamente, para amostras do biofilme do RALF usado na remoção de LAS para os dois primeiros e LAE para o último.

Carosia (2011) verificou maior proporção de representantes similares ao filo Synergistetes na biomassa do separador de fases, quando comparada com aquela do material

suporte, cujos valores foram de 19% e 2%, respectivamente. Motteran (2013) em estudo de remoção de LAE em RALF verificou representantes similares ao filo Synergistetes em maior destaque na biomassa do separador de fases (2,5%), somente na ausência de sacarose. Nas etapas com sacarose representantes deste filo foram evidenciados na amostra do material suporte (8,1%).

Representantes do filo Actinobacteria foram observados apenas na amostra SF-IV (0,1%). Algumas espécies deste filo são comuns em solo e desempenham papel importante na decomposição de matéria orgânica e, consequentemente, no ciclo do carbono. A maioria é aeróbia, mas algumas delas podem crescer em condição anaeróbia (GHILIMAS et al., 2006). Espécies pertencentes a este filo foram encontradas em lodo de esgoto sanitário (DRZYZGA et al. 2008), RALF usado no tratamento de LAS (OLIVEIRA et al., 2010),reator operado em bateladas sequenciais usado na remoção de LAS (DUARTE et al., 2010) reator EGSB usado para remoção de LAS (DELFORNO, 2011); reator UASB usado para remoção de LAS de água de lavanderia (OKADA, 2012); RALF utilizado para remoção de LAE (MOTTERAN, 2013).

5.2.16.4 – Famílias

As sequências foram classificadas em 64 famílias, sendo 42, tanto para a biomassa da areia, quanto do separador de fases da etapa IV (Tabela 5.33). Observou-se predominantemente representantes pertencentes as famílias Desulfobulbaceae (1-58%) e Rhodocyclaceae (3-12%). para biomassa da etapa IV.

Representantes pertencentes as famílias Anaerolineaceae (2,8-4,3%), Bradyrhizobiaceae (0,1-1%), Chitinophagaceae (1,8-2%), Comamonadaceae (0,3-2,4%), Gemmatimonadaceae (1,2-2%), Geobacteraceae (0,6-1,3%), Holophagaceae (0,3-1,3%), Nitrosomonadaceae (0,8-1,7%), Synergistaceae (0,06-3,8%), Veillonellaceae (0,06-3,1%) e Xanthomonadaceae (0,06-3,7%) foram verificados em menor proporção nessa biomassa do reator (A-IV e SF-IV). As demais famílias representaram <1% das sequências analisadas em ambas as amostras.

Tabela 5.33 – Distribuição das famílias na biomassa do RALF da etapa IV

FAMÍLIA	A-IV			SF-IV		
	U	A	%	U	A	%
0_unclassified	46	324	9,74	109	2028	67,11
Acetobacteraceae	2	7	0,21	1	3	0,10
Acholeplasmataceae	-	-	-	2	42	1,39
Aeromonadaceae	1	16	0,48	-	-	-
Alcaligenaceae	1	12	0,36	1	4	0,13
Anaerolineaceae	10	92	2,77	13	129	4,27
Aurantimonadaceae	1	2	0,06	-	-	-
Bdellovibrionaceae	4	19	0,57	1	3	0,10
Beijerinckiaceae	1	5	0,15	0	0	0,00
Bradyrhizobiaceae	4	34	1,02	1	3	0,10
Bryobacter	1	7	0,21	0	0	0,00
Burkholderiales_incertae_sedis	1	5	0,15	0	0	0,00
Chitinophagaceae	10	66	1,98	8	55	1,82
Chlorobiaceae	1	2	0,06	-	-	-
Clostridiaceae 1	1	2	0,06	-	-	-
Clostridiales_Incertae Sedis XI	-	-	-	1	5	0,17
Comamonadaceae	3	79	2,38	1	8	0,26
Cryomorphaceae	-	-	-	2	8	0,26
Cytophagaceae	-	-	-	1	2	0,07
Desulfobulbaceae	7	1945	58,50	3	33	1,09
Enterobacteriaceae	-	-	-	1	2	0,07
Erythrobacteraceae	1	2	0,06	-	-	-
Flavobacteriaceae	-	-	-	1	2	0,07
Gemmatimonadaceae	8	66	1,98	4	35	1,16
Geobacteraceae	3	42	1,26	2	19	0,63
Gp6	2	4	0,12	-	-	-
Halothiobacillaceae	0	0	0,00	1	3	0,10
Holophagaceae	2	9	0,27	4	38	1,26
Hydrogenophilaceae	1	7	0,21	2	22	0,73

continua...

continução...

FAMÍLIA	A-IV			SF-IV		
	U	A	%	U	A	%
Ignavibacteriaceae	2	15	0,45	2	20	0,66
Leptospiraceae	-	-	-	1	7	0,23
Methanospirillaceae	-	-	-	3	13	0,43
Methylococcaceae	2	16	0,48	-	-	-
Nitrosomonadaceae	2	27	0,81	3	51	1,69
Nocardiaceae	-	-	-	1	2	0,07
Parachlamydiaceae	-	-	-	1	3	0,10
Peptostreptococcaceae	1	12	0,36	3	13	0,43
Planctomycetaceae	1	2	0,06	-	-	-
Polyangiaceae	1	4	0,12	1	2	0,07
Porphyromonadaceae	1	17	0,51	-	-	-
Pseudomonadaceae	2	10	0,30	1	2	0,07
Rhodobacteraceae	3	14	0,42	1	4	0,13
Rhodocyclaceae	19	387	11,64	11	90	2,98
Rhodospirillaceae	-	-	-	1	4	0,13
Ruminococcaceae	1	2	0,06	3	8	0,26
Spartobacteria_genera_incertae_sedis	1	2	0,06	-	-	-
Sphingomonadaceae	2	10	0,30	-	-	-
Streptococcaceae	-	-	-	1	6	0,20
Subdivision3_genera_incertae_sedis	2	29	0,87	2	7	0,23
Synergistaceae	1	2	0,06	5	116	3,84
Syntrophaceae	1	3	0,09	2	4	0,13
Syntrophobacteraceae	1	2	0,06	-	-	-
Syntrophomonadaceae	-	-	-	1	2	0,07
Syntrophorhabdaceae	-	-	-	3	14	0,46
Thermoanaerobacteraceae	1	2	0,06	1	4	0,13
Veillonellaceae	1	2	0,06	6	93	3,08
Verrucomicrobiaceae	1	18	0,54	1	2	0,07
Xanthomonadaceae	1	2	0,06	4	111	3,67

A – Abundância relativa, U – UTO (Unidade taxonômica operacional), % - Porcentagem relativa à abundância relativa da biomassa. A-IV – biomassa da areia da etapa IV (com sacarose); SF-IV – biomassa do separador de

fases da etapa IV (SF-IV); A-V – biomassa da areia da etapa V (sem sacarose) e SF-V – biomassa do separador de fases da etapa V (sem sacarose).

Na Etapa V, foi possível classificar 32 e 35 famílias para biomassa da areia e do separador de fases, respectivamente (Tabela 5.34). As famílias predominantes na biomassa da etapa V foram as seguintes: Gemmatimonadaceae (25,5-34%), Rhodocyclaceae (19,1-22,4%) e Chitinophagaceae (12,4-14,4%).

Representantes pertencentes as famílias Bdellovibrionaceae (1,2-1,8%), Bradyrhizobiaceae (0,4-2,2%), Comamonadaceae (0,7-1%), Leptospiraceae (1,9-2,6%), Peptostreptococcaceae (0,6-1,4%), Pseudomonadaceae (0,7-1,1%), Subdivision3_genera_incertae_sedis (7,1-9,1%) e Verrucomicrobiaceae (1-2,9%) foram observados em menor proporção nessa biomassa do reator (A-V e SF-V). As demais famílias representaram <1% das sequências analisadas em ambas as amostras.

Tabela 5.34 – Distribuição das famílias na biomassa do RALF da etapa V

FAMÍLIA	A-V			SF-V		
	U	A	%	U	A	%
0_unclassified	30	401	13,50	37	413	10,95
Acetobacteraceae	1	3	0,10	1	3	0,08
Aeromonadaceae	1	6	0,20	1	11	0,29
Bdellovibrionaceae	3	54	1,82	3	46	1,22
Bradyrhizobiaceae	5	65	2,19	2	14	0,37
Burkholderiales_incertae_sedis	1	11	0,37	2	15	0,40
Campylobacteraceae	3	11	0,37	2	16	0,42
Caulobacteraceae	1	5	0,17	1	2	0,05
Chitinophagaceae	16	368	12,39	22	543	14,40
Clostridiaceae 1	-	-	-	1	2	0,05
Comamonadaceae	4	21	0,71	5	38	1,01
Desulfobulbaceae	-	-	-	1	2	0,05
Enterobacteriaceae	-	-	-	1	2	0,05
Erythrobacteraceae	1	2	0,07	1	3	0,08
Fusobacteriaceae	2	14	0,47	2	5	0,13

continua...

continuação...

FAMÍLIA	A-V			SF-V		
	U	A	%	U	A	%
Gemmatimonadaceae	8	757	25,48	12	1283	34,02
Geobacteraceae	1	3	0,10	-	-	-
Holophagaceae	3	6	0,20	2	5	0,13
Lachnospiraceae	1	2	0,07	1	2	0,05
Leptospiraceae	6	77	2,59	6	72	1,91
Methylococcaceae	1	27	0,91	1	8	0,21
Nitrospiraceae	-	-	-	1	2	0,05
Oxalobacteraceae	1	16	0,54	1	30	0,80
Parachlamydiaceae	-	-	-	1	2	0,05
Peptostreptococcaceae	3	42	1,41	2	22	0,58
Phyllobacteriaceae	1	2	0,07	-	-	-
Planctomycetaceae	-	-	-	2	4	0,11
Polyangiaceae	1	17	0,57	1	15	0,40
Porphyromonadaceae	1	3	0,10	-	-	-
Pseudomonadaceae	5	33	1,11	5	25	0,66
Rhodobacteraceae	2	14	0,47	2	13	0,34
Rhodocyclaceae	17	665	22,38	19	720	19,09
Rhodospirillaceae	1	15	0,50	2	7	0,19
Sphingomonadaceae	2	13	0,44	3	17	0,45
Subdivision3_genera_incertae_sedis	5	270	9,09	3	269	7,13
Synergistaceae	1	3	0,10	3	17	0,45
Veillonellaceae	1	4	0,13	3	19	0,50
Verrucomicrobiaceae	3	31	1,04	3	110	2,92
Xanthomonadaceae	1	10	0,34	3	14	0,37

A – Abundância relativa, U – UTO (Unidade taxonômica operacional), % - Porcentagem relativa à abundância relativa da biomassa. A-IV – biomassa da areia da etapa IV (com sacarose); SF-IV – biomassa do separador de fases da etapa IV (SF-IV); A-V – biomassa da areia da etapa V (sem sacarose) e SF-V – biomassado separador de fases da etapa V (sem sacarose).

Observou-se para biomassa da Etapa IV, que as sequências não classificadas foram mais abundantes (67,1%) no separador de fases (SF-IV) comparado com a biomassa A-IV (9,7%). Em relação a biomassa da Etapa V observou-se menor porcentagem de sequências não classificadas, sendo 13,5% para A-V e 11% para SF-V (Figura 5.45).

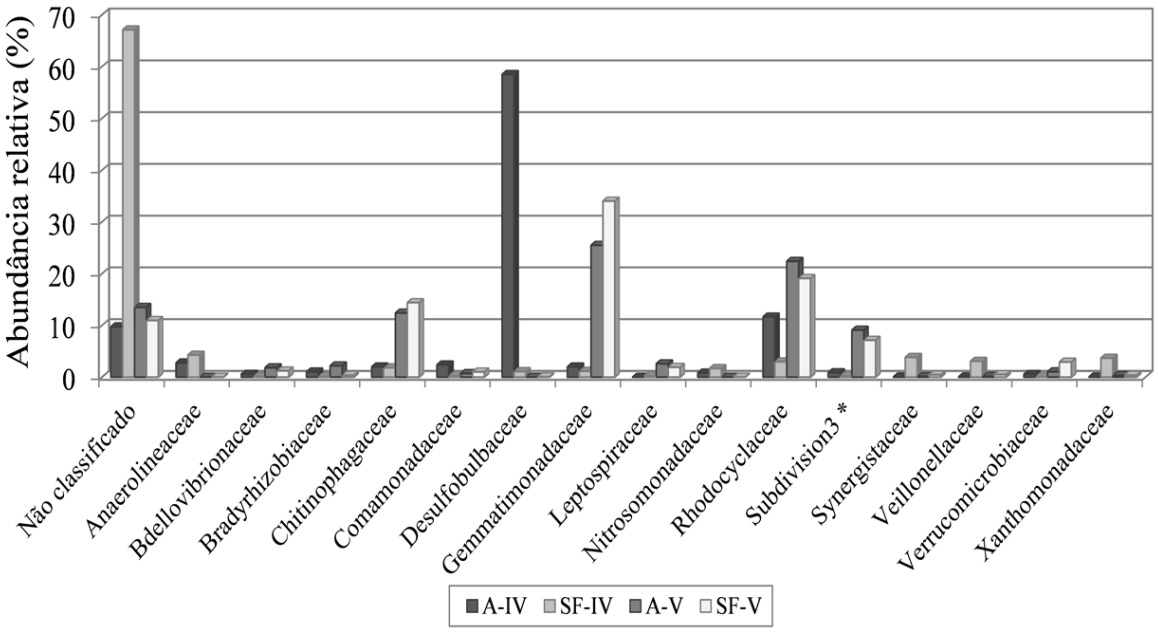

Figura 5.45 – Abundância relativa das famílias mais representativos (similaridade 97%) nas amostras da Areia-IV, Separador de fases-IV, Areia-V e Separador de fases-V

Pode-se observar 18 famílias em comum as quatro amostras do RALF (Figura 5.46). Verificou-se para as sequências não classificadas maior abundância relativa (324-2028 sequências), bem como, para representantes das famílias Gemmatimonadaceae (35-1283 sequências) e Rhodocyclaceae (90-720 sequências). Observou-se para as demais famílias abundância relativa entre 2 e 543 sequências.

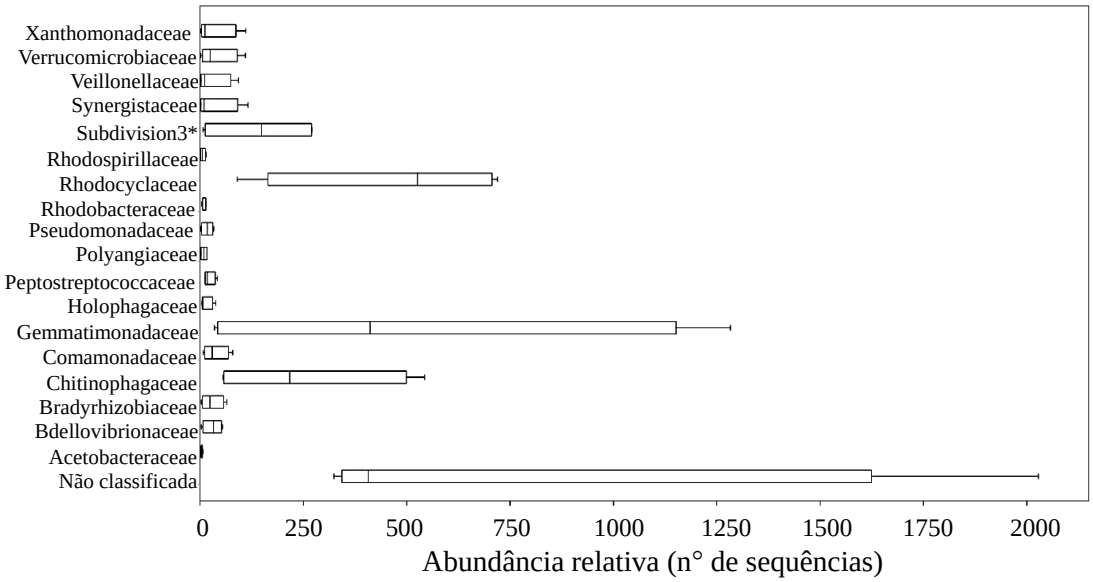

Figura 5.46 – Abundância relativa das famílias em comuns com as amostras A-IV, SF-IV, A-V e SF-V

Representantes da família Gemmatimonadaceae são bacilos gram negativos, aeróbios e com espécies capazes de degradar benzoato (KRIEG et al., 2010), a proporção observada dessa família foi 1,98%, 1,1%, 25,5% e 34% para biomassa da A-IV, SF-IV, A-V e SF-V, respectivamente.

Na família Rhodocyclaceae estão incluídas espécies capazes também de degradar benzoato, por meta clivagem do anel aromático, além de fenol e tolueno (UNZ; FARRAH, 1972; ARVIN et al., 1989; BRENNER et al., 2005). Observou-se maior proporção dessa família na biomassa da areia (11,6 – 22,4%) que na biomassa do separador de fases (3 –19%) para as Etapas IV e V, respectivamente. A presença de ambas as famílias na biomassa do reator foram, portanto, relacionadas com a degradação de LAS de água de lavanderia adicionado ao substrato sintético.

5.2.16.5 – Gêneros

Classificou-se o total de 92 gêneros na biomassa do RALF, sendo 44 distribuídos na biomassa da areia da Etapa IV (A-IV) e 45 no separador de fases da mesma etapa (SF-IV). Para a biomassa da Etapa V foram identificados 38 e 47 gêneros para a areia (A-V) e separador de fases (SF-V), respectivamente. Sete gêneros foram comuns às quatro amostras, sendo eles:

Bdellovibrio, Ferruginibacter, Gemmatimonas, Holophaga, Sediminibacterium, Subdivision3_genera_incertae_sedis e *Zoogloea.*

5.2.16.6 – Gêneros da biomassa da areia (Etapa IV)

Para a biomassa da areia (Etapa IV) foram identificados 20 gêneros mais frequentes, com abundância relativa na faixa de 0,27% (*Bosea*) a 58,5% (*Desulfobulbus*) (Figura 5.47).

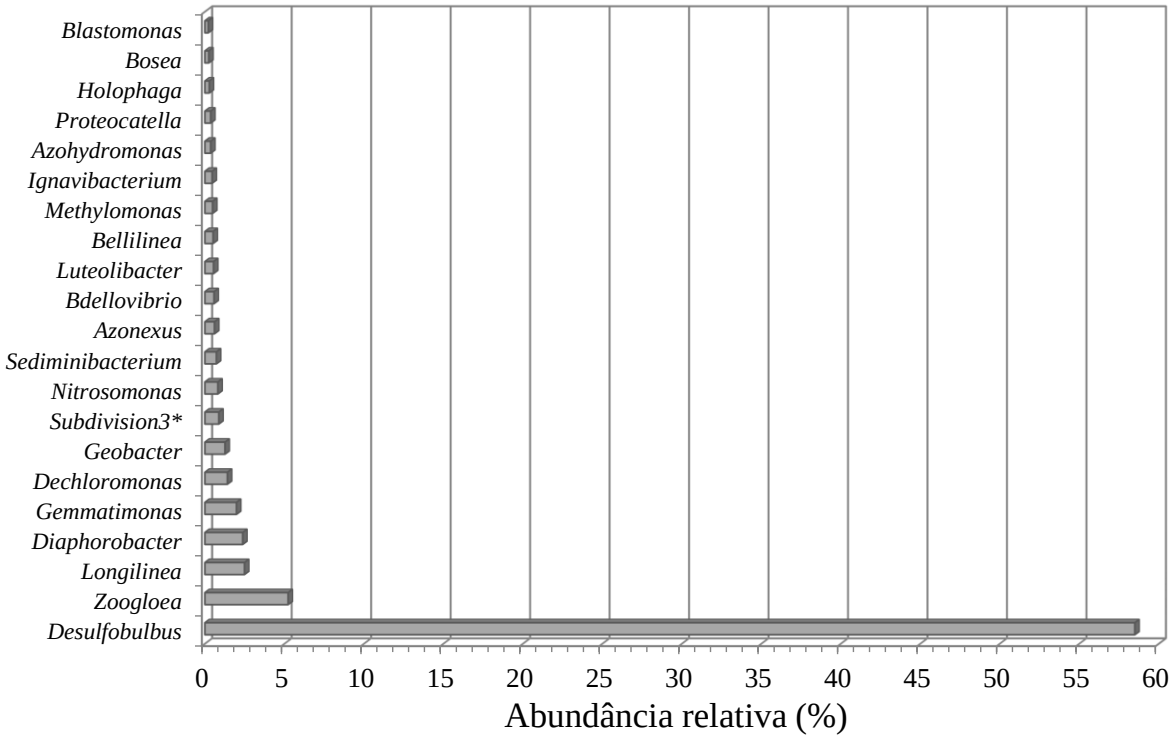

Figura 5.47 – Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na amostra da biomassa da Areia da Etapa IV (similaridade 97%)

Dentre esses 20 gêneros, 10 foram relacionados com representantes de ambiente anaeróbio facultativo ou estrito e os outros 10 com bactérias aeróbias (Tabela 5.35), apesar de alguns representantes serem capazes de se manterem em condição anaeróbia, tais como, *Bosea*, *Diaphorobacter* e *Zoogloea* (KHAN, 2002; BRENNER et al., 2005; PHAM, 2009).

Com exceção do gênero *Proteocatella*, todos os demais são gram negativos não formadores de endósporo. Todos os gêneros listados na Tabela 5.35 já foram identificados em

amostras ambientais como lodos de estações de tratamento, justificando assim a presença neste estudo.

Algumas espécies de *Desulfobulbus, Dechloromonas, Diaphorobacter Methylomonas* e *Zoogloea* podem usar nitrato, em substituição ao oxigênio, como receptor final de elétrons, permitindo seu desenvolvimento em condição anóxica (BRENNER et al., 2005).

Embora Brenner et al. (2005) classifique o gênero *Desulfobulbus* como anaeróbio estrito, vários autores citam que algumas espécies deste gênero são capazes também de utilizar nitrato como receptor final de elétrons, formando amônia como produto final por meio da via desassimilativa que envolve a enzima nitrato redutase (CYPIONKA, 1995; MOURA et al., 1997).

O uso de nitrato como receptor final de elétrons é uma possibilidade, considerando sua presença na água residuária de lavanderia (9±4,7 $mg.L^{-1}$ de nitrato), com base na caracterização da água de lavanderia. *Desulfobulbus* também está relacionados com a redução de sulfato a sulfeto (BRENNER et al., 2005). As possíveis fontes de enxofre foram as proteínas presentes no extrato de levedura usado na água residuária sintética e o LAS, que possui um grupo aromático sulfonado.

Assim como *Desulfobulbus, Bosea* também está relacionada com a redução de sulfato ou tiossulfato a sulfeto (BRENNER et al., 2005). A presença desse gênero foi corroborada pela concentração de sulfato no afluente do RALF, sendo que a presença de representantes desse gênero foi maior (0,47%) na Etapa V, com maior concentração afluente de sulfato (16±20,2 $mg.L^{-1}$) do que na Etapa IV (0,24%) com 8±4,2 $mg.L^{-1}$ de sulfato afluente.

Vários gêneros identificados nesse trabalho são capazes de utilizar extrato de levedura: *Diaphorobacter, Longilinea, Gemmatimonas, Dechloromonas, Bellilinea, Methylomonas* e *Proteocatella* (BRENNER et al., 2005; YAMADA et al., 2006; PHAM, 2009; PIKUTA et al., 2009; KRIEG et al., 2010).

Algumas espécies de *Dechloromonas* são capazes de utilizar completamente compostos aromáticos, incluindo benzeno, a CO_2 em condição anaeróbia, ou na presença de nitrato como receptor de elétrons. Além disso, podem usar AQDS (2,6-antrahidroquinona dissulfonada) como doador de elétrons e acetato como fonte de carbono (COATES et al, 2001). Este gênero já foi observado em reatores anaeróbios no tratamento de água residuária contendo LAS (DUARTE et al., 2010; DELFORNO et al., 2012; OKADA, 2012). A presença de LAS neste estudo pode ter favorecido representantes desse gênero na biomassa do reator.

Cinco gêneros foram relacionados com a degradação de carboidratos, entre eles a sacarose: *Longilinia* (2 – 3%), *Bellilinea* (0,5 –0,51%), *Ignavibacterium* (0,45 – 0,66%), *Bosea* (0,24 – 0,48%) e *Azohydromonas* (0,13 – 0,36%) (BRENNER et al., 2005; XIE; YOKOTA, 2005; LINO et al., 2010). Com exceção dos representantes do gênero *Bosea* que foram favorecidos

também pelo sulfato afluente da Etapa V, os demais gêneros foram observados somente na Etapa IV (com sacarose).

Entre os 20 gêneros com maior abundância relativa na areia da Etapa IV do RALF, oito deles possuem representantes relacionados com a degradação de compostos aromáticos podendo estar relacionados com a degradação do LAS.

Representantes do gênero *Bdellovibrio* são capazes de degradar compostos com um anel aromático (benzeno, tolueno, etil benzeno, xileno) ou dois anéis aromáticos (naftaleno) (BRENNER et al., 2005). Os gêneros *Dechloromonas, Gemmatimonas, Holophaga* e *Zoogloea* possuem espécies capazes de degradar compostos com um anel aromático (fenol, tolueno, hidroxi- e metoxi- benzoatos) (BRENNER et al., 2005; KRIEG et al., 2010). O LAS, que possui um grupo aromático pode ter favorecido a seleção de representantes desses gêneros na biomassa do reator. Com exceção de *Bdellovibrio* e *Holophaga* observou-se para os demais gêneros maior abundância relativa nas biomassas da Etapa V, quando a concentração de LAS afluente foi a maior (27,91±9,57 $mg.L^{-1}$).

Kenner et al. (1994) verificaram a degradação de compostos aromáticos (benzeno, fenol, *p*-cresol) por *Nitrosomonas europaea*. Segundo os autores não foi verificada completa mineralização pois não houve a quebra do anel aromático, entretanto a bactéria pode ter iniciado a degradação com geração de sub-produtos que podem ser utilizados por outras espécies.

Representantes do gênero *Nitrosomonas* foram observados na biomassa da areia (0,8%) e separador de fases (1,7%) da Etapa IV. Segundo Schmidt et al. (2002), *Nitrosomonas* podem oxidar amônio na ausência de oxigênio dissolvido, substituindo o O_2 por NO_2. Observou-se nitrogênio amoniacal na água residuária de lavanderia de 2,71 a 23,34 $mg.L^{-1}$ (Tabela A1, apêndice) e formação de nitrito no efluente do reator na Etapa IV (20,94±14,5 $mg.L^{-1}$), o que pode justificar a presença deste gênero na biomassa do RALF.

Tabela 5.35 – Descrição dos 20 gêneros de maior abundância relativa na biomassa da areia (Etapa IV) do RALF (similaridade 97%)

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Azohydromonas	-	-	Aeróbia	Lodo de indústria de papel	Mahanty et al. (2013); Ugwu (2011); Xie; Yokota (2005)
Azonexus	-	-	Aeróbia e microaerófila (fixam N_2)	Lodo aeróbio de estação de tratamento em Daejeon Coréia do Sul, UASB.	Brenner et al. (2005); Quan et al. (2006); Okada (2012)
Bdellovibrio	-	-	Aeróbia	Solo, esgoto, água doce, bioreator (BETX).	Brenner *et al.* (2005)
Bellilinea	-	-	Anaeróbia estrita	Lodo de reator, solo de plantaçao de arroz.	Brenner et al. (2005); Yamada et al. (2007)
Bosea	-	-	Aeróbia e microaerófila	UASB, solos cultivados.	Brenner et al. (2005)
Dechloromonas	-	-	Anaeróbia facultativa	Lodo de indústria de papel, reator EGSB, UASB.	Brenner et al. (2005); Delforno et al. (2012); Okada (2012)
Desulfobulbus	-	-	Anaeróbia estrita	Regiões anóxicas de água doce, água salobra, habitats marinhos; conteúdo ruminal, esterco animal e lodo de esgoto.	Brenner et al. (2005); Okada (2012)

continua...

continuação...

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Diaphorobacter	-	-	Aeróbia e anaeróbia	Solo de plantação de arroz e lodos ativados.	Khan; Hiraishi (2002); Pham (2009).
Gemmatimonas	-	-	Aeróbia	Lodos ativados em condição de remoção de fósforo e solo.	Davis et al. (2005); Joseph et al. (2003); Krieg et al. (2010); Liu et al., (2011)
Geobacter	-	-	Anaeróbia estrita	UASB.	Brenner et al. (2005); Okada 2012
Holophaga	-	-	Anaeróbia	Lodo anóxicos de rios de água doce, sistemas de tratamento de fabrica de papel, UASB.	Krieg et al. (2010); Liesack et al. (1994); Okada 2012
Ignavibacterium	-	-	Anaeróbia	Águas termais, UASB.	Lino et al. (2010); Wang et al. (2012)
Longilinea	-	-	Anaeróbia estrita	Lodos de reatores anaerobios, solos de plantaçao de arroz.	Yamada et al. (2006)
Luteolibacter	-	-	Aeróbia	Lodos ativados, tundra (solo).	Jiang et al. (2012)
Methylomonas	-	-	Aeróbia estrita	Sedimentos de rios e lagos, lodo de wetland; lodos ativados.	Brenner et al. (2005)

continua...

conclusão...

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Nitrosomonas	-	-	Anaeróbia facultativa	Estações de tratamento de esgoto, águas eutrofizadas, solos e rios.	Brenner et al. (2005)
Proteocatella	+	+	Anaeróbia	RALF e EGSB	Bialek et al. (2012); Pikuta et al. (2009)
Sediminibacterium	-	-	Aeróbia	Lodo de estação de tratamento de esgoto municipal.	Jin et al. (2011)
*Subdivision3**				Lodos ativados	Zhang et al. (2012)
Zoogloea	-	-	Aeróbia e anóxica (NO_3)	Águas poluídas, estações de tratamento, lodos ativados.	Arvin et al. (1989); Brenner et al. (2005); Okada (2012)

Subdivision3 = Subdivision3_genera_incertae_sedis;* Endósp. = endósporo.

5.2.16.7 – Gêneros da biomassa do separador de fases (Etapa IV)

Para os 20 gêneros mais frequentes identificados na biomassa do separador de fases (Etapa IV) foram observadas abundância relativa entre 0,23% (*Proteocatella*) a 3,34% (*Rhodanobacter*) como pode ser observado na Figura 5.48.

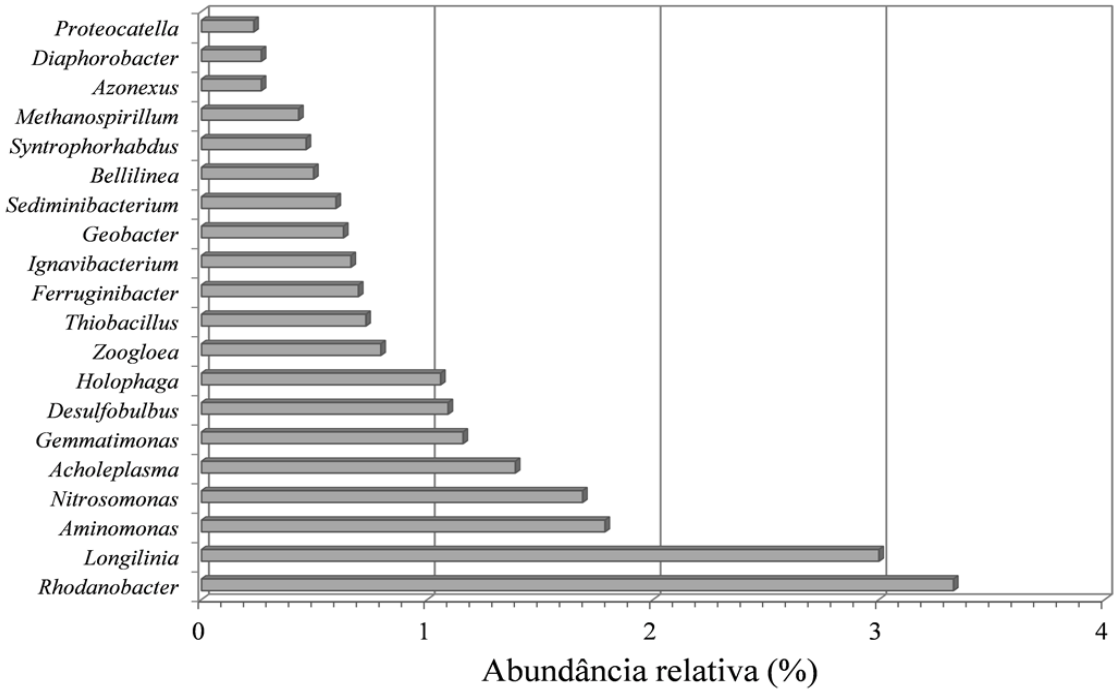

Figura 5.48 – Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na biomassa do Separador de fases da Etapa IV (similaridade 97%)

Entre esses 20 gêneros, 12 foram relacionados com representantes de ambiente anaeróbio facultativo ou estrito, 7 com bactérias aeróbias ou facultativas, e um possui representantes, tanto aeróbio, como anaeróbio (Tabela 5.36). Com exceção dos gêneros *Proteocatella* e *Rhodanobacter*, todos os demais são gram negativos. O único gênero com representantes capazes de formar endósporo é *Proteocatella*. Todos os gêneros listados na Tabela 5.36 foram observados em amostras ambientais como lodos de estações de tratamento.

Entre os representantes aeróbios, os mais abundantes foram *Rhodanobacter* (3,3%), *Gemmatimonas* (1,1%) e *Diaphorobacter* (0,2%). Tais microrganismos podem ter sido favorecidos pela troca gasosa que ocorreu no separador de fases, bem como, as bactérias semelhantes a *Azonexus* (0,2%) e *Zooglea* (0,7%) que são microaerofílicas e anaeróbias facultativas.

Alguns gêneros com menor abundância podem ter sido favorecidos pelo meio nutricional (substrato sintético), bem como, por metabólitos de outros microrganismos presente no reator, como é o caso do gênero *Azonexus* (0,2%), que podem utilizar, tanto o N_2 da atmosfera como ácidos orgânicos (ácido succínico, propiônico e acético) e etanol como fonte de carbono (REINHOLD-HUREK, 2006) .

Bactérias semelhantes à *Azonexus* foram identificadas, tanto no material suporte, como no separador de fases da Etapa IV. Chou et al. (2008) citam que os microrganismos pertencentes a este gênero possuem oxidação positiva para Tween 20 e Tween 40, dois surfactantes não iônicos.

Bactérias semelhantes a *Zooglea* (0,7%) também foram identificadas no separador de fase. Tais células são capazes de se manterem em condição de escassez de oxigênio, e podem utilizar nitrato como receptor final de elétrons ao invés do oxigênio (BRENNER et al., 2005). O nitrato, como receptor de elétrons, é oriundo dos compostos nitrogenados da água residuária de lavanderia adicionada ao substrato sintético.

A quarta maior abundância relativa da amostra da biomassa do separador de fases da etapa IV foi atribuída a *Nitrosomonas* (1,7%). A presença desse gênero poderia estar relacionada com a degradação de compostos aromáticos, uma vez que *N. europeae* é capaz de degradar tolueno e alquilbenzenos (KEENER; ARP, 1994). Todavia, Brandt et al. (2001) não observaram degradação de LAS em cultura de *N. europeae*, além da cessação do crescimento em 15 $mg.L^{-1}$ do surfactante.

Representantes do gênero *Nitrosomonas* caracterizam-se por realizar oxidação de amônio a nitrito, mediante reação que consome alcalinidade do meio. A média de N-amoniacal na água residuária de lavanderia foi 10,2±6 $mg.L^{-1}$ e verificou-se presença de nitrito no efluente.

Desulfobulbus (1,1%) utilizam ácidos orgânicos e álcoois como doadores de elétrons (BRENNER et al., 2005). Estes compostos podem ter sido provenientes da degradação das cadeias alquílicas do surfactante LAS.

O substrato sintético contendo extrato de levedura e sacarose favoreceu bactérias semelhantes a *Longilinea* (3%), *Amminomonas* (1,8%), *Gemmatimonas* (1,1%), *Bellilinea* (0,5%), *Diaphorobacter* (0,3%) e *Proteocatella* (0,2%), uma vez que os microrganismos pertencentes a estes gêneros possuem o crescimento estimulado quando submetidos a essa condição nutricional (HESPELL et al., 1977; BAENA et al. 1999; JANSSEN et al., 1999; BRENNER et al., 2005; YAMADA et al., 2006; YAMADA et al, 2007; PIKUTA et al., 2009; KRIEG et al., 2010; OKADA, 2012).

Os microrganismos do gênero *Acholeplasma* (1,4%) são anaeróbios facultativos e quimiotróficos. Este gênero foi encontrado em estudos sobre diversidade microbiana de reator de leito granular expandido com altas cargas de sulfato e nitrato no tratamento de águas residuárias salobras (LIAO et al., 2013) e em estudos de diversidade microbiana em reatores termofílicos anaeróbios (WAGNER; WIEGEL, 2008). Estes microrganismos utilizam a glicose, galactose e frutose como doadores de elétron para a síntese de carboidratos. São capazes de fermentar piruvato em lactato e acetato, bem como, capazes de metabolizar vários açúcares e aminoácidos como fonte de carbono (LAZAREV et al., 2011), o que torna estes microrganismo com metabolismo muito versátil, capaz de utilizar subprodutos e metabólitos de outros microrganismos. Este gênero foi observado apenas na biomassa do separador de fases da Etapa IV (com sacarose), a presença do co-substrato e o ambiente facultativo do separador de fases podem ter favorecidos os representantes desse gênero.

Neste estudo foi observado o gênero *Holophaga* na biomassa de todas as amostras do reator, porém a maior abundância relativa foi na biomassa do separador de fases da etapa IV (1%). As bactérias da classe Holophagae são bacilos, Gram negativos anaeróbios, mesofílicos e quimio-organotróficos e podem fermentar trimetoxibenzoatos e trihidroxibenzenos em acetato (KRIEG et al., 2010). Estes microrganismos podem utilizar compostos metilados aromáticos, citrato e piruvato na respiração anaeróbia e fermentação homoacetogênica (LIESACK et al., 1994; COATES et al., 1999). Representantes deste gênero são capazes de degradar ácido pirúvico e compostos aromáticos em acetato, bem como, utilizar compostos húmicos na respiração e fermentação (GILBRIDE et al., 2004). O gênero *Holophaga* já foi observado em estudos de tratamento de água residuária contendo LAS padrão, LAS de água de lavanderia e LAE (OLIVEIRA et al., 2009; OKADA, 2012; MOTTERAN, 2013). O grupo aromático do LAS, os sub-produtos de degradação dessa molécula, bem como, a complexa água residuária utilizada podem ter favorecido a manutenção dos representantes desse gênero.

Sequências semelhantes à *Ignavibacterium* foram identificadas na biomassa da areia (0,45%) e separador de fase (0,66%) da Etapa IV (com sacarose). Microrganismos pertencentes à este gênero possuem metabolismo versátil, podem utilizar álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos, diversos açúcares, como a sacarose, e até mesmo compostos tóxicos como fonte de carbono (WEAVER et al., 1975; KIM et al., 2004; LINO et al., 2010; LIU et al., 2013). A adição de extrato de levedura pode ter favorecido este gênero pois esse substrato fornece micronutrientes, aminoácidos e vitaminas além dos nutrientes necessários para manter a atividade de degradação do LAS (KHLEIFAT, 2006; ABBOUD et al., 2007). O surfactante e

demais compostos da água residuária (ex. etanol 100,5±117,2 $mg.L^{-1}$) podem também, ter sido fontes de carbono para os representantes desse gênero.

Dois gêneros foram relacionados à bactérias acumuladoras de fósforo: *Cloacibacterium* (0,07%) e *Thiovirga* (0,1%) (ITO et al., 2005; ALLEN, 2006; CERQUEIRA et al., 2012). Nessa etapa de operação (Etapa IV) foi verificada a maior concentração efluente de fosfato (11,74±3,2 $mg.L^{-1}$) para 16,03±7,7 $mg.L^{-1}$ afluente.

Entre os 20 gêneros com maior abundância relativa no separador de fases da Etapa IV do RALF, nove deles possuem representantes relacionados com a degradação de compostos aromáticos podendo estar relacionados com a degradação do LAS. Por exemplo, representantes dos gêneros *Gemmatimonas*, *Geobacter*, *Holophaga*, *Rhodanobacter*, *Syntrophorhabdus* e *Zoogloea* são capazes de degradar fenol, tolueno, benzaldeído, hidroxi-, metoxi- e benzoatos (BRENNER et al., 2005; GILBRIDE et al., 2004; KRIEG et al., 2010).

Além disso, foram encontrados gêneros capazes de degradar outros compostos aromáticos, tais como, aminobenzoato (*Desulfobulbus*), benzeno, etil-benzeno e tolueno (*Nitrossomonas*) e naftilfosfato e nitro-fenil-galactopiranosida (*Ferruginibacter*) (BRENNER et al., 2005; LIM et al., 2009).

Bactérias similares a *Geobacter* foram identificadas, tanto na amostra da areia, como do separador de fases da etapa IV. Os representantes deste gênero diferenciam-se de todas as outras bactérias estritamente anaeróbias, tanto fenotipica, quanto genotipicamente, uma vez que, as espécies deste gênero são as primeiras redutoras de Fe(III) que realizam oxidação dissimilatória completa. Também, são os únicos microrganismos descritos capazes de acoplar a oxidação de compostos monoaromáticos, incluindo tolueno, à redução de Fe(III) (KUEVER et al., 2005).

Bactérias do gênero *Geobacter* têm sido encontradas na presença de PCE (tetracloroetileno) e TCE (tricloroetileno) (DUHAMEL; EDWARDS, 2006). Dentre os metais pesados analisados na água residuária de lavanderia, observou-se maiores concentrações de ferro (0,22±0,22 $mg.L^{-1}$), o que pode ter favorecido na seleção deste gênero na biomassa do reator. Representantes deste gênero já foram observados em outros estudos de tratamento de água residuária contendo LAS (CAROSIA, 2011; DELFORNO et al., 2012; FERREIRA, 2012; OKADA, 2012).

Tabela 5.36 – Descrição dos 20 gêneros de maior abundância relativa na biomassado separador de fases (Etapa IV) do RALF (similaridade 97%)

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Acholeplasma			Anaeróbia facultativa	Trato digestivo de animais, EGSB tratando esgoto com altas concentrações de sulfato e nitrato	Angulo et al. (2000); Liao et al. (2013)
Aminomonas	-	-	Anaeróbia estrita	Lagoa anaeróbia de estação de tratamento	Baena et al. (1999)
Azonexus	-	-	Aeróbia/ Microaerófila (fixam N2)	Lodo aeróbio de estação de tratamento em Daejeon Coréia do Sul	Brenner et al. (2005); Okada (2012); Quan et al. (2006); Reinhold-Hurek (2006)
Bellilinea	-	-	Anaeróbia estrita	Lodo de reator, solo de plantaçao de arroz	Brenner et al. (2005); Yamada et al. (2007)
Desulfobulbus	-	-	Anaeróbia estrita	Regiões anóxicas de água doce, água salobra, habitats marinhos; conteúdo ruminal, esterco animal e lodo de esgoto.	Brenner et al. (2005); Okada (2012)
Diaphorobacter	-		Aeróbia e anaeróbia	Solo de plantação de arroz, lodos ativados	Khan; Hiraishi (2002); Pham (2009)

continua...

continuação...

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Ferruginibacter	-	-	Aeróbia obrigatória	Sedimento de água doce; solo de jardim; RLF tratando LAS	Lim et al. (2009); Oliveira et al. (2013); Xie et al. (2006)
Gemmatimonas	-	-	Aeróbia	Lodos ativados em condição de remoção de fósforo; solo	Davis et al. (2005); Hugenholtz et al. (2001); Joseph et al. (2003); Liu et al., 2001)
Geobacter	-	-	Anaeróbia estrita	UASB (LAS)	Brenner et al. (2005); Okada (2012)
Holophaga	-	-	Anaeróbia	Lodo anóxicos de rios, sistemas de tratamento de fabrica de papel	Krieg et al. (2010); Oliveira et al. (2009); Okada (2012)
Ignavibacterium	-	-	Anaeróbia	Águas termais, reator de leito fixo (anamox)	Lino et al. (2010); Okamoto et al. (2013)
Longilinea	-	-	Anaeróbia estrita	Lodos de reatores anaeróbios e solos (arroz)	Yamada et al. (2006)
Methanospirillum	-		Anaeróbia estrita	Estações de tratamento de efluentes	Patel (1976)
Nitrosomonas	-		Anaeróbia facultativa	Estações de tratamento de esgoto, águas eutrofizadas, solos e rios.	Brenner et al. (2005)

continua...

conclusão...

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Proteocatella	+	+	Anaeróbia	RALF e EGSB	Bialek et al. (2012); Pikuta et al., (2009)
Rhodanobacter	+	-	Aeróbia	Lodos ativados tratando nonilfenol etoxilados, UASB (LAS)	Brenner et al. (2005); Okada (2012); Zhang et al. (2012)
Sediminibacterium	-		Anaeróbia	RALF (LAS)	Carosia (2011); Hang et al. (2008); Oliveira (2010)
Syntrophorhabdus	-	-	Anaeróbia	UASB (fenol)	Gilbride et al. (2004); Qiu et al. (2008)
Thiobacillus	-		Aeróbia Facultativa	Ambientes marinhos, rios e solos, estações de tratamento de efluentes, sedimentos anaeróbios	Kelly et al. (1990)
Zoogloea	-	-	Aeróbia (O2) e anóxica (NO3)	Águas poluídas, estações de tratamento, UASB (LAS)	Brenner et al. (2005); Okada (2012)

Endósp. = endósporo.

5.2.16.8 – Gêneros da biomassa da areia (Etapa V)

Para os 20 gêneros com maior frequência obtidos para a biomassa da areia (Etapa V) foi observada abundância relativa entre 0,3% (*Diaphorobacter*) a 25,5% (*Gemmatimonas*) como pode ser observado na Figura 5.49.

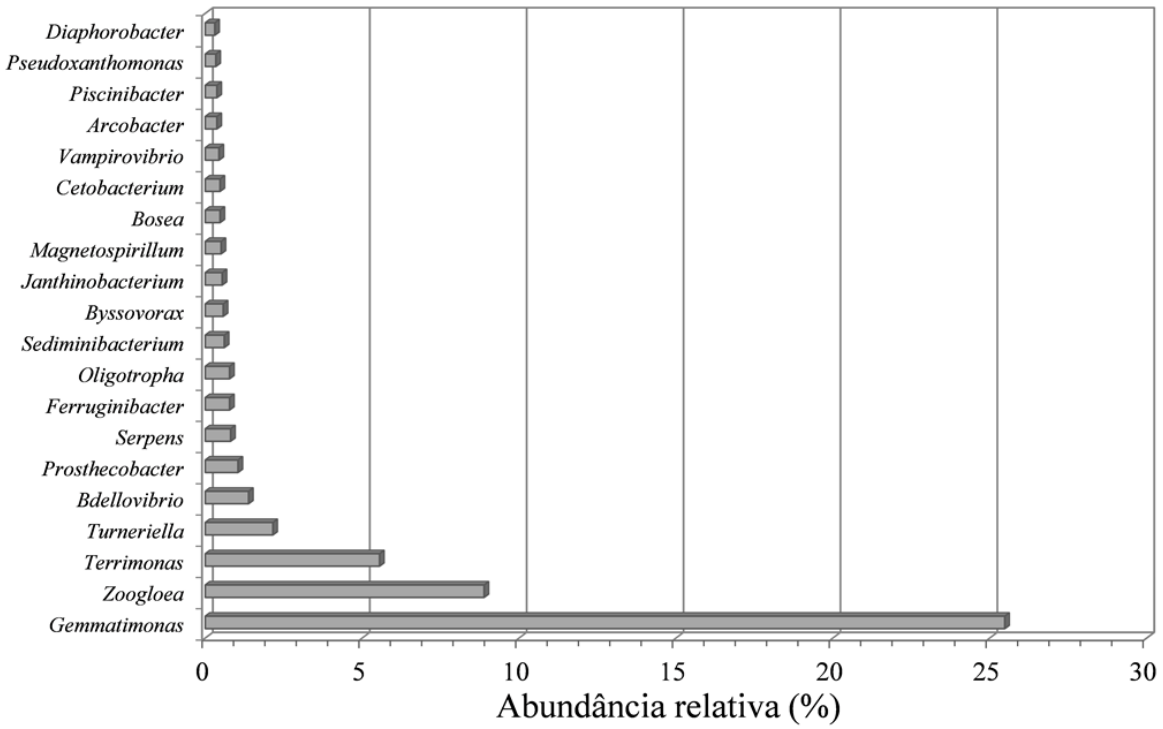

Figura 5.49 – Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na biomassa da areia da Etapa V (similaridade 97%)

Entre esses 20 gêneros, dois foram relacionados com representantes de ambiente anaeróbio facultativo ou estrito, 17 com bactérias aeróbias, microaeróbias ou facultativas, e um possui representantes, tanto aeróbio, como anaeróbio. Todos os gêneros são gram negativos e sete gêneros possuem representantes capazes de formar endósporo (Tabela 5.37). Com exceção de *Serpens*, todos os gêneros listados na Tabela 5.37, já foram observados em amostras relacionadas a estações de tratamento.

Entre os gêneros identificados na amostra da areia da última etapa (Etapa V) os mais abundantes foram *Gemmatimonas* (25,5%), *Zoogloea* (8,9%) e *Terrimonas* (5,5%). *Gemmatimonas* e *Zoogloea* foram relacionados com a degradação de LAS, devido sua

capacidade de degradar benzoato (KRIEG et al., 2010) e de meta clivagem de anel aromático de benzeno (BRENNER et al., 2005), respectivamente.

Quatro gêneros foram considerados capazes de utilizar o extrato de levedura para o seu metabolismo, *Gemmatimonas* (25,5%), *Serpens* (0,8%), *Byssovorax* (0,5%) e *Diaphorobacter* (0,3%) (BRENNER et al., 2005; PHAM, 2009; KRIEG et al., 2010).

Cinco gêneros foram relacionados com a degradação de LAS por serem capazes de degradar compostos aromáticos como fenol (*Zoogloea* e *Magnetospirillum*), tolueno (*Bdellovibrio* e *Zoogloea*), metoxi e hidroxi-benzoato (*Gemmatimonas* e *Zoogloea*), naftilphosphate e nitro-fenil-galactopiranosida (*Ferruginibacter*) e naftaleno, benzeno, etil benzeno, e xileno (*Bdellovibrio*) (BRENNER et al., 2005; LIM et al., 2009; KRIEG et al., 2010).

Representantes semelhantes a *Oligotropha* (0,8%) são considerados aeróbios, mas podem utilizar monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrogênio para o crescimento autotrófico (DEBARATI *et al*., 2008). Segundo Malik et al. (2005), tais bactérias podem ter seu metabolismo alterado quando submetidos a surfactantes aniônicos como o LAS.

Bactérias semelhantes a *Magnetospirillum* (0,5%) são microaerófilas, quimiorganotróficas, não fermentam carboidratos, entretanto, utilizam ácidos orgânicos como malato, succinato, fumarato, lactato, oxalacetato como fonte de carbono (SCHLEIFER et al., 1991). A variedade de ácidos orgânicos durante a operação do reator pode ter favorecido esse grupo.

Bactérias similares a *Bosea* (0,5%) foram identificadas na biomassa da areia da Etapa V (sem sacarose). São microaeróbias e capazes de degradar sacarose. Segundo Das et al. (1996), microrganismos semelhantes a este gênero podem se manter sob condição anaeróbia na presença de ácidos orgânicos como málico e succínico. Nessa etapa de operação foram observados ácido málico (4,55±1,8 $mg.L^{-1}$) e ácido succínico (2,21±0,3 $mg.L^{-1}$) no efluente do reator. *Bosea* também está relacionada com a redução de sulfato a sulfeto (BRENNER et al., 2005). A presença desse gênero foi corroborada pela maior concentração de sulfato no afluente do RALF na Etapa V (16±20,2 $mg.L^{-1}$).

Cetobacterium (0,5%) foi citado por Finegold et al., (2003) como degradadores de polietilenoglicóis, subprodutos da degradação de surfactantes não iônico (álcool linear etoxilado). Nonil fenol etoxilado e tetrametil butil fenóxi etoxilado, ambos surfactantes não iônicos, estavam presentes na água de lavanderia, os subprodutos da degradação desses compostos podem ter favorecidos os representantes deste gênero.

Bactérias semelhantes a *Vampirovibrio* (4,4%) também foram identificadas neste estudo. De acordo Brenner et al. (2005) espécies desse gênero já foram identificadas em biomassa de água de abastecimento e em útero de suíno. No caso especifico deste trabalho, provavelmente, faziam parte da composição da biomassa usada como inóculo e proveniente de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura (Tabela 5.37).

Tabela 5.37 – Descrição dos 20 gêneros de maior abundância relativa na biomassa da areia (Etapa V) do RALF (similaridade 97%)

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Arcobacter	-	-	Aeróbia/ Microaeróbia	Reservatórios de água, esgoto e ambientes salinos	Brenner et al. (2005)
Bdellovibrio	-		Aerobia	Solo, esgoto, água doce, bioreator (BETX)	Brenner et al. (2005)
Bosea	-	-	Aeróbia e microaeróbia	Reatores anaeróbios (UASB) no tratamento de esgotos, solos cultivados	Brenner et al. (2005); Das et al. (1996)
Byssovorax			Aeróbia obrigatória	Solo com plantas em decomposição, reator em batelada sequenciais (tetraciclina)	Brenner et al. (2005); Zhang et al. (2013)
Cetobacterium	-	-	Microaerofílica	Fezes, reator desnitrificante	Finegold et al. (2003); Lahav et al. (2009)
Diaphorobacter	-		Aeróbia e anaeróbia	Solo de plantação de arroz e lodos ativados	Khan; Hiraishi (2002); Pham (2009)
Ferruginibacter	-	-	Aeróbia obrigatória	Sedimento de água doce, solo, RALF (LAS)	Lim et al. (2009); Oliveira et al. (2013); Xie et al. (2006)
Gemmatimonas	-	-	Aeróbia	Lodos ativados em condição de remoção de fósforo, solo	Davis et al. (2005); Krieg et al. (2010); Liu et al. (2011)

continua...

continuação...

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Janthinobacterium	-		Aerobia	Reator (ANAMOX)	Kampfer (2008); Schmidt et al. (2002)
Magnetospirillum	-		Microaerofílica	Sedimentos, ambientes aquáticos, biorreator (tolueno)	Brenner et al. (2005); Meyer et al. (2013)
Oligotropha	-		Aeróbia	Águas residuárias e solo	Debarati et al. (2008); Malik et al., 2005
Piscinibacter	-		Aerobia facultativa	Sistema de tratamento (remoção de nitrogênio e fósforo)	Brenner et al. (2005); Kim et al. (2013)
Prosthecobacter	-		Aeróbia obrigatória	Lodos ativados	Brenner et al. (2005); Liu et al. (2005)
Pseudoxanthomonas	-		Aeróbia	Biofiltro de indústria de processamento animal	Brenner et al. (2005)
Sediminibacterium	-		Aerobia	RALF (LAS)	Oliveira et al. (2010)
Serpens	-		Anaeróbia	Sedimentos de lagoas.	Brenner et al. (2005)
Terrimonas	-	-	Aeróbia	Solo de jardim no Japão; fonte de água doce Taiwan, UASB (LAS)	Brenner et al. (2005); Okada (2012); Xie (2006)

continua...

conclusão...

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Turneriella	-		Anaeróbia obrigatória	Estação de tratamento de efluente (vala de oxidação)	Han et al. (2013)
Vampirovibrio	-			Água de abastecimentod e útero de suíno	Brenner et al. (2005)
Zoogloea	-	-	Aeróbia e anóxica (NO_3)	Águas poluídas, estações de tratamento e flocos de lodos ativados	Arvin et al. (1989); Brenner et al. (2005); Butterfield (1935); Okada 2012; Unz e Farrah (1972)

Endósp. = endósporo.

5.2.16.9 – Gêneros da biomassa do separador de fases (Etapa V)

Entre os 20 gêneros mais abundantes, quatro foram relacionados com representantes de ambiente anaeróbio facultativo ou estrito, 13 com bactérias aeróbias, microaeróbias ou facultativas. Todos os gêneros são gram negativos e um gênero possui representante capaz de formar endósporo (Tabela 5.38). Com exceção de *Byssovorax* e *Serpens*, todos os demais gêneros listados na Tabela 5.38 já foram observados em amostras ambientais como lodos de estações de tratamento.

Observou-se abundância relativa para a biomassa do separador de fases da última etapa (Etapa V) entre 0,005% e 34% (Figura 5.50). Entre os gêneros mais abundantes observou-se *Gemmatimonas* (34%), *Zoogloea* (9,2%) e *Terrimonas* (6,5%). Esses mesmos gêneros também foram identificados e mais abundantes na biomassa da areia, dessa mesma etapa de operação do reator. *Zoogloea* foi relacionada com a degradação de LAS, devido à capacidade de meta clivagem de anel aromático de benzeno (BRENNER *et al.*, 2005).

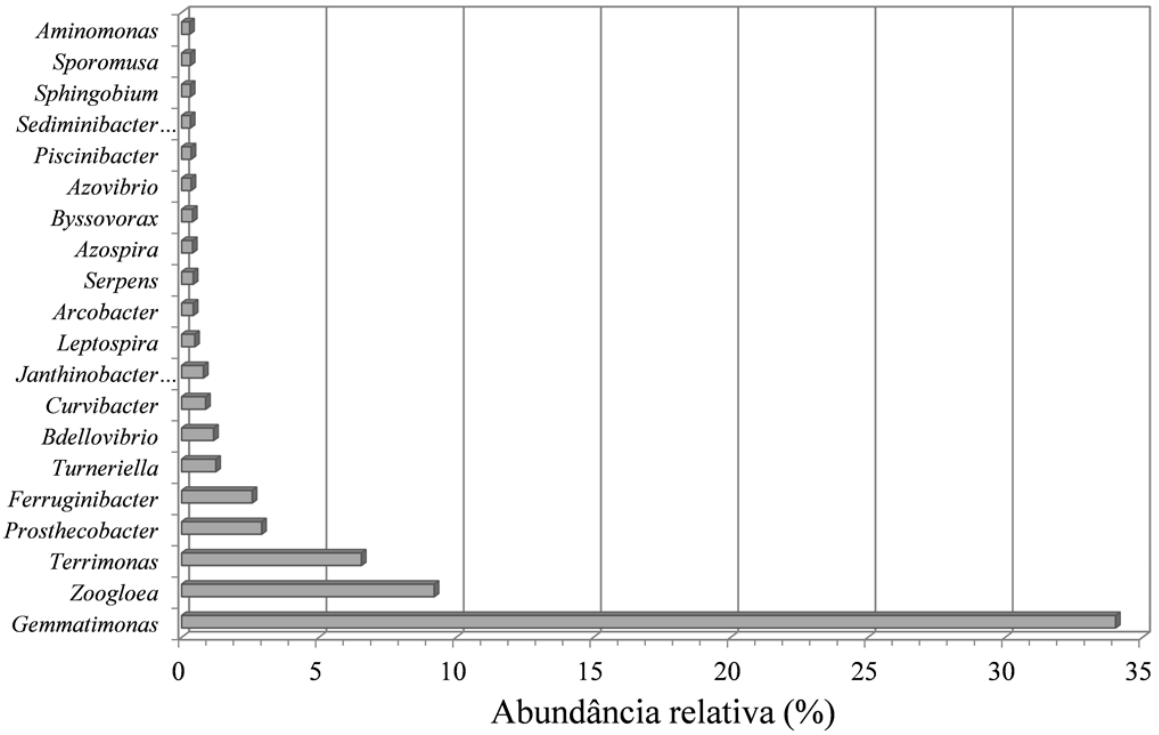

Figura 5.50 – Abundância relativa dos 20 gêneros mais frequentes na biomassa do Separador de fases da Etapa V (similaridade 97%)

Entre os 20 gêneros com maior frequência foram identificados dois deles capazes de utilizar amônia como fonte de nitrogênio (*Prosthecobacter* e *Zoogloea*) e um capaz de realizar a desnitrificação (*Zoogloea*) (BRENNER et al., 2005; KRIEG et al., 2010). Além disso, foram identificados três gêneros conhecidos por utilizar o nitrato como receptor de elétrons: *Serpens, Azospira* e *Azovibrio* com abundância relativa de 0,42%, 0,40% e 0,34%, respectivamente (BRENNER *et al*., 2005).

Espécies de *Azospira* são bacilos curvos, Gram negativos, não formadores de endósporos, com único flagelo. São heterotróficas, capazes de fixar nitrogênio e podem utilizar nitrato e perclorato como receptores de elétrons. O crescimento ocorre em temperatura ótima por volta de 37°C e pH neutro. Além disso, crescimento de espécies de *Azospira* já foi verificado em meio contendo etanol (TAN; REINHOLD-HUREK, 2003). A presença de etanol (100,5±117,2 $mg.L^{-1}$) na água residuária de lavanderia pode ter favorecido o crescimento dessas bactérias no reator.

Cinco gêneros foram considerados capazes de utilizar extrato de levedura para o seu metabolismo, *Gemmatimonas* (34%), *Serpens* (0,4%), *Byssovorax* (0,4%), *Sphingobium* (0,32%) e *Aminomonas* (0,3%) (BAENA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2001; BRENNER et al., 2005; KRIEG et al., 2010). Em todas as etapas de operação foi adicionado extrato de levedura na alimentação do reator.

Quatro gêneros foram relacionados com a degradação de carboidratos: *Terrimonas* (6,5%%), *Prosthecobacter* (2,9%%), *Janthinobacterium* (0,8%%) e *Sphingobium*(0,3%%) (TAKEUCHI et al., 2001; BRENNER et al., 2005; KAMPFER, 2008). Os gêneros *Azospira* (0,4%), *Azovibrio* (0,34%), *Sporomusa* (0,32%) e *Zoogloea* (9,2%) são capazes de consumir álcoois e ácidos orgânicos (KRIEG et al., 2010). Desse modo, tais bactérias foram favorecidas devido a composição do substrato sintético e água residuária de lavanderia.

Bactérias do gênero *Sediminibacterium* foram identificadas em todas as amostras do reator, sendo que a abundância relativa para o separador de fases de Etapa V foi 0,3%. São bacilos Gram negativos. Oliveira et al. (2010) e Carosia (2011) identificaram clones semelhantes à *Sediminibacterium* sp., em reator anaeróbio de leito fluidificado usado na remoção de LAS padrão e oriundo de detergente em pó, respectivamente. Embora, o metabolismos dessa espécie ainda seja pouco conhecido, sua presença em reator anaeróbio com água de lavanderia sugere que pode estar associada as vias de degradação do surfactante ou da digestão anaeróbia de outros compostos.

Na amostra do separador de fases da Etapa V, foi observado um gênero relacionado à bactérias acumuladoras de fósforo, *Aquabacterium* (0,05%). Nessa etapa de operação foi observado 4,82±3,1mg.L^{-1} e 6,47±2,7 mg. L^{-1} de fosfato afluente e efluente, respectivamente.

Tabela 5.38 – Descrição dos 20 gêneros de maior abundância relativa na biomassa do separador de fases (Etapa V) do RALF (similaridade 97%)

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Aminomonas	-	-	Anaeróbia estrita	Lagoa anaeróbia de estação de tratamento	Baena et al. (1999)
Arcobacter	-	-	Aeróbia/ Microaeróbia	Reservatórios de água, esgoto e ambientes salinos	Brenner et al. (2005)
Azospira	-		Aeróbia, microaerofílica quando fixando N_2	Isolado de raízes (*Oryza officinalis, O. minuta, O. sativa*.) e raíz de arroz	Brenner et al. (2005)
Azovibrio	-		Microaerofílica	Raízes e em escleródios dos fungos encontrados em solo em que foi cultivado arroz	Brenner et al. (2005)
Bdellovibrio	-		Aeróbia	Solo, esgoto, água doce e bioreator (BETX)	Brenner et al. (2005)
Byssovorax			Aeróbia obrigatória	Solo com planta em decomposição	Brenner et al. (2005); Reichenbach (2006)
Curvibacter	-		Aeróbia/ Microaerófila	Reator de leito fixo (remoção de perclorato)	Xu et al. (2012)

continua...

continuação...

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Ferruginibacter	-	-	Aeróbia obrigatória	Sedimento de água doce, solo e RALF (LAS)	Lim et al. (2009); Oliveira et al. (2013); Xie et al. (2006)
Gemmatimonas	-	-	Aeróbia	Lodos ativados (remoção de fósforo) e solo.	Davis et al. (2005); Hugenholtz et al. (2001); Krieg et al. (2010)
Janthinobacterium	-		Aeróbia	UASB (anamox)	Kampfer (2008); Viancelli et al. (2011)
Leptospira	-		Aeróbia	Lodos ativados	Hougen (1979); You et al. (2002)
Oligotropha	-		Aeróbia	Águas residuárias e solo	Debarati et al., 2008; Malik et al., 2005
Piscinibacter	-		Aeróbia facultativa	Sistema de tratamento (remoção de nitrogênio e fósforo)	Brenner et al. (2005); Kim et al. (2013)
Prosthecobacter	-		Aeróbia obrigatória	UASB (LAS)	Brenner et al. (2005); Okada (2012)
Sediminibacterium	-		Aeróbia	RALF (LAS)	Carosia (2011); Hang et al. (2008)
Serpens	-		Anaeróbia	Sedimentos de lagoas	Brenner et al. (2005)
Sphingobium	-	-	Aeróbia	Solos contaminados e biorreatores (pentaclorofenóis)	Takeuchi *et al*. (2001); Zilouei et al. (2008); Chen et al., (2013)

continua...

conclusão...

Gênero	GRAM	Endósp.	Condição	Ocorrência	Referência
Sporomusa	-	+	Anaeróbia e aerotolerante	Ambientes anóxicos e águas residuárias de refinaria de beterraba e de destilaria	Vos et al. (2009); Delforno et al. (2012); Okada 2012
Terrimonas	-	-	Aeróbia	Solo de jardim Japão e UASB (LAS)	Brenner et al. (2005); Xie, (2006); Okada (2012)
Turneriella	-		Anaeróbia obrigatória	Estação de tratamento de efluente (vala de oxidação)	Han et al. (2013)
Zoogloea	-	-	Aeróbia e anóxica (NO_3)	Águas poluídas, estações de tratamento e UASB (LAS)	Brenner et al. (2005); Okada (2012)

Endósp. = endósporo.

Seis gêneros foram relacionados com a degradação de LAS por serem capazes de degradar compostos aromáticos como fenol (*Zoogloea*), tolueno (*Bdellovibrio* e *Zoogloea*), metoxi e hidroxi-benzoato (*Gemmatimonas*, *Sporomusa* e *Zoogloea*), naftilphosphate e nitro-fenil-galactopiranosida (*Ferruginibacter*) e naftaleno, benzeno, etil benzeno, xileno (*Bdellovibrio*) e hexaclorocicloexano (*Sphingobium*) (TAKEUCHI et al., 2001; BRENNER et al., 2005; LIM et al., 2009; KRIEG et al., 2010).

As diferenças na comunidade microbiana da areia e do separador de fases em ambas as etapas operacionais do reator (IV e V) deveram-se as condições de tais locais, que favoreceram algumas espécies em detrimento de outras. A seleção dos organismos está associada as peculiaridades metabólicas de cada grupo, e, nesse caso, ocorreu provavelmente devido a capacidade de se fixar em material suporte, competição entre os grupos, bem como, a possível diferença do potencial redox de cada local amostrado.

5.2.16.10 – Gêneros relacionados com a degradação de LAS

Neste trabalho identificou-se 24 gêneros relacionados com a degradação de LAS (Tabela 5.39). Desse modo, a importância de consórcios microbianos para a degradação do surfactante (JIMENEZ et al., 1991; KHLEIFAT, 2006). Atribuiu-se a necessidade de consórcios microbianos à complexidade das reações necessárias para a degradação de LAS, que envolvem quebra de anel aromático e reações de dessulfonação, β e ω-oxidação. Entre os gêneros identificados, apenas espécies de *Clostridium* e *Synergistes* podem realizar a dessulfonação e β-oxidação, respectivamente.

Tabela 5.39 – Descrição e abundância relativa (%) de gêneros capazes de degradação de compostos aromáticos

Gênero	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	Degradam	Referência
Bdellovibrio	0,57	0,10	1,38	1,17	Naftaleno, benzeno, tolueno, etil benzeno exileno	Brenner et al. (2005)
Clostridium	-	0,07	-	-	Metoxie hidroxi-benzoato	Hsu et al. (1990)
Dechloromonas	1,41	-	-	-	Tolueno, metoxi e hidroxi-benzoato	Brenner et al. (2005)
Desulfobulbus	58,50	1,09	-	0,05	p-aminobenzoato	Brenner et al. (2005)
Desulfosporomusa	-	-	-	0,08	Compostos aromáticos metoxilado	Sass et al. (2004)
Ferruginibacter	0,15	0,69	0,77	2,57	Naftilfosfato, naftol-fosfato, nitro-fenil-galactopiranosida	Lim et al. (2004)
Gemmatimonas	1,98	1,16	25,5	34,02	Metoxi e hidroxi-benzoato	Krieg et al. (2010)
Geobacter	1,26	0,63	0,10	-	Fenol	Brenner et al. (2005)
Holophaga	0,27	1,06	0,13	0,05	Metoxi e hidroxi-benzoato	Krieg et al. (2010)
Magnetospirillum	0,00	0,13	0,50	0,13	Fenol	Brenner et al. (2005)
Nitrosomonas	0,81	1,69	-	-	Benzeno, etil-benzeno, tolueno	Brenner et al. (2005)
Phenylobacterium	-	-	0,17	0,05	Cloridazon, antipirina, piramidon, fenilalanina	Brenner et al. (2005)

continua...

continuação...

Gênero	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	Degradam	Referência
Propionivibrio	-	-	-	0,05	Compostos Hidroaromáticos	Zemb et al. (2011)
Rhodanobacter	-	3,34	-	-	Metoxi e hidroxi-benzoato	Brenner et al. (2005)
Schlesneria	-	-	-	0,05	Condroitina sulfato	Kulichevskaya (2007)
Sedimentibacter	-	0,17	-	-	Fenol, metoxi e hidroxi-benzoato	Lara-Martin et al. (2007)
Shinella	0,12	-	-	-	Metil sulfolane	Lin (2009)
Sphingobium	-	-	0,13	0,32	Hexaclorociclohexano	Chen et al. (2013)
Sphingopyxis	0,09	-	0,30	0,05	Tweens 20, 40, 60 e 80	Kim et al. (2005)
Sporomusa	-	0,10	0,13	0,32	Metoxi e hidroxi-benzoato	Vos et al. (2009)
Sulfuritalea	-	-	-	0,05	Compostos sulfurosos	Kojima; Fukui (2011)
Synergistes	-	0,07	-	-	Hidroxi-piridona	Kumar et al. (2010)
Syntrophorhabdus	-	0,46	-	-	Fenol, hidroxi-benzoato	Gilbride et al. (2004)
Zoogloea	5,23	0,79	8,89	9,20	Fenol, Tolueno, metoxi e hidroxi-benzoato	Brenner et al. (2005)

Na biomassa da areia, observou-se abundância relativa entre 0,12 e 58,5% de gêneros relacionados com a degradação de LAS, sendo que 0,24% (Etapa V) e 60% (Etapa IV) da abundância relativa corresponderam a gêneros anaeróbios, 2,23% (Etapa V) anaeróbios facultativos e, em torno de 8% (Etapa IV) e 37,5% (Etapa V), corresponderam a gêneros aeróbios (Figura 5.51).

Na biomassa do separador de fases, observou-se abundância relativa entre 0,05 e 34% de gêneros relacionados com a degradação de LAS, sendo que 0,5% (Etapa V) e 2,6% (Etapa

IV) da abundância relativa corresponderam a gêneros anaeróbios, 0,11% (Etapa V) e 1,7% (Etapa IV) anaeróbios facultativos e, em torno de 6,22% (Etapa IV) e 47,5% (Etapa V), corresponderam a gêneros aeróbios (Figura 5.51).

A condição anaeróbia facultativa do separador de fases foi fundamental para a remoção de LAS observada (39-75%), em virtude do consórcio de gêneros aeróbios e anaeróbios identificados no reator. Entre aqueles relacionados com a degradação de LAS, foram identificados gêneros aeróbios ou microaerófilos (abundância relativa: 6,2-47,5%), anaeróbios ou anaeróbios estritos (abundância relativa: 0,24-60%) e gêneros anaeróbios facultativos (abundância relativa: 0,11-2,23%) (Figura 5.51).

Segundo Okada (2012) algumas das reações envolvidas na degradação de LAS requerem condição aeróbia (ω-oxidação), enquanto, outras podem ocorrer em condição aeróbia ou anaeróbia (degradação de compostos aromáticos, dessulfonação, β-oxidação).

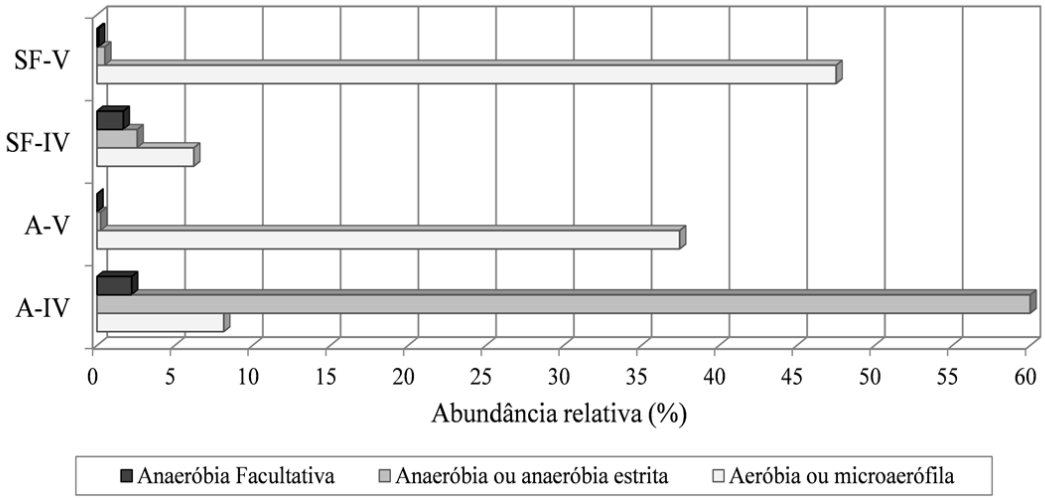

Figura 5.51 – Condição dos gêneros relacionados com a degradação de LAS, segundo a abundância relativa nas amostras da areia (A) e separador de fases (SF) das Etapas IV e V

Verificou-se maior eficiência de remoção de LAS (58,8±16%) na Etapa IV, quando comparada com a Etapa V (39,3±20,6%). Nessa última etapa, quando houve a retirada da sacarose da alimentação, observou-se diminuição de 8,8% na produção de ácidos orgânicos comparados à Etapa IV (com sacarose), por conseguinte, observou-se menor degradação do surfactante.

Na biomassa da Etapa IV os seguintes gêneros foram predominantes: *Desulfobulbus* (1,1-58,5%), *Zoogloea* (0,8-5,23%), *Rhodanobacter* (0-3,34%), *Gemmatimonas* (1,2-2%),*Geobacter* (0,63-1,26%), *Nitrosomonas* (0,8-1,7%) e *Dechloromonas* (0-1,4%). Na biomassa da Etapa V os gêneros mais abundantes foram: *Gemmatimonas* (25,5-34%), *Zoogloea*

(8,9-9,2%), *Bdellovibrio* (1,2-1,4%), *Ferruginibacter* (0,8-2,6%), *Sporomusa* (0,13-0,32%) e Sphingobium (0,13-0,32%).

Dentre os 92 gêneros classificados, 44 foram observados em estudos semelhantes de degradação de LAS, em reatores anaeróbios de leito fluidificado (OLIVEIRA, 2010; CAROSIA, 2011; FERREIRA, 2012), reator granulado de leito expandido (DELFORNO, 2011), UASB (OKADA, 2012) e reator horizontal de leito fixo (DUARTE, 2006) (Tabela 5.40).

Tabela 5.40 – Gêneros presentes em estudos com LAS em reatores anaeróbios

Gênero	**Duarte (2006)**	**Oliveira (2010)**	**Delforno (2011)**	**Carosia (2011)**	**Ferreira (2012)**	**Okada (2012)**
Aminomonas	X		X			X
Anaerotruncus			X			
Aquabacterium		X				
Arcobacter			X			X
Azonexus			X			X
Azospira		X	X	X		
Bdellovibrio						X
Bellilinea						X
Bosea						X
Cloacibacterium		X				
Clostridium III	X	X		X		X
Dechloromonas			X	X	X	X
Desulfobulbus						X
Diaphorobacter		X				
Ferruginibacter						X
Gemmatimonas		X				X
Geobacter			X	X	X	
Geothrix			X			
Gp6						X
Holophaga	X					X
Leptolinea						X
Leptonema						X
Levilinea						X

continua...

continuação...

Gênero	**Duarte (2006)**	**Oliveira (2010)**	**Delforno (2011)**	**Carosia (2011)**	**Ferreira (2012)**	**Okada (2012)**
Longilinea			X			X
Luteolibacter						X
Magnetospirillum		X				X
Methylomonas						X
Nitrosomonas						X
Nitrospira		X				
Phenylobacterium						X
Propionivibrio			X			
Prosthecobacter						X
Rhodanobacter						X
Roseomonas			X			
Sedimentibacter						X
Sediminibacterium					X	
Shinella			X			
Smithella				X		X
Sporomusa		X		X		X
Synergistes		X			X	X
Terrimonas			X			X
Thiobacillus						X
Thiovirga					X	
Zoogloea			X			X

As árvores filogenéticas foram construídas com as sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação de LAS e com maior abundância relativa da amostra da areia e do separador de fases das Etapas IV e V, respectivamente (Figuras 5.52 a 5.52). As sequências obtidas no Genbank relacionadas às sequências provenientes da biomassa do material suporte (areia) e do separador de fases (Etapas IV e V), respectivamente, estão listadas nas Tabelas 5.41 a 5.44.

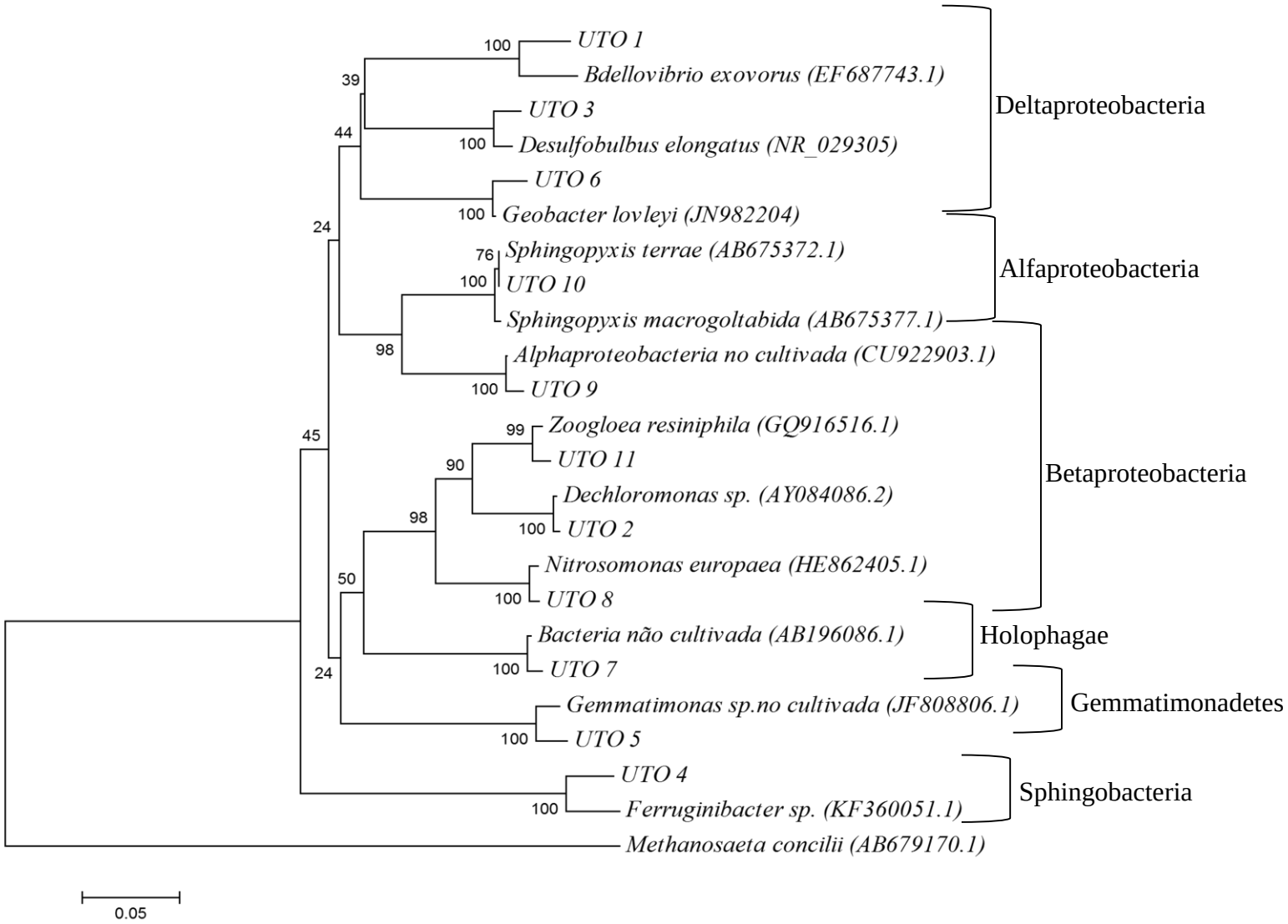

Figura 5.52 – Árvore filogenética da biomassa A-IV do RALF com as sequencias representativas das UTOs com maior abundância relativa dos gêneros responsáveis pela degradação indireta do LAS. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta concilli* foi escolhida como *outgroup*. *Bootstrap* de 1000 amostragens. Entre parênteses está o número de acesso da seqüência no *GenBank*.

Tabela 5.41 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do LAS (Amostra A-IV)

UTO	Gênero	N. Sequências	A.R. (%)	Similaridade (%)	N. Acesso	Descrição	Referência
1	*Bdellovibrio*	8	0,24	95	EF687743	*Bdellovibrio exovorus* strain JSS rRNA 16S, sequência parcial	Koval et al. (2013)
2	*Dechloromonas*	42	1,26	99	AY084086	*Dechloromonas* sp. JDS5 RRNA 16S, sequência parcial	Shrout; Parkin (não publ.)
3	*Desulfobulbus*	533	16,03	99	NR_029305	*Desulfobulbus elongatus* strain FP rRNA 16S, sequência parcial	Janssen et al. (1996)
4	*Ferruginibacter*	3	0,09	95	KF360051	*Ferruginibacter* sp. DS48-6-4 RRNA 16S, sequência parcial	Jin (2013)
5	*Gemmatimonas*	25	0,75	97	JF808806	*Gemmatimonas* sp.não cultivada clone R7-43 rRNA 16S, sequência parcial	Xia et al. (não publ.)
6	*Geobacter*	31	0,93	99	JN982204	*Geobacter lovleyi* strain Geo7.1A RRNA 16S, sequência parcial	Costanza et al. (2009)

continua...

continuação...

UTO	Gênero	N. Sequências	A.R. (%)	Similaridade (%)	N. Acesso	Descrição	Referência
7	*Holophaga*	7	0,21	100	AB196086	Bactéria não cultivada clone: TB003-100 rRNA 16S, sequência parcial,	Hoshino et al. (2006)
8	*Nitrosomonas*	23	0,69	99	HE862405	*Nitrosomonas europaea*rRNA 16S, strain ATCC 25978 sequência parcial	Pell et al. (não publ.)
9	*Shinella*	4	0,12	99	CU922903	Proteobacteria não cultivada rRNA 16S clone QEDR3AA10	Riviere et al. (2009)
10	*Sphingopyxis*	3	0,09	99	AB675372	*Sphingopyxis terrae* RRNA 16S, sequência parcial, strain BSN20.	Hotta et al. (não publ.)
				99	AB675377	*Sphingopyxis macrogoltabida* rRNA 16S, sequência parcial: BSN54	Hotta et al. (não publ.)
11	*Zoogloea*	75	2,26	99	GQ916516	*Zoogloea resiniphila* strain AOLR22 rRNA 16S, sequência parcial	Adav et al. (2010)

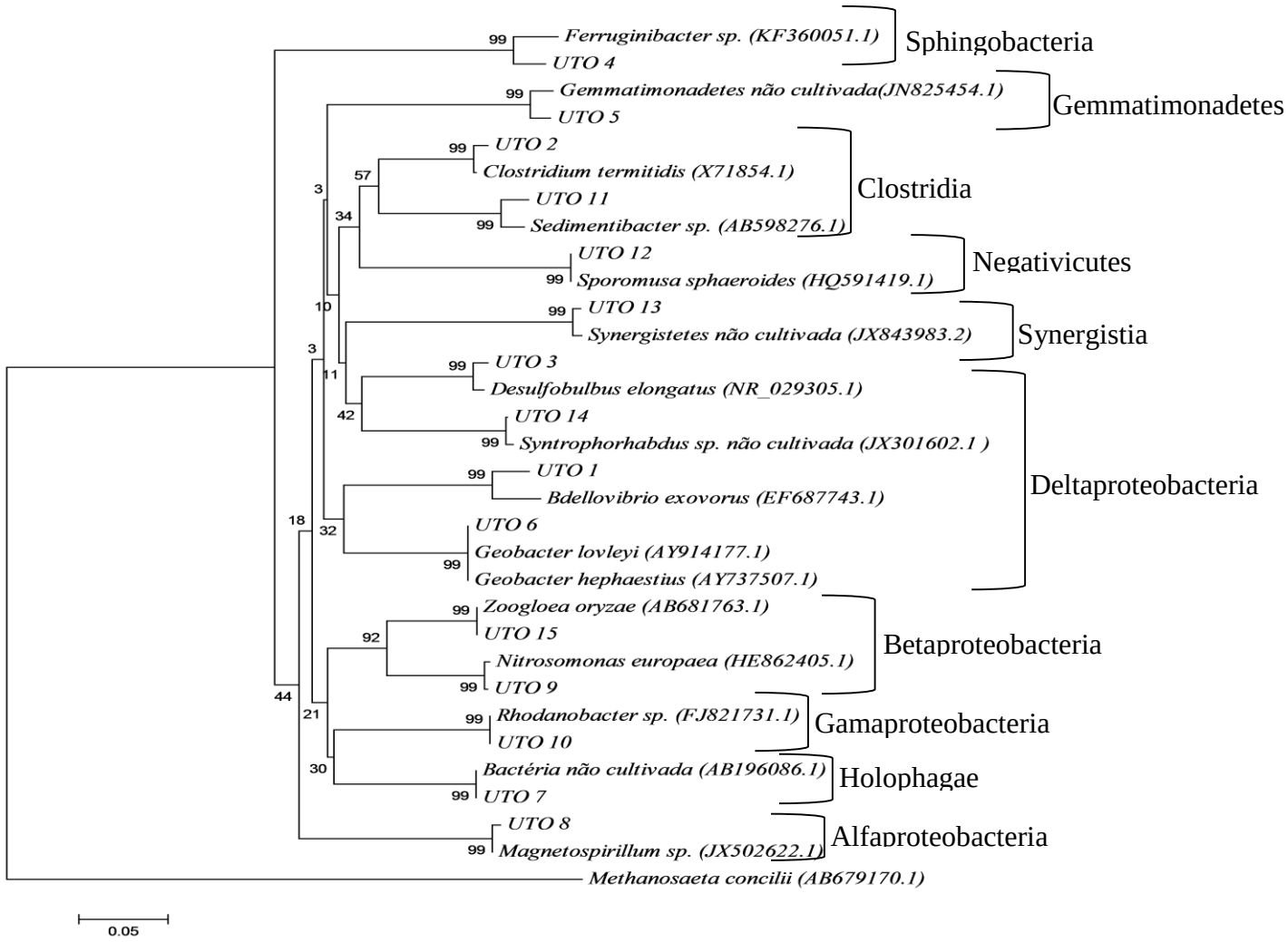

Figura 5.53 – Árvore filogenética da biomassa A-IV do RALF com as sequencias representativas das UTOs com maior abundância relativa dos gêneros responsáveis pela degradação indireta do LAS. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta concilli* foi escolhida como *outgroup*. *Bootstrap* de 1000 amostragens. Entre parênteses está o número de acesso da seqüência no *GenBank*

Tabela 5.42 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do LAS (Amostra SF-IV)

UTO	Gênero	N. Sequências	A.R. (%)	Similaridade (%)	N. Acesso	Descrição	Referência
1	*Bdellovibrio*	8	0,26	95	EF687743	*Bdellovibrio exovorus* strain JSS rRNA 16S, sequência parcial	Koval et al. (2013)
2	*Clostridium III*	2	0,07	99	X71854.1	*Clostridium termitidis* rRNA 16S sequência parcial	Rainey; Stackebrandt (1993)
3	*Desulfobulbus*	33	1,09	99	NR_029305	*Desulfobulbus elongatus* strain FP rRNA 16S, sequência parcial	Janssen et al. 1996
4	*Ferruginibacter*	21	0,69	95	KF360051	*Ferruginibacter* sp. DS48-6-4 rRNA 16S, sequência parcial	Jin (2013)
5	*Gemmatimonas*	35	1,16	96	JN825454.1	Gemmatimonadetes não cultivada clone Alchichica_AQ121B74 rRNA 16S, sequência parcial	Couradeau et al. (2011)
6	*Geobacter*	19	0,63	99	AY914177	*Geobacter lovleyi* rRNA 16S, sequência parcial	Sung et al. (2006)
				99	AY737507	*Geobacter hephaestius*rRNA 16S, sequência parcial	Janssen (não publ.)
7	*Holophaga*	32	1,06	100	AB196086	Bactéria não cultivada rRNA 16S, sequência parcial, clone: TB003-100.	Hoshino et al. (2006)

continua...

continuação...

UTO	Gênero	N. Sequências	A.R. (%)	Similaridade (%)	N. Acesso	Descrição	Referência
8	*Magnetospirillum*	4	0,13	99	JX502622.1	*Magnetospirillum* sp. SO-1 rRNA 16S, sequência parcial	Dziuba, et al. (2013)
9	*Nitrosomonas*	51	1,69	99	HE862405	*Nitrosomonas europaea* rRNA 16S, strain ATCC 25978 sequência parcial	Pell et al. (não publ.)
10	*Rhodanobacter*	101	3,34	99	FJ821731.1	*Rhodanobacter* sp. GR24-2 rRNA 16S, sequência parcial	Kim et al. (2013)
11	*Sedimentibacter*	5	0,17	97	AB598276.1	*Sedimentibacter* sp. MO-SED rRNA 16S, sequência parcial	Imachi et al. (2011)
12	*Sporomusa*	3	0,10	100	HQ591419.1	*Sporomusa sphaeroides* strain AG8-12 rRNA 16S, sequência parcial	Tarasov et al. (2011)
13	*Synergistes*	2	0,07	98	JX843983.2	Synergistetes não cultivada clone 7H-B rRNA 16S, parcial sequência.	Tomazetto; Oliveira (2013)
14	*Syntrophorhabdus*	14	0,46	99	JX301602.1	*Syntrophorhabdus* sp. não cultivada clone SR_44_(4) rRNA 16S, sequência parcial	Cardinali-Rezende et al. (não publ.)
15	*Zoogloea*	24	0,79	99	AB681763.1	*Zoogloea oryzae* rRNA 16S, sequência parcial, strain: NBRC 102407.	Nakagawa (não publ.)

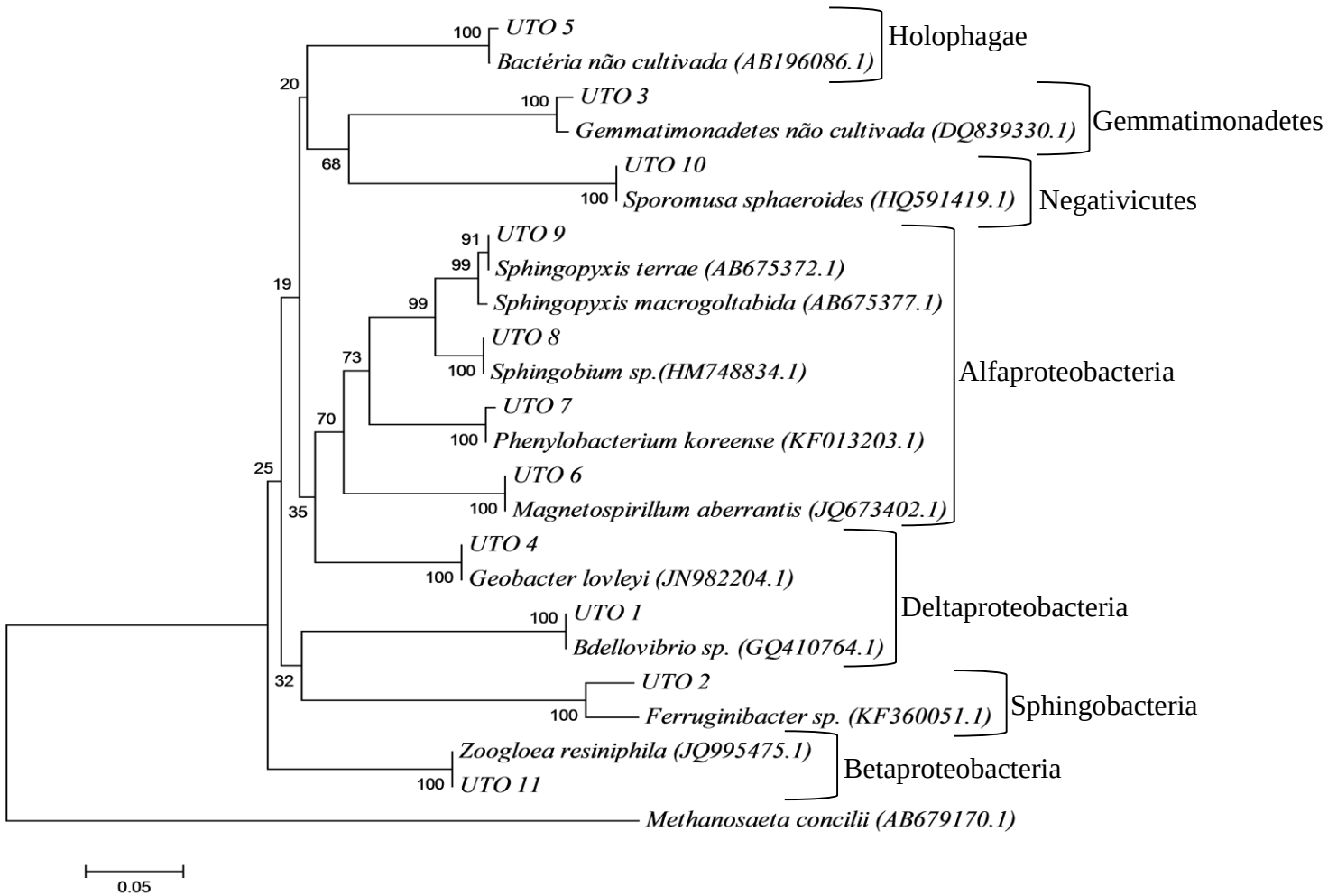

Figura 5.54– Árvore filogenética da biomassa A-IV do RALF com as sequencias representativas das UTOs com maior abundância relativa dos gêneros responsáveis pela degradação indireta do LAS. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta concilli* foi escolhida como *outgroup*. *Bootstrap* de 1000 amostragens. Entre parênteses está o número de acesso da seqüência no *GenBank*.

Tabela 5.43 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do LAS (Amostra A-V)

UTO	Gênero	N. Sequências	A.R. (%)	Similaridade (%)	N. Acesso	Descrição	Referência
1	*Bdellovibrio*	41	1,38	99	GQ410764	*Bdellovibrio* sp. TY 16S rRNA, sequência parcial	Cai et al. (não publ.)
2	*Ferruginibacter*	23	0,77	95	KF360051	*Ferruginibacter* sp. DS48-6-4 16S rRNA gene,sequência parcial	Jin (2013)
3	*Gemmatimonas*	757	25,48	97	DQ839330.1	Gemmatimonadetes não cultivada isolado BF23 16S rRNA 16S,sequência parcial	Lin et al. (1991)
4	*Geobacter*	3	0,10	99	JN982204	*Geobacter lovleyi* strain Geo7.1A RNA16S, sequência parcial	Costanza et al. (2009)
5	*Holophaga*	4	0,13	100	AB196086	Bactéria não cultivada rRNA 16S, sequência parcial,clone:TB003-100.	Hoshino et al. (2006)
6	*Magnetospirillum*	15	0,50	99	JQ673402	*Magnetospirillum aberrantis* strain SpK rRNA16S, sequência parcial	Gorlenko et al. (2011)
7	*Phenylobacterium*	5	0,17	100	KF013203	*Phenylobactéria koreense* strain SBR9 16S rRNA, sequência parcial	Moreira e Castro (não publ.)
8	*Sphingobium*	4	0,13	99	HM748834	*Sphingobium* sp. BA-3 RNA16S, sequência parcial.	Zhang et al. (2012)
9	*Sphingopyxis*	9	0,3	99	AB675377	*Sphingopyxis macrogoltabida* rRNA 16S, sequência parcial: BSN54.	Hotta et al. (não publ.)
				99	AB675372	*Sphingopyxis terrae* rRNA 16S, sequência parcial, strain:BSN20.	Hotta et al. (não publ.)
10	*Sporomusa*	4	0,13	100	HQ591419.1	*Sporomusa sphaeroides* strain AG8-12 rRNA 16S gene, sequência parcial	Tarasov et al. (2011)
11	*Zoogloea*	264	8,89	99	JQ995475	*Zoogloea resiniphila* strain ICS2 rRNA 16S, sequência parcial	Cruz *et al* (2013)

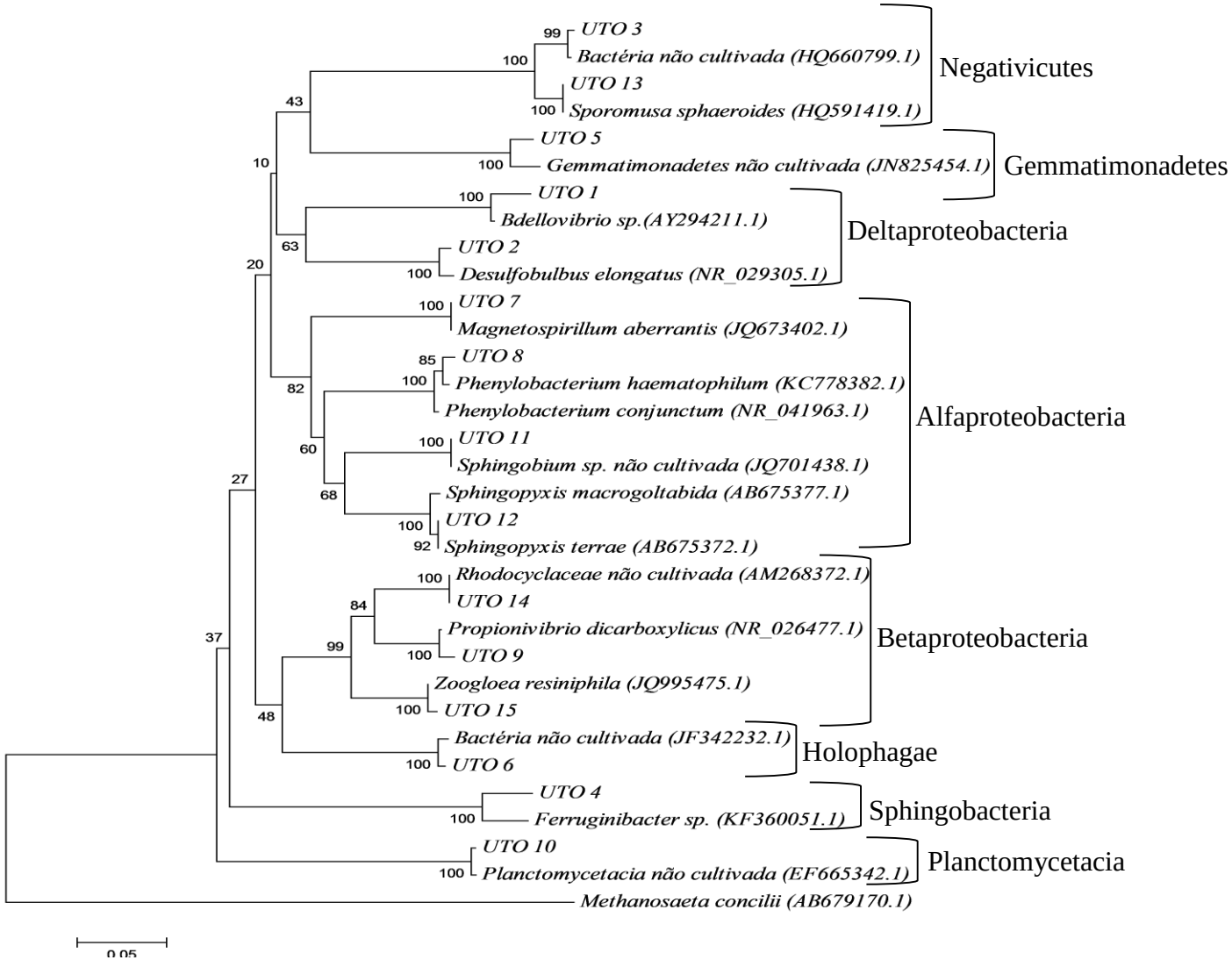

Figura 5.55 – Árvore filogenética da biomassa A-IV do RALF com as sequencias representativas das UTOs com maior abundância relativa dos gêneros responsáveis pela degradação indireta do LAS. A barra de escala informa a distância filogenética e *Methanosaeta concilli* foi escolhida como *outgroup*. *Bootstrap* de 1000 amostragens. Entre parênteses está o número de acesso da seqüência no *GenBank*

Tabela 5.44 – Sequências obtidas no *GenBank* comparadas às sequências representativas das UTOs relacionadas com a degradação do LAS (Amostra SF-V)

UTO	Gênero	N. Sequências	A.R. (%)	Similaridade (%)	N. Acesso	Descrição	Referência
1	*Bdellovibrio*	28	0,74	97	AY294211	*Bdellovibrio* sp. Ec13 rRNA 16S, sequência parcial	Davidov et al. (2004)
2	*Desulfobulbus*	897	23,79	99	NR_029305	*Desulfobulbus elongatus* strain FP rRNA 16S, sequência parcial	Janssen et al. 1996
3	*Desulfosporomusa*	3	0,08	99	HQ660799	Bactéria não cultivada clone RABS_C25 rRNA 16S, sequência parcial	Sharp et al. (não publ.)
4	*Ferruginibacter*	75	1,99	95	KF360051	*Ferruginibacter* sp. DS48-6-4 rRNA 16S, sequência parcial	Jin (2013)
5	*Gemmatimonas*	657	17,42	97	JN825454.1	Gemmatimonadetes Não cultivada clone Alchichica_AQ1_2_1B_74 RRNA 16S, sequência parcial	Couradeau et al. (2011)
6	*Holophaga*	2	0,05	99	JF342232	Não cultivada Bactéria clone 439MICCbiofilm rRNA 16S, sequência parcial	Santo Domingo et al. (2011)
7	*Magnetospirillum*	5	0,13	99	JQ673402	*Magnetospirillum aberrantis* strain SpK rRNA 16S, sequência parcial	Gorlenko et al. (2011)

continua...

continuação...

UTO	Gênero	N. Sequências	A.R. (%)	Similaridade (%)	N. Acesso	Descrição	Referência
8	*Phenylobacterium*	2	0,05	99	KC778382	*PhenyloBactéria haematophilum* strain BGB17 rRNA 16S, sequência parcial	Zhang (não publ.)
				99	NR_041963	*PhenyloBactéria conjunctum* strain FWC 21 rRNA 16S, sequência parcial	Abraham et al. (2008)
9	*Propionivibrio*	2	0,05	98	NR_026477	*Propionivibrio dicarboxylicus* strain CreMal1 rRNA 16S, sequência parcial	Hippe et al. (1999)
10	*Schlesneria*	2	0,05	99	EF665342	Planctomycetacia não cultivada clone GASP-MB2W1_F07 16S rRNA 16S, sequência parcial	Jangid et al. (2011)
11	*Sphingobium*	12	0,32	99	JQ701438	*Sphingobium* sp. não cultivada Control_3 rRNA 16S, sequência parcial	Pajares e Souza (não pub.)
12	*Sphingopyxis*	2	0,05	99	AB675377	*Sphingopyxis macrogoltabida r*RNA 16S, sequência parcial, strain: BSN54.	Hotta et al. (não publ.)
				99	AB675372	*Sphingopyxis terrae*r RNA 16S, sequência parcial: BSN20.	Hotta et al. (não pub.)
13	*Sporomusa*	12	0,32	100	HQ591419.1	*Sporomusa sphaeroides* strain AG8-12 rRNA 16S, sequência parcial	Tarasov et al. (2011)

continua...

conclusão...

UTO	Gênero	N. Sequências		Similaridade (%)	N. Acesso	Descrição	Referência
14	*Sulfuritalea*	2	0,13	100	AM268372	Rhodocyclaceae não cultivada rRNA16S, clone A4 4. sequência parcial	Hesselsoe et al. (2009)
15	*Zoogloea*	160	4,24	100	JQ995475.1	*Zoogloea resiniphila* strain ICS2 rRNA 16S, sequência parcial	Cruz et al (2013)

5.3 – Potencial Metanogênico

O teste de potencial metanogênico foi realizado em 579 horas (24 dias). Os maiores valores de produção acumulada máxima de metano observados foram 1.068,1 µmol, 1.010,3 µmol, 1.128,8 µmol, 1.218,2 µmol e 1.238,1 µmol para as séries experimentais C (Controle), P1 (16,3±2,5 $mg.L^{-1}$ de LAS), P2 (32±0,8 $mg.L^{-1}$ de LAS), P3 (47,2±3,9 $mg.L^{-1}$ de LAS) e P4 (75,4±7,5 $mg.L^{-1}$ de LAS), respectivamente. Os valores médios de produção de metano para as séries experimentais C, P1, P2, P3 e P4 podem ser observados na Tabela 5.45.

Observou-se que a produção acumulada de metano foi similar entre as séries experimentais (Tabela 5.45). Como verificado na caracterização da água residuária de lavanderia utilizada no ensaio de potencial metanogênico (Tabela A1, apêndice) compostos biodegradáveis também faziam parte da sua composição e devido ao consórcio microbiana do inóculo a digestão anaeróbia foi favorecida. Desse modo, verificou-se que a produção acumulada máxima de metano nas séries experimentais com LAS foram semelhantes ao controle.

Tabela 5.45 – Produção acumulada de metano mensurada nas séries experimentais nas CNTP

Série Experimental	**Concentração de LAS inicial**	**Produção Acumulada média**	**Produção Acumulada máxima**
	$mg.L^{-1}$	**µmol de CH_4**	
Controle	-	615,6	1.068,1
P1	16,3±2,5	576,9	1.010,3
P2	32±0,8	690,7	1.128,8
P3	47,2±3,9	710	1.218,2
P4	75,4±7,5	708	1.238,1

Por meio do ajuste da equação de Gompertz modificada (equação 2), foi possível estimar a produção acumulada de metano (teórica), a produção potencial de metano, a taxa de produção de metano e a duração da fase *lag* (fase de adaptação da biomassa) de cada série experimental.

A produção potencial de metano nas séries experimentais foi proporcional à concentração de LAS de água de lavanderia adicionada ao meio (Tabela 5.46), observou-se

que, quanto maior a concentração de LAS menor a fase *lag* (Figura 5.56). Assim, nas maiores concentrações de LAS menor foi a taxa de conversão do substrato à metano, entretanto maiores valores de metano (µmol de CH_4) foram detectados ao longo do ensaio.

Tabela 5.46 – Produção acumulada de metano pelo ajuste de Gompertz modificado nas séries experimentais nas CNTP

Série Experimental	**PARÂMETROS**		
	Produção potencial de metano – Teórica (µmol)	**Taxa de produção de metano (µmol/d)**	**Fase *lag* (horas)**
Controle	838,11+28,1	14,81+2,7	4,93
P1	813,1+37,11	8,57+1,81	<0,1
P2	926,2+49,1	12,42+3,37	<0,1
P3	1097,3++68,8	6,44+1,52	<0,1
P4	1141,9	8,16+1,71	<0,1

C = controle; P1 = 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS; P2 = 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS; P3 = 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e P4 = 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS.

Os reatores em batelada foram inoculados com biomassa preliminarmente aclimatada ao substrato sintético (extrato de levedura e sacarose), o qual, forneceu fonte de carbono prontamente assimilável para os microrganismos, o que pode ter ocasionado diminuição da fase *lag*, em todos os reatores. Destaca-se que a adição de LAS de água de lavanderia aos reatores foi feita após o consumo completo das fontes de carbono, mencionadas anteriormente.

Garcia-Morales et al. (2001) avaliaram o efeito inibitório do surfactante aniônico LAS (0 a 50 mg.L^{-1}) em processo anaeróbio empregando reatores em batelada. Os autores observaram o oposto do presente estudo; ou seja, quanto maior a concentração do surfactante no meio maior a fase *lag* e, assim, quanto mais longo o período que antecedeu o ponto máximo de produção de metano maior foi o efeito inibitório causado pelo surfactante.

Segundo Esposito et al. (2012), quanto maior a biodegradabilidade do substrato maior a taxa de produção de metano, ou seja, mais próxima do eixo Y será a curva, indicando menor fase *lag*, como o ocorrido neste estudo. Por outro lado, segundo estes autores, quanto maior a concentração ou a complexidade da matéria orgânica menor será a taxa de produção de metano durante essa fase inicial. Este fato resultou em grande distância da curva de produção acumulada de metano a partir do eixo Y durante a fase inicial.

Pôde-se observar que, embora nas maiores concentrações de LAS o pico de produção de metano tenha ocorrido de maneira mais lenta, em todas as séries experimentais houve rápida produção de metano, com estabilidade dessa produção após 100 horas (C, P1 e P2) e 200 horas (P3 e P4). Esta estabilidade ocorreu diferente para cada série experimental, sendo 121 horas para o controle; 145 para P1; 130 horas para P2; 288 horas para P3 e 243 horas para P4 (Figura 5.56).

Para as séries experimentais P1, P3 e P4, a inclinação da reta no que se refere a velocidade de produção de metano foi maior quando comparado com as séries C e P2, assim, a fase exponencial das séries P1, P3 e P4 teve maior durabilidade quando comparada com a série C e P2 (Figura 5.56). Reafirmando que a complexidade da água residuária utilizada, pode ter influenciado, tanto no fornecimento de fontes importantes para o metabolismo microbiano, bem como pode ter comprometido a velocidade de reação na transformação da matéria orgânica à metano

Destaca-se que ao aumentar a concentração do surfactante de 16,3±2,5 $mg.L^{-1}$ (P1) para 75,4±7,5 $mg.L^{-1}$ (P4) a produção acumulada de metano foi 22,5% superior. Atribuiu-se a este fato a presença de maiores concentrações de outras fontes de carbonos vindas desse tipo de água residuária (item 5.1.9.).

Angelidaki et al. (2004) verificaram que para concentrações de LAS acima de 50 $mg.L^{-1}$ ocorreu inibição da maioria dos grupos microbianos do processo anaeróbio. Entretanto, comparado com a série experimental P3 (47,2±3,9 $mg.L^{-1}$ de LAS), o aumento de aproximadamente 59,7% na concentração do surfactante na série P4 (75,4±7,5 $mg.L^{-1}$ de LAS) não interferiu negativamente na produção de metano em função do tempo (Figura 5.56). Observou-se para ambas as séries estabilização dessa produção após 200 horas.

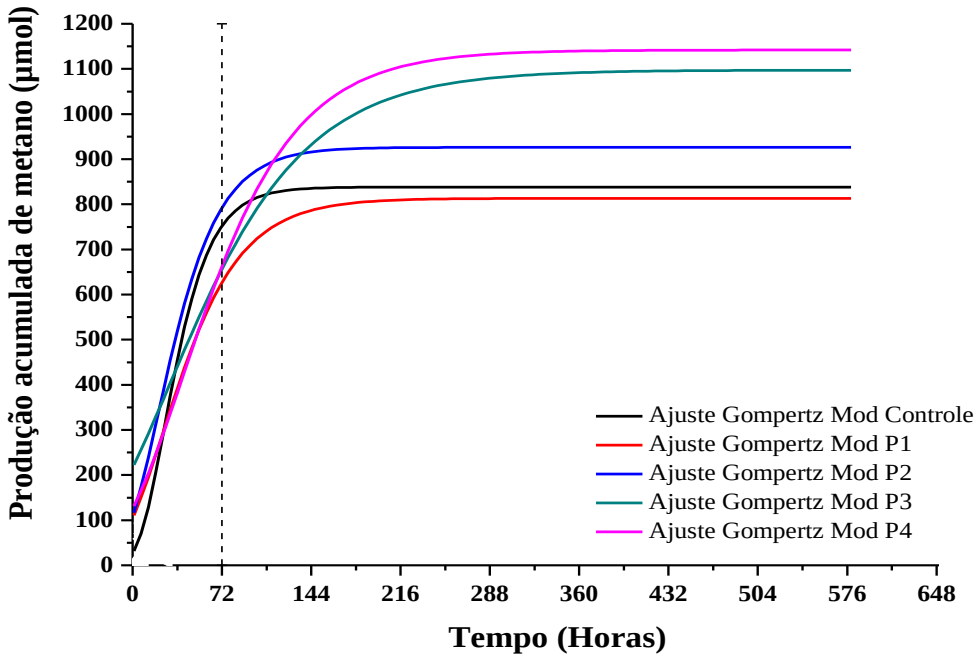

Figura 5.56 – Ajuste da Produção acumulada de metano (µmol) para todas as séries experimentais: Controle (sem adição de água de lavanderia), 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS, 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS, 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS, após 600 horas de incubação

A taxa específica de produção de metano foi de 8,54±1,58 µmol/gSTV.h^{-1}; 4,94±1,04 µmol/gSTV.h^{-1}; 7,51±1,94 µmol/gSTV.h^{-1}; 3,71±0,87 µmol/gSTV.h^{-1} e 4,91±1,08 µmol/gSTV.h^{-1}, para as séries experimentais Controle, P1, P2, P3 e P4, respectivamente. A concentração de LAS e demais compostos da água de lavanderia interferiu na cinética de transformação da matéria orgânica à metano.

Notou-se que a taxa foi mais elevada na série Controle quando comparada com as demais, com exceção da série P2 (7,51±1,94 µmol/gSTV.h^{-1}) que possuiu valores próximos ao do controle (8,54±1,58 µmol/gSTV.h^{-1}) (Figura 5.57). Por outro lado, observou-se que quanto maior a concentração de LAS maior a produção de metano, sendo assim os compostos presentes nesta água residuária foram usados na digestão anaeróbia à metano.

Carvalho (2006) avaliou lodo granular de UASB usado no tratamento de esgoto sanitário, cuja atividade metanogênica foi de 0,0816 a 0,582 µmol CH4.gSTV.h^{-1}. Lapa (2006) submeteu a ensaio metanogênico biomassa imobilizada em espuma de poliuretano proveniente de reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais usado no tratamento de esgoto sanitário. Os valores encontrados pelos autores foram em torno de 0,93 µmol CH4.gSTV.h^{-1}.

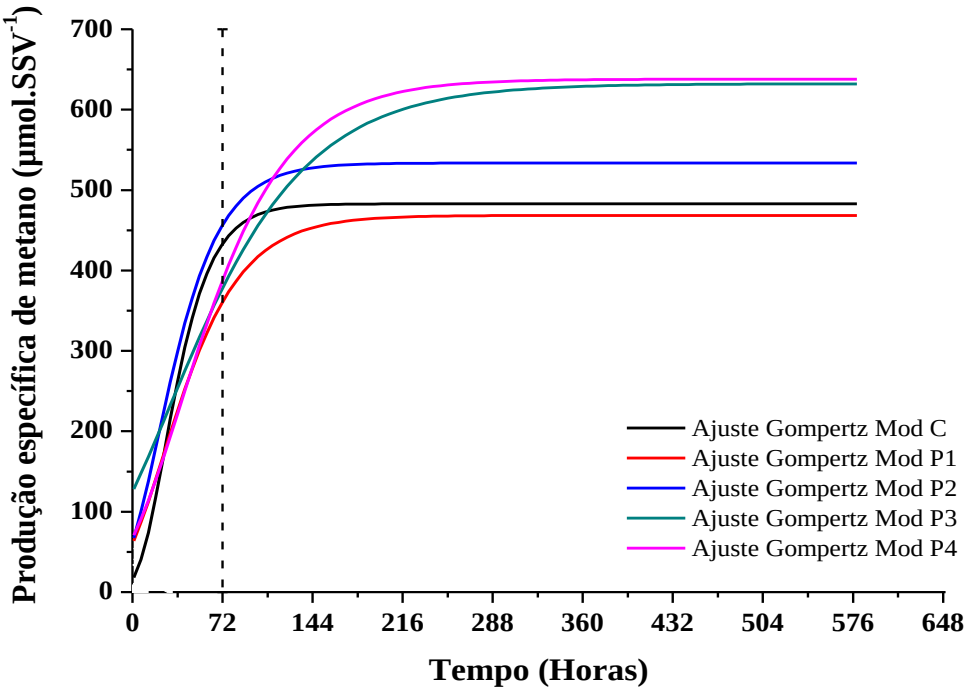

Figura 5.57 – Produção especifica de metano para todas as séries experimentais: Controle (sem adição de água de lavanderia), 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS, 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS, 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS, após 600 horas de incubação

Parte do metano gerado em todos os reatores foi oriundo da matéria orgânica presente no substrato sintético (extrato de levedura e sacarose), o que pode ser verificado pelos elevados valores de eficiência de remoção da matéria orgânica obtidos em cada série experimental (Tabela 5.47). Verificou-se ao final do experimento maior eficiência de remoção de matéria orgânica (86%) para a série P4. Já para a série P3 observou-se menor eficiência de remoção de matéria orgânica (82,4%), evidenciando que a água residuária de lavanderia não interferiu na remoção da matéria orgânica total.

Tabela 5.47 – Valores inicial e final de DQO e eficiência de remoção de matéria orgânica em cada série experimental

Série experimental	DQO média ($mg.L^{-1}$)		Eficiência
	Inicial	Final	(%)
C	482±17	78±18	83,7±4,3
P1	518±3	77±27	85±5,4
P2	527±52	81±5	84,6±0,6
P3	536±18	92±32	83±5,4
P4	571±40	77±10	86,2±2,8

C = controle; P1 = 16,3±2,5 $mg.L^{-1}$ de LAS; P2 = 32±0,8 $mg.L^{-1}$ de LAS; P3 = 47,2±3,9 $mg.L^{-1}$ de LAS e P4 = 75,4±7,5 $mg.L^{-1}$ de LAS.

Na Tabela

Tabela 5.48 pode-se observar os valores de ST e STV ao final do ensaio. Não se verificou crescimento significativo de microrganismos pela concentração de sólidos totais voláteis (STV), cujo valor médio inicial e final para todas as séries experimentais foram de 1,58 $g.L^{-1}$ e 1,64±0,2 $g.L^{-1}$, respectivamente. Provavelmente, isso ocorreu devido ao reduzido tempo de operação (24 dias), uma vez que a taxa de crescimento dos microrganismos anaeróbios é lenta, com tempo de geração mínimo de 2 a 3 dias (MOSEY, 1983) e a presença de LAS e outros compostos xenobióticos na água residuária. Notou-se que para as séries com maiores concentrações de LAS (P3 e P4) foram observados menores valores de sólidos voláteis.

Tabela 5.48 – Série de sólidos ao final do teste de potencial metanogênico

Série experimental	$mg.L^{-1}$	
	ST	STV
C	2,76±0,3	1,71±0,2
P1	2,71±0,2	1,73±0,1
P2	3,00±0,1	1,94±,0,1
P3	2,34±0,1	1,56±0,1
P4	1,95±0,8	1,24±0,5

C = controle; P1 = 16,3±2,5 $mg.L^{-1}$ LAS; P2 = 32±0,8 $mg.L^{-1}$ LAS; P3 = 47,2±3,9 $mg.L^{-1}$ LAS e P4 = 75,4±7,5 $mg.L^{-1}$ LAS.

Almendariz et al. (2001) observaram decréscimo da remoção de LAS (de 68% para 33%) com o aumento da concentração de surfactante (de 20 para 50 mg.L^{-1}). Entretanto, no presente estudo inibição pela alta concentração do surfactante não foi observada, pelo contrário, maiores eficiências de degradação do surfactante foram registradas para as série com maiores concentrações de LAS (P3 e P4) como pode ser observado na Tabela 5.49.

Tabela 5.49 – Balanço de massa de LAS do ensaio de potencial metanogênico.

Série Experimental	**LAS (mg. L^{-1})**				**Eficiência (%)**
	Inicial	**Final**	**Adsorvido**	**Degradado**	
C	0	0	0	0	-
P1	16,3±2,5	0,9±0,1	12±0,7	3,5±3	18,9±15,9
P2	32±0,8	0	15,7±4,6	16,3±3,8	51,3±13,1
P3	47,2±3,9	0	13,2±4,2	34±8,1	71,10±11,3
P4	75,4±7,5	0	27,9±8,8	47,59±16,4	61,52±15,5

C = controle; P1 = 16,3±2,5 mg.L^{-1} LAS; P2 = 32±0,8 mg.L^{-1} LAS; P3 = 47,2±3,9 mg.L^{-1} LAS e P4 = 75,4±7,5 mg.L^{-1} LAS.

A produção de ácidos orgânicos (AOs) nas séries experimentais não afetou a produção de metano. Os AOs totais foram de 46,3±21 mg.L^{-1}, 42,4±2,1 mg.L^{-1}, 38,5±14,3 mg.L^{-1}, 39±17,2 mg.L^{-1} e 38,2±14,2 mg.L^{-1} para as séries C, P1, P2, P3 e P4, respectivamente (Tabela 5.50). O ácido orgânico com maior representatividade em todas as séries experimentais contendo água de lavanderia (P1, P2, P3 e P4) foi o ácido fórmico (24,5±5,9 mg.L^{-1}). As metanogênicas hidrogenotróficas usam esse ácido para produzir metano (Bacilos fluorescentes e *Methanosarcina*).

Tabela 5.50 – Ácidos Orgânicos do ensaio de potencial metanogênico

Série experimental	Ácidos Orgânicos (mg.L^{-1})					
	Cítrico	**Málico**	**Succínico**	**Lático**	**Fórmico**	**Acético**
C	3,2±0,1	0,6±0,1	<LD	2,0±0,4	34,5±20,5	2,9±2,9
P1	3,1±0,06	<LD	2,3±2,3	1,7±0,6	26,9±5,3	<LD
P2	1,5±1,5	0,7±0,06	4,8±0,2	1,70,1	17,5±11,4	3,4±0,1
P3	3,0±0,05	0,9±0,3	2,3±2,3	2,0±0,3	23,0±11,5	2,0±2,0
P4	1,5±1,5	0,9±0,2	2,7±2,7	1,0±1,0	20,5±11,2	<LD
Média	**2,5±0,8**	**0,6±0,3**	**2,4±1,5**	**1,7±0,4**	**24,5±5,9**	**1,7±1,4**

Série experimental	Ácidos Orgânicos (mg.L^{-1}) cont.					
	Propiônico	**Isobutírico**	**Butírico**	**Isovalérico**	**Valérico**	**TOTAL**
C	1,6±1,6	1,3±1,3	<LD	<LD	<LD	46,3±21
P1	3,5±0,1	1,7±0,03	0,8±0,8	<LD	2,5±2,5	42,4±2,1
P2	1,9±1,9	2,30,8	<LD	4,8±0,04	<LD	38,5±14,3
P3	<LD	0,5±0,5	<LD	5,3±0,3	<LD	39,0±17,2
P4	<LD	1,8±0,1	<LD	9,8±0,1	<LD	38,2±14,2
Média	**1,4±1,3**	**1,5±0,6**	**0,2±0,3**	**4±3,7**	**0,5±0,5**	**40,8±3,1**

<LD = menor que o limite de detecção da curva de calibração do método. C = controle; P1 = 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS; P2 = 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS; P3 = 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e P4 = 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS. Cit = cítrico; Mál. = málico; Suc. = succínico; Lát. = lático; Fórm. = fórmico; Acé. = acético; Prop. = propiônico; Isob. = isobutírico; But. = butírico; Isov. Isovalérico; Val. = valérico.

Na série controle houve maior concentração de AOs totais (46,3±21 mg.L^{-1}), dentre eles os mais representativos foram o ácido fórmico seguido do ácido cítrico. Observou-se decréscimo de AOs totais, conforme o aumento da concentração do surfactante.

5.3.1 – DGGE das amostras do ensaio de potencial metanogênico

Mediante análise de cluster do perfil de bandas do DGGE, mudanças nas populações microbianas foram observadas para os dois Domínios (Archaea e Bacteria) quando comparadas com o padrão de bandas do inóculo após 579 horas experimentais do teste de potencial metanogênico.

Observou-se maior variação dos coeficientes de similaridade para o Domínio Archaea (53% a 99%) do que para o Domínio Bacteria (60% a 96%) (Figuras 5.58 e 5.59). Observou-se para o inóculo maior valor do índice de similaridade para o Domínio Archaea (74%) comparado ao Domínio Bacteria (60%).

Por meio da correlação de *Pearson* foram verificadas similaridades de 96% e 99% entre a série experimental P1 (16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS) e o C (controle sem adição de LAS) para os Domínios Archaea e Bacteria, respectivamente. Pôde-se observar que a adição de 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS proveniente de água de lavanderia não provocou grandes alterações na comunidade microbiana de acordo com o perfil de bandas do DGGE.

Observou-se, tanto para o Domínio Bacteria, quanto para o Domínio Archaea que o aumento da concentração do surfactante nas séries experimentais comparado ao ensaio controle (C) ocasionou diminuição da similaridade (Figuras 5.58 e 5.59).

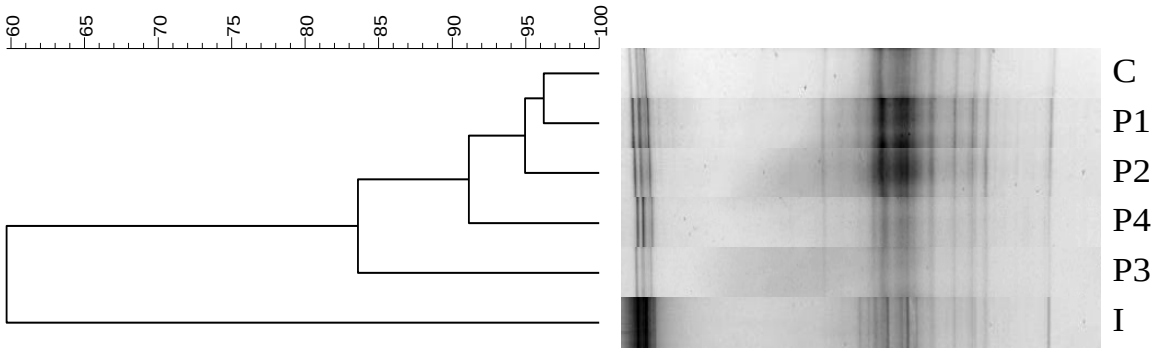

Figura 5.58 – Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas padrões do DGGE dos fragmentos do rRNA 16S para o **Domínio Bacteria** de amostras do ensaio de potencial metanogênico para as amostras: C = controle; P1 = 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS; P2 = 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS; P3 = 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e P4 = 75,4±7,5 mg.L^{-1}de LAS

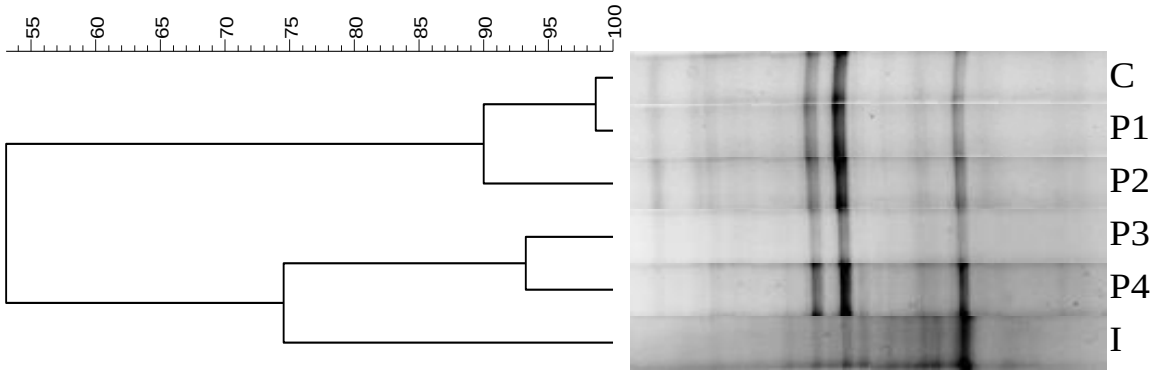

Figura 5.59 – Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas padrões do DGGE dos fragmentos do rRNA 16S para o **Domínio Archaea** de amostras do ensaio de potencial metanogênico para as amostras: C = controle; P1 = 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS; P2 = 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS; P3 = 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e P4 = 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS

Por meio do cálculo do índice de Shannon-Wiener (Tabela 5.51) verificou-se que a comunidade microbiana pertencente ao Domínio Bacteria (2,61 – 2,93) foi mais diversa quando comparado com o Domínio Archaea (2,08 – 2,57).

Tabela 5.51 – Índice de Shannon-Wiener para as amostras dos testes de potencial metanogênico

Índice de Shannon-Winner (H')						
Domínio	**Inóculo**	**C**	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**
Archaea	2,44	2,42	2,57	2,52	2,08	2,49
Bacteria	2,69	2,82	2,93	2,89	2,61	2,68

C = controle; P1 = 16,3±2,5 mg.L^{-1} de LAS; P2 = 32±0,8 mg.L^{-1} de LAS; P3 = 47,2±3,9 mg.L^{-1} de LAS e P4 = 75,4±7,5 mg.L^{-1} de LAS.

Resultados diferentes foram observados por Garcia-Morales et al (2001), ao comparar comunidades microbianas acidogênicas e metanogênicas em reatores anaeróbios em batelada na presença de LAS (0 a 50 ppm). Estes autores citam que o surfactante empregado possuiu maior efeito inibitório na comunidade metanogênica (Domínio Archaea) quando comparado com a comunidade acidogênica (Domínio Bacteria).

Neste estudo com água residuária de lavanderia como fonte de LAS pôde-se notar que os microrganismos pertencentes ao Domínio Archaea foram mais sensíveis ao aumento da concentração do surfactante (P4) em condição de anaerobiose estrita, uma vez que, verificou-se para este grupo menor similaridade (54%) em relação ao controle (C), quando comparado ao Domínio Bacteria (91%).

6 – CONCLUSÕES

- Por meio da caracterização da água residuária de lavanderia comercial foi evidenciado grande variação na concentração de diversos parâmetros, principalmente matéria orgânica e LAS.

- Trinta e quatro COXs foram observados na água residuária entre eles: solventes (Butanol, Etanol, etc.), auxiliares na produção de produtos de limpeza (Cis-dimetil Cicloexanol, Dimetil Cicloexanol, etc.), fragrâncias (Limoneno, Linalol, etc.), preservativo e antioxidante (Fenóxi Etanol) e alguns agentes tensoativos (Tetrametil Butil Fenóxi Etoxilado e Nonil Fenol Etoxilado). Em menor quantidade repelente (Mercaptometano), preservativo/antioxidante (Fenóxi Etanol).
- Elevada remoção de matéria orgânica (superior a 80% de eficiência) foi observada em todas as fases de operação do reator na presença do LAS de água residuária de lavanderia.
- A presença de sacarose ao substrato sintético não influenciou significativamente a carga orgânica aplicada ao reator.
- Observou-se que o aumento do TDH de 18,6h (Etapa III) para 23h (Etapa IV) foi favorável para remoção DQO mas não para a remoção de LAS.
- Devido à elevada superfície de contato promovida pela areia (material suporte) observou-se maior número de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas nesta porção do reator.
- Ao longo das Etapas IV e V de operação do RALF bem como entre as diferentes regiões do reator observou-se com isso que o Domínio Bacteria teve função mais importante na degradação do LAS do que o Domínio Archaea.
- A sacarose não afetou negativamente a remoção de matéria orgânica, entretanto, este co-substrato influenciou na diversidade microbiana do reator anaeróbio de leito fluidificado.
- A degradação do LAS foi decorrente de consórcio microbiano observado pela análise de Pirosequenciamento da região V4 do rRNA 16S (24 gêneros relacionados com a degradação do LAS).
- Verificou-se diminuição da velocidade de conversão de matéria orgânica à metano para maiores concentrações de LAS nos ensaios de potencial metanogênico.

7 – SUGESTÕES

Com base na experiência adquirida durante este trabalho, sugere-se:

- Analisar quantitativamente os COXs da água residuária do efluente do reator e adsorvido na areia.

- Avaliar por espectrometria de massa os intermediários da degradação anaeróbia do LAS e, assim, tentar estabelecer possível rota metabólica.

- Avaliar a remoção e degradação de LAS em água residuária de lavanderia comercial com menores tempo de detenção hidráulica (TDH) em reator de leito fluidificado.

- Realizar ensaios em reatores em batelada para degradação de LAS de água residuária de lavanderia empregando-se culturas purificadas e similares aos gêneros mais abundantes identificados na biomassa do reator.

- Realizar ensaios de cinética de inibição com LAS padrão (Sigma) e LAS de água residuária de lavanderia.

- Analisar a comunidade microbiana em todas as etapas de operação do reator inclusive aquela proveniente do inóculo.

- Fazer o sequenciamento do RNAm para ver quais genes estão ativos no reator e estudar as rotas metabólicas envolvidas na degradação do LAS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, M. M. et al. (2007). Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzosulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pantoea agglomerans*. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 41, n. 4, p. 432-439.

ABRAHAM, W. R. et al. (2008). Phylogeny by a polyphasic approach of the order Caulobacterales, proposal of Caulobacter mirabilis sp. nov., Phenylobacterium haematophilum sp. nov. and Phenylobacterium conjunctum sp. nov., and emendation of the genus Phenylobacterium **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.58, n. 8, p. 1939-1949.

ABRAMS, E. F.; DERKIC,S. D.; FONG, C.V. (1975). Identification of Organic Compounds in Effluents from Industrial Sources. Report to *U.S. Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances*, Washington, DC, by Versar, Inc., General Technologies Division, Springfield, VA.USEPA-560/3-75-002, p. 70.

ABU-ZREIG, M.; RUDRA, P. R.; DICKINSON, T. W. (2003). Effect of application of surfactants on hydraulic properties of soils. **Biosystems Engineer**, v. 84, n. 3, p. 363 – 372.

ADAV, S. S.; LEE, D. J.; LAI, J. Y. (2010). Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 85, n. 5, p. 1601-1610.

ADEQ (Arizona Department of Environmental Quality) (2003). Regulation for Using Graywater. Publication N. C 01 – 06, Phoenix, Arizona,

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). (1994). Toxicological profile for zinc.Atlanta, 243 p.,

AHRING, B. K.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digesters. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v. 43, n. 3, p. 559-565.

AL-JAYYOUSI, O. R. (2003). Greywater reuse: towards sustainable water management. **Desalination.** v.156 p. 181-192.

ALLEN, T. D. et al. (2006). *Cloacibacterium normanensegen.* nov., sp. nov., a novel bacterium in the family Flavobacteriaceae isolated from municipal wastewater**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 56, p. 1311–1316.

ALMENDARIZ, F. J. et al. (2001). Degradation of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugmented with a *Pseudomonas aeruginosa* (M113) strain. **Water Science and Technology.** v. 44, n. 4, p. 183-188.

AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. (1995). Phylogenetic identification an in situ detection of individual cells without cultivation. **Microbial Reviews**. v. 59, n.1, p.143-169.

ANDREOZZI, R. et al. (2006). Evaluation of biodegradation kinetic constant for aromatic compounds by means of aerobic batch experiments. **Chemosphere**. v. 62, n. 9, p. 1431-1436.

ANGELIDAKI, I. et al. (2004). Anaerobic bioprocessing of sewage sludge, focusing on degradation of linear alkylbenzene sulfonates (LAS). **Water Science and Technology**. v. 49, n. 10, p. 115-122.

ANGULO, A. F. et al. (2000). *Acholeplasma vitulisp.* nov., from bovine serum and cell cultures. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.50, p.1125–1131.

AONGHUSA, C. N.; GRAY, N. F. (2002). Laundry detergents as a source of heavy metals in irich domestic wastewater**. J. Environ. Sci. Health**. v, 37, p. 1-6.

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

APHA. (1998). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th edition, American Public Health Associatin, Washington, D.C.

ARAUJO, J. C. (2004). Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Environmental technology**. v. 25, n. 7, p. 809–17.

ARVIN, E.; JENSEN, B. K.; GUNDERSEN, A. T. (1989). Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, n. 12, p. 3221-3225.

BAENA, S. et al. (1999). *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp nov., a mesophilic anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, Jul, p. 975-982.

BAIRD, C. (1995). **Environmental Chemistry**. Freeman and Company, Nova Iorque, p.484.

BAJPAI, D.; TYAGI, V. K. (2007). Laundry detergents: an overview**. J. Oleo Sci**. v.56, n.7, p. 327-40.

BALSON, T.; FELIX, M. S. B. (1995). Biodegradability of Nonionic Surfactants. **In Biodegradability of Surfactants**. Karsa, D. R., Porter, M. R.; Blackie Academic and Professional: New York, p. 204-229.

BARROS, F. F. C. et al. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Quím. Nova**. v.30, n.2 , p. 409-414.

BAUMGARTNER, A. et al. (2012). The phylum Synergistetes in gingivitis and necrotizing ulcerative gingivitis**. Journal of medical microbiology**. v. 61, n.11, p.1600–1609.

BERNA, J. L. et al. (2007). Anaerobic biodegradation of surfactants – Scientific review. **Tenside Surf. Det**. p. 44 – 6.

BEYENAL, N. Y. (1997). Combined Effects of Cu^{2+} and Zn^{2+} on Activated Sludge Process. **Water Research**. v. 31, n.4, p. 699-704.

BIALEK, K. et al. (2012). Microbial community structure and dynamics in anaerobic fluidized-bed and granular sludge-bed reactors: influence of operational temperature and reactor configuration. **Microbial Biotechnology**. v.5, n.6, p.738–752.

BIGARDI, T. A. R. et al. (2003). Fate of anionic surfactants in an aerated lagoon sedimentation pond WWTP. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 8, n. 1, p. 45-48.

BINGHAM, E.; COHRSSEN, B.; POWELL, C.H. (2001). **Patty's Toxicology**. 5th ed. NY, NY: John Wiley and Sons, v.7, 688 p.

BLANCO, E. (2012). **Caracterização e tratamento de água residuária de lavanderia comercial em reator anaeróbio operado em bateladas seqüenciais**. 2012. 92 p. Trabalho de Graduação – Escola de Engenharia de São Carlos, 2012.

BOONE, D. R.; WHITMAN, W. B.; ROUVIÈRE, P. (1993). Diversity and taxonomy of methanogens. **In J. G. Ferry (ed.). Methanogenesis**. Chapman and Hall, New York, N.Y. p. 35-80.

BORSATO, D.; GALÃO, O. F.; MOREIRA, I. (1999). **Detergentes naturais e sintéticos**. Londrina. Editora UEL, 131p.

BOSQUILHA, G. E. (2002). **Estudo da distribuição de surfactantes e de polifosfatos no Sistema Estuarino de Santos/São Vicente e Baía de Santos (SP, Brasil) e avaliação das metodologias aplicadas.** Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanógrafico – USP, São Paulo. 2002.

BRAGA, M. C. B. (1989). **Estudo da Eficiência dos Processos Bioquímicos em um Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado Automatizado.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1989.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTE, J. E. W. A. (1993). **Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais.** São Paulo, CETESB, 764 p.

BRANDT, K. K. et al. (2001). Yrensen Toxic Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate on Metabolic Activity, Growth Rate, and Microcolony Formation of *Nitrosomonas* and *Nitrosospira* Strains. **Applied and environmental microbiology.** v. 67, n. 6, p. 2489–2498.

BRASIL. Ministério da Saúde. (1982). **Portaria, n° 112. Referente substâncias tensoativas aniônicas, utilizadas na composição de saneantes de qualquer natureza, devem ser biodegradáveis**. Brasília, Diário Oficial da República Federativa do Brasil. p.l0904, Seção 1, pU.

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. (1957). An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological Monographs**. v. 27, p.325-349.

BREITMAIER, E. (2006). **Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones**. Engelfriedshalde 46. 72076. Tubingen, Alemanha. ISBN-13: 978-527-31786-8,

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

BRUNEL, E.; CANCELA DA FONSECA, J. P. (1979). Vie de la société. Concept de la diversité dans les écosystemes complexes. (Table ronde tenue à l`ocasion du colloque sur les écosystèmse bocagers à Rennes en 1976). **Bull. Ecol**. v. 10, n. 2, p.147-163.

BRUNNER, P. H. et al. (1988). Occurrence and behaviour of Linear alkylbenzene sulphonates in sewage and sewage sludge treatment. **Wat. Res**. v. 22, n. 12, p. 1465-1472.

BUDAVARI, S. (1996). **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 12th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co Inc p. 641.

BURSEY, J. T.; PELLIZZARI, E. D. (1982). **Analysis of Wastewater for Organic Pollutants in Consent Degree Survey.** Contract No. 68-03-2867. Athens, GA: USEPA Environ Res Lab p. 98.

BUSH, A. O. et al. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms Margolis et al. revised. **Journal of Parasitology**. v. 83, n. 4, p. 575-583.

BUTTERFIELD, C. T. (1970). Studies of Sewage Purification: II. A Zooglea-Forming Bacterium Isolated from Activated Sludge. **Public Health Reports**. v. 50, n. 20, p. 671-684.

BUTTS, M.; KIRK, O. (2005). **Encycl Chem Technol**. NY, NY: John Wiley & Sons; Silicones. Online Posting.

CAI, J.; LU, Z. Lysis of 35 bacterial strains by BALO isolated from Tianjin and Fujian, China Não publicado

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

CARVALHO, K. Q. (2006). **Resposta dinâmica de reator UASB em escala piloto submetido a cargas orgânicas e hidráulicas cíclicas: modelos matemáticos e resultados experiementais**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

CASANOVA, L. M.; GERBA C. P.; KARPISCAK, M. (2001). Chemical and Microbial Characterization of Household Graywater. **J. Environmental Science and Health**. v. 36, n. 4, p. 395-401.

CAVALLI, L.; GELLERA, A.; LANDONE, A. (1993). LAS removal and biodegradation in a wastewater treatment plant. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 12, p. 1777-1788.

CERQUEIRA, V. S. et al. (2012). Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 28, p. 1203–1222.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K. (2001). Biotransformation of Limonene by *Pseudomonas putida.* **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v. 55, n. 5, p. 541-546.

CHEN, H. et al. (2013). *Sphingobium limneticum* sp. nov. and *Sphingobium boeckii* sp. nov., two freshwater planktonic members of the family Sphingomonadaceae, and reclassification of Sphingomonas suberifaciens as Sphingobium suberifaciens comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 63, n. 2, p. 735-43.

CHERNICHARO, C. A. L. (2007). **Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias.** Belo Horizonte: Politécnica. 2007.

CHOU, J. H. et al. (2008). *Azonexus hydrophilus* sp. nov., a nifH gene-harbouring bacterium isolated from freshwater. **Int. jour. of syst. and evolutionary microbiology**. v. 58, n. 4, p. 946–51.

CHRISTOVA-BOAL, D., EDEN, R. E., MCFARLANE, S. (1996). An investigation into greywater reuse for urban residential properties. **Desalination**, v. 106, p. 391–397.

CIRJA, M. et al. (2008). Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). **Environ. Sci. Biotech.** v. 7, v. 61-78.

COATES, J. D. et al. (1999). Ubiquity and Diversity of Dissimilatory (Per)chlorate-Reducing Bacteria. **Applied and environmental microbiology**. p. 5234–5241.

COATES, J. D. (2001). Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. **Nature**. v. 411.

COLE, J. R. et al. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**. v. 37, p.141–145.

COLINVAUX, P. (1996). **Ecology**. New York, John Wiley and Sons Inc., 725 p.

COMBER, S. D. W.; GUNN, A. M. (1996). Heavy Metals Entering Sewage - Treatment Works from Domestic Sources. **Journal Chart. Inst. Water Environment**. v.10, n. 2, p. 137-142.

CONNELL, J. H. (1978). Diversity in tropical rain forests and coral reefs**. Science**. v. 199, p.1302-1310.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. CONAMA. (1986). **Resolução n◦20, de 18 de junho de 1986. Classificação das águas doces, salobras e salinas do território nacional**. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html. Acesso em 12 de abril de 2011.

_____.(2005). **Resolução n◦357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, 17 de março de 2005.

COSTA, M. J. C. (2006). **Tratamento biológico de efluente de lava-jatos**. Dissertação (Mestrado). PRODEMA/Universidade Federal da Paraíba/ Universidade Estadual da Paraíba, 2006.

COSTA, R. H. R.; MARTINS, G. B. H. (1997). Práticas limpas aplicadas as indústrias têxteis do Estado de Santa Catarina. In.19. **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. 14 a 19 de setembro de 1997, Foz do Iguaçú. Anais eletrônico. ABES,

COSTA, M. J. C. et al. (2007). Anaerobic codigestion of surfactants substances, oil and sludge of sewage. **Eng. sanit. ambient**. v.12, n. 4, p. 433-439.

COSTA, R. B. (2009). **Avaliação Comparativa da Degradação Anaeróbia de Alquilbenzeno Linear Sulfonado em Reator de Leito Fluidificado**. Trabalho de Graduação – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

COSTANZA, J. et al. (2009). Fate of TCE in heated Fort Lewis soil. **Environ. Sci. Technol**. v. 43, n. 3, p. 909-914.

COSTERTON, J. W. et al. (1995). Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, n.1, p.711-745.

COURADEAU, E. et al. (2011). Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured Microbialites from the alkaline lake Alchichica (Mexico). **PLoS One** 6(12): e28767.

CRUZ, I. et al. (2013). Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v. 97, n. 22, p. 9847-9858.

CSERHÁT, T.; FORGÁCS, E.; OROS, G. (2000). Biological activity and environmental impact of surfactants. **Environ. Intern.** v. 28, p. 337-348.

CYPIONKA, H. (1995). **Solute transport and cell energetics**. In L. L. Barton (ed.), Biotechnology handbooks, volume 8, sulphate-reduction bacteria, New York: Plenum Press., p. 1251-84.

DAS, M. M. et al. (1996). In vitro gas production and rumen degradation characteristics of Zizyphus [Ziziphus] leaves. **Indian J. Anim. Nutr**. v.13 n.3. p. 142-147.

DAVIS, K. E.; JOSEPH, S. J.; JANSSEN, P. H. (2005). Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 71, p. 826-834.

DAVIDOV, Y.; JURKEVITCH, E. (2004). Diversity and evolution of Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs), reclassification of Bacteriovorax starrii as Peredibacter starrii gen. nov., comb. nov., and description of the Bacteriovorax-Peredibacter clade as Bacteriovoracaceae fam. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 54, n. 5, p. 1439-1452.

DEBARATI, P. et al. (2008). Genome sequence of the chemolithoautotrophic Bacterium Oligotropha carboxidovorans OM5. **J. Bacteriol. August**. v. 190, n. 15, p. 5531-5532.

DELFORNO, T. P. et al. (2012). Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 107, n. 0, p. 103-109.

DEMIREV, P. A.; FENSELAU, C. (2008). Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Microorganisms. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, p. 71-93.

DENGER, K.; COOK, A. M. (1999). Linear alkylbenzene sulphonate (LAS) bioavaliable to anaerobic bacteria as a source of sulphur. **Journal of Applied Microbiology**. v. 86, p. 165-168.

DENTEL, S. K. (1993). Effects os surfactants on sludge devt/atering and pollutant fate. **Relatório de Projeto - Water Resources Center -** University of Delaware.

DILALLO, R.; ALBERTSON, E. (1961).Volatile acids by direct tritation. **Journal WPCF**, v.33, p. 356-365.

DINSDALE, E. A. et al. (2008). Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, v. 452, p. 629-632.

DOCKS, E. L. (1992). Kirk-Othmer Encycl Chem Technol. 4th ed. NY, NY: John Wiley and Sons, v. 4, 414 p.

DROEGE, M.; HILL, B. (2008). The Genome Sequencer FLX(TM) System--Longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. **Journal of Biotechnology**. v. 136, p. 3-10.

DRZYZGA, O. (2008). *Gordonia cholesterolivorans* sp. nov., a cholesterol-degrading actinomycete isolated from sewage sludge. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v.59, n.5, p. 1011-1015.

DUARTE, I. C. S., AGUILA, N. K. S., VARESCHE, M. B. A. (2005).Tratamento de linear alquilbenzeno sulfonato em reator anaeróbio horizontal de leito fixo. In: **Anais do IV Seminário do projeto temático: Desenvolvimento, análise, aprimoramento e otimização de reatores anaeróbios para tratamento de águas residuárias.** UFSCar, São Carlos p. 30 - 39.

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

DUARTE, I. C. S. et al. (2006). Development of a Method by HPLC to Determine LAS and its Application in Anaerobic Reactors. **J. Braz.Chem. Soc**. l17, 7, p. 1360-1367.

DUARTE, I. C. S. et al. (2008). Evaluation of the microbial diversity in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor treating linear alkylbenzene sulfonate. **Biodegradation**. v. 19, n. 3, p. 375-385.

DUARTE, I. C. S. (2009). Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in mesophilic anaerobic sequencing batch reactor. **En: VILAS, A. M. (ed) Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. World Scientific Pub Co Inc, Sevilha: 352-355.

DUEÑAS, J. F. et al. (2003). Characterisation of phosphorous forms in wastewater treatment plants. **Journal of Hazardous Materials.** v.97, p. 193-205.

DUHAMEL, M; EDWARDS, E. A. (2006). Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by Dehalococcoides. **FEMS Microbiol Ecol**. v. 58, p. 538–549.

EDGAR, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v.26, n.19, p.2460-2461, Aug.

EICHHORNA, P. (2002). Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. **Science of The Total Environment**. v. 284, n. 1–3, p. 123–134.

EDWARDS, R. et al. (2006). Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics**. v.7, n.57.

ELSGAARD, L. et al. (2003). Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates in sulfate-leached soil mesocosms. **Chemosphere**. v. 50, p. 929-937.

ENGSTROM, R. T.; JAMES, F. C. (1981). Plot size as a factor in winterbird-population studies. **Condor.** v. 83, p. 34 – 41.

ERIKSSON, E.; DONNER, E. (2009). Metals in Greywater: Sources, Presence and Removal Efficiencies. **Desalination.** v. 248, n. 1-3, p. 271-278.

ERIKSSON, E. et al. (2003). Household chemicals and personal care products as sources for xenobiotic organic compounds in grey wastewater. **Water SA**. v. 2, n. 29, p.4378-4738.

ERIKSSON, E. et al. (2002). Characteristics of grey wastewater. **Urban Water**. v. 4, n.1, p. 58-104.

ESPOSITO, G. et al. (2012). Bio-methane potential tests to measure the biogas production from the digestion and co-digestion of complex organic substrates. **The Open Environmental Engineering Journal**. v.. 5, p. 1-8.

FARIA, O. et al. (2006). Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 26, n. 2, p. 309-317.

FENAROLI. (1975). **Handbook of Flavor Ingredients**. v. 2. Edited, translated, and revised by T.E. Furia and N. Bellanca. 2nd ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co., p. 12.

FERNANDEZ, N. et al. (2008). Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater. **Renewable Energy**., v. 33, p. 2458–2466.

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

FERREIRA, F. V. et al. (2011). Influence of Co-Substrate in Household Surfactant Removal using Anaerobic Fluidized Bed Biological Reactor – A Comparative Study. **Digestion Anaerobic America Latina (DAAL)** – Ouro Preto, Brazil.

FINEGOLD, S.M. et al. (2003). *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium.* Syst.Appl.Microbiol. 26: 177-181 2003. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. List No. 93**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 53, p. 1219-1220.

FISHER, R. A.; CORBET, A. S.; WILLIANS, C. B. (1943). The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. **Journal of Animal Ecology**. v. 12, p.42-58.

FORESTI, E. (1994). Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: **Tallery Seminario Latonoamericano Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales,** 3., 1994, Montevidéu. **Anais.** Montevidéu: Universidad de La República. p.97-110.

FURIA, T. E. (1972). **CRC Handbook of Food Additives**. 2nd ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co. 233 p.

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; SANCHEZ-LEAL, J.; RIBOSA, I. Effect of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) on the anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, v. 40, n. 15, p. 2958-2964, 2006

GARCIA-MORALES, J. L. et al. (2001). Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by linear alkylbenzene-sulfonate (LAS**). Chemical and Biochemical Engineering Quarterly.** v. 15, n. 1, p. 13-19.

GARLAND, J. L. et al. (2004). Response of greywater recycling systems based on hydroponic plant growth to three classes of surfactants. **Water Research**. v.38, p. 1952 – 1962.

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

GE, J. et al. (2004). New bipolar electrocoagulation-electroflotation process for the treatment of laundry wastewater. **Separation Purification Technology**. Amsterdam: Elsevier, v. 36, p. 33-39.

GERBA, C. P. et al. (1995). Water quality of graywater treatment system**. Water Research.** v. 31, n. 1, p.109–116.

GILBRIDE, K. A.; FULTHORPE, R. R. (2004). A survey of the composition and diversity of bacterial populations in bleached kraft pulp-mill wastewater secondary treatment systems. **Can. J. Microbiol.** v. 50. p. 633–644.

GODON, J. J. et al. (2005). Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the 'Synergistes' example. **Environmental Microbiology.** v. 7, n. 2, p. 213–224.

GONÇALVES, R. F et al. (2001). **Pós - Tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios.** Cap. 4 - Pós- Tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios por Reatores com Biofilme, p. 171 – 278; PROSAB 2.

GORLENKO, V. M. et al. (2011). *Magnetospirillum aberrantis* sp. nov., a new freshwater bacterium with magnetic inclusions. **Mikrobiologiia**. v. 80, n. 5, p. 679-690.

GRAEDEL, T. E. (1978). **Chemical Compounds in the Atmosphere.** NY, NY: Academic Press Granulares. São Paulo p. 306-9.

GRAY, S. R.; BECKER, N. S. C. (2002). Contaminant flows in urban residential water system. **Urban Water.** v. 4, n. 4, p. 331-346.

GROSS, A. et al. (2007). Recycled vertical flow constructed wetland (RVFCW) — a novel method of recycling greywater for irrigation in small communities and households. **Chemosphere.** v. 66, p. 916–923.

GROSS, A. et al. (2003). Reuse of graywater for landscape irrigation in small remote desert communities. **Water and Irrigation**. v. 437, p. 29-39.

GROSS, A. (2005). Environmental impact and health risks associated with greywater irrigation: a case study. **Water Science & Technology**. v. 52, n. 8, p. 161–169.

GÜNTHER, F. (2000). Waste water treatment by source separation. **Ecological Engineering**. v. 15, n. 1-2, p.139-141.

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.

HAAGENSEN,F. et al. (2002). Anaerobic treatment of sludge: focusing on reduction of lAS concentration in sludge. **Water Science and Technology**, v.6, n. 10, p. 159-165.

HAMMER, O.; HARPER, D.; RYAN, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica.** v. 4, n. 1, p. 4-9, 2001. Disponível em: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

HAN, Y.; LI, L.; LIU, J. (2013). Characterization of the airborne bacteria community at different distances from the rotating brushes in a wastewater treatment plant by 16S rRNA gene clone libraries. **Journal of Environmental Sciences**. v. 25, n. 1, p. 5–15.

HANDELSMAN, J. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**. v.5, p. 245-249.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. **Microb Ecol**., v. 35, n. 1, p. 1-21.

HERA. (2009). Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products - Linear Alkylbenzene Sulphonate, LAS.

HESPELL, R. B. (1977). *Serpens flexibilis* gen. nov., sp. nov., an Unusually Flexible, Lac tate - Oxidizing Bacterium. **International jornal of systematic bacteriology**. p. 371-381.

HESSELSOE, M. et al. (2009). Isotope array analysis of *Rhodocyclales uncovers* functional redundancy and versatility in an activated sludge. **ISME**. v.12, p. 1349-1364.

HEYLEN, K et al. (2006). Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 72, n. 4, p. 2637-2643.

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

HIPPE, H. et al. (1999). Phylogenetic analysis of Formivibrio citricus, *Propionivibrio dicarboxylicus, Anaerobiospirillum thomasii, Succinimonas amylolytica* and *Succinivibrio dextrinosolvens* and proposal of Succinivibrionaceae fam. Nov. **Int. J. Syst. Bacteriol**. v.49, n. 2, p.779-782.

HORII, Y. (2008). Arch Environ Contam Toxicol IVL; Swedish Environmental Research Institute, Results from the Swedish National Screening Programme, v.55: p. 701-710. Disponível em: http://www.imm.ki.se/Datavard/PDF/B1643_siloxaner.pdf

HOSHINO, T. et al. (2006). Long-term monitoring of the succession of a microbial community in activated sludge from a circulation flush toilet as a closed system. **FEMS Microbiol. Ecol**., v. 55, n. 3, p. 459-470.

HOTTA, Y. et al. S10-GERMS method using MALDI-TOF MS classified alkylphenol polyethoxylate degrading bacteria. Trabalho não publicado.

HOUGEN, K. H. (1979). Leptospraceae, a New Family to Include Leptospira Noguchi 1917 and Leptonema gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 29, n. 3, p. 245-251.

HOUSAINDOKH, M. R. (1993). Interaction of glucose oxidase with ionic surfactants: a microcalorimetric study. **Int. J. Biol. Macromol**. v.15, p. 337 – 341.

HSU, T. D.; LUX, M. F.; DRAKE, H. L. (1990). Expression of an aromatic-dependent decarboxylase which provides growth-essential CO2 equivalents for the acetogenic (wood) pathway of Clostridium-thermoaceticum. **Journal of Bacteriology**. v. 172, n. 10, p. 5901-5907.

HU, M. et al. (2012). Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. **Bioresource Technology**. v. 117, p. 72–79.

HU, J.; ZHANG, L. A. BETX-degrading strain HJ1. Trabalho não publicado.

HUANG, J. et al. (2007). Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgite. **Journal Environmental Management.** v.84, p. 229-236.

HUBER, J. A. et al. (2007). Microbial Population Structures in the Deep Marine Biosphere. **Science,** v.318, p. 97-100.

HUGENHOLTZ, P. (2001). Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. **Appl Environ Microbiol**. v. 67, p. 411–419.

HUTTON, M.; SYMON, C. (1986). The quantities of cadmium, lead, mercury and arsenic entering the U.K. environment from human activities. **Sci Total Environ**. v.1, n.57, p.129-50.

HYPES, W. D. (1974). Characterization of Typical household Grey Water. In: Winneberger JHT, editor. **Manual of Grey Water Treatment Practice**. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science.

IMACHI, H. et al. (2011). Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. **ISME J**. v. 5, n. 12, p. 1913-1925.

ITII. (1982). **Toxic and Hazarous Industrial Chemicals Safety Manual**. Tokyo, Japan: The International Technical Information Institute, p. 17.

ITO, T. et al. (2005). *Thiovirga sulfuroxydansgen.* nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 55, p.1059–1064.

JANGID, K. et al. (2011). Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboeground vegetation and soil properties. **Soil Biol. Biochem**. v. 43, n. 10, p. 2184-2193.

JANSSEN, P. H.; FARRELL, K. A. O. (1999). Succinate-decarboxylating anaerobic bacterium. **ISME** v. 49, n.3 , p. 1009–1013.

JANSSEN, P. H. (2006). Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S RNAr and 16S RNAr Genes. **Appl Environ Microbiol.** v.72, p.1719-1728.

JANSSEN, P. H. et al. (1996). Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium Desulfocapsa thiozymogenes gen. nov., sp. Nov. **Arch. Microbiol**. v.166, p.184-192.

JANSSEN, P. H. Geobacter hephaestius sp. nov., a sulfur- and iron-reducing bacterium isolated from anoxic rice paddy soil (Não publicado)

JAWORSKA, J. et al. (2002). Environmental risk assessment of phosphonates, used in domestic laundry and cleaning agents in the Netherlands.**Chemosphere.** v.47, p. 655-665.

JEFFERSON, B. et al. (2001). Nutrient addition to enhance biological treatment of greywater. **Water resource**. v.35, n. 11, p. 2701-2710.

JEFFERSON, B. (2000). Membrane bioreactors and their role in wastewater reuse. **Water Science Technology**. v.41, n. 1, p. 197 – 204.

JEFFERSON, B. (1999). Technologies for domestic wastewater recycling.**Urban Water**. v. 1, n. 4, p. 285-292.

JENKINS, D.; RUSSEL, L. L. (1994). Heavy Metals Contribution of Household Washing Products to Municipal Wastewater. **Water Environmental Research**, v. 66, p. 805.

JEONG, T. Y. (2007). Evaluation of methane production by the thermal pretreatment of waste activatedsludge in an anaerobic digester. **Journal Ind. Eng. Chem**. v. 13, n. 5, p. 856-863.

JEPPESEN, B. (1993). Domestic greywater reuse: preliminary evaluation. Urban Water Research Association of Australia. **Research Report**. n. 60.

JIANG, F. (2012). *Luteolibacter luojiensis* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil, and emended description of the genus Luteolibacter**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 62, n. 9, p. 2259-63.

JIMENEZ, L. et al. (1991). Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium. **Appl. Environ. Microbiology**. v. 57, p. 1566-1569.

JIN, D. (2011). Analysis of bacterial community in bulking sludge using culture-dependent and -independent approaches**. Journal of Environmental Sciences**.v. 23, n. 11, p. 1880–1887.

JIN, L. (2013). *Ferruginibacter* sp. nov. and *Caulobacter* sp. Nov Unpublished Submitted Environmental Biotechnology Research.

JONES, D. L. (2009). Soil organic nitrogen mineralization across a global latitudinal gradient. **Global biogeochemical cycles**. v. 23, p.1-5.

JOSEPH, S. J. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, p. 7210-7215.

KALMBACH, S. et al. (1999). *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. **International Journal of Systematic Bacteriology.** v.49, p.769-777.

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

KEENER, W. K.; ARP, D. J. (1994). Transformations of Aromatic Compounds by *Nitrosomonas europaea*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, n. 6, p. 1914-1920.

KELLY, D. P.; SMITH, N. A. (1990). **Adv Microb Ecol.** v. 11, p. 345-85.

KERRN-JESPERSEN, J. P.; HENZE, M.,STRUBE, R. (1994). Biological Phosphorus Release and Uptake Under Alternating Anaerobic and Anoxic Conditions in a Fixed-film Reactor. **Water Research**. v.28, n.5, p.1253-1255.

KHAN, S. T.; HIRAISHI, A. (2002). Diaphorobacter nitroreducensgen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated Sludge. **J. Gen. Appl. Microbiol**. v.48, p. 299–308.

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

KIM, B. C. et al. (2013). Comparison of the Bacterial Communities in Anaerobic, Anoxic, and Oxic Chambers of a Pilot A2O Process Using Pyrosequencing Analysis**. Curr Microbiol.** v. 66, p. 555–565.

KIM, M. K. et al. (2004). Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. **Biotechnology Letters.** p. 819–822.

KIM, M. K. et al. (2005). *Sphingopyxis granuli* sp. nov., a β-Glucosidase-Producing Bacterium in the Family Sphingomonadaceae in α-4 Subclass of the Proteobacteria. **The Journal of Microbiology**. v.43, n. 2, p.152-157.

KIMURA, K.; HARA, H.; WATANABE, Y. (2005). **Desalination**. v.178, p.135.

KNAEBEL, D. B. et al. (1996). Microbial mineralization of organic compounds in an acidic agricultural soil: Effects of preadsorption to various soil constituents. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, n. 11, p. 1865-1875.

KOBAYASHI, K. (2004). Factors Affecting Phytotoxic Activity of Allelochemicals in Soil. **Weed Biology and Management**. v. 4, n. 1, p. 1-7.

KOJIMA, H.; FUKUI, M. (2011). *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary* **Microbiology.** v.61, p. 1651–1655.

KOVAL, S. F. et al. (2013). *Bdellovibrio exovorus* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v.63, n.1, p. 146-151.

KREBS, C. J. (1990). **Ecological methodology**. 2nd ed. Addison Wesley Longman.USA 620 p.

KRIEG, N. R. et al. (2010). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, v. 4 (The Bacterioidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Plantomycetes)

KUDO, Y. et al. (1997). Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS Microbiol. Ecol**. v.22, p. 39-48.

KUEVER, J. et al. (2005). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. v. 2, The proteobacteria. 1388 p.

KULICHEVSKAYA, I. S. (2007). *Schlesneria paludicola* gen. nov., sp. nov., the first acidophilic member of the order Planctomycetales, from Sphagnum-dominated boreal wetlands. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 57, p.2680-2687.

KUMAR, S. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics.** v. 9, p. 299-306.

LAHAV, O. et al. (2009). Quantification of anammox activity in a denitrification reactor for a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**. v. 288, p.76-82.

LARSON, R. J. et al. (1994). The CLER Review, v.1, n,1, p4.

LARA-MARTIN, P. A. et al. (2007). Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonates in coastal marine sediments. **Environmental Science & Technology**. v. 41, n. 10, p. 3573-3579.

LAZAREV, V. N. et al. (2011). Complete Genome and Proteome of *Acholeplasma lailawii*. **Journal of Bacteriology.** v.49, p. 43-53.

LE, M. N. (2005). Investigation on Reuse Potential of Laundry Water for Household Garden Irrigation in Toowoomba. Trabalho de Graduação - Faculty of Engineering and Surveying University of Southern Queensland.

LEAL, L. H. et al. (2010). Comparison of Three Systems for Biological Greywater Treatment. **Water**. v.2, p.155-169.

LEAL, L. H. (2011). Characterization and anaerobic biodegradability of grey water. **Desalination.** v. 270, n.1-3, p. 111 – 115.

LEE, B. K. H. (1970). The effect of anionic and non-ionic detergents on soil microfungi. **Can J. Bot**. v. 48, p. 583-589.

LEITE, G. S.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F. (2010). Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução. **Quim. Nova**. v. 33, n. 3, p.734-738.

LEWIS, R. J. (1993). **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 12th ed. New York, NY: Van Nostrand Rheinhold Co., 847 p.

LEWIS, R. J. (1997). **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 13th ed. NY, NY: John Wiley & Sons, Inc. 1136 p.

LEWIS, R. J. (2001). **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 14th Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, 307 p.

LI, F.; WICHMANN, K.; OTTERPOHL, R. (2009). Review of the technological approaches for grey water treatment and reuses. **Science of the Environment**. v. 409, p.3439-3449.

LI, H. Q.; SCHRODER, H. F. (2000). Surfactants – standard determination methods in comparison with substance specific mass spectrometric methods and toxicity testing by *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Water Science & Technology.** V. 42, n. 7-8, p. 391–398.

LIAO, R. et al. (2013). The performance and microbial diversity of an expanded granular sludge bed reactor for high sulfate and nitrate waste brine treatment. **Journal of Environmental Sciences**. v. 13, p.60479-9.

LIESACK, W.; BAK, F. (1994). *Holophaga foetida* gen A new , homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. **Archives of Microbiology**. v. 162, n. 1-2, p. 85-90.

LIM, J. H.; BAEK, S. H.; LEE, S. T. (2009). *Ferruginibacter alkalilentusgen.* nov., sp. nov. and Ferruginibacter lapsinanissp. nov., novel members of the family 'Chitinophagaceae' in the phylum Bacteroidetes, isolated from freshwater sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**

LIMA, G. et al. 92005). **Diagnóstico ambiental das lavanderias de Toritama.** Agência Estadual de Meio Ambiente E Recursos Hídricos – CPRH, 2005. Disponível em: http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/toritama.pdf

LING, W. et al. (2007). Cloud point extraction coupled with HPLC-UV for the determination of phthalate esters in environmental water samples. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 874–878, 2007.

LINO, F. A. M. et al. (2010). Energy impact of waste recycleable ina Brazilian metropolitan. **Resources, Conversion and Recycling**. v.54, p.916-922.

LIU, Y.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. (2005). Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated Sludge. **Bioresource Technology**. v. 96, n. 11, p.1205–1214.

LIU, Y. J. et al. (2011). Alphaproteobacteria dominate active 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid herbicide degraders in agricultural soil and drilosphere. **Environ. Microbiol**. v.13, n.4, p.991-1009.

LOBNER, T. et al. (2005). Effects of process stability on anaerobic biodegradation of LAS in UASB reactors. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 89, n. 7, p.759-765.

MADSEN, T.; RASMUSSEN, H. B. (1996). A method for screening the potential toxicity of organic chemicals to methanogenic gas production. **Water Science and Technology**. v. 33, n. 6, p. 213-220.

MAGURRAN, A. (1998). **Ecological Diversity and its Measurement**. Chapman & Hall, London.

MAGURRAN, A. E. (2004). **Measuring Biological Diversity**. Blackwell Science, Oxford. Vii, 256 p.

MAHANTY**,** B.; ZAFAR, M.; PARK, H. S. (2013). Characterization of co-digestion of industrial sludges for biogas production by artificial neural network and statistical regression

models. **Environmental Technology.** Special Issue: Sustainable Technologies: Bioenergy and Biofuel from Biowaste and Biomass. v. 34**,** n. 13-14.

MALIK, A. (2005). Effect of surfactants on stability of Acinetobacter johnsonii S35 and Oligotropha carboxidovorans S23 coaggregates. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 51, p. 313–321.

MANIASSO, N. (2001). Ambientes micelares em Química Analítica. **Química Nova**, v. 24, no. 1, p. 87-93.

MARCOMINI A.; ZANETTE M. (1996). Chromatographic determination of non-ionic aliphatic surfactants of the alcohol polyethoxylate type in the environment, **Journal of Chromatography A**. v.733, p. 193-206.

MANOUSAKI, E. et al. (2004). Degradation of sodium dodecylbenzene sulfonate in water by ultrasonic irradiation. **Water Research**. v. 38, p. 3751–3759.

MARGULIES, M. et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**. v. 437, p.15.

MASTROTI, R. R. et al. (1998). Avaliação preliminar da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar. **Rev. bras. oceanogr.** v.46, n.2, p.187-193.

MATSUO, T.; NISHI, T. (2000). Actived carbon filter treatment of laundry waste water in nuclear power plants and filter recovery by heting in vacuum. **Carbon**, London, v. 38, p. 709-714.

MAUFFRET, A; TEMARA, A.; BLASCO. J. (2010). Exposure of the marine deposit feeder *Hydrobia ulvae* to sediment spiked with LAS congeners. **Water Research**, 44, p. 2831–2840.

MCCRADY, M. H. (1915). The numerical interpretation of fermentation-tube results. **J. Infect. Dis**. v.17, p.183-212.

MEDINGER, R. et al. (2010). Diversity in a hidden word: potencial and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. **Mol. Ecol.** v.19. s.1, p. 32-40.

MELLO, G. (2000). **Caracterização e Tratamento de Efluentes de uma Lavanderia Industrial**. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Civil. Universidade de Passo Fundo, 2000.

MELO, A. S.; HEPP, L. U. (2009). Ferramentas estatísticas para análise de dados provenientes de biomonitoramento. **Oeco. Brasil**. v. 12, n. 3, p. 463-486.

MENDONÇA, N. M. (2004). **Tratamento de Esgoto Sanitário Empregando Reator de Leito Expandido em Escala Plena com Zonas Anaeróbias e Aeróbias Sobrepostas, Construção e Operação.** Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

MENEZES, J. C. S. S. (2005). **Tratamento e reciclagem do efluente de uma lavanderia industrial**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MENHINICK, E. F. (1964). A comparison of some species individuals diversity indices applied to samples of field insects. **Ecology**. v.45, p.859-861.

METCALF; EDDY. (2003). Inc. **Wastewater Engineering Treatment and Reuse**. 4.ed. NewYork, Ed. McGraw – Hill Book, 1815 p.

MEYER, F. et al. (2008). The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**. v.9, n.1, p.386–8.

MEYER, I. et al. (2013). Caracterización fisiológica, molecular y genética de una cepa de Magnetospirillum aislada de un bioreactor con tolueno. Biosaia. **Revista de los másteres de Biotecnología Sanitaria y Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria de la UPO**. n.2.

MIEURE, J. P. et al. (1990). Terrestrial safety assessment of linear alkylbenzene sulfonate. **Chemosphere**. v. 21, p. 252-262.

MIQUELETO, A. P. et al. (2010). Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v.101, pp. 1324-1330.

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

MONTEGGIA, L. O.; BEAL, L. L. (1994). Evaluation of Operation Stability of Anaerobic Digestion - **7th International Symposium on Anaerobic Digestion**. Cape Town, South África.

MORAES, M. C. F. (2004). **Estudos dos efeitos da radiação ionizante na toxicidade aguda de efluentes que apresentam surfactants aniônicos**. Dissertação (Mestrado). Instituto se Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2004.

MORIYAMA, K. et al. (1989). The amount of heavy metals domestic waste water. **Water Sci. Tchnolo**. v.21, p.1913-1916.

MOSEY, F. E. (1983). Mathematical modelling of the anaerobic digestion: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 209-232.

MOTTERAN, F. (2013). **Caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbio de leito fluidificado envolvida na degradação de surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL)**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

MOURA, I.; BURSAKOVA, S.; C. COSTA, C.; MOURA, J. J.G. 1997. Nitrate and Nitrite Utilization in Sulfate-Reducing Bacteria. *Anaerobe*, v. 3,n. 5, p. 279–290, 1997.

MUYZER, G. (1999). DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems. **Curr Opin Microbiol**. v.2, p.317–322.

MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNAr. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, n. 3, p. 695-700.

NAETHER, A. (2012). Environmental Factors Affect Acidobacterial Communities below the Subgroup Level in Grassland and Forest Soils. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 78, n. 20, p. 7398–7406.

NASSAR, M. M.; EL-GEUNDI, M. S. (1991). Comparative cost of colour removal from textileeffluents using natural adsorbents. **Journal of Chemical Technology and Biotechnoogy**. v.50, p.257-265.

NATION, J. L. (1983). A New Method Using Hexamethyldisilazane for Preparation of Soft Tissues for Scanning Electron Microscopy. **Stain Technology**. v.58, p.347-351.

NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. (2007). Query-dependent banding (QDB) for faster RNA similarity searches. **PLoS Comput. Biol**.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicação. **Química Nova**. v. 25, n.5, p.772-776.

NOGALES, B. et al. (2001). Combined Use of 16S Ribosomal DNA and 16S RNAr To Study the Bacterial Community of Polychlorinated Biphenyl-Polluted Soil. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, p.1874-1884.

NOLDE, E. (1999). Greywater reuse systems for toilet flushing in multi-sotrey buildings – over ten years experience in Berlin. **Urban Water**. v. 1, n. 4, p. 275-284.

NSW HEALTH. (2000**). Greywater reuse in Sewered single domestic premises**. Sidney, Disponível em:http://www.health.nsw.gov.au/publichealth/ehb/generalwastewater/greywater_policy.pdf

NTP (2001). **Office of Liaison and Scientific Review**. National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review.

NUBEL, U. et al. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacilluspolymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. **J. Bacteriol**. v. 178, p. 5636-5643.

NYRÉN, P. (1987). Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. **Analytical Biochemistry**. v.167, p.235-238.

ODUM, E. P. (1983). **Ecologia.** Rio de Janeiro, Guanabara, 434p.

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

OKADA, D. Y. et al. (2013). Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate. **Bioresource technology**. v. 128, p. 125–33.

OKAMOTO, H. et al. (2013). Development of a fixed-bed anammox reactor with high treatment potential. **Biodegradation**. v.24, p.99–110.

ØKLAND T, WILHELMSEN E, SOLEVÅG Ø. (2005). A Study of the Priority Substances of the Water Framework Directive, monitoring and need for screening. Bergfald & Co. Norway.

OLIVEIRA, L.L. (2010). **Remoção de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

OLIVEIRA, L.L. et al. (2008). Remoção de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reator de leito fluidificado preenchido com areia como material suporte. Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP. **Seminário do Projeto Temático da FAPESP 2008**.

OLIVEIRA, L. L. (2009). Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzenenext term sulfonate in anaerobic reactors. **Journal of Environment Management**. v.90, n.2, p. 1261-1268.

O'NEIL, M. J. (2006). **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals**. 14th ed., Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., p. 1029.

O'NEIL, M. J. (2001). **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., p. 451.

OSADA, T; HAGA, K.; HARADA,Y. (1991). Removal of Nitrogen and Phosphorus from Swine Wastewater by the Activated Sludge units with the Intermittent Aeration Process. **Water Research**. v. 25, p.1377-1388.

OSAKA, T. (2008). Identification of the bacterial community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing. **FEMS Microbiol. Ecol**. v.64, n. 3, p.494-506.

OTTERPOHL, R.; BRAUN, U.; OLDENBURG, M. (2003). Innovative technologies for decentralized water, wastewater and biowaste management in urban and peri-urban areas. **Water Sci. Tech**. v.48, n.11/12, p.23 – 32.

OTTOSON, J.; STRENSTRÖM, T. A. (2003). Feacal contamination nof greywater and associated microbial risk. **Water Research**. v. 37, n. 3, p. 645-655.

PACE, N. R., STAHL, D. A.; OLSEN, G. J. (1986). The Analyzis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology.** v. 9, p. 1-55.

PAINTER, H. A.; ZABEL, T. (1989). The behavior of LAS in sewage treatment. **Tenside Surfactants Detergents**. v. 26, p. 108-115.

PAJARES, S.; SOUZA,V. Response to long-term environmental stress of aquatic bacterial communities from the Cuatro Cienegas Basin (Mexico) (Não publicado).

PARKIN, G. F., OWEN, W. F. (1986). Fundamental of anaerobic-digestion of wastewater sludge. **Journal of Environmental Engineering.** v. 112, p. 867–920.

PATEL, G. B. (1976). Characterization of strain of Methanospirillum hungatii. **Canadian Journal of Microbiology**. v.22, n.9, p. 1404-1410.

PEIXOTO, G. et al. (2012). Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied biochemistry and biotechnology.** v. 168, n. 3, p. 651–71.

PELL, L., KROHN-MOLT, I.; POMMERENING-ROESER, A. Partial 16S rRNA gene sequence of the Type Strain of *Nitrosomonas europaea*, ATCC 25978 (Nm50, C-31) (Não publicado)

PENTEADO, E. D. (2012). **Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

PENTEADO, J. C. P.; EL SEOUD, O. A.; CARVALHO, L. R. F. (2006). Linear alkylbenzene sulfonates: chemistry, environmental impact and analysis. **Quím. Nova.** v. 29, n. 5. p. 1038-1046.

PERALES, J. A. (1999). Linear alkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. **Bull. Environ. Contam.Toxicol**. v.63, p.94-100.

PHAM, V. H. (2009). Diaphorobacter oryzaesp. nov., isolated from a thiosulfate-oxidizing enrichment culture. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p.218–221.

PIKUTA, E. V. et al. (2009). Proteocatella spheniscigen. nov., sp. nov., a psychrotolerant, spore-forming anaerobe isolated from penguin guano. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**

PITAROKILI, D. (2002). Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of Salvia sclarea from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, n.23, p. 6688–6691.

PIVELLI, R. P. (2002). Qualidade das Águas. Apostila do curso Qualidade Ambiental I. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública – USP.

PRATS, D. et al. (1997). Removal of anionic and nonionic surfactants in a wastewater treatment plant with anaerobic digestion. A comparative study. **Water Research**. v. 31, n. 8, p. 1925-1930.

QIU, Y. L. (2008). Syntrophorhabdus aromaticivorans gen. nov., sp. nov., the First CulturedAnaerobe Capable of Degrading Phenol to Acetate in Obligate Syntrophic Associations with a Hydrogenotrophic Methanogen. **Applied and environmental microbiology**. v.74, p.2051–2058.

QUAISER, A. et al. (2003). Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**. v. 50. p. 563-575.

QUAN, Z.; IM, W.; LEE, S. (2006). *Azonexus caeni* sp . nov., a denitrifying bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 56, n. 5, p.1043–1046.

QUIROGA, J. M.; SALES, D.; GÓMEZ-PARRA, D. (1989). Experimental Evaluation of pollution potential of anionic surfactants in the marine environment. **Water Research.** v. 23, n. 7, p. 801-807,

RAES, J. et al. (2011). Toward molecular trait-based ecology through integration of biogeochemical, geographical and metagenomic data. **Mol Syst Biol**. v. 15, n. 7, p. 473.

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

RAND, G. M. (1995). **Fundamental of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental. Fate and Risk Assessment**. 2. Edição. Taylor & Francis.

RAPOPORT, B; ROQUE O. C. C.; FERREIRA, A. P. (2004). **Águas cinzas: caracterização, avaliação financeira e tratamento para reuso domiciliar e condominial**. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública.

REICHENBACH, H. et al. (2006). *Byssovorax cruentagen*. nov., sp. nov., nom. rev., a cellulose-degrading myxobacterium: rediscovery of 'Myxococcus cruentus' Thaxter 1897. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 56, p. 2357–2363.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. (2000). Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu latoand description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictusgen*. nov., sp. nov., *Azospira oryzaegen*. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilusgen*. nov., sp. nov. ***I*nternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 50, p.649–659.

REYNOLDS, P. J.; YOUNG, W.; MASCARENHAS, R. (1997). Study on the possible problems for the aquatic environmental related to surfactants in detergents. **EEC Report No.EC**. v. 4294, 66 p.

RIBAS, M. M.; MORAES, E. M.; FORESTI, E. (2007). Avaliação da acurácia de diversos métodos para determinação de ácidos graxos voláteis e alcalinidade a bicarbonate para monitoramento de reatores anaeróbio. **Revista Engenharia Florestal**. Rio de Janeiro, v.12, n. 3, p. 240-246.

RIBEIRO, C. P. B; CORRÊA, M. F. (2013). **Avaliação do sistema de lodo ativado de uma lavanderia industrial através da caracterização físico-química e microbiológica.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2013.

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.

RIVIERE, D. et al. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge, **ISME J**., v.6, p.700-714.

RODRIGUES, S. N. et al. (2008). Microencapsulation of Limonene for Textile Application. Industrial & Engi- neering, **Chemistry Research**. v. 47, n. 12, p. 4142-4147.

RODRIGUEZ-BRITO, B. et al. (2010). Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. **ISME J.** v. 4, n. 6, p.739-751.

RONAGHI, M.; UHLEN, M.; NYREN, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v.281, p.363- 365.

RONAGHI, M. et al. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Anal Biochem**. v. 242, p. 84 - 89.

ROSE, J. B. et al. (1991). Microbial and persistence of enteric pathogens in graywater from various household source. **Water Research**. v. 25, n. 1, p. 37-42.

SÁEZ, M. et al. (2001). **J. Anal. Chem.** v. 371, p. 486.

SAKAMOTO, I. K. (1996). **Comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo anaeróbio granulado metanogenico, submetido a adições crescente de sulfato**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.

SAKAMOTO, I. K. et al. (2012). Evaluation of microorganisms with sulfidogenic metabolic potential under anaerobic conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 55, n. 5: p.779-784, 2012.

SALANITRO, J.; DIAZ, L. (1995). Anaerobic biodegradability testing of surfactants. **Chemosphere**. v. 30, n. 5, p. 813-830.

SANTO DOMINGO, J. W. et al. (2011). Molecular survey of concrete sewer biofilm microbial communities. **Biofouling**. v.27, n. 9, p.993-1001.

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

SANZ, J. L. et al. (2003). Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Biodegradation**. v.14, p. 57-64.

SÃO PAULO. (1976). Decreto Estadual n◦ 8468. Aprova o regulamento da **Lei n◦ 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente.** Diário da Oficial da União, 8 de setembro de 1976.

SASS, H. et al. (2004). Desulfosporomusa polytropa gen. nov., sp. nov., a novelsulfate-reducing bacterium from sediments of an oligotrophic lake. **Arch Microbiol.** v. 182, p. 204–211.

SCHEIBEL, J. J. (2004). The evolution of anionicsurfactant technology to meet the requirements of the laundry detergentindustry. **J. Surfactants Detergents.** v. 7, n. 4, p. 319-328.

SCHLEIFER, K. H. et al. (1991). The genus *Magnetospirillum* gen.nov. Description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp.nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb.nov. **Syst. appl. Microbiol**. v. 14, p. 379-385.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. (2004). Status of the microbial census. Microbiology and Molecular. **Biology Reviews**. v.68, p.686.

SCHMIDT, I.; HERMELINK, C.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. (2002). Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NOx) by two different lithotrophs. **Appl Environ Microbiol.** v. 68, p.5351–5357.

SCHMIDT, T. M.; DELONG, E. F.; PACE, N.R. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S RNAr gene cloning and sequencing. **J. Bacteriol.** v.173, p.4371-4378.

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

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. **Biochimica et Biophysica acta.** v.1508, p. 235-251.

SHACKELFORD, W. M.; KEITH, L. H. (1976). Frequency of Organic Compounds Identified in Water. USEPA-600/4-76-062, p.55.

SHARP, J. O. et al. Uranium speciation and stability after reductive immobilization in aquifer sediments (Não publicado)

SCHIMIDT, I. et al. (2002). Aerobic and Anaerobic Ammonia Oxidizing Bacteria – Competitors or Natural Partners?. **FEMS Microbiology Ecology**. v.39, p.175-181.

SHROUT, J. D.; PARKIN,G. F. Isolation of Perchlorate-Reducing, Hydrogen-Utilizing, Autotrophs and other Novel Perchlorate-Degrading Bacteria. (Não publicado).

SIMBERLOFF, D.; DAYAN, T. (1991). The guild concept and the structure of ecological communities. **Annual Review of Ecology and Systematics.** v. 22, p. 115 – 143.

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

SIMPSON, E. H. (1949). Measurement of diversity. **Nature**. v.163, p. 1-688.

SINGH, H. (2006). **Mycorremediation.** New Jersey: John Wiley & Sons.

SMULDERS, E. et al. (2002). Laundry Detergents. In: Ullmann's Encyclpedia of Industrial Chemistry, 6 ed. CD-ROM. Wiley- VCH. - See more at: http://followscience.com/content/344881/estudo-da-qualidade-e-eficiencia-de-lava-roupas-desenvolvido-usando-sabao-obtido#sthash.aMOuznKh.dpuf. 2002

SOGIN, M. L. et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ─rare biosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.103, p.12115-12120.

SOLOMONS, T. W. G. (1996). Organic chemistry. 6. Ed. New York: John Wiley & Sons, 1250 p.

SPEECE, R. E. (1996). **Anaerobic biothecnology for industrial wastewaters**. Archae Press, Nashville, TN, USA.

STEBER, J.; BERGER H. (1995). Biodegradability of anionic surfactants. In: Karsa D.R.; Porter M.R. (eds.), Biodegradability of Surfactants. **Glasgow: Blackie Academic & Professional.** p. 134-182,

STOKER, H. S. (1989). Chemistry, a Science for Today. **Journal of chemical education.** MacMillan; London, p. 669-671.

SUNG, Y. et al. (2006). *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. **Appl. Environ. Microbiol**. v.72, n.4, p.2775-2782.

SWISHER, R. D. (1987). **Surfactant biodegradation**. 2. ed. Nova Iorque: CRC Press, p.17-45.

TAKEUCHI, M.; HAMANA, K.; HIRASHI, A. (2001). Proposal of the genusSphingomonas sensu strictoand three new genera,Sphingobium, NovosphingobiumandSphingopyxis, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v.51, p.1405–1417.

TAN, Z.; REINHOLD-HUREK, B. (2003). *Dechlorosoma suillum* Achenbach et al. 2001 is a later subjective synonym of *Azospira oryzae* Reinhold-Hurek and Hurek 2000. **IJSEM Intern. Journ of Sistematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, n.4, p.1139-1142.

TARASOV, A. L. et al. (2011). Isolation and investigation of anaerobic microorganisms involved in methanol transformation in an underground gas storage facility. **Microbiology**. v. 80, p. 172–179.

TAYLOR, L. R.; KEMPTON, R. A.; WOIWOD, I. P. (1976). Diversity statistics and the Log-Series model. **J. Anim. Ecol.** v.45, n.1, p.255-272.

TEDERSOO, L. et al. (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. **New Phytol**. v.188, n.1, pp. 291-301.

TIPPER, J. C. (1979). Rarefaction and rarefiction – the use and abuse of a method in paleoecology. **Paleobiology.** v. 5, p. 423 – 434.

TORRES, P. (1992). **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simunado esgoto sanitário sob diferentes condióes de operação.** Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

TRAINA, S. J.; MCAVOY, D. C.; VERSTEEG, D. J. (1996). Association of linear alkylbenzenesulfonates with dissolved humic substances and its effect on bioavailability. **Environmental Science & Technology**. v.30, n.4, p.1300-1309.

TRINGE, S. et al. 92005). Comparative metagenomics of microbial communities. **Science.** v.308, p.554 – 557.

TRUJILLO, S. (1998). Potential for greywater recycle and reuse in New Mexico. **New Mexico Journal of Science.** v. 38, p. 293-313.

TURK, S. S.; PETRINIC, I.; SIMONIC, M. (2005). Laundry wastewater treatment using coagulation and membrane filtration. **Resources, Conservation and Recycling**. v.44, p. 185-196.

UGWU, C. U.; TOKIWA, Y.; ICHIBA, T. (2011). Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by fermentation and bioconversion processes with *Azohydromonas lata.* **Bioresource Technology.** v.102 p.6766–6768.

UNZ, R. F.; FARRAH, S. R. (1972). Use of aromatic-compounds for growth and isolation of *Zoogloea*. **Applied Microbiology**. v. 23, n. 3, 1972, p. 524-529.

USEPA/OTS (1985). Tech Sup Doc Octamethyl cyclotetrasiloxane.

USEPA (1987). Toxic air pollutant/source crosswalk: A screening tool for locating possible sources emitting toxic air pollutants. Research Triangle Park, NC: USEPA, Office of Air Quality Planning and Standards. USEPA-450/4-87-023ª.

VAN HAANDEL; MARAIS, O. (1999). **Comportameno do Sistema de Lodo Ativado-Teoria e Aplicação para Projeto e Operação** - (ed) ABES. Campina Grande-Universidade Federal da Paraíba, 448p.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. (2007). The division Synergistes. **Anaerobe**. v.13, p. 99–106.

VEECH, J. A. et al. (2002). The additive partitioning of species diversity: recente revival of na old idea. **Oikos**. v.99, p.3-9.

VENTER, J. C. et al. (2001). The Sequence of the Human Genome. **Science**. v.291, p.1304-1351.

VERGE, C.; MORENO, A. (2000). Effects of anionic surfactants on *Daphnia magna*. **Tenside Surfactants Detergents**. v. 37, p. 172-175.

VERGE, C. et al. (2001). Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). **Chemosphere**. v. 44, p.1749-1757.

VIANCELLI, A. et al. (2011). Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v.54, n.5, p.1035-1041.

VOS, P. D. et al. (2009). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, v. 3 (The Firmicutes).

WAGNER, I. D.; WIEGEL, J. (2008). Diversity of thermophilic anaerobes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1125, p.1–43.

WALKER, D. (1989). Diversity and stability. In: CHERRETT, J.M., ed. Ecological concepts. Oxford, **Blackwell Scientific Public**. p.115-146.

WANG, L. et al. (2007). Cloud point extraction coupled with HPLC-UV for the determination of phthalate esters in environmental water samples. **J. Environ. Sci. (China)**. n.19., p. 874–879.

WANG, L. et al. (2012). Performance of autotrophic nitrogen removal in the granular sludge bed reactor. **Bioresource Technology**. v.123, p. 78–85.

WANG, Q. et al. (2007). Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl. Environ. Microbiol.** v.73, p.5261-5267.

WEAVER, P. F.; WALL. J. D.; GEST, H. (1975). Characterization of Rhodopseudomonas casulata. **Arch. Microbiol**. v.105, p.207-216.

WEBER, M. I. (2006). **Avaliação da eficiência de um reator anaeróbio de leito fluidizado para o tratamento de resíduos líquidos da indústria de refrigerantes**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, 2006.

WILKINS, J. R. (1999). Algaecide Composition and Methods of Removing Algae, **US Patent No. 5,856,272.**

WHITTAKER, R. H. (1960). Vegetation of the Siskioy Mountains, Oregon and California. **Ecological Monographs.** v. 30, p. 279-338.

WIEL-SHAFRAN, A. et al. (2006). Potential changes in soil properties following irrigation with surfactant-rich greywater. **Ecological Engineering**. v. 26, n. 4, p. 348-354 .

WOESE, C. R.; FOX, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.74, p.5088-5090.

WOLF, W.; FEIJTEL, T. (1998). Terrestrial risk assesment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils. **Chemosphere**. n.36, p.1319-1343.

WRIGHT, E. S. et al. (2012). A Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences. **Applied and Environmental Microbiology**. v.78, n.3, p.717-725.

XIA, S. et al. Effects of solids retention times on antibiotics removal performance and microbial communities in an A/O-MBR process. (Não publicado)

XIE, C. H.; YOKOTA, A. (2005). Reclassification of Alcaligenes latusstrains IAM 12599 T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophilaas*, *Azohydromonas latagen*. nov., comb. nov., *Azohydromonas australicasp*. nov. and *Pelomonas saccharophilagen*. nov., comb. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.55, p.2419–2425.

XU, J. (2006). Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**. v.15, n.7, p.1713–1731.

YAMADA, T. et al. (2007). *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v.57, p.2299–2306.

YAMADA, T. et al. (2006). *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and Leptolinea tardivitalis gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v.56, p.1331–1340.

YING, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environment International.** v.32, n.3, p.417-431.

YOU, S. J.; HSU, C. L.; OUYANG, C. F. (2002). Identification of the microbial diversity of wastewater nutrient removal processes using molecular biotechnology. **Biotechnology Letters**. v.24, p.1361–1366.

ZAGATTO, P. A.; GOLDSTEIN, E. G. (1991). Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. **Revista CETESB de Tecnologia: Ambiente.** v.5, p.13-20.

ZEMB, O. et al. (2011). Improvement of RNA-SIP by pyrosequencing to identify putative 4-n-nonylphenol degraders in activated sludge. **Water Research**, v.46, n.3, p.601-661.

ZHANG, H. et al. (2003). *Gemmatimonas aurantiacagen*. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetesphyl. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v.53, p.1155–1163.

ZHANG, M. H. et al. (2013). Effect of trace tetracycline concentrations on the structure of a microbial community and the development of tetracycline resistance genes in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**. v.150, p.9–14.

ZHANG, T.; SHAO, M. F.; YE, L. (2012). 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. **The ISME Journal.** v.6, p.1137–1147.

ZHANG, T.; SHAO, M. F.; YE, L. (2012) 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. **ISME J.** v.6, n.6, p.1137-47.

ZHANG, B. G. Bacteria isolated from the upper stream of Shule River (Não publicado)

ZHANG, J. et al. (2012). *Sphingobium jiangsuense* sp. nov., a 3-phenoxybenzoic acid-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 62, n. 4, p. 800-805.

ZILOUEI, H.; GUIEYSSE, B.; MATTIASSON, B. (2008). Two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of high concentrations of pentachlorophenol using Sphingobium chlorophenolicum DSM 8671 **Chemosphere**. v.72, n.11, p.1788–1794.

ZOU, H. et al. (2006). J. Role of nitrate in biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 22, n. 7, p. 701-706.

ZWIETERING, M. H. et al. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**. v. 56, n. 6, p. 1875–81.

APÊNDICES

Tabela A1 – Caracterização da água residuária de lavanderia usada na alimentação do reator.

Parâmetro	**Amostra de água de lavanderia**							
(mg.L^{-1})	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**Média**
pH	7,2	7,1	5,6	6,4	6,5	6,8	6,4	6,6±0,5
DQOb*	3.070	3.543	703	886	746	1.653	1.922	1.789±1.058
DQOf*	2.754	3.107	619	843	492	1.418	1.674	1.558±955
Alcalinidade T*	35,30	22,10	53,08	282,4	16,5	57,5	269,1	105±109
Sulfato	15,12	189,2	216,3	-	198	153,6	194	161±68
Sulfeto	0,03	0,035	0,112	0,171	0,122	151	0,21	21,7±53
SST	0,098	0,013	0,01	0,077	0,01	0,059	0,089	0,05±0,04
SSF	0,004	0,001	0,003	0,0045	0,003	0,002	0,003	0,003±0,001
SSV	0,094	0,012	0,007	0,0725	0,007	0,057	0,086	0,05±0,04
Fluoreto	20,68	1,13	7,02	14,04	6,02	4,935	8,02	8,9±6
Brometo	2,13	3,23	1,11	2,22	1,21	1,36	1,06	1,76±0,74
Nitrato	6,02	19,21	6,12	12,24	8,12	5,63	5,73	9±4,7
N-amoniacal	8,92	2,71	11,67	23,34	10,67	6,13	7,91	10,2±6
NTK	19,33	23,02	21,3	42,6	23,3	10,9	21,73	23,2±8,9
Fosfato	68,20	199,23	201,34	402,68	211,34	144,71	81,02	186,9±103,3
LAS	1.094,8	426,3	2.038,5	11.949	2.925	573	1.195	2.886±3.786
Ácidos:								
málico	-	5,14	5,22	10,44	-	-		6,93±2,5
succínico	-	7,39	-	-	-	-		7,39
lático	21,49	15,76	35,07	70,14	138,91	46,30	51,03	54,1±38,6
fórmico	6,59	3,94	3,87	7,74	6,12	2,04	8,05	5,48±2,1
acético	12,29	9,86	11,67	23,34	15,34	5,11	8,72	12,33±5,4
propiônico	10,66	10,76	12,67	25,34	29,37	9,79	11,24	15,7±7,5
isobutírico	13,79	10,92	14,84	29,68	17,04	5,68	9,04	14,43±7,2
butírico	-	-	13,91	27,82	-	-		20,87±6,9

continua...

continuação...

Parâmetro	Amostra de água de lavanderia							
(mg.L^{-1})	1	2	3	4	5	6	7	Média
isovalérico	32,26	11,96	-	-	18,16	6,05	7,83	15,25±9,5
valérico	-	-	-	-	15,06	5,02	6,43	8,84±4,4
capróico	-	-	-	-	16,38	5,46		10,9±5,5
Etanol	58,25	384,60	38,87	77,74	60,97	20,32	62,73	100,5±117,2

Tabela A2 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
0_unclassified(1)	136	1073	150	141	20	48	14	18
0_unclassified(2)	136	1073	150	141	20	48	14	18
0_unclassified(3)	136	1073	150	141	20	48	14	18
0_unclassified(4)	136	1073	150	141	20	48	14	18
0_unclassified(5)	136	1073	150	141	20	48	14	18
Acidobacteria(1)	22	38	6	5	6	4	3	2
Acidobacteria_Gp3(2)	9	0	0	0	2	0	0	0
0_unclassified(3)	2	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified(4)	2	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Bryobacter(3)	7	0	0	0	1	0	0	0
Bryobacter(4)	7	0	0	0	1	0	0	0
Bryobacter(5)	7	0	0	0	1	0	0	0
Acidobacteria_Gp6(2)	4	0	0	0	2	0	0	0
Gp6(3)	4	0	0	0	2	0	0	0
Gp6(4)	4	0	0	0	2	0	0	0
Gp6(5)	4	0	0	0	2	0	0	0
Holophagae(2)	9	38	6	5	2	4	3	2

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Holophagales(3)	9	38	6	5	2	4	3	2
Holophagaceae(4)	9	38	6	5	2	4	3	2
Geothrix(5)	0	6	2	3	0	1	1	1
Holophaga(5)	9	32	4	2	2	3	2	1
Actinobacteria(1)	0	2	0	0	0	1	0	0
Actinobacteria(2)	0	2	0	0	0	1	0	0
Actinomycetales(3)	0	2	0	0	0	1	0	0
Nocardiaceae(4)	0	2	0	0	0	1	0	0
0_unclassified(5)	0	2	0	0	0	1	0	0
Bacteroidetes(1)	104	240	494	726	15	23	25	30
0_unclassified(2)	0	33	30	15	0	4	4	2
0_unclassified(3)	0	33	30	15	0	4	4	2
0_unclassified(4)	0	33	30	15	0	4	4	2
0_unclassified(5)	0	33	30	15	0	4	4	2
Bacteroidia(2)	17	0	3	5	1	0	1	1
Bacteroidales(3)	17	0	3	5	1	0	1	1
0_unclassified(4)	0	0	0	5	0	0	0	1
0_unclassified(5)	0	0	0	5	0	0	0	1

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Porphyromonadaceae(4)	17	0	3	0	1	0	1	0
0_unclassified(5)	17	0	3	0	1	0	1	0
Flavobacteria(2)	2	29	0	0	1	5	0	0
Flavobacteriales(3)	2	29	0	0	1	5	0	0
0_unclassified(4)	2	19	0	0	1	2	0	0
0_unclassified(5)	2	19	0	0	1	2	0	0
Cryomorphaceae(4)	0	8	0	0	0	2	0	0
0_unclassified(5)	0	8	0	0	0	2	0	0
Flavobacteriaceae(4)	0	2	0	0	0	1	0	0
Cloacibacterium(5)	0	2	0	0	0	1	0	0
Sphingobacteria(2)	85	178	461	706	13	14	20	27
Sphingobacteriales(3)	85	178	461	706	13	14	20	27
0_unclassified(4)	19	121	93	163	3	5	4	5
0_unclassified(5)	19	121	93	163	3	5	4	5
Chitinophagaceae(4)	66	55	368	543	10	8	16	22
0_unclassified(5)	31	16	160	178	4	4	6	11
Ferruginibacter(5)	5	21	23	97	2	2	3	3
Flavihumibacter(5)	6	0	0	0	1	0	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Lacibacter(5)	0	0	2	9	0	0	1	2
Sediminibacterium(5)	24	18	18	12	3	2	2	1
Terrimonas(5)	0	0	165	247	0	0	4	5
Cytophagaceae(4)	0	2	0	0	0	1	0	0
Meniscus(5)	0	2	0	0	0	1	0	0
Chlamydiae(1)	0	3	0	2	0	1	0	1
Chlamydiae(2)	0	3	0	2	0	1	0	1
Chlamydiales(3)	0	3	0	2	0	1	0	1
Parachlamydiaceae(4)	0	3	0	2	0	1	0	1
Parachlamydia(5)	0	3	0	2	0	1	0	1
Chlorobi(1)	17	20	0	0	3	2	0	0
Chlorobia(2)	2	0	0	0	1	0	0	0
Chlorobiales(3)	2	0	0	0	1	0	0	0
Chlorobiaceae(4)	2	0	0	0	1	0	0	0
Chlorobaculum(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Ignavibacteria(2)	15	20	0	0	2	2	0	0
Ignavibacteriales(3)	15	20	0	0	2	2	0	0
Ignavibacteriaceae(4)	15	20	0	0	2	2	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Ignavibacterium(5)	15	20	0	0	2	2	0	0
Chloroflexi(1)	92	170	0	0	10	15	0	0
0_unclassified(2)	0	41	0	0	0	2	0	0
0_unclassified(3)	0	41	0	0	0	2	0	0
0_unclassified(4)	0	41	0	0	0	2	0	0
0_unclassified(5)	0	41	0	0	0	2	0	0
Anaerolineae(2)	92	129	0	0	10	13	0	0
Anaerolineales(3)	92	129	0	0	10	13	0	0
Anaerolineaceae(4)	92	129	0	0	10	13	0	0
0_unclassified(5)	5	11	0	0	2	4	0	0
Anaerolinea(5)	0	2	0	0	0	1	0	0
Bellilinea(5)	17	15	0	0	3	3	0	0
Leptolinea(5)	2	5	0	0	1	1	0	0
Levilinea(5)	0	4	0	0	0	1	0	0
Longilinea(5)	68	92	0	0	4	3	0	0
Euryarchaeota(1)	0	13	0	0	0	3	0	0
Methanomicrobia(2)	0	13	0	0	0	3	0	0
Methanomicrobiales(3)	0	13	0	0	0	3	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Methanospirillaceae(4)	0	13	0	0	0	3	0	0
Methanospirillum(5)	0	13	0	0	0	3	0	0
Firmicutes(1)	75	414	51	45	15	50	6	7
0_unclassified(2)	15	191	0	0	3	12	0	0
0_unclassified(3)	15	191	0	0	3	12	0	0
0_unclassified(4)	15	191	0	0	3	12	0	0
0_unclassified(5)	15	191	0	0	3	12	0	0
Bacilli(2)	2	6	0	0	1	1	0	0
Lactobacillales(3)	2	6	0	0	1	1	0	0
0_unclassified(4)	2	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Streptococcaceae(4)	0	6	0	0	0	1	0	0
Lactococcus(5)	0	6	0	0	0	1	0	0
Clostridia(2)	50	116	47	26	9	30	5	4
0_unclassified(3)	2	17	0	0	1	4	0	0
0_unclassified(4)	2	17	0	0	1	4	0	0
0_unclassified(5)	2	17	0	0	1	4	0	0
Clostridiales(3)	46	95	47	26	7	25	5	4

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
0_unclassified(4)	30	67	3	0	4	17	1	0
0_unclassified(5)	30	67	3	0	4	17	1	0
Clostridiaceae 1(4)	2	0	0	2	1	0	0	1
0_unclassified(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Thermobrachium(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Clostridiales_Incertae Sedis XI(4)	0	5	0	0	0	1	0	0
Sedimentibacter(5)	0	5	0	0	0	1	0	0
Lachnospiraceae(4)	0	0	2	2	0	0	1	1
0_unclassified(5)	0	0	2	2	0	0	1	1
Peptostreptococcaceae(4)	12	13	42	22	1	3	3	2
0_unclassified(5)	0	6	39	22	0	2	2	2
Proteocatella(5)	12	7	3	0	1	1	1	0
Ruminococcaceae(4)	2	8	0	0	1	3	0	0
0_unclassified(5)	0	2	0	0	0	1	0	0
Anaerotruncus(5)	0	4	0	0	0	1	0	0
Clostridium III(5)	0	2	0	0	0	1	0	0
Oscillibacter(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Syntrophomonadaceae(4)	0	2	0	0	0	1	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
0_unclassified(5)	0	2	0	0	0	1	0	0
Thermoanaerobacterales(3)	2	4	0	0	1	1	0	0
Thermoanaerobacteraceae(4)	2	4	0	0	1	1	0	0
0_unclassified(5)	2	4	0	0	1	1	0	0
Negativicutes(2)	8	101	4	19	2	7	1	3
Selenomonadales(3)	8	101	4	19	2	7	1	3
0_unclassified(4)	6	8	0	0	1	1	0	0
0_unclassified(5)	6	8	0	0	1	1	0	0
Veillonellaceae(4)	2	93	4	19	1	6	1	3
0_unclassified(5)	2	90	0	0	1	5	0	0
Anaerosinus(5)	0	0	0	4	0	0	0	1
Desulfosporomusa(5)	0	0	0	3	0	0	0	1
Sporomusa(5)	0	3	4	12	0	1	1	1
Fusobacteria(1)	0	0	14	5	0	0	2	2
Fusobacteria(2)	0	0	14	5	0	0	2	2
Fusobacteriales(3)	0	0	14	5	0	0	2	2
Fusobacteriaceae(4)	0	0	14	5	0	0	2	2
Cetobacterium(5)	0	0	14	5	0	0	2	2

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Gemmatimonadetes(1)	66	35	757	1283	8	4	8	12
Gemmatimonadetes(2)	66	35	757	1283	8	4	8	12
Gemmatimonadales(3)	66	35	757	1283	8	4	8	12
Gemmatimonadaceae(4)	66	35	757	1283	8	4	8	12
Gemmatimonas(5)	66	35	757	1283	8	4	8	12
Nitrospira(1)	0	0	0	2	0	0	0	1
Nitrospira(2)	0	0	0	2	0	0	0	1
Nitrospirales(3)	0	0	0	2	0	0	0	1
Nitrospiraceae(4)	0	0	0	2	0	0	0	1
Nitrospira(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Planctomycetes(1)	2	0	0	4	1	0	0	2
Planctomycetacia(2)	2	0	0	4	1	0	0	2
Planctomycetales(3)	2	0	0	4	1	0	0	2
Planctomycetaceae(4)	2	0	0	4	1	0	0	2
Schlesneria(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Singulisphaera(5)	2	0	0	2	1	0	0	1
Proteobacteria(1)	2760	779	1118	1090	75	52	60	68
0_unclassified(2)	23	361	19	17	3	5	2	3

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
0_unclassified(3)	23	361	19	17	3	5	2	3
0_unclassified(4)	23	361	19	17	3	5	2	3
0_unclassified(5)	23	361	19	17	3	5	2	3
Alphaproteobacteria(2)	147	33	151	75	18	7	15	14
0_unclassified(3)	0	0	0	2	0	0	0	1
0_unclassified(4)	0	0	0	2	0	0	0	1
0_unclassified(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Caulobacterales(3)	0	0	5	2	0	0	1	1
Caulobacteraceae(4)	0	0	5	2	0	0	1	1
Phenylobacterium(5)	0	0	5	2	0	0	1	1
Rhizobiales(3)	111	8	99	28	9	3	7	3
0_unclassified(4)	70	5	32	14	3	2	1	1
0_unclassified(5)	70	5	32	14	3	2	1	1
Aurantimonadaceae(4)	2	0	0	0	1	0	0	0
Martelella(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Beijerinckiaceae(4)	5	0	0	0	1	0	0	0
Methylocapsa(5)	5	0	0	0	1	0	0	0
Bradyrhizobiaceae(4)	34	3	65	14	4	1	5	2

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
0_unclassified(5)	24	3	28	3	1	1	2	1
Bosea(5)	8	0	14	0	2	0	2	0
Oligotropha(5)	2	0	23	11	1	0	1	1
Phyllobacteriaceae(4)	0	0	2	0	0	0	1	0
0_unclassified(5)	0	0	2	0	0	0	1	0
Rhodobacterales(3)	14	4	14	13	3	1	2	2
Rhodobacteraceae(4)	14	4	14	13	3	1	2	2
0_unclassified(5)	14	4	14	13	3	1	2	2
Rhodospirillales(3)	10	21	18	10	3	3	2	3
0_unclassified(4)	3	14	0	0	1	1	0	0
0_unclassified(5)	3	14	0	0	1	1	0	0
Acetobacteraceae(4)	7	3	3	3	2	1	1	1
0_unclassified(5)	5	0	3	3	1	0	1	1
Roseomonas(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Stella(5)	0	3	0	0	0	1	0	0
Rhodospirillaceae(4)	0	4	15	7	0	1	1	2
0_unclassified(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Magnetospirillum(5)	0	4	15	5	0	1	1	1

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Sphingomonadales(3)	12	0	15	20	3	0	3	4
Erythrobacteraceae(4)	2	0	2	3	1	0	1	1
Croceicoccus(5)	2	0	2	3	1	0	1	1
Sphingomonadaceae(4)	10	0	13	17	2	0	2	3
0_unclassified(5)	0	0	0	3	0	0	0	1
Blastomonas(5)	7	0	0	0	1	0	0	0
Sphingobium(5)	0	0	4	12	0	0	1	1
Sphingopyxis(5)	3	0	9	2	1	0	1	1
Betaproteobacteria(2)	519	175	781	854	28	18	26	31
0_unclassified(3)	0	0	53	43	0	0	1	2
0_unclassified(4)	0	0	53	43	0	0	1	2
0_unclassified(5)	0	0	53	43	0	0	1	2
Burkholderiales(3)	98	12	63	91	6	2	8	10
0_unclassified(4)	2	0	15	8	1	0	2	2
0_unclassified(5)	2	0	15	8	1	0	2	2
Alcaligenaceae(4)	12	4	0	0	1	1	0	0
Azohydromonas(5)	12	4	0	0	1	1	0	0
Burkholderiales_incertae_sedis(4)	5	0	11	15	1	0	1	2

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Aquabacterium(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Piscinibacter(5)	5	0	11	13	1	0	1	1
Comamonadaceae(4)	79	8	21	38	3	1	4	5
0_unclassified(5)	0	0	4	2	0	0	1	1
Curvibacter(5)	0	0	8	33	0	0	2	3
Diaphorobacter(5)	79	8	9	3	3	1	1	1
Oxalobacteraceae(4)	0	0	16	30	0	0	1	1
Janthinobacterium(5)	0	0	16	30	0	0	1	1
Hydrogenophilales(3)	7	22	0	0	1	2	0	0
Hydrogenophilaceae(4)	7	22	0	0	1	2	0	0
Thiobacillus(5)	7	22	0	0	1	2	0	0
Nitrosomonadales(3)	27	51	0	0	2	3	0	0
Nitrosomonadaceae(4)	27	51	0	0	2	3	0	0
Nitrosomonas(5)	27	51	0	0	2	3	0	0
Rhodocyclales(3)	387	90	665	720	19	11	17	19
Rhodocyclaceae(4)	387	90	665	720	19	11	17	19
0_unclassified(5)	142	54	387	337	7	6	6	8
Azonexus(5)	20	8	0	0	3	1	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Azospira(5)	0	0	8	15	0	0	2	2
Azovibrio(5)	0	2	4	13	0	1	1	1
Dechloromonas(5)	47	0	0	0	2	0	0	0
Denitratisoma(5)	0	2	0	4	0	1	0	1
Propionivibrio(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Shinella(5)	4	0	0	0	1	0	0	0
Sterolibacterium(5)	0	0	2	0	0	0	1	0
Sulfuritalea(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Zoogloea(5)	174	24	264	347	6	2	7	5
Deltaproteobacteria(2)	2025	82	80	65	19	14	6	6
0_unclassified(3)	3	7	6	2	1	2	1	1
0_unclassified(4)	3	7	6	2	1	2	1	1
0_unclassified(5)	3	7	6	2	1	2	1	1
Bdellovibrionales(3)	19	3	54	46	4	1	3	3
Bdellovibrionaceae(4)	19	3	54	46	4	1	3	3
Bdellovibrio(5)	19	3	41	44	4	1	2	2
Vampirovibrio(5)	0	0	13	2	0	0	1	1
Desulfobacterales(3)	1945	33	0	2	7	3	0	1

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Desulfobulbaceae(4)	1945	33	0	2	7	3	0	1
Desulfobulbus(5)	1945	33	0	2	7	3	0	1
Desulfuromonadales(3)	42	19	3	0	3	2	1	0
Geobacteraceae(4)	42	19	3	0	3	2	1	0
Geobacter(5)	42	19	3	0	3	2	1	0
Myxococcales(3)	11	2	17	15	2	1	1	1
0_unclassified(4)	7	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified(5)	7	0	0	0	1	0	0	0
Polyangiaceae(4)	4	2	17	15	1	1	1	1
Byssovorax(5)	0	0	17	15	0	0	1	1
Chondromyces(5)	4	2	0	0	1	1	0	0
Syntrophobacterales(3)	5	4	0	0	2	2	0	0
Syntrophaceae(4)	3	4	0	0	1	2	0	0
Smithella(5)	3	4	0	0	1	2	0	0
Syntrophobacteraceae(4)	2	0	0	0	1	0	0	0
0_unclassified(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Syntrophorhabdaceae(3)	0	14	0	0	0	3	0	0
Syntrophorhabdaceae(4)	0	14	0	0	0	3	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Syntrophorhabdus(5)	0	14	0	0	0	3	0	0
Epsilonproteobacteria(2)	0	0	11	16	0	0	3	2
Campylobacterales(3)	0	0	11	16	0	0	3	2
Campylobacteraceae(4)	0	0	11	16	0	0	3	2
Arcobacter(5)	0	0	11	16	0	0	3	2
Gammaproteobacteria(2)	46	128	76	63	7	8	8	12
0_unclassified(3)	2	10	0	0	1	1	0	0
0_unclassified(4)	2	10	0	0	1	1	0	0
0_unclassified(5)	2	10	0	0	1	1	0	0
Aeromonadales(3)	16	0	6	11	1	0	1	1
Aeromonadaceae(4)	16	0	6	11	1	0	1	1
0_unclassified(5)	16	0	6	11	1	0	1	1
Chromatiales(3)	0	3	0	0	0	1	0	0
Halothiobacillaceae(4)	0	3	0	0	0	1	0	0
Thiovirga(5)	0	3	0	0	0	1	0	0
Enterobacteriales(3)	0	2	0	2	0	1	0	1
Enterobacteriaceae(4)	0	2	0	2	0	1	0	1
0_unclassified(5)	0	2	0	0	0	1	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Morganella(5)	0	0	0	2	0	0	0	1
Gammaproteobacteria_incertae_sedis(3)	0	0	0	3	0	0	0	1
0_unclassified(4)	0	0	0	3	0	0	0	1
0_unclassified(5)	0	0	0	3	0	0	0	1
Methylococcales(3)	16	0	27	8	2	0	1	1
Methylococcaceae(4)	16	0	27	8	2	0	1	1
0_unclassified(5)	0	0	27	8	0	0	1	1
Methylomonas(5)	16	0	0	0	2	0	0	0
Pseudomonadales(3)	10	2	33	25	2	1	5	5
Pseudomonadaceae(4)	10	2	33	25	2	1	5	5
0_unclassified(5)	7	2	9	9	1	1	3	3
Azorhizophilus(5)	3	0	0	0	1	0	0	0
Serpens(5)	0	0	24	16	0	0	2	2
Xanthomonadales(3)	2	111	10	14	1	4	1	3
Xanthomonadaceae(4)	2	111	10	14	1	4	1	3
0_unclassified(5)	0	10	0	5	0	1	0	1
Pseudoxanthomonas(5)	2	0	10	4	1	0	1	1
Rhodanobacter(5)	0	101	0	0	0	3	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Thermomonas(5)	0	0	0	5	0	0	0	1
Spirochaetes(1)	0	7	77	72	0	1	6	6
Spirochaetes(2)	0	7	77	72	0	1	6	6
Spirochaetales(3)	0	7	77	72	0	1	6	6
Leptospiraceae(4)	0	7	77	72	0	1	6	6
Leptonema(5)	0	0	4	7	0	0	1	1
Leptospira(5)	0	0	9	18	0	0	2	2
Turneriella(5)	0	7	64	47	0	1	3	3
Synergistetes(1)	2	116	3	17	1	5	1	3
Synergistia(2)	2	116	3	17	1	5	1	3
Synergistales(3)	2	116	3	17	1	5	1	3
Synergistaceae(4)	2	116	3	17	1	5	1	3
0_unclassified(5)	2	60	0	6	1	2	0	1
Aminomonas(5)	0	54	3	11	0	2	1	2
Synergistes(5)	0	2	0	0	0	1	0	0
Tenericutes(1)	0	42	0	0	0	2	0	0
Mollicutes(2)	0	42	0	0	0	2	0	0
Acholeplasmatales(3)	0	42	0	0	0	2	0	0

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	Número de sequências				Número de UTOs			
	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V	A-IV	SF-IV	A-V	SF-V
Acholeplasmataceae(4)	0	42	0	0	0	2	0	0
Acholeplasma(5)	0	42	0	0	0	2	0	0
Verrucomicrobia(1)	49	70	301	379	4	6	8	6
0_unclassified(2)	0	16	0	0	0	2	0	0
0_unclassified(3)	0	16	0	0	0	2	0	0
0_unclassified(4)	0	16	0	0	0	2	0	0
0_unclassified(5)	0	16	0	0	0	2	0	0
Spartobacteria(2)	2	45	0	0	1	1	0	0
0_unclassified(3)	0	45	0	0	0	1	0	0
0_unclassified(4)	0	45	0	0	0	1	0	0
0_unclassified(5)	0	45	0	0	0	1	0	0
Spartobacteria_genera_incertae_sedis(3)	2	0	0	0	1	0	0	0
Spartobacteria_genera_incertae_sedis(4)	2	0	0	0	1	0	0	0
Spartobacteria_genera_incertae_sedis(5)	2	0	0	0	1	0	0	0
Subdivision3(2)	29	7	270	269	2	2	5	3
Subdivision3_genera_incertae_sedis(3)	29	7	270	269	2	2	5	3
Subdivision3_genera_incertae_sedis(4)	29	7	270	269	2	2	5	3
Subdivision3_genera_incertae_sedis(5)	29	7	270	269	2	2	5	3

continua...

Tabela A3 – Descrição dos táxons da biomassa da areia e separador de fases das Etapas IV e V por pirosequenciamento 454 e respectivos números de sequencias e UTOs.

Rótulos de Linha	**Número de sequências**				**Número de UTOs**			
	A-IV	**SF-IV**	**A-V**	**SF-V**	**A-IV**	**SF-IV**	**A-V**	**SF-V**
Verrucomicrobiae(2)	18	2	31	110	1	1	3	3
Verrucomicrobiales(3)	18	2	31	110	1	1	3	3
Verrucomicrobiaceae(4)	18	2	31	110	1	1	3	3
Luteolibacter(5)	18	0	0	0	1	0	0	0
Prosthecobacter(5)	0	2	31	110	0	1	3	3
Total Geral	**3325**	**3022**	**2971**	**3771**	**158**	**217**	**133**	**158**

UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais). (1) – Filo; (2) – Classe; (3) – Ordem; (4) – Familia; (5) – Gênero

Tabela A4 – Caracterização da água de lavanderia utilizada no ensaio de potencial metanogênico

Parâmetros	**Valor (mg.L^{-1})**	**Parâmetros**	**Valor (mg.L^{-1})**
pH	6,16	Glicose	5,5
Alcalinidade Total	23,05	Etanol	134,7
DQO bruta	1952,5	Frutose	1,5
DQO filtrada	1542,5	Ácido Cítrico	2,9
LAS	1000	Ácido Málico	3,0
SST	0,0895	Ácido Succínico	5,8
SSF	0,0095	Ácido Lático	92,9
SSV	0,08	Ácido Fórmico	6,9
Sulfato	231,1	Ácido Acético	3,8
Cloreto	121,6	Ácido Propiônico	16,7
Nitrato	8,09	Ácido Isobutírico	1,0
NTK	35,9	Ácido Butírico	2,4
Fosfato	28,8	Ácido Isovalérico	3,9

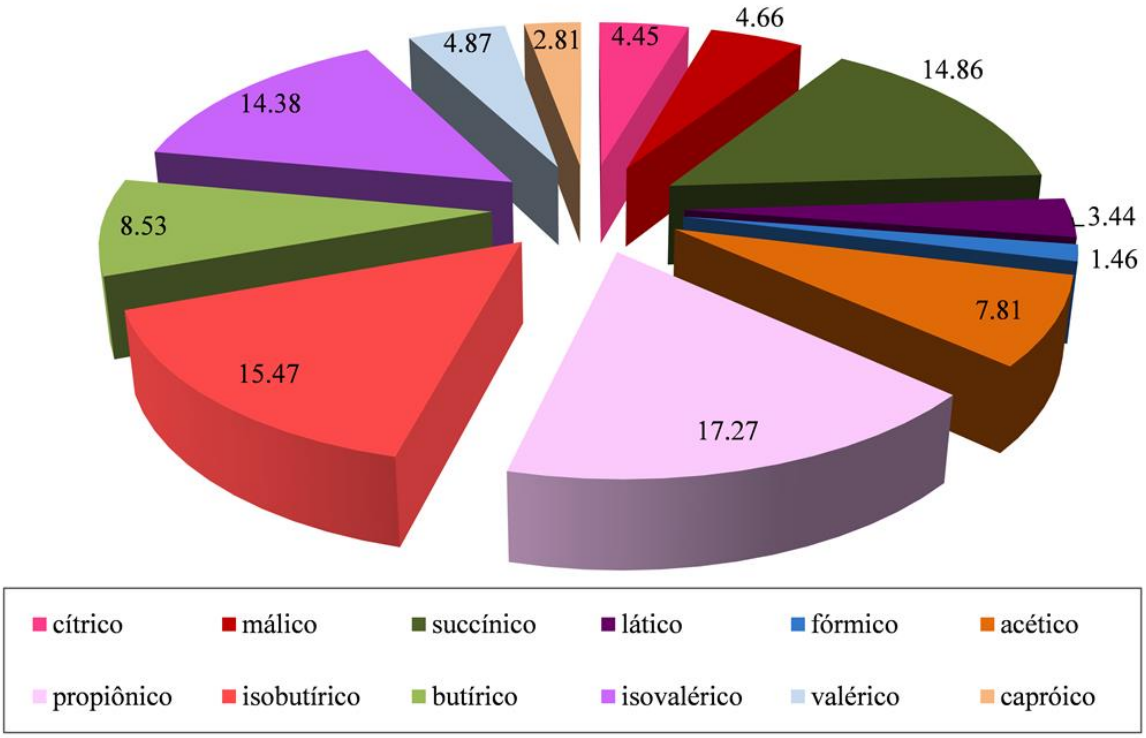

Figura A1 – Distribuição da produção de ácidos orgânicos no período de inoculação em porcentagem (%)

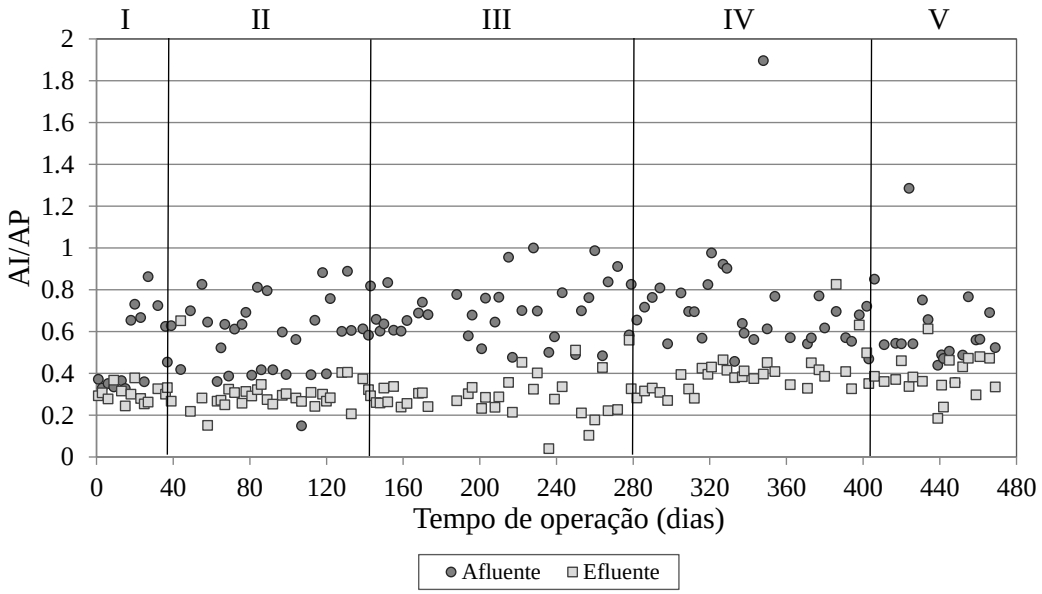

Figura A2 – Variação temporal da relação Alcalinidade Intermediária/Alcalinidade Parcial (AI/AP) afluente e efluente