

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Departamento de Hidráulica e Saneamento

GUNTHER BRUCHA

**Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do
pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos
do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo.**

São Carlos
2007

GUNTHER BRUCHA

**Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do
pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos
do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo.**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Engenharia Civil.

Área de Concentração: Hidráulica e
Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena
Vazoller

São Carlos
2007

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

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

B887i Brucha, Gunther
Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na
degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade
microbiana dos sedimentos enriquecidos do Estuário de
Santos-São Vicente, Estado de São Paulo / Gunther Brucha
; orientadora Rosana Filomena Vazoller. -- São Carlos,
2007.

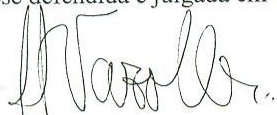
Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2007.

1. Tratamento de águas residuárias. 2. Desalogenação
reduativa do PCP. 2. Reator anaeróbio horizontal de leito
fixo. 3. Teoria dos recursos limitantes.
4. Biorremediação anaeróbia. 5. Estuário de Santos-São
Vicente. 6. Arquéias metanogênicas halofílicas.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO


Candidato: Bacharel **GUNTHER BRUCHA**

Tese defendida e julgada em 01/10/2007 perante a Comissão Julgadora:



APROVADO

Prof.^a Dr.^a **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Colaboradora – Instituto de Ciências Biomédicas/USP)



APROVADO

Prof. Titular **EUGENIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)



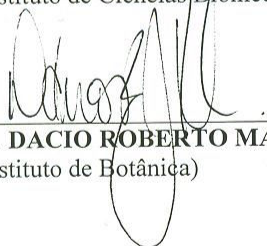
APROVADO

Dr.^a **MÁRCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC**
(Pós-Doutoranda/FAPESP)



APROVADO

Prof.^a Dr.^a **VIVIAN HELENA PELLIZARI**
(Instituto de Ciências Biomédicas/USP)

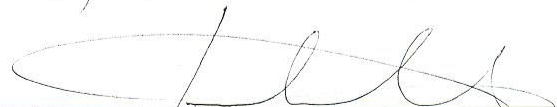


APROVADO

Dr. **DACIO ROBERTO MATHEUS**
(Instituto de Botânica)



Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia (Hidráulica e Saneamento)



Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

*Dedico este trabalho às mulheres de minha vida
Que me fizeram acreditar e lutar
ainda mais por um futuro melhor*

*À minha esposa Adriana
Às minhas filhas Clara e Luiza
Com todo amor*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Rosana Filomena Vazoller, pela orientação, amizade e compreensão das decisões tomadas. Pessoa iluminada, brilhante, amiga, acolhedora, que me inseriu no maravilhoso mundo dos microrganismos anaeróbios e sempre incentivou meu crescimento acadêmico profissional. Rô, muito obrigado por estes últimos 8 anos. Você teve influencia direta em minha formação pessoal e profissional. Terei você, sempre, como exemplo a ser seguido. Sua benção, Madrinha.

À Dra. Márcia Damianovic, pelo aceite na orientação e por estar sempre presente em todas as fases deste trabalho, contribuindo no delineamento de estratégias, na tomada de decisões e nas orientações durante a confecção de relatórios e da presente Tese. Agradeço também pela amizade, incentivo e por todo carinho.

À minha linda família, Adriana, Clara e Luiza, por tudo. Vocês são o motivo de todo meu esforço.

Aos meus Pais, Werner Brucha e Rose Marie Siciliani Brucha (*in memoriam*), por todo esforço e carinho dedicados à minha criação. Fica o pesar de não poder abraçá-los agora e compartilhar a alegria da tarefa cumprida.

Aos meus irmãos, Werner e Érika e cunhados, Silvia e Edmundo, pelo contínuo apoio e incentivo dados ao longo da realização deste trabalho e de todos os outros.

Aos meus sobrinhos João Victor e Pedro Henrique, pela nova vida que trouxeram a família.

À Roberto, Diva, Tatiana, Cris, Allan, Marcelo e minha sobrinha Camila, pelo acolhimento, paciência, ajuda e agradável convívio nos últimos 5 anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (proc. 03/07946-5).

A CAPES pela concessão de Bolsa de estudo durante os primeiros 6 meses deste doutorado.

À CETESB pela disponibilização de toda a logística e ao técnico Osvaldo pela ajuda na coleta do sedimento do Estuário de Santos –São Vicente.

Ao pesquisador Dr. Marcelo Bento, pela imprescindível ajuda e ensinamento na determinação da taxa de emissão de metano do sedimento.

Ao Prof. Dr. Eugênio Foresti, pelas contribuições durante as bancas de qualificação, pelo apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Maria Bernadete Varesche, pelas sugestões, conselhos, convívio e amizade durante estes últimos 8 anos.

Às queridas Beth Moraes, Janja e Eloisa pelos gratificantes momentos compartilhados e pela ajuda e ensinamento nas análises cromatográficas e microscópicas. Saudades...

Ao Prof. Dr. Fernando Lanças e ao técnico Guilherme Mota, pela possibilidade de uso do cromatógrafo gasoso, com espectrômetro de massa.

A todos os professores do Departamento de Hidráulica e Saneamento, pelo agradável convívio, em especial ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat e Profa. Dra. Maria do Carmo Calijuri, pelas orientações e conselhos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, em especial a Sandra, Cristine Barreto, Cristina Nakayama e Carol, pela disponibilidade de uso do DGGE e pela ajuda.

Ao Paulo, Júlio e Cidinha do Laboratório de Saneamento por estarem sempre dispostos a ajudar e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento Pavi, Sá, Flávia, André e Wagner pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Flavinha, Mércia e Lara, minhas irmãs, pela grande amizade, excelente convívio e ótimos momentos de descontração.

A todos os colegas do Departamento de Hidráulica e Saneamento, em especial do Laboratório de Processos Biológicos, com quem convivi nos últimos 8 anos, desde o mestrado, e que proporcionaram um ambiente saudável e gostoso de trabalhar. Não citarei nomes, para não cometer injustos esquecimentos. Muito Obrigado por tudo pessoal...

Aos Professores do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Rondônia, pelo apoio e compreensão nos últimos momentos desta tese.

A Johannes Janzen, Renata Aguiar e Leonardo Damasceno pelo essencial auxílio nas análises estatísticas e comparações de modelo de isoterma de adsorção.

Não poderia deixar de agradecer a todos os meus amigos de república e faculdade, em especial ao Guilherme, João Durval, Cendi, Jairo, Peninha, Grego, Bispo, Sorrizo, Zuba, Thais, Geli, Cris, Ana, Danilo, Samantha, Thiago, Heitor e Guinso, por toda a amizade.

Aos meus afilhados Helena e João Victor, com todo amor.

Aos Amigos de infância, Henrique, Zoner, Arthur, Tochinha e Serginho, que mesmo longe, pude sentir as boas vibrações enviadas. Aos ausentes Thiago e Milton, aonde quer que estiverem recebam meu forte abraço. SAUDADES.

À minha querida família, aos tios, tias, primos, primas.

À Sioni Maluf Barbieri (*in memoriam*), sempre. Por me inserir e incentivar ao mundo acadêmico. Serei sempre grato.

À DEUS, por ter me dado saúde e força para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO

Gunther

RESUMO

BRUCHA, G. (2007). Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana natural dos sedimentos do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo. Tese (doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

A pesquisa que ora se apresenta visou estabelecer as condições nutricionais adequadas para o uso do sedimento do estuário de Santos – São Vicente do Estado de São Paulo, como inóculo no Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) no processo de degradação anaeróbia do pentaclorofenol (PCP) em busca da aplicação da tecnologia em escala real, assim como identificar grupos microbianos envolvidos no processo. Para tanto, sedimento do estuário de Santos-São Vicente, com características metanogênicas foi utilizado. Os microrganismos provenientes do sedimento estuarino foram enriquecidos sob condições metanogênicas e halofílicas, visando a utilização do sedimento como inóculo nos ensaios nutricionais e na operação dos reatores do tipo RAHLF. O meio de cultivo salino Biota, suplementado com glicose e formiato, foi utilizado para o desenvolvimento da comunidade microbiana metanogênica halofílica.

Testes de degradação do PCP foram realizados previamente sob diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, com vistas a uma melhor compreensão da relação N:P adequada para o processo anaeróbio. Os resultados provenientes do acompanhamento da diversidade microbiana do Domínio *Bacteria* nas diferentes relações testadas indicaram a seleção de distintas comunidades microbianas, resultando em diferentes velocidades de degradação do PCP. A relação N:P de 10:1 foi a que apresentou melhores resultados, pois além da rápida degradação do PCP quando comparada com as outras relações, apresentou a maior diversidade de microrganismos.

Posteriormente, o sistema RAHLF foi operado com vazão média afluyente de aproximadamente 44 ml/hora, com meio mineral salino Biota (DQO:N:P de 1000:130:45) para R1 e com a alteração para relação DQO:N:P de 1000:10:1 para R2. Duas diferentes estratégias foram adotadas para partida dos reatores. Para R1, optou-se por acrescentar PCP na concentração inicial de 10,0 mg.L⁻¹, durante 110 dias causando desestabilização da metanogênese e acúmulo de PCP, requerendo intervenção para recuperação do reator pelo período de 90 dias. Na partida do RAHLF 2, optou-se pelo aumento gradual de concentração do PCP de 0,5 mg.L⁻¹ a 12,0 mg.L⁻¹ durante 52 dias. Após estabelecimento da metanogênese, R1 foi alimentado durante de 270 dias com 5,0 mg PCP.L⁻¹, durante 41 dias com 8,0 mg.L⁻¹ e 59 dias com 12 mg.L⁻¹. O balanço de massa no reator RAHLF 1 demonstrou que 0,52% do PCP adicionado saiu no efluente e que não ocorreu adsorção no sistema. 22,34 mg de 2,4,6 TCP, intermediário da degradação do PCP, ficaram adsorvidos na biopartícula. Os resultados das análises de diversidade microbiana apontaram para mudança da comunidade microbiana do Domínio *Bacteria* ao longo do período operacional e morfologias de bacilos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp estiveram presentes no reator.

No RAHLF 2, a degradação do PCP foi de 100%, até a concentração de 10,0 mg.L⁻¹. No final da fase com 12,0 mgPCP.L⁻¹, a concentração no efluente foi de 1,4 mgPCP.L⁻¹, com eficiência média de remoção de 93,2 ± 5,5 %. 2,4,6 TCP foi o intermediário principal no efluente do reator. 4,06 % do PCP adicionado ao sistema foram encontradas no efluente e 15,94% ficaram adsorvidas nas biopartículas do reator. Portanto, considera-se que 80% do PCP adicionado sofreu degradação anaeróbia microbiana. A presença dos microrganismos *Methanocaldococcus* e *Methanosaeta* na fase final de operação do RAHLF 2 e determinadas no sedimento coletado foi considerada fundamental para manter estabilidade do reator. Essa descoberta contribui com informações sobre a real diversidade microbiana de ecossistemas tropicais, sobretudo em habitats anaeróbios, bem como sobre as condições nutricionais e os procedimentos necessários para confiná-la em reatores e usá-la em processos de biorremediação.

Palavras-chaves: desalogenação redutiva do PCP, reator anaeróbio horizontal de leito fixo, teoria dos Recursos Limitantes, biorremediação anaeróbia, Estuário de Santos-São-Vicente, arqueias metanogênicas halofílicas.

ABSTRACT

BRUCHA, G. (2007). *Influence of nitrogen and phosphorus nutrients on the anaerobic degradation of pentachlorophenol and on the natural microbial diversity of sediments from the Santos-São Vicente Estuary, state of São Paulo, Brazil*. Doctoral thesis. São Carlos School of Engineering, University of São Paulo – USP, São Carlos, SP, Brazil

The research presented here aimed to determine the optimal nutritional conditions for the use of sediment from the Santos-São Vicente estuary in the state of São Paulo, Brazil, as an inoculum for a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor (HAIB) applied to the anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP), seeking to apply the technology on the real scale and to identify the microbial groups involved in the process. To this end, sediment with methanogenic characteristics from the Santos-São Vicente estuary was used. The microorganisms from the estuarine sediment were enriched under methanogenic and halophilic conditions, aiming to use the sediment as an inoculum in nutritional assays and in the operation of HAIB reactors. Biota saline culture medium supplemented with glucose and formiate was used to develop the halophilic methanogenic microbial community.

PCP degradation tests were carried out previously under different concentrations of nitrogen and phosphorus in order to gain a better understanding of the optimal N:P ratio for the anaerobic process. The findings on the microbial diversity of the Domain *Bacteria* at the various ratios tested here indicated the selection of distinct microbial communities, resulting in different PCP degradation velocities. The N:P ratio utilized was 10:1 since it presented the best results not only in terms of faster PCP degradation than the other ratios but also the highest diversity of microorganisms.

The HAIB reactor was then operated with a mean inflow of approximately 44 ml/hour, using the Biota saline mineral medium with a COD:N:P ratio of 1000:130:45 in R1 (reactor 1) and a COD:N:P ratio of 1000:10:1 in R2. Two distinct strategies were adopted to start up the reactors. In R1, PCP was added at an initial concentration of 10.0 mg.L⁻¹ for 100 days, causing destabilization of the methanogenesis and accumulation of PCP, requiring a 90-day intervention for the reactor's recovery. To start up R2, the PCP concentration was increased gradually from 0.5 mg.L⁻¹ to 12.0 mg.L⁻¹ for 52 days. After methanogenesis was established, R1 was fed for 270 days with 5.0 mg of PCP.L⁻¹, followed by 41 days with 8.0 mg.L⁻¹ and 59 days with 12 mg.L⁻¹. The mass balance in R1 indicated that 0.52% of the added PCP exited through the reactor's outflow and that adsorption of the system did not occur. 22.34 mg of 2,4,6 TCP, an intermediary of PCP degradation, was adsorbed in the bioparticles. The results of the analysis of microbial diversity indicated a change in the microbial community of the Domain *Bacteria* along the operational period, with fluorescent bacilli morphologies resembling *Methanobacterium* sp present in the reactor.

PCP degradation in R2 was 100% up to a concentration of 10.0 mg.L⁻¹. At the end of the phase with 12.0 mgPCP.L⁻¹, the effluent concentration was 1.4 mgPCP.L⁻¹, with a mean removal efficiency of 93.2 ± 5,5 %. 2,4,6 TCP was the main intermediary in the reactor's effluent. 4.06% of the PCP added to the system was found in the effluent and 15.94% was adsorbed in the bioparticles of the reactor. Therefore, it was concluded that 80% of the added PCP underwent microbial anaerobic degradation. The presence of *Methanocalculus* and *Methanosaeta* microorganisms in the final operating phase of R2, which was determined in the collected sediment, was considered fundamental for maintaining the reactor's stability. This discovery contributes to the body of information about the real microbial diversity of tropical ecosystems, above all in anaerobic habitats, and about the nutritional conditions and procedures involved in confining these microorganisms in reactors and using them in bioremediation processes.

Keywords: reductive dehalogenation of PCP, horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, Resource Ratio Theory, anaerobic bioremediation, Santos-São Vicente Estuary, halophilic methanogenic archaea.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da molécula do Pentaclorofenol	30
Figura 2: Rota metabólica principal de degradação do PCP no Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado, segundo os experimentos de Khodadoust et al., 1997, com etanol como fonte de carbono simples.	35
Figura 3: Rota metabólica secundária de degradação do PCP no Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado. Fonte: Khodadoust et al., 1997 – com etanol como fonte de carbono simples.	36
Figura 4: Modelo de degradação do fenol pela rota do ácido benzóico ou carboxilação do fenol, segundo Londry e Fedorak (1992).	37
Figura 5: Esquema da conversão de benzoato a metano em ambientes anaeróbios, Segundo Fang et al. (1997). Legenda: BAS - bactérias acetogênicas sintróficas; BRS-I – bactérias redutores de sulfato que realizam a degradação incompleta do substrato; BRS-C - bactérias redutores de sulfato que oxidam completamente o substrato; APM- produtoras de metano acetoclásticas e hidrogenotróficas	37
Figura 6: Diagrama geral de diferentes métodos moleculares usados para determinar a diversidade de populações microbianas mistas (Muyzer <i>et al.</i> , 1996).	64
Figura 7: Esquema geral do trabalho de pesquisa da presente tese de doutorado	73
Figura 8. Área de estudo, região da Baixada Santista, São Paulo.	74
Figura 9: Local da coleta (frente da Companhia Siderúrgica Paulista – COSIPA)	75
Figura 10: Procedimento de transferência do sedimento dos “cores” para os frascos Duran sob condições de anaerobiose.	77
Figura 11: Câmara de difusão de gases	80
Figura 12: Ampola gasométrica	80
Figura 13: Frasco reator utilizado no enriquecimento da amostra de sedimento	87
Figura 14: Imagem fotográfica do procedimento de troca do meio de cultura e retiradas de amostra: a) abertura do frasco reator sob assepsia e fluxo de N ₂ no meio de cultura a ser acrescentado, b) processo de sifonamento do meio de cultura, após retirada de amostras para análises, c) acréscimo do meio de cultura novo sob fluxo de N ₂ /CO ₂ , d) acréscimo das fontes de carbono, vitaminas, bicarbonato, solução redutora de sulfeto de sódio, PCP e macronutrientes sob fluxo de N ₂ /CO ₂	87
Figura 15: Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). As letras A, B, C, D e E correspondem ao frasco de alimentação, reservatório de N ₂ , bomba peristáltica, reator e sistema coletor de gás, respectivamente. L/D corresponde aos pontos de amostragem nas relações comprimento/diâmetro ao longo do reator	88
Figura 16: Representação gráfica dos valores de metano (%) e indicação das alimentações efetuadas ao longo dos dias de operação durante enriquecimento do sedimento a ser utilizado como inoculo na operação do RAHLF 1 (a) e no RAHLF 2 (b)	123
Figura 17: Representação gráfica dos valores de PCP (mg/g espuma) adsorvido na biomassa imobilizada ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.	129
Figura 18: Representação gráfica dos valores de PCP na fração líquida ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.	129
Figura 19: Representação gráfica dos valores dos compostos intermediários passíveis de medição no sistema de reação, ao longo do experimento na fração líquida	130

- Figura 20: Fotos do géis de DGGE. (a) e (b) DGGE dos produtos de PCR usando primers do 131
Domínios *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente, com gradientes de géis iguais a 30 e
70%. Legenda da Figuras: 1; 3; 5 – Pontos 1,3 e 5 do reator antes da adição do PCP; 2;
4; 6 – Pontos 1,3 e 5 do reator após a saturação da biomassa com PCP.
- Figura 21: Representação gráfica da variação de valores do gás metano em relação ao tempo 142
(dias) durante a fase 1 nos diferentes ensaios.
- Figura 22: Representação gráfica da variação de valores do gás metano em relação ao tempo 143
(dias) durante a fase 2 nos diferentes ensaios.
- Figura 23: Representação gráfica da variação de valores do gás metano em relação ao tempo 143
(dias) durante a fase 3 nos diferentes ensaios.
- Figura 24: Representação gráfica da variação de valores do gás metano em relação ao tempo 144
(dias) durante a fase 4 nos diferentes ensaios.
- Figura 25: Fotos do gel de DGGE. Produtos de PCR usando primers do Domínio *Bacteria*, com 148
gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda: I-Inóculo; 1 – 1000:0:0 (DQO:N:P); 2 –
1000:5:1; 3 – 1000:5:2; 4 – 1000:10:0; 5 – 1000:10:1; 6 – 1000:10:2; 7 – 1000:15:2; 8
– 1000:20:5; 9 – 1000:50:10; 10 – 1000:130:45.
- Figura 26. Reatores anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) inoculado, por bombeamento 149
em circuito fechado, durante 72 horas, do sedimento enriquecido em meio mineral
Biota.
- Figura 27: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a 151
presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 1 do reator: a) bacilos
retos com extremidade arredondada; b) bacilos retos, bacilos curvos e cocos; c)
filamento fino; d) cocos e filamentos curvos; e) cocos, filamentos finos e bacilos
pequenos; f) morfologia semelhante ao gênero *Methanosarcina* sp.
- Figura 28: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a 152
presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 3 do reator: a) bacilos
com inclusões; b) bacilos curvos grande com extremidade arredondada e cocos; c)
bacilos curvo segmentado com comprimento de 12 μm e bacilos pequenos de
comprimento aproximado de 2 μm ; d) aglomerado de cocobacilos, bacilos e cocos; e)
filamento fino, bacilo pequeno reto, bacilo pequeno curvo e cocos; f) morfologia
semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp., cocos e bacilos pequenos.
- Figura 29: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a 153
presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 5 do reator: a)
aglomerado de bacilos e cocos; b) cocobacilos; bacilos retos e bacilos curvos; c) cacho
de cocos; d) cocos grandes e bacilos pequenos
- Figura 30: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a 154
presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 3 do RAHLF 2: a)
aglomerado de cocobacilos; b) cocobacilos e bacilo fino curvo (seta); c) bacilos com
extremidade arredondada; d) cocobacilos enfileirados.
- Figura 31: Representação gráfica da variação temporal dos valores da Demanda Química de 156
Oxigênio (DQO) no afluente e efluente e eficiência de remoção.
- Figura 32: Variação temporal da concentração de PCP no afluente, PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP no 158
efluente e da eficiência de remoção do PCP durante o período de partida do RAHLF 1.
- Figura 33: Representação esquemática da variação espacial da massa de PCP adsorvido na 161
biopartícula e presentes na fase líquida em cada seção do reator no 117º dia de
operação.

- Figura 34: Representação gráfica da variação temporal dos valores de DQO no afluente e efluente e eficiência de remoção. 165
- Figura 35: Variação temporal da concentração de PCP no afluente, PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP no efluente e da eficiência de remoção do PCP 166
- Figura 36: Representação esquemática da variação espacial na concentração de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 5,0 PCP.L-1 aplicada no afluente. 167
- Figura 37: Representação esquemática da variação espacial na concentração de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 5,0 PCP.L-1 aplicada no afluente no 16º dia de operação. 169
Legenda: 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente
- Figura 38: Representação esquemática da variação espacial nas concentrações de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 13,0 PCP.L⁻¹ aplicada no afluente no 267º dia de operação. 172
Legenda: 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente
- Figura 39: Representação esquemática da variação espacial da massa de 2,4,6 TCP adsorvido na biopartícula do reator no 268º dia de operação. 173
- Figura 40: Fotos do gel de DGGE do sistema RAHLF 1. DGGE dos produtos de PCR usando primers do Domínios *Bacteria*, com gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda da Figuras: 1, 2 e 3 – Pontos 1, 3 e 6 do reator antes da adição do PCP e ; 2; 4; 7 – Pontos 1, 3 e 5 do reator após a saturação da biomassa com PCP; 5 e 8 – Ponto 3 e 5, após 267 dias de operação com PCP. 174
- Figura 41: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 1 (a, b), 3 (c, d) e 5 (e, f) do reator ao final da operação com 5mgPCP.L⁻¹: a) bacilos, cocobacilos, bacilos curvos e filamentos b) bacilos reto com extremidade arredondada; filamento e cocobacilos c) bacilos retos, bacilo curvo, cocos, filamentos fino; d) predomínio de filamentos finos e) bacilos retos com extremidade arredondada, filamento; f) bacilos e cocobacilos. 176
- Figura 42: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 1 do reator: a) bacilos retos com extremidade arredondada, bacilos curvos; b) bacilos retos e curvos fluorescentes c) bacilos retos e fluorescentes semelhante a *Methanobacterium* e curvos fluorescentes; d) filamentos, bacilos curvos e cocos fluorescentes; e) bacilos retos com extremidade arredondadas; f) filamento fluorescente. 177
- Figura 43: Representação gráfica da variação temporal dos valores de DQO no afluente e efluente e eficiência de remoção. 180
- Figura 44: Variação temporal da concentração de PCP no afluente, PCP, 2,4,6 TCP no efluente e da eficiência de remoção do PCP. 180
- Figura 45: Representação esquemática da variação espacial nas concentrações de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 0,6 PCP.L-1 aplicada no afluente no 15º dia de operação. Legenda; 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente 181
- Figura 46: Representação esquemática da variação espacial nas concentrações de PCP, 2,4,6 TCP para concentração de 5,0 PCP.L-1 aplicada no afluente no 23º dia de operação Legenda: 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente 182
- Figura 47: Representação esquemática da variação espacial nas concentrações de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 12,0 PCP.L-1 aplicada no afluente no 54º dia de operação. Legenda: 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente 185
- Figura 48: Representação esquemática da variação espacial da massa de PCP e 2,4,6 TCP adsorvido na biopartícula em cada seção do reator no 54º dia de operação. 186
- Figura 49: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas dos pontos 1 (a, b, c) e 3 (d, e, f) do reator: a) bacilos retos com extremidade arredondada, b) bacilos fluorescentes; c) bacilos retos e cocos; d) aglomerados de bacilos; bacilos com inclusões; e) bacilos retos com extremidade arredondadas, bacilos pequenos; f) bacilos fluorescentes. 187

Figura 50: Fotos do gel de DGGE. Produtos de PCR usando primers do Domínio Bactéria com 190 gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda: I-Inóculo; P1a, P3a, P5a – amostras do Ponto 1, 3 e 5 do reator antes da adição do PCP; P1d, P3d, P5d – amostras do Ponto 1, 3 e 5 do reator após 54 dias de operação. As bandas submetidas as análises da seqüência estão marcadas com números (referente a tabela 30 de afiliação filogenética).

Figura 51: Fotos do gel de DGGE. Produtos de PCR usando primers do Domínio *Archaea* com 191 gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda: I-Inóculo; P1a, P3a, P5a – amostras do Ponto 1, 3 e 5 do reator antes da adição do PCP; P1d, P3d, P5d – amostras do Ponto 1, 3 e 5 do reator após 54 dias de operação. As bandas submetidas as análises da seqüência estão marcadas com números (referente a tabela 30 de afiliação filogenética).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pesquisas realizadas no LPB/SHS/EESC/USP com degradação de PCP	41
Tabela 2. Relações N:P que estabelecem o nutriente limitante em relação aos níveis de clorofila	52
<i>a.</i>	
Tabela 3: Meio Mineral Biota.	82
Tabela 4: Composição da solução traços de metais.	83
Tabela 5. Composição da solução de vitaminas	84
Tabela 6. Preparo das soluções estoques dos clorofenóis	85
Tabela 7. Concentração final e volume das soluções usadas nos enriquecimentos do sedimento COSIPA	90
Tabela 8: Concentração final e volume das soluções usadas nos ensaios de degradação do PCP no sistema semi contínuo, variando-se as relações nutricionais	92
Tabela 9: Experimentos com diferentes relações nutricionais e critérios adotados	93
Tabela 10: Concentração final e volume das soluções usadas nos ensaios de degradação do Pentaclorofenol no RAHLF	97
Tabela 11: Frequência das análises físico-químicas realizadas durante a operação dos RAHLF	98
Tabela 12: Concentração final dos reagentes para a execução do PCR do Domínio <i>Bacteria</i>	109
Tabela 13: Concentração final dos reagentes para a execução do PCR do Domínio <i>Archaea</i>	109
Tabela 14. Indicações geográficas e valores das variáveis físico-químicas das amostras coletadas	116
Tabela 15. Teores de CO ₂ e metano em ppm	119
Tabela 16. Resultados das análises empregadas na caracterização da amostra de sedimento	120
Tabela 17. Resultado do ajuste dos dados experimentais a diferentes isotermas de adsorção.	125
Tabela 18: Valores do ensaio de adsorção do PCP.	127
Tabela 19: Valores de PCP (mg/g espuma) adsorvido na biomassa imobilizada ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos	128
Tabela 20: Valores de PCP (mg.L ⁻¹) na fração líquida ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.	129
Tabela 21: Valores dos ácidos orgânicos voláteis ao final da fase 3 de operação.	144
Tabela 22: Valores dos ácidos orgânicos voláteis ao final da fase 4.	145
Tabela 23: Concentrações teóricas de PCP _{inicial} , PCP _{final} , 2,4,6 TCP, 2,3 DCP e 2,6 DCP determinados após as 4 fases operacionais.	146
Tabela 24: Valores de N-NH ₄ , determinados ao final de cada experimento.	147
Tabela 25: Valores de P, determinados ao final de cada experimento.	147
Tabela 26: Valores do PCP (mg/g) adsorvido na biopartícula e presente na fase líquida ao longo do reator no 117º dia de operação.	161
Tabela 27: Valores determinados de DQO no afluente e efluente e eficiência de remoção.	165
Tabela 28: Valores (mg.L ⁻¹) de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6DCP presentes na fase líquida ao longo do reator no 16º dia de operação.	168
Tabela 29: Valores da concentração de PCP no afluente, PCP, 2,4,6 TCP no efluente durante operação do RAHLF 2.	181
Tabela 30: Afiliação filogenética de fragmentos de DNAr 16S recuperados neste estudo (número da banda se refere aos geis de DGGE nas Figuras 50 e 51)	192

LISTA DE SIGLAS

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
COSIPA - Companhia Siderúrgica de São Paulo
DGGE – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DQO – Demanda Química de Oxigênio
DNA – Ácido Desoxiribonucléico
GC – Cromatografia Gasosa
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PAHs - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PCP – Pentaclorofenol
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
RAHLF – Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
RNA – Ácido Ribonucléico
rpm – Rotações por minuto
ST – Sólidos Totais
STV – Sólidos Totais Voláteis
UASB – Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*)
HCB – hexaclorobenzeno
BHC – hexaclorociclohexano
PCBs – Bifenilos Policlorados
LPB – Laboratório de Processos Biológicos
ARDRA - Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado
UASB – REATOR Anaeróbio de manta de Lodo
TCP – Triclorofenol
TDH – Tempo de Detenção Hidráulica
TeCP - Tetraclorofenol
BRS – Bactéria Redutora de Sulfato
CP - Monoclorofenol
DCP - Diclorofenol
PM - Peso Molecular
SSV – Sólidos Suspensos Voláteis
CAG – Carvão Ativado Granular

LISTA DE SIMBOLOS

°C – graus Celsius

L – Comprimento (cm)

L/D – Relação comprimento por diâmetro

M – Molaridade

pH – Potencial Hidrogênico

Q – Vazão

R^2 – Quadrado do Coeficiente de Correlação

t - temperatura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁREA DE ESTUDO	24
3.2 PENTACLOROFENOL	29
3.3 ESTUDOS MICROBIANOS SOBRE A DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS HALOGENADOS	30
3.3.1 Biodegradação anaeróbia do PCP	34
3.3.2. Tratamento anaeróbio do PCP em biorreatores	38
3.3.3 Estudo de isotermas de adsorção do PCP	46
3.4 NITROGÊNIO E FÓSFORO COMO NUTRIENTES LIMITANTES	49
3.5 ECOLOGIA MOLECULAR MICROBIANA	59
3.5.1 TÉCNICA DE “ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE” e outras	65
4. MATERIAL E MÉTODOS	72
4.1 AMOSTRAGENS	74
4.1.1 Coleta, transporte e estoque de amostras do sedimento	75
4.1.2 Determinação de parâmetros físico-químicos, profundidade e localização do ponto de coleta	78
4.1.3 Determinação da taxa de emissão do metano na interface superfície – água	78
4.1.4 Caracterização da amostra de sedimento	81
4.2 COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES E MEIO DE CULTIVO	81
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	86
4.3.1 Descrição dos reatores	86
4.3.1.1 Reatores semi-contínuos	86
4.3.1.2 Reator contínuo do tipo RAHLF	88
4.3.2 Procedimento para ativação e enriquecimento do consórcio microbiano anaeróbio metanogênico das amostras de sedimento do Sistema Estuarino de Santos-São Vicente: COSIPA	89
4.3.3 Avaliação do desempenho do inóculo para remoção de PCP em diferentes relações nutricionais (DQO:N:P) baseado na Teoria “Resource Ratio”	90
4.3.4 Ensaios de degradação do PCP no RAHLF com duas diferentes relações nutricionais (DQO:N:P) 1000:130:45 e 1000:10:1	93

4.3.4.1 Inoculação dos RAHLF	94
4.3.4.2 Procedimento para operação contínua dos RAHLF	96
4.3.4.3 Monitoramento do reator	98
4.3.5 Ensaio de adsorção de PCP na espuma de poliuretana do RAHLF	99
4.3.6 Isoterma de adsorção	100
4.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA O ACOMPANHAMENTO DOS EXPERIMENTOS LABORATORIAIS	101
4.4.1 Parâmetros e métodos de análise	101
4.4.2 Procedimento para determinação cromatográfica do metano	101
4.4.3 Procedimento para determinação cromatográfica dos ácidos orgânicos voláteis e fenol	102
4.4.4 Procedimento para determinação cromatográfica dos compostos clorados	103
4.4.4.1 Procedimento de extração e derivatização das amostras	104
4.4.4.2 Preparação da curva de calibração	105
4.4.5 Procedimentos para os exames microscópicos	105
4.4.6 Análise da diversidade microbiana por DGGE	106
4.4.6.1 Extração de DNA	107
4.4.6.2 Reação de Amplificação – PCR	108
4.4.6.3 Técnica do DGGE	111
4.4.6.4 Análise dos Géis do DGGE	112
4.4.6.5 Cálculo do coeficiente de similaridade	112
4.4.7 Sequenciamento	113
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
5.1 LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGENS E DETERMINAÇÃO <i>IN SITU</i> DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS	114
5.2 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE EMISSÃO DO GÁS METANO NA INTERFACE SUPERFÍCIE – ÁGUA	117
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE SEDIMENTO	119
5.4 ATIVAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DO CONSÓRCIO MICROBIANO ANAERÓBIO METANOGÊNICO DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO DO SISTEMA ESTUARINO DE SANTOS-SÃO VICENTE COLETADOS EM FRENTE DA COSIPA	122
5.5 TESTES PRELIMINARES À OPERAÇÃO DOS REATORES RAHLF	124
5.5.1 Ensaio de adsorção	124
5.5.1.1 Isoterma de adsorção	124
5.5.1.2 Avaliação da adsorção de PCP durante a partida do RAHLF 1	126
5.5.2 Análise da diversidade microbiana por DGGE durante o estudo de adsorção	130

no RAHLF 1	
5.6 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO INÓCULO NA REMOÇÃO DE PCP EM DIFERENTES RELAÇÕES NUTRICIONAIS (DQO:N:P), BASEADO NA TEORIA “RESOURCE RATIO”	134
5.7 OPERAÇÃO DO RAHLF	148
5.7.1 Inoculação	148
5.7.2 Estratégias de Partida	155
5.7.3 Operação do RAHLF com PCP	164
6.0 CONCLUSÕES	200
7.0 RECOMENDAÇÕES	203
8.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	204

1. INTRODUÇÃO

O processo de industrialização da região da Baixada Santista ocorreu na década de 50, época em que várias indústrias químicas se instalaram na região, atraídas pela inauguração da Refinaria Presidente Bernardes em Cubatão no ano de 1955, assim como pela proximidade com a região metropolitana de São Paulo e logística propiciada pelo porto de Santos. Entre o período de 1955 e 1975, 22 grandes indústrias se alocaram na região de Cubatão (TARGA; KLOCKOW, 1997).

Dentre elas, a Clorogil S/A – Indústrias Químicas que produzia o tetracloreto de carbono e o pentaclorofenato de sódio, este último, um composto fungicida utilizado como princípio ativo para preservação de madeiras. Em 1976, a Clorogil S/A foi incorporada pelo conglomerado da Rhodia S/A, tornando-se então responsável pelo transporte dos resíduos gerados pelo sistema de produção (MATHEUS, 1998). Contudo, a destinação dos dejetos foi negligenciada e a distribuição desses resíduos se deu de forma aleatória sobre a planície arenosa da Baixada Santista. Foram encontradas quantidades notáveis de resíduos em locais como o distrito de Samaritá na cidade de São Vicente, e áreas da região de Cubatão e Itanhaém. Em um período de quase duas décadas, a partir do final dos anos 1960, foram dispostas na região 12 mil toneladas de produtos tóxicos impregnados de compostos organoclorados, principalmente de pentaclorofenol (PCP). Somente em meados dos anos 1980, devido a ações do órgão ambiental do Estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, uma parte do solo contaminado (30 toneladas) do distrito de Samaritá (São Vicente) foi removida pela Rhodia S/A e armazenada para posterior estabilização em uma “estação de espera” (MATHEUS, 1998).

O exemplo do sério descaso com a destinação de compostos residuais constitui uma das mais graves evidências de origem da poluição por produtos tóxicos na região da Baixada Santista e, conseqüentemente, do Estuário de Santos- São Vicente. Porém, apesar do grande esforço da CETESB para a melhoria da qualidade ambiental da Baixada Santista, via programas como o de “Recuperação da Qualidade Ambiental de Cubatão”, diversas áreas foram comprometidas (CETESB, 2001). O levantamento de dados sobre o estado de contaminação dos sedimentos, da coluna d’água e dos organismos aquáticos no Estuário, publicado pela CETESB no início do século XXI (2001), mostrou que a região ainda apresentava-se impactada pela presença de elevadas concentrações de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs), metais pesados, compostos organoclorados e fenólicos. Apesar de não ter sido especificamente citada a presença de PCP no relatório de 2001, em função de sua não detecção nas amostras de sedimentos, em 1990 suas concentrações eram próximas a 35,0 µg/Kg nos sedimentos, como também divulgado pela CETESB (1991).

Nesse contexto, no qual há indicações de fontes do composto PCP como as estações de espera para tratamento de organoclorados, bem como a ocorrência pretérita de clorofenóis em sedimentos do Estuário, o Programa Biota FAPESP vem possibilitando desde o ano 2000, a pesquisa sobre a diversidade microbiana anaeróbia local e seu potencial na degradação do composto pentaclorofenol. Com foco na biorremediação de áreas severamente contaminadas, os seguintes projetos vêm sendo desenvolvidos na Escola de Engenharia de São Carlos no âmbito do Programa Biota, como a Tese de Flávia Talarico Saia, “Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP: Avaliação do potencial de biodegradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)”, FAPESP número 00/08323-3, defendida em 2005, a Tese de Mércia Regina Domingues, em andamento e intitulada “Diversidade molecular de Archaea e Bacteria em amostras de sedimentos estuarinos enriquecidos na presença de clorofenóis”, e

a presente pesquisa “Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana natural dos sedimentos do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo”, FAPESP número 03/07946-5.

A pesquisa que ora se apresenta visou estabelecer as condições nutricionais adequadas para o uso do sedimento do estuário de Santos – São Vicente do Estado de São Paulo, como inóculo no Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) no processo de degradação anaeróbia do pentaclorofenol (PCP) em busca da aplicação da tecnologia em escala real, assim como identificar grupos microbianos envolvidos no processo. Resultados anteriormente obtidos revelaram o potencial de degradação desse composto químico por sedimentos do estuário sob condições controladas de anaerobiose e salinidade (SAIA, 2005; NAKAYAMA, 2005; SAIA et al., 2007).

Para tanto, sedimento do estuário de Santos-SãoVicente foi coletado. Pouco se sabe sobre os microrganismos presentes em diversos ambientes, atualmente os microbiologistas divergem sobre a porcentagem de 1 a 10% da totalidade de microrganismos classificados. Ou seja, 90 a 99% dos microrganismos não são conhecidos. E se estes dados fossem apontados para o Brasil, país rico em diversidade de ambientes, seriam ainda pior. Está sendo discutido pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, a criação de um centro oficial depositário de células microbianas, para aumentar o conhecimento sobre a real diversidade microbiana brasileira e sua potencial aplicação em diversos segmentos. Para processos tecnológicos é crucial o conhecimento dos microrganismos provenientes de biomas brasileiros envolvidos na degradação de compostos tóxicos visando o sucesso da aplicação da biorremediação anaeróbia em nosso país. O conhecimento da existencia da atividade metanogênica no local de coleta do sedimento apontou para o uso deste como um potencial inóculo de sistemas de reatores anaeróbios sob condições metanogênicas. Os resultados da caracterização do local de coleta norteou o uso de condições halofílicas em todos os ensaios, tentando desta forma,

mimetizar ao máximo as condições ambientais. A caracterização do sedimento foi fundamental para adotarmos estratégias de diluições do sedimento antes a inoculação dos RAHLFs, devido a toxicidade dos metais encontrados e aos altos teores de óleos e graxas presentes.

O efeito da concentração de nitrogênio e fósforo na comunidade microbiana e na degradação do PCP foram estudados com base na teoria dos *nutrientes limitantes* (SMITH, 2002), que prediz que diferentes relações nutricionais próximas às condições limitantes têm influência na seleção de diferentes comunidades microbianas. Para isso, testes de degradação do PCP foram realizados previamente sob diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo. Posteriormente, foram realizados no RAHLF, testes sob duas distintas concentrações nutricionais, a mais otimizada com respeito a eficiência de remoção dos compostos de interesse e economia e a utilizada em trabalhos anteriores (SAIA, 2007). Assim, ensaios experimentais prévios podem identificar qual a relação nutricional requerida. Em termos práticos isto é significativo, pois implica que diferentes condições nutricionais devem ser usadas para tratar diferentes áreas contaminadas por distintos compostos (GRAHAN; SMITH; LAW, 1995).

O monitoramento da atividade microbiana foi realizado por determinações cromatográficas de clorofenóis, ácidos orgânicos e composição do biogás formado. O acompanhamento sistemático do processo permitiu analisar possíveis rotas metabólicas da degradação do PCP pela comunidade microbiana. A estrutura da comunidade frente a variação das concentrações dos nutrientes foi avaliada pela técnica molecular de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e a caracterização de algumas espécies através do sequenciamento de pares de bases de bandas excisadas dos géis resultantes da aplicação do DGGE. Nesse sentido, a fração genômica alvo obtida pela aplicação do DGGE permitiu a

identificação de tipos microbianos possivelmente responsáveis pela transformação e/ou quebra do clorofenol.

Assim, a presente pesquisa visou trazer contribuições para o real entendimento da diversidade microbiana autóctone halofílica, proveniente do estuário de Santos, envolvidas no processo de biodegradação do PCP. Também estabeleceu, com base em custos operacionais e seleção de comunidade microbiana com maior capacidade de degradar o composto estudado, as condições nutricionais e os procedimentos necessários para confiná-las no RAHLF e usá-las em processos de biorremediação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

1. Avaliar as concentrações dos macronutrientes N e P com o fim de otimizar o sistema RAHLF para a degradação anaeróbia metanogênica do PCP.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a taxa de emissão de metano na interface superfície - água no local de coleta do sedimento;

2. Estudar a degradação do pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) inoculado com sedimentos previamente enriquecidos do estuário de Santos-São Vicente, sob condições metanogênicas;

3. Estudar as rotas metabólicas da degradação do PCP pela comunidade microbiana estabelecida no RAHLF através da análise de produtos do metabolismo;

4. Analisar a estrutura da comunidade presente nas amostras durante os experimentos nutricionais e de operação do RAHLF, através dos padrões de bandas da técnica de DGGE, provenientes da amplificação de fragmentos do RNA r 16S;

5. Identificar microrganismos autóctones presentes no RAHLF envolvidos na degradação anaeróbia do Pentaclorofenol, através da reamplificação e sequenciamento de bandas excisadas do Gel de DGGE;

6. Recomendar as condições mais favoráveis para o tratamento anaeróbio de PCP no RAHLF, empregando-se como inóculo culturas microbianas autóctones enriquecidas a partir de locais previamente contaminados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Características da área de estudo

A região de Santos compreende uma área de aproximadamente 794 Km² e está situada entre 23°45'00'' e 24°03'17''S de latitude, e entre 46°15'00'' e 46°30'00''W de longitude (CETESB, 1985). A baía de Santos é constituída pelo Estuário de Santos – São Vicente,

inserido na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo e alimentado pelas águas dos rios que nascem nas encostas da Serra do Mar e pelas oriundas da própria Baixada. Esta característica causa a formação de um labirinto de canais e meandros que na porção central e noroeste individualizam as ilhas de São Vicente e Santo Amaro. Contornando as margens desses canais, existem manguezais que ocupam grandes extensões de planície até a zonação da maré (FUNDESPA, 1994).

O sistema estuarino de Santos – São Vicente é tido com um dos mais sérios exemplos brasileiros de degradação ambiental de sistemas costeiros, cuja origem dos problemas de poluição hídrica e atmosférica foi fundamentalmente industrial (CETESB, 1999). A região abriga o maior porto da América Latina – o Porto de Santos-, e o mais relevante pólo industrial do país, situado no Município de Cubatão.

Entre as décadas de 50 a 70 a Baixada Santista passou a integrar o circuito da industrialização pesada do país, com a implantação da refinaria Presidente Bernardes da Petrobrás, da Companhia Siderúrgica de São Paulo (COSIPA) e do complexo de fertilizantes (MESQUITA, 1995). Em 1985, somavam-se 22 indústrias de grande e médio porte, abrigando 111 fábricas distintas (CETESB, 1990). As ocorrências de liberação de efluentes industriais inadequados, de resíduos sólidos, dos esgotos sanitários provenientes do Porto de Santos e dos municípios da Baixada Santista, bem como os freqüentes acidentes de derramamentos de óleo e outras substâncias nos cursos d'água, favoreceram um conjunto de condições deletérias e impactantes ao ambiente estuarino (CETESB, 1990, 2001). Apesar do esforço do “Programa de recuperação da qualidade ambiental de Cubatão” instituído pela CETESB em 1984, um levantamento realizado em 1988 sobre os rios da região revelou a presença de elevadas

concentrações de metais pesados e de compostos organoclorados na água, nos sedimentos e nos organismos aquáticos (CETESB, 1990; EYSINK *et al.*¹, 1991 *apud* CETESB, 2001).

Nishigima, Weber e Bicego (2001) relataram níveis alarmantes de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos no estuário de Santos, indicando que o ponto de coleta próximo à Cosipa apresentava altos níveis de acenafitileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e criseno. Adicionalmente, as concentrações encontradas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais (PAHs) nos sedimentos foi de 0,08 a 42,39 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e as de n-alcanos variaram entre 4,38 e 157,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$, sugerindo intensa atividade antropogênica. As contribuições biogênicas de n-alcanos em áreas controle foram determinadas proximamente na faixa de 2,0 a 4,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sedimento. Em outro estudo realizado no sítio Cosipa (MEDEIROS; BÍCEGO, 2004), constatou-se valores totais de PAHs em torno de 15,38 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sedimento, prevalecendo os compostos fluorantreno (2,71 $\mu\text{g.g}^{-1}$), criseno (2,74 $\mu\text{g.g}^{-1}$), pireno (2,06 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e benzo(a)pireno (1,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$). Com relação aos hidrocarbonetos alifáticos totais as concentrações encontradas foram de 107,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Em 2001, a CETESB realizou uma campanha amostral a fim de avaliar a presença de contaminantes químicos em 26 pontos distribuídos por toda a região estuarina, abrangendo os principais rios contribuintes do sistema, a Baía de Santos e parte da zona marinha adjacente. A compilação dos resultados mostrou que o sedimento é o compartimento com a maior variedade e frequência de detecção de contaminantes, sendo a área mais crítica a da bacia de evolução da COSIPA. Na bacia foram encontradas as maiores concentrações de PAHs (109.200 a 733.700 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ peso seco), PCBs (3,0 a 74 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ peso seco), metais pesados (Pb-132 a 295 $\mu\text{g.g}^{-1}$, Mn-599 a 1561 $\mu\text{g.g}^{-1}$, Hg-0,48 a 0,85 $\mu\text{g.g}^{-1}$, Zn-260 a 818 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e

¹ EYSINK, G.G.J.; LAMPARELLI, M .C.; VARGAS-BOLDRINNI, C.; MARTINS, M.C. *Contaminants in the Cubatão Riverbasin and its Estuary (SP, Brazil), relating to the Aquatic Biota. Part 1. Heavy Metals, arsenic and Cyanide.* 11th Biennial International Estuarine Reasearch Conference - San Francisco USA. Session: Inputs and Cycling of Natural and Contaminant Materials in Estuaries. 1991.

compostos fenólicos (Fenol – 280 a 1100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 4-metilfenol – 20 a 2300 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 2,4 dimetilfenol – 150 a 690 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) em níveis acima dos limites de toxicidade. Segundo os critérios do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), as amostras de água analisadas apresentaram níveis elevados de cádmio e chumbo, e menores de cobre, hexaclorobenzeno (HCB) e hexaclorociclohexano (BHC). Foi diagnosticado em peixes, siris, caranguejos, mexilhões, ostras, camarões e unhas-de-velho o acúmulo de compostos como PCBs, PAHs, dioxinas e furanos. Embora a ocorrência de PCP nessas amostras de sedimento não se tenha sido detectada, os dados divulgados em relatório anterior pela própria Cetesb (1990) revelaram valores de PCP no sedimento da bacia do rio Cubatão próximos a $35,0\mu\text{g.kg}^{-1}$. As informações conclusivas do relatório da CETESB (2001) em relação a fontes de emissão apontam que as áreas contaminadas por pesticidas organoclorados na Baixada Santista foram aquelas destinadas à disposição irregular de resíduos sólidos da indústria Rhodia S/A (grupo Rhône Poulenc) e o Lixão de Pilões.

A introdução do composto PCP na região da Baixada Santista teve início em 1962, quando as atividades da empresa Clorogil S/A – Indústrias Químicas iniciaram sua produção, bem como do sal pentaclorofenato de sódio e do tetracloreto de carbono como desengraxante de indústria metalúrgica (MESQUITA, 1995; MATHEUS, 1998). Com a incorporação dessa empresa em 1976 ao conglomerado francês Rhône-Poulenc, cuja subsidiária no Brasil é a Rhodia S/A, a unidade de produção do PCP foi mantida até 1978, quando foi fechada devido a problemas sociais e sanitários (MESQUITA, 1995). A destinação desorganizada dos resíduos da Rhodia S/A, em parte armazenada ou descartada em área de aterros industriais, seguida pelo transporte e disposição aleatória dos rejeitos em diferentes locais da região santista, culminou em graves acidentes e impactos ambientais (MESQUITA, 1995).

A seriedade da movimentação irracional de rejeitos da fabricação do composto PCP na Baixada Santista e em locais da Grande São Paulo, a CETESB elaborou em 1985 normas para controlar e fiscalizar o transporte deste produto. A dimensão dessa situação pode ser novamente exemplificada pela atuação das indústrias Rhodia S/A. Em apenas dois meses do ano 1985, foram deslocadas da área de fabrico aproximadamente 48 toneladas de PCP para diferentes destinos, segundo o relatório Prevenção de Acidentes Ambientais na Região Metropolitana de São Paulo (CETESB, 1985).

A história revela, de acordo com Matheus (1998), que entre 1966 e 1988 foram lançadas quase 12 mil toneladas de produtos tóxicos na região de Santos, entre eles o PCP, o HCB e o Hexacloroetano. Em 1998, foram identificadas 11 áreas contaminadas por esses compostos nos municípios de São Vicente, Cubatão e Itanhaém (MATHEUS, 1998). Em consequência desse reconhecimento e por exigência da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB e da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, a empresa implementou iniciativas para solucionar os índices de poluição instituídos, tais como a instalação de um incinerador e uma estação de esperera, situada à margem da Rodovia Padre Manuel da Nóbrega na altura dos km 67 (MESQUITA, 1995; MATHEUS, 1998). Nesse local, foram armazenadas várias toneladas de solos contaminados, bem como resíduos tóxicos industriais. No estudo realizado por Nascimento (2004), no qual foram avaliadas as condições das áreas próximas aos depósitos citados em relação aos compostos PCP e HCB, foi revelado que os poluentes encontravam-se presentes, com ocorrência de contaminação difusa a distâncias de até 500 metros a partir desses depósitos.

Apesar da existência de projetos para remoção, tratamento e disposição dos poluentes da estação de espera para um local adequado, a CETESB (2001) apontou a área como uma possível fonte de emissão de organoclorados para o sistema estuarino de Santos e São Vicente, especialmente do hexaclorobenzeno. Além disso, constatou-se o risco eminente de

contaminação local pelos tóxicos encontrados no Lixão de Pilões, como os organoclorados dispostos pelas indústrias Ultrafertil, Alba, Carbocloro e Rhodia (MATHEUS, 1998). A CETESB, em seu relatório de 2001, recomendou a implantação de medidas para redução da contaminação por organoclorados nos mananciais de água a níveis não deletérios ao ambiente, visando à recuperação da região. Este trabalho de doutorado visa suprir esta necessidade, pois propõe a aplicação de tecnologia de reatores anaeróbios para o tratamento de áreas contaminadas com compostos organoclorados, utilizando como inóculo microrganismos presentes no sedimento da região.

3.2 Pentaclorofenol

O pentaclorofenol (PCP) é um composto orgânico aromático halogenado (Figura 1), com peso molecular igual a 266,34. Este composto pode ser sintetizado por dois diferentes processos: (1) cloração direta do fenol, clorofenol e policlorofenóis sob ação de catalisadores como o amoníaco, antimônio e seus cloretos em elevadas temperaturas, sob temperaturas de 30 a 40°C; (2) hidrólise alcalina do hexaclorobenzeno em metanol e álcoois hidratados, misturados em vários solventes, havendo a substituição de um íon cloreto por um íon hidróxido (VERCHUEREM, 1983 ²*apud* MATHEUS, 1998). É um composto orgânico estável devido ligação estável do átomo de cloro com o carbono, é praticamente insolúvel em água (8mg/100 ml) e altamente solúvel em solventes orgânicos. Em água, a solubilidade se dá quando se encontra na forma do sal pentaclorofenato de sódio (PCP-Na). Apresenta como dose letal para 50% dos indivíduos (DL 50) valores de 146,175 mg/Kg de rato (Merck, 1996),

² VERSCHUEREN, k. . Handbook of environmental data on organic chemicals. New York, 1983,363p

sendo efetivo biocida. O PCP é considerado composto de baixo custo, o que possibilitou seu emprego nas indústrias têxteis, na agricultura e na produção de algacidas, bactericidas, fungicidas e moluscocidas para a preservação de madeiras recém cortadas, bem como proteção de postes, vigas e dormentes de estrada de ferro (HÄGGBLÖM; VALO, 1995). O produto era conhecido no mercado como Penta, Acutox, Fungol, Penchlor, Pentachlor e Pó da China (MATHEUS, 1998). No Brasil o a utilização do composto foi restrita em 1985 e em 2006, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vinculada ao Ministério da Saúde publicou a Resolução RDC nº 164, de 18 de agosto no Diário Oficial da União nº 160 proibindo todos os usos dos ingredientes ativos Pentaclorofenol e seus sais no país.

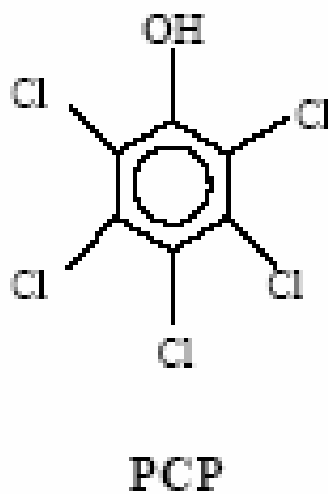


Figura 1: Estrutura da molécula do pentaclorofenol (Index Merck, 1996).

3.3 Estudos microbianos sobre a degradação de compostos halogenados

Os compostos orgânicos halogenados, tais como os clorofenóis são oriundos de resíduos derivados da produção tecnológica agrícola e industrial e estão entre os poluentes

mais abundantes nos solos, sedimentos aquáticos e aquíferos contaminados. Em função de sua bioacumulação e toxicidade, desafiam a integridade dos ecossistemas e suas diferentes formas de vida, afetando indiscriminadamente a biodiversidade. Apesar dos efeitos deletérios à vida, muitos desses compostos podem servir como fonte energética e de crescimento celular à uma variedade de populações microbianas, as quais, muito provavelmente, desenvolveram estratégias enzimáticas próprias e originais para a degradação de moléculas halogenadas naturalmente encontradas em solos e águas (FETZNER, 1998). Assim, a ação dos microrganismos sobre clorofenóis, hidrocarbonetos clorados, bifenilos policlorados etc. pode ser passível, desde que “*se dê o tempo suficiente e as condições ecológicas adequadas para o ataque microbiano*” (SMIDT, 2001).

Smidt (2001) afirmou que a biodegradabilidade de compostos halogenados no ambiente depende fortemente de duas condições, da estrutura química da molécula a ser degradada e dos fatores abióticos que caracterizam o habitat dos microrganismos. A eficiência da degradação aeróbia de compostos halogenados é bem conhecida, e os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e genéticos envolvidos na quebra das moléculas por oxigenases têm sido bem documentados (FETZNER, 1998). Os sistemas enzimáticos microbianos dependentes do oxigênio – mono- e dioxigenases – atuam eficientemente na desalogenação de moléculas com pequeno número de halogênios substituintes, o que resulta na persistência de compostos altamente halogenados nos ambientes aeróbios (SMIDT, 2001).

A sólida evidência que emerge na ciência há cerca de duas décadas, e revoluciona os estudos sobre a degradação de organohalogenados, refere-se à habilidade estritamente anaeróbia de alguns procariontes em conservar energia pelas reações de desalogenação reductiva de compostos orgânicos halogenados (EL FANTROUSSI; NAVEAU; AGATHOS, 1998; SMIDT, 2001).

É fato que consórcios anaeróbios promovem a desalogenação reductiva de halogenados orgânicos através do metabolismo potencial de certos organismos fermentativos, sulfato-redutores, ferro-redutores e metanogênicos. São relevantes os exemplos sobre a ocorrência da completa desalogenação anaeróbia de compostos clorados em investigações sobre tecnologias sanitárias como a biorremediação de sítios contaminados ou o biotratamento de compostos clorados (VAZOLLER, 1996; EL FANTROUSSI; NAVEAU; AGATHOS, 1998). Relacionando-os historicamente, merecem destaque a transformação do tetracloroetano a eteno e/ou etano, ou mesmo a metano, por culturas anaeróbias mistas enriquecidas em biorreatores (FREEDMAN; GOSSET, 1989), a descloração de misturas complexas de compostos polihalogenados pela ação de biofilmes microbianos em reatores anaeróbios industriais (EL FANTROUSSI; NAVEAU; AGATHOS, 1998) e a formação do metano em biorreatores pela degradação de compostos fenólicos altamente clorados, como o pentaclorofenol (SUSARLA et al., 1998).

Em 1998, El Fantroussi, Naveau e Agathos (1998) compilaram uma série de informações sobre as rotas metabólicas das culturas puras anaeróbias desalogenadoras de organoclorados, sendo os três modelos de metabolismos mais relevantes: - via metabolismo central, em que o composto é a única fonte de carbono e energia para a célula e é usual quando os substratos são hidrocarbonetos simples (C1 e C2) clorados; - via co-metabolismo ou reação “fortuita”, que se refere a um conjunto de reações que resultam na modificação accidental do organoclorado por enzimas e cofatores que normalmente catalisam outras reações do metabolismo microbiano; nesse caso, a transformação não é energeticamente útil para a célula e, portanto, outros doadores de elétrons e/ou aceptores de elétrons exercerão essa função; por essa via, o composto é transformado ainda que o organismo seja incapaz de o utilizar em seus mecanismos energéticos; - via halorespiração, processo pelo qual compostos halogenados são utilizados como aceptores de elétrons em reações exergônicas de

desalogenação, com a conseqüente conservação de energia para o crescimento celular; ao contrário do que acontece no co-metabolismo, a desalogenação nesses organismos é catalisada por enzimas com grande afinidade pelo substrato e elevada especificidade.

O metabolismo dos compostos halogenados alifáticos e aromáticos, por uma ou outra via bioquímica catalítica, gera em última instância produtos cujo esqueleto carbônico é alterado, quer por uma modificação na ligação entre carbonos, ou pela substituição do íon haleto por um elétron e sua conseqüente eliminação (FETZNER, 1998). De acordo com Bouwer e Zenhder (1993) são três os mecanismos de redução dos compostos alifáticos e aromáticos halogenados: - hidrogenólise, uma redução na qual a ligação carbono-halogênio é quebrada e um átomo de halogênio é substituído pelo hidrogênio; - dialoeliminação, uma redução em que dois halogênios são removidos de átomos de carbono adjacentes e, ao mesmo tempo, forma-se uma ligação dupla entre os átomos de carbono; - reação de acoplamento, na qual ocorre uma ligação entre dois radicais livres e eliminação de um halogênio. Todos estes mecanismos de redução podem estar envolvidos no processo da desalogenação redutiva de uma molécula.

Hagblom (1992) relatou vários experimentos sobre a biodegradação anaeróbia do PCP por consórcios microbianos metanogênicos e/ou sulfetogênicos, pontuando que os aceptores finais de elétrons no meio de reação orientam uma ou outra condição metabólica. Sem dúvida, é fundamental o esclarecimento dos mecanismos que governam a desalogenação redutiva em culturas puras, nos quais enzimas e cofatores específicos e pouco conhecidos efetuam a reação.

Para melhor compreender o metabolismo das reações celulares de desalogenação redutiva, os estudos devem ser conduzidos com culturas puras desalogenadoras, selecionando-se as enzimas e cofatores responsáveis pelas reações. Contudo, o conjunto do conhecimento básico não prescinde da necessidade de outros estudos, como por exemplo, dos efeitos de fatores abióticos em processos da transformação microbiana de um composto clorado em

diferentes ambientes. Isso se destaca quando o fim é tecnológico, como o emprego dos sistemas de engenharia para destoxificar ou “limpar” ambientes contaminados. É o conjunto dos resultados sobre os aspectos fundamentais e os de engenharia que traduzem a aplicação segura de sistemas para a biorremediação e/ou biotratamento de organohalogenados (MOHN; TIEDJE, 1992).

3.3.1 Biodegradação anaeróbia do PCP

A reação de desalogenação redutiva microbiana do PCP é diretamente proporcional ao número de cloros da molécula do PCP. Em geral, quanto maior o grau de cloração de um composto maior seu estado de oxidação, fator que torna as moléculas mais suscetíveis à reação redutiva de desalogenação (ADRIAENS; VOGEL, 1995).

A rota preferencial de degradação do PCP pode ser explicada pela desalogenação redutiva preferencialmente na posição *orto*, porém as desclorações iniciais podem também se dar nas posições *para* e *meta* (WILD; HARRAD; JONES, 1993).

Os metabólitos mais comuns formados durante a desalogenação do PCP foram apontados por Larsen et al. (1991) como 2,3,4,5-TeCP, o 3,4,5-TCP, o 3,5-DCP e o 3-CP, e a reação inicial ocorreria preferencialmente na posição *orto*. Bryant, Hale e Rogers (1991) também descreveram a desalogenação do PCP por comunidades microbianas anaeróbias presentes em sedimentos não adaptados ao composto, e os resultados apontaram que a desalogenação inicial se deu na posição *para* resultando no composto 2,3,5,6-TeCP, em seqüência a desalogenação ocorreu na posição *orto* resultando em 2,3,5 TCP.

Khodadoust et al. (1997) estudaram a degradação anaeróbia do PCP em reator anaeróbio de leito fluidificado com carvão ativado como suporte e etanol como substrato orgânico principal. No decorrer do período experimental, incluindo o período de partida, a remoção do PCP foi maior que 99%, considerando-se concentrações da ordem de 1.333 mg. L⁻¹ no afluente e uso de inóculo previamente adaptado. A produção dos metabólitos 2,4,6-TCP, 2,4-DCP e 4-CP indicou que a desalogenação se deu na posição *3-meta* do anel aromático (Figura 2). Em outra fase operacional, os autores verificaram outra rota para a desalogenação inicial do PCP, ocorrendo na posição *orto* e resultando nos compostos 3,4,5-TCP, 3,4-DCP e 3-CP (Figura 3). A primeira rota observada por Khodadoust et al. (1997) é também a encontrada anteriormente por Nicholson et al. (1992), cujos experimentos com consórcios metanogênicos adaptados em 5.300 mg. L⁻¹ de acetato e 3,4 μM de PCP foram eficientes na descloração do PCP.

Takeuchi et al. (2000) investigaram a transformação de 19 isômeros de clorofenóis (PCP, 2,3,4,5-TeCP, 2,3,4,6-TeCP, 2,3,5,6-TeCP, 2,3,4-TCP, 2,3,5-TCP, 2,3,6-TCP, 2,4,5-TCP, 2,4,6-TCP, 3,4,5-TCP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,5-DCP, 2,6-DCP, 3,4-DCP, 3,5-DCP, 2-CP, 3-CP, 4-CP) por lodos anaeróbios metanogênicos e verificaram que a transformação ocorreu via desalogenação redutiva inicialmente na posição *orto*. A descloração de átomos nas posições *meta* ou *para* somente ocorreu na transformação do composto 3,4,5-TCP, cujos produtos foram 3,4-DCP e 3,5-DCP.

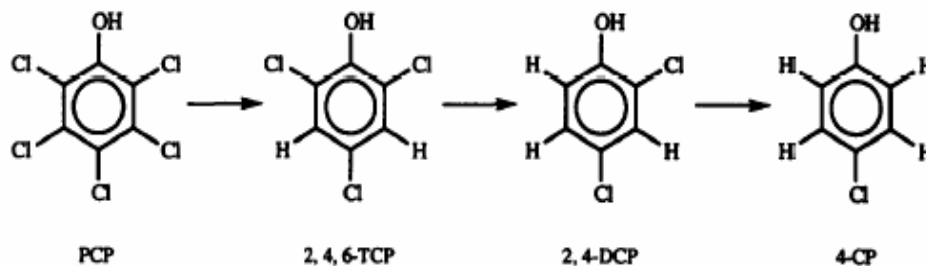


Figura 2: Rota metabólica principal de degradação do PCP no Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado, segundo os experimentos de Khodadoust et al. (1997), com etanol como fonte de carbono simples.

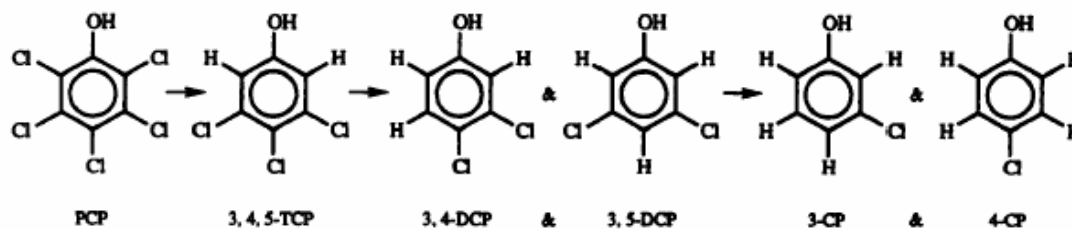


Figura 3: Rota metabólica secundária de degradação do PCP no Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado. Fonte: Khodadoust et al. (1997) – com etanol como fonte de carbono simples.

Chen et al. (2000) estudaram a degradação anaeróbia do PCP em digestor anaeróbio de vidro em escala laboratorial com volume total de 8,0 litros, operado a 35 ± 1 °C com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 15 dias. Lodo cru contendo 3,5 a 4,5 % de sólidos totais e sólidos voláteis, respectivamente proveniente de uma estação de tratamento de água residuária serviu como substrato primário para o consórcio anaeróbio. Adição diária de 30 mg de PCP – C^{14} foi realizada para observar a distribuição da radiação em todas as fases. Os resultados demonstraram que 19,5% do C^{14} proveniente do PCP encontravam-se na fase aquosa, 78% na fase sólida e 2,5% na fase gasosa. Estudos de balanço de massa indicaram que o composto 3 CP foi o principal intermediário presente no efluente do sistema (95%), seguido por 3,4CP (4,5%) e por 3,5CP (0,5%). Nenhum intermediário foi detectado na fase gasosa.

Zangh e Wiegel (1990) sugeriram que a desalogenação reductiva necessária para transformar o 2,4-DCP em 4-CP é precedida de uma carboxilação, que transforma a molécula de fenol em benzoato (Figura 4), e posterior quebra do anel aromático. O experimento desses autores (ZANGH; WIEGEL, 1990) mostrou que a desalogenação do composto possibilitou a acetogênese com formação de ácido acético, dióxido de carbono e hidrogênio, seguida da metanogênese.

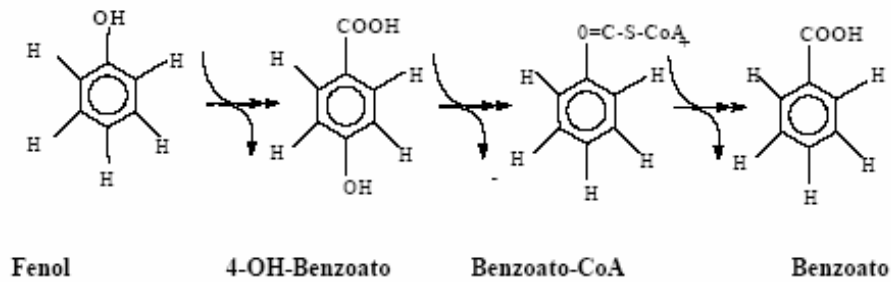


Figura 4: Modelo de degradação do fenol pela rota do ácido benzóico ou carboxilação do fenol, segundo Londry e Fedorak (1992).

De acordo com Fang et al. (1997), uma vez formado o benzoato, sua conversão anaeróbia resulta em ácido acético, via a ação de bactérias acetogênicas sintróficas (BAS). Em seus experimentos, os autores verificaram que o gás hidrogênio foi usado pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) na presença do sulfato, com formação de sulfeto de hidrogênio. Os ensaios também evidenciaram a atividade de arqueias acetoclásticas metanogênicas *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., bem como de hidrogenotróficas, como por exemplo, *Methanobacterium* sp., *Methanospirillum* sp. e *Methanobrevibacter* sp. .

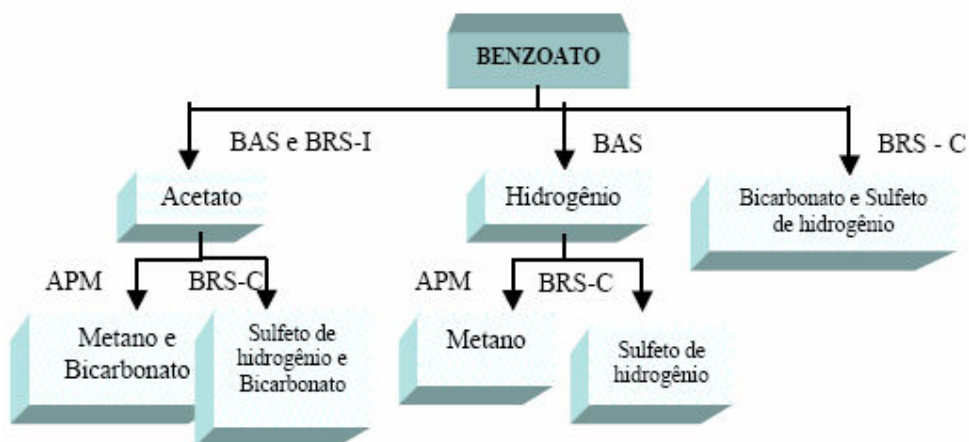


Figura 5: Esquema da conversão de benzoato a metano em ambientes anaeróbios, segundo Fang et al.(1997).Legenda: BAS - bactérias acetogênicas sintróficas; BRS-I – bactérias redutoras de sulfato que realizam a degradação incompleta do substrato; BRS-C -bactérias redutoras de sulfato que oxidam completamente o substrato; APM- produtoras de metano acetoclásticas e hidrogenotróficas

3.3.2. Tratamento anaeróbio do PCP em biorreatores

Como anteriormente mencionado, o metabolismo anaeróbio tem demonstrado sua eficiência na desalogenação redutiva de compostos com elevado número de halogênios. Assim, a escolha pelos processos biológicos anaeróbios de tratamento para a transformação de compostos tóxicos halogenados é uma alternativa segura, como defendido por El Fantroussi, Naveau e Agathos (1998). Segundos os autores, em áreas de aplicação biotecnológicas tem sido revelado que os microrganismos anaeróbios são mais adaptados que os aeróbios para a remoção de compostos halogenados de efluentes industriais. De acordo com a revisão feita pelos autores, isto acontece devido à polimerização de compostos haloaromáticos que ocorre frequentemente quando são degradados por bactérias aeróbias, limitando assim os ataques eletrolíticos subseqüentes pelo oxigênio a estrutura do composto.

De acordo com Speece (1986), a eficiência de um reator biológico, seja ele aeróbio ou anaeróbio, está relacionada com a cinética das reações bioquímicas, a qual apresenta dois aspectos-chaves: - as características hidráulicas (fluxo e mistura) que proporcionem o contato adequado entre a água residuária e a biomassa; - a retenção da biomassa no reator. As configurações dos reatores, portanto, visam a reunião desses dois aspectos para que as reações biológicas resultem em elevada eficiência de remoção da matéria orgânica em sistemas de reação com a menor dimensão e no menor tempo possíveis. No caso do tratamento anaeróbio, foram desenvolvidos os denominados “sistemas de alta taxa”, com capacidade em reter grandes quantidades de biomassa ativa, permitindo elevados tempos de retenção celular mesmo com a aplicação de baixos tempos de retenção hidráulica.

A biodegradação anaeróbia do PCP foi constatada em diferentes tipos de reatores anaeróbios, em que se inclui os “sistemas de alta taxa”, tais como o reator anaeróbio de fluxo

ascendente e manta de lodo (UASB), os filtros biológicos anaeróbios, o reator anaeróbio híbrido - UASB e filtro anaeróbio, o reator com leito expandido com carvão ativado granular e o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) (SAIA, 2005).

Shen, Liu e He (2005) estudaram a degradação do PCP em reator UASB, no qual grânulos anaeróbios foram adaptados às concentrações de 5 a 70 mg. L⁻¹clorofenóis por um período de 6 meses. O sistema operado com tempos de retenção hidráulica entre 20 a 22 horas resultou em velocidades de degradação da ordem de 200 a 220 mg/ L /d para concentrações de 170 a 180 mg. L⁻¹ de PCP. Nesse trabalho, os autores relataram que a adsorção e desorção do PCP no lodo granulado anaeróbio seguiram a equação da isoterma de Freundlich, sendo parte da adsorção não reversível. As conclusões mostraram que o principal mecanismo de remoção de PCP no reator UASB foi biológico e não físico-químico através da adsorção e volatilização.

Visvanathan et al. (2005) avaliaram o potencial de biorreator com membrana (MBR) aplicado a degradação do PCP. O MBR combina um sistema de filtração em membrana com um processo biológico. O reator foi operado por 120 dias com um inóculo previamente adaptado, a tempos de retenção hidráulica da ordem de 12 horas. Na primeira fase, a carga orgânica aplicada foi de 600 mg. L⁻¹ e a carga aplicada de PCP variou de 12 a 40 mg/m³/d. A remoção do PCP no sistema foi maior que 99%. Na segunda fase do estudo, cargas maiores de PCP foram aplicadas da ordem de 20 a 200 mg/m³/d, resultando em 99% ou mais de remoção do composto. Os autores verificaram que devido a alta concentração de biomassa, a biossorção de PCP foi um fator importante para o processo de biodegradação, pois aumentou o contato do composto com a biomassa. Experimentos em sistemas descontínuos revelaram que a capacidade de adsorção do PCP pela biomassa microbiana foi de 0,63 mg PCP/g biomassa em 60 minutos.

Lanthier et al. (2005) estudaram a degradação do PCP em um reator de filme fixo com volume total igual a 505mL, preenchido com aproximadamente 275g de anéis “rasching” como suporte para a colonização da biomassa. Como inoculo, o experimento empregou lodo granulado macerado proveniente de um reator UASB que tratava água residuária de indústria de processamento de polpa de maçã. O consórcio metanogênico foi adaptado a concentrações baixas de PCP (1,3 mg.L⁻¹) por 225 dias. Foram também acrescidas ao sistema fontes orgânicas adicionais como sacarose (1,99 g.L⁻¹), ácido butírico (0,63g.L⁻¹) e etanol (0,46g.L⁻¹). O biorreator foi operado a 35°C, com um TDH de 28 e 35 horas. Após o período de adaptação, maiores teores de PCP, da ordem de 364 mg.L⁻¹, foram testados. A remoção do PCP foi de 99%, sendo sua total mineralização em torno de 60% e o restante convertido a 3-CP, principal produto do metabolismo do sistema de reação. Nesse trabalho, foram realizadas análises de biologia molecular, aplicando-se a técnica de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (“FISH”). Os autores detectaram a presença da bactéria halorespiradora *Desulfitobacterium hafniense* em 19% da biomassa, e associaram o ótimo desempenho do reator à essa atividade microbiana.

Os dados da Tabela 1 mostram o potencial do processo anaeróbio na remoção do PCP e seus intermediários clorados em pesquisas realizadas no Brasil, no Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP. Os autores avaliaram a ocorrência da biodegradação anaeróbia do PCP por diferentes inóculos e sistemas de reação.

Condições do sistema de reação /Referências	Damianovic (1997)	Larizatti (1997)	Oliveira (1998)	Baraldi (2001)	Montenegro (2001)	Freire (2005)	Saia (2005)
Reator	RAHLF	Batelada	Batelada	RAHLF	RAH	RALF	RAHLF
Tempo de operação (d)	109	234-92	~ 19	240	755	80	120
Lodo aclimatado	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
Fontes de carbono	4 – Glicose; Ac Acético; Ac Fórmico; Etanol	4 – metanol; Ac. Butírico Ac Acético; Ac. propionico;	4 e 2	1 Etanol	4 – Ac Acético; Ac Láctico; Ac Propiônico; etanol	1 – Glicose	1 – Glicose
Concentração de PCP (mg.L ⁻¹)	0,2 a 8,0	5	2,5	2 a 13	2,0 a 21	1 a 6	5 a 21
Valores da matéria orgânica em DQO _{afluente} (mg.L ⁻¹)	3000	--	--	3000	6.880,0	1000	1000
Vazão afluente	650 e 160 mL/d	reator descontínuo	reator descontínuo	760 mL/d	400 a 800 ml/d	48 L/d	1066 mL/d
Temperatura (°C)	30	ambiente	55	30	31 a 36	32	30
TDH	25 e 18 h	--	--	25 h	36 h	8 h	18 h
Remoção de PCP (%)	total (75 a 97) e (90 a 97)	--	100 e 80	100	99	93 a 70	99
Remoção de matéria orgânica expressa em DQO (%)	97	--	--	97	96,7	91,9	70 a 100
Material suporte	espuma poliuretana	--	--	espuma poliuretana	esponja de poliuretana	carvão	espuma de poliuretana

Tabela 1: Pesquisas realizadas no LPB/SHS/EESC/USP com degradação de PCP.

Damianovic (1997), em trabalho pioneiro no Brasil, estudou a degradação anaeróbia do PCP em concentrações de 0,2 a 8,0 mg. L⁻¹ empregando dois reatores anaeróbios do tipo RAHLF e meio de cultivo Angelidak. Como fontes de carbono ou co-substratos acrescentaram-se glicose, ácido acético, ácido fórmico e etanol, com taxas de carregamento orgânico diferentes, 1,12 KgDQO/m³ para o primeiro reator e 1,71 KgDQO/m³ para o segundo. A operação do sistema resultou em elevadas taxas de remoção de matéria orgânica total (expressa em DQO), conseqüentemente do PCP. No trabalho, constatou-se que o composto PCP foi desalogenado em compostos menos clorados, principalmente DCP. A autora indicou a presença marcante do gênero *Methanosaeta* sp. no reator com taxa de carregamento orgânica menor. Para o outro reator, foi verificada a presença de morfologias semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., bem como morfologia de cocobacilos vibríões, aos pares, as quais foram relacionados a víbrios redutores de sulfato.

Larizzatti (1997) e Oliveira (1998) estudaram a degradação do pentaclorofenol por lodos anaeróbios mesofílicos e termofílicos, respectivamente, em reatores bateladas e obtiveram remoção de PCP de 75 a 97% e de 80 a 100%, respectivamente. Larizzatti (1997) observou a predominância de gêneros metanogênicos semelhante à *Methanococcus* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter*., *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.

Baraldi (2001) operou o RAHLF em condições semelhantes a Damianovic (1997), enfatizando a caracterização da comunidade microbiana. A autora utilizou como inóculo a mistura de lodo proveniente de um reator UASB aplicado ao tratamento de efluentes de indústria de reciclagem de papel e papelão e de outro aplicado ao tratamento de esgoto. O estudo constatou que a remoção da matéria orgânica e, conseqüentemente do PCP ocorreu na primeira terça parte do reator. As técnicas moleculares de PCR, ARDRA e hibridização “slot-blot” utilizadas confirmaram o predomínio do Domínio *Archaea* e alterações na diversidade das populações após a adição de 2,0 mgPCP. L⁻¹. As morfologias identificadas pela autora

revelaram o predomínio de tipos metanogênicos acetoclásticos do gênero *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. As células estavam presentes em maior intensidade no ponto inicial do reator. Já nos trechos finais do reator as células estavam em menor quantidade e com indícios de degeneração celular.

Montenegro et al. (2001) verificaram a eficiência de reator anaeróbio híbrido (RAH) na degradação do PCP em concentrações de 2,0 a 21,0 mg. L⁻¹. Os experimentos empregaram como fontes de carbono adicionais ao processo com PCP, ácidos orgânicos tais como acético, propiônico, e láctico, bem como do álcool metanol, perfazendo uma DQO de 6,88 g. L⁻¹. O RAH apresentou remoção de matéria orgânica expressa em DQO de cerca 97%, redução do PCP de 99% e composição do metano no biogás da ordem de 85,5%. As velocidades de remoção determinadas foram próximas a 1,07 mg PCP. g⁻¹ SSV. d⁻¹ durante as mais elevadas concentrações de PCP adicionadas. Testes revelaram a presença de microrganismos metanogênicos na concentração de 10⁵ a 10⁶ células/ mL. Os autores utilizaram a técnica FISH em conjunto com a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para analisar os grupos microbianos que estavam presentes no sistema durante a degradação do PCP (Montenegro et al., 2003). Os autores concluíram que as arqueias metanogênicas eram predominantes no lodo granulado anaeróbio, perfazendo porcentagens da ordem de 82 e 89% , respectivamente antes e após a adição de 21,0 mg. L⁻¹ de PCP. As células detectadas com sonda específica para *Methanosarcinales* (MSMX860) foram morfológicamente similares ao gênero *Methanosaeta* (33%) e *Methanosarcina* (26%). Os resultados de FISH também revelaram que a porcentagem de célula morfológicamente similar a *Methanosarcina* decresceu de 26,0% para 9,0% após a adição do PCP, ao contrário da porcentagem de *Methanosaeta* sp. que aumentou de 33 para 79% após a adição do PCP.

Freire (2005) avaliou a capacidade do reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) utilizando carvão ativo granular como suporte na degradação do PCP. O reator foi inoculado

com lodo proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB), tratando água residuária de abatedouro de aves. O substrato sintético (DEL NERY, 1987) continha glicose como fonte de carbono adicional (DQO efluente de 1000 mg. L⁻¹) e o composto clorado foi testado a concentrações de 1 a 6 mg. L⁻¹. Foi adotado um tempo de detenção hidráulico de 8 horas, correspondente a uma vazão de alimentação de 48 L/dia. A temperatura na fração líquida variou de 25°C a 30°C. As eficiências médias de remoção do PCP estiveram na faixa de 70 a 93% para os 80 dias de operação. O autor detectou a predominância de bacilos não metanogênicos (não fluorescentes). Também estavam presentes cocos, bactérias filamentosas, bacilos metanogênicos, cistos de *Methanosarcina* e *Methanosarcina* sp.

Saia et al. (2007) estudaram a degradação do PCP no RAHLF inoculado com sedimentos provenientes do estuário de Santos - São Vicente previamente enriquecidos sob condições metanogênicas e halofílicas. O reator preenchido com cubos de espuma de poliuretano foi operado por 126 dias e tempo de detenção hidráulica de 18 horas, com meio de cultura salino contendo glicose (1,0 g. L⁻¹) como principal fonte de carbono e PCP nas concentrações de 5, 13, 15 e 21 mg. L⁻¹. O desempenho do RAHLF foi estável, mantendo boa eficiência durante toda sua operação. A redução dos níveis de matéria orgânica (expressa em DQO) variou de 70 a 100% e a do PCP foi de 99% com detecção de compostos menos clorados e sob teores de metano no biogás de 15 a 30%. Da massa de 1.111,73 mg de PCP aplicada ao reator, teores de 286,9 mg ficaram retidos nas biopartículas do sistema pelo processo de adsorção e 834,83 mg foram biodegradados. Os autores também fizeram a caracterização microbiológica e detectaram células com sonda específica para *Methanosarcinales* (MSMX860) pela técnica do FISH e estas foram morfológicamente similares ao gênero *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. Este resultado também foi observado por microscopia eletrônica de varredura.

Os três estudos prévios realizados com o sistema RAHLF demonstraram o potencial deste reator no tratamento de compostos clorados, selecionando populações microbianas degradadoras de clorofenóis sob metanogênese.

O RAHLF foi inicialmente descrito por FORESTI et al. (1995) para o tratamento de água residuária de indústria de papel e segundo Zaiat (1996), o reator contendo espumas de poliuretana como material de enchimento e suporte para a imobilização da biomassa possui vantagens, a saber: - partida em tempo curto; - operação estável rápida; - utilização de material de enchimento leve, poroso, de alta superfície específica e de custo atrativo; - fácil colonização e elevada retenção da biomassa ao leito fixo; - contato biomassa-esgoto adequado; - tempos de retenção hidráulica reduzidos para cargas orgânicas relativamente elevadas; - comportamento semelhante ao reator com regime de fluxo pistonado. Estas características tornam o RAHLF bastante promissor ao tratamento de diferentes águas residuárias, inclusive as que contêm compostos tóxicos.

Além da pesquisa realizada por Saia (2005), Cattony (2005) utilizou o RAHLF para remoção de tolueno e benzeno com velocidades de remoção dos compostos sob condições sulfetogênicas da ordem de $0,06 \text{ mg}_{\text{tolueno}} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{SSV}} \cdot \text{d}^{-1}$ e $0,07 \text{ mg}_{\text{benzeno}} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{SSV}} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Nardi et al. (2005) utilizaram com sucesso este reator na remoção de 95% dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) em concentração de $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cada composto e tempo de retenção hidráulica de 12 horas. Os autores indicaram o uso do RAHLF no tratamento de efluentes e águas subterrâneas contaminadas por BTEX e gasolina.

3.3.2 Estudo de isotermas de adsorção do PCP

Estudos sobre adsorção de compostos são datados desde o início dos anos 60. Um dos pioneiros foi o de Giles et al. (1960) que resultou em 4 modelos básicos de isotermas de adsorção para soluções diluídas. As classificações foram baseadas no desenho da curva traçada ao se comparar o coeficiente de equilíbrio (Moles. L^{-1}) com a concentração na fase sólida (Moles/Kg). Assim, apresentam-se: - o modelo da curva em S, usado para situações em que na parte inicial de baixa concentração de equilíbrio ocorre baixa interação entre o contaminante e a fase sólida; entretanto, quando a adsorção do soluto inicia, mais fácil se dá a adsorção de quantias adicionais, com ocorrência de interação entre moléculas adsorvidas e outras, o que facilita a fixação na superfície do adsorvente; - o modelo da curva em L, usado para situações em que o contaminante tem alta afinidade com a superfície do composto e assim, quanto mais sítios do substrato forem preenchidos, mais difícil este substrato é adsorvido por novas moléculas; - o modelo da curva em H, caso particular do modelo em L, no qual o contaminante tem alta afinidade com o sólido que é completamente adsorvido; - o modelo da curva em C, caracterizado pela constante de partição do soluto entre a solução e o sólido, crescendo para a máxima adsorção possível. A linearidade da isoterma mostra que o número de sítios para adsorção permanece constante.

As isotermas podem ser representadas por equações simples que relacionam diretamente o volume adsorvido em função da pressão e/ou concentração do adsorvato, sendo as Langmuir, Freundlich, Henry, Temkin, Giles e BET as mais comuns empregadas nos estudos sobre adsorção (RUTHVEN, 1984).

Com base no trabalho realizado por Giles (1960), Mollah e Robinson (1996) estudaram e modelaram a adsorção e desorção do PCP em carvão ativado granular. Os dados

de equilíbrio do PCP adsorvido no carvão ativado e na fase aquosa foram ajustados em 5 diferentes modelos de isotermas. O modelo de Radke-Prausnitz (1972) foi o que apresentou um menor desvio entre o predito e o experimentalmente observado. Os resultados demonstraram que quando a concentração de equilíbrio era somente $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$ de PCP, o carvão ativado granular (CAG) teve capacidade de adsorver 157 mg PCP/g , revelando-se a elevada capacidade de adsorção deste composto. Este modelo se equivale ao modelo em L citado por Giles (1960), no qual o contaminante tem alta afinidade pelo substrato. Mollah e Robinson (1996) também relataram que o processo de adsorção e desorção do PCP em carvão ativado foram reversíveis, mas a desorção foi menor a temperatura de $25\text{-}30^\circ\text{C}$. Os autores citados estudaram a capacidade de adsorção do PCP em CAG em função do pH, e verificaram que a quantidade máxima de PCP adsorvido se deu com pH na faixa de 6,0 e a quantidade mínima quando o pH foi de 11. Além disso, observou-se que a adsorção do PCP em função da temperatura diminuía com o aumento da temperatura, considerando-se a faixa de 10 a 60°C .

A adsorção de compostos lipofílicos como o PCP pode ser um importante processo de remoção deste composto em biorreatores aplicado ao tratamento de resíduos. Estudos conduzidos por Jacobsen et al. (1991) mostraram que a adsorção do PCP por lodos ativados é estimada como sendo superior a 50%, desde que o tempo de detenção celular seja inferior a 3 dias. Por outro lado, o tempo de retenção celular foi superior a 14 dias e a quantidade de PCP adsorvido foi menor que 10 % do total de PCP removido. A isoterma de adsorção indicou linearidade até a concentração de $100 \text{ } \mu\text{g. L}^{-1}$ de PCP dissolvido.

Jacobsen, Arvin e Reinders (1996) determinaram que a concentração de equilíbrio para adsorção e desorção do PCP em biomassa microbiana foi estabilizada em aproximadamente 5 minutos e permaneceu constante por um período de 11 dias. Os autores calcularam a isoterma de adsorção linear para concentrações até $80 \text{ } \mu\text{g. L}^{-1}$ em pH 6 e para

concentrações de $160 \mu\text{g. L}^{-1}$ em pH 8. Os trabalhos de Karickhoff (1984)³ apud Jacobsen, Arvin e Reinders (1996) indicaram linearidade da isoterma de adsorção em biomassa microbiana para concentrações de até $2,66 \text{ mg PCP. L}^{-1}$.

Visvanathan et al. (2005) estudaram a capacidade de bioadsorção do PCP em lodo empregando experimentos operados sob condições descontínuas. Os resultados revelaram que a capacidade de bioadsorção do lodo aumenta com o aumento do tempo de contato até um determinado momento, em que se estabiliza. A concentração de PCP na fase líquida decresceu rapidamente nos primeiros 10 minutos e vagarosamente nos demais 50 minutos, quando então ocorreu a estabilização da bioadsorção do lodo em $0,63 \text{ mg PCP.g}^{-1}$ biomassa. O tempo de 60 minutos foi utilizado como tempo de equilíbrio para os estudos da isoterma. Este resultado também foi alcançado por Ladislao e Gali (2004), que reportaram que a bioadsorção do PCP se estabilizou em menos de 2 horas em testes com lodos ativados, e cerca de 2 horas quando um lodo granulado anaeróbio foi testado. Para a determinação do tempo de equilíbrio, volume de 50 mL de concentração de biomassa conhecida, foi adicionado em frascos com concentrações de PCP, variando de 7 a 15 mg. L^{-1} . O tempo de contato variou de 0, 10, 20, 40, 60, 120 e 180 minutos. Os resultados mostraram que a partir dos 60 minutos, não houve diminuição da concentração do PCP adsorvido. Para a construção da curva de isoterma de adsorção, os autores trabalharam com $15,0 \text{ mg PCP. L}^{-1}$ e tempo de equilíbrio de 60 minutos. Os resultados revelaram que a capacidade de adsorção da biomassa foi de $0,63 \text{ mg PCP.g}^{-1}$ biomassa. A quantidade de PCP adsorvida pela biomassa foi determinada como sendo a diferença entre a concentração inicial e final no líquido. Os autores ajustaram seus dados com o modelo de Freundlich.

A equação que descreve o modelo de Freundlich é a seguinte:

$$\ln (q_{eq}) = \ln (K_F) + n \ln C_{eq}, \text{ em que:}$$

³ Karickhoff, S.W. (1984) Organic pollutant sorption in aquatic systems. **J. Hydraul. Engng** 110, 707-735.

- q_{eq} é a capacidade específica (relação entre a quantidade de PCP adsorvido e o peso da biomassa);

- K_F e n são constantes da Isoterma de Freundlich;

- C_{eq} é a concentração de equilíbrio do PCP na solução.

Freire (2005) estudou a adsorção de PCP em carvão ativado e correlacionou com a isoterma de adsorção de Langmuir, a qual resultou em melhor ajuste dos pontos experimentais. O resultado do ensaio indicou que a presença da glicose reduziu em 9% a adsorção do PCP no carvão ativado, demonstrando competitividade destes dois compostos pelos sítios ativos do carvão.

3.4 Nitrogênio e Fósforo como nutrientes limitantes

Segundo Odum (1983), o material essencial que está disponível em quantidades que mais se aproxima das necessidades mínimas necessárias para a manutenção das funções vitais dos organismos é considerado “fator limitante”, ou seja condição que se aproxima ou exceda os limites de tolerância, conceito este que se tornou conhecido como a “lei” do mínimo de Liebig. Na verdade, um fator limitante pode ocorrer não só por causa da insuficiência de algum material, conforme foi proposto por Liebig, mas também por excesso. Assim os organismos apresentam um mínimo e um máximo ecológico, que representam os limites de tolerância. O conhecimento deste conceito foi primordial para que microbiologistas dominassem a difícil arte de formulação de meios para se cultivar microrganismos. Na

confecção de meios de cultura para quaisquer microrganismos, o objetivo principal é fornecer uma mistura balanceada de nutrientes necessários, em concentrações que permitam um bom crescimento (STANIER, 1986), entretanto estes nutrientes, ao contrario do que se acreditava, não pode estar em excesso, tornando-se inibidores ou tóxicos quando suas concentrações forem aumentadas. Isto é verdade para muitos substratos orgânicos, como acetato, por exemplo. Alguns constituintes inorgânicos também podem se tornar inibitórios se estiverem em excesso (STAINER, 1986).

Para crescer, os microrganismos devem retirar do meio em que vivem substâncias necessárias para síntese de seu material celular e para a geração de energia. E é baseado neste princípio científico, e partindo do conhecimento da composição química da célula microbiana que os meios de culturas são elaborados. A matéria sólida de uma célula contém principalmente, além de hidrogênio e oxigênio, que são derivados da água, carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Estes seis elementos representem cerca de 95% do peso seco celular. Muitos outros elementos estão presentes em frações residuais. Estudos nutricionais mostram que potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês, cobalto, cobre, molibdênio e zinco são requeridos por praticamente todos os microrganismos (STAINER, 1986). De acordo com este princípio, os nutrientes disponíveis para o desenvolvimento celular podem ser divididos em duas classes: -macronutrientes, aqueles requeridos em grandes quantidades pela célula; - micronutrientes, aqueles necessários em quantidades extremamente pequenas.

Os elementos carbono, nitrogênio e fósforo são macronutrientes e essenciais a estruturação das biomoléculas. A maioria dos microrganismos requer compostos orgânicos como fonte de carbono e podem catabolizar e/ou assimilar o carbono proveniente de diferentes compostos como aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, bases nitrogenadas, compostos aromáticos, etc. O nitrogênio pode ser encontrado na célula microbiana em associação com compostos orgânicos e de forma reduzida (grupo amino), na constituição de

proteínas, aminoácidos e coenzimas. As fontes de nitrogênio para as células microbianas são os aminoácidos, a amônia e o nitrato (MADIGAN et al., 1996).

De acordo com Hutchinson⁴ (1957) apud Odum (1993), de todos os elementos presentes nos organismos vivos, o fósforo é provavelmente o mais importante em termos ecológicos. Em relação aos demais, sua proporção nos seres vivos (síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídios) tende a ser consideravelmente maior do que a encontrada nas fontes primárias dos sistemas biológicos. Portanto, segundo o autor, é mais provável que uma deficiência de fósforo limite a produtividade de uma dada região da superfície terrestre do que uma deficiência de qualquer outro material, com exceção da água.

A quantidade de nitrogênio e fósforo é altamente significativa para a produtividade de ecossistemas aquáticos, e o fósforo é um fator limitante para a produtividade em ambientes de águas doces temperadas devido a sua pequena disponibilidade natural. Apesar de poucos estudos de limitação de nutrientes em lagos tropicais, tem sido sugerido que, enquanto a limitação por N ocorre raramente em sistemas temperados de águas doces (SMITH, 1983), pode ser mais comum em sistemas tropicais (LEWIS, 2002), em decorrência de maiores perdas de N por denitrificação em temperaturas mais elevadas. Já em ambientes aquáticos marinhos o N parece ser consideravelmente limitante devido a sua baixa concentração (WETZEL, 1983). Esses nutrientes principais e os numerosos elementos traço (ferro, manganês, molibdênio e zinco) têm importância biológica crucial na constituição de proteínas, ácidos nucleicos e na produção de enzimas específicas.

Em relação à produtividade primária, Overbeck (2000) comenta que os nutrientes nitrogênio e fósforo são consumidos pelo fitoplâncton em uma relação média de massa de 7,2:1, e será limitante se a disponibilidade desses compostos diferir muito dessa relação. Uma relação crítica de N:P indicada pelo autor é de 10:1. A Tabela 2 de Forsberg et al. (1978), por

⁴ Hutchinson, G.E. 1957. A Treatise on Limnology. Vol.I, Geography, Physics and Chemistry. New York, John Wiley & Sons, 1015pp.

exemplo, mostra as relações N:P descritas para o desenvolvimento de culturas de algas ou em lagos naturais. De acordo com os autores, a relação N:P maior que 12 revela que o P torna-se o fator limitante para o crescimento celular. Por sua vez, a relação N:P menor que 7, destaca o N como o limitante ao desenvolvimento das culturas. Finalmente, a relação N:P entre 7 e 12 resulta que, nessa condição, ambos os nutrientes são limitantes ao crescimento celular. A tabela 2 também apresenta dados de que demonstram o poder preditivo de diferentes concentrações de P e N em relação a biomassa fitoplanctônica expressa na forma de clorofila *a*.

Tabela 2. Relações N:P que estabelecem o nutriente limitante em relação aos níveis de clorofila *a*.

N total/P total	Nutriente limitante do crescimento	Nível de clorofila <i>a</i> (mg/m ³)
> 12	P	< 20
7-12	N e/ou P	20-70
<7	N	> 70

Fonte: FORSBERG et al. (1978).

Em estudos para verificar a dominância de cianobactérias em lagos em função da relação N:P, Smith (1983) observou que a relação 29:1 possibilitava a dominância de grupos de cianobactérias, mas uma relação superior evitava esse predomínio. Em trabalho posterior Smith et al., (1995) concluiu que a relação de 22:1 estabelece a mais distinta barreira entre lagos dominados por cianobactérias fixadoras de N e lagos com baixas ocorrências destas algas. O mecanismo proposto por Smith (1983) para ligar a dominância de cianobacteria com a baixa relação de N:P é que todas as espécies de cianobactérias, são mais capazes de competir por nitrogênio do que outros fitoplanctons, quando a quantidade deste composto é baixa.

Os estudos de Smith (1983, 1998) e Overbeck (2000) demonstram o papel essencial que a disponibilidade de nutrientes tem no controle da composição e biomassa das comunidades fitoplanctônicas. A razão ótima de nutriente para o crescimento é peculiar de cada espécie e pode determinar a exclusão ou a co-existência de espécies potencialmente competidoras (TILMAN, 1977, 1981).

Alguns experimentos realizados por Tilman et al, 1986 e Olsen, 1988⁵ appud Huszar et al. (2005) demonstraram que a habilidade competitiva por nitrogênio e fósforo é diferente, entre algas verdes e azuis. Teoricamente espera-se que, se diversas espécies de algas são limitadas pelos mesmos nutrientes, as que apresentam um menor requerimento destes nutrientes sejam capaz de vencer competitivamente as outras em condições de equilíbrio (TILMAN, 1977, 1981).

Embora seja de fato a concentração absoluta de um determinado nutriente que vai permitir ou não o crescimento de certa espécie (REYNOLDS, 1999), é importante lembrar que as espécies possuem habilidades diferentes em captar nutriente do meio. Em baixas concentrações, um determinado nutriente pode, por exemplo, estar abaixo da capacidade de adsorção de uma espécie e não da outra, fazendo com que a primeira seja excluída pela segunda, que se tornaria dominante (HUSZAR, et al, 2005).

A teoria dos nutrientes limitantes, proposta por Tilman (TILMAN et al, 1977; TILMAN et al., 1981), demonstrou de maneira clara, em experimentos realizados em laboratório e mais tarde comprovados por estudos de campo, que as concentrações de nutrientes necessárias ao crescimento são diferentes entre as espécies.

Trabalhos recentes têm sugerido a aplicação da teoria dos nutrientes limitantes como ferramenta para explicar os efeitos dos acréscimos nutricionais nas populações microbianas ativas (SMITH; GRAHAM; CLEVELAND, 1998; HEAD; SWANNEL, 1999; SMITH,

⁵ OLSEN, Y. Phosphate kinetic and competitive ability phytoplankton blooming Cyanobacteria under variabel phosphate suply. 1988. Thesis (Ph.D) – Norwegian Institutte of Technology, University of Trondheim.

2002). Quando a teoria se aplica à comunidades microbianas complexas, ocorrem mudanças na densidade microbiana e na estrutura da comunidade. Atlas e Bartha (1972) em seu estudo pioneiro variaram a relação N:P e obtiveram uma população microbiana com melhor desempenho na degradação de óleos em ambiente marinho sob uma relação molar entre 2:1 e 20:1.

O acréscimo de nutrientes a fim de estimular o desenvolvimento microbiano durante processos de biorremediação é bastante praticado. Porém, é ainda considerado empírico, necessitando o esclarecimento de suas conseqüências em base experimental, notadamente em relação aos efeitos do acréscimo de nutrientes para a atividade de biodegradação (HEAD; SWANNEL, 1999).

A teoria dos nutrientes limitantes tem sido aplicada na suplementação de nutrientes nos estudos sobre a biodegradação de hidrocarbonetos. Baseado no princípio de que se diferentes espécies ou linhagens de microrganismos presentes em amostras de solos contaminados com hidrocarbonetos têm diferentes necessidades nutricionais, a teoria prediz que alterações na dominância dos microrganismos podem ocorrer se a relação N:P for alterada. Assim, a alteração na composição da população microbiana em função da relação N:P poderá resultar na alteração das rotas bioquímicas e/ou velocidades de degradação do poluente pelo favorecimento de espécies mais eficientes (SMITH; GRAHAM; CLEVELAND, 1998)

A modificação da proporção N:P resulta na alteração significativa da composição da comunidade microbiana e das velocidades de biodegradação. Um exemplo está no estudo de campo de Swanell et al. (1999), no qual adotou técnicas de biorremediação em áreas com derramamento de óleo. Através de métodos da biologia molecular para estudo dos genes que codificam o RNA ribossomal para avaliação filogenética das espécies microbiana, os autores relataram as mudanças nas populações microbianas sob variação dos teores de N e P.

No estudo realizado por Smith, Graham e Cleveland, (1998) testou-se o efeito da limitação de nutrientes na velocidade da degradação aeróbia dos hidrocarbonetos hexadecano e fenantreno. Avaliando-se 34 diferentes combinações dos compostos nitrito de sódio (na faixa de 0 a 8,4 mg N/g de solo) e fosfato de potássio (na faixa de 0 a 0,68mg P/g de solo), os autores demonstraram que a relação N:P ideal para a máxima degradação aeróbia do hexadecano foi igual a 7:1. O resultado não significou que as populações degradadoras de hexadecano estavam ausentes nas demais relações testadas, apenas que forma menos eficientes. Por sua vez, a biodegradação máxima do fenantreno ocorreu sob duas relações N:P, uma próxima a 5:1 e outra cerca de 20:1. Neste caso, os autores associaram o resultado a possível seleção de duas distintas populações degradadoras de fenantreno, como também supuseram a indução de rotas metabólicas diversas na mesma população, com diferentes velocidades das reações. Análise na população microbiana presentes nos ensaios com diferentes relações nutricionais testadas indicou a seleção de diferentes padrões de diversidade. Os resultados experimentais demonstraram a consistência da teoria nutrientes limitantes, em que a suplementação do meio de cultivo com diferentes relações N:P influenciou as velocidades de degradação do fenantreno e do hexadecano.

Em outro trabalho, Röling et al. (2002) estudaram o efeito da adição de diferentes níveis de N:P na dinâmica da comunidade microbiana cultivada para testes de degradação de óleo. Os experimentos foram conduzidos em microcosmo inoculado com sedimentos de uma praia contaminada. As variações na diversidade de microrganismos nas diferentes concentrações nutricionais foram comparadas pela análise do gene RNAr 16S amplificados e submetidos à técnica do gel de eletroforese com gradiente desnaturante – DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Os resultados obtidos, analisados após a determinação da produção de dióxido de carbono e da degradação do óleo, demonstraram que a adição de nutrientes aumentou significativamente a biodegradação. Entretanto, as velocidades de

produção de CO₂ e de consumo de óleo foram similares para as diferentes concentrações de nutrientes. Isto demonstrou que foi a adição de nutrientes, e não as quantidades adicionadas, que influenciou diretamente na degradação do óleo.

A pesquisa que demonstra padrões similares de respostas é a Ishihara et al. (1994), que estudando a degradação de óleos em microcosmos com água do mar sintética e inoculados com uma cultura pura - Linhagem SM8. Os autores verificaram que a taxa de degradação foi fortemente afetada pela alteração das concentrações de N e P. Os resultados foram analisados em modelo tridimensional com a taxa de utilização de O₂ em função dos níveis acrescentados de nitrogênio e fósforo. Estes dados mostraram que baixas velocidades de utilização do O₂ ocorreram quando a relação N:P era baixa. Ainda, observaram um aumento progressivo nessa velocidade com o aumento dos níveis dos nutrientes N e P. Portanto os resultados concluem que a Linhagem SM8 apresentará melhor resultados de degradação de óleos em concentrações elevadas de nutrientes, sendo desfavorecida quando as condições nutricionais forem limitantes.

Braddock et al. (1997) observaram que quando o nitrogênio era o nutriente limitante em áreas contaminadas com hidrocarbonetos, o tamanho da população e a atividade dos microrganismos do solo aumentaram com a adição de N e P. Os autores também relataram que o padrão de distribuição microbiana e o de degradação dos hidrocarbonetos diferiram consistentemente sob diferentes relações N:P.

Os experimentos que aplicaram a teoria nutrientes limitantes na degradação aeróbia de hidrocarbonetos demonstraram claramente que o suprimento com diferentes relações N:P resultaram em um forte impacto nas taxas de degradação dos compostos.

Sem dúvida, a teoria não suscita grandes questões, na medida que preconiza o emprego equilibrado dos macronutrientes em direção à seleção de culturas microbianas mais eficientes na degradação de um composto alvo. Mas, para a Ecologia Microbiana aplicada às

práticas de tratamento de resíduos e/ou biorremediação é necessário esclarecer que a seleção de grupos microbianos em função dos nutrientes resulta na alteração de elos em cadeias alimentares e, por conseguinte, em rotas metabólicas. Assim, é importante o domínio das possíveis conseqüências de sua aplicação em campo. Para tanto, se abrem as perguntas sobre essa teoria e a operação de biorreatores anaeróbios.

Trabalhos sobre a degradação anaeróbia de clorofenóis realizados em laboratório utilizam excesso dos nutrientes N e P. Montenegro (2001) e Montenegro et al. (2001) estudaram a degradação anaeróbia do PCP em reator anaeróbio híbrido com um meio de cultivo contendo 10,66 g de N. l^{-1} e 1,56g de P. L^{-1} (SOARES; HIRATA, 1997). A carga orgânica média aplicada foi 5,0g DQO. L^{-1} , resultando na relação DQO:N:P de 5:10:1. A concentração do composto clorado variou de 2,0 a 21,0 mg. L^{-1} e a taxa de remoção deste composto foi em torno de 99,0%. Chen et al. (2000) estudaram a degradação do PCP em digestor anaeróbio, e o meio de cultura utilizado continha 323 mg de N. L^{-1} e 17 mg de P. L^{-1} , ou seja, uma proporção N:P de 19:1. O meio Zinder et al. (1984), utilizado como substrato em diversos trabalhos de pesquisas nos quais se estudou a degradação anaeróbia de compostos poluentes como o tricloroetileno (TCE) (BRUCHA, 2001), o tolueno e o benzeno (CATTONY, 2005) possui em sua constituição 132 mg de N-NH₄. L^{-1} e 22,75 mg de P – PO₄. L^{-1} , estabelecendo uma proporção N:P de 5,8:1.

Gardin, Lebeault e Paus (2001) estudaram a degradação anaeróbia do composto 2,4,6-TCP (triclorofenol) em reator UASB alimentado de modo contínuo com glicose, propionato, acetato e o composto clorado na concentração de 25 a 278 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. Os nutrientes N e P foram usados no meio na relação C:N:P igual a 100:5:1. O composto 2,4,6-TCP foi degradado em 2,4-DCP e 4-CP, mas não sofreu mineralização completa devido às baixas velocidades de degradação do composto monoclorado.

Danianovic (1997) utilizou o meio Angelidaki, Petersen e Ahring, (1990) na operação de um RAHLF, estudando a degradação anaeróbia do PCP em concentrações de 0,2 a 8,0 mg. L⁻¹. Como anteriormente apontado, foram acrescentadas as fontes orgânicas glicose e os ácidos acético e fórmico, perfazendo uma DQO teórica de 3000mg. L⁻¹. A autora obteve 100% de remoção do composto com produção de DCP em concentrações médias de 0,23 mg. L⁻¹. O meio utilizado continha 105,66 mg de N-NH₄. L⁻¹ e 54,29 mg de P – PO₄. L⁻¹, perfazendo uma relação DQO:N:P de 1000:35:18.

Vale ressaltar que os meios utilizados pelos trabalhos citados foram elaborados para estudos laboratoriais em microbiologia e bioquímica e que foram transportados para estudos de processos anaeróbios em laboratório, por se tratar de meios confiáveis, resultando muitas vezes em respostas aquém da realidade. Entretanto, precisa-se averiguar a real necessidade da aplicação de altas concentrações de nutrientes em processos de escala real, onde o custo operacional é relevante e a maximização da velocidade de degradação é preterida.

Segundo Speece (1996), o requerimento de macronutrientes dos microrganismos anaeróbios é proporcionalmente reduzido quando comparado com o do processo aeróbio, sobretudo devido à quantidade reduzida da síntese de biomassa nesses sistemas. Entretanto, o autor aponta que a concentração de N disponível aos microrganismos anaeróbios deve se encontrar entre 40 e 70 mg. L⁻¹ a fim de prevenir a limitação do processo por este composto.

Não foi encontrada na literatura a descrição de trabalhos que relatem a aplicação de uma condição nutricional próxima à limitante para reatores anaeróbios que operavam na degradação de compostos clorofenólicos. O objetivo deste trabalho foi aplicar a teoria nutrientes limitantes, já consagrada em ecologia, para ecossistemas anaeróbios e estudar a comportamento da comunidade microbiana na limitação de nutrientes. A aplicação desta teoria visou selecionar inóculos autóctones com melhor desempenho na degradação anaeróbia do PCP para ser aplicado no sistema RAHLF, buscando otimizar a eficiência da degradação

anaeróbia deste composto, transformando em produtos menos clorados e/ou a mineralização, uma vez que a interrupção do processo de degradação anaeróbia deste composto por desalogenação reductiva ocorre em intermediários clorados (ZHANG; WIEGEL, 1990; MOHN; TIEDJE, 1992; FAHMY; KUT; HEINZEL, 1994; GARDIN; LEBEAULT; PAUS, 2001). Também buscou-se estabelecer a relação nutricional ideal, visando além de maximizar a eficiência do sistema, diminuir custo em processos de biorremediação do local contaminado.

3.5 Ecologia Molecular Microbiana

O estudo sobre as comunidades microbianas levanta questões sobre a composição, estrutura, estabilidade e relação da atividade e função de seus habitantes. As técnicas microbiológicas tradicionais e os exames microscópicos comuns são meios insuficientes para responder a estas questões. A maioria dos microrganismos em amostras ambientais não pode ser detectada através de exames microscópicos convencionais, pois muitas vezes, as células microbianas podem se encontrar no meio de forma agregada quando, por exemplo, se aderem a partículas do solo, aos sedimentos de um corpo aquático ou mesmo entre si (MUYZER et al.,1996). Além disso, é praticamente impossível a simulação das condições ideais para a reprodução microbiana encontrada no ambiente, muitas vezes impossibilitando o cultivo e a manutenção mais adequados em laboratório.

A investigação filogenética de populações naturais é importante para conhecer a diversidade microbiana dos ambientes. O desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular associado à tecnologia de bioinformática é componente de uma nova linha de estudo interdisciplinar conhecida por Ecologia Molecular Microbiana. Nesse sentido, busca-se

determinar a diversidade genética das comunidades microbianas e suas relações com o ambiente (MUYZER et al., 1996; TESKE et al., 1996; HEUER et al., 1997; KOWALCHUK et al., 1997).

Os ácidos desoxirribonucléico (DNA) e ribonucléico (RNA) são extraídos de comunidades microbianas presentes em amostras de solo, água e sedimentos, sendo empregados em diferentes estratégias moleculares, a fim de determinar a complexidade da comunidade e identificar os membros das populações. No entanto, para que tais análises possam ser realizadas, os ácidos nucléicos precisam ser isolados dos outros constituintes celulares e ressuspensos em solução aquosa. Muitas vezes, as suspensões de ácidos nucléicos necessitam ainda passar por processos de purificação para que compostos considerados como contaminantes, tais como proteínas e polissacarídeos, sejam retirados da solução.

Para se obter ácidos nucléicos para análises, duas diferentes estratégias de extração têm sido desenvolvidas na última década, extração por lise direta e extração por lise indireta. Na primeira, o DNA é extraído da comunidade microbiana diretamente da amostra ambiental (OGRAM; SAYLER; BARKAY, 1987) e, na segunda, os microrganismos são primeiramente extraídos do solo ou sedimento, para depois a células serem lisadas e o DNA ser extraído (TORVISK 1980; HOLBEN et al., 1988; TSAI; OLSON, 1991). Entretanto, as duas metodologias apresentam suas desvantagens. O método de lise indireta é demorado, trabalhoso e normalmente menos eficiente, pois recupera menor quantidade de DNA que o método de lise direta. Por sua vez, o método de lise direta apresenta como desvantagens a extração de DNA tanto de procariontes como de eucariontes, maior índice de contaminação por compostos húmicos, no caso de extração de sedimentos e solos, e maior nível de degradação dos ácidos nucléicos extraídos (TSAI; OLSON, 1991).

Em geral, o processo de extração celular é composto por alguns poucos procedimentos básicos para que ocorra a desintegração e homogeneização de células, a solubilização dos

ácidos nucléicos, a separação dos ácidos nucléicos dos outros constituintes celulares e a precipitação dos ácidos nucléicos. Os protocolos de isolamento de ácidos nucléicos apresentam pequenas variações e podem ser mais ou menos convenientes a determinados propósitos em função do tempo gasto, da quantidade e pureza dos ácidos nucléicos obtidos, do nível de degradação dos ácidos nucléicos e da eficiência de lise das células-alvo (PIZA, 2000).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), introduzida por Saiki et al. (1985), permitiu amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma. É um método pelo qual se obtém *in vitro* várias cópias de um determinado fragmento do DNA. A aplicação de métodos baseados na PCR tem sido cada vez mais utilizada em vários campos da Biologia Molecular.

Para a sistemática microbiana, o PCR é atualmente o método básico para obter cópias de segmentos de DNA genômico para clonagem e seqüenciamento de genes utilizados na caracterização e identificação de microrganismos. Nos estudos de genética de populações e Ecologia Microbiana, os fragmentos amplificados por PCR geram dados sobre a distribuição natural dos microrganismos no ambiente. As vantagens do PCR incluem a simplicidade, rapidez e sensibilidade do método que necessita de pequenas quantidades de DNA (MULLIS; FALOONA, 1987).

Metodologias baseadas na análise de fragmentos específicos de RNAr 16S ou de genes cromossomais que os codificam, DNAr 16S, têm se revelado de grande valia para o estudo da diversidade de microrganismos em amostras ambientais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; MUYZER et al., 1996). Essas seqüências são marcadores filogenéticos importantes devido a sua distribuição universal (ocorrem em todos os organismos), bem como pela sua conservação estrutural e funcional, pela presença de regiões conservadas ou variáveis e hiper-variáveis nas diferentes porções da molécula de DNA e, finalmente, pelo tamanho que fornece a informação da seqüência de bases para inferências filogenéticas. Além disso, mais

de 10.000 seqüências estão disponíveis em bancos de dados públicos de seqüência de nucleotídeos, como o GenBank (BENSON et al., 1997) e o Ribosomal Database Project (RDP – MAIDAK et al., 1997).

A análise direta do DNA usando experimentos de reassociação de DNA (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990) ou hibridação DNA/DNA (LEE; FUHRMAN, 1990) revelou a importante informação do número de diferentes genomas em amostras ambientais. Em adição à análise direta de DNA, uma outra estratégia de análise da diversidade é baseada na eletroforese de RNA de baixo peso molecular (5S RNAr e RNAt) em gel de poliacralamida de alta resolução (HÖFLE, 1992). No entanto, essas duas metodologias não permitem identificar os membros da comunidade. As duas únicas estratégias que permitem a identificação dos membros da comunidade são a clonagem e o DGGE de marcadores moleculares como o RNAr 16S, ambos seguidos de seqüenciamento dos fragmentos amplificados e isolados.

Diferentes estratégias de clonagens têm sido aplicadas para analisar a diversidade genética microbiana: clonagens de fragmentos, de alto peso molecular, gerados por “shotgun” em bacteriófago lambda (SCHMIDT; DELONG; PACE, 1991), clonagem de fragmentos de DNAr, que são cópias do DNA obtido por transcrição reversa a partir do RNAr (WARD; WELLER; BATESON, 1990) e de fragmentos de RNAr 16S, ambos fragmentos obtidos por amplificação por PCR (FUHRMAN; McCALLUM; DAVIS, 1993; GIOVANNONI et al., 1990). Todas essas estratégias de clonagem resultaram em bibliotecas de recombinantes na qual o fragmento de DNA ligado a vetores plasmidiais e inserido em células hospedeiras pode ser seqüenciado. Usando essas estratégias, microrganismos que nunca tinham sido identificados puderam ser classificados (MUYZER et al., 1996).

Assim, os ácidos nucléicos extraídos de diferentes comunidades microbianas são usados em diferentes estratégias moleculares para determinar a diversidade genética e identificar membros das comunidades. Ao realizar as análises comparativas de seqüências

“ambientais” com seqüências de microrganismo conhecidos, a afiliação filogenética de membros da comunidade pode ser inferida. A Figura 6 esquematiza algumas diferentes estratégias para se determinar à diversidade genética da população microbiana.

Outra estratégia para análise da diversidade está baseada na eletroforese de fragmentos de RNAr 16S, em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes de DNA (DGGE) (MUYZER et al., 1996). Para isso, fragmentos específicos de DNA têm que ser amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

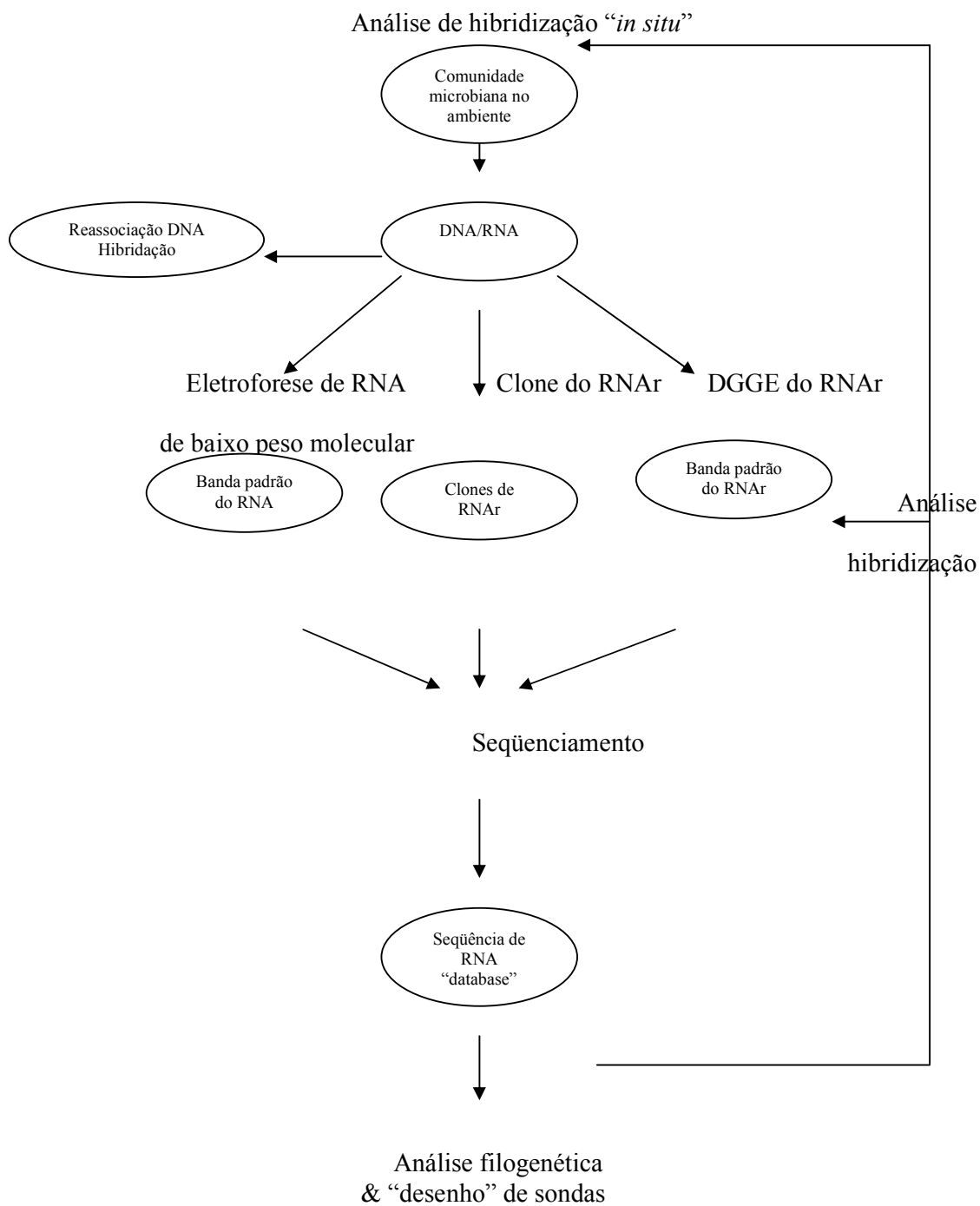


Figura 6: Diagrama geral de diferentes métodos moleculares usados para determinar a diversidade de populações microbianas mistas (MUYZER et al., 1996).

3.5.1 Técnica de “Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante” e outras

A técnica de DGGE ou eletroforese em gel com gradiente desnaturante foi originalmente desenvolvida e aplicada na pesquisa médica a fim de detectar, identificar e localizar mutações de ponto, naturais e induzidas (MYERS et al., 1985). É das técnicas da Biologia Molecular que permite medir a diversidade de uma comunidade microbiana sem que para isso seja necessário cultivar as células. A técnica atinge um nível de resolução que permite separar fragmentos de DNA de mesmo comprimento com seqüências de nucleotídeos diferentes, e está baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida contendo gradiente linear de uma substância desnaturante (uréia e formamida). Devido a isso, pode-se detectar até 95% de todas as substituições em uma única base (nucleotídeo) entre as seqüências de até 500 pares de base de comprimento (VALLAEYS et al., 1997).

Dentre as limitações da metodologia do DGGE encontram-se: - o custo do “primer” com “GC-clamp”; - a análise com até 500 pares de base; - os genes excepcionalmente ricos em GC não facilmente analisados, pois é muito difícil de separar estas bandas no gel; - o método envolve o uso de substâncias tóxicas como formamida;- a coincidência nos domínios de dissociação de fragmentos diferentes de DNA com o mesmo número dos nucleotídeos A-T e C-G.

A técnica de DGGE vem sendo utilizada para estimar a diversidade genética de comunidades microbianas em diferentes ambientes, tais como biorreatores (GUSMÃO et al., 2007; BUZINI, et al., 2006), amostras de sistemas aquáticos e sedimentos de fontes termais e outros ambientes extremos, bem como no estudo de bacterioplâncton de água doce (MUYZER et al., 1993; TESKE et al., 1996; WAWER; MUYZER, 1995; KOWALCHUK et

al., 1997; HEUER et al., 1997;). Os procedimentos do DGGE proporcionam ainda a possibilidade de isolamento e seqüenciamento de bandas distintas, permitindo a análise filogenética dos membros da comunidade (MUYZER et al.,1996).

Tartakovsky et al. (2000) correlacionaram os intermediários clorados com o aparecimento de bandas no DGGE de um reator UASB operado com glicose e com aumento progressivo de PCP. O seqüenciamento de bandas mais relevantes do gel do DGGE revelou a proliferação de *Clostridium* e *Sybtrophobacter/Syntrophomonas* sp. Durante a degradação do PCP. Estes autores relacionaram o gênero *Clostridium* com a degradação direta do PCP e *Sybtrophobacter/Syntrophomonas* sp com o consumo dos ácidos orgânicos intermediários e do benzoato.

Maukonen e Ratto (2001) utilizaram a técnica do DGGE para monitorar a composição da comunidade microbiana em um reator de leito fluidizado redutor de sulfato, que era usado para tratar efluente contaminado por metais (Zn e Fe²⁺) e sulfato. Dois reatores foram operados, um com etanol e outro com etileno-glicol, como doadores de elétrons. Os resultados mostraram que havia muitas linhagens bacterianas presentes ambos os reatores e que a população do reator operando com etanol foi mais estável do que a do operado com etileno-glicol.

Sanz (2002) utilizou esta técnica para estudar as populações microbianas e sua evolução em perfis de sedimentos marinhos com indícios da ocorrência de alquilbenzenos sulfonados (LAS), relacionando os parâmetros físico-químico e microbiológicos.

Röling et al. (2002), por sua vez, estudaram o efeito da adição nutricional em microcosmos contendo sedimentos de praia contaminados por óleo com diferentes níveis nutricionais. As comunidades bacterianas foram comparadas por padrões de bandas do DGGE. Afiliação filogenética da comunidade foi analisada por amplificação, clonagem e sequenciamento do RNAr 16S. Análises estatísticas dos padrões de bandas do DGGE

apontaram mudanças claras na estrutura de comunidades, tanto com relação ao tempo, como aos diferentes tratamentos impostos. Análise em triplicatas das amostras retiradas dos microcosmos individuais demonstrou a existência de baixa heterogeneidade espacial em um mesmo microcosmo. Entretanto, quando se comparou a similaridade dos padrões de bandas em três microcosmos preparados independentes que receberam a mesma concentração de nutrientes inorgânicos os resultados não foram significativamente diferentes dos microcosmos alimentados com diferentes concentrações de nutrientes. Frente a estes resultados, os autores não puderam concluir que foram as diferentes concentrações de nutrientes a responsável pela seleção de das diferentes comunidades. Os autores relataram que uma fraca homogeneização da fração sedimento/água contribuíram significativamente para alta variabilidade da estrutura da comunidade microbiana entre os microcosmos (somente $65\% \pm 6$ de similaridade).

Apesar da variação da comunidade microbiana nos diferentes reatores não ter sido atribuída aos diferentes concentrações de nutrientes inorgânicos impostos, o tratamento de impostos reduziu drasticamente a diversidade da comunidade bacteriana. A diminuição da diversidade pode ser justificada pela forte seleção da bactéria pertencente ao grupo degradadora de alcano *Alcanivorax/Fundibacter*.

Em recente estudo, Yang et al. (2005) descreveram a caracterização filogenética de culturas anaeróbias provenientes de sítio contaminado com cloroetenos, capazes de desalogenar redutivamente o tetracloroetano (PCE). A cultura foi enriquecida usando diferentes combinações de doadores de elétrons (hidrogênio e acetato) e aceptores de elétrons (PCE, cis, 1,2 dicloroetileno cDCE). Os autores utilizaram a técnica do PCR do RNAr 16S – DGGE para comparar a composição da comunidade microbiana e seqüenciar as bandas de interesse. A técnica FISH também foi utilizada para quantificar grupos específicos de microrganismos, usando oligonucleotídeos marcados (sondas) previamente desenhados com base nas seqüências obtidas das bandas específicas extraídas do DGGE. Os resultados

indicaram a presença dos gêneros *Dehalococcoides* e *Desulfotobacterium* como microrganismos capazes de desalogenar os compostos clorados estudados. O gênero *Dehalococcoides* foi associado com a completa desalogenação de cloroetenos a etenos, utilizando hidrogênio como doador de elétrons. A bactéria *Desulfotobacterium* foi associada com a desalogenação incompleta do PCE a *cis*-DCE utilizando o acetato como doador de elétrons. Os autores concluíram que a combinação de técnicas convencionais como o DGGE e o FISH foi uma importante estratégia para identificar os microrganismos chaves envolvidos na desalogenação do PCE, isto é, correlacionando a função dos microrganismos com sua identificação filogenética.

Lanthier et al. (2005) estudaram o desenvolvimento de uma comunidade microbiana degradadora de PCP em um reator de filme fixo inoculado com lodo granulado proveniente de um UASB. Análises de PCR-DGGE demonstraram que as comunidades de *Bacteria* e *Archaea* no reator estabilizaram no biofilme depois de 56 dias de operação. Modificações consideráveis no Domínio *Bactéria* com relação ao inóculo ocorreram, e menos de 1/3 das bandas inicialmente presentes permaneceram no reator após a estabilização da comunidade. A metodologia do FISH, com sondas para o Domínio *Bacteria* e *Archaea* também foi utilizada pelos autores e revelou que o biofilme era composto principalmente pelo Domínio *Bacteria*, com representação de 70% das células presentes. Foram utilizados “primers” específicos para detecção, através do PCR, da bactéria haloinspiradora *Desulfotobacterium hafniense*. Este microrganismo capaz de degradar o PCP (LANTHIER et al., 2002) foi detectado durante o período de aclimação do reator, e através da técnica do FISH, pelo emprego de sondas específicas, determinou-se que esta linhagem era responsável por 19% da comunidade total presente no biofilme. Os autores associaram este fato como sendo crucial para o desempenho do reator.

Akarsubasi et al. (2006) utilizaram a metodologia do DGGE para comparar as comunidades de arqueias presentes de dois distintos reatores UASB (143 e 476 m³, operados desde 1998 e 1996, respectivamente) tratando água residuária de uma destilaria de álcool na Turquia. Ambos os reatores apresentaram uma composição muito similar na comunidade de arqueias, 83,1%. Amostras recortadas do gel de DGGE foram seqüenciadas e as seqüências predominantes de ambos os reatores pertencia a *Methanobacteria formicicum* e *Methanosaeta soehngeni*.

No Brasil, estudos realizados por Rosado et al. (1997), empregaram a técnica do DGGE para avaliar a diversidade do gene *nifH* de linhagens isoladas de *Paenibacillum* spp. e organismos presentes em amostras de solo. Prantero et al. (1999) utilizaram esta técnica para identificar uma população capaz de degradar hidrocarbonetos de petróleo.

Cattony (2001) empregou o DGGE para verificar o efeito do aumento da temperatura, causado pela queima de cana de açúcar, na estrutura da comunidade microbiana do solo. Os resultados obtidos não revelaram alterações na estrutura da comunidade bacteriana do solo de canavial depois da queima.

Duarte et al. (2001) utilizaram a metodologia do PCR-DGGE, para verificar o efeito seletivo de hidrocarbonetos contendo enxofre na diversidade bacteriana de um solo. O resultado, obtido pela análise do DGGE, demonstrou uma diminuição no padrão de bandas com o aumento na concentração de óleo.

Brucha (2001) utilizou a técnica do DGGE com primers do Domínio *Archaea* e *Bactéria* para verificar a diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia do tricloroetileno (TCE). No final do experimento, morfologias semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* estavam presentes. O resultado do DGGE analisado de amostras do sedimento enriquecido antes da adição e após a degradação do TCE, demonstrou que não houve

mudança significativa na comunidade e, portanto a microbiota enriquecida foi resistente as concentrações de TCE estudada (6 e 12 mg. L⁻¹) podendo ser responsável pelo processo de degradação sob metanogênese.

A análise do DGGE de fragmentos do RNAr 16S amplificados por PCR foi utilizada para a investigação da diversidade bacteriana em sedimento contaminado do estuário da baixada santista (Santos-São Paulo). Análises preliminares do DGGE indicaram um alto número de bandas, resultando em uma alta diversidade de microrganismos presentes no sedimento contaminados, tornando difícil a visualização e comparação dos padrões de bandas obtidos no gel (PIZA; MANFIO, 2001).

Buzzini et al., (2006) utilizaram a técnica do DGGE para avaliar alterações na diversidade microbiana em reator UASB tratando efluente de indústria de papel e celulose. Os resultados revelaram que a estrutura da comunidade microbiana estava complexa e similar durante o período experimental. A comunidade microbiana do Domínio *Bacteria* foi mais sensível a mudanças operacionais do que o Domínio *Archaea*.

Saia et al. (2007), ao estudarem o potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) pelos microrganismos autóctones do estuário de Santos, utilizaram a técnica do DGGE para acompanhar padrões de diversidade microbiana. Os autores constataram que para o Domínio *Archaea*, o enriquecimento em condições halofílicas do sedimento do estuário de Santos- São Vicente apresentou pouca diversidade de espécies com apenas duas bandas. Esta diversidade aumentou no RAHLF com o surgimento de pelo menos quatro novas bandas ao longo de todo o comprimento do reator, as quais persistiram durante a adição progressiva de PCP. Padrões de bandas do DGGE de todos os pontos do reator foram comparados antes e após a adição do PCP pelo índice de similaridade (GILLAN et al., 1998). Os valores variaram de 94 a 100% para o domínio *Archaea*. Portanto, a autora constatou que as adições de PCP não provocaram

alteração na estrutura da comunidade microbiana de arqueias do biofilme formado nos ensaios contínuos no RAHLF sob condições metanogênicas e halofílicas.

Para o Domínio *Bacteria*, a foi constatado a presença de pelo menos nove bandas no enriquecimento sob condições metanogênicas e halofílicas. Ao comparar o padrão de bandas das amostras do reator, os autores observou-se que o PCP alterou a estabilidade da comunidade microbiana halofílica próximo a entrada do reator. A presença do organoclorado parece ter afetado a estrutura da comunidade do Domínio *Bacteria*. Os autores concluíram que a técnica do DGGE permitiu constatar que microrganismos autóctones do Domínio *Bacteria*, sob condições metanogênicas e halofílicas, foram capazes de degradar o PCP. As arqueias metanogênicas halofílicas estiveram relacionadas com o consumo de ácidos orgânicos, principalmente o acético e de intermediários metabólicos menos clorados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Visando alcançar os objetivos propostos, o projeto foi desenvolvido em etapas, a saber:

(1) caracterização das condições abióticas do local amostrado na região do estuário próximo a Cosipa (23°52'31,1''S; 46°22'35,9''W), notadamente e caracterização físico-química das amostras de sedimento e água; exames microscópicos das amostras; determinação do gás metano na interface água-sedimento para a verificação da atividade anaeróbia metanogênica *in situ*;

(2) realização de testes nutricionais em sistemas anaeróbios operados em batelada com alimentação semi-contínua, a fim de determinar a melhor relação N:P para a degradação anaeróbia do PCP (1 mg. L⁻¹) em condições halofílicas; aplicação da técnica do DGGE para avaliar a alteração na diversidade microbiana devida às diferentes condições nutricionais testadas;

(3) enriquecimento dos sedimentos para inoculação do RAHLF; operação do RAHLF com PCP em meio de cultura contendo N e P nas respectivas concentrações de 130 e 45 mg. L⁻¹ sob condições halofílicas; aplicação de exames microscópicos e da técnica de DGGE para análise da microbiota nas diversas etapas de operação;

(4) enriquecimento dos sedimentos para inoculação do sistema RAHLF; operação do RAHLF com PCP em meio de cultivo contendo N e P nas respectivas concentrações de 10 e 1 mg. L⁻¹ sob condições halofílicas; identificação de culturas degradadoras através dos métodos moleculares DGGE e seqüenciamento genômico.

A Figura 7 organiza em um esquema as etapas e procedimentos da pesquisa realizada na presente tese de doutorado.

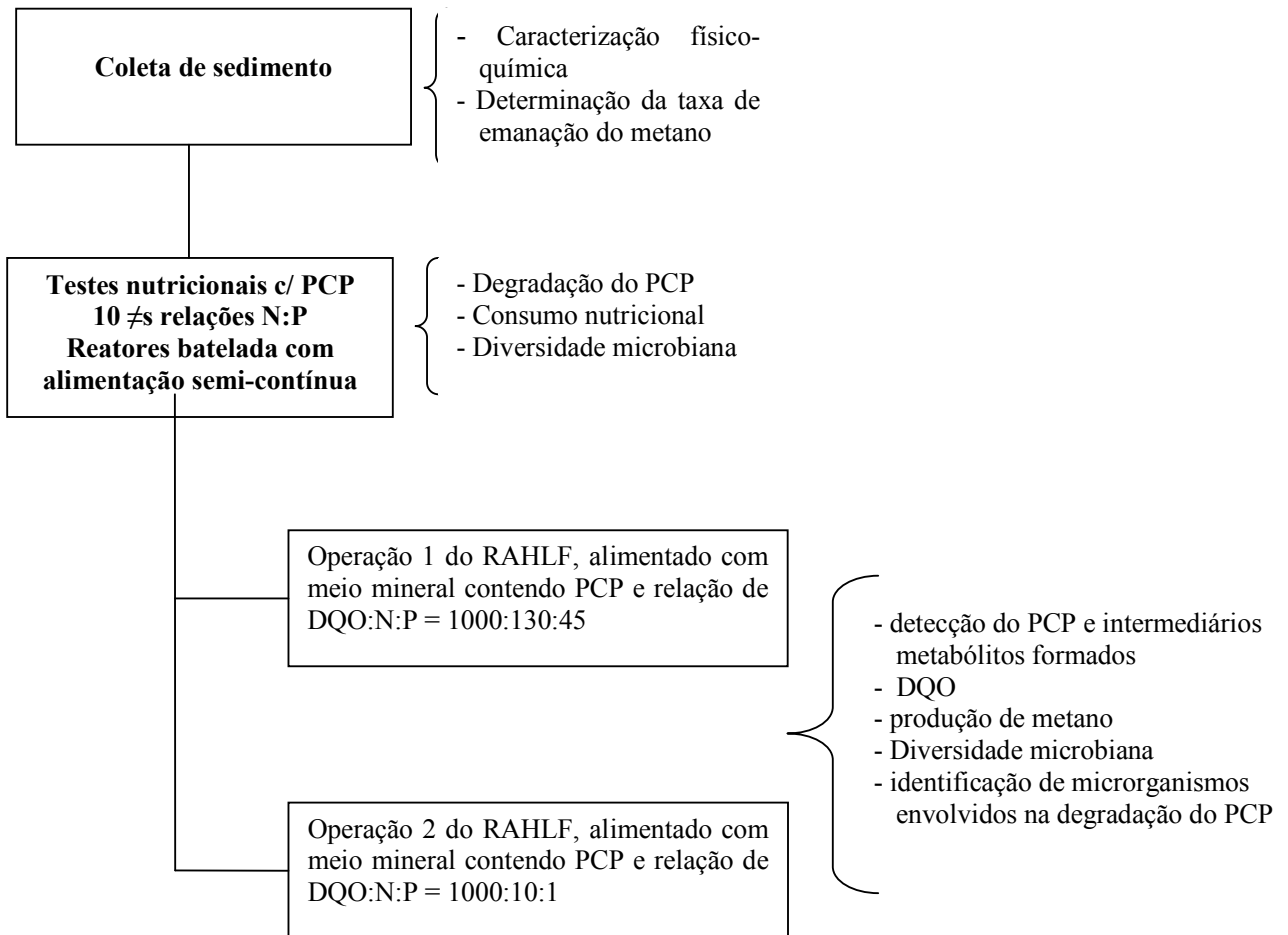


Figura 7: Esquema geral do trabalho de pesquisa da presente tese de doutorado.

4.1 AMOSTRAGENS

As amostragens do sedimento foram realizadas com o apoio da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) que possui autorização para efetuar coletas na região do estuário. A coleta foi realizada em barco a motor no período de maré baixa, entre 13:00 e 15:00h do dia 06/07/2004. As condições de tempo eram boas, sem vento e chuva, facilitando o manuseio do amostrador. Os pontos foram georeferenciados com aparelho GPS, marca Garmim. Além da coleta do sedimento, foram realizadas as análises de condutividade, salinidade, oxigênio dissolvido, pH e potencial redox na água de superfície e de fundo.

As amostragens foram feitas nos pontos 4 - Projeto Biota Fapesp (Figura 8). O ponto 4 fica em frente à Cosipa e situa-se ao lado do cais desta empresa (Figura 9). Foi possível observar manchas de óleo na superfície da água, formando uma película fina. O sedimento coletado apresenta aspecto lodoso, consistência viscosa (semelhante à graxa), coloração preta e emanava forte odor de óleo.



Figura 8. Área de estudo, região da Baixada Santista, São Paulo.



Figura 9: Local da coleta (frente da Companhia Siderúrgica Paulista – COSIPA)

4.1.1 Coleta, transporte e estoque de amostras do sedimento.

Para a coleta de sedimento utilizou-se um amostrador do tipo corer (Figura 10) cedido pela CETESB. Este amostrador é bastante utilizado em estudos sobre comunidades microbianas anaeróbias (PARKES et al., 1993; BERKAW; SOWERS; MAY, 1996; KAZUMI et al., 1997).

O amostrador consiste de uma peça de aço inox à qual se prende um tubo de acrílico de 50cm de comprimento e 5,4cm de diâmetro interno. A peça de aço inox possui uma tampa interna que permanece aberta durante a descida do amostrador, a qual se fecha antes de subir a amostra, formando vácuo evitando que a amostra se perca durante o recolhimento do

aparelho. O aparelho possui um peso móvel, amarrado à uma corda, que pode ser utilizado como um “martelo”, ajudando o tubo a penetrar no sedimento. A fixação do tubo de acrílico na peça de aço inox é feita com o auxílio de duas borboletas e um anel de borracha (Oring) que promove vedação suficiente para a formação de vácuo no tubo.

Para coleta, o seguinte procedimento foi tomado: fixou-se o tubo de acrílico no amostrador; - mergulhou-se o aparelho até alcançar o sedimento; - com o auxílio do peso móvel, o tubo penetrou no sedimento;- puxou-se o amostrador com cuidado, a boca inferior do tubo foi tampada com tampa de PVC; - o tubo foi desconetado da peça de aço inox e imediatamente colocado uma tampa de borracha na outra extremidade; - as duas extremidades foram vedadas com fita adesiva e etiquetadas.

Este procedimento foi realizado 4 vezes para o preenchimento dos 4 tubos de coleta. Os tubos com as amostras foram transportados para o laboratório preservados a temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$ até o momento do manuseio, no dia seguinte. No laboratório, o conteúdo dos “cores” foi transferido para frascos Duran de 2L (um frasco por core) sob atmosfera de nitrogênio. Para isso, um funil de boca larga foi acoplado ao frasco e nitrogênio fluxionado através do funil. Como os “cores” estavam com pouca quantidade de água, não foi necessário a homogeneização da amostras. Uma das tampas do cilindro foi retirada e o conteúdo vertido aos poucos no funil, cuidadosamente. É importante ressaltar que, antes de verter o sedimento, o fluxo de gás foi trazido para a boca do funil e mantido sobre o material durante toda a transferência. A Figura 10 ilustra o procedimento de transferência do sedimento para os frascos Duran.



Figura 10. Procedimento de transferência do sedimento dos “cores” para os frascos Duran sob condições de anaerobiose.

Após a transferência, o funil foi retirado e o fluxo de hidrogênio foi mantido no frasco por mais 10 minutos no sedimento e 5 minutos no “headspace”, para garantir a anaerobiose do sistema. O frasco foi finalmente tampado com batoque de butila e tampa de rosca e guardado em geladeira até o momento do uso. Além das amostras para os experimentos de microbiologia, alíquotas de sedimento foram guardadas para futuras análises da comunidade microbiana através de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Para estas análises, frascos apropriados de 1,5mL foram preenchidos com sedimento e imediatamente guardados em freezer (-20°C).

4.1.2 Determinação de parâmetros físico-químicos, profundidade e localização do ponto de coleta.

As determinações dos valores de pH, temperatura, salinidade, condutividade, potencial redox e oxigênio dissolvido foram feitas com o auxílio de aparelho WTW, com os eletrodos Oxi 197, pH 197, LF 197. Para as medidas da água, o sensor foi colocado em duas profundidades: perto da superfície e próximo ao sedimento. O referenciamento geográfico dos pontos foi feito através de aparelho GPS modelo Etrex marca Garmin utilizando 6 satélites de referência. A profundidade no momento da coleta estava em torno de 1,00 metro.

4.1.3 Determinação da taxa de emissão do metano na interface superfície – água.

A determinação da taxa de emissão do metano e do gás carbônico representa o fluxo de gás dissolvido que na interface água-ar escapa para a atmosfera. Esta foi utilizada como uma medida indireta para verificar a atividade dos microrganismos metanogênicos no local da coleta do sedimento. Para isto, utilizou-se a câmara de difusão de gases (Figura 11) e seu funcionamento pode ser comparado com um copo invertido que mantém aprisionado um volume conhecido de ar sobre a superfície do estuário recebendo os gases que emanam. Determinando a concentração dos gases inicial, e uma nova concentração após alguns minutos de intercâmbio, conhece-se a massa que atravessou a área abrangida pelo copo no período de amostragem. Quando o gás emanado satura o ar do copo, este volta a se dissolver na água. Para levar em conta o efeito da saturação utilizam-se três câmaras simultaneamente que são submetidas a 3 diferentes tempo de equilíbrio (3, 6 e 12 minutos). Decorridos os períodos,

foram colhidas alíquotas do ar equilibrado em uma ampola gasométrica (Figura 12) para transporte de amostra e levadas para análises cromatográficas. A partir dos resultados da análise, extrapolou-se a taxa de saturação para o instante inicial no qual, dada a ausência de saturação correspondeu a condição existente na interface água-ar antes da instalação da câmara. Assim é obtida a taxa de emissão verdadeira. Esta técnica foi desenvolvida pelo Prof. Dr Bohdan Mathvienko Sikar e foi descrita por Rosa et al. (2002).

O procedimento experimental para o uso das câmaras de difusão foi o seguinte:

- 1) Usando uma bomba manual cilíndrica, de pistão com capacidade de 600mL, aspirou-se o ar cerca de 10 cm acima do nível da água. É importante que o motor do barco foi desligado em tempo para que o vento dissipe o CO₂ liberado pelo motor e este não contaminasse o experimento. Uma alíquota do ar da bomba foi transferida para ampola gasométrica destinada a análise cromatográfica.
- 2) Transferiu-se 150 mL do ar da bomba para uma câmara submersa inicialmente preenchida com água; depois de 3 minutos transferiu-se o ar equilibrado para a ampola gasométrica marcada
- 3) Transferiu-se novos 150 mL do ar da bomba para outra câmara submersa, obteve-se amostra equilibrada após 6 minutos, que foi armazenada na ampola gasométrica.
- 4) A última equilibração teve duração de 12 minutos.

É importante notar que o uso das porções (150mL) do mesmo ar da bomba em todas as situações de equilíbrio assegurou que todas as câmaras possuíssem gases com a mesma concentração em seu instante inicial. Na ausência de tal garantia a determinação das concentrações ficaria incerta.

Para evitar erros, o experimento foi realizado por duas pessoas, sendo uma cronometrista e a outra o manipulador. Anotou-se para cada condição de equilíbrio a hora e o minuto do início e do fim, bem como o respectivo número de amostra. As amostras foram levadas para o Laboratório Construmaq – São Carlos onde foram processadas. A composição do biogás foi determinada por cromatográfica com detecor TCD (condutividade térmica) para o CO_2 . Para a determinação das concentrações de CH_4 usou-se o detecor FID (ionização em chama).

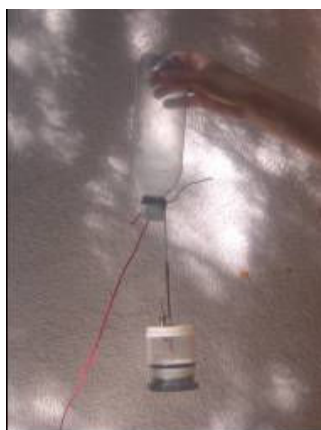


Figura 11: Câmara de difusão de gases



Figura 12: Ampola gasométrica

4.1.4 Caracterização da amostra de sedimento

A amostra de sedimento coletada foi analisada para determinar a concentração de óleos e graxas, segundo metodologia de extração com hexano em Soxhlet, Por sua vez, o fosfato total foi determinado pelo método do ácido ascórbico, o nitrogênio amoniacal pelo método de destilação e titulação e os sólidos totais voláteis (STV) pelo método gravimétrico descritos em APHA, AWWA e WEF (1998).

4.2 COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES E MEIO DE CULTIVO.

O meio de cultura utilizado foi o meio mineral denominado Biota (Tabela 3), acrescido da solução traço de metais, como descrito por SAIA (2005). A salinidade de 20 ‰ do meio de cultura mineral foi mantida pela adição de NaCl e demais sais que constituem a água do mar, como descrito em APHA, AWWA e WEF (1998). O meio foi previamente tamponado com 0,1% de bicarbonato de sódio e acrescido de 0,1 ml/10ml de meio total de uma solução de vitaminas adaptada por Vazoller (1995) a partir de Touzel e Albagnac (1983), além dos compostos orgânicos glicose e formiato de sódio em concentração de 0,5g. L⁻¹ cada. O meio foi reduzido pela adição de 0,05% de solução de sulfeto de sódio. O meio de cultura Biota, nessas condições, era composto de 130 mg.L⁻¹ de N e 45 mg.L⁻¹ de P, respectivamente como N-NH₄ e P-PO₄. Esses foram os sais cujas concentrações variaram nos testes nutricionais realizados.

Tabela 3: Meio de Cultivo Mineral Biota.

MEIO MINERAL BIOTA	
Componentes	quantidade para 1,0 l
NH ₄ Cl	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,2g
NaCl	20 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1g
KCl	0,3g
Solução de resazurina 0,1%	1,0mL
Solução-traço de metais	10,0mL

Fonte: SAIA (2005).

Os sais foram dissolvidos em água previamente fervida sob fluxo de N₂, visando minimizar o conteúdo de oxigênio dissolvido. A solução foi autoclavada por 20 minutos a 121°C e 15 psi e armazenada à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Previamente ao uso dos meios de cultura, substituiu-se a atmosfera de nitrogênio dos frascos para a mistura gasosa nitrogênio e dióxido de carbono na proporção de 70:30% (v/v).

Para o preparo da Solução Traço de Metais os reagentes foram pesados e dissolvidos em água Milli-Q na ordem apresentada na Tabela 4, de acordo com Saia (2005). O pH da solução foi mantido em 7,0 pela adição de KOH 10% m/v. A solução foi distribuída em frascos Duran de 250mL ou 500 mL, fechados com tampas de batoque de butila e lacrados com rolhas de borracha. Após esterilização em autoclave, os frascos foram armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz.

A solução indicadora do potencial de oxidação e redução do meio de cultivo foi a de resazurina 0,1% (m/v), preparada pela dissolução de 0,1g do corante em 100 mL de água Milli-Q. A solução foi mantida sobre refrigeração em frasco âmbar.

O tamponamento do meio de cultivo foi realizado pela adição de solução estoque de bicarbonato de sódio 10% (m/v). Essa solução era previamente preparada dissolvendo-se 100 g do reagente em 1000 mL de água Milli-Q, previamente fervida por 15 minutos. Após o resfriamento da água à temperatura aproximadamente de 50°C, o bicarbonato de sódio era

acrescido, e a mistura submetida a fluxo de nitrogênio (100%) por 20 minutos, com o auxílio de uma pipeta invertida. A solução era esterilizada a frio empregando-se o sistema Millipore com membrana de 0,2 μm , e o fluxo de nitrogênio era mantido até o término da distribuição de alíquotas da solução em frascos de antibióticos de 50 mL estéreis. Os frascos eram armazenados a temperatura ambiente, sob ausência de luz.

Tabela 4: Composição da solução traços de metais.

Componente	Quantidade
Ácido nitriloacético (NTA)*	1,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,28g
Na ₂ WO ₄ .2 H ₂ O	0,165g
Na ₂ SeO ₃	0,15g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01g
AlK (SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,02g
H ₃ BO ₃	0,01g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL

Fonte: SAIA (2005).

A composição da solução de vitaminas está descrita na Tabela 5. O preparo da solução foi realizado de acordo com metodologia descrita em Vazoller (1995). Para isso, os sais foram dissolvidos em água Milli-Q sob fluxo de N₂ (100%). A solução foi esterilizada por filtração em sistema Millipore com membrana de 0,2 μm , e sob assepsia foi distribuída em frascos de Duran de 250mL ou 500 mL, sob fluxo de N₂ (100%). Os frascos foram fechados com

tampas de batoque de butila, lacrados com selo de alumínio e armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz para uso posterior na preparação do substrato.

Tabela 5. Composição da solução de vitaminas

Solução de Vitaminas para <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i>	
Componente	Quantidade
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina.HCl	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantotenato de cálcio	0,005 g
Piridoxina.HCl	0,010 g
Vitamina B ₁₂	0,0001 g
Ácido p-aminobenzóico	0,005 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000m

Fonte: Widdel; Pfennig (1984); Touzel; Albagnac (1983) *apud* Vazoller (1995).

A solução de sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 5% (m/v), redutora do meio de cultivo, foi preparada pela dissolução de 5,0 g desse sal em 100 mL de água Milli-Q previamente fervida e resfriada à temperatura de 40°C. O sal foi dissolvido e a solução homogeneizada e esterilizada em membrana 0,22 μm da Millipore, sob fluxo de nitrogênio (100%). A solução foi distribuída em pequenas alíquotas, em frascos de antibiótico de 50 mL, sob atmosfera de nitrogênio (100%) e mantida em temperatura ambiente.

As fontes de carbono nas concentrações estoques de 2,0 moles/L (formiato de sódio) e 1,0 mol/L (glicose) foram preparadas sob atmosfera de nitrogênio (100%), homogeneizando-se cada uma das fontes individualmente em água Milli-Q. A solução preparada foi transferida para um erlemmeyer de 500 mL, sob fluxo de nitrogênio (100%) mantido por 20 minutos e, então, sob o mesmo fluxo de gás, foi distribuída em frascos de antibiótico de 30mL. Os frascos foram fechados com tampas de batoque de butila, lacrados com selo de alumínio, esterilizados por autoclavagem a 20 minutos, 121°C e 15 psi de pressão, e estocados ao abrigo da luz.

As soluções-padrão estoque de cada composto clorofenólico, bem como a solução contendo todos os clorofenóis, foram preparadas em solução aquosa de NaOH 0,2M. As soluções de concentração intermediária e final foram preparadas pela dissolução da solução estoque em água padrão Milli-Q. Os analitos foram pesados e as soluções preparadas de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6. Preparo das soluções estoques dos clorofenóis

Analitos	Quantidade (g)	Soluções estoques
		Concentrações (mg.L ⁻¹)
Pentaclorofenol	0,07	7000
2,6 diclorofenol	0,0027	270
2,3 diclorofenol	0,0032	320
2,4,6 triclorofenol	0,0022	220
2,3,6 triclorofenol	0,0021	210
2,3,4 triclorofenol	0,0009	90
2,4 dibromofenol	0,0068	680
(Padrão interno)		

Para o composto 2-clorofenol, que apresentava-se na forma líquida e com densidade de 1275,3 g.L⁻¹, preparou-se uma solução com concentração de 1500 mg.L⁻¹, utilizando-se como solvente uma solução aquosa de NaOH 0,2M.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Descrição dos reatores

4.3.1.1 Reatores semi-contínuos

O enriquecimento do sedimento para utilização como inóculo foi realizado em frasco reator de boro silicato (Duran) de 2,0 litros com volume útil de 1,0 litro (Figura 13). Frascos de vidro boro silicato de 1,0 L com volume útil de 500mL foram utilizados como reatores semi-contínuos no ensaio nutricional, onde testou-se diferentes relações de N e P. Nestes ensaios, o meio era trocado, após estabilização da porcentagem de metano na atmosfera do frasco reator, visando a manutenção das concentrações nutricionais requeridas. Para isso, a agitação magnética era desligada 24 horas de antecedência para precipitação da biomassa. O frasco era despressurizado, com auxílio de uma agulha estéril, aberto sob assepsia e cerca de 800 mL de meio era retirado por sifonamento. O inóculo era protegido da aeração por um selo hídrico. Após a drenagem do sobrenadante, o frasco era submetido a atmosfera de N₂/CO₂(70/30), e o volume reacional completado com meio mineral, bicarbonato, vitaminas, fontes de carbono, redutora, PCP e as devidas concentrações de N e P, nas mesmas proporções da relação inicial estabelecida (Figura 14).



Figura 13. Frasco reator utilizado no enriquecimento da amostra de sedimento

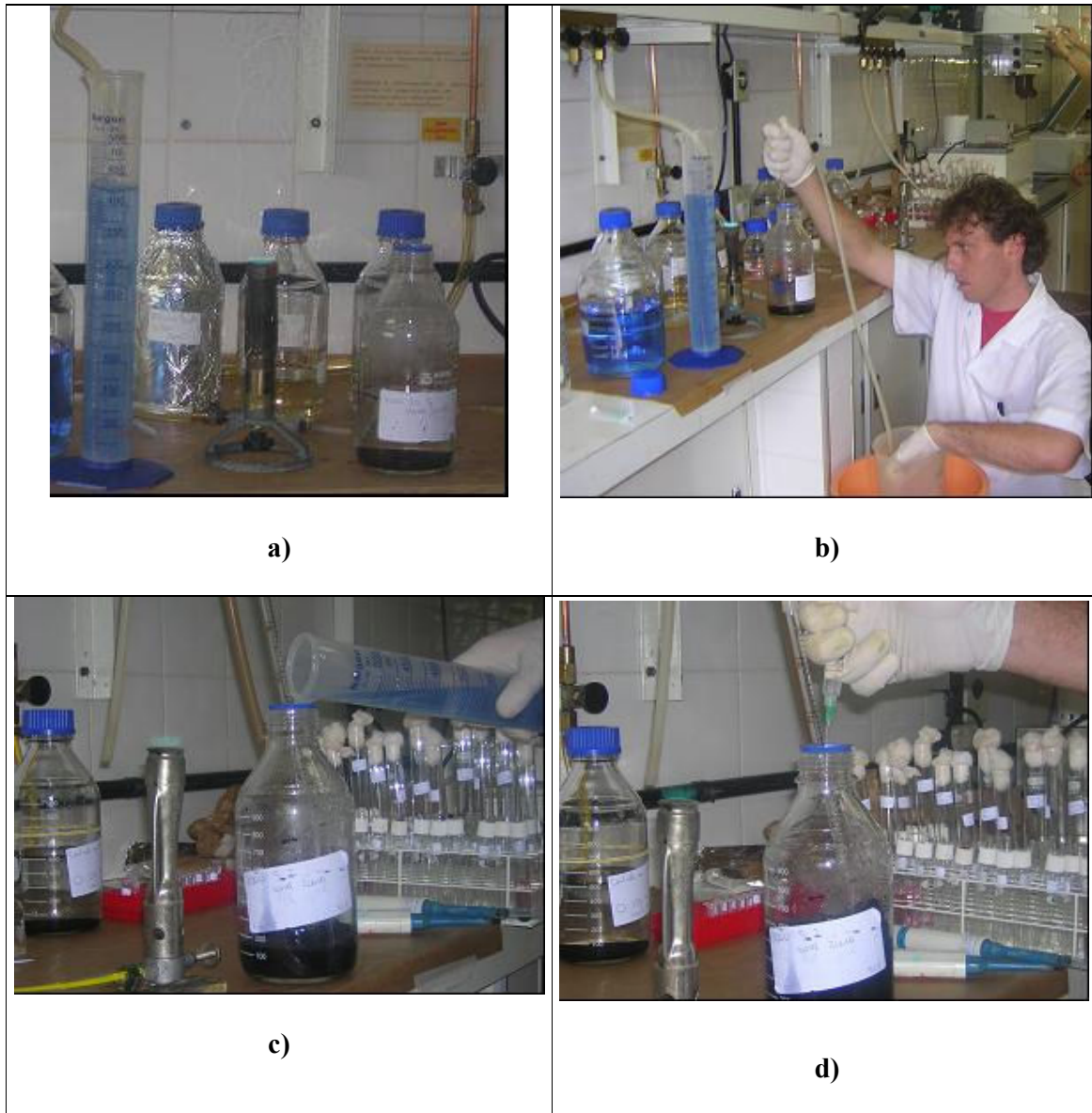


Figura 14: Imagem fotográfica do procedimento de troca do meio de cultura e retiradas de amostra: a) abertura do frasco reator sob assepsia e fluxo de N_2 no meio de cultura a ser acrescentado, b) processo de sifonamento do meio de cultura, após retirada de amostras para análises, c) acréscimo do meio de cultura novo sob fluxo de N_2/CO_2 , d) acréscimo das fontes de carbono, vitaminas, bicarbonato, solução redutora de sulfeto de sódio, PCP e macronutrientes sob fluxo de N_2/CO_2 .

4.3.1.2 Reator contínuo do tipo RAHLF

Na avaliação da remoção do PCP em sistema contínuo e biomassa imobilizada testando duas relações nutricionais distintas, foi utilizado o reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) (Figura 15) desenvolvido por Foresti et al. (1995).

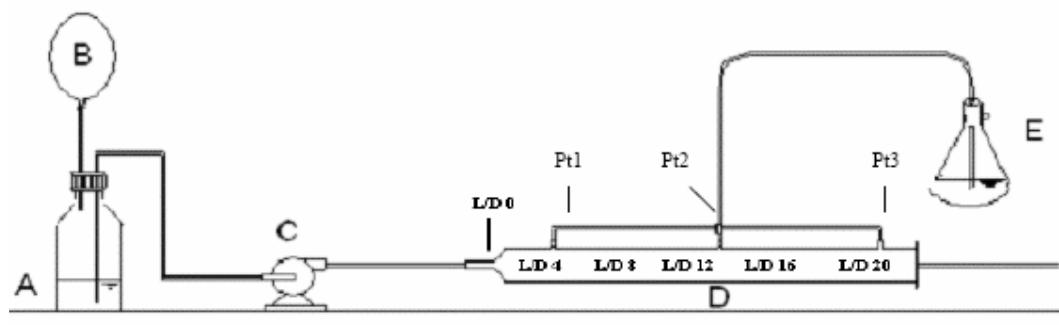


Figura 15. Esquema do reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF). As letras A, B, C, D e E correspondem ao frasco de alimentação, reservatório de N₂, bomba peristáltica, reator e sistema coletor de gás, respectivamente. L/D corresponde aos pontos de amostragem nas relações comprimento/diâmetro ao longo do reator.

O reator foi confeccionado em vidro de boro silicato, com comprimento (L) de 100 cm e diâmetro interno (D) de 5 cm, perfazendo uma relação comprimento por diâmetro (L/D) de aproximadamente 20. O volume total aproximado foi de 1990 mL e volume útil de 800mL. Para a coleta de amostras havia 5 pontos espaçados 20 cm entre si, resultando em L/D de 3,3, 6,6, 9,9, 13,2, 16,5. A coleta do biogás foi feita na mangueira superior, em três pontos: na entrada do reator próximo à L/D = 3,3 (ponto 1); no meio, L/D = 9,9 (ponto 2) e L/D = 16,5 e no final próximo (ponto 3).

4.3.2 Procedimento para ativação e enriquecimento do consórcio microbiano anaeróbio metanogênico das amostras de sedimento do Sistema Estuarino de Santos-São Vicente: COSIPA.

Os inóculos utilizados nos testes nutricionais e na operação do RAHLF foram preparados utilizando-se procedimento de enriquecimento do sedimento da Cosipa armazenados em geladeira em frascos de vidro Duran fechados, sob atmosfera de 100% nitrogênio. O procedimento foi realizado em reatores semi-contínuos. O meio de cultura utilizado foi o meio mineral Biota previamente autoclavado sob atmosfera de 100% nitrogênio, com salinidade expressa em NaCl igual a 2 % e com formiato e glicose como fontes orgânicas. A formulação do meio e as condições de preparo está descrito no item 4.2 do capítulo de Material e Métodos. A salinidade do meio mineral Biota foi aplicada de acordo com a salinidade encontrada no local da coleta. As concentrações de N e P foram corrigidas de acordo com os diferentes ensaios. Anteriormente à introdução dos sedimento, o meio foi submetido a condições assépticas e fluxo de nitrogênio por 15 minutos e em seguida, sob atmosfera de N₂/CO₂ (70:30% v/v), foi tamponado com 0,1% de solução de bicarbonato de sódio, acrescido das soluções nutrientes (vitaminas e fontes de carbono), e reduzido com 0,05% de solução sulfeto de sódio 5%, conforme indicado na Tabela 7.

Uma alíquota de 100 ml de sedimento foi transferida para um frasco reator, sob fluxo de nitrogênio (100%), o qual foi fechado sob esta atmosfera e agitado manualmente para a homogeneização. Com o auxílio de proveta, mediu-se 100 mL de sedimento homogeneizado, que foi transferido para o frasco reator contendo o meio de cultura suplementado. Os procedimentos foram feitos sob condições de assepsia e substituição do fluxo constante de

nitrogênio por mistura gasosa de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30% v/v). Os frascos foram incubados sob agitação controlada a 150 rpm, sob temperatura de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O monitoramento dos reatores semi-contínuos foram feitos através da determinação da porcentagem de metano presente na atmosfera livre do sistema, ácidos voláteis e exames microscópicos.

Tabela 7. Concentração final e volume das soluções usadas nos enriquecimentos do sedimento COSIPA .

Componentes	Volume adicionado(mL)	Concentração final no meio de cultivo
Meio Mineral Biota	863,6	-
Bicarbonato de sódio 10% (m/v)	10	0,1%
Solução de vitaminas	10	-
Glicose (180 g.L ⁻¹)	2,77	0,5 g/L
Formiato de sódio (140 g.L ⁻¹)	3,67	0,5 g/L
Redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v)	10	0,05%
Inoculo	100	10 %

4.3.3 Avaliação do desempenho do inóculo para remoção de PCP em diferentes relações nutricionais (DQO:N:P) baseado na Teoria “Resource Ratio”

Este ensaio foi adotado com a finalidade de estudar a teoria “*Resouce Ratio*” ou Teoria dos Nutrientes Limitantes de SMITH *et al.* (1998) em ecossistemas anaeróbios, que prediz que a competição por recursos limitantes influencia a composição da diversidade microbiana. Pretendeu-se com a metodologia adotada, determinar a relação nutricional que melhor estimulasse o desenvolvimento dos microrganismos degradadores de PCP, tendo como princípio que diferentes populações microbianas são favorecidas por diferentes relações

nutricionais. Os resultados obtidos nesse experimento nortearam a etapa experimental de operação dos reatores contínuos, os RAHLFs.

Amostras enriquecidas na ausência de PCP, por 220 dias sob a relação de DQO:N:P de 1000:130:45, encontrada no meio mineral Biota foram submetidas à ensaios de degradação de PCP sob diferentes relações nutricionais. Para minimizar a influência dos nutrientes remanescentes, 3 diluições subseqüentes foram realizadas, anteriores à inoculação: 800ml do meio de cultura era sifonado e novo meio de cultura sem N e P era repostado.

Para a montagem dos experimentos, 50 ml da amostra do sedimento enriquecido foram adicionadas em 450 ml de meio mineral Biota, com modificação nas concentrações de NH_4Cl e KH_2PO_4 estabelecendo 11 diferentes relações de DQO: N: P, de acordo com os dados conhecidos na literatura sobre condições limitantes para metabolismos anaeróbios e aeróbios (Tabela 9). Nos ensaios $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$ de PCP foi adicionada aos frascos reatores. Solução estoque de 25g N/L foi preparada a partir de NH_4Cl e solução estoque de 4,98 g P/L a partir de KH_2PO_4 . Estas soluções foram mantidas sob refrigeração e utilizadas para acréscimo das fontes de N e P em diferentes relações.

A Tabela 8 mostra a concentração final das soluções usadas neste ensaio e a Tabela 5 enumera os experimentos de acordo com as relações nutricionais adotadas para melhor compreensão na discussão dos resultados e apresenta comentários a respeito dos critérios de escolha das diferentes relações. Os frascos foram incubados a 30°C , e mantidos sob agitação constante de 150 rpm.

Tabela 8: Concentração final e volume das soluções usadas nos ensaios de degradação do PCP no sistema semi contínuo, variando-se as relações nutricionais

Componentes	Volume adicionado(mL)	Concentração Final no meio de cultivo
Meio mineral Biota (sem NH ₄ Cl e KH ₂ PO ₄)	428	-
Bicarbonato de sódio 10% (m/v)	5	0,1%
Solução de vitaminas	5	-
Glicose (90 g.L ⁻¹)	2,85	0,5 g/L (550 mg DQO/l)
Formiato de sódio (280 g.L ⁻¹)	4	1,437 g/L (500mg DQO/l)
Redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v)	5	0,05%
PCP (7,0 g/l)	0,072	1 mg. L ⁻¹

O período de alimentação dos frascos reatores variou de 20 a 26 dias, em função da estabilização da produção de metano. Após a estabilização, era realizada a troca do meio de cultura. Assim, as realimentações determinaram 4 fases experimentais (Fase 1, 2, 3 e 4). Ao final de cada uma delas, alíquotas de amostras drenadas eram retiradas para determinação de N-NH₄, P-PO₄, PCP e intermediários, ácidos voláteis e DQO. Após o término do experimento amostras de todos os frascos foram coletadas para verificar a estrutura da diversidade microbiana estabelecida nas diferentes condições impostas, de acordo com metodologia descrita no Item 4.4.6 de material e métodos.

Tabela 9: Experimentos com diferentes relações nutricionais e critérios adotados

Experimento	Relação (DQO/N/P)	Comentários
1	1000:0:0	Controle sem N e P
2	1000:5:1	Concentração de N e P abaixo da relação sugerida por Speece
3	1000:5:2	Concentração de N abaixo da relação sugerida por Speece
4	1000:10:0	Relação DQO:N baseada em Speece (1996) e ausência de P
5	1000:10:1	Relação DQO:N baseada em Speece (1996) variando P
6	1000:10:2	Relação escolhida para nortear o trabalho, abaixo da qual é considerada por Speece (1996) como limitante para o sistema anaeróbio
7	1000:15:2	Relação intermediária entre aeróbio e anaeróbio
8	1000:20:5	Relação intermediária entre aeróbio e anaeróbio
9	1000:50:10	Relação adotada quando se trabalha com microorganismos aeróbios
10	1000:130:45	Relação estabelecida pelo meio mineral Biota adotada por Saia (2005)
11	1000:130:45 Inóculo autoclavado	Frasco controle com inóculo autoclavado a 1,2 atm (121°C) por 3 dias consecutivos

4.3.4 Ensaios de degradação do PCP no RAHLF com duas diferentes relações nutricionais (DQO:N:P) 1000:130:45 e 1000:10:1

Visando comparar a influencia da concentração de nutrientes na eficiência do RAHLF alimentado com o PCP, dois diferentes ensaios foram realizados. No primeiro ensaio, testou-se a relação nutricional imposta pelo meio mineral Biota, que contém 130 mg N.L⁻¹ e 45 mg P L⁻¹. No segundo ensaio, foi testada a relação apontada pelo ensaio nutricional em reator semi-contínuo, contendo 10 mg N.L⁻¹ e 1 mg P.L⁻¹. Neste último ensaio o meio utilizado foi o mineral Biota, com correções na concentração de NH₄Cl e KH₂PO₄. Para ambos os ensaios,

distintos enriquecimentos a partir do sedimento coletado foram realizados, cada qual com as devidas concentrações de N e P impostas durante a operação do RAHLF.

4.3.4.1 Inoculação dos RAHLF

Nos dois ensaios de degradação do PCP no RAHLF, com as relações nutricionais distintas, o procedimento de inoculação adotado foi o mesmo e está descrito a seguir. A relação de nitrogênio e fósforo (N:P) estabelecida pelo meio Biota é de 130:45 e foi adotada no RAHLF 1. No RAHLF 2 as concentrações de NH_4Cl como fonte de Nitrogênio e de KH_2PO_4 como fonte de fósforo foi alterada para testar a relação N:P 10:1.

Nos RAHLF 1 e RAHLF 2, o sedimento da COSIPA previamente enriquecido sob condições de anaerobiose com glicose e formiato como fonte de carbono foi utilizado como inóculo do reator. O RAHLF foi preenchido com 1.040 mL (20,8 g) de espuma de poliuretano com densidade de 23 Kg.m^{-3} e 40% de porosidade, no formato de cubos com +/- 0,3 cm de lado, e embebidos em água destilada estéril, previamente autoclavados a temperatura de 121°C e pressão de 1 atm por 20 minutos.

Anteriormente à inoculação, o RAHLF preenchido com a espuma foi submetido à fluxo de nitrogênio 100% por 10 minutos. Este gás foi injetado pela mangueira de entrada mantendo a saída aberta, garantindo assim a passagem do gás ao longo de todo o reator e com isto garantindo a manutenção da anaerobiose do sistema. Anteriormente à inoculação, o meio basal foi bombeado para o reator em sistema de circuito fechado, de modo a umedecer toda a espuma e preencher o volume útil do sistema. Este procedimento teve duração de 2 horas. As

mangueiras utilizadas durante a operação do RAHLF com PCP foram de “tygon”, material com menor adsorção de PCP.

Aliquota de 300 ml do sedimento da Cosipa previamente enriquecido e com produção de metano estável foi transferido para frasco Duran com volume total de 5000 ml contendo 3000ml de meio biota salino, previamente autoclavado, sob fluxo de N_2 e sob condições assépticas. A concentração final do inoculo foi de 10%.

A imobilização das células, nos dois ensaios, foi realizada segundo metodologia descrita em Domingues (2001) a adotada por Saia, (2005), com todos os cuidados em relação à manipulação de microrganismos anaeróbios estritos. O reator foi operado em circuito fechado, com auxílio de bomba peristáltica com retorno do efluente do reator ao frasco de alimentação até observar ocorrência visual de biofilme.

O período de inoculação dos reatores foi de 6 dias. Os inóculos foram bombeados diariamente para o reator por um período de 12 horas, na vazão máxima da bomba. Por precaução, no período noturno a bomba foi desligada. As mangueiras utilizadas nas inoculações foram de silicone previamente lavadas.

A imobilização da biomassa no reator foi verificada pela subtração da biomassa contida no frasco de inoculação, expressa em SSV ($g.l^{-1}$), imediatamente antes e após a inoculação.

Após o período de imobilização da biomassa, o sistema passou a ser alimentado de forma contínua, sem recirculação do afluente (substrato). Anteriormente à operação contínua, amostras de 3 cubos de espumas de cada ponto de amostragem do reator foram retiradas para exames microscópicos sob microscopia de contraste de fase e fluorescência.

4.3.4.2 Procedimento para operação contínua dos RAHLF

Os reatores RAHLF 1 (R1) e RAHLF 2 (R2) foram operados com vazão média afluyente de aproximadamente 44 ml/hora, correspondendo ao tempo de detenção hidráulica de 18 horas, considerado satisfatório por Damianovic (1997) e Saia (2005) durante pesquisas sobre degradação anaeróbia do PCP no mesmo reator. Para a partida dos RAHLFs, após a sua inoculação, houve alimentação inicial de aproximadamente $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e 1.437 mg.L^{-1} de formiato de sódio, obtendo-se DQO teórica de $1,05 \text{ g.L}^{-1}$, constante durante toda a operação do sistema, com meio mineral salino Biota nas relações nutricionais de 1000:130:45 (DQO:N:P para R1) e 1000:10:1 (DQO:N:P para R2). Optou-se por operar o reator por período de 20 e 26 dias, para R1 e R2, respectivamente, sem a adição do PCP.

Após este período, duas diferentes estratégias foram adotadas para partir os reatores RAHLF 1 e RAHLF 2. Na partida do RAHLF 1, visando aclimatação da comunidade microbiana ao composto clorado, optou-se por acrescentar o PCP na concentração de $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Para isso, o meio foi preparado nas mesmas condições do prévio enriquecimento do reator com a adição do composto clorado, como pode ser observado na Tabela 10. Este etapa teve duração de 109 dias. Após esta fase o reator foi operado sem a adição do composto clorado por um período de 90 dias.

Após o período de partida, o PCP voltou a ser adicionado ao substrato em concentração de 5 mg.L^{-1} por 168 dias. Após esta etapa a concentração de PCP adicionada foi de 10 mg.L^{-1} por 101 dias de operação, totalizando 269 dias de operação do RAHLF com PCP.

No RAHLF 2, para a partida do reator, após a sua inoculação, também houve alimentação inicial de aproximadamente $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e 1.437 mg.L^{-1} de formiato de

sódio, obtendo-se DQO teórica de $1,05 \text{ g.L}^{-1}$, constante durante toda a operação do sistema, assim como a relação 1000:10:1 de DQO:N:P. Optou-se por operar o reator por período de 26 dias sem a adição do PCP, verificando-se a imobilização da biomassa pelos resultados de microscopia óptica e observação visual do reator indicarem que houve colonização da biomassa de maneira quase uniforme. Após este período, o PCP começou a ser adicionado na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Para isso, o meio foi preparado nas mesmas condições do prévio enriquecimento do reator com a adição do composto clorado, como pode ser observado na Tabela 6. Este experimento teve duração de 16 dias e foi denominado de etapa 1. Após esta fase, a concentração do PCP adicionado aumentou para $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e o reator foi operado por um período de 8 dias, sendo denominada de etapa 2. Na etapa 3, a concentração de PCP adicionada aumentou para 10 mg.L^{-1} e teve duração de 12 dias de operação. Após este período a concentração do PCP foi aumentada para $12,4437 \text{ mg.L}^{-1}$ e o reator foi operado por mais 16 dias, totalizando 81 dias de operação.

Tabela 10: Concentração final no meio de cultivo e volume das soluções usadas nos ensaios de degradação do Pentaclorofenol no RAHLF

Componentes	Volume adicionado(mL)	Concentração Final no meio de cultivo
Meio mineral Biota	3000	-
Bicarbonato de sódio 10% (m/v)	31	0,1%
Solução de vitaminas	31	-
Glicose (180g/L)	8,7	0,5 g/L (550 mg DQO/l)
Formiato de sódio (140 g.L^{-1})	48,1	1,437 g/L (500mg DQO/l)
Redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v)	31	0,05%
PCP (7,0 g/l)	0,225; 2,25; 4,5	0,5; 5; 10 mg.L^{-1} (respectivamente)

4.3.4.3 Monitoramento do RAHLF

O desempenho dos reatores foi avaliado pela determinação de parâmetros físico-químicos como DQO, ácidos voláteis totais, concentração do gás metano no biogás e concentração de PCP e metabólitos. A frequência das análises em quase todo o período experimental está descrita na Tabela 11. Em alguns momentos, devido a estabilidade do reator e impossibilidade de coleta das amostras a rotina de análises foi alterada.

A coleta do efluente foi realizada em proveta de vidro, material que minimiza a adsorção do PCP, com isofilme recobrimdo a sua porção superior e a coleta do afluente em conexão destinada a este fim, situada próxima da entrada do reator.

Tabela 11: Frequência das análises físico-químicas realizadas durante a operação dos RAHLF

Parâmetros	<i>Rotina</i>
DQO (bruta)	1 x sem - Paf e Pef
Ácidos voláteis por GC	1 x sem – Paf e Pef
Porcentagem de metano no biogás	1 x sem
Concentração de PCP e metabólitos	1 x sem - Paf e Pef
Análises Microbiológicas	P1, P3, P5

Legenda: 1 x sem – 1 x por semana; Paf: afluente e Pef: efluente ; P1,P3,P5: Pontos de amostragem ao longo do reator.

Todas as análises na fração líquida, exceto a de DQO, foram feitas nas amostras congeladas imediatamente após a coleta. As amostras foram processadas dentro da capela e as análises feitas em réplicas.

O meio basal utilizado apresenta em sua composição cloreto de sódio em concentração de 20g.L⁻¹ e foi reduzido com 0,05% de sulfeto de sódio. Tanto o cloro quanto o sulfeto

geram DQO, interferindo no método. Assim, para retirar esta interferência na leitura da DQO foi utilizado 0,2 g de nitrato de prata e 0,1ml solução de sulfato de zinco (100 g. L^{-1}) para cada 3 ml de amostra, segundo cálculos demonstrado por Saia (2005). A prata precipita o cloro e o zinco precipita o enxofre.

Para evitar formação de caminho preferencial do líquido dentro do reator, a cada retirada de partículas de espuma, foram recolocadas partículas de espumas novas.

4.3.5 Ensaio de adsorção de PCP na espuma de poliuretana do RAHLF

Com a finalidade de determinar a quantidade do PCP e seus congêneres que podem ficar retidos na biopartícula (inóculo mais suporte) pelo processo de adsorção, amostras da biopartícula foram retiradas nos 5 pontos de amostragem no 3^o, 10^o, 17^o, 24^o e 30^o dias de operação do RAHLF 1, alimentado com meio Biota adicionado de PCP.

Em cada ponto de amostragem foram retirados 8 cubos de espuma de poliuretano impregnados com inóculo e apertados contra a parede dos frascos, para drenagem da fração líquida remanescente, mantidos por 24 horas a 30^oC. Os cubos de espumas, isentos da fração líquida, foram levados ao tubo de DQO e submetidos à extração com 10,0 ml da solução de NaOH (0,1M), em banho ultrassônico por 9 minutos, permanecendo na solução por 12 horas. Após esse período, as amostras foram submetidas novamente a banho ultrassônico por 9 minutos e posteriormente levadas ao vórtex por 1 minuto, à velocidade máxima. Os cubos da biopartícula foram pressionados contra a parede do tubo para a drenagem da fração líquida, transferidos para um Becker e enviados à estufa 60^oC por 24 horas para a secagem e posterior

pesagem. Alíquotas de 1 mL da fase líquida foi utilizada para a extração e derivatização do PCP e intermediários clorados conforme metodologia descrita no item 4.4.4.

Este procedimento também foi adotado para a quantificação do PCP adsorvido na biopartícula ao final das fases de operação do RAHLF 1 e 2.

4.3.6 Isoterma de adsorção

Foram realizados testes de adsorção para determinação da capacidade da biopartícula (espuma de poliuretana mais inoculo). Para isso, cubos de espuma foram impregnados de inoculo esterelizados em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos por três procedimentos consecutivos. Amostras de massas conhecidas de biomassa imobilizada inativada foram colocadas em frascos de 100 ml, com 10 ml de meio mineral Biota com PCP nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg. L⁻¹. Os frascos reatores em triplicata foram lacrados e mantidos a 30°C por um período de 18 horas, suficiente para o equilíbrio entre as fases líquidas e sólidas. Após esse período, alíquotas da fração líquida foram retiradas para determinações cromatográficas da concentração do composto clorado. Os cubos de espuma foram processados como descrito no ensaio de adsorção de PCP na espuma de poliuretana do RAHLF (item 4.2.5). Alíquotas de 1 mL da fase líquida foi utilizada para a extração e derivatização do PCP. Foram aplicados modelos de isotermas de adsorção a partir dos resultados obtidos.

4.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA O ACOMPANHAMENTO DOS EXPERIMENTOS LABORATORIAIS

4.4.1 Parâmetros e métodos de análise

As concentrações de demanda química de oxigênio (DQO), Sólidos Voláteis Totais e Suspensos (STV e SSV) e pH foram determinados segundo os procedimentos descritos nos Métodos 2540 –D e 2540-BE no *Standart Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2005).

Para determinação analítica dos nutrientes N e P utilizou-se o método análise por injeção em fluxo (FIA) para determinação de amônia (Método 4500-I.) e ortofosfato (Método 4500-PF.), respectivamente (APHA; AWWA; WEF, 2005).

4.4.2 Procedimento para determinação cromatográfica do metano

O monitoramento de gás metano produzido pela atividade microbiana nos frascos reatores em batelada e no RAHLF foi realizado por cromatografia a gás. O cromatógrafo utilizado foi da marca Gow-Mac, equipado com detector de condutividade térmica e colunas PORAPAK-Q (de análise) e PORAPAK-T (de referência), ambas com 2 metros de comprimento, ¼” de diâmetro interno e 80 –100 mesh. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste e o forno operou a 50°C.

Os frascos reatores em batelada eram retirados da incubadora com agitação e temperaturas controladas, sendo suas tampas flambadas com álcool etílico antes da

amostragem feita com seringa. Amostras da atmosfera eram retiradas em alíquotas de 1000 μL , sem despressurização, com o auxílio de seringa Hamilton “gastight”, com trava. Na determinação da porcentagem de metano no RAHLF alíquotas de 1000 μL da atmosfera do reator obtida através dos pontos coletores de gases do reator foram analisadas.

4.4.3 Procedimento para determinação cromatográfica dos ácidos orgânicos voláteis e fenol

As análises dos ácidos orgânicos e do fenol, intermediário metabólico da degradação do PCP, foram feitas em cromatógrafo a gás Hewlett Packard, modelo HP 6890, equipado com detector de ionização de chama (FID), através da metodologia descrita em Moraes *et al.* (2000). A coluna capilar utilizada foi HP INNOWAX, com 30m de comprimento, 0,25 μm de espessura de filme e 0,25 mm de diâmetro interno. O gás de arraste utilizado foi o H_2 com vazão de 2,0 mL/min. Os gases auxiliares utilizados foram o H_2 , ar sintético e o N_2 . A técnica de injeção adotada foi o “*split*” 1:20 e o volume de amostra injetado foi de 1,0 μL . A temperatura do injetor de 300 $^{\circ}\text{C}$ e do detector de 250 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura inicial do forno foi de 100 $^{\circ}\text{C}$, por 3 minutos; em seguida, elevou-se a temperatura para 180 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. A seringa utilizada era previamente lavada com metanol, a cada injeção, em um limpador de seringas, por 16 vezes.

Anteriormente a injeção da amostra no cromatógrafo para a detecção dos ácidos orgânicos presentes nas amostras, alíquotas de 2,0 ml da amostra eram transferida para tubo de ensaio, com tampa de rosca. Foi acrescentado 1,0 g de NaCl, 100 μl da solução de ácido sulfúrico 1M, 100 μl da solução de ácido crotônico na concentração de 700 mg. L^{-1} (padrão

interno) e 0,6 ml de éter etílico purificado gelado. A amostra era agitada, em agitador de tubos, por 1 minuto e centrifugada por 1 minuto a 3000 rpm. A microseringa, utilizada para injetar as amostras, era armazenada em freezer e 1µl da solução aquosa era injetada.

Os limites de detecção teórico dos ácidos acético, propiônico, isobutírico, bitírico, isovalérico e valérico por esta metodologia foram de 5,13, 13,46, 14,9, 25,45, 7,9 e 12,5 mg.L⁻¹, respectivamente.

4.4.4 Procedimento para determinação cromatográfica dos compostos clorados

As análises cromatográficas, para detecção dos compostos clorados, foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett Packard, modelo HP 5890 série II, equipado com detector de captura de elétrons (CG-ECD). A coluna capilar utilizada foi HP-5 (5% diphenyl, 95% dimethylpolysiloxane) da Agilent Technologies com 30m de comprimento, 0,25 µm de espessura de filme e 0,32 mm de diâmetro interno. O gás de arraste utilizado foi o H₂ com vazão de 1 mL/min e como gás auxiliar foi utilizado o N₂ com vazão de 30 mL/min. A técnica de injeção adotada foi o “*splitless*” e o volume de amostra injetado foi de 1µL. A seringa utilizada era previamente lavada com metanol, a cada injeção, em um limpador de seringas, de acordo com o procedimento adotado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB-SHS/ESSC). A temperatura do injetor foi de 250⁰C e do detector de 320⁰C. A temperatura inicial do forno foi de 45⁰C, permanecendo nesta por 2 minutos; em seguida, elevou-se a temperatura para 132⁰C a uma taxa de 15⁰C/min, seguindo-se uma segunda rampa de 5⁰C/min até 204⁰C e, então, elevando-se novamente a temperatura a uma taxa de 70⁰C/min até 260⁰C, mantendo-se a mesma por 3 minutos (tempo de corrida de 26 minutos)

(DAMIANOVIC, et al., 2007). O limite de detecção dos compostos clorados foi de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Também foi utilizado, para análises qualitativas dos intermediários metabólitos proveniente da degradação do PCP, um cromatógrafo a gás com detector de espectrometria de massa (GC/MS), modelo QP 5000, marca Shimadzu. As análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos. A coluna capilar utilizada foi HP-5 (5% diphenyl, 95% dimethylpolysiloxane) da Agilent Technologies com 30m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno). A técnica de injeção adotada foi o “*splitless*” e o volume de amostra injetado foi de $1 \mu\text{L}$. A seringa utilizada era previamente lavada com metanol, a cada injeção. A temperatura do injetor foi de 250°C e da interface 300°C . O tempo de amostragem foi 1,2 min e a pressão na cabeça da coluna foi de 72,3. A razão m/v (massa/carga) utilizada foi de 30 a 300 e o tempo do solvente delay foi de 4,00 min. A temperatura inicial do forno foi de 45°C , permanecendo nesta por 3 minutos; em seguida, elevou-se a temperatura para 132°C a uma taxa de $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$, seguindo-se uma segunda rampa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 204°C e, então, elevando-se novamente a temperatura a uma taxa de $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 260°C , mantendo-se a mesma por 3 minutos (tempo de corrida de 26 minutos). O modo de detecção selecionado foi Scan.

4.4.4.1 Procedimento de extração e derivatização das amostras

Alíquotas de 1 mL das amostras analisadas, para detecção dos compostos clorados, foram transferidas para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 0,250 mL de solução de K_2CO_3 304g/L (solução tampão), 50 μL do padrão interno 2,4 dibromofenol a $3,4 \text{ mg.L}^{-1}$,

375 µL de anidrido acético e 0,5 mL de hexano. Os tubos foram submetidos a agitação, em agitador magnético de tubos do tipo vórtex, por 1 minuto para a ocorrência da acetilação e extração. Os tubos foram armazenados em freezer até o momento da análise cromatográfica (SAIA, 2005).

4.4.4.2 Preparação da curva de calibração

Duas curvas de calibração foram elaboradas, uma abrangendo concentrações baixas de clorofenóis (10 a 1000 µg/L) e outra concentrações mais altas (1,0 a 10,0 mg. L⁻¹). Para a primeira, as soluções-padrão de clorofenóis (PCP; 2,6; 2,3 diclorofenóis; 2,4,6; 2,3,6; 2,4,6 triclorofenóis; 2 clorofenol) foram empregadas. Para a segunda, utilizou-se somente o PCP, pois a detecção dos intermediários não foi possível aparecer nesta faixa. Ambas foram preparadas em água padrão Milli-Q, utilizando-se as soluções estoque descritas no item 4.2.1. A solução do padrão interno 2,4 dibromofenol utilizada apresentava concentração de 3,4 mg. L⁻¹, preparada a partir da solução de 680 mg. L⁻¹.

4.4.5 Procedimentos para os exames microscópicos

As observações sob microscopia foram realizadas para evidenciar a morfologia das células microbianas predominantes nas amostras após coleta e durante os experimentos. Os exames foram realizados com auxílio de um microscópio da marca Olympus, modelo BHT2,

acoplado a um sistema de câmara Olympus, modelo U-PMTVC, nº 8C14730 e sistema analisador de imagem Optronic-CCD vídeo câmara system.

As amostras examinadas ao microscópio foram as do sedimento utilizado como inóculo e amostras do reator ao final do experimento de ativação e enriquecimento dos consórcios microbianos metanogênicos. As amostras foram examinadas sob luz comum, contraste de fase e fluorescência. Para reduzir o movimento das células nas amostras, alíquotas foram dispostas em lâminas com ágar a 2% solidificado. As lâminas eram preparadas rapidamente, colocando uma alíquota das amostras sob o ágar solidificado e recoberto por uma lamínula (DSM, 1991).

4.4.6 Análise da diversidade microbiana por DGGE

Para análise da diversidade microbiana os procedimentos utilizados foram os seguintes:

- 1) Extraíu-se o DNA da comunidade bacteriana;
- 2) Procedeu-se ao PCR para amplificação de fragmentos do 16S RNAr usando primers para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*;
- 3) O produto do PCR foi analisado através da técnica do DGGE;
- 4) A complexidade dos padrões de bandas obtida no DGGE foi observada em um transiluminador UV e as bandas foram tomadas como uma medida da diversidade das comunidades.

4.4.6.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA dos microrganismos que estavam presentes na amostra de sedimento foi testado o protocolo de Griffiths *et al.* 2000, adaptado por Fábio Chinaglia (Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC-USP). Este protocolo tem sido utilizado com eficiência na extração de DNA das amostras de lodo.

Antes de iniciar o protocolo, foi testado o tempo de agitação para verificar qual o melhor tempo para extrair o DNA. Tempo muito curto pode não resultar em boa extração e tempo longo pode fragmentar o DNA. Assim, é importante determinar o melhor tempo de agitação. O protocolo utilizado está descrito a seguir:

Protocolo de extração

1. Pesou-se 0,5g amostra em tubo de rosca de 15ml estéril contendo 0,5 g de pérolas de vidro (“glass beads”) (150-212 microns-Sigma)
2. Ressuspendeu-se na capela na seguinte ordem: 1ml de PBS 1X + 1ml de Tris HCl saturado com fenol pH 8.0 + 1ml clorofórmio
3. Os tubos foram agitados em agitador de tubos vórtex por 60 segundos
4. Centrifugou-se (6000 rpm) por 10min a 4⁰C para separação da fase aquosa (contém os ácidos nucléicos)
5. Transferiu-se com o tubo reto a fase aquosa (800 µl, ou o quanto conseguir sem pegar próximo ao clorofórmio/fenol, para não pegar sujeira) para eppendorf de 2ml estéril e completou o volume com fenol.
6. Agitou-se por 10s no vórtex previamente ligado a potência máxima

7. A amostra foi centrifugada a 6000rpm por 10min a 4⁰C
8. Transferiu-se a fase aquosa ($\pm 400 \mu\text{l}$, ou o quanto conseguir sem pegar o fenol) para novo eppendorf de 2ml estéril e completar o volume ou adicionar o mesmo volume ($\pm 400 \mu\text{l}$) de clorofórmio
9. Agitou-se por 10s no vórtex a potência máxima
10. A amostra foi centrifugada novamente a 6000rpm por 10min a 4⁰C ou a temp. ambiente

Os procedimentos 8, 9 e 10 foram repetidos por 2x

11. Transferiu-se a fase aquosa ($\pm 100 \mu\text{l}$ ou quanto for possível sem clorofórmio) para um novo eppendorf.

O resultado do processo de extração foi verificado em gel de agarose 1% preparado com tampão TEB 1X e corado com brometo de etídio.

4.4.6.2 Reação de Amplificação – PCR

As amostras de DNA purificadas foram amplificadas usando “primers” para o 16S DNAr dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Foi preparada uma mistura para reação com as concentrações finais de reagentes de acordo com as Tabelas 12 e 13 para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente.

Tabela 12: Concentração final dos reagentes para a execução do PCR do Domínio *Bacteria*

Reagentes	Estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 50µL
Solução tampão da Taq	10 X	1 X	5 µL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
Primers 968f	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Primer 1401 r	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
DNTP's	100 mM	0,8 mM	0,4 µL
<i>Taq</i> -polimerase	5 U/µL	0,5 U/12,5µL	0,4 µL
DNA	--	50-100ng	--
H ₂ O	--	--	Qsp. 50µL

Tabela 13: Concentração final dos reagentes para a execução do PCR do Domínio *Archaea*

Reagentes	Estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 50µL
Solução tampão da Taq	10 X	1 X	5 µL
MgCl ₂	50 mM	3,5 mM	3,5 µL
Primers 1100f	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Primer 1400 r	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
DNTP's	100 mM	0,8 mM	0,4 µL
<i>Taq</i> -polimerase	5 U/µL	0,5 U/12,5µL	0,4 µL
DNA	--	50-100 ng	--
H ₂ O	--	--	Qsp. 50µL

À mistura de água e tampão acrescentou-se o dNTPs e em seguida os “primers”. Por último, acrescentou-se a enzima *Taq* polimerase e o DNA (2,0µL) a ser amplificado. Como foram realizadas várias amplificações, preparou-se uma mistura contendo a enzima, que foi distribuída em alíquotas nos tubos de PCR contendo as amostras de DNA. Para manipulação das soluções estoque de “primers” foi necessário o uso de ponteiras com proteção de aerossóis, e as preparações foram feitas sob fluxo laminar.

- Primers do Domínio *Archaea* usados no PCR :

Os primers do Domínio *Archaea* foram específicos para amplificar a região do DNA entre as posições 1100 e 1400 do RNAr 16S. Esses primers foram desenhados segundo KUDO *et al.* (1997). Os autores se basearam nas seqüências do RNAr 16S de bactérias metanogênicas (existentes na base de dados do DNA – “DNA data base”). Assim:

Domínio Archaea:

Primer 1100 F (c/ GC clamp) : 5'gc.- AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG
3'

Primer 1400R : 5' CGG CGA ATT CGT GCAAGG AGC AGG GAC 3'

Seqüência do GC clamp: 5' CGC CCG CCG CGC GCGGCG GGC GGG GCG GGG GCA
CGG GGG G

- Programa usado no PCR com os primers do Domínio *Archaea*:

-1ciclo à temperatura de 95° C por 5 minutos seguido de 30 ciclos à: 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 90 segundos. O último ciclo é seguido por 72° C por 7 minutos e finalizando a 4°C.

- Primers do Domínio *Bacteria* que usados no PCR :

F 968 GC (posições 968-984) e R1401 (posições 1378-1401)

968 F com GC clamp: 5'gc. AAC GCG AAG AAC CTT AC

1401 R: 5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG

A seqüência rica em G+C acoplada a extremidade 5' do primer serviu para impedir a completa desnaturação do fragmento de DNA durante a separação em gel de DGGE.

- Programa usado no PCR com os primers do Domínio *Bacteria*:

-1 ciclos à 97° C por 3 minutos; 30 ciclos à 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72°C por 1 min; depois 1ciclo de 72°C por 3 minutos e resfriamento a 4° C.

As ampliações realizadas foram feitas com o uso de um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Foi confirmada a qualidade dos produtos do PCR em gel de agarose 1,2%, antes de proceder ao DGGE.

4.4.6.3 Técnica do DGGE

O resultado da amplificação do DNA para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* foram analisadas pela técnica do DGGE. Para isso confeccionou-se um “sanduíche” de gel gradiente desnaturante paralelo de desnaturação de 30 a 70%, no qual o gradiente é paralelo à direção do campo elétrico aplicado. Após a polimerização do gel foi realizada a montagem da cuba do tampão superior no tanque de eletroforese contendo tampão TE a 60°C. As amostras provenientes do PCR foram aplicadas nas canaletas com auxílio de ponteiros de seqüenciamento, e a eletroforese foi de 50V por 14 horas. Em seguida, foram feitas a remoção dos géis e a coloração com brometo de etídio (BRUCHA, 2001).

4.4.6.4 Análise dos Géis do DGGE

Os géis foram fotografados com um sistema de foto-documentação. A complexidade dos padrões de bandas obtidos no DGGE foi tomada como uma medida da diversidade da comunidade. Através dos diferentes padrões de migração das bandas, comparando-se a amostra do reator antes da adição do PCP e após a saturação da biomassa com este composto foi analisada a variação da diversidade dos Domínios Archaea e Bacteria ao longo do período inicial.

4.4.6.5 Cálculo do coeficiente de similaridade

Na comparação das bandas da eletroforese em gel de gradiente desnaturante, foi utilizada a equação (4.1), segundo Gillan et al (1998). Essa equação permite calcular o coeficiente de similaridade (Cs) entre duas amostras, considerando o número de bandas do DGGE de cada amostra e o número de bandas comuns às amostras.

$$Cs = 2J / (a+b) \times 100 \quad (4.1)$$

Onde:

a - número de bandas do DGGE na amostra 1

b - número de bandas do DGGE na amostra 2

J - número de bandas comuns dos DGGE

4.4.7 Sequenciamento

As bandas de interesse do gel de DGGE foram recortadas com auxílio de um bisturi estéril, e reamplificadas, seguindo metodologia descrita no item 4.4.6.2. Os *primers* utilizados foram os mesmos, com exceção da sequência GC Clamp dos *primers* Forward. As amostras já amplificadas foram enviadas para o Laboratório do Centro de Genoma Humano – USP para quantificação, purificação e sequenciamento. A identificação dos diferentes microrganismos foi realizada utilizando-se conjunto de reagentes para sequenciamento automático baseados em dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (chamados *dye terminators*). As concentrações de DNA molde e de *primers* seguiram as instruções dos fabricantes. As reações de sequenciamento foram purificadas no sephadex G50 e aplicadas no seqüenciador Megabace 1000 da GE Healthcare. A análise foi feita pelo software Sequence Analyser 3.0 com basecaller Cimarron 3.12. Os resultados foram analisados no programa DNASTart e comparação no Blast – NCBI.

5. Resultados e Discussão

5.1 Localização dos pontos de amostragem e determinação *in situ* das variáveis físico-químicas

A amostragem realizada na profundidade de aproximadamente 1,00 metro ocorreu durante a maré baixa, na localização geográfica de S 23° 52'401''; W' 46°22'727'', feita por GPS e o sedimento coletado emanava um forte odor de óleo.

Os resultados das variáveis físico-químicas apresentados na Tabela 14 referem-se aos fatores abióticos do local amostrado, quais sejam, valores de condutividade, salinidade, pH e potencial de óxido-redução na água, bem como os teores de metano emitidos na superfície.

A condutividade elétrica é a capacidade de uma solução conduzir corrente elétrica, sendo esta a função da concentração de íons presentes na água (ESTEVES, 1988). Assim, uma solução com maior concentração de íons possui maior valor de condutividade. O valor da condutividade da água no ponto de coleta foi de 24 $\mu\text{s}/\text{cm}$ na superfície e 34,1 $\mu\text{s}/\text{cm}$ no hipolíminio. As diferenças podem ser devido aos teores de salinidade dos pontos amostrados, bem como pela concentração de compostos presentes no local. Segundo Barreto (1999), a condutividade elétrica pode ser utilizada para detectar indícios de poluição, embora não discrimine a natureza dos elementos geradores dos valores medidos. Os trabalhos de Saia (2005) e Nakayama (2005), realizados no local e em igual período sazonal no ano de 2002, revelaram valores de condutividade da água de fundo e da superfície de 30,0 e 9,36 $\mu\text{s}/\text{cm}$, respectivamente. A diferença destes valores com os resultados apresentados pelo presente trabalho é atribuída à diferença de profundidade do local de coleta dos dois estudos. Saia e Nakayama caracterizaram o ambiente quando a maré estava alta, com dois metros de profundidade, contrastando com profundidade de 1,0 metros deste trabalho.

Os valores de temperatura na superfície e na interface água sedimento foram iguais a 24 °C, revelando ocorrência de homeotermia da coluna d'água em função da freqüente circulação da massa de água, da pequena profundidade do ponto amostrado e da exposição contínua a ação dos ventos. Esteves (1998) relatou este mesmo comportamento nas lagoas costeiras do Estado do Rio de Janeiro, que apresentam baixa profundidade e ressaltou a importância do vento que vem do mar, que é sempre constante pela ausência de montanhas, neste processo. Saia (2005) também determinou a homeotermia da coluna d'água nos valores de 24,5°C no mesmo local e em igual período sazonal no ano de 2002. O valor de 24°C detectado na coluna d'água no mês de julho é explicado pelo alto calor específico da água, que proporciona estabilidade térmica dos ambientes aquáticos.

Os valores de temperatura do local de coleta do sedimento caracteriza este ambiente como mesofílico e serviu para nortear os próximos passos experimentais. O sedimento foi incubado à temperatura de 30 °C, com vistas a favorecer a condição mesofílica e possibilitar velocidades mais rápidas ao metabolismo anaeróbio metanogênico (SPEECE, 1996).

No ponto de coleta os valores do potencial de óxido-redução na água da superfície e de fundo foram +57 e -310 mV, respectivamente. Esta diferença de valores pode estar relacionada à influência da maré, à baixa profundidade no momento da coleta e à dinâmica de circulação de água dentro do estuário. De fato, a existência de baixo valor de potencial de óxido-redução é condizente com ocorrência de anaerobiose, condição fundamental para a atuação dos anaeróbios estritos, particularmente das arqueias metanogênicas. Assim, a emissão de metano na interface ar-sedimento (item 5.2) verificada no local é justificada.

O pH pode ser considerado uma das variáveis mais importantes para a caracterização de ambientes aquáticos, mas também pode ser uma das variáveis mais difíceis de se interpretar devido ao número de fatores que o influenciam (ESTEVES, 1988). Os valores de pH na água de superfície e na água de fundo foram de 7,6, condição ligeiramente básica. Saia

(2005) determinou neste mesmo local de coleta, em 2002, o valor de pH na superfície e na água de fundo em torno de 7,6 e 7,2, respectivamente. Geralmente, o valor do hipolímio é mais baixo, e está relacionado com as condições mais profundas, como demonstrado por Saia, que determinou a diferença em profundidade de 2,0 metros. Portanto, a ausência de diferenças neste estudo pode ser explicada pelo fato da baixa altura da coluna d'água no momento da amostragem.

Tabela 14. Indicações geográficas e valores das variáveis físico-químicas das amostras coletadas

Localização / Variáveis físico-químicas	Indicações / Valores
1. Localização geográfica (GPS)	S 23° 52' 401''; W' 46°22'727''
2. Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	
• água da superfície	24
• água do fundo	34,1
3. Salinidade (‰)	
• água da superfície	15,2
• água do fundo	21,3
4. pH	
• água da superfície	7,6
• sedimento	7,6
5. Potencial de óxido-redução (mV)	
• água da superfície	+57
• água do fundo	-310
6. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	
• água da superfície	24
• água do fundo	24

Os valores da salinidade na água de superfície e de fundo foram de 15,2 e 21,3 ‰, respectivamente. Braga et al. (2000) determinaram o valor de 24,9 ‰ neste mesmo local. O valor determinado na interface água-sedimento foi fundamental para estabelecer a salinidade empregada no meio de cultura do presente estudo, cerca de 20‰.

As variáveis físico-químicas da coluna d'água determinadas no local de coleta do sedimento corrobora com a informação de eutrofização da área estudada, como apontada por CETESB (2001). Estes dados indicam que os impactos apontados por esse relatório, como liberação de efluentes industriais inadequados, de resíduos sólidos, dos esgotos sanitários

provenientes do Porto de Santos e dos municípios da Baixada Santista, bem como os freqüentes acidentes de derramamentos de óleo e outras substâncias nos cursos d'água ainda persistem. A caracterização do ambiente onde foi coletado o sedimento foi essencial para desenhar estratégias metodológicas que permitiram transformar este sedimento em um bom inóculo de reatores anaeróbios.

5.2 Determinação da taxa de emissão do gás metano na interface superfície – água.

De acordo com o resultado das análises dos gases, o ponto 4 BIOTA, ou como se pode denominar o “sítio Cosipa” apresentou emissão difusiva dos gases metano na ordem de 23,90 (+/- 13,38) mg CH₄ /m²/d e carbônico na ordem de 2535 (+/- 1752) mg CO₂ /m² /d. Os resultados dos teores CO₂ e metano (ppm) presentes nas câmaras de difusão por cromatografia estão relacionados na Tabela 15 e foram utilizados no cálculo de emissão difusiva, de acordo com metodologia descrita em Rosa *et al.*, (2002). Os resultados confirmam a existência de atividade metanogênica no local. Sabe-se que os teores do metano que emanam do sedimento são, em geral, maiores do que aqueles que são lançados na interface água-ar, uma vez que podem ser consumidos pelas bactérias metanotróficas ao longo da coluna d'água, sofrer reações de foto-oxidação, ou ficam armazenados no fundo da coluna d'água por força da pressão que esta exerce. As médias de emissão difusiva de rios e reservatórios amostrados entre os anos de 2003 e 2004 em sítios localizados no território nacional entre as latitudes 3 graus Sul e 14 graus Sul são de -1346 (+- 5946) a 6617 (+- 4523) mg CO₂ /m² /d e de 6,12 (+- 8,49) a 57,4 (+- 165,3) mg CH₄ m²/d (ROSA *et al.*, 2002). Os valores com sinal negativo significam absorção dos gases pelos corpos d'água.

A determinação da taxa de emissão de metano em ambiente estuarinos varia de acordo com a salinidade do local, pois a disponibilidade do sulfato relacionada com a salinidade favorece as bactérias redutoras de sulfato na competição com as metanogênicas (CAPONE; KIENE, 1988). Alguns trabalhos têm demonstrado a importância da salinidade na determinação da emissão do metano. Barlett et al., (1985) ao estudar a emissão do gás metano no estuário Bay Tree Creek Salt Marsh, estado de Virginia (USA), determinou para variações de salinidade de 5 a 23 (‰) ocorreu emissão de 129,6 a 41,6 $\text{mg/m}^2/\text{dia}^{-1}$. Barlett et al., (1987) estudando o estuário York River, estado de Virginia (USA), verificou que para a salinidade de 2,6, 5,5 e 8,8 (‰) a emissão de metano foi de 48, 60,8 e 14,4 $\text{mg/m}^2/\text{dia}^{-1}$ respectivamente. Magenheimer et al., (1996), estudando o estuário Dipper Harbour (Canadá) determinou a taxa de emissão de metano de 2,08 e 0,48 $\text{mg/m}^2/\text{dia}^{-1}$ para salinidade na faixa de 20,6 a 23,5 e 31 a 35 (‰), respectivamente. Estes estudos realmente apontam para uma real diminuição da produção de metano quando há o aumento da salinidade. A concentração de emissão de metano em áreas estuarinas com salinidade em torno de 20(‰), a mesma do presente trabalho, variou de 1,6 $\text{mg/m}^2/\text{dia}^{-1}$ determinada em Scheldt – Bélgica/Holanda (MIDDELBURG et al., 1996) e 2,08 $\text{mg/m}^2/\text{dia}^{-1}$ em Dipper Harbour (Canadá).

Assim, a emissão difusiva do “sítio Cosipa” (23,90 (+/- 13,38) $\text{mg CH}_4 /\text{m}^2/\text{d}$) encontra-se uma magnitude superior ao determinado em literatura em regiões estuarinas impactadas com salinidade próximas. O fato de os estuários citados pela literatura estar localizados em regiões temperadas, pode ser uma explicação para esta diferença, pois a temperatura é essencial para a boa atividade metanogênica. Não foi encontrado na literatura científica, trabalhos que determinam taxas de emissão de metano em estuários brasileiros, portanto estes dados são únicos e nos permite concluir que o ambiente estudado apresenta elevada atividade metanogênica. Este resultado norteou o uso do sedimento deste local para

enriquecimento dos microrganismos anaeróbios, tornando-os aptos a serem usados como inóculos em reatores anaeróbios.

Tabela 15. Teores de CO₂ e metano em ppm

Amostra	CO ₂	Metano
1 C0 (t 0)	250	2,12
1 C3 (t =3min)	556	4,82
1C6 (t =6min)	670	9,11
1C12 (t =12 min)	586	9,7
2C0 (t 0)	297	1,94
2C3 (t =3min)	411	3,9
2C6 (t =6min)	619	5,08
2C12 (t =12min)	692	6,83

Legenda: 1C – Câmara 1; 2C - Câmara 2; t – tempo de equalização

5.3 Caracterização da amostra de sedimento

As reais condições de contaminação do sedimento estudado são visualizadas na Tabela 16 que apresenta os valores das variáveis físico-químicas determinadas.

A quantidade de sólidos voláteis associada à concentração de biomassa presente na amostra de sedimento da COSIPA foi de 288,73 g STV/L. Considera-se para lodo de esgoto que o valor determinado por STV pode ser associado à biomassa presente. Entretanto, para sedimentos essa associação não pode ser direta, uma vez que em sua composição há componentes como óleos e graxas e matéria orgânica provenientes de galhos, folhas, frutos e demais substâncias presentes na região estuarina.

Tabela 16. Resultados das análises empregadas na caracterização da amostra de sedimento.

Parâmetros	Valores
STV	115,73 g/L
Óleos e graxas	6.180,0 mg/L
Fosfato total	2.544,0 mg/L
N amoniacal	46 mg/L
Zn	80 mg/Kg
Pb	148 mg/Kg
Cd	Nd
Ni	10,5 mg/Kg
Fe	32,7 g/Kg
Mn	1.075 mg/Kg
Cr	31,0 mg/Kg
Cu	40,5 mg/Kg

Legenda: STV – Sólidos Totais Voláteis; N – Nitrogênio; Zn – Zinco; Pb – Chumbo; Cd – Cádmio; Ni – Níquel; Fe – Ferro; Mn – Manganês; Cu – Cobre; Cr – Cromo.

A quantidade de óleos e graxas encontrada foi de $6,18 \text{ g.L}^{-1}$. Esta alta concentração seria prejudicial para a hidrodinâmica do reator se o sedimento fosse utilizado diretamente para a inoculação do RAHLF, pois esse óleo poderia colmatar o leito fixo, causando alteração no tempo de detenção hidráulica.

Visando uma maior compreensão da qualidade da matrix coletada, como fonte de inóculo para aplicação tecnológica, foi realizada a determinação da concentração de metais pesados no sedimento. Entretanto a legislação brasileira não dispõe de critério de qualidade de sedimento que os considere. A CETESB vem adotando em seus relatórios ambientais, os critérios estabelecidos pela Agência Ambiental Canadense (ENVIRONMENTAL CANADA, 1999), que apresenta o nível de classificação PEL (Probable Effect Level) que determina as concentrações acima da qual são causadoras de efeitos adversos severos sobre os organismos aquáticos e o TEL (Theshold Effect Level) que indica a concentração abaixo da qual não são esperados efeitos adversos sobre o organismos aquáticos. Levando em consideração este parâmetro nas análises dos resultados encontrados neste trabalho, deve-se atentar para a concentração de chumbo encontrada no sedimento que foi de $148 \text{ } \mu\text{g/g}$ e é superior as

concentrações estabelecidas pelo PEL (122µg/g). A CETESB determinou a concentração entre 8,3 a 17,5 µg/g deste metal no estuário de Santos em 1979, e em 1999 a concentração encontrada no mesmo ponto de coleta foi de 295µg/g no sedimento. A alta concentração de chumbo no sedimento coletado se explica pelo metal estar presente no efluente da COSIPA e de outras siderúrgicas instaladas no local, além da refinaria da Petrobrás (CETESB, 2001).

A concentração média de cobre no sedimento foi de 40 µg/g e é inferior a determinada pelo PEL (108 µg/g), mas está acima do TEL (18,7µg/g) e também indica preocupação com o local. Os valores encontrados pela CETESB (2001) em 1999 foi 81µg/g para o mesmo lugar de amostragem, indicando possível redução da emissão deste composto pelas indústrias instaladas no local. A concentração de cromo (31,0 µg/g) determinada no sedimento está próxima a estabelecida pelo TEL (32,3µg/g) e coincide com os valores determinados pela CETESB em 1999 (CETESB, 2001) que variava de 23 a 70µg/g. Os demais parâmetros encontram-se em concentrações abaixo dos valores limites para os organismos aquáticos (TEL), de acordo com a Agência Ambiental Canadense.

Estes resultados levantaram preocupações de uso direto do sedimento como inóculo no RAHLF, pois as elevadas concentrações de metais pesados encontradas no local poderia inibir, por toxicidade, a atividade microbiana metanogênica.

Assim, decidiu-se adotar o método de diluições sequenciais no processo de ativação e enriquecimento do consórcio microbiano anaeróbio metanogênico das amostras de sedimento coletado, visando minimizar a interferência destes constituintes.

5.4 Ativação e enriquecimento do consórcio microbiano anaeróbio metanogênico das amostras de sedimento do Sistema Estuarino de Santos-São Vicente coletados em frente da COSIPA.

Os microrganismos proveniente do sedimento estuarino foram enriquecidos sob condições metanogênicas, visando a utilização do sedimento como inóculo nos ensaios nutricionais e na operação dos reatores do tipo RAHLF (RAHLF 1 e RAHLF 2). Este processo também resultou em diluições do sedimento, diminuindo assim a toxicidade causada pelas altas concentrações de metais pesados e óleos e graxas presente nas amostras *in natura*.

O sedimento coletado no estuário de Santos – São Vicente foi inoculado em meio mineral Biota, com as condições físico-químicas e nutricionais adequadas para favorecer a obtenção de culturas metanogênicas provenientes de ambiente salino. A produção de metano nos frascos reatores indicou a ocorrência de ambiente metanogênico após período de adaptação de 19 dias de incubação.

A variável de controle utilizada foi a produção de metano nos frascos reatores. Os frascos reatores para produção de inóculo foi preenchido com 100 mL de sedimento, diluídos em 900 ml de meio Biota, conforme a Tabela 3 no item 4.2.2.

No enriquecimento do sedimento para uso como inóculo durante o ensaio do RAHLF 1, o reator foi realimentado com 0,250 mg/L de formiato de sódio e 0,250 mg/L de glicose, sempre após a estabilização da produção do gás metano (%), na periodicidade indicada na Figura 16 (a). O lodo foi considerado apto como inóculo do RAHLF 1 quando a porcentagem do gás metano na atmosfera do frasco atingiu valor estável de 39%.

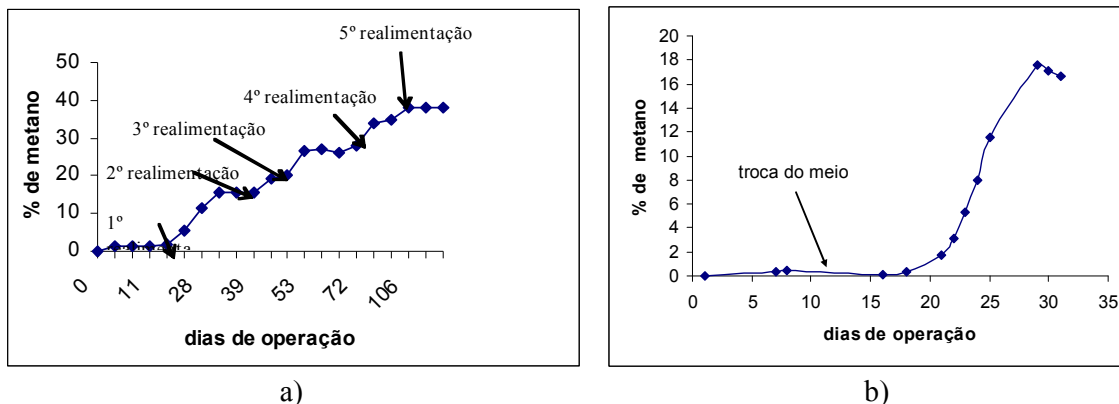


Figura 16: Representação gráfica dos valores de metano (%) e indicação das alimentações efetuadas ao longo dos dias de operação durante enriquecimento do sedimento a ser utilizado como inoculo na operação do RAHLF 1 (a) e no RAHLF 2 (b).

No enriquecimento do sedimento para uso como inóculo do RAHLF 2, o meio mineral biota teve a concentração de N e P corrigida para as relações de 10:1 mg.L⁻¹. O sistema de enriquecimento foi então operado sob condições semi-contínuas e após 11 dias de operação substituiu-se o meio de cultivo por novo meio mineral biota, com as mesmas concentrações nutricionais, como demonstrado no item 4.2.2 do capítulo Material e Métodos. Este procedimento visou a manutenção das relações nutricionais impostas durante todo o período de enriquecimento, pois buscava-se a seleção da comunidade microbiana pela baixa concentração nutricional imposta durante este processo. Após 30 dias de operação a porcentagem do gás metano na atmosfera do frasco reator era de 18% e o lodo foi considerado apto como inóculo do RAHLF 2. A Figura 16 b, mostra o avanço da produção de metano ao longo do período operacional do reator destinado ao enriquecimento do lodo.

Dessa forma, os procedimentos utilizados para o enriquecimento dos microrganismos autóctones presentes no sedimento proveniente do estuário de Santos-São Vicente foi adequado. O meio de cultivo salino Biota suplementado com glicose e formiato, nas duas condições nutricionais testadas, foi propício para o desenvolvimento da comunidade microbiana metanogênica, transformando o sedimento estuarino com aspecto de uma borra

oleosa, como discutido no item 5.3 do capítulo resultados e discussão, em lodo metanogênico para ser utilizado em reatores anaeróbios.

5.5 Testes preliminares à operação dos reatores RAHLF.

5.5.1 Ensaio de adsorção

5.5.1.1 Isoterma de adsorção

Para os cálculos da isoterma, a quantidade de PCP adsorvida pela biopartícula foi determinada como sendo a diferença entre a concentração inicial e final no líquido, dividido pelo peso seco da biomassa.

Os valores experimentais da isoterma e adsorção foram ajustados a diversos modelos propostos por diferentes autores (Tabela 17). Os dados para o cálculo do Erro Relativo Médio e de Erros ao Quadrado para todos os pontos estão demonstrado no Anexo 1. Em todas as isotermas o ajuste foi satisfatório em termos do seu coeficiente de correlação (r^2), entretanto, os ajustes dos dados das isotermas propostas por Radke – Prausnitz (1972)⁶, Mathews e Weber (1977)⁷ e Fritz e Schlünder (1974)⁸ *appud* Mollah e Robinson, (1996) não produziram resultados satisfatórios, com elevados desvio nos coeficientes da isoterma.

⁶ RADKE, C. J.; PRAUSNITZ, J. M. (1972). Adsorption of organic of organic solutes from dilute aqueous solution on GAC. *Ind. Engr Chem. Fund. V 11*. p. 445-451.

⁷ MATHEWS A. P.; WEBER W.J. (1977). Effects of external mass transfer and intraparticle diffusion on adsorption rates in slurry reactors. *AIChE Symp. Ser.* 71, 91-98.

⁸ FRITZ, W.; SCÜNDER E.U.; (1974). Simultaneous adsorption equilibria of organic solutes in dilute aqueous solution on GAC. *Chem. Engr. Sci.* 29, p. 1279-1282

Foi possível aplicar regressão linear entre os dados experimentais e os modelos de Langmuir, Freundlich e Linear, visto que as pressuposições sobre homocedasticidade e normalidade dos resíduos foram satisfatórias para todas as regressões, resultando em $p=0$. Baseado neste critério, as isotermas de Freundlich (1907)⁹, Langmuir (1918)¹⁰ *appud* Mollah e Robinson, (1996) e Linear ajustaram-se satisfatoriamente aos pontos experimentais.

Tabela 17: Resultado do ajuste dos dados experimentais a diferentes isotermas de adsorção.

Isoterma	Nº de parâmetros	Coefficientes da isoterma	R ²	ERM ⁺	SEQ*
Langmuir	2	$a_1 = 4,20 \cdot 10^{-1} \pm 4,12 \cdot 10^{-2}$ $a_2 = 6,05 \cdot 10^{-4} \pm 4,88 \cdot 10^{-4}$	0,994	27,52	63,83
Freundlich	2	$a_1 = 6,36 \cdot 10^{-1} \pm 1,78 \cdot 10^{-1}$ $a_2 = 8,99 \cdot 10^{-1} \pm 5,20 \cdot 10^{-2}$	0,994	22,25	52,35
Radke – Prausnitz	3	$a_1 = 1,43 \cdot 10^{-3} \pm 3,10 \cdot 10^0$ $a_2 = 1,00 \cdot 10^0 \pm 8,25 \cdot 10^{-1}$ $a_3 = -9,98 \cdot 10^{-1} \pm 3,94 \cdot 10^0$	0,994	19,28	50,71
Mathews – Weber	3	$a_1 = 2,97 \cdot 10^1 \pm 2,42 \cdot 10^4$ $a_2 = 4,57 \cdot 10^1 \pm 3,81 \cdot 10^4$ $a_3 = 1,02 \cdot 10^{-1} \pm 1,13 \cdot 10^0$	0,994	22,27	52,36
Fritz – Schlünder	4	$a_1 = 4,75 \cdot 10^2 \pm 1,58 \cdot 10^6$ $a_2 = 1,40 \cdot 10^0 \pm 3,80 \cdot 10^3$ $a_3 = 7,47 \cdot 10^2 \pm 2,49 \cdot 10^6$ $a_4 = 4,98 \cdot 10^{-1} \pm 3,80 \cdot 10^3$	0,994	22,26	52,35
Linear	2	$a_1 = 2,55 \cdot 10^0 \pm 1,44 \cdot 10^0$ $a_2 = 3,57 \cdot 10^{-1} \pm 1,04 \cdot 10^{-2}$	0,994	32,99	60,58

$$+ \text{Erro relativo médio} = \frac{\sum |q_{\text{obs}} - q_{\text{cal}}|}{N_{\text{obs}}} \times 100.$$

*Soma dos erros ao quadrado.

A Tabela 17 mostra os valores dos erros relativos e das somas dos erros ao quadrado para todos os modelos. Esses parâmetros têm sido utilizados para definição do melhor ajuste de modelos em isotermas (MOLLAH; ROBINSON, 1996). De acordo com estas análises, o

⁹ FREUNDLICH H. (1907). Über die Adsorption in Lösungen. *Z. Phys. Chem.* 57, p. 385

modelo de Freundlich foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais. O modelo da isoterma de Freundlich é descrito pela seguinte equação: $\ln(q_{eq}) = \ln(K) + n \ln C_{eq}$. A constante K , que indica a capacidade de adsorção da biopartícula foi 0,63 e n , que indica a intensidade de adsorção, igual a 0,899. Visvanathan et al. (2005) estudaram a capacidade de bioadsorção do PCP em lodo empregando experimentos operados sob condições descontínuas. O modelo de Freundlich foi utilizado para ajuste de seus dados. Os autores encontraram valores da constante K_F igual a do presente trabalho, ou seja 0,63, e valor de n igual a 0,388. Shen, Liu e He, (2005) estudaram a capacidade de adsorção do PCP por lodo granular do reator UASB. Os autores concluíram que a equação da isoterma de Freundlich foi a que melhor descreveu o comportamento de adsorção do PCP em lodo granular em um reator UASB. Os autores determinaram valores para as constantes K e n de 0,567 e 1,113.

Portanto, o modelo de Freundlich tem se ajustado bem para experimento de isoterma de adsorção de PCP em biomassa microbiana e foi o modelo que melhor se ajustou no presente trabalho, que estudou a adsorção do PCP em biopartícula (espuma + biomassa).

5.5.1.2 Avaliação da adsorção de PCP durante a partida do RAHLF 1

Para determinar a quantidade de PCP que estava adsorvido na biopartícula, amostras de espumas inoculadas (biopartícula) foram retiradas do reator e processadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.5 de material e métodos. A Tabela 18 apresenta os dados de recuperação do composto clorado adsorvido na biomassa imobilizada com relação ao processo de adsorção adotado durante o ensaio de isoterma de adsorção.

¹⁰ LANGMUIR J. (1918). The adsorption of gases on planes of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 40,361.

Tabela 18. Valores do ensaio de adsorção do PCP.

PCP adicionado (mg)	0,0497	0,098	0,2	0,497	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
A) PCP recuperado na fração líquida (mg)	0,0108	0,0208	0,0867	0,297	0,452	1,035	1,792	2,327	2,693
B) PCP recuperado na espuma (mg)	0,0210	0,021	0,0853	0,182	0,517	0,98	1,33	1,575	1,766
Capacidade de recuperação (%)	64	43	86	96,3	97	101	104	98	90

Capacidade de recuperação: (massa de PCP remanescente na fração líquida + massa de PCP adsorvida na espuma)/(massa de PCP adicionada) = (A+B)/PCP adicionado

Considerando a capacidade de recuperação do método de extração como sendo a massa de PCP remanescente na fração líquida mais a massa de PCP adsorvida na biopartícula dividida pela massa de PCP adicionada, a eficiência da metodologia de extração variou de 86 a 104% de recuperação para massas adicionadas de 0,2 a 5,0 mg PCP e 46% e 64% para massa de 0,098 e 0,05 mgPCP.

As concentrações de PCP adsorvida na biomassa imobilizada e presente na fração líquida (Figura 17 e 18, Tabela 19 e 20) durante alimentação do reator com 10 mgPCP. L⁻¹ indicam que em 30 dias a pluma de PCP avançou pelo reator e atingiu o efluente. A concentração do PCP na fase líquida no 30º dia foi praticamente constante (10mg/l) ao longo dos pontos de amostragem, e próxima à concentração adicionada (Figura 18, Tabela 20), indicando saturação da biomassa imobilizada. Nessa fase, a massa média do composto PCP por grama de espuma foi de 6,5 mg de PCP. Isoterma de Freundlich, prediz que para a concentração de equilíbrio de 10,0 mgPCP.L⁻¹, 5,04 mg PCP estaria adsorvido por grama de espuma. Os dados da isoterma de adsorção (item 5.5.1.1) indicam que o modelo de Freundlich possa ser utilizado para mensurar a capacidade de adsorção do PCP em biopartícula (espuma mais lodo anaeróbio) não degradadores de PCP, mais é impossível obter um verdadeiro balanço de massa nas fases líquida e sólida durante a operação do RAHLF devido a hidrodinamica do reator e a degradação do PCP pelos microrganismos presentes. Entretanto, apesar da diferença dos dados observados e do previsto pela modelo de isoterma adotado,

estes apontam para conclusão de que, neste período, a adsorção foi o mecanismo principal de remoção do PCP.

Realmente, a adsorção de compostos lipofílicos como o PCP pode ser um importante processo de remoção deste composto em biorreatores. Jacobsen, Arvin e Reinders (1996), demonstraram que a adsorção de PCP em lodo ativado pode ser superior a 50% quando o tempo de detenção celular é menor que 3 dias. Entretanto, segundo estes autores, quando o tempo de detenção celular for superior a 14 dias o mecanismo de adsorção é inferior a menos de 10% da remoção de PCP. Os dados deste trabalho diferem as do apresentado por Jacobsen, Arvin e Reinders (1996), pois o reator utilizado neste estudo é de leito fixo e o tempo de detenção celular foi o mesmo tempo de duração deste ensaio, 30 dias. Entretanto, o principal mecanismo de remoção do PCP foi a adsorção durante o período inicial de aclimação da comunidade microbiana ao PCP, na partida do RAHLF 1. Uma das possíveis explicações para este resultado é utilização de inoculo não adaptado ao composto tóxico.

Apesar de o mecanismo principal de remoção do PCP ter sido a adsorção, ao longo do período operacional, observou-se o decaimento da concentração de PCP adsorvido na espuma no ponto 1 (Tabela 19), e valores-traço dos intermediários clorados passíveis de serem medidos na fase líquida (Figura 19). A presença dos intermediários menos clorados indicou a ocorrência da biodegradação do PCP no sistema.

Tabela 19: Valores de PCP (mg/g espuma) adsorvido na biomassa imobilizada ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.

	3d	10d	17d	24d	30d
P1	7,72	6,67	5,45	4	5,04
P2	0,87	4,47	3,33	4,09	6,64
P3	0,03	2,2	2,74	5,1	8,17
P4	nd	0,29	1,56	4,11	6,15
P5	nd	0,046	1,5	1,024	6,69

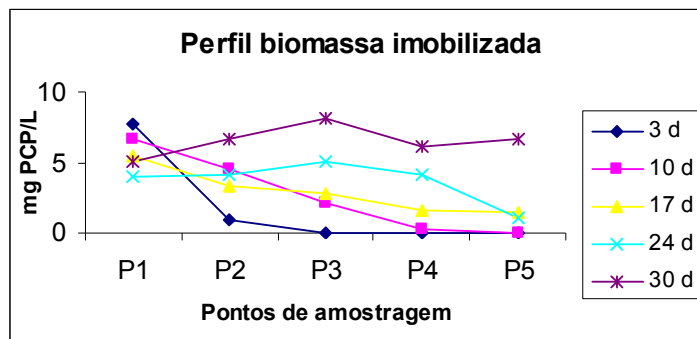


Figura 17: Representação gráfica dos valores de PCP (mg/g espuma) adsorvido na biomassa imobilizada ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.

Tabela 20: Valores de PCP (mg/L) na fração líquida ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.

	3d	10d	17d	24d	30d
P1	4	4	9,38	7,6	10,2
P2	0,4	2,8	6,94	4,96	10,2
P3	0,2	2,1	9,07	7,5	10,9
P4	0	0,1	4,66	6,87	10,5
P5	0	0,1	2,97	3,7	10,7

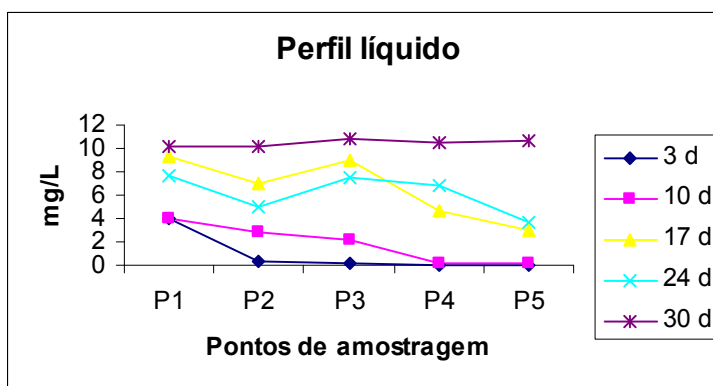


Figura 18: Representação gráfica dos valores de PCP na fração líquida ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.

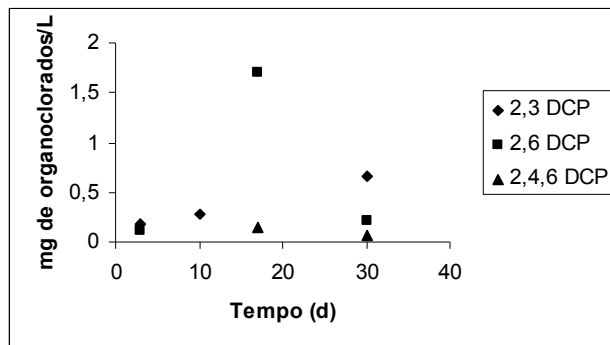


Figura 19: Representação gráfica dos valores dos compostos intermediários passíveis de medição no sistema de reação, ao longo do experimento na fração líquida

5.5.2 Análise da diversidade microbiana por DGGE durante o estudo de adsorção no RAHLF 1

Visando entender o impacto que a saturação do leito do RAHLF com PCP causa nos microrganismos autóctones provenientes do sedimento do estuário de Santos aderidos ao material suporte do RAHLF, a variação da diversidade microbiana foi determinada por métodos de biologia molecular. Para isso, perfis de DGGE de amostras do início (Ponto 1), meio (Ponto 3) e fim (Ponto 5) do reator foram comparadas antes e após a saturação com o PCP, através do coeficiente de similaridade, segundo equação descrita por Gillan et al., (1998).

Os perfis de bandas do DGGE das amostras antes da adição do PCP e após a saturação da biomassa com este composto, do ponto 1, 3 e 5 do reator, ou seja, começo, meio e fim, amplificadas com *primers* do Domínio *Archaea* mostram que as estruturas das comunidades microbianas, pertencentes a este domínio, foram semelhantes, como demonstrado na figuras 20 b e a representação gráfica no ANEXO 2. No ponto 1, das 16 bandas inicialmente presentes, 15 se mantiveram e apareceram outras 3 após a saturação com o PCP. No ponto 3,

das 11 bandas inicialmente presentes (antes da adição do PCP), 10 se mantiveram. No ponto 5, das 12 bandas iniciais, 11 se mantiveram após a saturação da biomassa. O coeficiente de similaridade foi de 88%, 95% e 95%, respectivamente, para os pontos 1, 3 e 5, comparando-se antes da adição do PCP e após a saturação com este composto. Estes resultados demonstraram que a comunidade de arqueias, proveniente do sedimento do estuário de Santos, foi pouco impactada com a saturação da biopartícula com PCP.

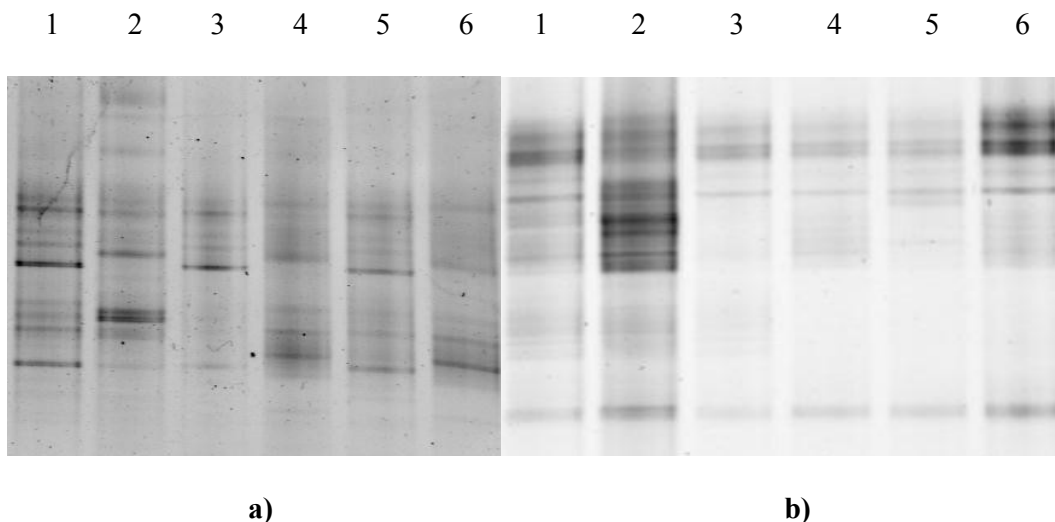


Figura 20: Fotos do géis de DGGE. (a) e (b) DGGE dos produtos de PCR usando primers do Domínio *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente, com gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda da Figuras: 1; 3; 5 – Pontos 1,3 e 5 do reator antes da adição do PCP; 2; 4; 6 – Pontos 1,3 e 5 do reator após a saturação da biomassa com PCP.

O perfil de bandas do DGGE para o Domínio *Bacteria* (Figura 20 a), das amostras coletadas antes da adição do PCP e após a saturação do leito do reator com este composto no começo, meio e fim do reator, revelou um grande impacto na comunidade microbiana após a saturação com o PCP. A representação gráfica do perfil de bandas do DGGE para o Domínio *Bacteria* encontra-se demonstrada no ANEXO 3. No ponto 1, das 9 bandas inicialmente presentes, 5 se mantiveram e outras 6 foram evidenciadas. O coeficiente de similaridade para

este ponto foi de 50%. No ponto 3, das 5 amostras inicialmente presentes, somente 1 se manteve e outras 5 apareceram, perfazendo um coeficiente de similaridade de 18%. O coeficiente de similaridade no ponto 5 foi de 43% e das 8 bandas inicialmente presente somente 3 permaneceram após a saturação com o PCP e surgiram outras 3. Estes resultados demonstram que o Domínio *Bacteria* sofreu alterações quando ocorreu saturação da biomassa imobilizada com o PCP, constatando-se o desaparecimento de populações após a saturação e o predomínio de algumas, estas possivelmente relacionadas com tolerância ao PCP ou com sua degradação.

Estes resultados confirmaram alguns estudos prévios que indicaram microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* como responsáveis pela degradação inicial do PCP, enquanto que as arqueias foram associadas ao metabolismo dos sub-produtos formados, reforçando a importância do sintrofismo microbiano para a degradação deste composto (TARTAKOVISKY et al., 2001, MONTENEGRO et al., 2001). O estudo de Saia *et al.* (2007) revelou grande variação de bandas do Domínio *Bacteria* em relação ao de *Archaea*, e presença específica de bactérias em todas as porções do RAHLF durante a degradação do PCP. A autora concluiu que os membros da comunidade microbiana pertencentes ao Domínio Bactéria estavam diretamente envolvidos com a desalogenação do PCP e membros da ordem *Methanosarcinales* estavam diretamente envolvidos com este metabolismo. Lanthier (2005) monitorou mudanças na comunidade microbiana por DGGE durante o processo de aclimação em PCP, e notou importantes modificações no Domínio *Bacteria* entre o biofilme do reator e o lodo granular original usado como inoculo. Os autores constataram que das 25 bandas do DGGE presentes em ambas as amostras, somente 6 eram comuns. Para o Domínio *Archaea* a comunidade encontrada em ambas as amostras foi menos complexa, com a presença de 8 a 10 bandas no lodo usado como inoculo. As bandas mais proeminentes também foram encontrada no biofilme.

Alguns trabalhos relatam o tempo que se levou para a comunidade microbiana, tanto do Domínio *Bacteria* como *Archaea*, se adaptarem a exposição do PCP. Tartakovsky et al., (1999) demonstraram estabilização da comunidade de *Bacteria* depois de 17 dias de operação de um UASB, alimentado com PCP. Liu et al., (2002), demonstraram estabilização de *Bactéria* e *Archaea* em dois reatores anaeróbios acidogênicos após 13 dias de operação. Entretanto, não se encontrou em literatura trabalhos que relatem o efeito da adsorção de PCP em biopartículas contendo comunidades microbianas provenientes de sedimento estuarinos.

Neste trabalho, apesar de não ter sido realizado o acompanhamento da diversidade microbiana por mais tempo para verificar se a comunidade microbiana entrou em estabilidade, as mudanças na alteração da diversidade observada mais os relatos de outros trabalhos, onde intervalos de tempo inferiores ao adotado por este estudo são necessários para que a comunidade microbiana se estabilize, nos faz concluir que após o período de avanço da pluma de adsorção, onde a saturação da biomassa foi completa, de acordo com a concentração de equilíbrio de $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ a microbiota presente no reator estava em processo de estabilização.

5.6 Avaliação do desempenho do inóculo na remoção de PCP em diferentes relações nutricionais (DQO:N:P), baseado na Teoria “Resource Ratio”

Com o objetivo de testar diferentes relações nutricionais na degradação anaeróbia do PCP, com vistas a uma melhor compreensão da relação N:P adequada para o processo anaeróbio, o presente estudo fundamentou-se na Teoria dos Nutrientes Limitantes (SMITH et al., 1998). A teoria prediz que diferentes relações nutricionais selecionam diferentes comunidades microbianas, e quando esta é aplicada em processo de biorremediação resulta em diferentes taxas de degradação dos compostos estudados (HEAD; SWANNEL, 1999; SMITH, 2002). Essa teoria vem sendo aplicada com sucesso na degradação aeróbia de hidrocarbonetos demonstrando que o suprimento de diferentes relações N:P apresentam forte impacto nas taxas de degradação destes compostos (HEAD; SWANNEL, 1999). Entretanto, a relação nutricional N:P nos processos anaeróbios de estabilização de resíduos orgânicos não tem sido relatada com base na Teoria dos Nutrientes Limitantes. Nesse sentido, o presente estudo procurou avaliar diferentes relações nutricionais (ver Tabela 2 do item 4.2.3 de Material e Métodos) para os microrganismos anaeróbios, na busca para encontrar as melhores relações de N e P para a degradação do PCP, facilitando as reações de degradação e favorecendo o crescimento celular.

A influência da relação nutricional N:P foi avaliada pelo desempenho dos frascos reatores tipo batelada sob alimentação semi-contínua, em relação à redução da concentração de PCP e formação de clorofenóis, diversidade microbiana e produção de metano, entretanto os dois primeiros parâmetros, aliados a relação com menor concentração dos nutrientes que apresentaram bons resultados de degradação do PCP, foram fundamentais para selecionar a relação DQO:N:P mais adequada. Para isso, o lodo enriquecido foi submetido a iguais concentrações de PCP, alterando as concentrações de N e P, sem adaptação prévia ao PCP. A

estabilização da produção de metano foi utilizada como indicador para a alimentação dos reatores. O intervalo entre as alimentações sucessivas foi definido como fase. Para minimizar a influência dos nutrientes remanescentes no inóculo, 3 diluições subseqüentes foram realizadas, anteriores à inoculação, resultando na ausência de N, de acordo com a metodologia disponível e concentração de aproximadamente 3,0 mgP/L biodisponível. A concentração de sólidos voláteis no inóculo foi de 18,19 g STV/L.

Para facilitar a compreensão e discussão, as Figuras 21, 22, 23 e 24 representam os valores das determinações de metano ao longo das fases 1, 2, 3 e 4. Os frascos reatores estão numerados de 1 a 10, com as diferentes relações nutricionais impostas, como mostrado na Tabela 2 do item 4.2.3. As Tabelas 21 e 22 apresentam os valores dos ácidos orgânicos que estiveram presentes no final das fases 3 e 4, respectivamente. A Tabela 23 apresenta a concentração de PCP introduzida em cada reator experimental, assim como o residual e os sub-produtos da degradação do composto no final de cada fase experimental, tais como 2,4,6 TCP, 2,3 DCP e 2,6 DCP. As tabelas 24 e 25 apresentam os valores residuais de N e P no final de cada fase experimental. Relembrando (item 4.2.3), as fases operacionais para todas as relações testadas, tem-se: Fase 1 (primeiros 20 dias de operação); Fase 2 (do 20° a 46° dia de operação); Fase 3 (do 46° ao 70° dia de operação); Fase 4 (do 70° a 96° dia de operação).

Os resultados das determinações de N-amoniaco e de P (ver Tabelas 24 e 25, respectivamente) ao final de cada fase experimental dos ensaios 1 (N:P_{inicial} = 0:0) e 4 (N:P_{inicial} = 10:0) revelaram que nutrientes foram suplementados ao meio de reação pelo sedimento, e que o P presente nesse sedimento não foi limitante à atividade biológica nos sistemas de reação. Portanto, em ambas as condições nutricionais ocorreu metanogênese (Figura 21, 22, 23 e 24) e degradação do PCP, como pode ser observado na Tabela 23.

Na ausência de adições de P, permite-se afirmar que o sedimento é a origem desse elemento no meio de reação, bem como inferir sobre a forma de sua liberação, ou seja, através

de processos físicos e/ou biológicos como dessorção e/ou endogenia microbiana, respectivamente. Os resultados da determinação de fósforo no final das fases experimentais detectaram aproximadamente $3,3 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, nos experimento 1 e 4, em que este composto não foi inserido. Em baixas concentrações, a quantidade de fósforo geralmente é conservada em processos de digestão anaeróbia (FIELD et al., 1984). Quando o fósforo está em excesso, sua remoção das águas residuárias envolve a adsorção do fosfato aos sólidos suspensos e a subsequente remoção desses sólidos (METCALF E EDDY, 1991). Este nutriente pode ser incorporado em sólidos biológicos (microrganismos) ou removido por precipitação química. Realmente, a remoção de fósforo em excesso é obtida mediante seleção de bactérias capazes de armazenar polifosfato e essa seleção é feita expondo os microrganismos alternadamente às condições aeróbias e anaeróbias (KERRN-JESPERSEN et al., 1994). Nesse sentido, como as quantidades que foram detectadas ao final das fases experimentais, aproximadamente 3,3 mgP/L (Tabela 25), estavam próximas as condições limitantes, possivelmente estas concentrações se encontravam no início dos experimentos e foram consideradas adequadas para a ocorrência e manutenção das atividades celulares. Este dados estão de acordo com a relação de C[DQO]:N:P de 1000:10:2 proposta por Speece (1996) para a digestão anaeróbia metanogênica. Como no ensaio 4, a concentração de N inicial foi de 10mg/L (Tabela 24) e o residual observado de fósforo em torno de 3,0 mg/l (Tabela 25), portanto, as relação C:N:P estava acima da mínima necessária estabelecida pelos autores para processos anaeróbios.

No ensaio 4, relação N:P de 10:0 e cuja concentração inicial da primeira fase foi de 1,0mg PCP/L, ocorreu degradação de cerca metade do composto, restando como PCP 0,54mg/L após 20 dias de incubação. Além disso, determinou-se também 0,64 mg/L de 2,4,6 TCP, principal composto formado durante todo o ensaio (Tabela 23). Nas 2º, 3º e 4º fases, ocorreu remoção de 100%, 91% e 100% do PCP adicionado, respectivamente.

Particularmente para o ensaio 1, os resultados conduziram a seguinte questão: “*como os microrganismos presentes no reator do ensaio 1 estiveram ativos, produziram metano e após duas fases experimentais foram hábeis em degradar o PCP sem acréscimo de nutrientes?*” Com relação ao fósforo, a resposta se fundamenta na afirmação anterior, em que concentrações de P no próprio sedimento foram passíveis de suplementar as necessidades das reações anaeróbias, e as condições de ensaio facilitaram o acesso das células aos nutrientes. Com relação ao nutriente N, como este não foi detectado ao final das fases experimentais, (Tabela 24), quando a produção de metano estava estabilizada, deduz-se que uma pequena quantidade de nitrogênio foi disponibilizada pelo processo de endogenia microbiana. Considerando-se que 15% do peso seco de uma célula microbiana constituem-se por nitrogênio (TORTORA, FUNKE, CASE, 1991), ao ocorrer morte celular, fontes nitrogenadas ficam disponíveis no meio, e provavelmente esta pequena quantidade foi suficiente para possibilitar a atividade microbiana anaeróbia, após um período de adaptação as novas condições impostas. Após este período, a matéria orgânica foi consumida e o composto clorado biodegradado pela comunidade selecionada. É interessante notar que a existência de nutrientes biodisponíveis no sedimento possibilita inferir sobre a existência de reações anaeróbias metanogênicas no local amostrado.

Os resultados da técnica DGGE revelaram que ao final do ensaio 1 (N:P = 0:0), coluna 1 da Figura 25, poucas bandas do Domínio *Bacteria* com baixa intensidade foram observadas, ao comparar-se com as obtidas a partir das amostras testadas com outras relações nutricionais. Representação gráfica das bandas do DGGE do Domínio *Bacteria* encontra-se no Anexo 4. Quando comparados com o número de bandas presentes no inóculo (coluna I, Figura 25), os dados permitem algumas inferências sobre a ocorrência de seleção microbiana ao longo dos ensaios 1, com redução da diversidade microbiana. Apesar das análises de PCR-DGGE não serem robustamente quantitativas, a diferença da intensidades de bandas tem refletido a real

diferença na abundância relativa de diferentes componentes da diversidade microbiana (AKARSUBASI et al., 2006), desde que o processo de extração e amplificação tenha tido a mesma eficiência para todas as amostras testadas. Buzzini et al. (2006) associaram a diminuição da intensidade de banda de DGGE ao longo do período operacional do reator UASB tratando água residuária de indústria de papel, como redução de sua população. Análises microscópicas auxiliaram a estas conclusões. Portanto, a diminuição do número de bandas nas amostras dos ensaios 1, do presente trabalho, onde não foram acrescentados os nutrientes N e P, podem estar associados à diminuição da diversidade microbiana, possivelmente ocasionada por morte celular. Houve perda de amostras do ensaio 4, e devido a este fato, não se conseguiu uma boa extração e conseqüentemente, amplificação e DGGE.

Quando os ensaios foram realizados com acréscimo inicial de 5,0 mg N/L (ensaio 2 – 5:1 e 3 – 5:2), os resultados mostram um consumo de cerca 100% do macronutriente. Os resultados do emprego da técnica DGGE revelaram que concentrações próximas as limitantes tiveram um efeito seletivo na constituição da comunidade microbiana bacteriana anaeróbia, pois nos ensaios 2 e 3 com relação N:P de 5:1 e 5:2 (linhas 2 e 3 da Figura 25) houve baixa similaridade dos padrões de bandas obtidos (50%), na comparação entre eles. Este resultado está de acordo com o que prediz a Teoria dos Nutrientes Limitantes, pois duas relações nutricionais distintas, abaixo da considerada limitante por Speece (1996), C:N:P de 1000:10:2, selecionaram comunidades distintas, e possivelmente com diferentes capacidades em metabolizar o PCP. No ensaio 2, com relação N:P de 5:1 a biodegradação do PCP e remoção da matéria orgânica não ocorreu, resultando em um acúmulo de 481,75 mg/L e 383 mg/L de ácido acético ao final da fase 3 e 4, respectivamente (Tabela 21 e 22). A concentração de PCP residual esteve próxima à concentração adicionada, bem como não foram determinados os intermediários ao final de cada fase experimental (Tabela 23). No ensaio 3 com relações N:P de 5:2, observou-se degradação do PCP somente na 3ª fase,

demonstrando que a comunidade selecionada por esta relação nutricional foi apta a degradar o composto clorado, após um provável tempo necessário para adaptação dos microrganismos selecionados. Segundo os resultados da técnica DGEE, quando a relação nutricional N:P testada foi baixa, de 5:1 e 5:2, a concentração dos dois nutrientes teve impacto na seleção da comunidade microbiana. Smith, Graham e Cleland (1998), trabalhando com microrganismos aeróbios, demonstraram que a adição de diferentes concentrações de N e P nas relações 5:1 e 20:1, selecionaram diferentes grupos de organismos autóctones, com diferentes capacidades de degradação do composto fenantreno. Portanto, os dados do presente trabalho trazem para o ecossistema anaeróbio, os resultados já alcançados em estudos com microrganismos aeróbios.

Nas relações N:P de 10:1, 10:2, 15:2, 20:5 e 50:10 a degradação do PCP se iniciou na fase 2, uma vez que o PCP residual ao final da fase 1 foi próximo a concentração inicial. As populações microbianas estabelecidas por estas relações precisaram de um tempo menor de adaptação para a degradação do PCP. As análises de DGGE revelaram que nos ensaios 5 e 6, com relação de N:P de 10:1 e 10:2 apresentou um maior número de bandas perceptíveis (21) e uma maior similaridade entre si (95,23%), demonstrando que as diferentes concentrações de fósforo estudadas (1 e 2 mg/L), quando a concentração de N foi de 10mg/L, não foi impactante no processo de seleção microbiana. Os resultados também indicaram uma alta similaridade nos padrões de bandas dos ensaios 15:2, 20:5 e 50:10 quando comparadas entre si (90,3%, 96,5% e 93,75, na comparação entre 15:2 e 20:5, 15:2 e 50:10 e 20:5 e 50:10, respectivamente), demonstrando que o N foi o limitante no sistema, pois as concentrações de P estudadas (2, 5 e 10mg/L) não tiveram impacto na comunidade microbiana. Entretanto, quando se comparou a similaridade destes grupos com a relação 10:1, concentração que apresentou um maior número de bandas e uma ótima eficiência de remoção do PCP, a similaridade ficou entre 80 e 84% (80% entre 10:1 e 15:2, 84% entre 10:1 e 20:5 e 83,3 % entre 10:1 e 50:10). Este resultado se deve ao desaparecimento de algumas bandas presentes

nas relações 10:1 com o aumento da carga nutricional. Todas as bandas presentes nas relações 15:2, 20:5 e 50:10 estavam presentes na relação 10:1.

A similaridade dos padrões de bandas do Domínio *Bacteria* do ensaio 10 (N:P de 130:45) quando comparada com as relações 15:2, 20:5 e 50:10 variou entre 64 e 72% (64,28% entre 130:45 e 20:5, 69,23% entre 130:45 e 50:10 e 72% entre 130:45 e 15:2). Neste ensaio, a degradação do PCP iniciou somente na 3ª fase e esta demora, quando comparada com os outros ensaios que apresentavam relação nutricional acima da considerada limitante, pode estar relacionada ao fato de que a relação 130:45 apresentava um menor número de bandas (11) quando comparada com as outras relações, indicando que a comunidade bacteriana selecionada por esta relação nutricional necessitou de um tempo maior de adaptação para que o processo de degradação do PCP fosse iniciado. Saia et al. (2007) ao estudarem a degradação do PCP em RAHLF com inóculo proveniente do mesmo local de coleta do presente trabalho, utilizaram meio de cultivo com a mesma relação 130:45 (N:P). Os autores constataram a presença de 13 a 17 bandas no gel de DGGE para o Domínio bactéria em concentrações de PCP variando de 5 a 20 mg/L. A diferença destes resultados com o presente trabalho, que detectou somente 11 bandas nesta mesma relação, pode estar relacionado ao fato de Saia et al. (2007) terem empregado extrato de levedura, o que altera a relação de N e P, bem como apenas glicose como fonte de carbono e demais condições operacionais. Um outro fator que deve ser levado em consideração é a instabilidade de comunidade microbiana anaeróbia durante longo período de operação de reatores estáveis. Fernández et al. (1999), demonstraram que as comunidades de Bactérias e Archeae são extremamente dinâmicas, com drásticas mudanças em curtos períodos de tempo, durante operação de reator metanogênico, sob condições constantes e com performance estável, por um período de 605 dias. Portanto, o dinamismo da dos microrganismos anaeróbios pode ser uma explicação para a diferença de diversidade bacteriana encontrada por Saia et al. (2007) e pelo presente trabalho.

Em sistemas de tratamento anaeróbio de águas residuárias, onde a carga a ser tratada, nem sempre é constante, quanto maior diversidade de microrganismos presentes no reator maior estabilidade da comunidade a possíveis alterações, pois nos ecossistemas metanogênicos há uma complexa cadeia alimentar, em que microrganismos estão divididos em níveis tróficos. Distúrbios nas populações de um nível trófico afetam a comunidade inteira e causam um desequilíbrio que se reflete no desempenho do reator, como o acúmulo de intermediários, mudanças no pH e diminuição da eficiência (SCHINK, 1988). Neste ensaio, os nutrientes N e P foram fornecidos em diferentes concentrações, e como previsto pela Teoria dos Nutrientes Limitantes (TILMAM, 1981) foram selecionadas diferentes comunidades microbiana dominadas por organismos mais aptos a utilizar os nutrientes inorgânicos. As diferentes comunidades microbianas autóctones selecionadas apresentaram diferentes velocidades de degradação do PCP. De acordo com essas premissas, com os resultados de degradação do PCP (Tabela 23) e com a contenção de gastos na operação em escala real, a relação 10:1, ensaio 5, foi a que apresentou melhores resultados, pois além da rápida degradação do PCP quando comparada com as outras relações, apresentou a maior diversidade de microrganismos. Devido a este fato, esta relação foi escolhida para ser testada na operação do reator RAHLF alimentado com PCP.

Os dados aqui apresentados corroboram com a aplicabilidade desta teoria em ambientes anaeróbios metanogênicos, pois se detectou a sensibilidade dos microrganismos envolvidos em relação a variação das condições nutricionais. Assim, a aplicação da Teoria dos Nutrientes Limitantes previamente a ensaios de degradação é uma importante estratégia para processos de biotratamento e biorremediação, pois esta pode ser usada na seleção de microrganismos autóctones proveniente de amostras ambientais que mais rapidamente biodegrada o composto tóxico, possibilitando assim, rápida partida no processo, melhor

eficiência de remoção e consumo eficiente dos nutrientes, evitando desperdício e reduzindo os gastos.

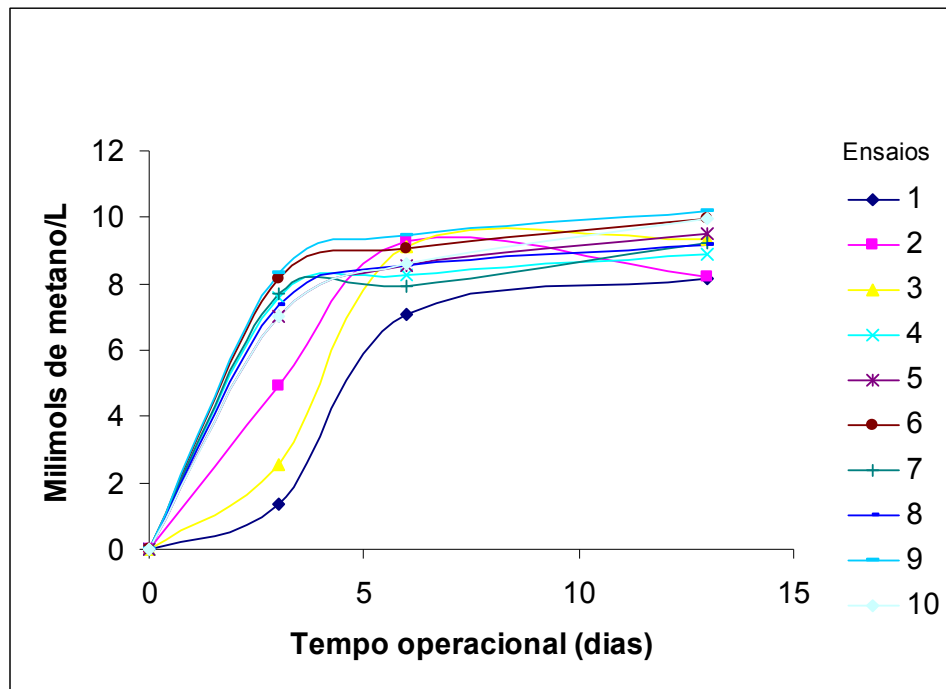


Figura 21: Representação gráfica da variação de valores do gás metano em relação ao tempo (dias) durante a fase 1 nos diferentes ensaios. Legenda: 1 – 1000:0:0 (DQO:N:P); 2 – 1000:5:1; 3 – 1000:5:2; 4 – 1000:10:0; 5 – 1000:10:1; 6 – 1000:10:2; 7 – 1000:15:2; 8 – 1000:20:5; 9 – 1000:50:10; 10 – 1000:130:45.

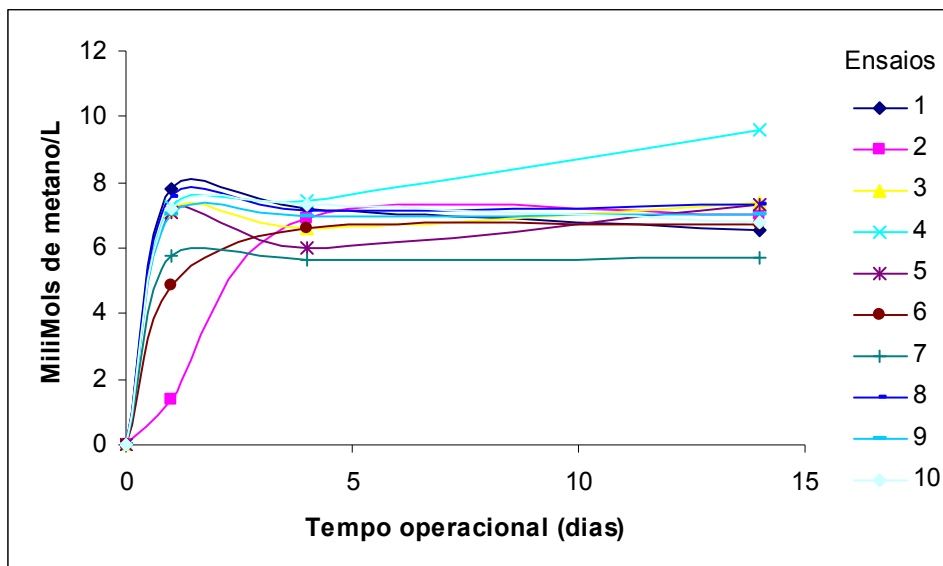


Figura 22: Representação gráfica da variação de valores do gás metano em relação ao tempo (dias) durante a fase 2 nos diferentes ensaios. Legenda: 1 – 1000:0:0 (DQO:N:P); 2 – 1000:5:1; 3 – 1000:5:2; 4 – 1000:10:0; 5 – 1000:10:1; 6 – 1000:10:2; 7 – 1000:15:2; 8 – 1000:20:5; 9 – 1000:50:10; 10 – 1000:130:45.

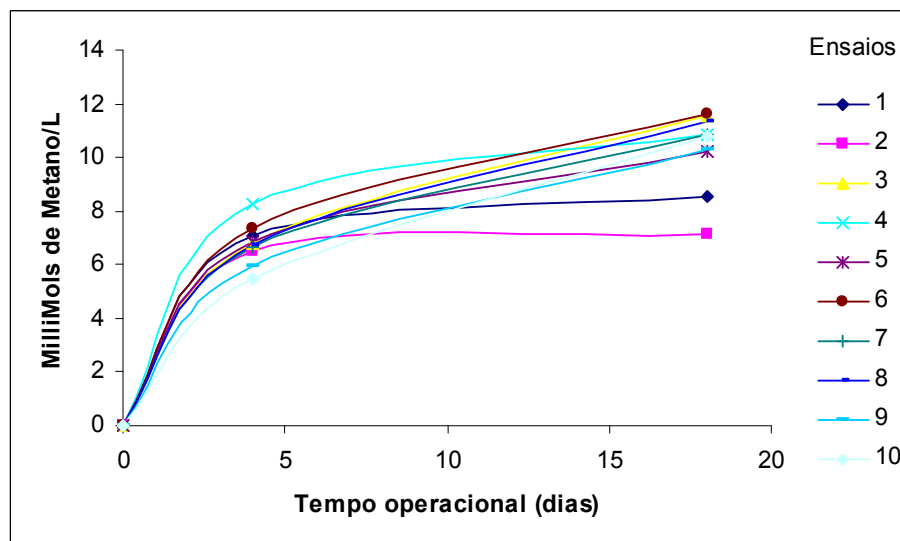


Figura 23: Representação gráfica da variação de valores do gás metano em relação ao tempo (dias) durante a fase 3 nos diferentes ensaios. Legenda: 1 – 1000:0:0 (DQO:N:P); 2 – 1000:5:1; 3 – 1000:5:2; 4 – 1000:10:0; 5 – 1000:10:1; 6 – 1000:10:2; 7 – 1000:15:2; 8 – 1000:20:5; 9 – 1000:50:10; 10 – 1000:130:45.

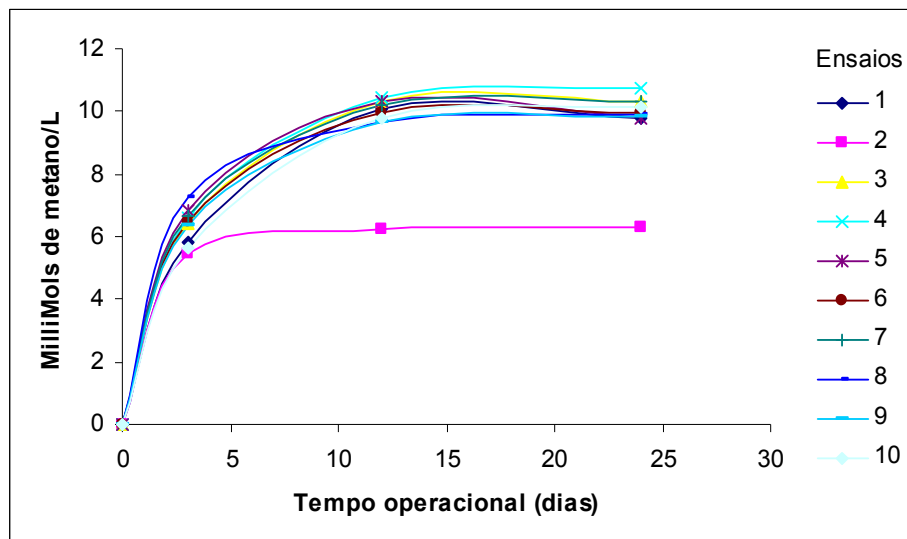


Figura 24: Representação gráfica da variação de valores do gás metano em relação ao tempo (dias) durante a fase 4 nos diferentes ensaios. Legenda: 1 – 1000:0:0 (DQO:N:P); 2 – 1000:5:1; 3 – 1000:5:2; 4 – 1000:10:0; 5 – 1000:10:1; 6 – 1000:10:2; 7 – 1000:15:2; 8 – 1000:20:5; 9 – 1000:50:10; 10 – 1000:130:45.

Tabela 21: Valores dos ácidos orgânicos voláteis ao final da fase 3 de operação.

Amostra Fase 3	Acético mg.l^{-1}	Propiônico mg.l^{-1}	Isobutírico mg.l^{-1}	Butírico mg.l^{-1}	Isovalérico mg.l^{-1}	Valérico mg.l^{-1}	Caprótico mg.l^{-1}
0:0	112,6	3,5	0,7	1,9	2,7	nd	nd
5:1	481,7	4,0	0,8	0,7	3,9	nd	nd
5:2	nd	6,9	nd	0,06	nd	nd	nd
10:0	5,0	5,0	nd	0,6	nd	0,03	0,2
10:1	5,0	6,0	nd	4,2	nd	nd	nd
10:2	nd	7,2	nd	nd	nd	nd	nd
15:2	nd	2,5	nd	2,6	nd	nd	0,3
20:5	3,3	8,4	nd	0,2	nd	nd	nd
50:10	nd	7,6	nd	nd	nd	nd	nd
130:45	2,9	7,6	1,2	nd	1,6	nd	nd

nd = não detectado

Tabela 22: Valores dos ácidos orgânicos voláteis ao final da fase 4.

Amostra Fase 4	Acético mg.l ⁻¹	Propiônico mg.l ⁻¹	Isobutírico mg.l ⁻¹	Butírico mg.l ⁻¹	Isovalérico mg.l ⁻¹	Valérico mg.l ⁻¹	Capróico mg.l ⁻¹
0:0	4,8	4,6	nd	nd	nd	nd	nd
5:1	383,0	3,7	0,1	0,1	2,0	nd	nd
5:2	19,8	1,3	nd	2,2	nd	0,5	1,2
10:0	5,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10:1	3,9	nd	nd	4,0	nd	nd	nd
10:2	2,9	5,2	nd	nd	nd	nd	nd
15:2	4,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
20:5	3,2	4,2	nd	nd	nd	nd	nd
50:10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
130:45	9,1	23,6	nd	1,3	nd	3,3	9,3

nd = não detectado

Tabela 23: Concentrações teóricas de PCP_{inicial}, PCP_{final}, 2,4,6 TCP, 2,3 DCP e 2,6 DCP determinados após as 4 fases operacionais.

Fases	PCP inicial*				PCP final				2,4,6 final				2,3 final				2,6 final			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1000:0:0	1,0	1,0	0,72	0,92	1,0	1,3	0,3	0,3	nd	nd	nd	1,2	0,57	nd	nd	0,24	nd	nd	nd	nd
1000:5:1	1,0	1,0	0,72	0,92	1,3	1,3	0,78	0,83	nd	nd	Nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1000:5:2	1,0	1,0	0,72	0,92	0,8	1,2	nd	nd	0,35	1,3	0,9	1,3	0,9	nd	nd	nd	nd	nd	0,38	nd
1000:10:0	1,0	1,0	0,72	0,92	0,5	nd	0,09	nd	0,64	1,26	1,5	0,9	0,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1000:10:1	1,0	1,0	0,72	0,92	1,2	nd	0,07	nd	1,25	1,5	1,5	0,9	0,9	nd	nd	nd	0,3	nd	0,3	nd
1000:10:2	1,0	1,0	0,72	0,92	1,0	nd	nd	nd	1,11	1,3	0,9	1,3	0,9	nd	nd	nd	0,4	nd	0,30	nd
1000:15:2	1,0	1,0	0,72	0,92	1,0	nd	nd	nd	1,32	1,4	0,96	1,4	0,96	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1000:20:5	1,0	1,0	0,72	0,92	0,9	0,06	nd	nd	1,13	1,29	1,0	1,29	1,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1000:50:10	1,0	1,0	0,72	0,92	1,0	nd	nd	nd	1,19	nd	nd	1,19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,81	nd
1000:130:45	1,0	1,0	0,72	0,92	1,2	1,0	nd	nd	0,3	1,29	0,88	1,29	0,88	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Controle	1,0				1,2		0,63	nd			nd		nd	nd		nd				nd

- a concentração foi medida apenas no frasco mãe

Tabela 24: Valores de N-NH₄, determinados ao final de cada experimento.

	Fase 1 mg.l ⁻¹	Fase 2 mg.l ⁻¹	Fase 3 mg.l ⁻¹
1	0	0	0
2	0,5	1	0
3	0,6	0	0
4	1,6	1,6	2
5	1,6	1,6	1,4
6	2,0	1,7	0,1
7	5,3	3,8	1,6
8	8,3	6,4	4,6
9	31,5	30,6	8,6
10	80,0	70,2	43,4

Tabela 25: Valores de P, determinados ao final de cada experimento

	Fase 1 mg.l ⁻¹	Fase 2 mg.l ⁻¹	Fase 3 mg.l ⁻¹	Fase 4 mg.l ⁻¹
1	2,7	3,7	3,6	2,9
2	3,2	4,0	3,9	2,8
3	3,2	3,5	4,2	3,9
4	2,7	3,7	3,7	3,2
5	2,9	4,6	3,1	3,3
6	3,2	4,0	3,7	4,0
7	3,2	3,9	3,1	4,1
8	4,2	5,5	5,7	4,8
9	5,8	9,5	8,9	8,6
10	12,6	22,2	28,7	22,5

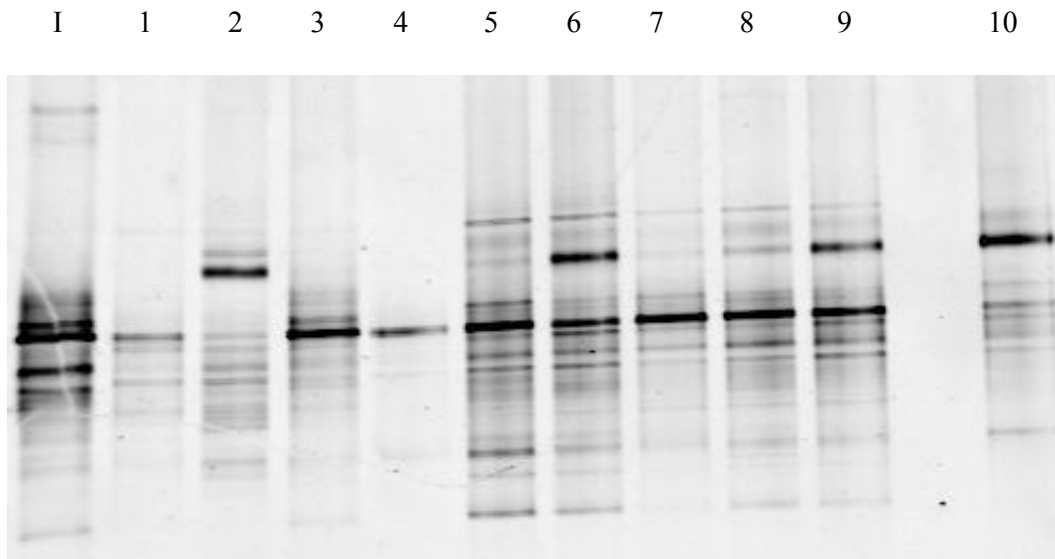


Figura 25: Fotos do gel de DGGE. Produtos de PCR usando primers do Domínio *Bacteria*, com gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda: I-Inóculo; 1 –1000:0:0 (DQO:N:P); 2 – 1000:5:1; 3 – 1000:5:2; 4 – 1000:10:0; 5 – 1000:10:1; 6 – 1000:10:2; 7 – 1000:15:2; 8 – 1000:20:5; 9 – 1000:50:10; 10 – 1000:130:45.

5.7 Operação do RAHLF

5.7.1 Inoculação

A inoculação dos reatores anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) foi concluída após o bombeamento em circuito fechado, durante 72 horas, do sedimento enriquecido em meio mineral Biota. A massa de lodo retida no sistema foi avaliada pela diferença de massa presente no frasco de alimentação anteriormente ao início do processo a após o período de alimentação. A concentração de biomassa imobilizada no RAHLF 1 foi de 736 mg SSV.L⁻¹, (886 mg SSV.L⁻¹ inicial - 150 mg SSV.L⁻¹ final no frasco reator). A quantidade de biomassa imobilizada no RAHLF 2 foi em torno de

1.119 mg STV.L⁻¹. Ao final dos procedimentos de inoculação os reatores ficaram visualmente homogêneo (de coloração preta por inteiro) com intensidade mais acentuada no primeiro terço do reator, como pode ser observado na Figura 26.

A inoculação de sistemas anaeróbios com lodo de unidades de tratamento anaeróbio de resíduos tem sido realizada através de contato direto com o material suporte por período de 24 horas, como indicado nos trabalhos de Foresti et al., 1995, Damianovic, 1997 e Nardi, 2002. Entretanto, alguns trabalhos utilizam o processo de recirculação quando o inóculo utilizado é oriundo de amostras ambientais (Saia, 2005), necessitando de um maior aproveitamento da biomassa presente sob condições controladas de anaerobiose. Essa técnica também foi adotada quando se inoculou culturas purificadas no RAHLF. Gusmão et al. (2007) inocularam o RAHLF com cultura purificada desnitrificante para avaliação da biodegradação do composto BTEX. A eficiência média de remoção do BTEX foi de 98,8%. Estes autores comprovaram a eficiência da técnica de inoculação de reatores anaeróbios.



Figura 26. Reatores anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) inoculado, por bombeamento em circuito fechado, durante 72 horas, do sedimento enriquecido em meio mineral Biota.

No presente trabalho, após a inoculação, amostras de espumas foram retiradas dos pontos 1, 3 e 5 do RAHLF 1 e ponto 3 do RAHLF 2 para exames microscópicos. No RAHLF 1 foram observadas morfologias de bacilos curvos, finos e curvos, espessos e retos, cocos, filamentos finos longos, sarcinas não fluorescentes conforme visualizadas na Figura 27. No ponto 3, a morfologia semelhante ao gênero *Methanosarcina* não foi encontrada, e a amostra revelou predomínio de cocos e bacilos. As diferentes morfologias encontradas podem ser visualizadas na Figura 28. As amostras examinadas do ponto 5 apresentaram menor incidência de tipos microbianos, revelando aglomerados com cocos e bacilos. Algumas morfologias encontradas são visualizadas na Figura 29.

Na análise microbiológica dos microrganismos imobilizados na espuma de poliuretano após procedimento de inoculação do RAHLF 2, aponta para o predomínio de cocobacilos. Também foram detectadas morfologias de bacilo com extremidade arredondada, bacilos finos e curvos, como visualizado na Figura 30. A diferença das comunidades microbianas presentes no RAHLF 1 e no RAHLF 2 após os processos de inoculação foi visível e em conjunto com as diferentes relações nutricionais e distintas metodologias empregadas para a partida dos reatores resultou em distintas eficiência de partida, como discutido no item 5.7.2.

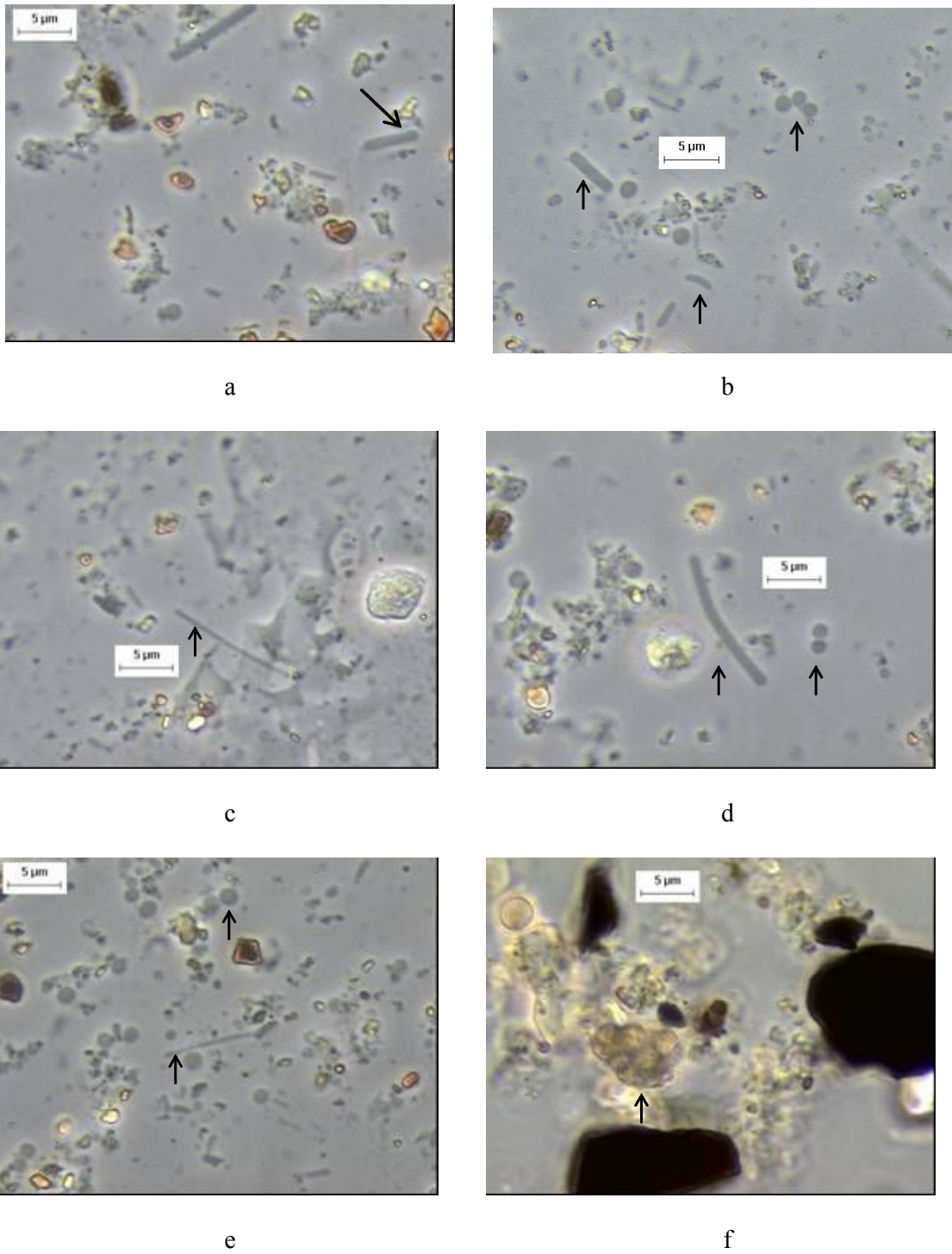
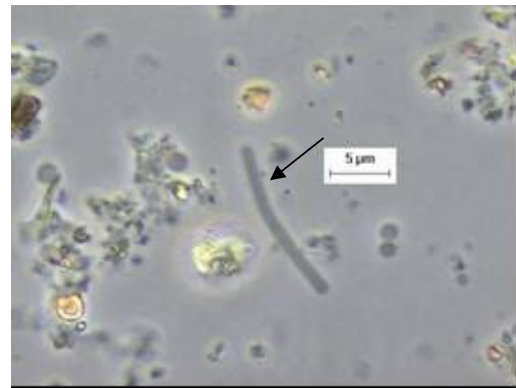


Figura 27: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 1 do reator: a) bacilos retos com extremidade arredondada; b) bacilos retos, bacilos curvos e cocos; c) filamento fino; d) cocos e filamentos curvos; e) cocos, filamentos finos e bacilos pequenos; f) morfologia semelhante ao gênero *Methanosarcina* sp.



a



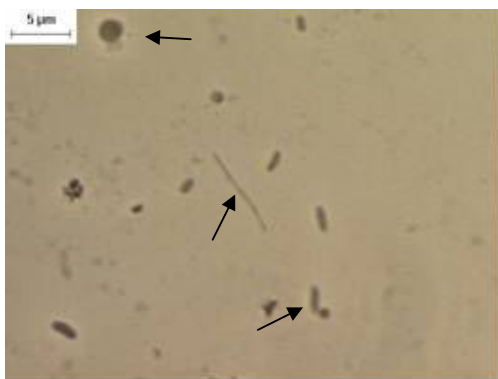
b



c



d



e



f

Figura 28: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 3 do reator: a) bacilos com inclusões; b) bacilos curvos grande com extremidade arredondada e cocos; c) bacilos curvo segmentado com comprimento de 12 μm e bacilos pequenos de comprimento aproximado de 2 μm ; d) aglomerado de cocobacilos, bacilos e cocos; e) filamento fino, bacilo pequeno reto, bacilo pequeno curvo e cocos; f) morfologia semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp., cocos e bacilos pequenos.

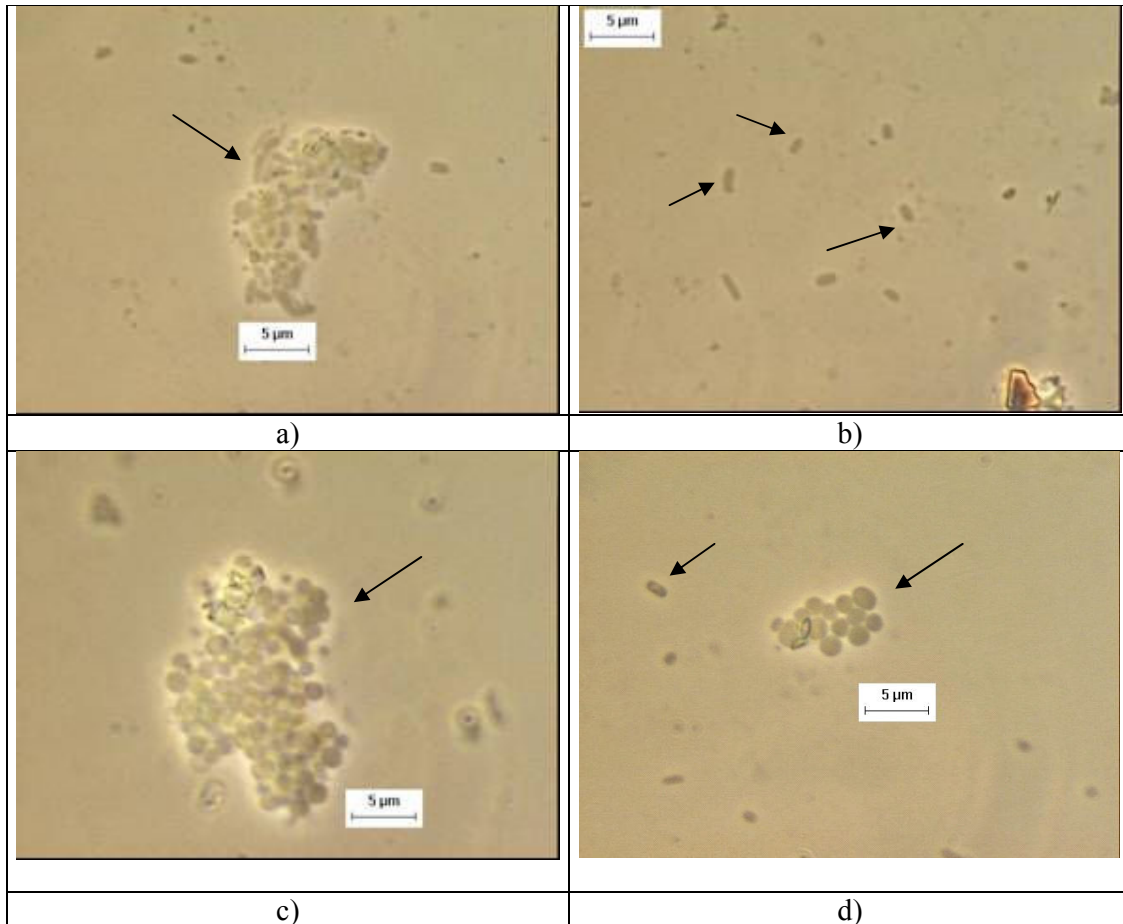


Figura 29: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 5 do reator: a) aglomerado de bacilos e cocos; b) cocobacilos; bacilos retos e bacilos curvos; c) cacho de cocos; d) cocos grandes e bacilos pequenos

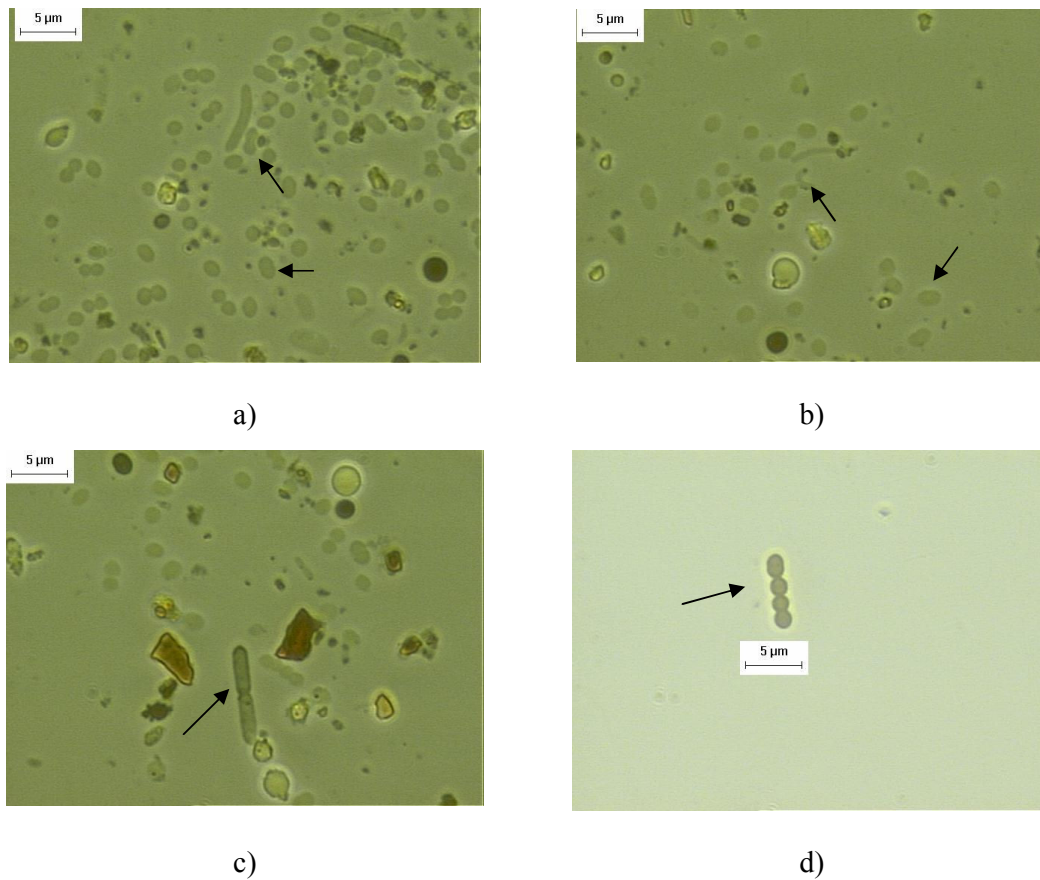


Figura 30: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 3 do RAHLF 2: a) aglomerado de cocobacilos; b) cocobacilos e bacilo fino curvo; c) bacilos com extremidade arredondada; d) cocobacilos enfileirados.

5.7.2 Estratégias de Partida

O desenvolvimento da comunidade microbiana metanogênica ao longo do reator foi observado após 20 dias de alimentação com meio mineral Biota nas relações nutricionais C:N:P (DQO:N:P) de 1000:130:45 para R1 e 1000:10:1 para R2, sendo fontes de carbono a glicose e o formiato. Apesar de as arqueias metanogênicas não estarem diretamente relacionadas com a descloração da molécula de PCP, esta estratégia foi empregada pelo fato deste importante grupo microbiano anaeróbio ser membro obrigatório do consórcio microbiano, participando ativamente no consumo de subprodutos da degradação do PCP e das demais fontes de carbono fornecidas. Além disto, este grupo é altamente sensível aos clorofenóis (WU et al., 1993), e assim, se a inibição dos microrganismos metanogênicos é evitada, a integridade do consórcio microbiano anaeróbio é favorecida (TARTAKOVSKY et al., 2000).

Após o período de 20 dias de operação, duas diferentes estratégias foram adotadas para a partida dos reatores RAHLF 1 e 2. Na partida do RAHLF 1, optou-se por acrescentar o PCP na concentração de 10,0 mg. L⁻¹. Nas condições operacionais a carga de PCP aplicada ao lodo biológico foi da ordem de 5mgPCP/gSTV. Nos primeiros 28 dias após aplicação do PCP, o processo anaeróbio de degradação da matéria orgânica, com eficiência média de 81 ± 9% (Figura 31) e valores do gás metano no biogás da ordem de 46 ± 9%, resultou na manutenção da atividade microbiana. A remoção de PCP foi de 100% nesse período, provavelmente em função do processo de adsorção do composto pelo material suporte utilizado na imobilização dos microrganismos, caracterizado por alta porosidade (92%). Siahpush et al. (1992)

indicaram que essa característica do suporte aumentou o tempo de retenção do composto no reator e favoreceu a biodegradação dos clorofenóis. Duff et al. (1995), da mesma forma, constataram a importância da bioadsorção como mecanismo de remoção de clorofenóis no período que precedeu a atividade de descloração, e Kennedy et al. (1992) relataram adsorção de clorofenóis nos grânulos do reator UASB, seguindo a isoterma de Freundlich.

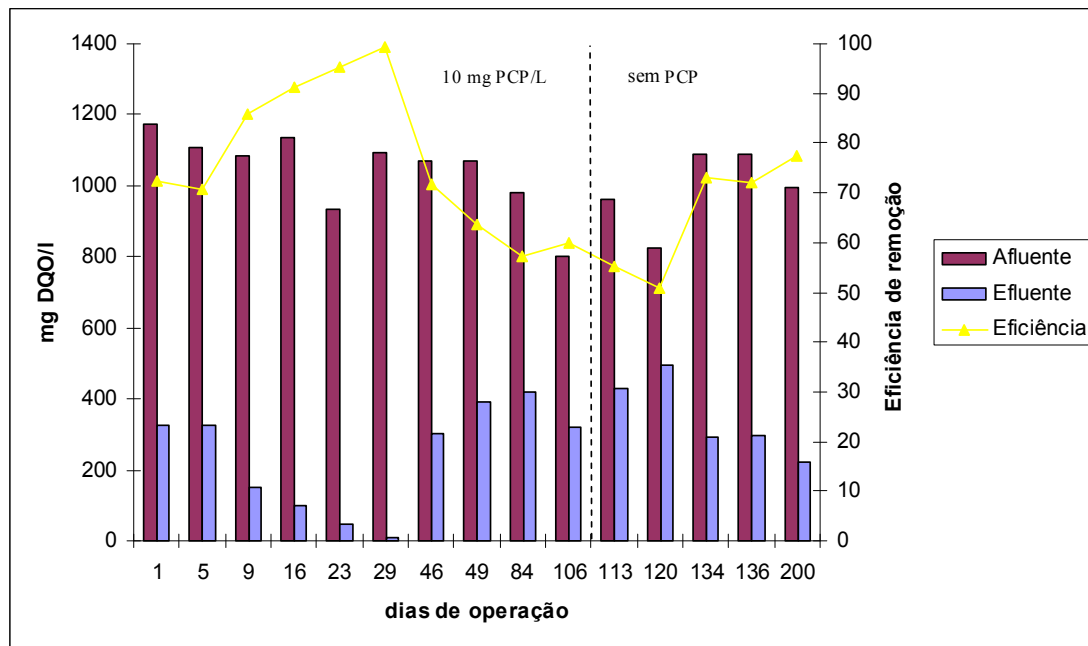


Figura 31: Representação gráfica da variação temporal dos valores da Demanda Química de Oxigênio (DQO) no afluente e efluente e eficiência de remoção.

Após 28 dias do início da adição de PCP, quando a pluma de adsorção atingiu o final do reator saturando a biomassa imobilizada total, a concentração de PCP no efluente do reator se igualou ao afluente, e permaneceu assim até o 103º dia após a adição do PCP. Nesse período, foi realizado o estudo de adsorção do PCP na biomassa

do reator, apresentado no item 5.5.1 do capítulo resultados e discussão. Nessa fase, constatou-se que a remoção do composto foi pequena, atingindo não mais que 3% de eficiência (Figura 32). Nesse mesmo período, a eficiência de remoção da matéria orgânica decresceu de 99 para 60%, com valores de ácido acético acumulados no efluente da ordem de 324 mg.L⁻¹. A produção de metano caiu de 20 mmoles de metano/L para 11 mmoles de metano/L após a adição do PCP no 106º dia. Neste dia, as análises de ácidos orgânicos por cromatografia indicaram a presença no efluente do sistema de 356,17 mg.L⁻¹ de ácido acético, 7,25 mg.L⁻¹ de propiônico e traços de ácidos butírico e isovalérico, o que justificou a queda da atividade metanogênica no sistema. Não foi detectado aumento do pH no afluente do sistema, devido ao tamponamento do meio de cultivo com bicarbonato de sódio.

Portanto, a saturação da biomassa com o PCP afetou a metanogênese do sistema, como demonstrado pela diminuição da produção de metano, pela alteração da comunidade microbiana do Domínio *Bacteria* e pelo acúmulo do ácido acético, em geral removido pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas. Saia (2007), ao utilizar sedimento coletado no mesmo local do presente trabalho como inóculo em um sistema RAHLF em seus estudos sobre degradação do PCP, determinou o predomínio das acetoclásticas *Methanosarcina* e *Methanosaeta* no sistema. O exame microscópico do inóculo estudado na presente investigação detectou morfologias semelhantes ao gênero *Methanosarcina*, porém não fluorescentes (item 5.7.1). Vários trabalhos na literatura relataram a toxicidade do PCP a grupos microbianos anaeróbios, tais como os de Piringer e Bhattacharya (1999) que constataram a inibição de um sistema acidogênico anaeróbio alimentado com glicose e 10 mg. L⁻¹ de PCP, Bhattacharya & Jin (1996), os quais observaram inibição reversível da metanogênese de uma cultura enriquecida com ácido acético na concentração de 1,9-2 g. L⁻¹ de SSV e 5 mg. L⁻¹ de PCP, e Ribarova et

al. (2002) que também verificaram a inibição da desalogenação do PCP quando 19 mg. L⁻¹ do composto foi acrescido ao meio de reação. No Brasil, o trabalho de Montenegro et al. (2001) descreveu a inibição da metanogênese em reator híbrido alimentado com 15 mg. L⁻¹ de PCP. Os resultados adquiridos pelo presente trabalho, corroboram com os apontados pelos trabalhos citados, pois a diversidade bacteriana metanogênica foi afetada com a exposição dos microrganismos autóctones não adaptados a concentração de 10,0 mg PCP.L⁻¹, resultando na inibição da atividade microbiana metanogênica.

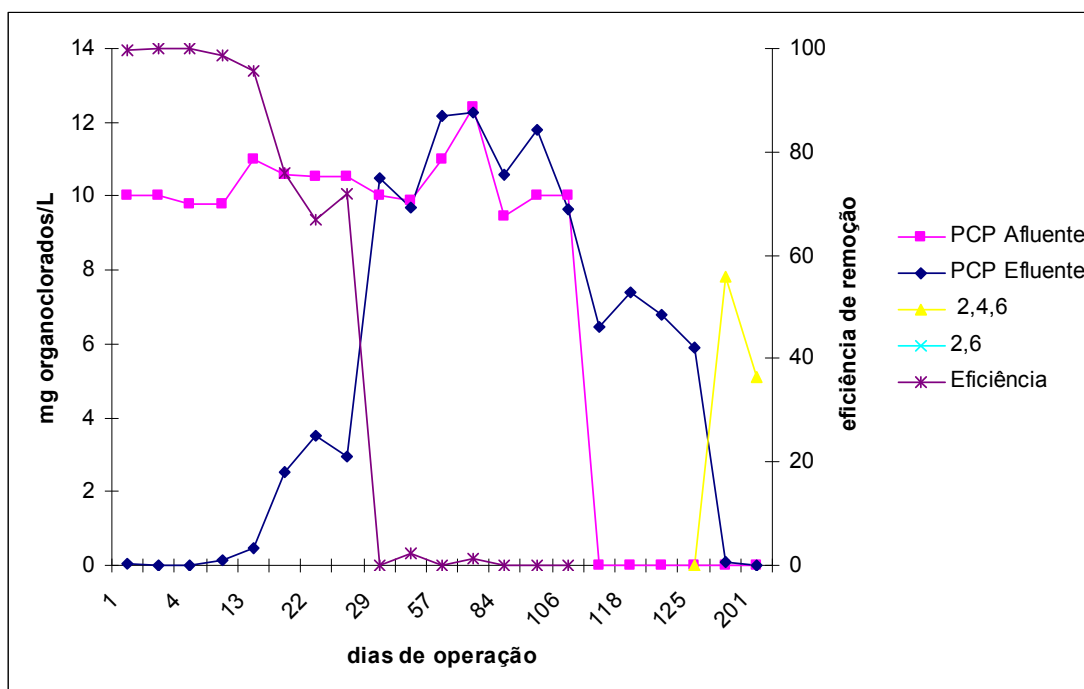


Figura 32: Variação temporal da concentração de PCP no afluente, PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP no efluente e da eficiência de remoção do PCP durante o período de partida do RAHLF 1.

Os resultados obtidos por Saia (2005), que operou um RAHLF sob condições nutricionais e de inóculo semelhantes às do presente trabalho mostraram eficiência de remoção de PCP na faixa de 99%, com detecção de traços de compostos intermediários menos clorados. Muito provavelmente, as diferenças nos resultados obtidos nos dois experimentos puderam ser relacionadas às diferentes estratégias adotadas na partida e

operação do reator. Saia (2005) iniciou a operação do RAHLF com carga de 5 mg. L⁻¹ de PCP, aumentando gradativamente sua concentração. A autora também utilizou como fonte de carbono somente glicose (1000 mg. L⁻¹) e adicionou 0,02% de extrato de levedura durante o enriquecimento do inóculo e operação do reator, enquanto que no presente trabalho empregou-se glicose (500 mg. L⁻¹) e formiato (500 mg. L⁻¹) como fontes de carbono.

O composto extrato de levedura parece ser um fator acelerador na degradação de compostos fenólicos. Baraldi (2001) também notou a necessidade da adição de extrato de levedura para garantir uma rápida eficiência de remoção do PCP. Maitinguer (2004) estudou a degradação anaeróbia de fenol (250 mg. L⁻¹) e verificou que a adição de extrato de levedura foi primordial para degradação anaeróbia destes compostos.

O extrato de levedura é um produto solúvel em água que provém de células de leveduras autolizadas. A composição química principal da levedura é seu teor protéico que varia de 35-56% e sua excelente fonte de nitrogênio. A proteína da levedura é composta de aminoácidos essenciais. Evitou-se a adição do extrato ao meio experimental do presente trabalho, pois alteraria o controle de nutrientes obrigatórios nas condições experimentais.

O baixo desempenho do RAHLF 1 na redução da matéria orgânica e na degradação de PCP corrobora com os resultados obtidos no ensaio nutricional conduzido em reator semi-contínuo, no qual a relação DQO:N:P de 1000:130:45, a mesma imposta para operar o RAHLF 1, selecionou um menor número de espécies microbianas e resultou em maior tempo necessário de adaptação para o início de degradação do PCP (item 5.6). Portanto, um dos prováveis motivos para lentidão na partida do reator RAHLF 1 operado com concentração inicial de 10mgPCP.L⁻¹, com

relação à degradação de PCP, pode ter sido a seleção de microrganismos imposta pela relação nutricional DQO:N:P de 1000:130:45.

Outro possível efeito negativo neste período operacional está relacionado à alteração dos fatores ambientais no reator, principalmente ao pH do afluente, que esteve em torno de 9,0 devido à adição de solução estoque de PCP utilizada naquela etapa. Detectado o problema, o pH da solução foi corrigido. Entre os fatores ambientais relevantes para a metanogênese, o pH é recomendado na faixa de 6,5 a 7,5 (SPEECE, 1996).

Devido à redução da eficiência de remoção da matéria orgânica em 40%, causado provavelmente pela toxicidade do PCP e alterações ambientais no reator, optou-se por operar o reator sem a adição de PCP a fim de verificar se ocorreria recuperação da eficiência. Este procedimento teve duração de 90 dias (Figura 32), período necessário para que a concentração do PCP no efluente ficasse próxima a zero. Durante esse procedimento ocorreu redução da concentração do PCP adsorvido, que provavelmente contribuiu para evitar a falência do reator.

No momento inicial desta fase, a eficiência de remoção da matéria orgânica encontrava-se em 51% (120 dias operacionais), com 291,89 mg. L⁻¹ de ácido acético e 10 mg. L⁻¹ de ácido propiônico e 6,8 mg. L⁻¹ de PCP presentes no efluente do reator. O perfil analítico realizado no 117^o dia de operação, de acordo com o método descrito no item 5.5.1.2 do capítulo Material e Métodos, detectou aproximadamente 3,8; 4,5; 5,2; 6,4 e 9 mg PCP.g_{espuma}⁻¹ em amostras dos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator, respectivamente. Destaca-se que os valores do composto clorado aumentaram no sentido do fluxo do reator. Estes resultados apontam para uma lavagem do reator demonstrando que a estratégia adotada conduziu a redução da concentração do PCP na biomassa imobilizada, como se pode observar na Figura 33 e Tabela 26.

Após a alimentação contínua com o meio Biota sem PCP, a concentração de PCP no afluente do reator foi diminuindo, e no 197º dia de operação obteve-se 0,1 mg. L⁻¹ de PCP e 7,83 mg. L⁻¹ de 2,4,6 TCP, indicando a ocorrência da biodegradação do PCP (Tabela 26, Figura 33). Aos 200º dias de operação, o PCP não foi detectado no efluente, e 5,10 mg de 2,4,6 TCP foi encontrado. Neste momento, a eficiência de remoção da matéria orgânica em termos de valor de DQO removida estava em 77,5% (Figura 31) e a produção de metano em 20 mmoles/L, representando 48% da atmosfera do reator. Estes resultados apontaram para a recuperação do reator. Assim, uma nova fase foi iniciada com o retorno da adição do composto clorado em valores menores, em torno de 5,0 mg. L⁻¹.

Tabela 26: Valores do PCP (mg/g) adsorvido na biopartícula e presente na fase líquida ao longo do reator no 117º dia de operação.

	Líquido (mg. L ⁻¹)	Espuma (mg. g ⁻¹)
P1	4,05	3,79
P2	5,63	4,56
P3	8,54	5,2
P4	6,36	6,4
P5	8,31	9

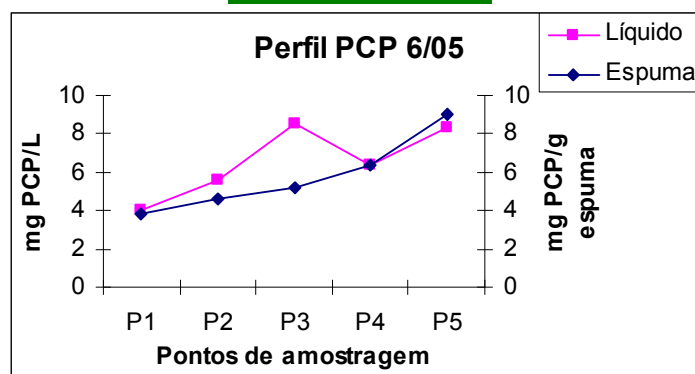


Figura 33: Representação esquemática da variação espacial da massa de PCP adsorvido na biopartícula e presentes na fase líquida em cada seção do reator no 117º dia de operação.

Os resultados desta fase indicaram que o PCP foi convertido principalmente no composto 2,4,6 TCP, indicando a desalogenação na posição 3-meta do anel aromático, similar ao observado por Khodadoust et. al. (1997).

A estratégia adotada na partida do RAHLF 1, inibiu comunidade microbiana metanogênica, concordando com Guthrie et al. (1984) e Tiedje et al. (1987). A produção de metano por lodo não aclimatado foi inibida na concentração de 0,2 a 0,4 mg PCP/L (GUTHRIE et al., 1984). Desta forma, a estratégia adotada no presente trabalho, em que PCP foi suprimido do afluente durante 90 dias foi correta, pois além de evitar a falência do sistema, proporcionou tempo necessário para que a comunidade microbiana se adaptar ao composto tóxico. Alguns estudos têm apontado que a capacidade de lodo anaeróbio em degradar compostos tóxicos pode ser aumentada após períodos de adaptação do inóculo de 2 semanas a 6 meses ou mais de aclimatação (HOROWITZ et al., 1983; BUITRÓN; CAPDEVILLE, 1995; BUITRÓN et al., 1998). Durante esta fase ocorre a seleção e multiplicação dos microrganismos especializados ou degradadores (WIGGINGS et al., 1987). Ye e Shen (2004) estudaram a adaptação de lodo anaeróbio a PCP e 2-CP, 3-CP e 4 CP por um período de 100 dias, e apesar do composto PCP ser o mais tóxico, os efeitos de aclimatação ao PCP e 2-CP foram os melhores. Nesse caso, a taxa de degradação destes dois compostos clorofenólicos foi aumentando com o passar do tempo. Estes resultados indicaram que na fase de adaptação a estrutura química dos compostos alvo é um fator decisivo para o ataque microbiano e que quanto mais alta a cloração do composto, mais facilmente ocorre a desalogenação redutiva, resultando aumento na velocidade de degradação. Portanto, a estratégia adotada na partida do RAHLF 1, proporcionou tempo suficiente (120 dias), para que a comunidade microbiana autóctone halofílica sofresse adaptação as condições impostas.

A partida do RAHLF 1 foi considerada lenta, em função do período necessário para recuperação do sistema, durante o qual ocorreu adaptação dos microrganismos em função da disponibilidade gradual do PCP adsorvido durante o período de adição do PCP. Devido aos longos períodos necessários para adaptação das comunidades microbianas anaeróbias alguns compostos tóxicos, em que microrganismos especializados envolvidos no metabolismo de degradação são selecionados, a fase de aclimação é provavelmente o período mais importante do que os curtos períodos onde a biodegradação ocorre (YE; SHEN, 2004).

De acordo com os resultados da partida do RAHLF 1, a estratégia adotada para a partida do RAHLF 2 foi o aumento gradual de concentração do PCP. Esta estratégia tem sido utilizada por outros autores (WU et al., 1993; JUTEAU et al., 1995; DAMIANOVIC, 1997; TARTAKOVISKY et al., 2001; MONTENEGRO et al., 2001; LANTHIER et al., 2005; SAIA et al., 2007) no estudo de degradação de PCP, independentemente do tipo de inóculo e do reator utilizado e parece ser necessária para adaptação da comunidade microbiana, mais especificamente dos grupos metanogênicos sensíveis a compostos xenobióticos (LANTHIER et al., 2005). Wu et al. (1993) operaram um reator UASB por um período inicial de 5 dias sem a adição de PCP. Após este período o composto foi adicionado na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e teve sua concentração gradualmente aumentada para 1,0, 2,0, 2,5, 5,0, 10, 15, 30 e 60 mg.L^{-1} . A eficiência de remoção do PCP variou de 95 a 99% para concentrações superiores a 10 mg.L^{-1} . Esta estratégia permitiu o desenvolvimento de grânulos anaeróbios estáveis na presença do composto tóxico. Damianovic (1997) iniciou a operação do RAHLF com $0,2 \text{ mg PCP.L}^{-1}$ aumentando para 0,4, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$. A estratégia adotada permitiu que o PCP fosse desalogenado em compostos menos clorados e que elevadas taxas de remoção de matéria orgânica total fosse obtida. Saia et al., (2007)

também estudou a degradação do PCP em RAHLF e começou a operação com 5,0 mgPCP.L⁻¹ e aumentou para 13, 15 e 21 mgPCP.L⁻¹. Os autores obtiveram eficiência de remoção de 100% do composto clorado.

No RAHLF 2, iniciou-se a adição do PCP com concentração de 0,5 mg.L⁻¹ por 16 dias. Após este período a concentração do PCP adicionado foi aumentada para 5,0, 10,0 e 12,0 mg.L⁻¹, por 8, 12 e 16 dias de operação cada, respectivamente. Dessa forma, a estratégia de acréscimo gradual de PCP para a partida do reator foi adequada e não provocou inibição da comunidade microbiana metanogênica, como observado na partida do RAHLF 1.

5.7.3 Operação do RAHLF com PCP.

Operação do RAHLF 1

Esta etapa teve duração de 169 dias de operação com adição de 5,0 mg. L⁻¹ de PCP, após o período de adaptação previamente discutido (item 5.7.2). A adição do composto clorado não influenciou a eficiência de remoção da matéria orgânica (análise em DQO) como verificado na Tabela 27 e Figura 34. A eficiência de remoção de DQO manteve-se na faixa de 75 a 80% nos 30 primeiros dias de operação, chegando a 85% em 60 dias e permanecendo nessa faixa até o 168^o dia de operação do reator.

Tabela 27: Valores determinados de DQO no afluente e efluente e eficiência de remoção.

Dias de amostragem	Afluente (mg. L ⁻¹)	Efluente (mg. L ⁻¹)	Eficiência (%)
1	1173	323,6	72
5	1110	323,6	70,8
9	1084	152,0	86,0
16	1134	97,5	91,4
23	934	45,2	95,2
29	1095	7,2	99,3
46	1072	302	71,82
49	1070	389,7	63,58
84	980	417,6	57,39
106	800	321,7	59,79
115	959,8	430	55,15
123	826	496,5	51
137	1091	292	73,18
139	1091	295,6	72,05
202	995,4	223	77,5
203	1019,6	251	75,36
207	872,0	187	78,5
228	1091,0	220	79,8
263	1034,2	161,04	98,44

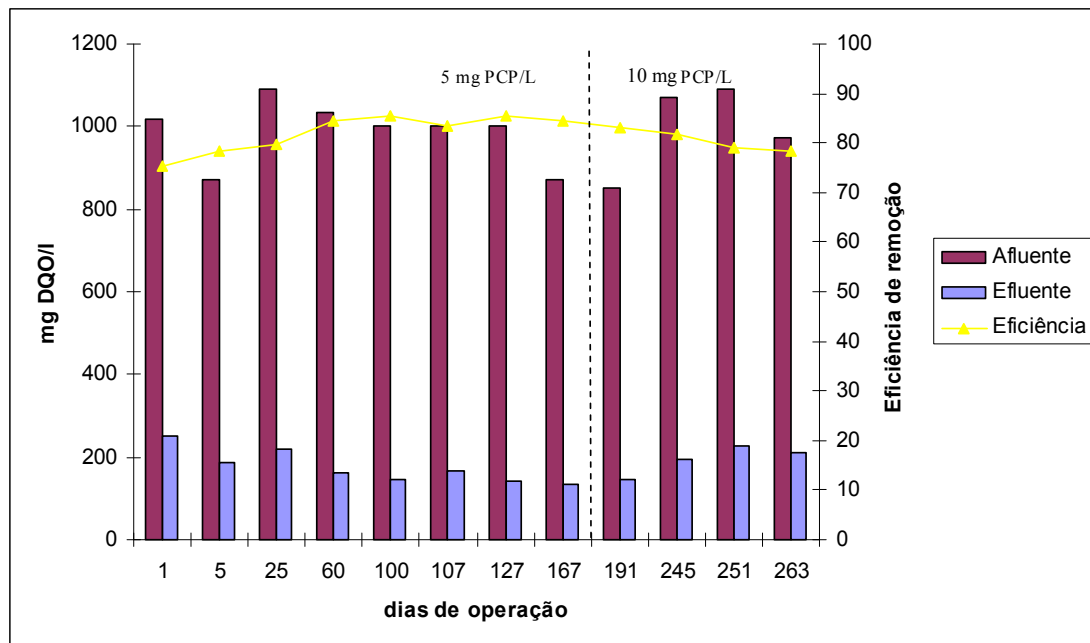


Figura 34: Representação gráfica da variação temporal dos valores de DQO no afluente e efluente e eficiência de remoção.

Na Figura 35 apresenta-se a eficiência de remoção do PCP nesta fase, que variou de 93,4 a 100%. O intermediário principal formado foi o 2,4,6 TCP, com concentração de $1,37 \pm 0,08 \text{ mg. L}^{-1}$ no período entre o 107º e o 140º dia de operação.

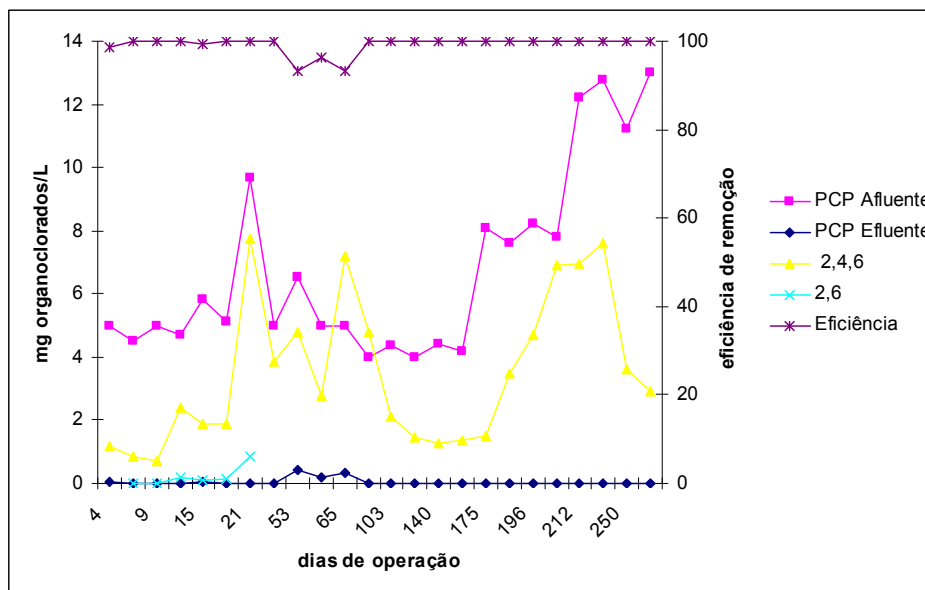


Figura 35: Variação temporal da concentração de PCP no afluente, PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP no efluente e da eficiência de remoção do PCP.

Análises cromatográficas realizadas em amostras retiradas ao longo do comprimento do reator (perfil espacial) no 9º dia operacional evidenciaram a degradação do PCP nos dois primeiros trechos do reator, como pode ser visualizado na Figura 36. Determinou-se a produção do composto 2,4,6 TCP nestes dois pontos, com uma queda na concentração deste intermediário nos trechos subsequentes, possivelmente associada à sua degradação. Traços de 2,6 DCP foram detectados nesta mesma fase. Khodadoust *et. al.* (1997), ao estudar a degradação anaeróbica do PCP em um reator anaeróbico de leito fluidificado, também detectaram a produção de 2,4,6 TCP como intermediário, indicando a desalogenação na posição 3-meta do anel aromático.

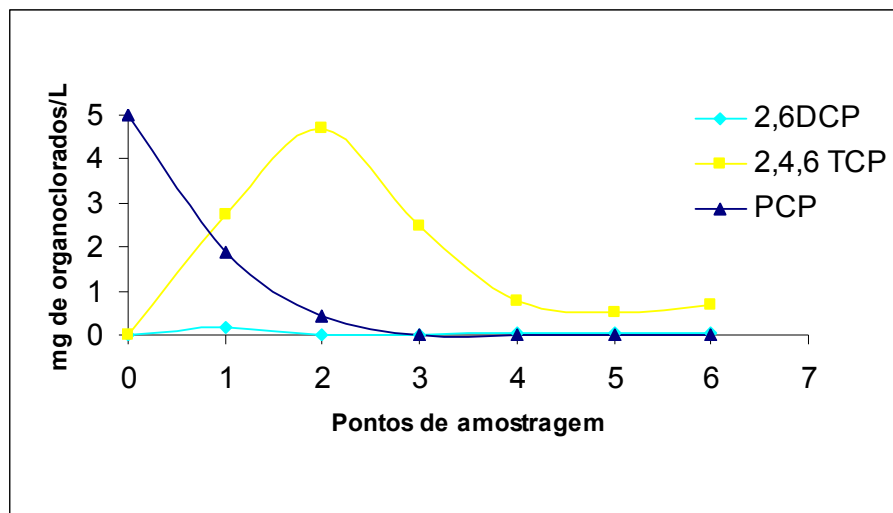


Figura 36: Representação esquemática da variação espacial na concentração de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 5,0 PCP./-1 aplicada no afluente.

O perfil espacial realizado no dia 16º dia operacional também aponta para degradação do PCP nos dois primeiros pontos do reator (Figura 37, Tabela 28). A presença de concentrações elevadas de 2,4,6 TCP no ponto 2 do reator pode ser associada a degradação do PCP preliminarmente adsorvido no sistema. O composto 2,6 DCP foi detectado na faixa de 3,5 mg.L⁻¹ nos pontos 1 e 2. Análise em GC/MS detectou, neste perfil, um composto similar a 2-clorofenol, 3-clorofenol e 4-clorofenol (Anexo 6). Trabalhos na literatura têm sugerido a existência de duas vias de desalogenação do PCP (Dennie et al., 1998). Quando o PCP é inicialmente desclorado na posição *meta* a transformação ocorre pela rota 2,4,6-TCP, 2,6-DCP e 4-CP. Devido a detecção de 2,4,6 TCP e 2,6 DCP nos experimentos em discussão, pode-se concluir que o composto 4-CP é o mais provável para a complementação da seqüência de desalogenação da rota metabólica PCP, 2,4,6 TCP, 2,6 DCP e 4 CP. Khodadoust et al. (1997), ao estudar a desalogenação do PCP obteve resultados similares, como pode ser observado na figura 2 do item 3.3.1 do capítulo revisão da literatura. Não foram

encontrados nesta etapa compostos fenólicos com 4 cloros. De acordo com estes resultados, a degradação inicial do PCP se deu na posição meta do anel aromático.

Análises qualitativas por cromatografia gasosa e espectrômetro de massa também determinaram a presença de fenol, 1 metil benzeno, 1,3 dimetilbenzeno, 1,2,3 trimetilbenzeno, 1,2,4 trimetilbenzeno, e 1,2 ácido benzenodicarboxílico (anexo 7). Segundo Londry e Fedorak (1992), a degradação anaeróbia do fenol tem sido demonstrada através de duas rotas distintas: a rota redutiva, na qual o anel aromático é reduzido, produzindo ciclohexanona como intermediário do metabolismo do fenol, antes da quebra do anel; e a rota do ácido benzóico, em que a carboxilação do fenol ocorre sob condições metanogênicas. A maioria das publicações descreve o ácido benzóico como intermediário na degradação do fenol. Knol e Winter (1987) e Béchard et al. (1990), utilizando espectrômetro de massa, mostraram que o benzoato foi formado a partir do fenol, sob condições metanogênicas. A utilização do cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massa na detecção destes compostos no RAHLF inoculado com sedimento severamente contaminado de uma área estuariana e operado em condições salinas, aponta para uma rota de degradação do PCP, passando por 2,4,6 TCP, 2,6 DCP, 2-CP, fenol, e por compostos associados a rota do benzoato.

Tabela 28: Valores (mg.L^{-1}) de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6DCP presentes na fase líquida ao longo do reator no 16º dia de operação.

Perfil	2,6DCP	2,4,6 TCP	PCP
P1	3,34	5,54	2,76
P2	3,54	10,17	0,03
P3	0,14	6,44	
P4	1,17	3,09	
P5	1,3	2,11	

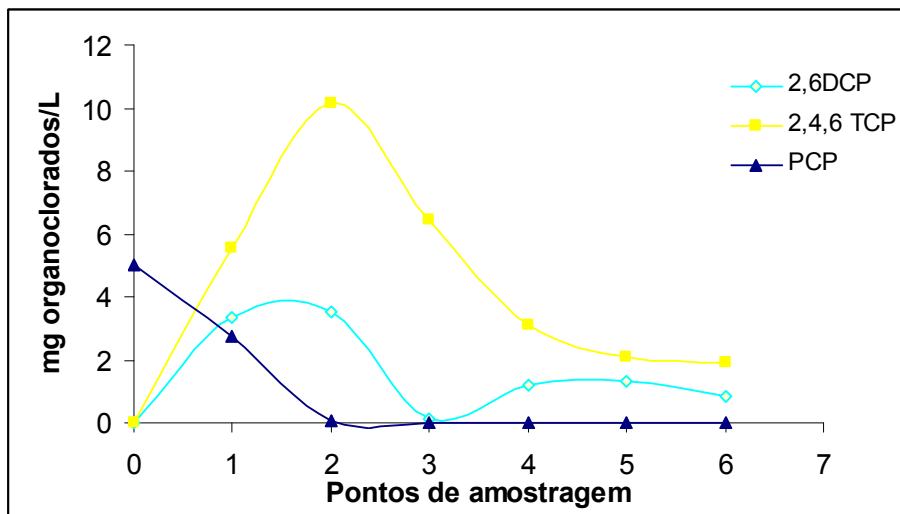


Figura 37: Representação esquemática da variação espacial na concentração de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 5,0 PCP.L⁻¹ aplicada no afluente no 16º dia de operação. Legenda: 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente

A estabilização da eficiência do reator em relação a remoção do PCP (~100%) e 2,4,6 TCP como intermediário predominante no efluente do reator ($1,37 \pm 0,08$ mg.L⁻¹), norteou o aumento da concentração do PCP.

Após a operação do reator com 5,0 mg de PCP.L⁻¹ (fase 1), com elevada eficiência de remoção do composto, a concentração deste foi aumentada para 8,0 ($\pm 0,2675$) mg.L⁻¹ (fase 2). A fase do experimento que compõe esta etapa se iniciou no 170º dia de operação e terminou com 211 dias de operação. O aumento na concentração do composto clorado não influenciou e eficiência de remoção da matéria orgânica (análise em DQO), como verificado na Figura 34. A eficiência manteve-se na faixa de 84% após o aumento de PCP (8,0 mg.L⁻¹). Na Figura 35 observa-se a resposta sobre a eficiência do reator em remover o PCP nesta fase 2 foi de 100%. Após o acréscimo de 8,0 ($\pm 0,2675$) mgPCP.L⁻¹ a concentração deste composto no efluente foi menor do

que o limite de detecção do aparelho ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). A produção do composto 2,4,6 TCP de $1,49 \text{ mg.L}^{-1}$ no 175º dia de operação aumentou para 3,47, 4,7 e $6,92 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente nos 192º, 196º e 202º dias de operação (Figura 35). Estes resultados indicaram o composto 2,4,6 TCP como intermediário preferencial.

Na fase 3, a concentração do PCP/afluente foi em média $12,3 (\pm 0,8037) \text{ mg.L}^{-1}$. A eficiência, que estava na faixa de 84% durante a operação com $8,0 \text{ mgPCP.L}^{-1}$, permaneceu em torno de 80% quando a concentração de PCP afluente do sistema foi de $12,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Esta fase se iniciou no 212º dia operacional e teve duração até 270 dias de operação. Nesta fase (3) a eficiência de remoção do PCP foi de 100%, com formação predominante do intermediário 2,4,6 TCP. A concentração de $6,93 \text{ mg.L}^{-1}$ do 2,4,6 TCP presentes no efluente no 212º dia de operação, manteve-se constante até o 242º dia de operação. A partir do 250º dia, a concentração deste composto diminuiu para $3,61 \text{ mg.L}^{-1}$, e no 268º dia foi detectado $2,89 \text{ mg 2,4,6 TCP.L}^{-1}$ no efluente. Este resultado mostra a capacidade dos microrganismos presentes no reator em transformar o PCP, e uma possível adaptação da comunidade microbiana a presença do composto 2,4,6 TCP presente no sistema desde o início da adição do PCP. Após este período, os microrganismos foram capazes de metabolizar este composto em outros intermediários do processo.

Análises cromatográficas realizadas em amostras retiradas ao longo do comprimento do reator (perfil espacial) no 270º dia operacional evidenciaram a degradação do PCP nos primeiro segmento (L/D 3,3) como pode ser visualizado na Figura 38. A concentração afluente de $13,0 \text{ mg.L}^{-1}$ decaiu para $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no primeiro ponto de amostragem (L/D 3,3) com formação de $7,96 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4,6 TCP. No segundo ponto de amostragem (L/D 6,6) o PCP não foi encontrado e a concentração do 2,4,6 TCP aumentou para $11,4 \text{ mg.L}^{-1}$, evidenciando que este composto foi o principal

intermediário formado na desalogenação anaeróbia do PCP, nestas condições. No terceiro, quarto e quinto pontos de amostragens (L/D de 9,9; 13,2 e 16,5), a concentração do TCP foi de 4,56, 2,55 e 3,0 mg.L⁻¹ respectivamente, demonstrando a capacidade do reator em transformar o triclorofenol. No efluente foram medidos 2,89 mg.L⁻¹ de 2,4,6 TCP. Baraldi (2001) e Damianovic (1997) também estudaram a degradação do PCP em um sistema do tipo RAHLF alimentado com meio de cultivo não salino e constataram que o composto desaparecia na porção inicial do reator (até L/D=4). Baraldi (2001) não detectou nenhum intermediário metabólico, porém Damianovic (1997) identificou compostos como tetra, tri e diclorofenóis tanto na fase líquida, como adsorvido nas biopartículas. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Saia (2005), que detectou a degradação do PCP na primeira sessão (L/D=4) do reator RAHLF operado sob condições salinas. No presente estudo, a diminuição da concentração do composto 2,4,6 TCP ao longo do reator certifica a importância do comprimento do reator na sua aplicação para a degradação dos intermediários metabólicos formados. Análises cromatográficas com espectrômetro de massa também mostraram a presença de compostos benzênicos como 2 metil benzeno, 1,2 dimetilbenzeno e 1,3 dimetilbenzeno, corroborando o modelo de degradação proposto por Zangh e Wiegel (1990) que sugeriram que a desalogenação reductiva necessária para transformar o DCP em CP é precedida de uma carboxilação, que transforma a molécula de fenol em benzoato.

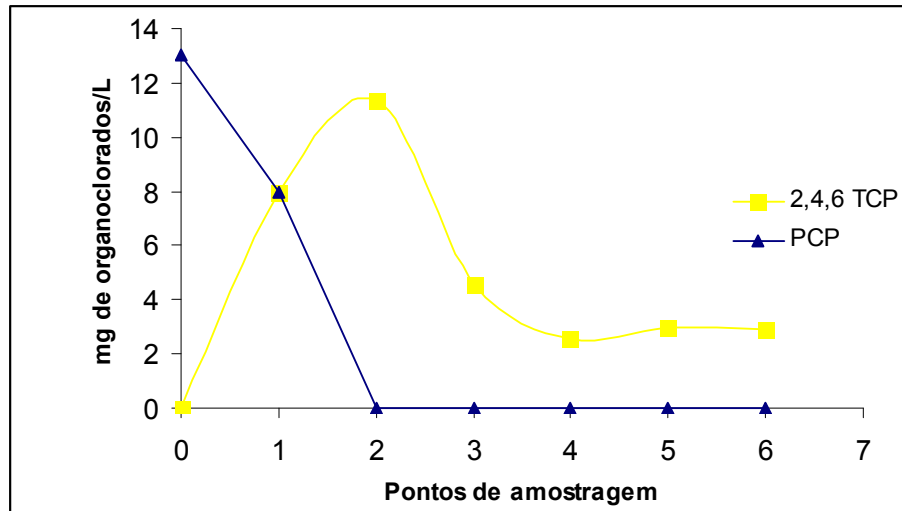


Figura 38: Representação esquemática da variação espacial nas concentrações de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 13,0 PCP./-1 aplicada no afluente no 267º dia de operação. Legenda: 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente.

Os resultados de quantidade de PCP e intermediários menos clorados adsorvidos na biopartícula (material suporte mais espuma) demonstraram a ausência do PCP adsorvido em todos os pontos amostrados, indicando que todo o PCP adicionado no reator foi degradado. O composto 2,4,6 TCP estava presente nas concentrações de 0,49, 0,56, 0,81, 1,83 e 1,62 mg/g_{espuma} nos pontos L/D 3,3, 6,6, 9,9, 13,2 e 16,5, respectivamente (Figura 39). Estes dados apontam para uma degradação total do PCP adsorvido, com formação preferencial de 2,4,6 TCP, considerado tóxico para os microrganismos (KRUMME; BOYD, 1988). Choi, Kim e Sang (2007) estudaram a degradação de 2,4,6 TCP em sistemas de barreiras seqüências em escala laboratorial. Foi relatado que os microrganismos anaeróbios não conseguiram degradar o 2,4,6 TCP na concentrações de 21, 62 e 139 mg.L⁻¹. Os autores associaram este fato a ausência de enzimas para degradar o composto e a toxicidade do 2,4,6 TCP. Krumme e Boyd (1988) relataram que o 2,4,6 TCP é o intermediário metabólico que tem maior poder de inibição de culturas anaeróbias, e o predomínio deste intermediário no efluente do reator é indício de que os microrganismos presentes no RAHLF não foram capazes de

metabolizar totalmente este composto nas condições impostas. No presente trabalho, entretanto, a presença de baixos valores de 2,4,6 TCP no efluente do sistema ao longo dos 268 dias de operação, como observado na Figura 39, demonstrou que a degradação do composto ocorreu após aclimatação da comunidade microbiana.

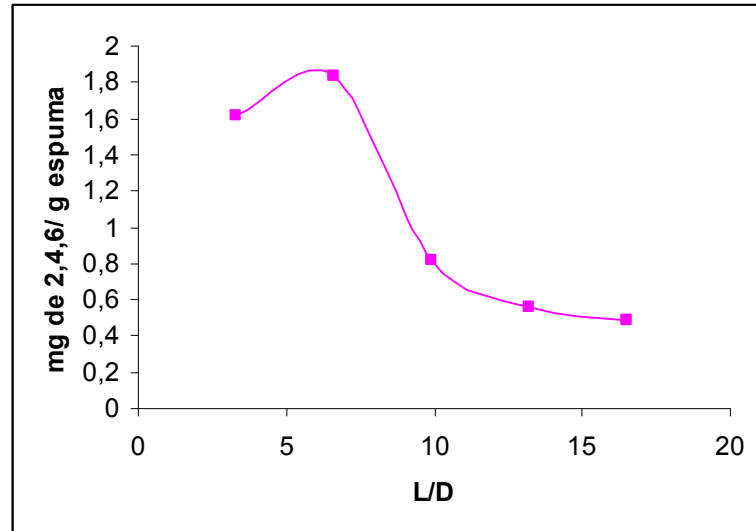


Figura 39: Representação esquemática da variação espacial da massa de 2,4,6 TCP adsorvido na biopartícula do reator no 268º dia de operação.

Os resultados das análises de diversidade microbiana pela técnica do DGGE apontam para uma mudança da comunidade microbiana do Domínio *Bacteria* ao longo do período operacional, como visualizado na Figura 40. Análises comparativas no ponto 3 do reator (L/D 9,9), empregando-se o índice de similaridade proposto por Gillan et al (1998) indicam similaridade de somente 23,5% nos padrões de bandas antes da adição do PCP e após 267 dias de operação do reator na presença do composto clorado. Na comparação do mesmo período no ponto 5 do reator (L/D 16,5), o índice de similaridade foi de 31,5%. Estes resultados corroboram a idéia de que a comunidade

microbiana halofílica proveniente de sedimento estuarino contaminado pertencente ao Domínio *Bacteria* sofreu adaptação às condições impostas.

Os resultados do DGGE do Domínio *Archaea*, não produziram resultados satisfatório devido ao longo tempo de armazenagem das amostras de DNA na geladeira.

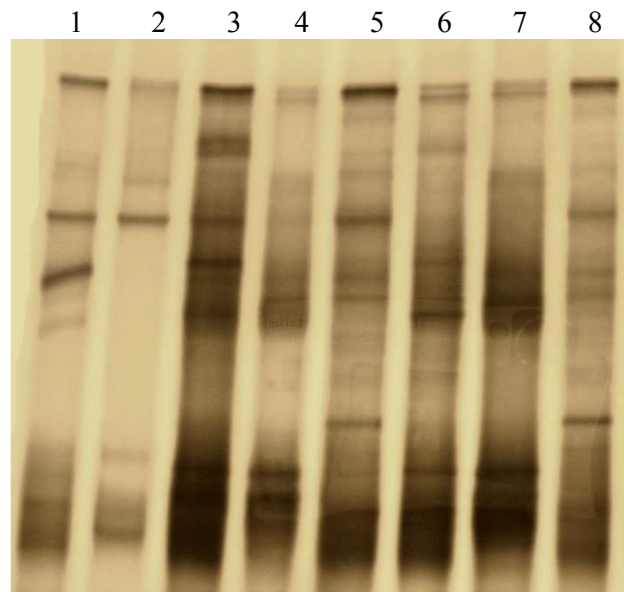


Figura 40: Fotos do gel de DGGE do sistema RAHLF 1. DGGE dos produtos de PCR usando primers do Domínios *Bacteria*, com gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda da Figuras: 1, 2 e 3 – Pontos 1, 3 e 6 do reator antes da adição do PCP e ; 2; 4; 7 – Pontos 1, 3 e 5 do reator após a saturação da biomassa com PCP; 5 e 8 – Ponto 3 e 5, após 267 dias de operação com PCP.

Os exames microscópicos realizados no final da fase 1 ($5,0 \text{ mg PCP.L}^{-1}$) revelaram o predomínio de bacilos reto com extremidade arredondada no ponto 1 do reator, e morfologias de cocobacilos, bacilos curvos e filamentos. No ponto 2 do reator estava presente uma grande quantidade de filamentos finos e morfologias semelhantes a bacilos retos, bacilo curvo e cocos. Na porção final do reator ocorreu o prodomínio de bacilos retos com extremidade arredondada e presença de filamento e cocobacilos. (Figura 41).

Ao final da fase 2 (10,0 mg PCP.L⁻¹), os exames revelaram morfologias como bacilos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. no ponto 1 do reator, bem como bacilos curvos e cocos fluorescentes. As morfologias encontradas podem ser visualizadas na Figura 42. Estes resultados apontam para a modificação da comunidade microbiana predominante no sistema, corroborando os resultados da técnica DGGE, pois nos exames microscópicos antes da adição do PCP (Item 5.7.1) não foram observadas morfologias semelhantes a *Methanobacterium* sp. Além dos bacilos curvos e cocos, também presentes nas amostras no último dia de operação do reator, foram observadas morfologias de bacilos espessos e retos, filamentos finos longos e sarcinas não fluorescentes conforme visualizadas na Figura 27.

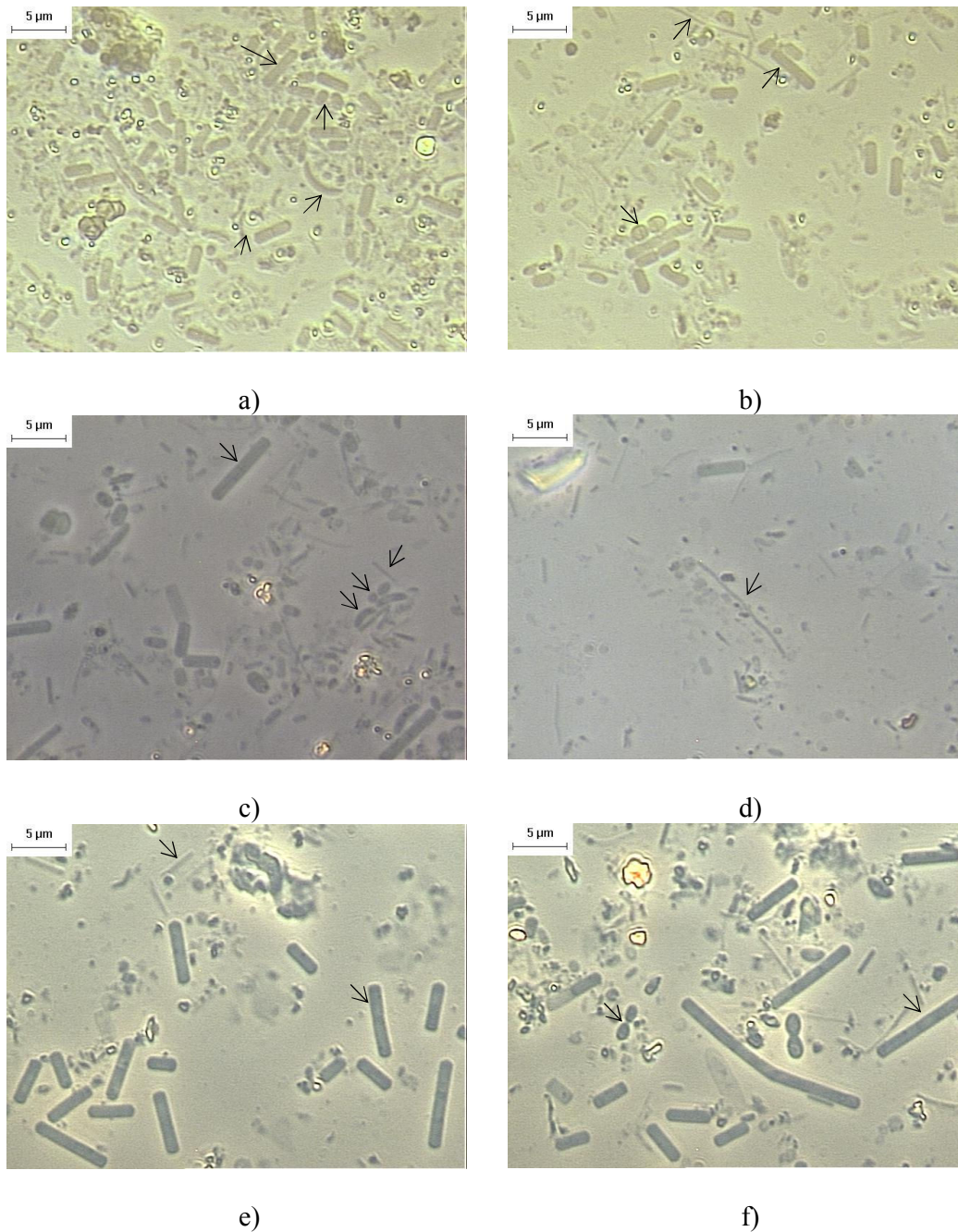


Figura 41: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 1 (a, b), 3 (c, d) e 5 (e, f) do reator ao final da operação com 5mgPCP.L^{-1} : a) bacilos, cocobacilos, bacilos curvos e filamentos b) bacilos reto com extremidade arredondada; filamento e cocobacilos c) bacilos retos, bacilo curvo, cocos, filamentos fino; d) predomínio de filamentos finos e) bacilos retos com extremidade arredondada, filamento; f) bacilos e cocobacilos.

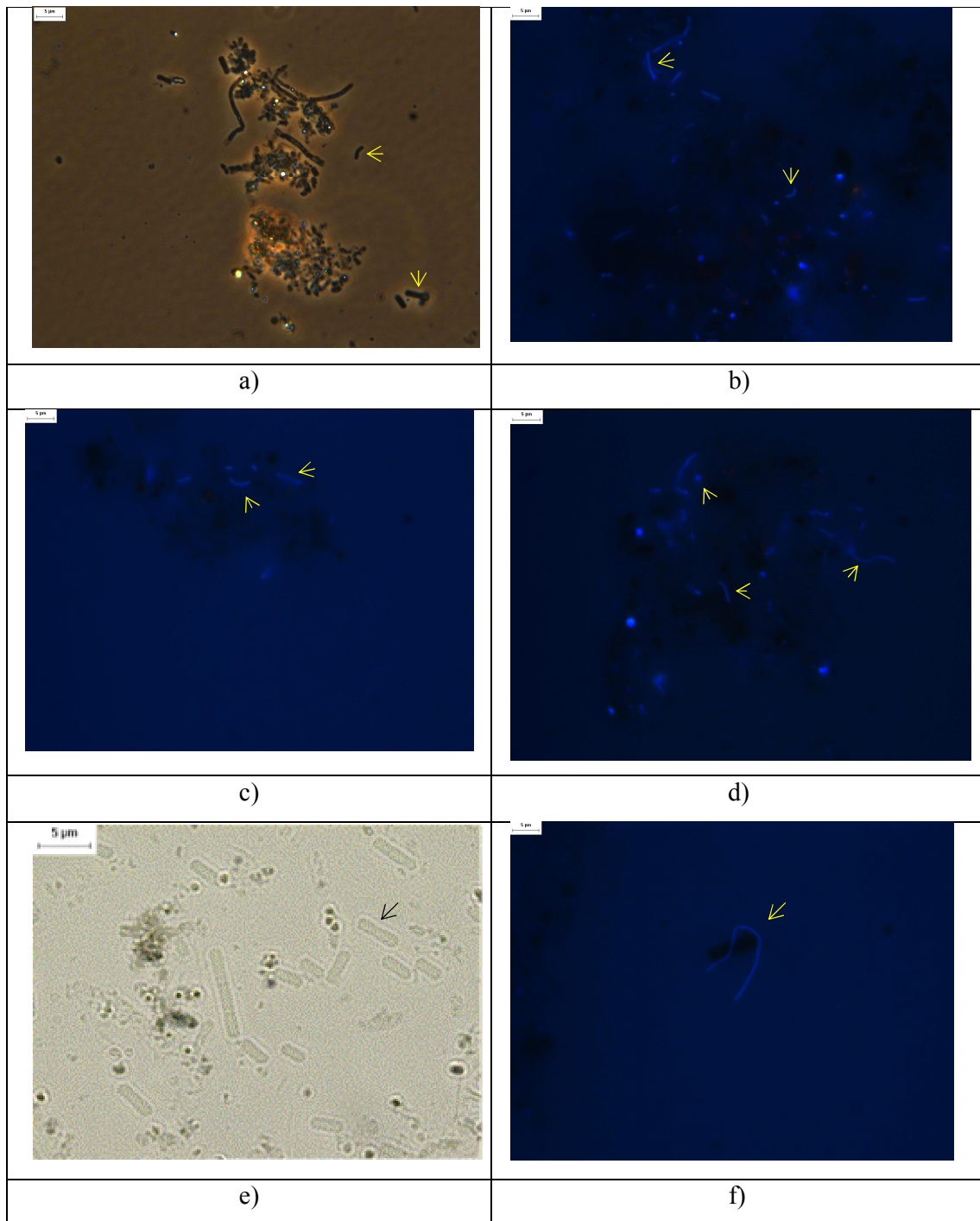


Figura 42: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas do ponto 1 do reator: a) bacilos retos com extremidade arredondada, bacilos curvos; b) bacilos retos e curvos fluorescentes c) bacilos retos e fluorescentes semelhante a *Methanobacterium* e curvos fluorescentes; d) filamentos, bacilos curvos e cocos fluorescentes; e) bacilos retos com extremidade arredondadas; f) filamento fluorescente.

O balanço de massa no reator RAHLF 1, após o período de partida, mostra que do total estimado de 1.955 mg de PCP introduzido no reator, 10,22 mg (0,52%) foi o remanescente determinado no efluente. O composto não ficou adsorvido no sistema, resultando em uma remoção biológica de 1944,78 mg de PCP. Na biopartícula ficaram adsorvidos 22,34 mg de 2,4,6 TCP. Estes resultados demonstraram que o mecanismo principal de remoção foi a biodegradação e não a adsorção. No trabalho realizado por Saia et al. (2007), do total de 1.111 mg de PCP introduzidos no RAHLF, 286,9 mg (25,8%) ficaram adsorvidos na biopartícula, com remoção biológica de 824,83 mg de PCP. Em Damianovic (1997), da quantidade de 242 mg de PCP introduzida no RAHLF no período operacional, determinou-se cerca de 0,5 mg adsorvido na biopartícula (ou 0,2%). Tsuno et al. (1996) reportaram a adsorção de 100g (40%) de PCP em biopartículas de carvão ativado granular durante 375 dias de operação de um reator biológico de leito sob concentração afluente de 400 mgPCP.l^{-1} ($80 \text{ mgPCP.l}^{-1}.\text{dia}$), demonstrando que a adsorção foi um mecanismo significativo na remoção de PCP mas o mecanismo principal de foi a biodegradação. Os resultados deste trabalho foram similares aos obtidos por Damianovic (1997), Wu et al. (1993) e Shen et al. (2005), nos quais a adsorção do composto no lodo granular foi baixa e a biodegradação foi o principal mecanismo de remoção de PCP. Estes resultados indicaram que o RAHLF nas condições operacionais impostas, sob condições metanogênicas, halofílicas e com microrganismos autóctones provenientes de área estuariana severamente contaminada foi capaz de metabolizar a quantidade de PCP imposta (13,58 mg PCP/gSSV).

Operação do RAHLF 2

Na operação do RAHLF 2, a condição nutricional imposta foi balizada nos resultados do ensaio nutricional, onde diferentes relações dos macronutrientes nitrogênio e fósforo, foram estudadas na degradação do PCP. A relação N:P de 10:1 foi escolhida de acordo com a eficiência de degradação o PCP, diversidade microbiana presente e menor taxa nutricional, conforme discutido no item 5.6.

Antes da adição do PCP, o RAHLF 2 foi operado por 26 dias e a eficiência de remoção da matéria orgânica foi de $60,6\% \pm 4,3\%$, nessa fase. Após a introdução gradual da concentração de PCP ($0,5 \text{ mgPCP.L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$, 10 mg.L^{-1} e 12 mg.L^{-1}) nas fases 1, 2 e 3, respectivamente), durante 54 dias, observou-se aumento da eficiência de remoção da matéria orgânica, atingindo 80% no 50º dia operacional ($10,0 \text{ mg PCP.L}^{-1}$), como verificado na Figura 43. A adição do composto clorado não desestabilizou o RAHLF, demonstrando que a estratégia adotado na partida deste reator, permitiu o desenvolvimento de um lodo anaeróbio estável, oriundo de sedimento estuarino contaminado, na presença do PCP.

O período operacional foi dividido em 4 fases em relação à concentração do PCP (Figura 44, Tabela 29). Na fase 1, o reator foi alimentado por 16 dias com $0,6 \pm 0,01 \text{ mg PCP.L}^{-1}$. Durante este período não foi detectado PCP no efluente do reator. A análise de perfil espacial no 16º dia operacional aponta para o desaparecimento do PCP no ponto 3 (L/D 9,9). O composto 2,4,6 TCP foi determinado na concentração de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 45) no ponto 5 do reator, tendo sua origem relacionada à biodegradação do PCP. O composto 2,4,6 TCP não foi encontrado no efluente do reator, certamente devido à atividade microbiana.

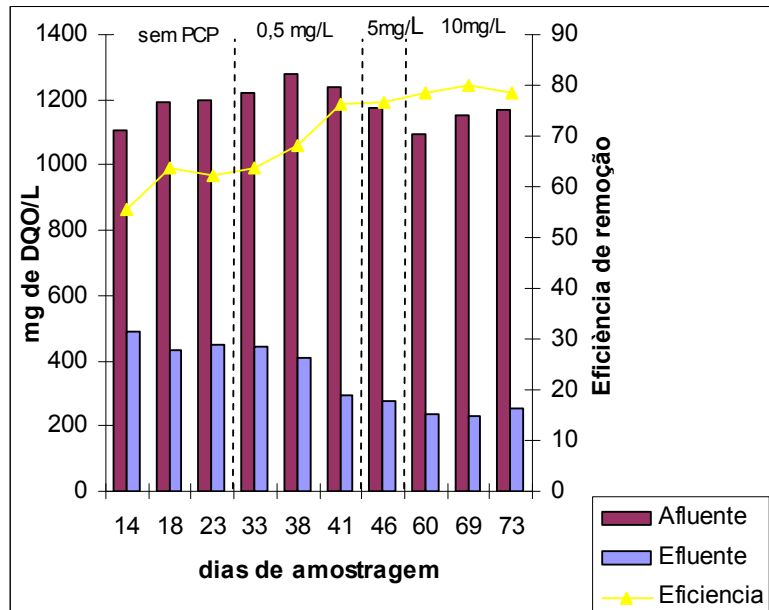


Figura 43: Representação gráfica da variação temporal dos valores de DQO no afluente e efluente e eficiência de remoção.

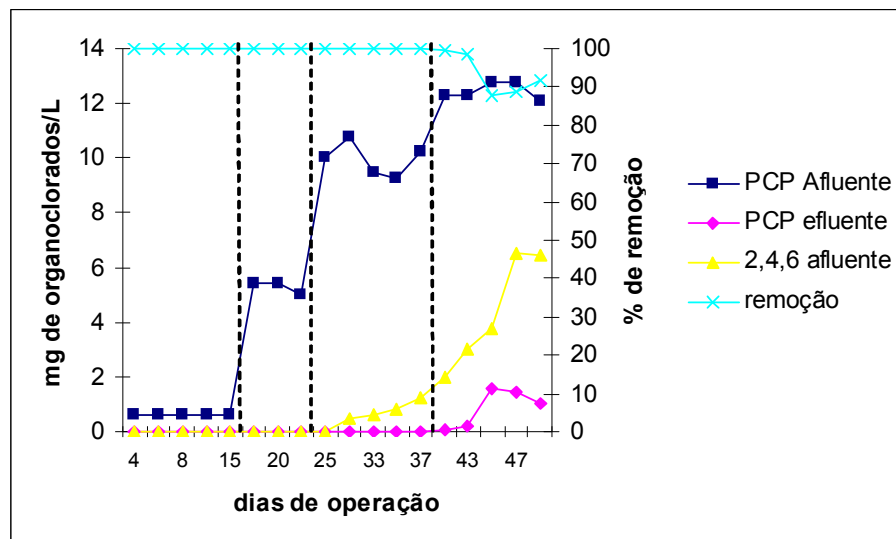


Figura 44: Variação temporal da concentração de PCP no afluente, PCP, 2,4,6 TCP no efluente e da eficiência de remoção do PCP.

Tabela 29: Valores da concentração de PCP no afluente, PCP, 2,4,6 TCP no efluente durante operação do RAHLF 2.

Dias de amostragem	PCP Afluente (mg. L ⁻¹)	PCP efluente (mg. L ⁻¹)	2,4,6 afluente (mg. L ⁻¹)
4	0,62	0	0
6	0,6	0	0
8	0,6	0	0
12	0,62	0	0
15	0,6	0	0
17	5,4	0	0
20	5,4	0	0
24	5	0	0
25	10	0	0
28	10,8	0	0,46
33	9,5	0	0,65
34	9,24	0	0,85
37	10,2	0	1,25
42	12,29	0,06	2
43	12,29	0,18	3
46	12,75	1,59	3,8
47	12,75	1,44	6,52
54	12,1	1	6,45

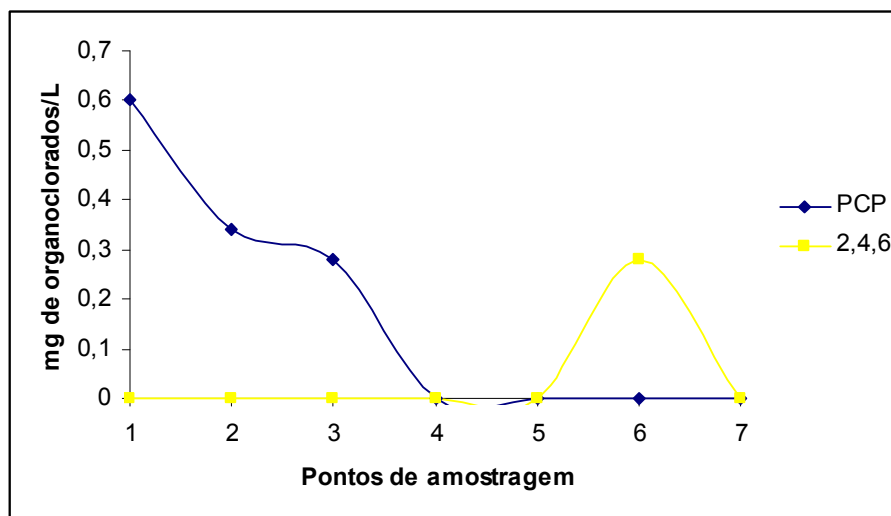


Figura 45: Representação esquemática da variação espacial nas concentrações de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de 0,6 PCP. L⁻¹ aplicada no afluente no 15^o dia de operação. Legenda; 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente

Na fase 2 $5,2 \pm 0,23$ mg PCP.L⁻¹ foram acrescentadas durante um período de 8 dias. Também não foi detectado PCP no efluente nesta fase. O perfil espacial realizado no 23º dia operacional demonstra que o composto PCP continuou sendo consumido até o ponto 3 (L/D 9,9) do reator (Figura 46) . Entretanto, o compostos 2,4,6 TCP apareceu no ponto 1 (L/D 3,3) na concentração de $0,547$ mg.L⁻¹, atingindo o valor máximo próximo a $1,0$ mg.L⁻¹ entre os pontos 2 e 3 e não foi determinado no efluente.

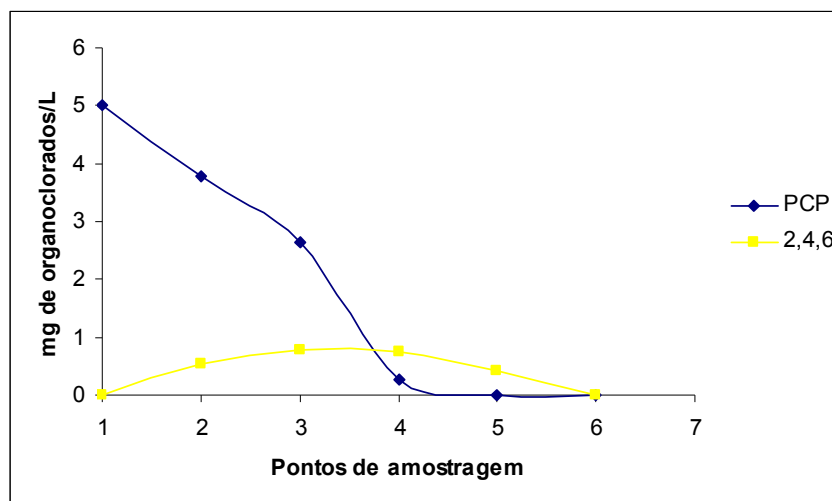


Figura 46: Representação esquemática da variação espacial nas concentrações de PCP, 2,4,6 TCP para concentração de $5,0$ PCP.L⁻¹ aplicada no afluente no 23º dia de operação Legenda: 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente

Na fase 3, $9,95 \pm 0,6$ mg PCP.L⁻¹ foram adicionadas ao sistema por um período de 12 dias. PCP não foi detectado no efluente do sistema neste período, entretanto o composto 2,4,6 TCP estava presente no efluente do sistema a partir do 28º dia operacional na concentração de $0,46$ mg. L⁻¹. A concentração do 2,4,6 TCP aumentou

para 0,65, 0,85 e 1,25 no 33º, 34º e 37º dias operacionais, respectivamente. Análises qualitativas em espectrômetro de massa no 37º dia operacional determinaram traços de 2,3,4,5 TeCP.

Na fase 4, que se iniciou no 38º dia operacional e se estendeu até o final deste ensaio (54º dia operacional), a concentração do PCP no afluente foi de $12,4 \pm 0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. Nesta etapa o PCP foi detectado no efluente do reator. No 42º dia operacional foram detectadas $0,06 \text{ mg PCP.L}^{-1}$. A concentração do PCP no efluente subiu para 0,18 e 1,59 mg.L^{-1} no 43º e 46º dias operacionais, respectivamente. No 47º a concentração de PCP no efluente se estabilizou ($1,4 \text{ mg.L}^{-1}$) e diminuiu para $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no 54º dia operacional, como pode ser visualizado na Figura 44. Nesta última etapa, entre os 38º e 54º dias operacionais, a eficiência média de remoção do PCP foi de $93,2 \pm 5,5 \%$. A concentração do composto 2,4,6 TCP subiu de 1,35 no 37º dia operacional para 2,0, 3,0, 3,8 e 6,5 mg.L^{-1} nos 42º, 43º, 46º e 47º dias operacionais, respectivamente. A concentração deste composto no efluente do reator se estabilizou e permaneceu nesta faixa até o 54º dia operacional ($6,45 \text{ mg.L}^{-1}$).

Nas análises qualitativas de intermediários por espectrometria de massa os compostos 2,3,5,6 TeCP, 2,3,4,5 TeCP, 2,4,6 TCP, 3,4,5 TCP e 4 CP (anexo 8) apareceram no ponto 1 (L/D 3,3) do reator. Também se encontrou neste ponto do reator compostos associados com rota de degradação do fenol como o 2,6 bis-fenol e o 1,2 ácido benzenodicarboxílico, além do próprio fenol (anexo 9). No ponto 2 do reator os tetraclorofenóis não foram encontrados, tendo-se determinado somente 2,4,6 TCP. Estes dados corroboram com a hipótese de que os compostos intermediários de degradação do PCP que são levados a 2,4,6 TCP, tem sua rota de degradação interrompida nesta etapa, devido a toxicidade deste composto. Krumme e Boyd (1988) verificaram a interrupção da rota de degradação quando o 2,4,6 TCP foi encontrado, enquanto que a rota que

levava a formação do 3,4,5 TCP desenvolve-se para a mineralização do composto. De fato, o composto 2,4,6 TCP apresenta alta toxicidade e pode inibir tipos microbianos anaeróbios (KRUMME; BOYD, 1988; CHOI; KIM; SANG, 2007), porém, os microrganismos autóctones provenientes do sedimento estuarino inoculado no RAHLF 1 foram menos sensíveis à toxicidade do 2,4,6 TCP, e sua degradação iniciou após 65 dias de tempo experimental. O RAHLF 2 foi operado por 59 dias, com aparecimento do composto 2,4,6 TCP no efluente do reator a partir do 25º dia de operação, portanto os microrganismos do reator estiveram exposto ao 2,4,6 TCP por 24 dias. Esse tempo pode não ter sido suficiente para aclimação dos microrganismos autóctones estuarinos nas condições nutricionais impostas e, assim, não ocorreu degradação do composto, resultando em altas concentrações de 2,4,6 TCP no efluente do reator, como visualizado na Figura 44, Tabela 29.

O resultado de perfil espacial realizado no 54º dia operacional revela redução notável do PCP no primeiro trecho do reator, como demonstrado pela Figura 47. Nessa condição, o composto 2,4,6 TCP foi medido no ponto 3 do reator, talvez pela degradação dos tetraclorofenóis presentes no ponto 1 do reator.

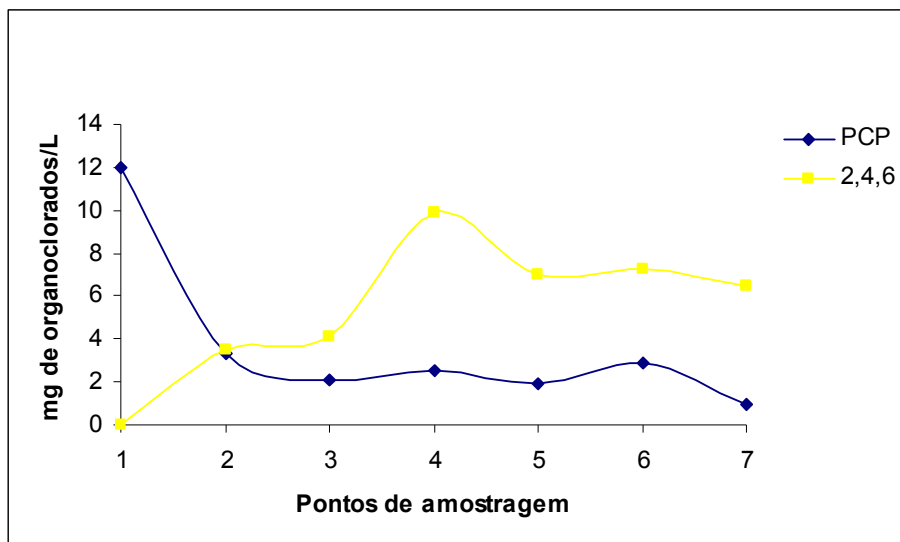


Figura 47: Representação esquemática da variação espacial nas concentrações de PCP, 2,4,6 TCP e 2,6 DCP para concentração de $12,0 \text{ PCP.L}^{-1}$ aplicada no afluente no 54º dia de operação. Legenda: 1- Afluente; 2- P1; 3-P2; 4 – P3; 5-P4; 6-P5; 7-Efluente

O resultado do teste de adsorção dos compostos clorados na biopartícula do reator de amostras do último dia de operação de R2 demonstra o aumento, ao longo do comprimento do reator, da concentração adsorvida nos pontos L/D 3,3, 6,6, 9,9 e 13,2, com concentrações de 1,96, 2,49, 3,63 e 4,1 mg de PCP/ g_{espuma} , respectivamente (Figura 48). O ponto L/D 16,5 continha 1,62 mg de PCP/ g_{espuma} . Estes dados apontam para uma maior atividade de degradação nos dois primeiros pontos do reator, corroborando os perfis espaciais da fase líquida. Da quantidade total de 385,46 mg de PCP adicionados ao sistema, 15,68 mg (4,06%) foram encontradas no efluente do sistema e 61,446 mg, ou 15,94%, ficaram adsorvidas na biopartícula do reator. Portanto, de toda a massa de PCP acrescentada ao sistema, considera-se que 80% sofreu degradação anaeróbia microbiana.

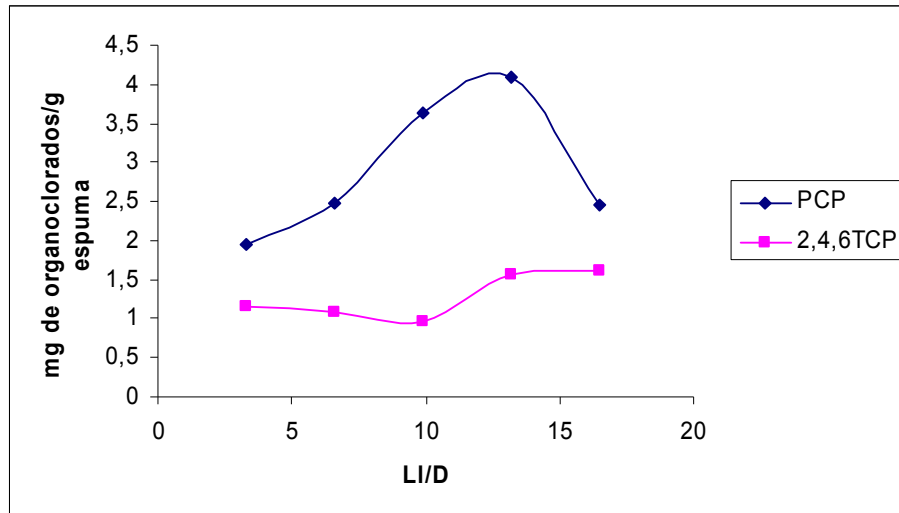
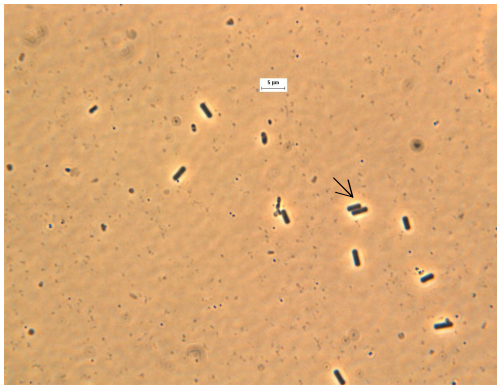
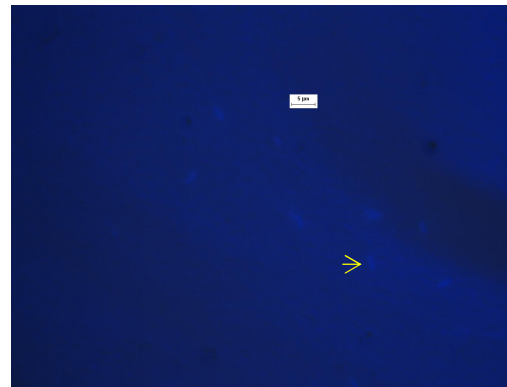


Figura 48: Representação esquemática da variação espacial da massa de PCP e 2,4,6 TCP adsorvido na biopartícula em cada seção do reator no 54º dia de operação.

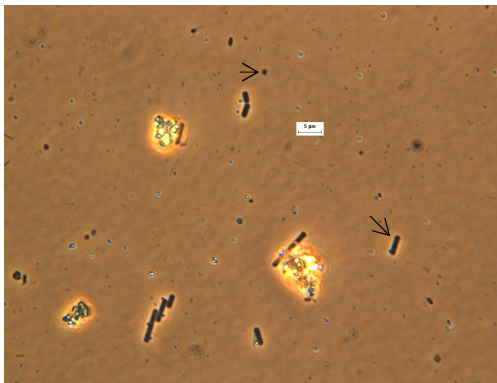
Exames microscópicos realizados no último dia operacional demonstraram mudança das morfologias predominantes, quando comparada com inoculo (Figura 30 item 5.7.1). O predomínio de cocobacilos na amostra do reator recém inoculado foi substituído pela ocorrência de morfologias de bacilos retos com extremidade arredondadas e fluorescentes, como se observa na Figura 49, após o 54º dia de operação com o PCP. Os exames também revelaram redução dos morfotipos encontrados após a operação do reator com PCP.



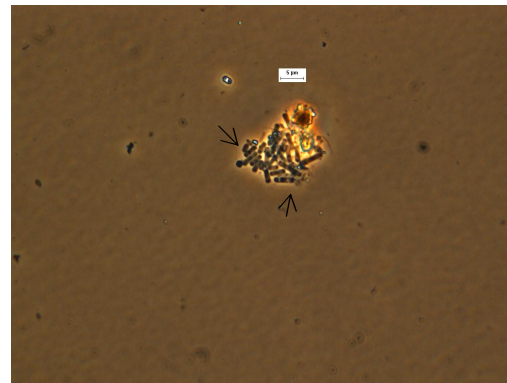
a)



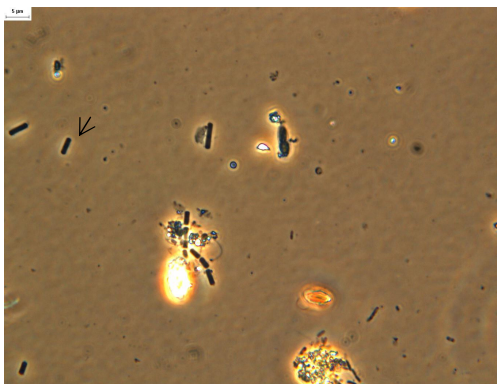
b)



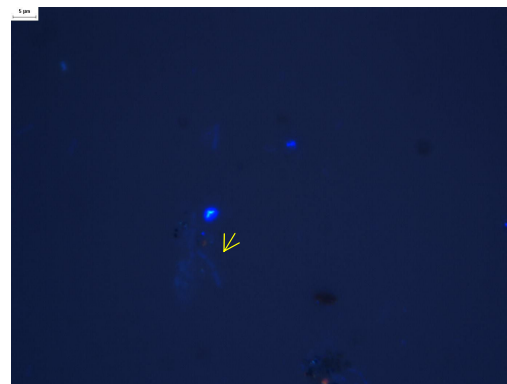
c)



d)



e)



f)

Figura 49: Fotomicrografias de amostras sob microscopia de contraste de fase, referentes a presença de microrganismos provenientes das espumas dos pontos 1 (a, b, c) e 3 (d, e, f) do reator: a) bacilos retos com extremidade arredondada, b) bacilos fluorescentes; c) bacilos retos e cocos; d) aglomerados de bacilos; bacilos com inclusões; e) bacilos retos com extremidade arredondadas, bacilos pequenos; f) bacilos fluorescentes.

Os resultados da aplicação da técnica DGGE também apontam para a existência de alterações na diversidade microbiana durante os experimentos. Na comparação dos perfis de bandas dos géis de DGGE, conforme metodologia descrita no item 4.4.6.5 de materiais e métodos, os índices de similaridade para o Domínio *Bacteria* antes da adição do PCP e ao término da operação do reator com este composto foram de 70, 77, e 85% para os pontos 1, 3 e 5, respectivamente (Figura 50).

Para o Domínio *Archaea*, das 7 bandas existentes no ponto 1 do reator nas amostras de espuma coletadas logo após inoculação, 4 se mantiveram e 3 desapareceram após a operação do RAHLF com PCP. O índice de similaridade neste ponto foi de 54%. No ponto 3, das 6 bandas inicialmente presentes, nenhuma se manteve ao final da fase experimental, porém, observou-se o aparecimento de 3 diferentes bandas. Estes dados apontam para ausência de similaridades entre estas duas fases experimentais. O ponto 5 do reator apresentou similaridade de 66,6% na comparação das amostras iniciais e finais do experimento e não houve alteração em relação as 3 bandas presentes na fase inicial, mas uma nova banda foi visualizada. Estes resultados diferem dos obtidos na partida do RAHLF 1 (item 5.5.2), em que o impacto da saturação da biomassa imobilizada com o PCP foi maior na comunidade pertencente ao Domínio *Bacteria*, bem como em relação a resultados encontrados por outros autores (TARTAKOVISKY et al., 2001, MONTENEGRO et al., 2001, Saia et al., 2007). Entretanto, deve-se considerar que a seleção da comunidade microbiana ocorreu não somente pela adição do PCP e sua provável toxicidade, mas pelas condições nutricionais impostas, relação DQO:N:P igual a 1000:10:1. Esta alteração na relação nutricional parece ter sido a responsável pelas modificações consideráveis na composição da comunidade microbiana do Domínio *Archaea*, resultando na seleção de

microrganismos autóctones com maior capacidade de competição na baixas relações nutricionais impostas, resistentes a toxicidade do PCP e associados ao metabolismo dos sub-produtos formados na degradação do PCP.

Com o objetivo de identificar os microrganismos autóctones provenientes de região estuarina envolvidos na desalogenação redutiva, e inoculados no RAHLF operado sob condição halofílica, 7 bandas do Domínio *Archaea* e 2 do Domínio *Bacteria* (bandas número 1 a 7 da Figura 51) foram excisadas, re-amplificadas e seqüenciadas, conforme metodologia descrita no item 4.4.7, do capítulo Material e Métodos. Para o Domínio *Bacteria*, diversas bandas foram recortadas do gel de DGGE, entretanto só duas resultaram em quantidades de DNA re-amplificado suficientes para um bom sequenciamento e análise filogenética (bandas 8 e 9 da Figura 50). As afiliações filogenéticas das bandas recortadas estão demonstradas na Tabela 30.

A banda 8 presente no ponto 1, 3 e 5 do reator apresentou similaridade (89%) a *Oceanobacillus iheyensis*, número de identificação (NC 004193.1). Este microrganismo foi isolado em sedimento marinho de profundidade de 1050m (LU; NOGI; TAKAMI, 2001). É uma bactéria extremamente halotolerante e alcalifílica, com capacidade de crescer em concentrações de 0 a 21% NaCl em pH 7.5 e 0-18% em pH 9.5. Apresenta concentração ótima de crescimento em 3% NaCl. A banda 9 apresentou baixa similaridade (81%) com o microrganismo *Bacillus halodurans*, número de identidade (NC 002570.2). Este microrganismo tem sido encontrado em ambientes alcalinos sendo explorado para extração da enzima xilanase. Esta enzima é utilizada para hidrololizar o componente xilano da madeira e facilitar a remoção da lignina. Mamo, Kaul e Mattiasson (2006), isolaram o *Bacillus halodurans* dos lagos de soda na região de Rift Valley da Etiópia. A baixa similaridade encontrada entre a espécie sequenciada e *Bacillus halodurans* e as diferenças de ambientes da origem destes microrganismos,

induz que esta sequência proveniente do gel de DGGE se trata de um microrganismo ainda não classificado.

Ambos os microrganismos selecionados para classificação filogenética não têm sido relatados em literatura como possíveis degradadores de organoclorados. Entretanto, estiveram presentes no reator após o término de operação com PCP nas condições nutricionais estudadas. Os exames microscópicos realizados ao final desta fase operacional, demonstra o predomínio da morfologia bacilo nas amostras, o que corrobora com as informações acima. Devido a poucas bandas recuperadas do DGGE para o sequenciamento, não podemos aferir sobre a participação destas espécies no processo de desalogenação reductiva do PCP, mas a sua detecção na comunidade microbiana degradadora e a forte intensidade no gel de DGGE na fase final de operação, é indício de sua atividade na presença do PCP

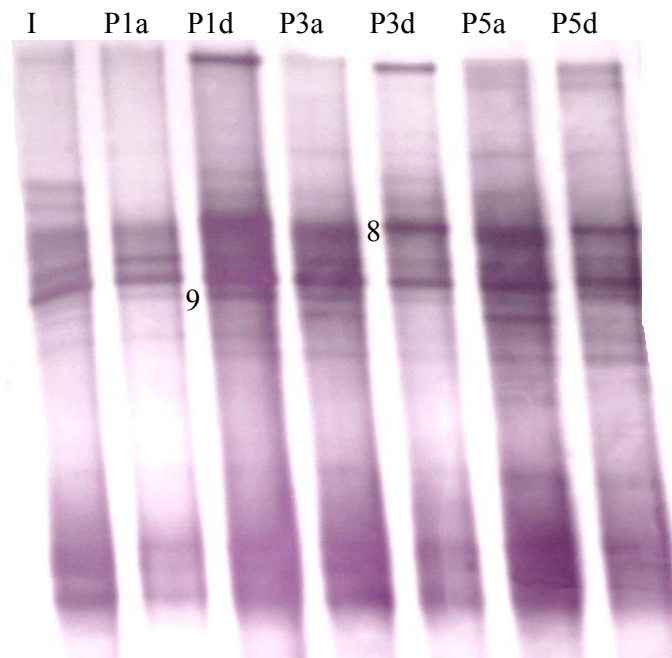


Figura 50: Fotos do gel de DGGE. Produtos de PCR usando primers do Domínio Bactéria com gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda: I-Inóculo; P1a, P3a, P5a – amostras do Ponto 1, 3 e 5 do reator antes da adição do PCP; P1d, P3d, P5d – amostras do Ponto 1, 3 e 5 do reator após 54 dias de operação. As bandas submetidas às análises da sequência estão marcadas com números (referente a tabela 30 de afiliação filogenética)

Os resultados do sequenciamento das bandas recortadas do Domínio *Archaea* revelaram que as 2 bandas analisadas nas amostras do final do reator, de acordo com o banco de dados NCBI, apresentaram similaridade com *Methanosaeta* uncultured (número AY 454772) e *Methanocalculus* uncultured, de 98 e 100%, respectivamente. Outras quatro espécies de *Methanosaeta* foram encontradas nas amostras, como demonstrado na tabela 30. Entre as 6 filotipos encontrados, 5 foram similares a culturas depositadas por Piza (2004). Provavelmente estas espécies não resistiram a toxicidade do PCP e/ou não se desenvolveram nas condições nutricionais estudadas. As cinco linhagens que apresentaram maior similaridade com as depositadas por Piza, Prado, Manfio, (2004) foram encontradas pelos autores em amostras do sedimento de Santos-São Vicente, no mesmo ponto de coleta do realizado na presente trabalho.

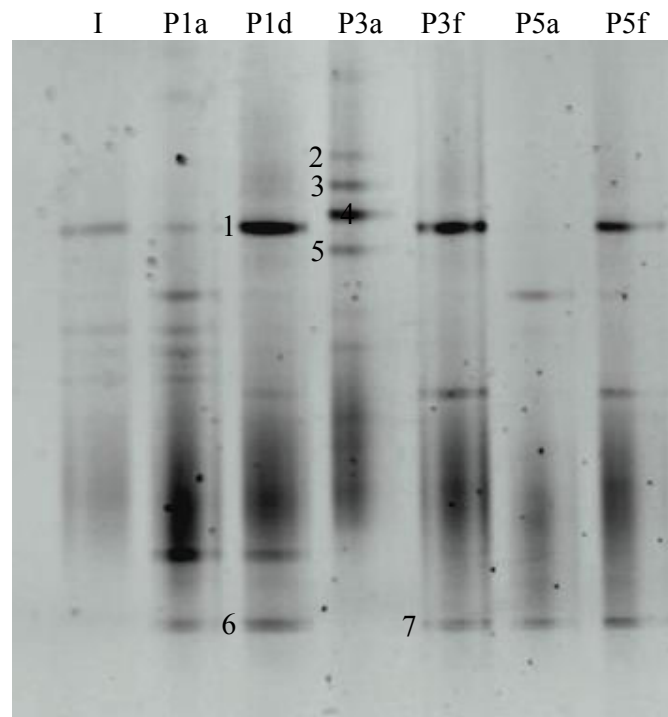


Figura 51: Fotos do gel de DGGE. Produtos de PCR usando primers do Domínio *Archaea* com gradientes de géis iguais a 30 e 70%. Legenda: I-Inóculo; P1a, P3a, P5a – amostras do Ponto 1, 3 e 5 do reator antes da adição do PCP; P1d, P3d, P5d – amostras do Ponto 1, 3 e 5 do reator após 54 dias de operação. As bandas submetidas às análises da seqüência estão marcadas com números (referente a tabela 30 de afiliação filogenética).

Tabela 30: Afiliação filogenética de fragmentos de RNAr 16S recuperados neste estudo (número da banda se refere aos geis de DGGE nas Figuras 50 e 51)

Número da banda	Tamanho do fragmento (~)	do filotipo com maior similaridade de seqüências; número de acesso	Similaridade de seqüência (%)
Banda 1	300	<i>Methanosaeta sp</i> uncultured; AY 454772	98%
Banda 2	300	<i>Methanosaeta sp</i> uncultured; AY 454768-1	99%
Banda 3	300	<i>Methanosaeta sp</i> uncultured; AY 454770	99%
Banda 4	300	<i>Methanosaeta sp</i> uncultured; AY 4547681	98%
Banda 5	300	<i>Methanosaeta sp</i> ; AB 288619	93%
Bandas 6 e 7	300	<i>Methanocalculus sp.</i> uncultured	100%
Banda 8	400	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> ; NC 004193.1	89%
Banda 9	400	<i>Bacillus halodurans</i> ; NC 002570.2	81%

O Gênero *Methanocalculus* é um dos sete pertencentes a família *Methanomicrobiaceae*. Também fazem parte desta família os gêneros *Methanomicrobium*, *Methanolacinia*, *Methanogenium*, *Methanoculleus*, *Methanoplanus* e *Methanofollis*. A família *Methanomicrobiaceae*, juntamente com *Methanocorpusculaceae* e *Methanospirillaceae*, completa a ordem *Methanomicrobiales* (Rouviere et al., 1992). Todas as linhagens pertencentes a família *Methanomicrobiaceae* podem usar hidrogênio, dióxido de carbono e formiato como substrato para a metanogênese. A descrição do novo gênero *Methanocalculus* foi feita por Olliver et al., (1998). O microrganismo *Methanocalculus halotolerans* foi isolada de poço petrolífero em região esuarina e apresentava formato de cocos irregulares e capacidade de crescimento ótimo em 5% NaCl, mas resistindo a concentrações de 0 a 12 %. Em 2000, Mori et al. (2000) isolaram no Japão outra espécie de *Methanocalculus*

(*Methanocalculus pumilus*). Esta apresentava crescimento ótimo em 1% NaCl e tolerava concentrações de até 7% NaCl. Lai et al. (2002) isolaram de sedimento estuarino de Taiwan (estuário Erlin Shi) duas linhagens de uma nova espécie de *Methanocalculus* (*Methanocalculus Taiwanensis*). As células apresentavam características morfológicas de cocos irregulares com 0,9 a 1,4 μm de diâmetro. As duas linhagens eram gram-negativas e catabolizavam formiato e $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ para produzir metano, mas não utilizava acetato, metanol, trimetilamina, etanol e álcoois secundários como substrato metanogênico. O crescimento ótimo se deu em concentração de 0,5% de NaCl, pH 6,7 e 37°C de temperatura. Portanto, este gênero está relacionado com metanogênicas hidrogenotróficas com crescimento ótimo em concentrações salinas próximas a encontradas neste estudo.

O DNA da banda 1, presente nas amostras do final do experimento, (Figura 51) teve sua seqüência 98% similar a *Methanosaeta* uncultured (número AY 454772). Esta linhagem foi depositada por Piza (2004). Em seu estudo, Piza (2004), avaliou a diversidade molecular de Archaea no estuário de Santos, no sítio COSIPA e relatou que 26,5% dos clones obtidos pertencia ao gênero *Methanosaeta*, sugerindo que membros deste gênero é um grupo importante e predominante neste sítio. Resultados similares foram encontrados por Purdy et al. (2002), em sedimentos do estuário do rio Colne. Vários trabalhos relatam a detecção de *Methanosaeta* em sedimentos (DOJKA et al., 1998; GROSSKOPF et al., 1998; VON WINTZINGERODE et al., 1999), indicando que este grupo é membro ativo da comunidade microbiana de sedimentos. A detecção destes microrganismos como componente importante da comunidade microbiana em sítio contaminado com hidrocarbonetos reforça a idéia de que a metanogênese acetoclástica possa ser o principal processo metanogênico associado com a degradação

de hidrocarbonetos (DOJKA et al., 1998; FICKER et al., 1999; WATANABE et al., 2002).

A detecção de methanogênica hidrogenotrófica (*Methanocalculus*) e methanogênica acetoclástica (*Methanosaeta*) na fase final de operação do RAHLF, alimentado com glicose e formiato sob condições halofílicas na presença do PCP, é sinal da existência de um verdadeiro sintrofismo microbiano no sistema. Na maioria dos ambientes anaeróbios, a cooperação metabólica entre microorganismos é requerida para a degradação completa da matéria orgânica. Por causa das considerações termodinâmicas, a mineralização dos intermediários é realizada pela cooperação ao menos de três grupos tróficos diferentes (hidrolíticos fermentativos, acetogênicos sintróficos e metanogênicos). O grupo dos microrganismos acetogênicos pode ser inibido em altas pressões H_2 , devido a incapacidade de regeneração das coenzimas oxidativas sob altas pressão deste gás. Portanto, para que toda a reação ocorra o hidrogênio e/ou o formiato tem que ser eliminados assim que produzidos.

Os microrganismos *Methanobacterium formicicum* e *Methanospirillum hungatii* são os metanogênicos hidrogenotróficos mais frequentemente encontrados em digestores anaeróbios (McINERNEY; BRYANT; PFENNIG, 1979; BOONE; BRYANT, 1980; CHARTRAIN; ZEIKUS, 1986) e em sedimentos de lagos eutrofizados (LOVLEY; DWYER; KLUG, 1982). Entretanto, diversas outras espécies methanogênicas são suscetíveis a realizar a remoção do hidrogênio e/ou do formiato. No presente estudo, *Methanocalculus* spp. foi o microrganismo responsável por esta função, devido a sua habilidade de usar não somente H_2/CO_2 como também o ácido fórmico como fonte de carbono e energia. Diversos estudos mostraram que transferência do formiato poderia ser tão importante como transferência do hidrogênio em associações sintróficas e, em alguns casos, o formiato poderia ser o portador principal

de elétron interespecies (BOK; LUIJTEN; STAMS, 2002; BOONE; JOHNSON; LIU, 1989; THIELE; ZEIKUS, 1988).

A importância da transferência do acetato interespecies em consórcio sintrófico também tem sido enfatizada por diversos autores (WARIKOO, et al., 1996; JACKSON; McINERNEY, 2002). A taxa de degradação dos substratos são influenciadas extremamente pela remoção eficiente dos produtos de extremidade, incluindo o acetato, e a presença de metanogênicas acetoclasticas foi um indício de melhora da degradação dos ácidos graxos (WARIKOO, et al., 1996). A detecção de *Methanosaeta* sp. como representante do grupo metanogênico acetoclástico na fase final de operação do RAHLF pode ser explicada devido a sua elevada afinidade com o acetato. As espécies pertencentes ao gênero *Methanosaeta* apresentam uma vantagem sobre as do gênero *Methanosarcina*, quando as concentrações de acetato são baixas. O gênero *Methanosarcina* não foi detectado neste ensaio. Saia et al. (2007) encontraram estes dois grupos durante a operação do RAHLF em condições halofílicas com PCP, contudo, os autores operaram o RAHLF com maiores concentrações de glicose, resultando possivelmente em maiores concentrações de acetato. Um outro fator interessante é com relação ao período de operação dos reatores. Fernández et al., (1999) estudaram a estabilidade da comunidade microbiana de um reator metanogênico operados sob condições constantes com performance estável, por um período de 605 dias. Populações do Domínio Bacteria e Archaea foram analisadas pela técnica do ADRA (análises de restrição do DNAr amplificado). Os resultados demonstraram que as comunidades de Bacterias e Archeae são extremamente dinâmicas, com drásticas mudanças em curtos períodos de tempo. Com relação as arqueias, dois distintos períodos puderam ser observado pelos autores. No primeiro, que teve duração de 425 dias prevalecia a predominância de *Methanobacterium formicium*. Durante o segundo período (68 dias),

o principal membro da comunidade de Archaea foram *Methanosarcina mazei* e *Methanobacterium bryantii*. Os resultados obtidos por Fernández et al., (1999), demonstraram que a estabilidade funcional de um reator não implica na estabilidade da comunidade e que uma comunidade extremamente dinâmica pode ser desenvolvida em um simples ecossistema. Portanto, a diferença encontrada nos microrganismos metanogênicos presentes no RAHLF 2 e no trabalho de Saia et al., (2007), pode estar relacionado com os diferentes tempo de operação dos reatores e com a instabilidade de comunidades microbianas anaeróbia.

O sintrofismo entre microrganismos pertencentes a Classe “Deltaproteobacteria” com microrganismos metanogênicos do gênero *Methanocalculus* and *Methanosaeta*, foi demonstrado por Grabowski et al., (2005). Os autores encontraram o microrganismo *Methanocalculus* spp em fração significativa nos clones recuperados da água do campo de óleo do lago Pelican e propuseram a hipótese que *Methanocalculus* spp. poderia ter um papel ecológico importante em reservatórios de óleo. Os autores concluíram que a presença do consórcio teve papel fundamental na degradação do heptadecano sob condições metanogênicas.

Warikoo et al., (1995) estudaram a degradação do benzoato por consórcios sintróficos e demonstraram que o aumento na concentração do acetato, afeta a degradação do benzoato por culturas sintróficas. É conhecido que em ambientes metanogênicos, o benzoato é degradado a acetato, H₂ e formiato (FERRY; WOLFE, 1976; MOUNTFORT; BRYANT, 1982; SHELTON; TIEDJE, 1984, SZEWZYK; SCHINK, 1989). A degradação do benzoato é termodinamicamente desfavorável se não ocorrer consumo do hidrogênio e formiato pelas metanogênicas hidrogenotróficas. (FERRY; WOLFE, 1976; MOUNTFORT; BRYANT, 1982). Portanto, para a completa degradação do benzoato é necessária a presença de microrganismos metanogênicos

acetoclásticos e hidrogênotróficos. Como a rota do benzoato é a rota preferencial de degradação do PCP sob condições anaeróbias e, em vistas do resultados alcançados, foi a rota verificada pelo presente estudo. A detecção dos microrganismos *Methanocalcullus* e *Methanosaeta* provenientes de amostra estuarina utilizada como matriz para inocular o RAHLF operado em condições salinas, foi considerada fundamental para manter estabilidade do reator. A alta identidade com as linhagens caracterizadas por Piza et al., (2004), conduz a afirmação sobre a importância destes microrganismos autóctones, no sintrofismo microbiano envolvido na desalogenação do PCP. Essa descoberta contribui com informações sobre a real diversidade microbiana de ecossistemas tropicais, sobretudo em habitats anaeróbios, bem como sobre as condições nutricionais e os procedimentos necessários para confiná-la em reatores e usá-la em processos de biorremediação.

Comparando-se os desempenhos dos sistemas RAHLF 1 e RAHLF 2 pode-se observar que o composto 2,4,6 TCP foi o principal intermediário de degradação do PCP em ambos os reatores, entretanto, no RAHLF 1 a concentração deste composto no final do experimento foi menor (Figura 35), provavelmente devido ao longo tempo de operação do reator (267 dias). O RAHLF 2 foi operado por 59 dias, e a presença do PCP e do 2,4,6-TCP adsorvido na biopartícula e deste intermediário em elevadas concentrações no efluente do sistema no período final de operação pode ser devido ao curto tempo de exposição da comunidade microbiana aos organoclorados. Este período de tempo parece não ter sido suficiente para que a comunidade dos microrganismos halofílicos provenientes de sedimento estuarino sofresse adaptação à toxicidade dos compostos. Realmente, acúmulos de intermediários clorados com elevada toxicidade são esperados em períodos de adaptação, pois diferentes linhagens microbianas tem diferentes taxas de crescimento e mais que uma linhagem bacteriana de consórcios

microbianas autóctones degradadores de PCP é necessária para a completa desalogenação do PCP (TARTAKOVISKY, et al., 1999).

A estratégia adotada para a partida do RAHLF 1, em que se permitiu a adaptação da comunidade microbiana ao PCP durante 120 dias, após saturação por adsorção da biopartícula com PCP presente no afluente (10mg. L^{-1}) e posterior lavagem no sistema, conduz à observação de que o tempo de exposição ao tóxico é determinante para o acúmulo, com posterior consumo do PCP e seus metabólitos (YE; SHEN, 2004), pois após este período o RAHLF teve eficiência de 100% de remoção do PCP em todas as concentrações testadas. Entretanto, a estratégia de partida adotada no RAHLF 2, com aumento gradual da concentração de PCP, resultou em uma partida mais rápida com ausência de saturação da biopartícula com o PCP evitando a falência do reator, diferentemente do observado no RAHLF 1, pois os compostos estavam sendo adsorvido e, em seguida, degradado.

As condições nutricionais impostas na operação do RAHLF 2, com baixas concentrações dos nutrientes nitrogênio e fósforo, quando comparadas com a operação do RAHLF 1 e com as demais condições relatadas em trabalhos de degradação anaeróbia do PCP (DANIANOVIC, 1997; TARTAKOVISKY et al., 1999; CHEN et al. 2000, GARDIN; LEBEAULT; PAUS, 2001; MONTENEGRO et al. 2001, SAIA et al., 2007), permitiram a seleção e o desenvolvimento de comunidade microbianas autóctones proveniente de área estuarina severamente contaminada capazes de desalogenar o PCP, sob condições metanogênicas, halofílicas e com glicose e formiato como doadores de elétrons. A condição nutricional imposta, aliada a estratégia de partida deste ensaio, possibilitou rápida partida no processo, ótima eficiência de remoção e consumo eficiente dos nutrientes, objetivando redução de custos em processos de biorremediação do local contaminado.

Uma das grandes limitações encontradas para se propor o uso de tecnologia da biorremediação em áreas contaminadas é a dificuldade em formular estratégias de tratamento que produza resultados satisfatórios em termos de taxa de degradação e concentração do contaminante residual (HEAD, 1998). Uma das preocupações está na quantidade de nutrientes que se deve fornecer para que a biorremediação ocorra. Diversos trabalhos têm sido realizados para verificar qual a relação nutricional adequada para que a comunidade microbiana aeróbia degradadora de compostos tóxicos se desenvolva, sem resultar em adição de mais nutrientes do que o estritamente necessário (SWANNEL et al., 1999; HEAD; SWANNEL, 1999, VENOSA, et al., 1996). Devido a este fato, os resultados apresentados e discutidos na presente tese constituem fonte relevante de informações para o entendimento das relações nutricionais em sistemas anaeróbios e corroboram com os resultados também alcançados por Damianovic (1997), Baraldi (2002), Nakayama (2005) e Saia et al., (2007). O presente trabalho propõe o uso do RAHLF inoculado com microrganismos autóctones provenientes da área estuarina estudada sob condições metanogênicas, halofílicas, com glicose e formiato como doadores de elétrons e baixa relação de nitrogênio e fósforo, como uma tecnologia anaeróbia a ser aplicada em estratégias de biorremediação da região impactada e em tratamento de efluentes industriais contendo PCP.

6.0 CONCLUSÕES

Quanto à coleta de sedimento e determinação *in situ* das variáveis físico-químicas do local de coleta

- O amostrador “corer” foi adequado para a coleta dos sedimentos.
- O ambiente de coleta do sedimento encontrava-se em condições mesofílicas, com baixo potencial Redox e apresentava elevada atividade metanogênica.

Quanto ao ensaio de adsorção

- A equação de isoterma de Freundlich foi a que melhor descreveu o comportamento da adsorção do PCP em biopartículas inertes.

Quanto à ativação e enriquecimento do consórcio microbiano anaeróbio metanogênico das amostras de sedimento do Sistema Estuarino de Santos-São Vicente coletados em frente da COSIPA.

- O meio de cultivo salino Biota suplementado com glicose e formiato, nas duas condições nutricionais testadas (DQO:N:P 1000:130:45 e 1000:10:1), foi propício para o desenvolvimento da comunidade microbiana metanogênica halofílica.

Quanto à avaliação do desempenho do inóculo na remoção de PCP em diferentes relações nutricionais (DQO:N:P), baseado na Teoria dos Nutrientes Limitantes.

- As diferentes relações nutricionais testadas resultaram na seleção de distintas comunidades microbianas do Domínio *Bacteria*, e em diferentes velocidade de degradação do PCP.
- A relação N:P de 10:1 foi a que apresentou melhores resultados, pois além da rápida degradação do PCP quando comparada com as outras relações, apresentou a maior diversidade de microrganismos e menor concentração nutricional.

Quanto à operação do RAHLF.

- A inoculação do RAHLF em sistema de circuito-fechado foi adequada.
- A espuma de poliuretano mostrou-se adequada para a colonização e imobilização da biomassa no reator sem perda de células durante o período operacional.
- Os microrganismos autóctones do enriquecimento do sedimento da Cosipa foram inóculos adequados para a biodegradação do PCP de 0,5 a 12,0 mg. L⁻¹ sob condições salinas, metanogênicas, com glicose e formiato como substratos orgânicos em RAHLF.
- A alimentação progressiva de PCP e as concentrações nutricionais adotadas (DQO:N:P 1000:10:1) utilizadas na partida do RAHLF 2 foram adequadas e proporcionaram uma partida mais eficiente do reator, quando comparado com o modo de alimentação e a condição nutricional adotado na partida do RAHLF 1.
- O composto, 2,4,6 TCP foi o intermediário principal no efluente do reator.
- A rota principal de degradação do PCP neste trabalho se deu através da descloração na posição *meta*, passado por 2,4,6-TCP, 2,6-DCP e 4-CP.
- Os perfis espaciais permitiram concluir que acentuada remoção de PCP na fase líquida para todas as concentrações aplicadas ocorreu na duas primeiras parte do reator.
- O balanço de massa no reator RAHLF 1 demonstrou a ocorrência de remoção biológica de 99,48% das 1.955 mg de PCP introduzidas no reator.

- O balanço de massa no reator RAHLF 2 demonstrou que da quantidade total de 385,46 mg de PCP adicionados ao sistema, 15,68 mg (4,06%) foram encontradas no efluente e 61,446 mg, ou 15,94%, ficaram adsorvidas nas biopartículas do reator. Portanto, considera-se que 80% do PCP adicionado foi degradado por processo anaeróbio.
- A técnica do DGGE permitiu constatar microrganismos halofílicos do Domínio *Bacteria*, os quais se presume, participaram na desalogenação redutiva do PCP. As arqueias metanogênicas halofílicas estiveram relacionadas com o consumo de ácidos orgânicos, principalmente o acético e fórmico.
- Análises das seqüências das bandas recortadas do gel de DGGE, permitiram identificar os microrganismos *Methanocalculus* e *Methanosaeta* na fase final de operação do RAHLF 2, relacionando estrutura da comunidade microbiana metanogênica e função dos seus integrantes.
- As espécies metanogênicas identificadas, presentes no RAHLF, apresentaram alta similaridade com linhagens provenientes do mesmo local onde foi coletado o sedimento utilizado como inóculo no reator, comprovando que a metodologia empregada para inoculação e operação do RAHLF, assim como o meio salino Biota, foram adequados para confinar e manter a população microbiana autóctone proveniente do sedimento estuarino de Santos no reator.

7.0 RECOMENDAÇÕES

Como recomendações para futuros trabalhos, sugerem-se:

- Para ensaios de degradação de compostos tóxicos, fazer exames nutricionais previamente, visando a escolha da relação DQO:N:P que selecione a comunidade microbiana mais apta a degradar o composto em questão.

- Para ensaios de degradação de compostos tóxicos utilizar, sempre que possível, inóculo previamente exposto ao composto.

- A estratégia de partida com acréscimo gradual da concentração do composto tóxico a ser estudado é adequada para reatores anaeróbios.

- Padronizar metodologia, que melhor reflita a determinação de biomassa microbiana de lodo proveniente de amostras ambientais.

- Isolar os microrganismos presentes na fase final do ensaio de degradação de produtos tóxicos, para realização de testes de fisiologia e metabolismo bioquímico, visando a identificação de culturas e, posterior submissão a uma coleção de cultura em centro depositário.

- Utilizar a metodologia do DGGE para acompanhamento do padrão de diversidade microbiana.

- Utilizar técnica de clonagem e sequenciamento para identificação de culturas microbianas.

- Utilizar a metodologia do SIP – Stable Isotope Probing, para identificação de linhagens microbianas, que participaram efetivamente do processo de degradação do composto alvo, desde que tenha certeza que a mineralização do composto ocorra.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAENS, P; VOGEL, T. M. Biological treatment of chlorinated organics. In: YOUNG, L.Y.; CERNIGLIA, C.E. **Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals**. Nova York : Wiley-Liss, 1995. p. 435-486
- AKARSUBASI, A.T.; INCE, O.; OZ, N. A.; KIRDAR, B.; INCE, B.K. Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 28-35. 2006.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic Identification and In Situ detection of Individual Microbial Cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, p. 143-169. Mar. 1995.
- APHA; AWWA.; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th Edition. 1998
- ATLAS, R, M; BARTHA, R. **Biotechnology Bioeng**. v14, p.309. 1972.
- BARALDI, B. Avaliação da comunidade e atividade microbiana em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP) através de métodos cromatográficos, exames microscópicos e técnicas moleculares com PCR, ARDRA e SLOT-BLOT. 149p . Tese de doutorado – Departamento de Hidráulica e Saneamento/EESC/USP. (2001).
- BARRETO, A. S. Estudo da distribuição de metais em ambientes lótico, com ênfase na assimilação pelas comunidades biológicas e sua quantificação no sedimento e água. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Carlos, 274 p. (1999).
- BENSON et al., GenBank. **Nucleic Acid. Res.**, 30, p. 17-20. 2002.
- BERKAW, M., SOWERS, K. R., MAY, H. D. Anaerobic *ortho* dechlorination of polychlorinated biphenyls by estuarine sediments from Baltimore Harbor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2534-2539, 1996.
- BOONE, D.R.; BRYANT, M.P. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov., gen. nov., from methanogenic ecosystems, **Appl. Environ. Microbiol.** v.40, p. 626–632. 1980.

- BOONE, D.R.; JOHNSON, R.L.; LIU, Y. Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of *K_m* for H₂ or formate uptake, **Appl. Environ. Microbiol.** v.55, p. 1735–1741. 1989.
- BOWER, E.J.; ZHENDER, J.B. Bioremediation of organic compounds – putting microbial metabolism to work. **Tibtech**, n.11, p. 36 – 367. 1993.
- BRADDOCK, J. F.; RUTH, M. L.; CATTERALL, P. H.; WALWORTH, J. L.; McCARTY, K. A. **Environmental Science and technology** v.31. p. 2078,1997.
- BRUCHA, G. Avaliação da diversidade microbiana de consórcio anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia do tricloroetileno – TCE, empregando-se a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE. São Carlos, Dissertação de mestrado SEA-EESC-USP, 130p.(2001).
- BRYAN, F. O.; HALE, D. D.; ROGERS, J. E.** Regiospecific Dechlorination of pentachlorophenol by dichlorophenol-adapted microorganisms in freshwater, anaerobic sediment slurries. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p. 2293, 1991.
- BUITRÓN, G.; GONZALVÉZ, A.; LÓPEZ-MARÍN, L.M. Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. **Water Science Technology**, v. 37, 4-5, p. 371 – 378. 1998.
- BUZZINI, A. P; SAKAMOTO, I. K. ; VARESCHE, M. B. A. ; PIRES, E. C . Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 168-176. 2006.
- CAPONE, D.G.; KIENE, R. P. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism **Limnol. Oceanogr.**, v. 33 (4), p. 725-749. 1988.
- CATTONY, E. B. M.; CHINALIA, F. A.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; VARESCHE, M. B. A. Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulphate. **Biotechnology and Bioengineering** v. 91, p. 244– 253. 2005.

- CATTONY, E.B.M. Avaliação da diversidade microbiana das características físico-químicas de solo submetido ao cultivo de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Carlos. (2001).
- CHARTRAIN, M.; ZEIKUS, J. G. Microbial ecophysiology of whey biomethanation: characterization of bacterial trophic populations and prevalent species composition in continuous culture. **Appl. Environ. Microbiol.** v.51, p.188-196. 1986.
- CHEN, S.T.; DONG, J.; BERTHOUEX, P.M.; BOYLE, W.C. Fate of pentachlorophenol (PCP) in an anaerobic digester. **Water Environ. Res.**, v. 72, p201-206, 2000.
- CHOI, J.; KIM, Y.; CHOI, S.J. Reductive dechlorination and biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol using sequential permeable reactive barriers: Laboratory studies. **Chemosphere**, v. 67, p. 1551-1557. 2007.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB (1990). Contaminantes na Bacia do Rio Cubatão e seus reflexos na biota aquática. São Paulo, 81p.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB (2001). Sistema estuarino de Santos e São Vicente. Relatório técnico – CETESB, Secretaria do meio Ambiente. Agosto.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, (1985). Carta do meio ambiente: Baixada Santista, São Paulo. 33p
- DAMIANOVIC, M. H. R. Z.. Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF). São Carlos. 176p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. (1997)
- DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SAIA, F.T.; MORAES, E.M.; LANDGRAF, D.; REZENDE, O.O.M; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. Gas chromatographic methods for monitoring of wastewater chlorophenol degradation in anaerobic reactors. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42, p. 45-52, 2007.
- DEBOK, F.A.M.; LUIJTEN, M.L.G.C.; STAMS, A.J.M. Biochemical evidence for formate transfer in syntrophic propionate-oxidizing cocultures of *Syntrophobacter*

- fumaroxidans* and *Methanospirillum hungatei*, **Appl. Environ. Microbiol.** v.68, p. 4247–4252. 2002.
- DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. São Carlos. 1993, 320 p. Tese (doutorado Hidráulica e Saneamento). EESC-USP
- DOJKA, M. A.; HUGENHOLTZ, P.; HAACK, S.K.; PACE, N.R. Microbial diversity in a hydrocarbon and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, (10), p. 3869-3877. 1998.
- DOMINGUES, M. R. Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e leito fixo, sob condições termofílicas. 164p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos. (2001).
- DSM- DEUTSCHE SAMMUNG von MIKROORGANISM und ZELKULTUREN GMBH-DSM. Curso: Scientific services of culture collections – the DSM experience – “Fundação André Toselo”. Campinas, SP.(1991)
- DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L.; ARAUJO, W.; van ELSAS, J.D. Analysis of Bacterial Community Structure in Sulfurous-Oil-Containing Soils and Detection of Species Carrying Dibenzothiophene Desulfurization (dsz) **Genes. Applied Environ. Microbiology.** p. 1052-1062. March, 2001.
- DUFF, S.J.B.; KENNEDY, K.J.; BRADY, A.J. Treatment of dilute phenol/PCP wastewaters using the Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor. **Wat. Res.** 29 (2), 645-651, 1995.
- EL FANTROUSSI S., NAVEAU, H. & AGATHOS, S.N. Anaerobic dechlorinating bacteria. **Biotechnology Progress**, 14(2):167-88, 1998.
- ENVIRONMENT CANADA (1999). *Canadian Sediment quality guide lines for protection of aquatic life*. Summary Tables. <http://www.ec.gc.ca>
- ESTEVEZ, F. A.; BOZELLI, R. L.; CAMARGO, A.F.M.; ROLAND, F.; THOMAS, S.M.. Variação diária (24 horas) de temperatura, O₂ dissolvido, pH e alcalinidade em duas lagoas costeiras do Estado do Rio de Janeiro e suas implicações no metabolismo destes ecossistemas. **Acta Limnol. Brás.** 2:99-127, 1988.

- FAHMY, M.; KUT, O.M.; HEINZEL, E. Anaerobic-aerobic fluidized bed biotreatments of sulphite pulp bleaching effluents. I global parameters. **Water Res.** v.24. p.1987-1996, 1994.
- FANG, H.H.P., LIU, Y. & CHENT, T. Effect of sulfate on anaerobic degradation of benzoate in UASB reactors. **Journal of Environmental Engineering**, v. 123, 320-328. 1997.
- FERNANDÉZ, A.; HUANG, S.; SESTON, S.; XING, J.; HICKEY, R.; CRIDDLE, C.; TIEDJE, J. How stable is stable? Function versus community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3497 - 3704. 1999.
- FERRY, J. G.; WOLFE R. S. Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. **Arch. Microbiol.** v.107, p.33-40. 1976.
- FETZNER, S. Bacterial dehalogenation. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.**, v.50(6), p.633-57, 1998.
- FICKER, M.; KRASTEL, K.; ORLICKY, S.; EDWARDS, E. Molecular characterization of toluene-degrading methanogenic consortium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, (12), p. 5576-5585. 1999.
- FIELD, J.A.; CALDWELL, J.S.; JEYANAYAGAM, S.; RENEAU JR.; R.B.; KROONTJE, W.; COLLINS JR. E.R. Fertilizer recovery from anaerobic digester. **Trans. ASAE**, v.27, p. 1871-1876. 1984.
- FIELD, J.A.; STAMS, A.J.M.; KATO, M.; SCHRAA, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. **Antonie van Leeuwenhoek**, 67, 47-77, 1995.
- FORESTI E.; ZAIAT M.; CABRAL, A.K.A; NERY, V. Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor for paper industry wastewater treatment. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 12, p. 157- 163. 1995.
- FORSBERG, G. C.; RYDING, S.O.; CLAESON, A.; FORBERG, A. Water chemical analyses and/ or algal assay? Sewage effluent and polluted water studies. **Mitt. Internat. Verein. Limnol.** v.21, p. 352-363. 1978.

- FREEDMAN, D. L. & GOSSET, J. M. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.9. p. 2144-2151.1989.
- FREIRE, F.B. Tratamento anaeróbio de efluentes contendo pentaclorofenol em reator de leito fluidificado. Tese de doutorado apresentado no Departamento de Hidráulica e Saneamento -EESC-USP. (2005).
- FREUNDLICH H. Über die Adsorption in Lösungen. **Z. Phys. Chem.** 57, p. 385, 1907.
- FRITZ, W.; SCÜNDER E.U. Simultaneous adsorption equilibria of organic solutes in dilute aqueous solution on GAC. **Chem. Engn. Sci.** 29, p. 1279-1282.1974.
- FUNDESPA Diagnóstico ambiental oceânico e costeiro das regiões sul e sudeste do Brasil. Vol. III, São Paulo: Fundespa, 1994.
- FURHMAN J.A.; McCALLUM K.; DAVIS, A.A. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. **Appl. Environ. Microbiol.** v.59, p.1294-1302. 1993.
- GARDIM, H.; LEBEAULT, J.M.; PAUSS, A. Degradation of 2,4,6- trichlorophenol (2,4,6 TCP) by co-immobilization of anaerobic and aerobic microbial communities in an upflow reactor under air-limited conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.56, p. 524-530. 2001.
- GENTHNER, B.S.; PRICE II, W.A.; PRITCHARD, P.H. Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v.55 (6), p.1466-1471. 1989
- GILES, C.H.; MACEWAN, T.H.; NAKHWA, S.N.; SMITH, D. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solid. **J. Chem. Soc.**, p. 3973-3993.1960.
- GILLAN, D.C.; SPEKSNIJDER, A.G.C.L.; ZWART, G.; RIDDER, C. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (mollusca, bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16s rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 3464– 3472. 1998.

- GIOVANNONI S.J.; BRISCHGI T.B.; MOYER C.L.; FIELD K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature** n.345, p. 60-63. 1990.
- GRABOWSKI, A.; BLANCHET, D.; JEANTHON, C. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. **Research in Microbiology.**, v. 156, p. 814-821. 2005.
- GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O' DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Rapid method for co-extraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 5488– 5491. 2000.
- GROSSKOPF, R.; JANSSEN, P.H.; LOSACK, W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, (3), p. 960-969. 1998.
- GUSMÃO, V. R.; CHINALIA, F A ; SAKAMOTO, I K ; VARESCHE, M. B. A. Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. **Journal of Hazardous Materials**, v. B139, p. 301-309. 2007.
- GUTHRIE, M. A.; KIRSCH, E.J.; WUKASCH, R.F.; GRADY Jr, C.P.L. Pentachlorophenol biodegradation. II. **Anaerobic. Water Res.** v.18, p. 452-461. 1984.
- HÄGGBLÖM, M.M. Microbial breakdown of halogenated pesticides and related aromatic compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, n. 1, p. 29-72. 1992.
- HEAD, I. M. & SWANNELL, R. P. J. Biodegradation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10 (3), p.234-239. 1999.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.E.H. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel - Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p 3233-3241. 1997.

- HÖFLE, M. Bacterioplankton community structure and dynamics after large-scale release of nonindigenous bacteria as revealed by low-molecularweight-RNA analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 58, p. 3387-3394. 1992.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Appl. Environ. Microbiol.** v.54, p. 703-711. 1988.
- HOROWITZ, A., SULFITA, J.M., TIEDJE, J.M. Reductive dehalogenations of halobenzoates by anaerobic lake sediment microorganism. **Appl Environ. Microbiol.** v.45, p. 1459-1465. 1983.
- HUSZAR, V.L.M.; BICUDO, D.C.; GIANI, A.; FERRAGUT, C.; MARTINELLI, L.A.; HENRY, R. Subsídio para compreensão sobre a limitação de nutrientes ao crescimento do fitoplâncton e do perifiton em ecossistemas continentais lênticos do Brasil. In: ROLAND, F.; CESAR, D.; MARINHO, M. (Eds). **Lições de Liminologia** – São Carlos: Rima. 2005.
- ISHIHARA, M.; SUGIURA, K.; ASAUMI, M.; GOTO, M.; SASAKI, E.; HARAYAMA, S. In: Microbial processes for bioremediation, Hinchee, R. E. Vogel, C. M.; Brockman, F. J.. Eds.: Battelle Press: Columbus, OH. p.101. 1994.
- JACKSON B.E.; McINERNEY M.J. Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits, **Nature**, v. 415, p. 454–456. 2002.
- JACOBSEN B.N.; ARVIN, E.; REINDERS, M. Factor affectin sorption of pentachlorophenol to suspended microbial biomass. **Water Res.** v.30. No. 1, pp 13-20. 1996.
- JACOBSEN, B. N. NYHOLM N., PEDERSEN B. M., POULSEN O. AND SCHULTZ B. Microbial degradation of pentachlorophenol and lindane in laboratory scale activated sludge reactors. **Wat. Sci. Technol.** v.23, p.349-356. 1991.
- JUTEAU, P.; BEAUDET, R.; McSWEEN, G.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; BISAILLON, J.G. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. **Applied.Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 218-224. 1995.
- KATO, M. T., NETO, C.O.A., CHERNICHARO, C.A.L., FORESTI, E. & CYBIS, L.F. Configurações de reatores anaeróbios. In: **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. PROSAB, cap. 3, p. 53-99. 1999.

- KAZUMI, J., CALDWELL, M.E., SUFLITA, J.M., LOVLEY, D.R., YOUNG, L.Y. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 813-818. 1997.
- KENNEDY, K.J.; LU, J.; MOHN, W.W. Biosorption of chlorophenols to anaerobic granular sludge. **Wat. Res.**, v.26 (8), p.1085-1092. 1992.
- KERN-JESPERSEN J. P., HENZE, M., STRUBE, R. Biological Phosphorus Release and Uptake Under Alternating Anaerobic and Anoxic Conditions in Fixed-film Reactor. **Wat. Res.**, v.28 (5), p. 1253-1255. 1994.
- KHODADOUST, A.P.; WAGNER, J.A.; SUIDAN, M.T.; BRENNER, R.C. Anaerobic treatment of PCP in fluidized-bed GAC bioreactors. **Water Research**, v. 31, n. 07, p. 1776-1786. 1997.
- KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP, J.W. Analysis of Ammonia- Oxidizing Bacteria of the β Subdivision of the class Proteobacteria in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA Fragments. **Appl. and Environ. Microbiol.** v. 63, p.1489-1497. 1997.
- KRUMME, M. S.; BOYD, S. A. Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. **Wat. Res.**, v. 22, p. 171-177. 1988.
- LAI, M.C.; CHEN, S.C.; SHU, C.M.; CHIOU, M.S.; WANG, C.C.; CHUANG, M.J. HONG, T.Y.; LIU, C.C.; LAI, L.J. HUA, J.J. *Methanocalculus taiwanensis* sp. nov., isolated from an estuarine environment **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1799–1806. 2002.
- LANTHIER, M.; JUTEAU, P.; LÉPINE, F.; BEAUDET, R. VILLEMUR. *Desulfitobacterium hafniense* is present in a High Proportion within the biofilms of a High-Performance Pentachlorophenol-Degrading, Methanogenic Fixed-Film Reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1058-1065. 2005.
- LANTHIER, M.; TARTAKOVISKY, B.; VILEMUR, R.; DeLUCA, G.; GUIOT, S.R. Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 4035-4043. 2002.

- LARIZATTI, S.F. Avaliação da degradação anaeróbia de pentaclorofenol por consórcios metanogênicos enriquecidos. 138p. Dissertação (Mestrado)– Departamento de Hidráulica e Saneamento /Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos. (1997).
- LARSEN, S.; HENDRIKSEN, H.V.; AHRING, B.K. Potential for thermophilic (50°C) anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n.07, p. 2085-2090. 1991.
- LEE, S.; FURHMAN J.A. DNA hybridization to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56, p.739-746.1990.
- LEWIS, W. M. Jr. Causes for the high frequency of nitrogen limitation in tropical ecosystems? **Verh. Internat. Verein Limnol.**, v. 28, p. 210 – 213. 2002.
- LONDRY, K.L.; FEDORAK, P.M. Benzoic acid intermediates in the anaerobic biodegradation of phenols. **Canadian Journal Microbiology**, v. 38, p. 1-11. 1992.
- LOVLEY, D.; DWYER, D. F.; KLUG. M.J. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for H₂ in sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 43, p.1373-1379. 1982.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganism**. 8. ed. ISBN 0-13-520875-0. 1996.
- MAINTINGUER, S. I. *Degradação anaerobia de fenol sob diferentes condições nutricionais*. Dissertação de mestrado em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos - EESC/USP. 99 p.
- MAMO, G.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. A thermostable alkaline active endo-B-1-4-xylanase from *Bacillus Halodurans* S7: Purification and characterization. **Enzyme and microbial Technology**, v.39, p. 1492-1498.
- MATHEUS, D. R. Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros. Rio Claro. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. 161 p. (1998).

- MATHEWS A. P.; WEBER W.J. Effects of external mass transfer and intraparticle diffusion on adsorption rates in slurry reactors. **AIChE Symp.** Ser. 71, 91-98, 1977.
- MAUKONEN, J.; RATTO, M. Characterization of Microbial Communities from Sulfate-Reducing Fluidized Bed Reactors Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) **Abstract of 9th International Symposium on Microbial Ecology.** p 383. (2001)
- MCINERNEY, M.J.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N. An anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens, **Arch. Microbiol.** v.122, p. 129–135. 1979.
- MEDEIROS, P.M.; BÍCEGO, M.C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I Santos, Sp - Brazil. **Marine Pollution Bulletin** , v.49, p. 761-769. 2004.
- MELVIN, A. N. W. T.; HOBSON, P. N. Identification of anaerobic digester bacteria using polymerase chain reaction methods. **Bioresource Technology**, v.47, p.73-80. 1994.
- Merck Index. The **Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals** (1996). [Maryadele J. O'Neil](#) (Ed). Merck Publisher.
- MESQUITA, A. S. Resíduos tóxicos industriais organoclorados em Samaritá: um problema de Saúde Pública. São Paulo. Dissertação de Mestrado do Departamento de Saúde Ambiental, Faculdade de Higiene e Saúde Pública –USP. 125p. (1995).
- METCALF & EDDY INC. **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse** 3^o ed. N.Y., Mc Graw-Hill 1334p. 1991.
- METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: treatment disposal, reuse.** 2.ed. New York: McGraw Hill, 1334p. (McGraw Hill Series in Water Resources and Environmental Engineering). 1990.
- MOHN, W.W. & TIEDJE, J.M. Microbial reductive dehalogenation. **Microbiol rev.** v. 56. p. 482-507. 1992.
- MOHN, W.W. & TIEDJE, J.M. Microbial reductive dehalogenation. **Microbial Reviews**, v.56 (3), p. 482 - 507. 1992.

- MOLLAH, H.A.; ROBINSON, C. W. Pentachlorophenol adsorption and desorption characteristics of Granular activated carbon – Isotherms. **Wat. Res.** v. 30 n°.12, p. 2901-2906. 1996.
- MONTENEGRO M.A.P., E.M. MORAES, H.M. SOARES, R.F. VAZOLLER, Hybrid reactor performance in pentachlorophenol (PCP) removal by anaerobic granules, **Water Sci. Technol.** v. 44, p. 137-144. 2002.
- MONTENEGRO, M. P. Avaliação da performance de um reator anaeróbio híbrido (RAH) e da atividade das populações de microrganismos anaeróbios, na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP). São Carlos, 2001. 222p. *Tese (Doutorado)*- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. (2001).
- MONTENEGRO, M.A.P.; ARAÚJO, J.C.; VAZOLLER, R.F. Microbial community evaluation of anaerobic granular sludge from a hybrid reactor treating pentachlorophenol by using fluorescence *in situ* hybridization. **Water Sci. Technol.** v.48 (6), p.65-73. 2003.
- MORAES, E.M.; ADORNO, M.A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reator anaeróbio tratando resíduos líquidos e sólidos. **Anais de VI Oficina e Seminário Latino Americano de Digestão Anaeróbia.** Recife, 2000.
- MORI, K.; YAMAMOTO, H.; KAMAGATA, Y.; HASTU, M.; TAKAMIZAWA, K. *Methanocalculus pumilus* sp. nov., a heavy-metal-tolerant methanogen isolated from a waste-disposal site. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.50, p. 1723 -1729. 2000.
- MOUNTFORT, D. O.; BRYANT, M. P. Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge. **Arch. Microbiol.** v.133, p. 249–256. 1982.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** v.155. p. 335-350. 1987.
- MUYZER, G.; WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain reaction-Amplified Genes Coding for 16 S rRNA. **Appl. And Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 695-700. 1993.

- MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S., TESKE; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. **Molecular Methods Ecology Manual** -Cap 3.4.4, p 1-23. 1996.
- MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel eletroforesis. **Nucleic Acids Res.** 13: 3131-3145. 1985.
- NAKAYAMA, C.R. Contribuição aos estudos de diversidade funcional de microrganismos realizados no Programa BIOTA FAPESP: Degradação Anaeróbia de Pentaclorofenol em sedimentos estuarinos: resposta metabólica de metanoarqueas e bactérias redutoras do íon sulfato. (2005). Tese (doutorado em Microbiologia)- Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, SP. (2005).
- NARDI, I. R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic packed bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. **Process Biochemistry.** v. 40, p. 587-592, 2005.
- NASCIMENTO, N.R.; NICOLA, S.M.C.; REZENDE, M.O.O.; OLIVEIRA, T.A.; ÖBERG, G. Pollution by hexachlorobenzene and pentachlorophenol in the coastal plain of São Paulo state, Brazil. **Geoderma**, v. 121, p. 221– 232. 2004.
- NICHOLSON, D.K.; WOODS, S.L.; ISTOK, J.D.; PEEK, D.C. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 07, p. 2280-2286. 1992.
- NISHIGIMA, F.N.; WEBER, R.R.; BÍCEGO, M.C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediment of Santos and Cananéia, Sp, Brazil. **Marine Pollution Bulletin** Vol. 42, No. 11, p.1064-1072. 2001.
- ODUM, E. P. Basic Ecology. CBS College Publishing. 1983.
- OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediment. **J. Microbiol. Methods** v.7, p.57 – 66. 1987.

- OLIVEIRA, S.S. Avaliação do potencial de um lodo anaeróbio termofílico na biodegradação do composto Pentaclorofenol (PCP). Dissertação de Mestrado apresentado no Departamento de Hidráulica e Saneamento -EESC-USP. (1998).
- OLLIVIER, B.; FARDEAU, M.; CAYOL, J.; MAGOT, M.; PATEL, B.K.C.; PRENSIER, G.; GARCIA, J. *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 48, p. 821-828. 1998.
- OVERBECK, J. Conceitos de ecossistema. In: JORGENSEN, S.E.; VOLLENWEIDER, R.A. **Diretrizes para o gerenciamento de lagos**. Vol 1: Princípios para o gerenciamento de lagos. p. 9 – 25. 2000.
- PARKES, R.J., DOWLING, N.J.E., WHITE, D.C., HERBERT, R.A., GIBSON, G.R. Characterization of sulphate-reducing bacterial populations within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 102, p. 235-250. 1993.
- PIRINGER, G. BHATTACHARYA, S.K. Toxicity And Fate Of Pentachlorophenol In Anaerobic Acidogenic System. **Water Res.** v.33 (11) P. 2674-2682. 1999.
- PIZA, F. F. Princípios de isolamento e purificação de ácidos nucleicos. IN: *Métodos moleculares para a avaliação a diversidade microbiana* – Curso Fundação André Toselo- p. 1-11. (2000).
- PIZA, F.F.. Ecologia molecular microbiana associada a sedimentos do estuário de Santos-São-Vicente (SP, Brasil). (2004). Tese (doutorado em genética e biologia molecular)- Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, SP, 2004.
- PIZA, F.F.; MANFIO, G.P. Diversity of Bacteria in contaminated estuarine sediment from Baixada Santista, Brazil, analysed by 16S rDNA sequencing and DGGE. **Abstract of 9th International Symposium on Microbial Ecology**. p218 (2001).
- PURDY, K.J.; MUNSON, M.A.; NELWELL, D.B.; EMBLEY, T.M. Comparison of molecular diversity of the methanogenic community at the brackish and marine ends of the UK estuary. **FEMS Microbial. Ecology**, v. 39, p. 17-21. 2002.
- RADKE, C. J.; PRAUSNITZ, J. M. Adsorption of organic of organic solutes from dilute aqueous solution on GAC. **Ind. Engn Chem. Fund.** v.11. p. 445-451. 1972.

- REYNOLDS , C. S. Non- determinism to probality, or N:P in the community ecology of phytoplankton. **Arch. Hydrobiol.**, v. 146, n. 1, p. 23-35. 1999.
- RÖLING, W. F. M.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; LEE, K.; DANIEL, F.; SWANNELL, R. J. P.; HEAD, I. M. Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient – Enhanced Oil Spill Biorremediation. **Applied and Environmental Microbiology.**, p. 5537-5548, Nov. 2002.
- ROSA, L.P.; SIKAR, B.M.; SANTOS, M.A.; MONTEIRO, J.L.; SIKAR, E.M.; SILVA, M.B.; SANTOS, E.D.; JUNIOR, A.P. Emissões dos gases de efeito estufa derivados de reservatórios hidroelétricos. Projeto BRA/00/029. 166p. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2002.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; van ELSAS, J D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia.** 28, p.135-147.1997.
- ROUVIE' RE, P.; MANDELCO, L.; WINKER, S.; WOESE, C.R. A detailed phylogeny for the *Methanomicrobiales*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 15, p.363 – 371. 1992.
- SAIA, F. T. Avaliação do potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), inoculado com sedimentos do estuário da Baixada Santista - Estado de São Paulo”. Tese de doutorado apresentado no Departamento de Hidráulica e Saneamento -EESC-USP. (2005).
- SAIA, F. T.; Damianovic, M.H.R.Z.; Cattony ,E.B.M.; Brucha G.; Foresti E.; Vazoller R. F. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a fixed-film reactor inoculated with polluted sediment from Santos–São Vicente Estuary, Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2007.
- SAIKI, R.K.; BUGAWAN, T.L.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N.A. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p.1350-1354. 1985.
- SANZ, J.L. Métodos de biologia molecular em digestão anaeróbia. In: **Taller sobre digestão anaeróbia**. Mérida, México. (2002).

- SCHINK, B. Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects, p. 771-846. In A. J. Zehnder (ed), **Biology of anaerobic microorganisms**. John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y. 1988.
- SCHMIDT T. M.; DELONG E.F.; PACE, N. R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **J. Bacteriol** v.173, p. 4371-4378. 1991.
- SCINK, B. Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects, p. 771-846. In: ZENDBER, A.J.B. (ed). **Biology of anaerobic microorganisms**. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. 1988.
- SHELTON, D. R., TIEDJE J. M. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 48, p. 840-848. 1984.
- SHEN, D.S.; LIU, X. W.; HE, Y.H. Studies On Adsorption, Desorption And Biodegradation Of Pentachlorophenol By The Anaerobic Granular Sludge In An Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Uasb) Reactor. **Journal Of Hazardous Materials B**, V. 125, P. 231-236. 2005.
- SIAHPUSH, A.R.; LIN, J.E.; WANG, H. Y. Effect of adsorbents on degradation of toxic organic compounds by coimmobilized systems. **Biotech. and Bioeng.**, v.39, p.619-628. 1992.
- SMIDT, H. Molecular characterization of anaerobic dehalogenation by *Desulfitobacterium dehalogenans*. Wageningen. Netherlands, PhD Thesis Wageningen University. 187 p. (2001).
- SMITH, V. H. Effects of Resource Supplies on the Structure and Function of Microbial Communities. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 99-106. 2002.
- SMITH, V.H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. **Science** , v. 221, p. 669-671. 1983.
- SMITH, V.H.; GRAHAM, D. W.; CLELAND, D. D. Application of Resource Ratio Theory to hydrocarbon biodegradation. **Environmental Science Technology**, n. 32, v. (21), p. 3386-95. 1998.

- SOARES, H. M.; HIRATA, T.S. Práticas de laboratório. IN: *Curso de tratamento biológicos de resíduos*, 3., Florianópolis, 1997. Cursos, Santa Catarina, CBAB, MCT/CNPq, CPGEQ/UFSC, CDB. p.23. 1997.
- SPEECE, R.E. *Anaerobic Biotechnology for industrial wastewater*. Nechville: Archae Press, 394 p. 1996.
- STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L.; PAINTER, P.R. **The Microbial World**. 5^o Edition. Prentice-Hall, New Jersey. 1986.
- SUSARLA, S., YONEZAWA, Y., MASUNAGA, S. Reductive transformations of halogenated aromatics in anaerobic estuarine sediment: kinetics, products and pathways. **Water Research**, v. 32 (3), p. 639-48. 1998.
- SWANNELL, R. J. P.; MITCHELL, D.; WATERHOUSE, J. C.; MISKIN, I. P.; HEAD, I. M.; PETCH, S.; JONES, D. M.; LEE, K.; LEPO, J. E. Impact of bioremediation treatments on the biodegradation of buried oil and predominant bacterial populations. In: *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Edited by BELL C. R.; BRYLINSKY, M.; JOHNSOS-GREEN, P. Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology; 1999.
- SZEWZYK, U.; SCHINK, B. Degradation of hydroquinone, gentisate, and benzoate by a fermenting bacterium in pure and defined mixed culture. **Arch. Microbiol.** v. 151, p. 541–545. 1989.
- TAKEUCHI, R.; SUWA, Y.; YAMAGISHI, T.; YONEZAWA, Y. Anaerobic transformation of chlorophenols in methanogenic sludge unexposed to chlorophenols. **Chemosphere** v.41, p. 1457-1462. 2000.
- TARGA, H.J.; KLOCKOW, D. Air Pollution and vegetation damage in the tropics – the Serra dor as an example. KLOCKOW, D., TARGA, H.J., VAUTZ, W. ed São Paulo. (1997).
- TARTAKOVISKY, B.; LEVESQUE, M.J.; DUMORTIER, R.; BEAUDET, R; GUIOT, S.R. Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4357 -4362. 1999.

- TARTAKOVISKY, B.; MANUEL, M. F.; BEAUMIER, D.; GREER, C.W.; GUIOT, S.R. Enhanced Selection of an Anaerobic Pentachlorophenol – degradation consortium. **Biotechnology and bioengineering**, v. 73 n. 06. p. 476-483. 2000.
- TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. Molecular Identification of Bacteria from Coculture by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of 16S Ribosomal DNA Fragments as a Tool for Isolation in Pure Cultures. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 4210-4215. 1996.
- THIELE, J.H.; ZEIKUS, J.G. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: Significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. **Appl. Environ. Microbiol.** v.54, p. 20–29. 1988.
- TIEDJE, J. H.; BOYD, S.A.; FATHEPURE, B.Z. Anaerobic degradation of chlorinated aromatic hydrocarbons. **Dev. Ind. Microbiol.** v.27, p.117-127. 1987.
- TILMAN, D. Ecological competition between algae: Experimental confirmation of resource based competition theory. **Science**, v. 192, p. 463-465. 1977.
- TILMAN, D. Tests of resource competition theory using four species of Lake Michigan algae. **Ecology**, v. 62, n. 3, p. 802-815. 1981.
- TILMAN, D.; KIELSING, R.; STENER, R.; KILHAM, S. S.; JOHNSON, F.A. Green, bluegreen and diatom algae: Taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. **Arch. Hydrobiol.**, v. 106, n. 4, p. 473-485. 1986.
- TORSVIK, V. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biol. Biochem.** V.12, p.15-21 1980.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56, p 782-787.1990.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology: An Introduction**. Fourth edition. California –USA. 1991
- TOUZEL. J.P.; ALBAGNAC, G. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. **FEMS Microbiology Letters**, v.16, p. 241-245. 1983.

- TSAI, Y. L.; OLSON, B. H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediment. **Appl. and Environm Microbial**, p. 1070 – 1074. April, 1991.
- TSUNO, H.; KAWAMURA, M.; SOMIYA, I. Anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP) in a biological expanded-bed reactor. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 5-6, p. 335-344. 1996.
- VALLAEYS, T.; TOPP, E.; MUYZER, G.; MACHERET, V.; LSGUERRE, G.; RIGAUD, A.; SOULAS, G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiol. Ecology**, v.24, p. 279-285. 1997.
- VAZOLLER, R. F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, SP. 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. (1995).
- VAZOLLER, R. F. Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável: Microbiologia e Saneamento Ambiental. Texto apresentado no Workshop Biodiversidade: Oportunidade e perspectiva Tecnológicas. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br>. Acesso em: 12 dez.1996.
- VENOSA, A.D.; SUIDAN, M.T.; WRENN, B.A.; STROHMEIER, K.L.; HAIMES, J.R.; EDERHARDT, B.L.; KING, D.H.; HOLDER, E. Biorremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. **Environ. Sci. Technol.**, v. 30, p. 1764-1775. 1996.
- VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data on organic chemicals**. New York, 1983.363p.
- VISVANATHAN, C.; THU, L.N.; JEGATHEESAN, V; ANOTAI, J. Biodegradation of pentachlorophenol in a membrane bioreactor. **Desalination**, v.183, p. 455-464. 2005.
- VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: DESA/UFGM, 1996, 211p.
- Von WENTZINGERODE, F.; SELENT, B.; HEGEMAN, W.; GOBEL, V.B. Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene transforming microbial consortium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 283-286. 1999.

- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultivated microorganisms in a natural environment. **Nature**, v. 345, p. 63 – 65. 1990.
- WARIKOO, V.; Mc INERNEY, M.J.; ROBINSON, J.A.; SUFLITA, J.M. Interspecies acetate transfer influences the extent of anaerobic benzoate degradation by syntrophic consortia, **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, p. 26–32. 1996.
- WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HAMAMURA, N.; KADU, N. Diversity abundance and activity archaeal population in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62,, p. 4299-4301. 2002.
- WAWER, C.; MUYZER, G. Genetic Diversity of *Desulfovibrio spp.* In Environmental Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of (NiFe) Hydrogenase Gene Fragments. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2203-2210. 1995.
- WETZEL, R.G. **Limnology**. Saunders College, Philadelphia, 2. ed. 1983.767p.
- WIGGINGS, B. A., JONES, S.H., ALEXANDER, M.A. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 53, p. 791-796. 1987.
- WILD, S. R.; HARRAD, S. J.; JONES, K. C. Chlorophenols in digested U.K. sewage sludge. **Water Research**, v.27 (10), p.1527-34. 1993.
- WU, W.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, J.G. Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n. 02, p. 389-397. 1993.
- YANG, Y.; PESARO, M.; SIGLER, W.; ZEYER, J. Identification of microorganism involved in reductive dehalogenation of chlorinated ethenes in an anaerobic microbial community. **Water Research**. v. 39, p. 3954-3966. 2005.
- YE, F.X.; SHEN, D.S. Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. **Chemosphere**, v. 54, p.1573-1580. 2004.

ZHANG, X.; WIEGEL, J. Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in fresh water sediment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 1119-1127. 1990.

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

ANEXO 1

Resultado dos ajuste dos dados experimentais a diferentes isothermas de adsorção para todos os pontos experimentais.

C (mg/L)	q (mg/g)	Langmuir	$(q_{cal}-q_{obs})^2$	ER (Erro Relativo)	Freundlich	$(q_{cal}-q_{obs})^2$	ER
1,08	1,03	0,45	0,33	6,97	0,68	0,12	4,19
2,87	3,90	1,20	7,28	8,64	1,64	5,11	7,24
8,67	5,64	3,63	4,04	4,46	4,44	1,44	2,66
29,70	9,66	12,27	6,80	3,37	13,42	14,17	4,87
45,20	23,02	18,50	20,43	2,45	19,58	11,81	1,87
103,50	42,80	40,96	3,39	0,54	41,25	2,40	0,45
179,20	65,29	67,99	7,27	0,52	67,58	5,23	0,44
232,70	82,00	85,78	14,29	0,58	85,47	12,06	0,53
269,30	101,18	97,38	14,41	0,47	97,47	13,75	0,46
		Soma	63,83	27,52	Soma	52,35	22,25

Legenda: C – Concentração de Equilíbrio; q – valor adsorvido observado; $(q_{cal}-q_{obs})^2$ – Erro ao quadrado; ER – Erro relativo médio

C (mg/L)	q (mg/g)	Radke	$(q_{cal}-q_{obs})^2$	ER	Mathews	$(q_{cal}-q_{obs})^2$	ER
1,08	1,03	0,8372852	0,035236848	2,289204924	0,68030819	0,118812442	4,203558623
2,87	3,90	1,85096852	4,206730135	6,570449387	1,63952432	5,118796209	7,247807795
8,67	5,64	4,6978994	0,881534329	2,082078031	4,43346308	1,448019734	2,668484149
29,70	9,66	13,6604391	16,00351339	5,176551695	13,4210767	14,14569827	4,866817732
45,20	23,02	19,7700126	10,56241819	1,764762931	19,5808773	11,82756461	1,867464515
103,50	42,80	41,2753163	2,324660417	0,44529314	41,2501313	2,402093129	0,452648582
179,20	65,29	67,515794	4,954158913	0,426136084	67,5785563	5,237489864	0,438152145
232,70	82,00	85,4260181	11,73759982	0,522258852	85,4736837	12,06647829	0,529524951
269,30	101,18	97,4655913	13,79683197	0,45888623	97,4713457	13,75411691	0,458175322
	Soma	50,70585204	19,27673505	Soma	52,36495254	22,27445849	

C (mg/L)	q (mg/g)	Fritz	$(q_{cal}-q_{obs})^2$	ER	Linear	$(q_{cal}-q_{obs})^2$	ER
1,08	1,03	0,68	0,12	4,19	2,93	3,64	23,28
2,87	3,90	1,64	5,11	7,24	3,57	0,11	1,05
8,67	5,64	4,44	1,44	2,66	5,65	0,00	0,02
29,70	9,66	13,42	14,16	4,87	13,16	12,24	4,53
45,20	23,02	19,58	11,81	1,87	18,70	18,70	2,35
103,50	42,80	41,25	2,40	0,45	39,52	10,75	0,96
179,20	65,29	67,58	5,24	0,44	66,56	1,62	0,24
232,70	82,00	85,47	12,06	0,53	85,68	13,52	0,56
269,30	101,18	97,47	13,76	0,46	98,75	5,90	0,30
	Soma	52,35	22,26	Soma	60,58	32,99	

Legenda: C – Concentração de Equilíbrio; q – valor adsorvido observado; $(q_{cal}-q_{obs})^2$ – Erro ao quadrado; ER – Erro relativo médio

ANEXO 2

Matriz dos perfis do DGGE realizados com *primers* para o Domínio *Archaea* nos pontos 1, 3 e 5 do reator, antes da adição e após a saturação da biomassa com PCP, durante o ensaio de estudo de adsorção no RAHLF 1

N	1	2	3	4	5	6	H
1	X	X	X	X	X	X	6
2	X	X	X	X	X	X	6
3	X	X	X	X	X	X	6
4	X	X	X	X	X	X	6
5	X		X		X	X	4
6		X					1
7	X	X	X	X	X	X	6
8		X			X		2
9	X	X	X	X	X	X	6
10	X	X	X	X	X	X	6
11		X					1
12	X	X	X	X	X	X	6
13	X	X	X	X	X	X	6
14	X	X					2
15	X	X					2
16	X	X					2
17	X	X					2
18	X	X					2
19	X	X	X	X	X	X	6
V	16	18	11	10	12	11	

Legenda da Figuras: N = posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas); 1, 3, 5 – Pontos 1, 3 e 5 do reator antes da adição do PCP; 2, 4, 6 – Pontos 1, 3 e 5 do reator após a saturação da biomassa com PCP.

ANEXO 3

Matriz dos perfis do DGGE realizados com *primers* para o Domínio *Bacteria* nos pontos 1, 3 e 5, do reator, antes da adição e após a saturação da biomassa com PCP, durante o ensaio de estudo de adsorção no RAHLF 1

N	1	2	3	4	5	6	H
1		X					1
2		X		X			2
3		X					1
4	X	X	X	X	X	X	6
5	X	X	X		X		4
6	X						1
7	X		X		X		3
8		X		X		X	3
9	X		X		X		3
10	X						1
11		X		X	X	X	4
12	X	X					2
13	X	X		X	X	X	5
14		X					1
15				X		X	2
16	X	X	X		X		4
17					X		1
18						X	1
V	9	11	5	6	8	6	

Legenda da Figuras: N = posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas); 1, 3, 5 – Pontos 1, 3 e 5 do reator antes da adição do PCP; 2, 4, 6 – Pontos 1, 3 e 5 do reator após a saturação da biomassa com PCP.

ANEXO 4

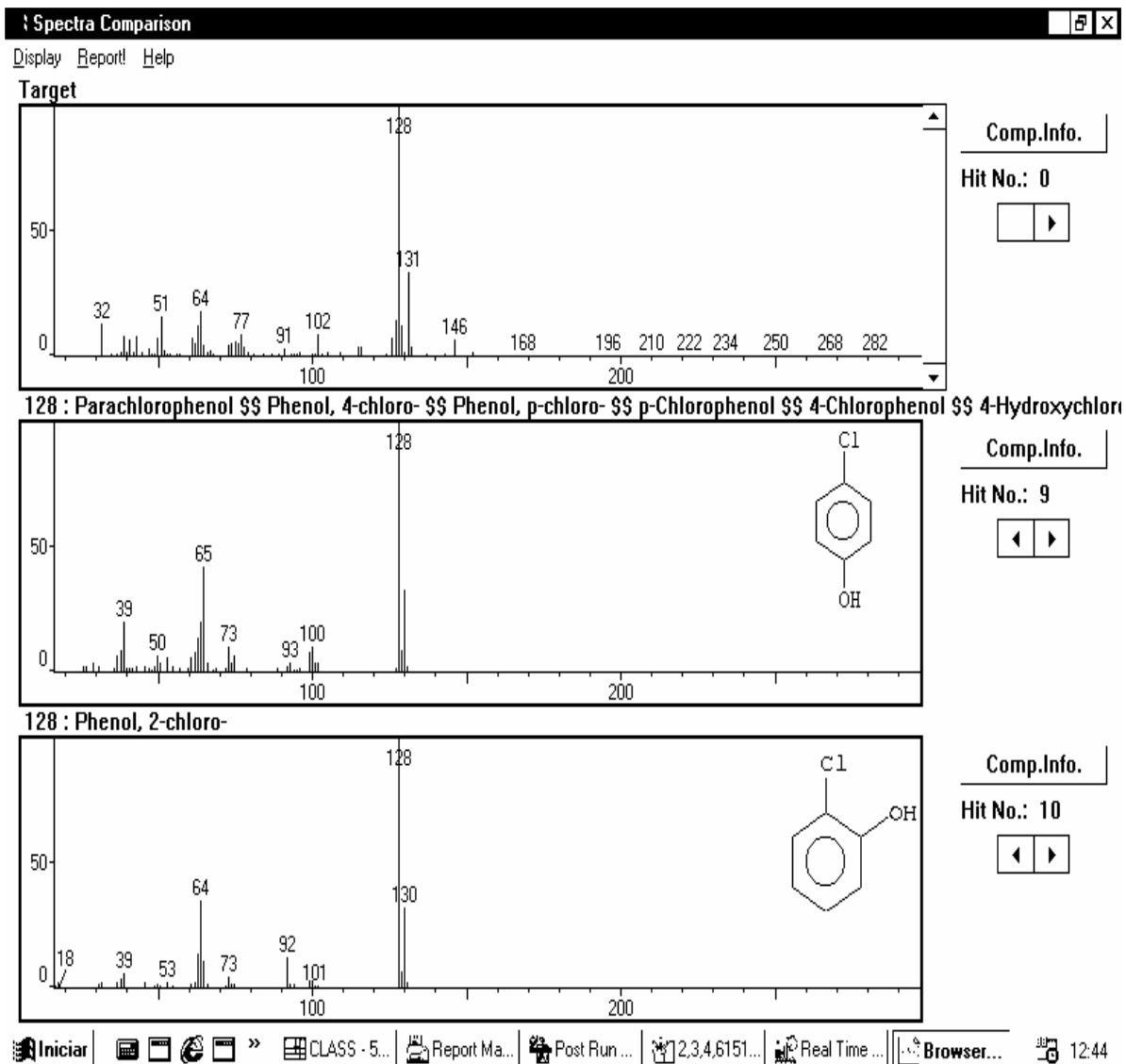
Matriz dos perfis do DGGE realizados com *primers* para o Domínio *Bactéria* no ensaio de avaliação do desempenho do inóculo na remoção de PCP em diferentes relações nutricionais (DQO:N:P)

N	1 (1)	2 (0:0)	3 (5:1)	4 (5:2)	5 (10:0)	6 (10:1)	7 (10:2)	8 (15:2)	9 (20:5)	10 (50:10)	11 (130:45)	H
1	X											1
2	X											1
3	X											1
4						X	X					2
5		X	X	X		X	X	X	X	X		8
6						X	X	X	X	X	X	6
7			X			X	X	X	X	X	X	7
8			X			X	X	X	X	X	X	7
9	X			X								2
10	X			X								2
11						X	X	X	X	X	X	6
12	X			X		X	X	X	X	X		7
13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	11
14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	11
15											X	1
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	11
17		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	10
18				X		X	X					3
19						X						1
20							X				X	2
21	X		X			X	X					4
22	X		X			X	X		X			5
23	X		X	X								3
24	X	X	X									3
25			X									1
26			X			X	X	X	X	X		6
27	X		X			X	X	X	X	X		7
28	X					X	X					3
29	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	10
30			X						X			2
31						X	X		X	X		4
32	X			X		X	X	X	X	X		7
V	17	6	16	12	5	21	21	14	17	15	11	

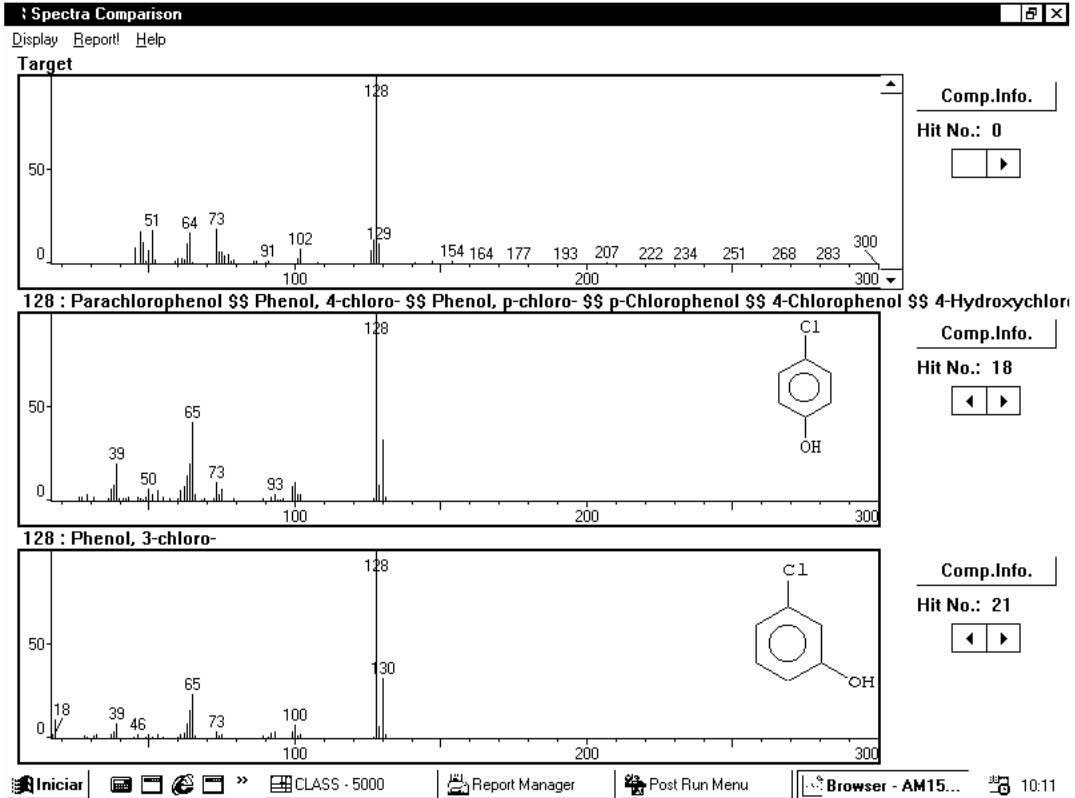
Legenda da Figuras: N = posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11: (Inoculo), (0:0), (5:1), (5:2), (10:0), (10:1), (10:2); (15:2); (20:5), (50:10), (130:45) em (N;P).

Anexo 5

Espectros de comparação resultante de análise em cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. Primeiro espectro é da amostra analisada. Os outros dois são os espectros dos compostos que apresentaram maior similaridade: 4 CP e 2 CP.

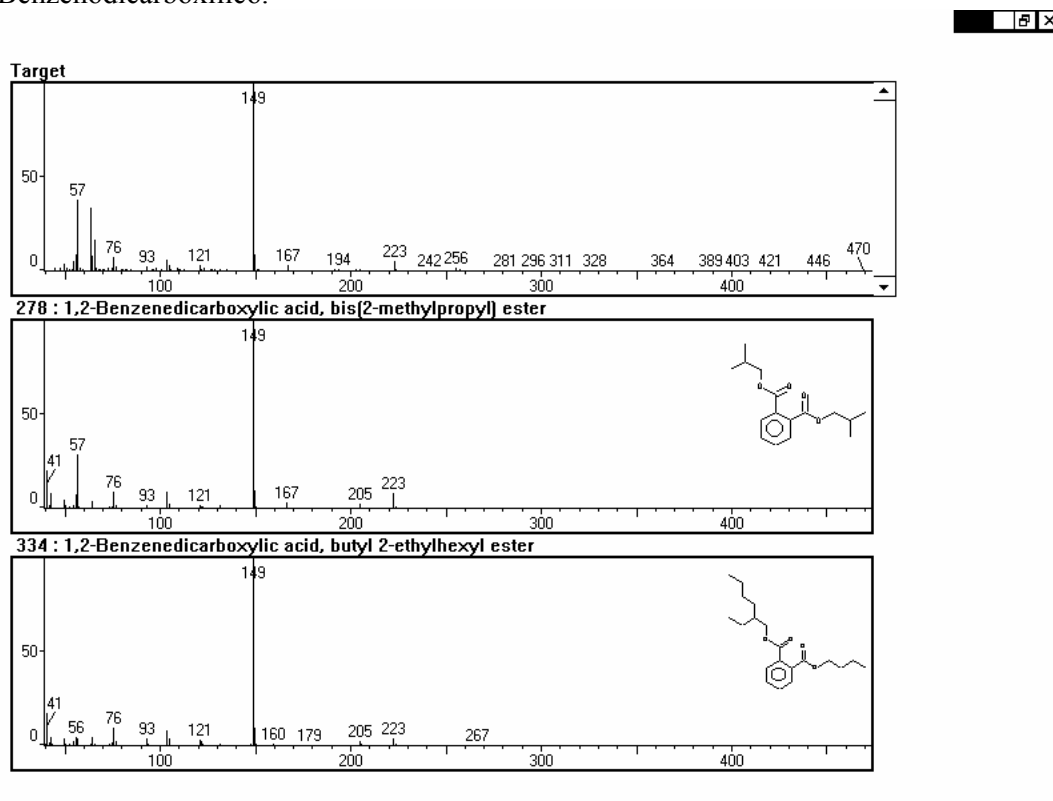


Espectro de comparação resultante de análise em cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. Primeiro espectro é da amostra analisada. Os outros dois são os espectros dos compostos que apresentaram maior similaridade: 4 CP e 3 CP.

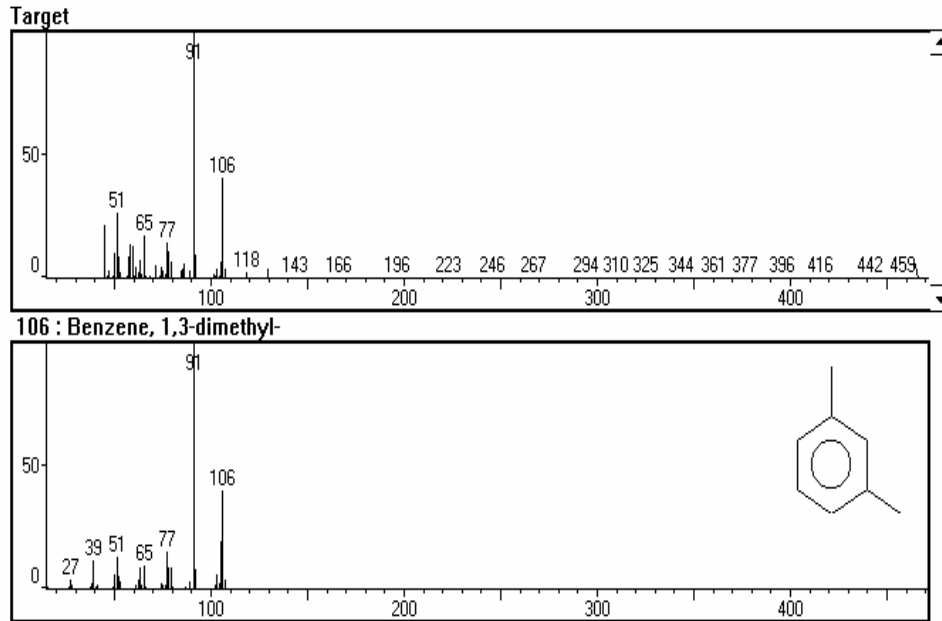


Anexo 6

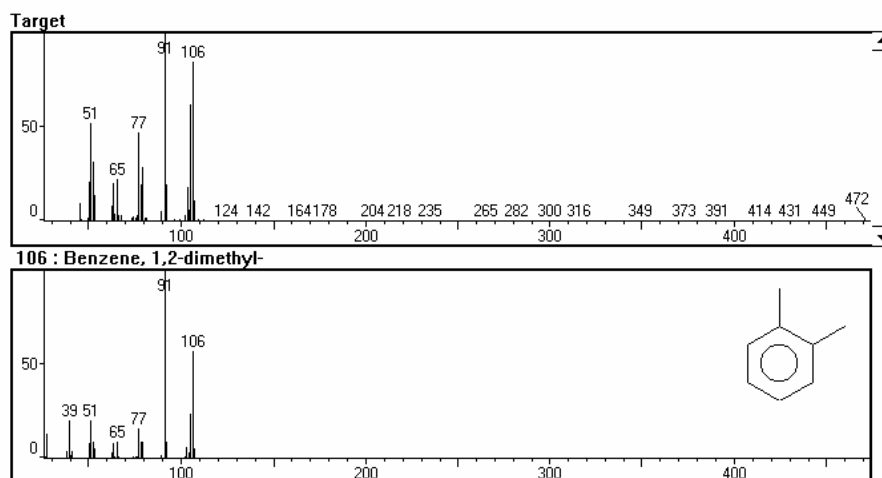
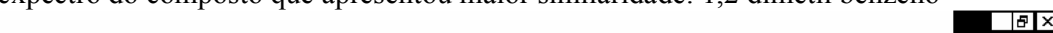
Espectro de comparação resultante de análise em cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. Primeiro espectro é da amostra analisada. Os outros dois são os espectros dos compostos que apresentaram maior similaridade: 1,2 Ácido Benzenedicarboxílico.



Espectro de comparação resultante de análise em cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. Primeiro espectro é da amostra analisada. Os outros é o espectro do composto que apresentou maior similaridade: 1,3 dimetil benzeno

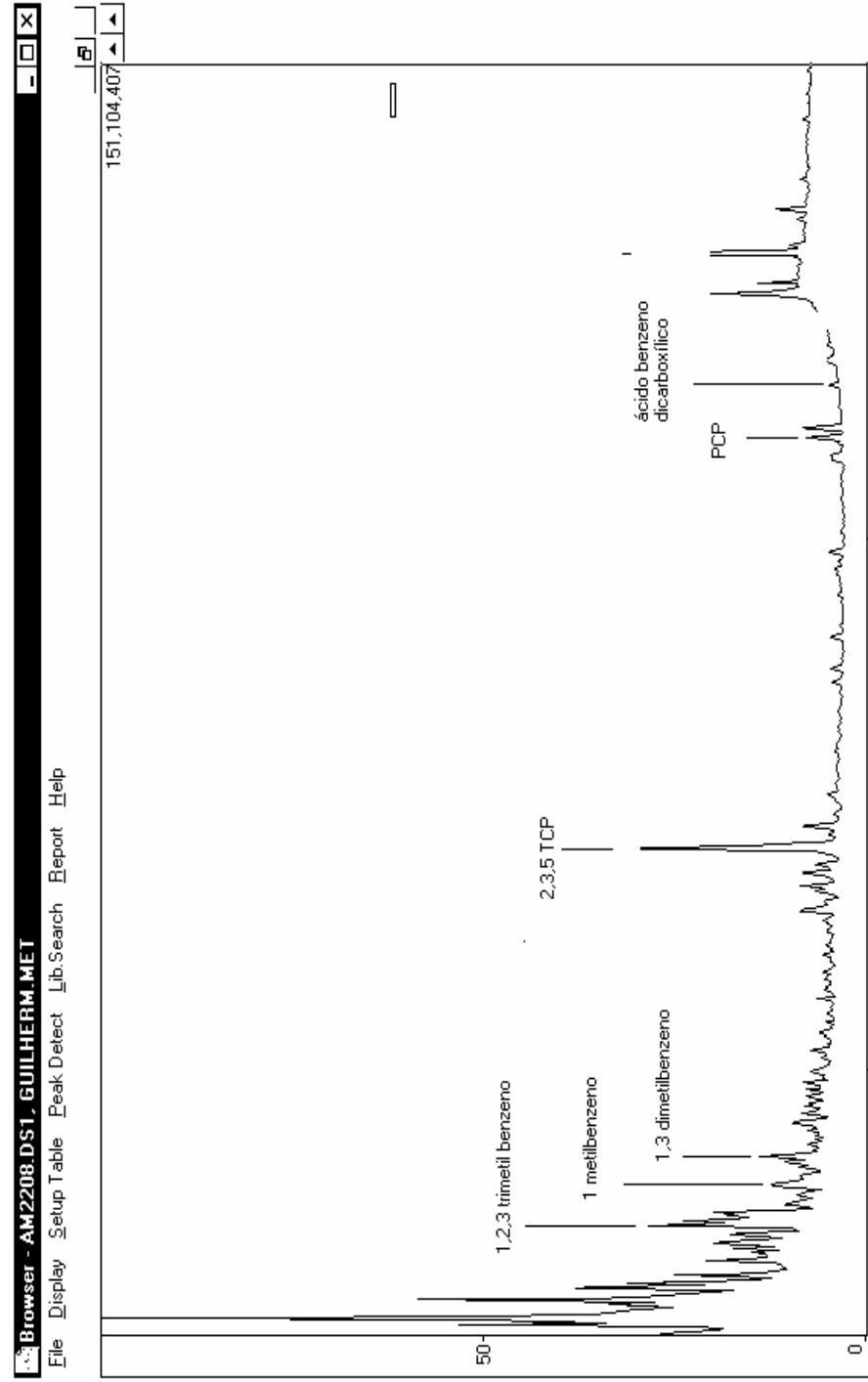


Espectro de comparação resultante de análise em cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. Primeiro espectro é da amostra analisada. Os outros é o espectro do composto que apresentou maior similaridade: 1,2 dimetil benzeno

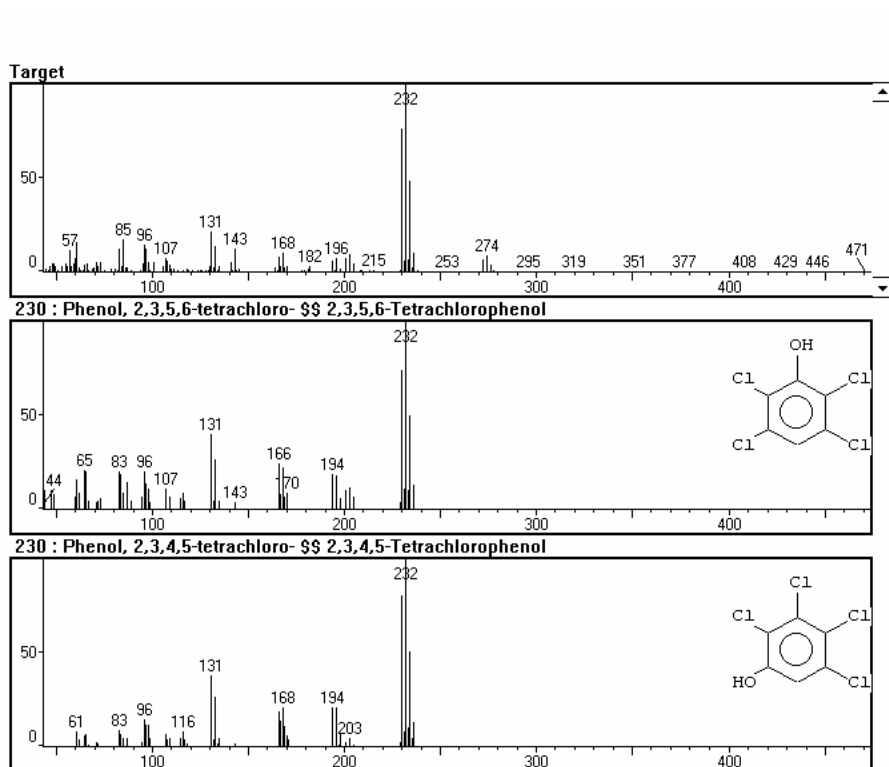


ANEXO 7

Cromatograma da amostra do efluente do reator durante operação com 10,0 mg/L do RAHLF 1.



Espectro de comparação resultante de análise em cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. Primeiro espectro é da amostra analisada. Os outros dois são os espectros dos compostos que apresentaram maior similaridade: 2,3,5,6 Tetraclorofenol e 2,3,4,5 TeCP.



ANEXO 8

Espectro de comparação resultante de análise em cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. Primeiro espectro é da amostra analisada. O outro é o espectro do composto que apresentou maior similaridade: Fenol

