

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
ENGENHARIA AMBIENTAL

**DEGRADAÇÃO E REMOÇÃO DE ALQUILBENZENO LINEAR  
SULFONADO EM REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE  
LEITO FIXO**

Aluno: Amanda Maria Tavares  
Orientador: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

Monografia apresentada ao curso de graduação  
em Engenharia Ambiental da Escola de  
Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo.

São Carlos, SP

2008

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

T231d

Tavares, Amanda Maria  
Degradação e remoção de alquilbenzeno linear sulfonado  
em reator anaeróbio horizontal de leito fixo / Amanda  
Maria Tavares ; orientador Maria Bernadete Amâncio  
Varesche. -- São Carlos, 2008.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São  
Paulo, 2008.

1. Surfactante. 2. LAS. 3. Reator anaeróbio. 4. Carvão  
vegetal. 5. Análise filogenética. I. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais, por toda ajuda,  
esforço e carinho que sempre me ofertaram.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelas oportunidades, amor e proteção.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche, pela instrução, paciência, oportunidade e disposição.

À Msc. Lorena Lima de Oliveira e à Prof. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte pelas dicas, ensinamentos, auxílio e paciência infindáveis, pela participação importante em todas as etapas do trabalho. Obrigada pela ajuda inestimável e por me ajudar a ir sempre em frente.

À Profa. Elisabeth Mattos Moraes, Maria Ângela Tallarico Adorno e Renata Médici pelo apoio e colaboração.

Aos meus colegas de iniciação científica Maurício, Matheus, Dagoberto e Ricardo, pela amizade e pelos bons momentos.

Aos amigos do LPB, em especial, Tatiana, Diego e Guilherme.

Ao CNPq pela bolsa de iniciação concedida.

Aos meus pais e irmão, Hélio, Maria e Fábio, pelo carinho, dedicação e apoio eternos.

À minha irmã, Simone, e namorado, Rogério, pelo apoio moral, imensa paciência, carinho e compreensão e por estarem comigo em todas as etapas do caminho.

À todos os meus amigos, pois tornam minha vida mais agradável, amenizando as dores e trazendo muitos momentos alegres.

## RESUMO

TAVARES, A. M. **Degradação e remoção de alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbio horizontal de leito fixo.** 2008. 113 f. Monografia, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a degradação do alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em condições anaeróbias, devido ao fato desse surfactante estar presente na formulação de diversos produtos de uso industrial e doméstico. O LAS representa mais de 40% de todo surfactante utilizado no mundo, merecendo especial atenção para sua ocorrência e destino no ambiente. Apesar de ser de difícil degradação, diversos estudos comprovaram sua biodegradabilidade, principalmente em condições aeróbias. Porém, ainda há discordância quanto à sua capacidade de metabolização em condições anaeróbias. Em decorrência desses fatores, utilizou-se um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) contendo biomassa imobilizada em carvão vegetal para tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 horas, resultando numa vazão de 100 mL/h. O reator foi alimentado, na etapa I, com sacarose, bicarbonato de sódio e extrato de levedura. Após 34 dias foram acrescentados  $5,2 \pm 1,5$  mg/L de LAS na alimentação (etapa II). Ao final de 117 dias, a sacarose foi retirada (etapa III) e essa condição foi mantida por 210 dias. Na etapa IV, que teve duração de 13 dias, foi retirado o extrato de levedura da alimentação. Verificou-se, por microscopia óptica de contraste de fase, aumento das células mortas dentro do reator nessa fase. Houve remoção média de aproximadamente  $47\% \pm 34\%$  do LAS, para concentração inicial média de  $5,3 \pm 1,7$  mg/L, durante o período experimental ( $62 \pm 31\%$ , na etapa II;  $40 \pm 33\%$ , na etapa III; e  $67 \pm 3\%$ , na etapa IV), e cerca de  $83\% \pm 9\%$  de matéria orgânica (DQO), para concentração inicial média de  $349 \pm 113$  mg/L. Tais resultados indicaram que a presença do LAS na alimentação não interferiu na remoção da matéria orgânica. Por meio do seqüenciamento de fragmentos do gene 16S RNAr foi possível identificar bactérias pertencentes aos Filos Deferribacteres, Proteobacteria, Spirochaetes, Firmicutes e Bacteriodetes, além da presença de bactérias não cultivadas. Algumas dessas possuindo mecanismos para desassimilação de sulfato e enxofre, e outras com a capacidade de degradar compostos aromáticos.

Palavras-chave: **surfactante, LAS, reator anaeróbio, carvão vegetal, análise filogenética.**

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 3.1: Estrutura do Alquilbenzeno Linear Sulfonado .....</i>	16
<i>Figura 4.1 – Fluxograma experimental .....</i>	28
<i>Figura 4.2 - Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo .....</i>	29
<i>Figura 5.1 – Variação temporal da eficiência de remoção de matéria orgânica .....</i>	43
<i>Figura 5.2 – Variação temporal da matéria orgânica bruta afluente e efluente (DQO) .....</i>	44
<i>Figura 5.3 – Variação temporal da matéria orgânica filtrada afluente e efluente (DQO).....</i>	44
<i>Figura 5.4 – Variação temporal da eficiência de remoção do LAS .....</i>	45
<i>Figura 5.5 – Variação temporal do LAS .....</i>	46
<i>Figura 5.6 – Variação da concentração de LAS na etapa IV.....</i>	47
<i>Figura 5.7 – Variação temporal do pH afluente e efluente .....</i>	49
<i>Figura 5.8 – Variação temporal da alcalinidade parcial afluente e efluente .....</i>	50
<i>Figura 5.9 – Variação temporal da alcalinidade total afluente e efluente.....</i>	51
<i>Figura 5.10 – Variação temporal da alcalinidade à bicarbonato efluente .....</i>	51
<i>Figura 5.11 – Variação temporal dos ácidos voláteis totais efluente .....</i>	55
<i>Figura 5.12 – Variação temporal do sulfato afluente e efluente .....</i>	56
<i>Figura 5.13 – Variação temporal do sulfeto afluente e efluente .....</i>	56
<i>Figura 5.14 – Pontos de amostragem e tempo teórico necessário para o líquido percorrer cada trecho do reator.....</i>	58
<i>Figura 5.15 – Variação espacial da matéria orgânica (DQO filtrada) no 34º dia de operação .....</i>	58
<i>Figura 5.16 – Variação espacial da DQO filtrada no 118º dia de operação .....</i>	59

<i>Figura 5.17 – Variação espacial da DQO filtrada no 231º dia de operação .....</i>	59
<i>Figura 5.18 – Variação espacial da DQO filtrada no 287º dia de operação .....</i>	59
<i>Figura 5.19 – Variação espacial do LAS no 118º dia de operação .....</i>	61
<i>Figura 5.20 – Variação espacial do LAS no 231º dia de operação .....</i>	61
<i>Figura 5.21 – Variação espacial do LAS no 298º dia de operação .....</i>	62
<i>Figura 5.22 – Variação espacial do LAS no 399º dia de operação .....</i>	62
<i>Figura 5.23 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 34º dia de operação .....</i>	64
<i>Figura 5.24 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 118º dia de operação .....</i>	64
<i>Figura 5.25 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 231º dia de operação .....</i>	65
<i>Figura 5.26 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 287º dia de operação .....</i>	65
<i>Figura 5.27 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 339º dia de operação .....</i>	66
<i>Figura 5.28 – Variação espacial do sulfato no 34º dia de operação .....</i>	68
<i>Figura 5.29 – Variação espacial do sulfato e sulfeto no 118º dia de operação .....</i>	68
<i>Figura 5.30 – Variação espacial do sulfato e sulfeto no 231º dia de operação .....</i>	69
<i>Figura 5.31 – Variação espacial do sulfato e sulfeto no 287º dia de operação .....</i>	69
<i>Figura 5.32 – Variação espacial do sulfato e sulfeto no 339º dia de operação .....</i>	70
<i>Figura 5.33 – Quantidade de LAS aplicada, efluente e removida em cada etapa .....</i>	73
<i>Figura 5.34 – Microscopia de contraste de fase de morfologias observadas no inóculo: (a) bacilos semelhantes à <i>Methanosaeta</i> sp., (b) bacilos, bacilos em cadeia e filamentos .....</i>	75
<i>Figura 5.35 – Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas, após 118 dias de operação: (a) e (b) bacilos, bacilos curvos e filamentos .....</i>	76
<i>Figura 5.36 – Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas, após 203 dias de operação: (a) bacilos curvos, (b) filamentos .....</i>	76

<i>Figura 5.37 – Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas , após 340 dias de operação: (a) filamentos, bacilos curvos, bacilos e (b) bacilos com endósporos</i>	76
<i>Figura 5.38 – Microscopia eletrônica de varredura do material suporte ao final da operação (340 dias de operação): (a) bacilos e (b) coco-bacilos e filamentos.....</i>	78
<i>Figura 5.39 – Árvore filogenética de consenso apresentando afiliação entre os clones (primers específicos para Domínio Bacteria). Árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining. ....</i>	82
<i>Figura 5.40 – Árvore filogenética de consenso apresentando afiliação entre os clones (primers específicos para Domínio Bacteria). Árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining. ....</i>	83

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 4.1 – Substrato sintético .....</i>	31
<i>Tabela 4.2 – Composição da solução de metais traço .....</i>	31
<i>Tabela 4.3 – Etapas de operação do reator .....</i>	33
<i>Tabela 4.4 – Freqüência e parâmetros das análises físico-químicas e cromatográficas .....</i>	34
<i>Tabela 4.5 – Composição do Meio LB .....</i>	38
<i>Tabela 4.6 – Composição da solução de acetato de potássio pH 4,8 .....</i>	39
<i>Tabela 4.7 – Composição da solução de GTE .....</i>	39
<i>Tabela 4.8 – Programação do termociclador para reações de seqüenciamento.....</i>	40
<i>Tabela 5.1 – Valores médios de DQO bruta e filtrada durante as etapas de operação .....</i>	43
<i>Tabela 5.2 – Concentração média de LAS durante as etapas de operação .....</i>	46
<i>Tabela 5.3 – Taxa de carregamento orgânico .....</i>	47
<i>Tabela 5.4 – Valores médios de pH afluente e efluente durante as etapas de operação .....</i>	50
<i>Tabela 5.5 – Concentração média de alcalinidade parcial, total e à bicarbonato e ácidos voláteis totais durante as etapas de operação .....</i>	52
<i>Tabela 5.6 - Concentração média de sulfato e sulfeto afluente e efluente durante as etapas de operação .....</i>	57
<i>Tabela 5.7 – Balanço de Massa do LAS.....</i>	72
<i>Tabela 5.8 – Quantidade de LAS afluente, efluente e removida em cada etapa .....</i>	73
<i>Tabela 5.9 – Concentração de sólidos do inóculo utilizado no reator .....</i>	74
<i>Tabela 5.10 – Concentração de sólidos no final do período operacional por grama de carvão .....</i>	74

<i>Tabela 5.11 – Afiliação das seqüências obtidas dos clones das amostras de biomassa do RAHLF .....</i>	79
<i>Tabela A.1 – Valores de monitoramento do LAS no reator.....</i>	106
<i>Tabela A.2 – Valores de monitoramento do pH e da DQO do reator .....</i>	107
<i>Tabela A.3 – Valores de monitoramento da alcalinidade do reator .....</i>	108
<i>Tabela A.4 – Valores de monitoramento do sulfato e sulfeto na terceira etapa de operação</i>	109
<i>Tabela B.1 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a primeira variação espacial (34º dia) .....</i>	111
<i>Tabela B.2 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a segunda variação espacial (118º dia) .....</i>	111
<i>Tabela B.3 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a terceira variação espacial (241º dia) .....</i>	111
<i>Tabela B.4 – Resultados da análise de ácidos voláteis durante a terceira variação espacial (241º dia).....</i>	112
<i>Tabela B.5 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a quarta variação espacial (287º dia) .....</i>	112
<i>Tabela B.6 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a quinta variação espacial (349º dia) .....</i>	112
<i>Tabela C.1 – Curvas de calibração para a determinação do LAS.....</i>	113

# SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
3.1. CARACTERÍSTICAS DOS AGENTES TENSOATIVOS.....	15
3.2. ALQUILBENZENO LINEAR SULFONADO.....	16
3.3. REMOÇÃO DO LAS .....	18
3.4. BIODEGRADAÇÃO DO LAS .....	19
3.5. REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO .....	22
3.6. MATERIAIS SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	24
3.7. TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1. DESCRIÇÃO DO RAHLF .....	29
4.2. MATERIAL SUPORTE .....	30
4.3. INÓCULO.....	30
4.4. COMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO SINTÉTICO .....	31
4.5. ETAPAS DE OPERAÇÃO .....	32
4.6. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS .....	33
4.7. EXTRAÇÃO DO LAS DO CARVÃO VEGETAL.....	34
4.8. ANÁLISE DE SÓLIDOS .....	35
4.9. EXAMES MICROSCÓPICOS.....	35
4.9.1 <i>Microscopia de contraste de fase</i> .....	35
4.9.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	36
4.10. ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA .....	36

4.10.1 Reação em cadeia da polimerase .....	37
4.10.2 Clonagem do Fragmento do gene RNAr 16S.....	37
4.10.3 Procedimento para Extração de Plasmídeo .....	38
4.10.4 Seqüenciamento do fragmento do RNAr 16S.....	40
4.10.5 Análise Filogenética .....	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1. OPERAÇÃO DO REATOR .....	42
5.2. VARIAÇÃO ESPACIAL .....	57
5.3. BALANÇO DE MASSA DE LAS.....	71
5.4. ANÁLISE DE SÓLIDOS .....	73
5.5. EXAMES MICROSCÓPICOS.....	75
5.6. ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	78
<b>6. CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>90</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO A – ANÁLISES DE MONITORAMENTO.....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO B – ANÁLISES ESPACIAIS .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO C – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO LAS .....</b>	<b>113</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) é um surfactante amplamente utilizado em produtos de limpeza doméstico e industrial, principalmente em indústrias têxteis e curtumes. Existem pelo menos duas razões para que o LAS seja o tensoativo mais importante: (1) suas rotas de fabricação são as mais eficazes e as mais econômicas, (2) possui diversas vantagens técnicas na formulação de detergentes que derivam da sua estrutura química e de suas propriedades físico-químicas. É considerado biodegradável e sua remoção de águas residuárias, provenientes do uso doméstico e industrial, tem se restringido a tratamentos biológicos convencionais, como lodos ativados e lagoas em série, o que pode não ser o suficiente para a sua remoção.

O LAS é lançado no ambiente, juntamente com seus intermediários, por meio do despejo direto de águas residuárias em corpos d'água, disposição de lodo de estações de tratamento em solos, e do lançamento de águas residuárias após tratamento biológico em estações convencionais (YING, 2006). Os despejos diretos e indiretos de LAS podem causar sérios problemas ambientais e de saúde pública (BASAR et al., 2004), visto que vários organismos que vivem nas águas receptoras de descargas são suscetíveis a bioconcentração e biotransformação do surfactante (ÁLVAREZ-MUÑOZ et al., 2007), podendo, inclusive, transmiti-lo por meio da cadeia alimentar aos seres humanos.

O LAS interfere na estabilidade da membrana plasmática de animais e plantas onde destrói os mecanismos de reação, diminuindo ou até interrompendo o funcionamento das células. Esse surfactante pode dissolver óleos na água e, também, dissolver substâncias tóxicas pouco solúveis que são liberadas no ambiente por meio dos efluentes não tratados de

indústrias (CHANG & JUANG et al., 2005). O LAS é bioacumulativo e, sendo assim, a sua concentração residual tem aumentado em plantas, rios e águas residuárias (CSERHÁTI et al., 2002).

Uma vez descartado em corpos d'água, o LAS tende a adsorver em sólidos suspensos, acumulando, posteriormente, nos sedimentos dos rios e mares. Essa dinâmica, conjuntamente com o arraste de sedimentos pelo movimento da água, leva ao acúmulo de LAS em ambientes costeiros, resultando em elevada concentração do surfactante na coluna d'água e nos sedimentos (HAMPEL et al., 2007). Considerando-se que as zonas costeiras são territórios para a reprodução de diversas espécies marinhas, e que o LAS pode apresentar toxicidade ainda não estudada para diversos organismos, a presença deste surfactante pode prejudicar a vida aquática, as comunidades ribeirinhas e todos os elementos dependentes dos estuários. Desse modo, torna-se importante o tratamento dos despejos industriais e residenciais e a remoção do surfactante das águas residuárias antes de seu lançamento nos corpos receptores.

Dentre as alternativas disponíveis para o tratamento de águas residuárias contendo compostos orgânicos, o tratamento biológico é o que oferece as melhores condições por apresentar custos relativamente reduzidos quando comparado ao tratamento fisico-químico. Sob condições aeróbias, a mineralização do LAS é realizada nos seguintes estágios: (1) degradação da cadeia alquílica; (2) degradação do grupo sulfonado; (3) degradação do anel benzênico. Contudo, ainda não se conhece o mecanismo de degradação da molécula do surfactante em condições anaeróbias.

A degradação do LAS por via anaeróbia vem sendo estudada recentemente no Brasil. Entre as diferentes configurações de reatores biológicos usados no tratamento de efluentes, o reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) em escala de bancada foi o mais aplicado no tratamento desse composto. Entretanto, reatores anaeróbios com biomassa imobilizada vêm sendo utilizados com sucesso no tratamento de diversas águas residuárias com

compostos xenobióticos, como águas contaminadas com substâncias presentes na gasolina (BTEX) (FERNANDES et al., 2005; GUSMÃO et al., 2005), aldicarbe (DAMASCENO et al., 2006) e LAS (OLIVEIRA et al., 2008; DUARTE et al., 2008).

O uso da biologia molecular para a identificação de microrganismos sem a necessidade de cultivo em laboratório possibilitou grande avanço na descoberta de novas espécies, mesmo com baixa concentração de material celular disponível, podendo auxiliar na identificação dos possíveis microrganismos responsáveis pela degradação do LAS.

Considerando-se os problemas ambientais causados pelo LAS e seu potencial para estabilização por via biológica, utilizou-se o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) preenchido com carvão vegetal para tratamento de água residuária contendo este surfactante, seguida de posterior identificação das bactérias envolvidas no processo por meio de técnicas de biologia molecular.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo Geral*

Avaliar a degradação e remoção do alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbio horizontal de leito fixo com biomassa imobilizada em carvão vegetal.

### 2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar a influência do LAS remoção temporal e espacial da matéria orgânica, medida como DQO, na presença do LAS;
- Avaliar a produção espacial de ácidos orgânicos voláteis;
- Proceder ao balanço de massa de LAS no RAHLF;
- Analisar a diversidade morfológica e filogenética de bactérias presentes no biofilme.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. *Características dos agentes tensoativos*

Agentes tensoativos são compostos orgânicos que possuem em sua molécula duas regiões distintas, uma hidrofóbica e outra hidrofílica. A parte hidrofóbica do tensoativo geralmente é composta de cadeias alquílicas ou alquilfenílicas, contendo de 10 a 18 átomos de carbono. Enquanto que a região hidrofílica é constituída por grupos iônicos ou não-iônicos ligados à cadeia carbônica (PENTEADO et al., 2006). Devido a essa estrutura, os agentes tensoativos diminuem a tensão superficial da água, favorecendo a remoção de gorduras, a limpeza de superfícies como roupas, louças, vidros, entre outros (MEZZANOTTE et al., 2003).

As fontes de surfactante são detergentes, dispersantes de óleo combustível, amaciantes de roupas, tintas e adesivos, biocidas, além dos produtos utilizados para remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos (SCOTT & JONES, 2000; CLARA et al., 2007). Esses compostos estão presentes em ampla variedade de resíduos líquidos, alguns dos quais podem ser tratados anaerobiamente, tais como, águas residuárias de indústria têxtil, águas residuárias que recebem temporariamente surfactantes devido à limpeza dos tanques de produção, esgoto doméstico, além de lodos de reatores com surfactante adsorvido (MÖSCHE & MEYER, 2002). O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) pode estar presente em solo usado para agricultura, inserido por meio da irrigação com águas contaminadas, aplicação de adubo ou lodo biológico, ou, também, uso de pesticida com detergente (OU et al., 1996).

Os surfactantes podem ser classificados quanto aos radicais hidrofílicos em: aniónicos, catiônicos, não-iônicos e anfóteros (BORSATO et al., 1999). De acordo com a carga superficial da molécula do surfactante, dependerá sua toxicidade, persistência e biodegradabilidade. Dentre as espécies de surfactante, os catiônicos são os que possuem maior toxicidade (CSERHÁTI et al., 2002).

### 3.2. *Alquilbenzeno Linear Sulfonado*

Alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) é um surfactante aniónico que foi introduzido no mercado em 1964, como substituto prontamente biodegradável para o tetrapropileno sulfonado que, devido à grande quantidade de ramificações de sua molécula, foi proibido de ser comercializado (SCOTT & JONES, 2000; MANOUSAKI et al., 2004). É composto por uma mistura de vários homólogos, constituindo cadeias carbônicas de diferentes comprimentos, contendo entre dez e quatorze átomos de carbono. Cada homólogo possui um anel aromático sulfonado na posição *para*, em qualquer local da molécula, exceto nos carbonos terminais (Figura 3.1) (MATTHIJS & DE HENAU, 1987).

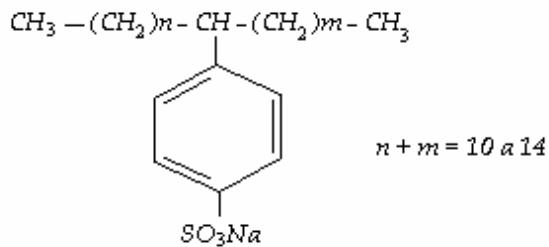


Figura 3.1: Estrutura do Alquilbenzeno Linear Sulfonado

Em 2000, o consumo de LAS foi estimado em aproximadamente 2,5 milhões de toneladas por ano, representando cerca de 40% de todo o surfactante utilizado no mundo (SANZ et al., 2000).

O LAS é responsável por sérios problemas de poluição ambiental, podendo apresentar toxicidade, de acordo com a concentração, para diversos organismos vivos. Entre os problemas relacionados ao acúmulo de LAS nos recursos hídricos, destacam-se efeitos relacionados com a diminuição dos elementos necessários à vida aquática como, por exemplo, oxigênio dissolvido, devido à diminuição da tensão superficial água/ar; diminuição da permeabilidade da luz, por manter as partículas presentes em suspensão (PENTEADO et al., 2006).

Entretanto, como efeito positivo, o surfactante pode auxiliar na remoção de outros poluentes ao englobá-los na camada formada pela sua interação com a superfície de sólidos, devido ao processo de adsorção. O LAS pode, inclusive, auxiliar a degradação destes poluentes ao torná-los disponíveis aos microrganismos, e, por conseguinte a formação de substâncias menos tóxicas (CSERHÁTI et al., 2002).

Ressalta-se, contudo, que a solubilização de compostos pouco solúveis em água, como óleos e algumas substâncias tóxicas, pode prejudicar a biota de rios e lagos, podendo causar inclusive o enfraquecimento e morte de peixes (HOFER et al., 1995; HARRISON et al., 1999; CHANG & JUANG et al., 2005).

O LAS interfere, também, na estabilidade da membrana plasmática de animais e plantas, além de inibir processos como a acetogênese e metanogênese da digestão anaeróbia realizadas por células procarióticas, tais como bactérias e arquéias, respectivamente (GAVALA & AHRING, 2002). A ligação do LAS com proteínas pode resultar na alteração do formato da cadeia polipeptídica e na mudança das cargas superficiais dessa molécula. Tais modificações podem levar à perda da função (CSERHÁTI et al., 2002). Em sistemas de lodos

ativados a presença de LAS influencia fortemente a morfologia e atividade dos flocos, tornando-os menores e mais circulares (LIWARSKA-BIZUKOJC & BIZUKOJC, 2006), podendo prejudicar o tratamento das águas residuárias e esgoto doméstico.

### **3.3. *Remoção do LAS***

A remoção do LAS do meio líquido pode ocorrer por processos físicos, como a adsorção e precipitação, por meio da formação de sais de LAS, ou processos bioquímicos, como a degradação do surfactante em compostos com cadeias carbônicas menores por via aeróbia e anaeróbia.

Os processos físicos (adsorção, sedimentação, etc.) são controlados pela dureza da água e representam menos de 10 % do total de LAS removido em águas moles e em torno de 30-35% em águas duras devido, principalmente, à alta precipitação de  $\text{Ca}(\text{LAS})_2$ , que é um composto estável (BERNA et al., 1989). Ressalta-se que esse processo é mais expressivo para compostos com cadeia alquílica maior (GARCIA et al., 2005) e em estuários e ambientes costeiros, onde a atividade metabólica dos microrganismos é menor do que nas águas continentais. Nesses ambientes, a forma predominante de remoção do LAS é por meio da precipitação com a formação de sais de magnésio e cálcio (EICHHORN et al., 2002).

Como consequência da precipitação do LAS, tem-se a diminuição da toxicidade aquática devido, principalmente, à redução geral da concentração da fração solúvel e, mais especificadamente, dos homólogos mais pesados, que são mais tóxicos (VERGE et al., 2001).

### **3.4. Biodegradação do LAS**

No tratamento biológico ocorre a degradação, que consiste na transformação de um composto químico pela atividade metabólica de microrganismos, que podem respirar aerobiamente, utilizando o oxigênio molecular, ou anaerobiamente, utilizando outros aceptores de elétrons. A eficiência desse processo depende da temperatura, pois esta se relaciona diretamente com o metabolismo dos microrganismos responsáveis pela degradação. Sendo assim, deduz-se que o potencial de contaminação representado por efluentes contendo LAS tem importante fator sazonal. No inverno, os efeitos adversos causados pela descarga direta desse composto em rios são mais acentuados devido ao menor coeficiente de degradação (PERALES et al., 1999).

Dentre as alternativas disponíveis para o tratamento de águas residuárias contendo compostos orgânicos, o tratamento biológico é o que oferece as melhores condições por apresentar custos relativamente reduzidos quando comparado ao tratamento físico-químico.

O perfil de remoção de LAS é complexo, mesmo durante o tratamento biológico, pois este envolve processos de adsorção/absorção, principalmente no lodo, que pode transformar certa fração biodegradável do LAS em indisponível para os microrganismos (CONRAD et al., 2006), precipitação de sais insolúveis e degradação para metabólitos não definidos com cinéticas desconhecidas (SANZ et al., 2003).

Os fatores que interferem na biodegradação são: a concentração de oxigênio dissolvido, complexação com tensoativos catiônicos, formação de sais insolúveis, presença de outros nutrientes orgânicos e variação do pH durante a degradação (PENTEADO et al., 2006), além da possibilidade do anel aromático ser biorresistente (SCHÖRBEL, 1989). Sua

degradação requer consórcio de bactérias que atuem em diferentes partes da molécula, alterando a cadeia alquílica, anel benzênico e grupo sulfonado (MONGENSEN et al., 2003).

Culturas mistas de microrganismos aeróbios podem degradar o LAS (SCHÖRBEL, 1989) em etapas definidas como biodegradação primária e final (SCOTT & JONES, 2000). Na biodegradação primária a estrutura do composto muda o suficiente para a molécula perder as suas propriedades surfactantes enquanto que, na biodegradação final, ocorre a formação de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ), água ( $\text{H}_2\text{O}$ ), sais minerais e biomassa (WHITE & RUSSEL, 1994).

Apesar de ser facilmente degradado aerobiamente, alguns ambientes possuem naturalmente condições anaeróbias, tais como, a maior parte de águas subterrâneas contaminadas, sedimentos, lodo proveniente de estações de tratamento de águas residuárias, além de estações que utilizam tecnologia anaeróbia para tratamento de resíduos. Nessas condições é possível também constatar a degradação do LAS (ZHANG & BENETT, 2005).

O tratamento anaeróbio possui algumas vantagens em relação ao tratamento aeróbio, entre as quais se destacam: (a) produção de menores volumes de lodo, consistindo em economia no manejo e destino final do resíduo do sistema de tratamento; (b) baixo consumo de energia elétrica, não requer o uso de vasta gama de equipamentos mecânicos e possuem operação e construção simples; (c) possibilidade de funcionar adequadamente mesmo após longos períodos de interrupção, o que é particularmente importante para efluentes sazonais; (d) possibilidade de recuperação e utilização do gás metano como combustível. Sistemas anaeróbios são especialmente recomendados quando a aclimatação do reator, ou seja, aquecimento do reator, não é requerido, visto que este aspecto pode tornar o processo economicamente inviável (ANDRADE NETTO & CAMPOS, 1999; FORESTI et al., 1999).

Dentre as desvantagens do tratamento anaeróbio, pode-se citar: (a) longo tempo de partida do sistema se não há disponibilidade de inóculo adequado; (b) sensibilidade do processo a mudança das condições ambientais, tais como, pH, temperatura, sobrecargas

orgânicas e hidráulicas; (c) possibilidade de emissão de odores ofensivos (ANDRADE NETTO & CAMPOS, 1999; FORESTI et al., 1999).

Contudo, apesar de vantajoso, diversos autores relacionaram a presença do LAS no tratamento anaeróbio como prejudicial à metanogênese. Durante muito tempo, o LAS foi considerado inacessível à biodegradação anaeróbia (FEDERLI & SCHWAB, 1992), exercendo efeito tóxico por meio da inibição imediata e subsequente decréscimo da atividade bacteriana. Maiores tempos de exposição ao surfactante, assim como concentrações elevadas acarretam a diminuição da atividade bacteriana, devido ao aumento da possibilidade de contato entre microrganismos e surfactante (MÖSCHE & MEYER, 2002).

Garcia et al. (2006) avaliaram a digestão anaeróbia de lodo em reatores em batelada com diferentes concentrações do surfactante. Os autores encontraram valores insignificantes para a transformação biológica do LAS em condições anaeróbias, atribuindo a biodegradação ocorrida em seus experimentos a alguma difusão inicial de oxigênio.

Entretanto, Shcherbakova et al. (1999) concluíram que não há restrições para o uso do tratamento anaeróbio em águas residuárias no que se refere aos processos de fermentação dos surfactantes e de seus produtos intermediários, sendo que seu sucesso deve-se principalmente à escolha adequada das condições de tratamento e da adaptação do lodo.

Mongensen et al. (2003) avaliaram a remoção de LAS e formação de benzoaldeído em reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) com volume de 0,2 L alimentados com meio mínimo composto de água destilada com adição de nutrientes, vitaminas e bicarbonato de sódio. O primeiro reator (controle) foi mantido sem LAS. O segundo foi alimentado com 10 mg/L de LAS e esterilizado três vezes após a inoculação para considerar apenas a adsorção do surfactante no lodo. O terceiro foi alimentado com 10 mg/L de LAS. O surfactante foi a única fonte de carbono e energia. No reator esterilizado ocorreu remoção de 10% de LAS em 432 horas, apenas por adsorção (não foi detectada produção de metano). No reator com

biomassa granulada ativa ocorreram 37% de remoção do LAS, durante o mesmo período.

Todos os reatores foram operados com tempo de retenção hidráulica de 12 horas.

Sanz et al. (2003) concluíram que a biodegradação ocorre inclusive na ausência de fontes externas de carbono, indicando que o surfactante pode ser parcialmente utilizado como fonte de carbono e energia por bactérias anaeróbias. A presença de LAS nas concentrações de 4-5 mg/L não inibiram a atividade anaeróbia.

Duarte (2006) utilizou dois reatores anaeróbios de leito fixo (RAHLF) para avaliar a degradação do LAS. O autor obteve remoção de cerca de 91% do LAS na ausência de outras fontes de carbono. Todavia, na presença de outras fontes orgânicas a remoção foi de, aproximadamente, 50%, para concentração afluente de 14 mg/L, em ambos os reatores. Essa remoção deveu-se a processos de adsorção e degradação biológica.

Khleifat (2006) estudou a biodegradação do LAS por consórcio de bactérias anaeróbias facultativas (*Pantoea agglomerans* e *Serratia odorifera*) e constatou que essas bactérias foram capazes de crescer em meio contendo apenas LAS. O autor verificou também que a capacidade de degradação foi maior em cultura mista do que em culturas puras constatando, portanto, interações positivas entre as espécies na degradação do surfactante.

Diante desses trabalhos verificou-se a perspectiva de degradação do LAS por via anaeróbia.

### **3.5. *Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo***

Os biorreatores horizontais de leito fixo apresentam diversas vantagens sobre os reatores de mistura (batelada), como construção e manutenção simples (peças de reposição

são facilmente encontradas no mercado), possibilidade de preparar diferentes configurações internas com o uso de materiais suportes disponíveis pela indústria, menor número de parâmetros cinéticos precisam ser conhecidos para o aumento de escala, além das condições de fluxo ser favorável no caso de inibição e/ou diminuição dos bioprocessos cinéticos (SANTEK et al., 2006).

O uso de material de enchimento leve, poroso e com alta superfície específica proporciona a retenção de grande quantidade de microrganismos no interior do reator, devido à imobilização da biomassa em filme bacteriano, a qual permite a obtenção de altas velocidades de tratamento, possibilitando a utilização de altas taxas e, consequentemente, de volume reacional menor em relação ao reator de mistura (KATO et al., 1999). Processos utilizando biomassa imobilizada são menos sensíveis à presença de materiais tóxicos e inibidores que os processos utilizando biomassa suspensa e garantem a retenção das células dentro do reator (ZAIAT, 1996).

O RAHLF foi desenvolvido por Zaiat et al. (1994) e utilizado inicialmente por Foresti et al. (1995) para o tratamento de água residuária de indústria de papel reciclado, atingindo 86% de remoção da matéria orgânica (DQO) no décimo dia de operação, demonstrando rápida adaptação e crescimento da biomassa. Sua concepção possibilita a integração dos sistemas de coleta e tratamento, podendo minimizar os problemas dos esgotos sanitários existentes (KATO et al., 1999). Devido ao sucesso inicial da aplicação do RAHLF, ele foi utilizado para o tratamento de outras águas residuárias contendo diferentes compostos xenobióticos.

### ***3.6. Materiais suporte para imobilização da biomassa***

A utilização de material suporte permite elevadas concentrações de biomassa dentro do reator, resultando em elevado tempo de retenção celular para relativamente baixos tempos de detenção hidráulica. Diversos materiais suporte têm sido estudados e utilizados desde a concepção do RAHLF. Cada material suporte permite o crescimento de comunidades bacterianas específicas, sendo que melhor adesão de biomassa é obtida em reatores preenchidos com material poroso, resultando em maiores eficiências de tratamento.

Oliveira (2006) utilizou dois reatores horizontais de leito fixo para estudar a degradação do LAS em diferentes materiais suportes para a imobilização da biomassa. Um dos reatores foi preenchido com carvão vegetal (RAHLF 1), e o outro, com espuma de poliuretano (20% do volume) e argila expandida (80% do volume) (RAHLF 2). Os reatores foram alimentados com 14 mg/L de LAS, com tempo de detenção hidráulica de 12 horas, seguindo as etapas listadas a seguir: (1) esgoto sintético, confeccionado com extrato de levedura (230 mg/L), bicarbonato de sódio (400 mg/L), sacarose (410 mg/L) e solução de micronutrientes, por 32 dias; (2) esgoto sintético com a adição de 14 mg/L de LAS por 276 dias; (3) esgoto sintético sem sacarose e 14 mg/L de LAS por 7 dias; (4) somente 14 mg/L de LAS por 30 dias. Os resultados obtidos indicaram a capacidade de ambos os reatores degradarem biologicamente o LAS em 28% para o RAHLF 1 e 27% para o RAHLF 2, ao final do tempo de operação (343 dias). O autor concluiu, com esse trabalho, que o reator utilizando biomassa imobilizada em carvão vegetal foi mais eficiente, visto que apresentou reduzida adsorção e maior coeficiente cinético de degradação.

Devido aos resultados obtidos por Oliveira (2006) e, acrescentando-se o baixo custo do carvão vegetal, decidiu-se pelo uso deste como material suporte para imobilização da biomassa.

### ***3.7. Técnicas de biologia molecular***

A identificação de microrganismos anaeróbios envolvidos nos sistemas de tratamento de águas residuárias é muito limitada. Essa limitação pode ser parcialmente atribuída às técnicas convencionais de microbiologia, relacionadas ao isolamento, cultivo em placas e número mais provável (NMP), além da necessidade de se isolar os microrganismos em culturas puras (SINGLETON & SAINSBURY, 1981; DUARTE, 2006), podendo tornar os procedimentos seletivos, uma vez que podem favorecer o crescimento de microrganismos adaptados ao meio de cultivo. Estima-se que apenas pequena fração dos microrganismos, menos que 10% em solos e menos que 1% em ambientes aquáticos, é usualmente recuperada em estudos baseados em isolamento e cultivo (CANHOS & MANFIO, 2001).

Os métodos tradicionais também não geram informações sobre as relações evolutivas entre os organismos, o que deveria ser a base para um sistema de classificação (HUNGENHOTLZ & PACE, 1996).

Estima-se que são conhecidos menos que 1% das bactérias e arquéias existentes na biosfera. O número de espécies de bactérias descrita na literatura vem crescendo nos últimos anos em virtude do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular, que possibilitam a análise de seqüências de DNA a partir de material genômico extraído diretamente de amostras ambientais (CANHOS & MANFIO, 2001).

A partir de 1972 uma série de descobertas revolucionou o estudo da genética e permitiu o surgimento de uma “nova ciência”, a genética molecular ou engenharia genética – um conjunto de técnicas onde um determinado fragmento de DNA (ácido desoxirribonucléico) é isolado e os genes são purificados, examinados e manipulados. Houve, então, o desenvolvimento da tecnologia de clonagem, que consiste na purificação de genes ou cópia deles para reproduzi-los em grande número na bactéria hospedeira (GARCIA & CHAMAS, 1996).

Por meio das técnicas de biologia molecular, que se baseiam na lise bacteriana, extração do DNA e RNA, amplificação do 16S RNAr por PCR e posterior caracterização por clonagem e seqüenciamento (FAORO, 2006), tornou-se possível a obtenção de material genético a partir de amostras biológicas diversas, muitas vezes em quantidade exígua (MARESCA & KOBAYASHI, 1994). Muitas dessas técnicas permitem a detecção, identificação, quantificação e visualização de microrganismos, sem a necessidade de cultivá-los previamente em laboratório (DORIGO et al, 2005). Esse aspecto é importante principalmente no caso de identificação de bactérias anaeróbias, visto que seu cultivo é dificultado pela falta de conhecimento sobre o meio nutricional a ser utilizado e devido à dificuldade em se manter condições anaeróbias de cultivo.

Com o advento das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciamento de DNA, os métodos moleculares, especialmente aqueles baseados no estudo da seqüência de genes do RNAr 16S, têm sido muito úteis na descoberta de novos microrganismos e criam a perspectiva do acesso, não somente a número maior de espécies, como também, a informações sobre a distribuição geográfica, relações ecológicas, atividade celular e a proporção numérica entre diferentes populações microbianas quando em seus ambientes naturais, sendo essas informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias de isolamento e cultivo de novos microrganismos em laboratório (AMANN et al., 1995).

Nesse trabalho foram utilizadas técnicas tradicionais, tais como microscopia de contraste de fase, microscopia eletrônica de varredura, além da técnica de PCR, clonagem e seqüenciamento de fragmentos do gene 16S RNAr.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 4.1 está apresentado o fluxograma do trabalho realizado.

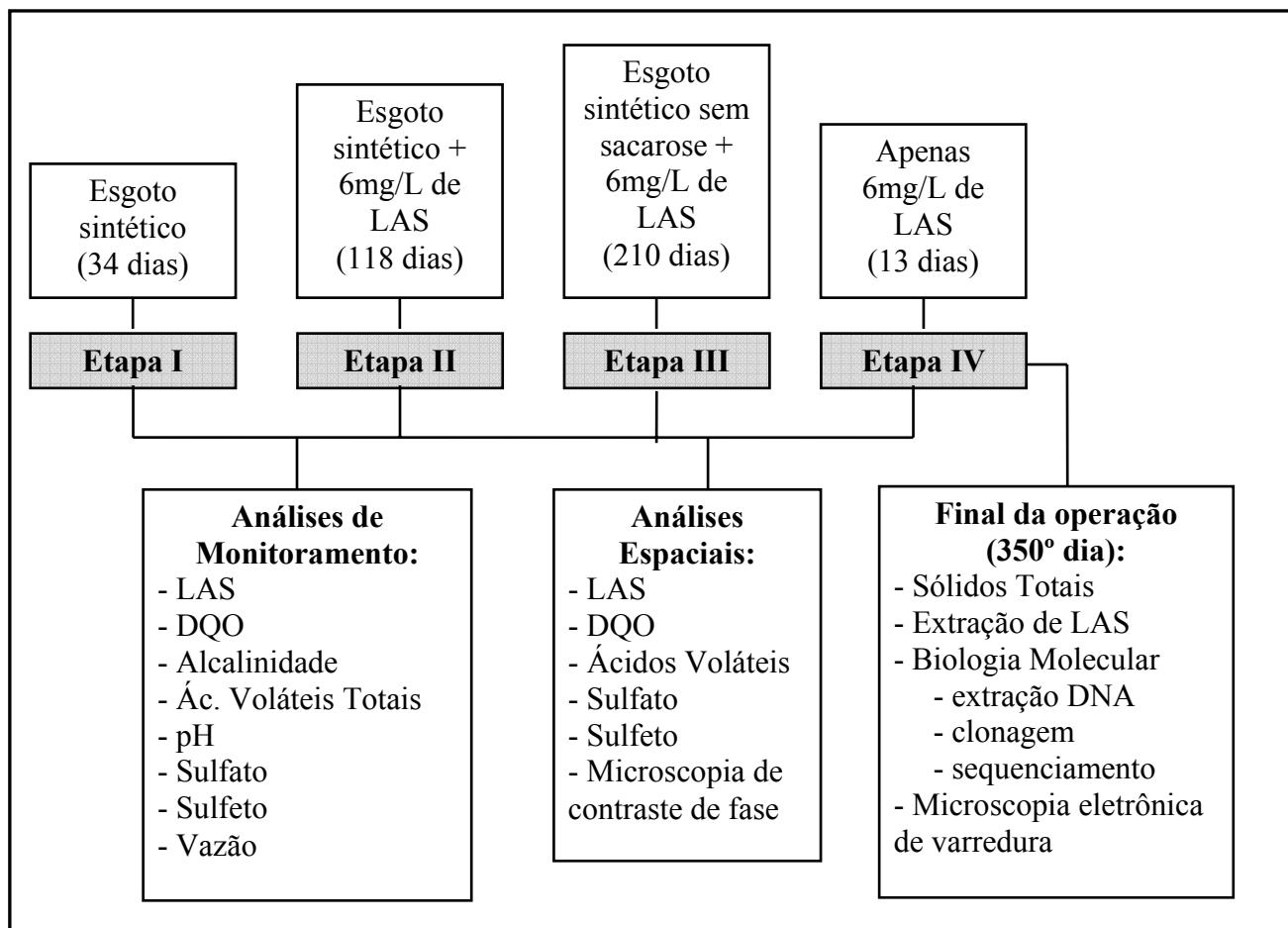


Figura 4.1 – Fluxograma experimental

#### 4.1. *Descrição do RAHLF*

Utilizou-se um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (Figura 4.2) para avaliar a remoção do LAS em condições anaeróbias. O tempo de detenção hidráulica aplicado foi de 12 horas, com vazão de 100 mL/h, baseada no volume útil de 1350 mL. O reator foi inoculado com lodo proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura (UNESP Botucatu). Foram analisadas amostras do afluente e efluente, periodicamente durante 340 dias de operação.

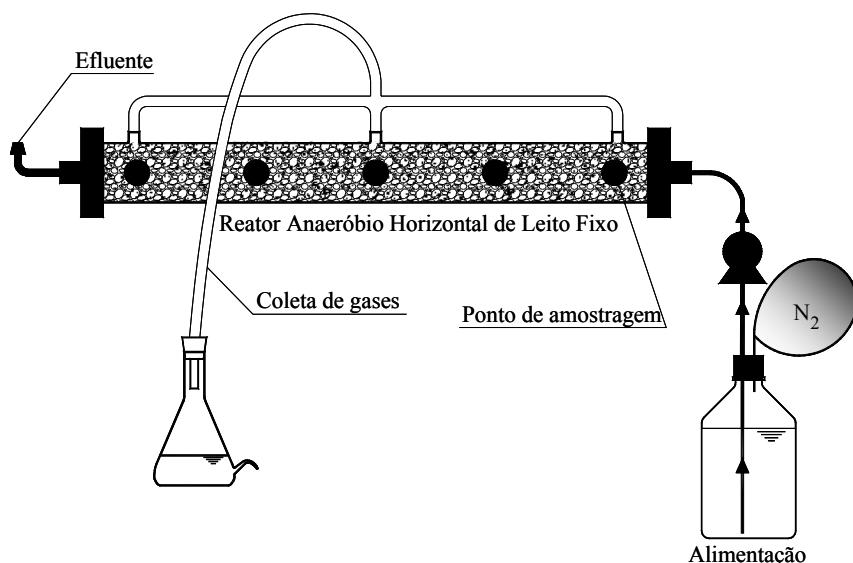


Figura 4.2 - Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo

O reator utilizado nesse trabalho (Figura 4.2) foi confeccionado em vidro borossilicato com 100 cm de comprimento (L) e 5 cm de diâmetro interno (D), com relação comprimento por diâmetro (L/D) de 20 e volume de 2000 mL. Na parte superior do reator foram colocadas tomadas para coleta e saída de gases. Ao longo do comprimento do reator foram instalados cinco pontos de amostragem líquida e sólida em posições correspondentes a L/D iguais a 1, 6, 10, 14, 19.

O reator foi condicionado em câmara climatizada com temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### **4.2. *Material suporte***

O reator foi preenchido com 348 gramas de carvão vegetal com tamanho entre 4,0 e 5,6 mm e densidade aparente de 273 g/L, resultando numa porosidade de 49%. Esse material foi escolhido por apresentar reduzida adsorção e valor de coeficiente cinético de degradação maior do que argila expandida e espuma de poliuretano (OLIVEIRA, 2006).

#### **4.3. *Inóculo***

O material suporte foi primeiramente mantido em estufa a 100°C por 24 horas de modo a evaporar a água presente em seus poros. Em seguida, o carvão foi colocado em sistema fechado juntamente com 1,5 L de lodo de reator UASB utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura da UNESP de Jaboticabal. O sistema foi mantido sem agitação por 24 horas.

O carvão com biomassa aderida foi inserido no reator e iniciou-se as atividades de operação e monitoramento.

#### 4.4. *Composição do substrato sintético*

O substrato sintético formulado por Torres (1992) foi utilizado como base para o meio nutricional, que foi armazenado em frasco de Duran de 5,0 L, mantido sob refrigeração. O substrato sintético utilizado está descrito na Tabela 4.1. Na Tabela 4.2 está discriminada a composição da solução de metais traço.

O surfactante utilizado foi o dodecilbenzeno sulfonado de sódio (Sigma) também conhecido como LAS comercial, com pureza de 80%. O restante corresponde a sulfato de sódio (15%) e impurezas orgânicas (5%) provenientes da fabricação. Pesou-se 1,25 g do LAS comercial e diluiu-se em 1 L de água destilada para a obtenção de solução estoque de 1 g/L de LAS.

*Tabela 4.1 – Substrato sintético*

Componentes	Concentração (mg/L)			
	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV
Bicarbonato de sódio	400	400	400	400
Extrato de levedura	500	500	500	0
Sacarose	80	80	0	0
LAS	-	6	6	6
Solução de sais (Tabela 4.2)	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL

Fonte: modificado de Torres (1992)

*Tabela 4.2 – Composição da solução de metais traço*

Sais inorgânicos	Concentração (g/L)
NaCl	50,0
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,4
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,9

Fonte: Torres (1992)

As etapas para a preparação do substrato sintético foram:

- 1) A solução de metais traço (Tabela 4.2) foi preparada previamente e mantida sob refrigeração em frasco âmbar de 1,0 L;
- 2) A solução estoque de LAS na concentração de 1g/L foi mantida sob refrigeração em frasco âmbar de 1,0 L;
- 3) Extrato de levedura, bicarbonato e sacarose foram pesados quinzenalmente e mantidos em frascos tampados sem umidade, à temperatura ambiente;
- 4) Adaptou-se bexiga de borracha ao frasco de alimentação preenchida com nitrogênio ( $N_2$  100%) visando à manutenção do meio anaeróbio.

#### ***4.5. Etapas de Operação***

As etapas de operação estão descritas a seguir:

- (I) Alimentação com substrato sintético modificado (Tabela 4.1), sem LAS, por 34 dias;
- (II) Alimentação com substrato sintético modificado (Tabela 4.1) e 6 mg/L de LAS, por 83 dias;
- (III) Retirada da sacarose e alimentação com 6 mg/L de LAS por 210 dias;
- (IV) Retirada do extrato de levedura por 13 dias e amostragem diária do LAS efluente.

Durante a operação foram analisadas amostras retiradas dos pontos de amostragem dos reatores. Com os resultados obtidos foi possível determinar a concentração de LAS, DQO, sulfato, sulfeto e ácidos orgânicos ao longo de toda a extensão do reator, podendo-se estabelecer, dessa maneira, a variação espacial do reator. Essas análises foram realizadas conforme explicitado na Tabela 4.3, que também descreve as etapas operacionais.

*Tabela 4.3 – Etapas de operação do reator*

<b>Etapa</b>	<b>Alimentação</b>	<b>Duração (dias)</b>	<b>Variação espacial (dia)</b>
I	Substrato sintético modificado	34	34º
II	Substrato sintético modificado + 6 mg/L de LAS	83	118º
III	Substrato sintético modificado sem sacarose + 6 mg/L de LAS	210	231º, 287º
IV	400 mg/L de bicarbonato + 5 mL de solução de metais traço (Tabela 4.2) + 6 mg/L de LAS	13	339º

#### **4.6. Análises físico-químicas e cromatográficas**

As análises das amostras do afluente e efluente do reator seguiram a freqüência e os parâmetros apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Freqüência e parâmetros das análises físico-químicas e cromatográficas

Parâmetro	Método	Freqüência	Referência
pH (unidade)	Potenciométrico	1 x por semana	-
DQO bruta (mg/L)	Espectrofotométrico	1 x por semana	APHA (1998)
DQO filtrada (mg/L)	Espectrofotométrico	1 x por semana e Perfil	APHA (1998)
Ácidos voláteis totais (mg HAc/L)	Titulométrico	1 x por semana	DILLALO & ALBERTSON (1961)
Alcalinidade (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	Titulométrico	1 x por semana	DILLALO & ALBERTSON (1961) modificado por RIPLEY et al. (1986)
LAS (mg/L)	Cromatográfico (HPLC)	1 x por semana e Perfil	DUARTE et al. (2006a)
Sulfeto (μg/L)	Espectrofotométrico	1 x por semana e Perfil	APHA (1998)
Sulfato (mg/L)	Espectrofotométrico	1 x por semana e Perfil	APHA (1998)
Ácidos Voláteis (mg/L)	Cromatográfico (GC)	Perfil	MORAES (2001)
Vazão (mL/h)	Volumétrico	3 x por semana	-

#### 4.7. Extração do LAS do carvão vegetal

A metodologia de extração de LAS foi desenvolvida para amostras de lodo (DUARTE, 2006). No entanto, o método foi testado para extração em carvão vegetal e verificou-se eficiência de 100%.

O método modificado consistiu nas seguintes etapas: pesar o carvão seco em estufa (100°C), transferi-lo para frasco apropriado (Falcon de 50 mL), adicionar por três vezes 50 mL de metanol puro, mantendo em banho de ultra-som a 50° C por 30 minutos, retirar o

sobrenadante e armazená-lo em frasco de 200 mL, antes da adição seguinte de metanol. Adicionar 20 mL de água ultrapurificada (Mili-Q) no carvão, mantendo em banho de ultrasom por mais 30 minutos e coletar o sobrenadante. Evaporar o extrato obtido em banho-maria a 60º C até volume final de 40 mL. Filtrar em membrana de 0,22 µm e analisar no HPLC.

#### **4.8. *Análise de Sólidos***

Foi realizada a análise em duplicata de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) do inóculo e de amostras coletadas ao final do período de operação, segundo metodologia de APHA (1998).

Antes da realização da análise dos sólidos presentes no carvão ao final do período operacional, o material suporte foi lavado com água destilada e agitado lentamente para desprendimento dos sólidos, que foram, então, transferidos para cápsulas e seguiram o procedimento padrão de determinação de sólidos. O carvão foi seco em estufa e sua massa foi mensurada para a obtenção da proporção de sólidos por grama de carvão.

#### **4.9. *Exames Microscópicos***

##### **4.9.1 *Microscopia de contraste de fase***

A microscopia de contraste de fase foi realizada ao final de cada fase e conjuntamente com a realização das análises espaciais.

Durante cada análise espacial, retiraram-se amostras de carvão, que foram armazenadas em frascos de antibiótico em geladeira por período inferior a uma semana.

Os frascos receberam alguns mililitros de água e foram agitados durante 20 minutos, de modo a remover a massa microbiana do carvão. Lâminas de vidro previamente limpas com álcool receberam a adição de uma camada de ágar 2%. Após a solidificação deste, uma gota da amostra microbiana de cada frasco foi adicionada e recoberta com a lamínula. As lâminas foram examinadas em microscópio Leica de contraste de fase e fluorescência, acoplado à câmera Optronics com captura de imagem e software Pro-Plus. Essa análise foi realizada para avaliar a diversidade morfológica da biomassa microbiana no reator.

#### ***4.9.2 Microscopia eletrônica de varredura***

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada após a desativação do reator segundo metodologia adaptada por Araújo et al. (2003) para filmes microbianos.

#### ***4.10. Análise da diversidade microbiana***

A análise da diversidade microbiana presente no reator foi realizada utilizando a técnica de PCR, seguida de clonagem e seqüenciamento do DNA extraído de amostras coletadas após a finalização da operação do reator. A extração do DNA foi realizada segundo protocolo de Griffiths et al.(2000).

#### **4.10.1 Reação em cadeia da polimerase**

Na amplificação dos fragmentos do gene RNAr 16S, por reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados *primers* específicos (oligonucleotídeos sintéticos) p27F e p1100R, homólogos às extremidades conservadas do gene RNAr 16S de bactérias (LANE, 1991).

Na reação de amplificação dos fragmentos do RNAr 16S das amostras foram utilizadas as seguintes soluções: 0,4 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs (GE Health Care), 2 unidades de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico.

O programa do termociclador para amplificação do gene RNAr 16S seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 10 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento, começando com 69°C e diminuindo 0,5°C por ciclo e 3 minutos a 72°C para extensão; seguido de mais 10 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento a 63°C e 3 minutos a 72°C para extensão. Para cada amostra foram feitas 10 réplicas da reação de PCR.

#### **4.10.2 Clonagem do Fragmento do gene RNAr 16S**

Foi realizada a clonagem das amostras de RNAr 16S após a ampliação por PCR. Primeiramente, realizou-se a adenilação utilizando 3 µL de PCR purificado; 1 µL de tampão com MgCl<sub>2</sub>; 1 µL de dATP; 1 µL de taq polimerase; 4 µL água ultra purificada estéril. Incubou-se a 70°C por 30 minutos no termociclador.

Em seguida foi realizada a ligação do vetor pGEM com a amostra. Para tal, misturou-se 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µL de vector pGEM easy, 2 µL do produto de PCR

adenilado, 1  $\mu$ L T4 DNA ligase e 1  $\mu$ L de água ultra purificada estéril com pipeta e incubou-se por 1 hora em temperatura ambiente.

Células competentes (*Escherichia coli*) que estavam armazenadas a -80°C foram mantidas em banho de gelo por 5 minutos. Misturou-se, então, 2  $\mu$ L do produto de ligação às células. Estas foram aquecidas em banho-maria a 42°C durante 50 segundos, sem agitação. Os tubos foram agitados manualmente e mantidos em banho de gelo por 2 minutos. Adicionou-se 200  $\mu$ L de meio LB (Tabela 4.5) à temperatura ambiente.

Incubou-se os tubos por 45 minutos, com agitação de 150 rpm. Duas placas de Petri contendo ampicilina/IPTG/X-Gal foram preparadas com a utilização de 28  $\mu$ L ampicilina na concentração (0,5 g em 10 mL de água), 47  $\mu$ L de IPTG (23 mg/mL) e 64  $\mu$ L de X-Gal (40 mg/mL).

Ressalta-se que as placas ficaram em repouso por 30 minutos antes do uso. 100  $\mu$ L do produto de transformação (conteúdo dos tubos) foram adicionados em cada placa e incubou-se a 37°C por 24 horas.

*Tabela 4.5 – Composição do Meio LB*

<b>Nutrientes</b>	<b>g/L</b>
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	5
Agar	15

#### **4.10.3 Procedimento para Extração de Plasmídeo**

Para extração do plasmídeo das células competentes que receberam o inserto foram utilizadas as seguintes soluções: acetato de potássio (Tabela 4.6), GTE (Tabela 4.7), SDS NaOH, etanol 95%, etanol 70%, água ultra purificada.

Tabela 4.6 – Composição da solução de acetato de potássio pH 4,8

Componentes	mL
Solução de KCl 5M	100
Ácido acético glacial	19,17
Água ultra purificada	47,5

Tabela 4.7 – Composição da solução de GTE

Componentes	mL
Solução de glicose 1M	1,25
Solução TRIS 1M	0,62
Solução de EDTA 0,5M	0,5
Água ultra purificada	23

O seguinte procedimento foi realizado: 1,5 mL da cultura crescida de *E. coli* com o inserto foram centrifugados por 5 minutos a 4°C em 10000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* formado foi ressuspensiondo em 100 µL de GTE por 5 minutos e agitado em vortex. Foram adicionados 200 µL da solução de NaOH SDS e os tubos foram agitados manualmente e colocados em gelo por 5 minutos. Adicionou-se 150 µL de acetato de potássio e levou-se ao vortex, manteve-se em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4°C a 10000 rpm e o sobrenadante (400 µL) foi transferido para um novo tubo onde foram adicionados 800 µL de etanol 95% e mantidos por 2 minutos a temperatura ambiente. Novamente, os tubos foram agitados em vortex e centrifugados por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado, *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado e o sobrenadante descartado. Deixou-se secar por 4 horas. Após esse período o *pellet* foi ressuspensiondo com 30 µL de água ultra-purificada estéril e adicionou-se 1 µL de RNAase (10mg/L).

#### 4.10.4 Seqüenciamento do fragmento do RNAr 16S

A eficiência de extração dos plasmídeos foi verificada em gel de agarose por eletroforese. O DNA plasmidial foi amplificado por PCR utilizando o *set de primers* M13f (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') e M13r (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3'). O programa de amplificação foi realizado como descrito a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94°C, 20 segundos para anelamento a 60°C, e 1,5 minutos de extensão a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram purificados com kit GFX 96 PCR Purification (GE Healthcare).

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado Big Dye Terminator (Applied Biosystem) com nucleotídeos marcados. Foram utilizados 2µL de Big Dye, 3 µL de produto de PCR purificado, 4µL de *primer*, 0,5 µL de tampão e 0,5 µL de água ultra-purificada estéril, totalizando 10 µL. Os tubos foram colocados em termociclador, cujas temperaturas de anelamento foram específicas para cada *primer* (Tabela 4.8).

*Tabela 4.8 – Programação do termociclador para reações de seqüenciamento*

Desnaturação	Anelamento	Extensão
94°C por 15 segundos	50°C por 15 segundos (M13F) 38°C por 45 segundos (968F) 55°C por 30 segundos (1100F)	60°C por 4 minutos

Para a precipitação do DNA foram adicionados 40 µL de isopropanol a 65%, e mantiveram-se os tubos à temperatura ambiente durante 15 minutos. Centrifugou-se a 14.000 rpm a 20°C por 30 minutos.

O isopropanol foi removido do tubo por inversão. Ao precipitado foram adicionados 200 µL de etanol a 60%. Novamente, centrifugou-se nas mesmas condições anteriores por 5 minutos. O etanol foi removido com auxílio de pipeta automática. As amostras foram

mantidas à temperatura ambiente até a evaporação total do etanol, pois a presença de etanol resulta em manchas e dificulta a análise de DNA.

Os *pellets* formados foram ressuspensos em 20 µL de formamida Hi- Di e submetidos a choque térmico (94°C por 4 minutos e 4°C por 4 minutos) em termociclador, a fim de desnaturar o DNA.

#### ***4.10.5 Análise Filogenética***

As seqüências parciais do gene RNAr 16S obtidas foram verificadas no programa computacional DNA Star e no site da NCBI, e comparados com as seqüências de RNAr 16S de organismos representados na base de dados do Genbank e RDP (Ribosomal Database Project, USA). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas segundo o método Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi realizada pelo método de Neighbor-Joining utilizando o programa MEGA versão 4 (KUMAR et al., 2001).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. *Operação do reator*

Na etapa I pretendeu-se adaptar e favorecer o desenvolvimento da biomassa proveniente do inóculo, de modo a torná-la capaz de resistir à presença do surfactante, o qual foi colocado posteriormente (etapa II). Essa etapa teve duração de 34 dias e remoção média de  $79 \pm 5\%$  e  $75 \pm 6\%$  da matéria orgânica, medida como DQO bruta e filtrada (Figura 5.1), respectivamente, para concentrações iniciais médias de  $587 \pm 183$  mg/L e  $403,6 \pm 68,6$  mg/L (Tabela 5.1, Figuras 5.2 e 5.3). Ressalta-se que os dados completos do monitoramento se encontram no Anexo A. No 25º dia houve remoção de 89% para DQO bruta e 84% para DQO filtrada, sendo as maiores eficiências obtidas nesse período. A partir da obtenção de tais valores de remoção, concluiu-se que a biomassa presente no reator estava bem adaptada e apta para a mudança das condições de alimentação.

Durante a etapa II, a remoção da matéria orgânica teve pouca variação em relação à etapa anterior. A DQO bruta afluente foi em média de  $430,5 \pm 79,2$  mg/L e a filtrada de  $295,3 \pm 97,8$  mg/L, sendo a eficiência de remoção média de 83% em ambos os casos. Os altos valores obtidos na remoção da DQO demonstraram que o LAS não interferiu na degradação da matéria orgânica.

A terceira etapa foi a de maior duração (210 dias). Manteve-se o extrato de levedura como importante fonte de vitaminas e aminoácidos para a manutenção dos processos

metabólicos da biota existente no reator. A remoção da matéria orgânica nessa etapa experimental foi de 82% para DQO bruta e 85% e para DQO filtrada, considerando valores afluentes médios de  $410 \pm 107$  mg/L e  $360 \pm 124$  mg/L, respectivamente. Esse fato sugere que, mesmo com o prolongado uso do surfactante e retirada da sacarose da alimentação, o reator continuou apresentando boa remoção da matéria orgânica afluente.

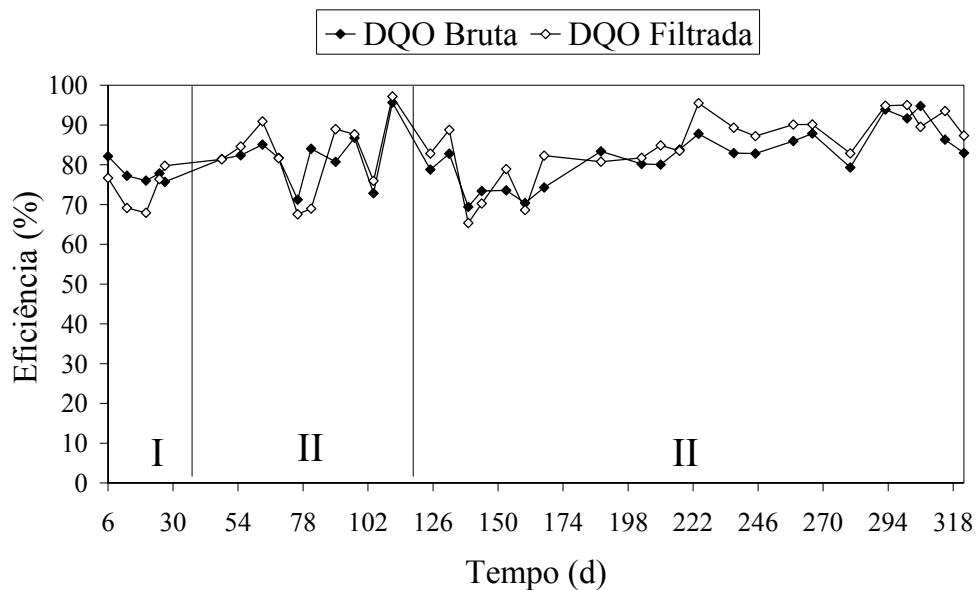


Figura 5.1 – Variação temporal da eficiência de remoção de matéria orgânica

Tabela 5.1 – Valores médios de DQO bruta e filtrada durante as etapas de operação

Etapa	DQO (mg/L)					
	Bruta		Filtrada			
	Afluente	Efluente	Eficiência (%)	Afluente	Efluente	Eficiência (%)
I	$587 \pm 183$	$119,4 \pm 41,3$	$79 \pm 5$	$403,6 \pm 68,6$	$101,8 \pm 35,7$	$75 \pm 6$
II	$430,5 \pm 79,2$	$68,5 \pm 19,8$	$83 \pm 7$	$295,3 \pm 97,8$	$45,2 \pm 17,6$	$83 \pm 9$
III	$410 \pm 107$	$68 \pm 21$	$82 \pm 7$	$360 \pm 124$	$49 \pm 19$	$85 \pm 8$
IV	-	-	-	-	-	-

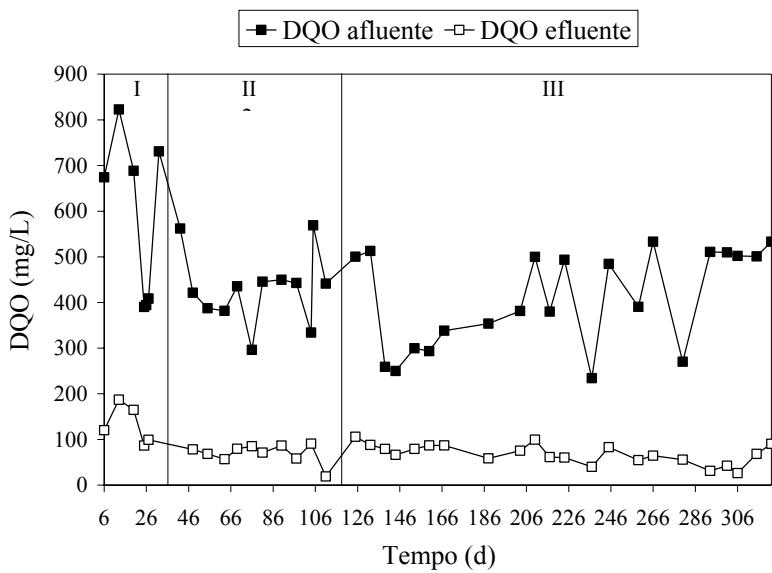


Figura 5.2 – Variação temporal da matéria orgânica bruta afluente e efluente (DQO)

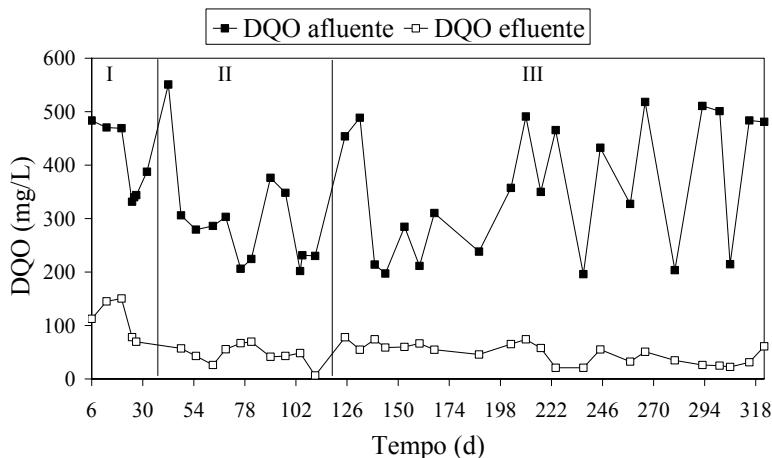


Figura 5.3 – Variação temporal da matéria orgânica filtrada afluente e efluente (DQO)

A eficiência de remoção de LAS (Figuras 5.4 e 5.5) foi de aproximadamente 62% na etapa II, para concentração afluente média de  $5,2 \pm 1,5$  mg/L (Tabela 5.2). Provavelmente, essa eficiência está relacionada predominantemente à adsorção do surfactante as partículas de carvão, principalmente nos primeiros 30 dias de operação.

A remoção do LAS na etapa III foi, em média, 28% para concentração média afluente de  $5,4 \pm 1,3$  mg/L. Essa diminuição da remoção de LAS em relação à etapa anterior pode estar relacionada à saturação do material suporte com o surfactante. A partir do 293º dia, no

final dessa etapa, verificou-se certa estabilização do reator, com remoção de  $92 \pm 19\%$  do LAS, para concentração média de  $4 \pm 2$  mg/L. Esse aumento na remoção pode ter ocorrido devido à possível estabilização do reator em relação a esse parâmetro, demonstrando, provavelmente, a adaptação das bactérias ao surfactante, abrindo a possibilidade de remoção do extrato de levedura sem decorrer em prejuízos sérios à operação.

Na etapa IV ocorreram as maiores mudanças nos parâmetros físico-químicos analisados. Houve remoção média de aproximadamente  $67 \pm 3\%$  do LAS, para concentração afluente média de  $7,6 \pm 0,9$  mg/L, chegando à concentração efluente média de  $3,4 \pm 2,2$  mg/L.

Verificou-se que a concentração de LAS efluente permaneceu em torno de 2,4 mg/L durante o período de 328 a 339 dias de operação (Figura 5.6). Nesse período a remoção de LAS foi de aproximadamente 68%. Isso ocorreu, provavelmente, devido à falta de outras fontes de carbono e, também, à estabilização do reator.

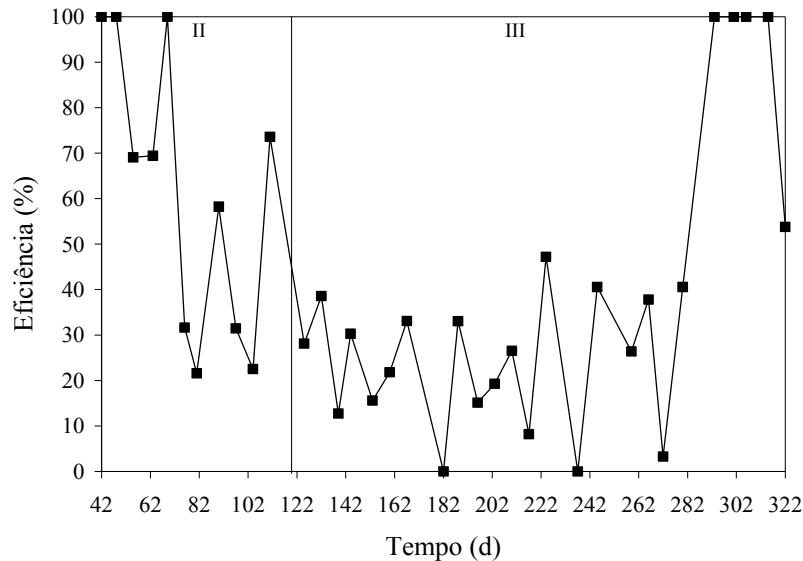


Figura 5.4 – Variação temporal da eficiência de remoção do LAS

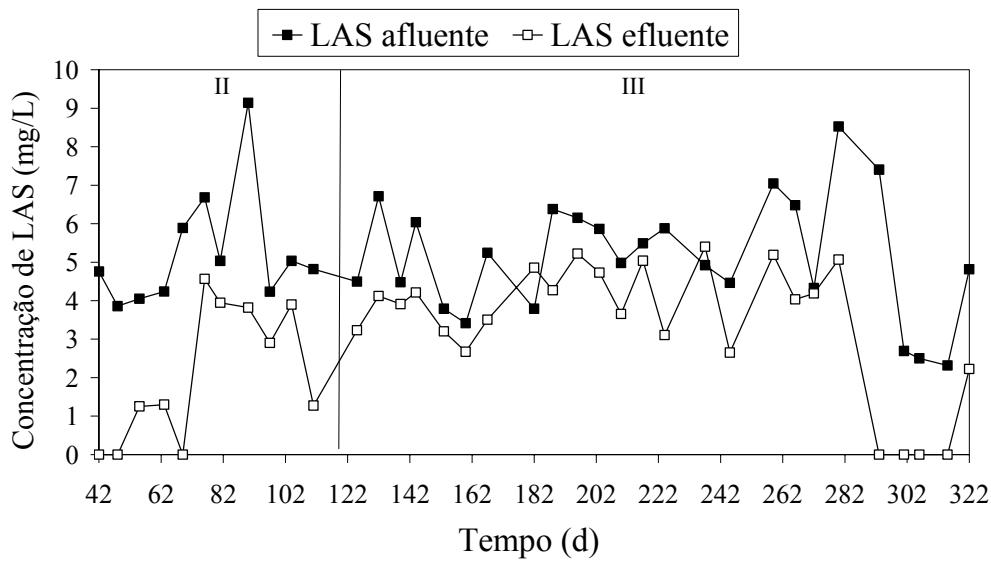


Figura 5.5 – Variação temporal do LAS

Tabela 5.2 – Concentração média de LAS durante as etapas de operação

Etapa	LAS (mg/L)		
	Afluente	Efluente	Eficiência (%)
I	-	-	-
II	5,2 ± 1,5	2,2 ± 1,8	62 ± 31
III	5,0 ± 1,6	3,2 ± 1,8	40 ± 33
IV	7,6 ± 0,9	3,4 ± 2,2	67 ± 3

Oliveira (2006) utilizou a mesma configuração de reator e condições operacionais semelhantes as usada nesse trabalho. A autora obteve remoção média de matéria orgânica (DQO filtrada) de 95% na etapa 1, com duração de 32 dias, para concentrações iniciais médias de 550 mg/L. Na etapa 2, a remoção de DQO filtrada foi acima de 85%, demonstrando, assim, que o LAS não interferiu na degradação da matéria orgânica. A autora obteve, ainda, remoção média de 40% do LAS na segunda fase de operação, para concentração inicial de 14 mg/L.

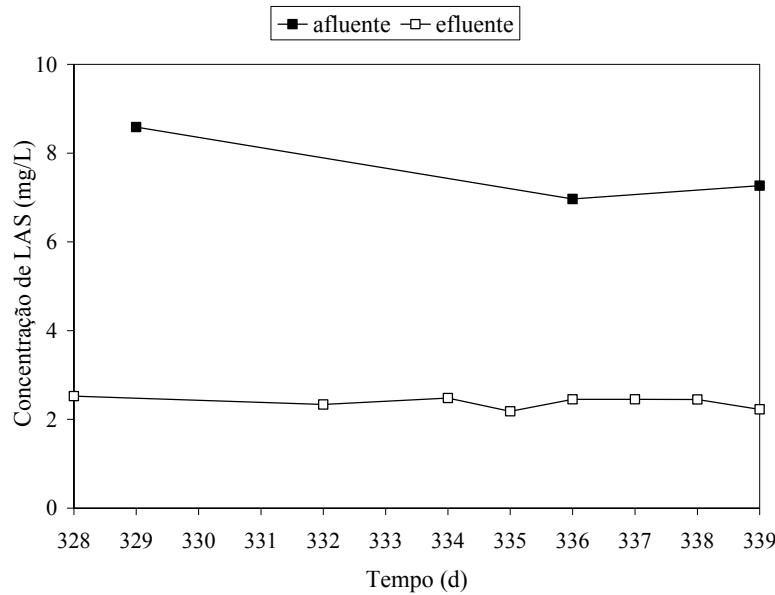


Figura 5.6 – Variação da concentração de LAS na etapa IV

No presente trabalho foi realizado o cálculo da taxa de carregamento orgânico em cada etapa de operação (Tabela 5.3). Obteve-se que, na etapa I, a taxa afluente e efluente foram de aproximadamente 0,81 kg DQO/m<sup>3</sup>.d e 0,20 kg DQO/m<sup>3</sup>.d, respectivamente. A taxa afluente foi maior na primeira metade dessa etapa, chegando a valores próximos a 1,0 kg DQO/m<sup>3</sup>.d, diminuindo, posteriormente, para valores entre 0,6 e 0,7 kg DQO/m<sup>3</sup>.d. A taxa de carregamento efluente diminui no decorrer dessa etapa, iniciando em 0,30 kg DQO/m<sup>3</sup>.d e, no final, atingindo o valor de 0,12 kg DQO/m<sup>3</sup>.d. A diminuição da taxa efluente pode ter ocorrido em função da diminuição da taxa afluente, assim como devido ao aumento da atividade bacteriana.

Tabela 5.3 – Taxa de carregamento orgânico

Etapa	Afl.	Efl.	Afl.	Efl.
	DQO	DQO	LAS	LAS
	kg/m <sup>3</sup> .d	kg/m <sup>3</sup> .d	g/m <sup>3</sup> .d	g/m <sup>3</sup> .d
<b>I</b>	0,81	0,20		
<b>II</b>	0,59	0,09	10,79	4,38
<b>III</b>	0,70	0,12	10,32	6,81
<b>IV</b>	-	-	15,21	6,80
<b>Média</b>	0,70	0,14	12,11	6,00

Na etapa II, a taxa média afluente foi de  $0,59 \pm 0,20$  kg DQO/m<sup>3</sup>.d. Entre os dias 81º e 111º dia, a taxa de carregamento variou de 0,44 kg DQO/m<sup>3</sup>.d, a 0,70 kg DQO/m<sup>3</sup>.d. Nessa mesma etapa, a taxa de carregamento efluente foi de  $0,09 \pm 0,04$  kg DQO/m<sup>3</sup>.d.

A taxa de carregamento afluente em relação ao LAS foi  $10,79 \pm 3,10$  g LAS/m<sup>3</sup>.d, observando-se variação durante a etapa II. A taxa efluente foi de  $4,38 \pm 3,46$  g LAS/m<sup>3</sup>.d, sendo os menores valores obtidos no início dessa etapa, particularmente entre o 42º e 69º dia de operação, devido, provavelmente, à adsorção do LAS no material suporte. Após o 69º dia, a taxa média de carregamento efluente foi de 6,77 g LAS/m<sup>3</sup>.d, evidenciando diminuição da remoção do surfactante.

Na etapa III, a taxa média de carregamento orgânico afluente ( $0,70 \pm 0,27$  kg DQO/m<sup>3</sup>.d) aumentou em relação à etapa anterior mesmo com a remoção da sacarose da alimentação. Verificou-se, também, aumento no desvio padrão devido a variações na DQO afluente. A taxa média efluente foi de  $0,12 \pm 0,11$  kg DQO/m<sup>3</sup>.d, demonstrando variações na DQO efluente e, por conseguinte na remoção de DQO. A partir do 224º dia, a taxa de carregamento efluente se estabilizou, mantendo média de  $0,05 \pm 0,01$  kg DQO/m<sup>3</sup>.d, mesmo com a variação da taxa afluente.

Durante essa etapa III, a taxa de carregamento de LAS afluente ( $10,32 \pm 3,34$  g LAS/m<sup>3</sup>.d) foi praticamente igual à etapa anterior. Contudo, verificou-se aumento da taxa de carregamento efluente  $6,81 \pm 3,69$  g LAS/m<sup>3</sup>.d, devido, provavelmente à diminuição da adsorção de LAS pelo material suporte. No final dessa etapa, a partir do 293º dia, a taxa de carregamento efluente foi praticamente nula, evidenciando a degradação biológica do surfactante, além da adaptação das bactérias.

Na etapa IV, a taxa de carregamento orgânico afluente devido ao LAS foi de  $15,21 \pm 1,73$  g LAS/m<sup>3</sup>.d, aumentando em relação às fases anteriores. A taxa de carregamento efluente foi de  $6,80 \pm 4,35$  g LAS/m<sup>3</sup>.d. As variações do carregamento efluente ocorreram

principalmente no início dessa etapa, provavelmente, devido às diminuição da DQO afluente e às mudanças operacionais relacionadas. A partir do 300º dia a taxa média efluente foi de  $4,74 \pm 0,26$  g LAS/m<sup>3</sup>.d, indicando estabilização.

Quanto ao pH (Figura 5.7) verificou-se pouca variação no decorrer das etapas operacionais, permanecendo com valores próximos à neutralidade. Na etapa I, o pH afluente teve valor médio de  $7,3 \pm 0,1$  e efluente de  $7,2 \pm 0,1$  (Tabela 5.4). Com a mudança na alimentação e a adição de LAS verificou-se leve diminuição do pH afluente para valor médio de  $7,1 \pm 0,1$ . O valor de pH efluente manteve, por toda essa etapa, maior que o pH afluente, possuindo média de  $7,4 \pm 0,1$ , indicando, por conseguinte, geração de alcalinidade no reator.

Após a retirada da sacarose (etapa III), o pH afluente médio aumentou para  $7,6 \pm 0,2$  e o pH efluente médio para  $7,5 \pm 0,1$ . Verificou-se, no decorrer das etapas operacionais, certa constância nos valores de pH efluente, indicando estabilidade do reator, capacidade tampão e perspectiva de responder adequadamente a mudanças na alimentação. Contudo, na etapa IV, com a retirada do extrato de levedura da alimentação, verificou-se aumento do pH afluente e efluente para valores próximos a 8.

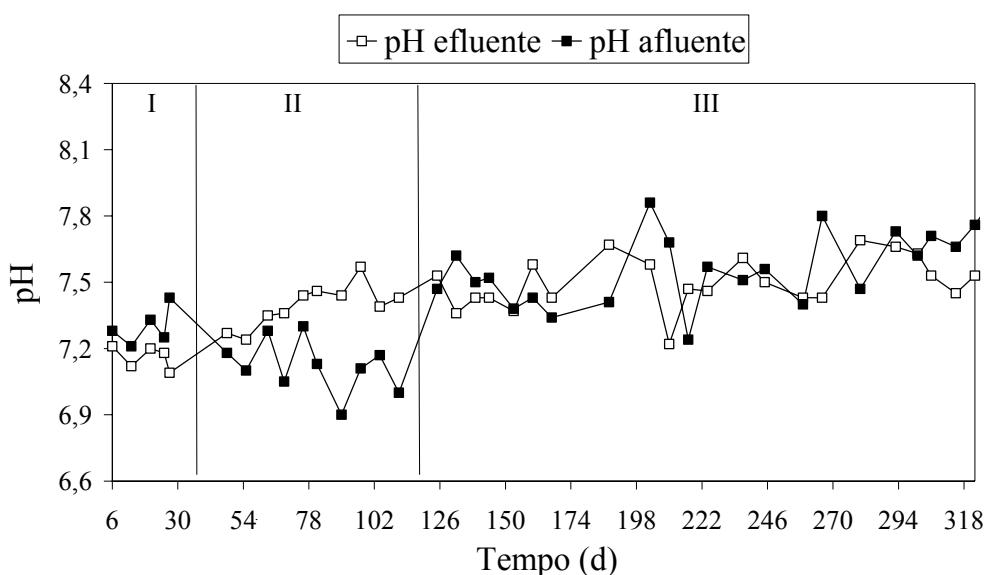


Figura 5.7 – Variação temporal do pH afluente e efluente

Tabela 5.4 – Valores médios de pH afluente e efluente durante as etapas de operação

Etapa	pH	
	Afluente	Efluente
I	7,3 ± 0,1	7,2 ± 0,1
II	7,1 ± 0,1	7,4 ± 0,1
III	7,6 ± 0,2	7,5 ± 0,1
IV	8	8

A alcalinidade foi dividida em parcial (Figura 5.8), total (Figura 5.9) e à bicarbonato (Figura 5.10). Ressalta-se que a alcalinidade está relacionada com a capacidade do reator em neutralizar os ácidos formados no processo de digestão anaeróbia e, também, em tamponar o pH do meio na eventualidade de acumulação de ácidos voláteis. Tanto a alcalinidade quanto os ácidos voláteis derivam primariamente da decomposição dos compostos orgânicos durante a digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 1997). Essa geração de alcalinidade relacionada a processos anaeróbios explica o fato de que, durante todo o período operacional, a alcalinidade efluente possuiu concentrações mais elevadas que a afluente.

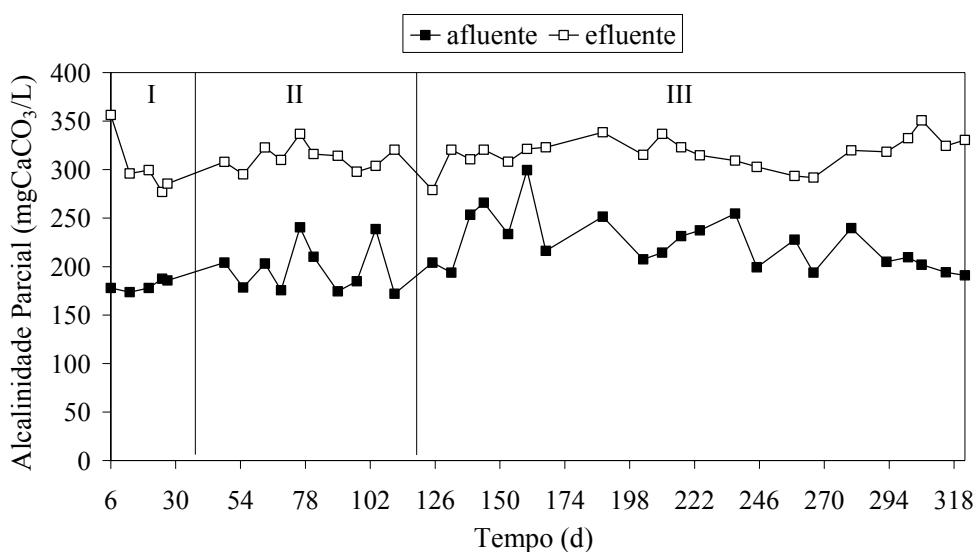


Figura 5.8 – Variação temporal da alcalinidade parcial afluente e efluente

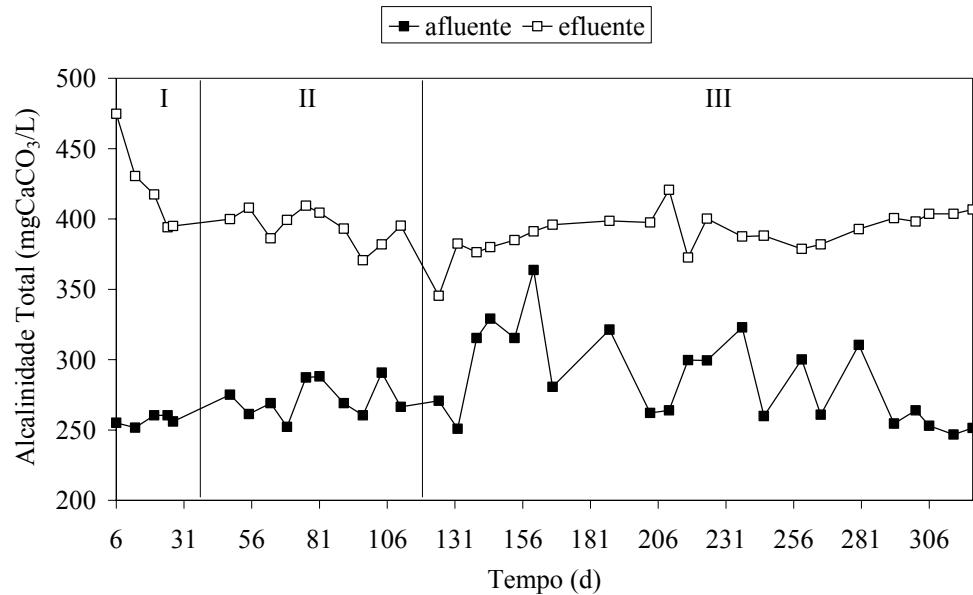


Figura 5.9 – Variação temporal da alcalinidade total afluente e efluente

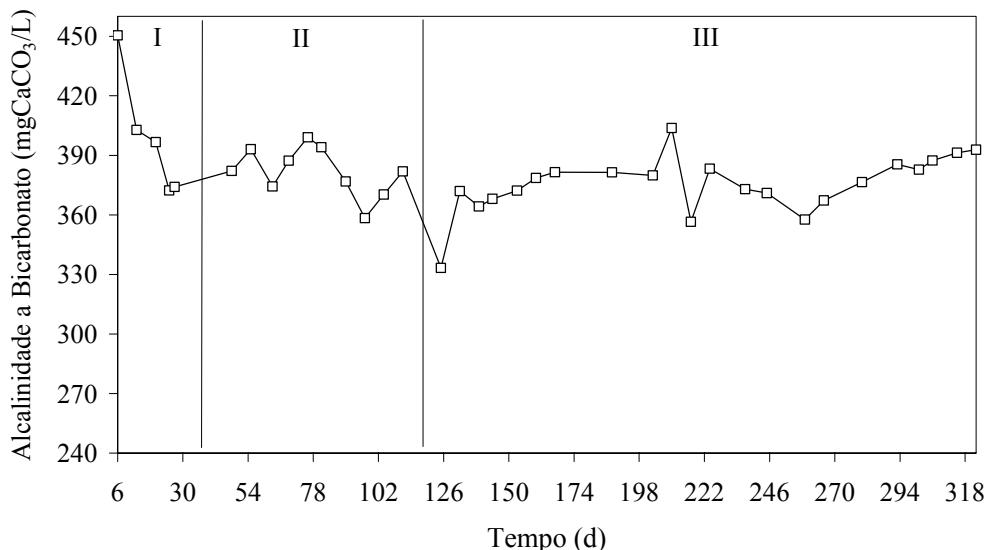


Figura 5.10 – Variação temporal da alcalinidade à bicarbonato efluente

Quanto à alcalinidade parcial, verificou-se, durante a etapa I, concentração média afluente de  $180,5 \pm 5,9$  mgCaCO<sub>3</sub>/L (Tabela 5.5) e efluente de  $302,8 \pm 31,2$  mgCaCO<sub>3</sub>/L, demonstrando geração de alcalinidade e, por consequência, funcionamento adequado do reator. Essa alcalinidade é denominada real para reatores anaeróbios e corresponde a ânions fracos (bicarbonato, borato, silicato e fosfato). Com a adição do LAS, a alcalinidade afluente

aumentou em 18 mgCaCO<sub>3</sub>/L, considerando o valor médio, e apresentou maior desvio padrão em relação à etapa anterior, ou seja, variou mais durante essa etapa. A alcalinidade efluente aumentou cerca de 10 mgCaCO<sub>3</sub>/L.

Considera-se, de maneira geral, que em relação à etapa anterior houve diminuição da produção de alcalinidade dentro do reator. Ressalta-se que essa redução pode ter ocorrido devido ao aumento da alcalinidade no meio que, por sua vez, diminui a produção de alcalinidade, visto se tratar de um equilíbrio químico, como exemplificado pela reação de degradação anaeróbia do acetato de sódio (Equação 1).



*Tabela 5.5 – Concentração média de alcalinidade parcial, total e à bicarbonato e ácidos voláteis totais durante as etapas de operação*

Etapa	Alcalinidade (mgCaCO <sub>3</sub> /L)						AVT (mgHAc/L)	
	Parcial		Total		Bicarbonato			
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Efluente	Efluente		
I	180,5 ± 5,9	302,8 ± 31,2	256,8 ± 3,7	422,4 ± 33,1	399,3 ± 31,6	32,6 ± 4,1		
II	198,1 ± 25,7	312,5 ± 12,5	272,0 ± 13,1	394,8 ± 12,3	381,7 ± 12,3	18,4 ± 3,5		
III	223,8 ± 28,4	317,5 ± 16,4	286,2 ± 32,8	390,4 ± 15,3	375,5 ± 14,8	21,0 ± 3,5		
IV	198,7	208,1	232,9	248,4	241,8	9,4		

Na etapa III a alcalinidade parcial afluente aumentou com a retirada da sacarose para concentração afluente média de 223,8 ± 28,4 mgCaCO<sub>3</sub>/L. A concentração efluente média foi de 223,8 ± 28,4 mgCaCO<sub>3</sub>/L.

Na etapa IV, houve diminuição da concentração de alcalinidade parcial efluente devido, provavelmente, à desestabilização do reator, à diminuição da atividade bacteriana ou, ainda, devido à diminuição da alcalinidade afluente. Ressalta-se que apesar da alcalinidade

afluente nesta etapa ter sido superior à alcalinidade afluente durante a etapa I, houve menor produção de alcalinidade.

A alcalinidade total afluente na etapa I foi de  $256,8 \pm 3,7$  mgCaCO<sub>3</sub>/L e a efluente foi de  $422,4 \pm 33,1$  mgCaCO<sub>3</sub>/L, indicando aumento na alcalinidade dentro do reator. A alcalinidade total corresponde à soma da alcalinidade parcial (AP) com a alcalinidade intermediária (AI), sendo que, essa última, corresponde aos ácidos orgânicos (húmicos, acético, propiônico, entre outros). Segundo Ripley et al. (1986), valores de AI/AP superiores a 0,3 indicam a ocorrência de distúrbios no processo de digestão anaeróbia. Baseado nessa informação foi calculado o valor de AI/AP para as etapas de operação e obteve-se a razão de 0,2. O valor de 0,3 não foi ultrapassado durante nenhum momento analisado.

Na etapa II, apesar de ter havido maior geração de alcalinidade parcial média efluente ( $312,5 \pm 12,5$  mgCaCO<sub>3</sub>/L), a alcalinidade total média efluente ( $394,8 \pm 12,3$  mgCaCO<sub>3</sub>/L) foi menor que na etapa anterior ( $422,4 \pm 33,1$  mgCaCO<sub>3</sub>/L), indicando redução na alcalinidade intermediária ou alcalinidade dos ácidos voláteis. Esse tipo de alcalinidade é considerado pouco importante para reatores anaeróbios, pois a sua capacidade de tamponamento atua na faixa de pH entre 3,75 e 5,75 (CHERNICHARO, 1997).

Na etapa III, houve aumento na alcalinidade total efluente em relação à afluente. Porém, houve redução em relação à etapa anterior. Na etapa IV, apesar da retirada dos co-substratos, ainda verificou-se aumento na alcalinidade total no reator em relação à concentração afluente, indicando funcionamento adequado em relação a esse parâmetro.

Quanto à alcalinidade à bicarbonato efluente, verificou-se redução na sua concentração no decorrer das etapas. Na etapa I, a concentração média obtida foi de  $399,3 \pm 31,6$  mgCaCO<sub>3</sub>/L. Com o acréscimo do LAS (etapa II), a concentração média diminuiu para  $381,7 \pm 12,3$  mgCaCO<sub>3</sub>/L e, com a retirada da sacarose (etapa III) para

$375,5 \pm 14,8 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$ . Com a retirada do extrato de levedura (etapa IV), a alcalinidade a bicarbonato diminuiu para  $242 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$  no 327º dia de operação.

A diminuição na alcalinidade à bicarbonato está relacionada à diminuição na concentração de alcalinidade total, visto que a alcalinidade à bicarbonato corresponde à concentração de alcalinidade total subtraídos 71% dos ácidos voláteis gerados, conforme a Equação 2 (CHERNICHARO, 1997).

$$AB = AT - 0,85 \cdot 0,83 \cdot AV \quad (2)$$

Sendo:

$AB$  = alcalinidade a bicarbonato ( $\text{mgCaCO}_3/\text{L}$ )

$AT$  = alcalinidade total ( $\text{mgCaCO}_3/\text{L}$ )

$AV$  = alcalinidade de ácidos voláteis ( $\text{mgHAc/L}$ )

$0,85$  = fator de correção que considera 85 % de ionização dos ácidos até o ponto final da titulação

$0,83$  = fator de conversão de ácido acético em alcalinidade

Lembrando que a alcalinidade a bicarbonato corresponde à capacidade real de tamponamento no reator, para a faixa de pH utilizada no tratamento anaeróbio. Portanto, no decorrer das etapas, a capacidade de tamponamento do reator diminuiu, porém esse fator não prejudicou a operação, visto que o pH manteve-se constante, em torno de 7.

A produção de ácidos voláteis efluente (Tabela 5.5 e Figura 5.11) foi em torno de  $32,6 \pm 4,1 \text{ mgHAc/L}$  na etapa I. Ressalta-se que a geração de ácidos no interior do reator não é idealmente representada pela concentração efluente, visto que os ácidos podem ser utilizados por organismos presentes no reator.

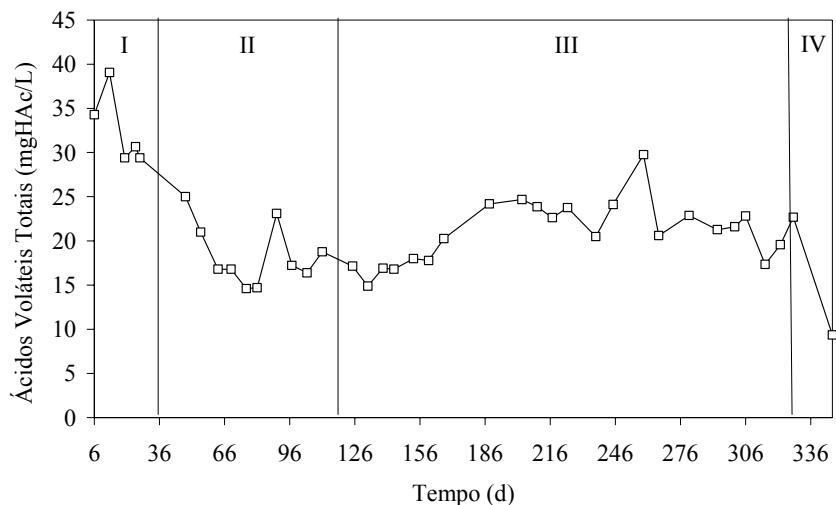


Figura 5.11 – Variação temporal dos ácidos voláteis totais efluente

Na etapa II, houve redução na concentração de ácidos voláteis efluente para concentração média de  $18,4 \pm 3,5$  mgHAc/L. Isso pode estar relacionado aos efeitos do LAS na comunidade microbiana e, também, ao consumo elevado dos ácidos gerados. Nessa etapa a remoção da DQO também diminuiu em relação à etapa anterior.

Na terceira etapa houve aumento na concentração média dos ácidos, que foi de  $21,0 \pm 3,5$  mgHAc/L. A concentração de ácidos nessa etapa foi aproximadamente constante durante todo o período, indicando, por sua vez, estabilidade do reator.

Na etapa IV, com a remoção dos co-substratos da alimentação, houve redução da quantidade de matéria orgânica a ser degradada e, por consequência, da geração de ácidos voláteis totais.

As análises de sulfato e sulfeto (Figuras 5.12 e 5.13) foram realizadas nas etapas III e IV de operação. O sulfato presente no reator é proveniente, provavelmente, do extrato de levedura e do LAS.

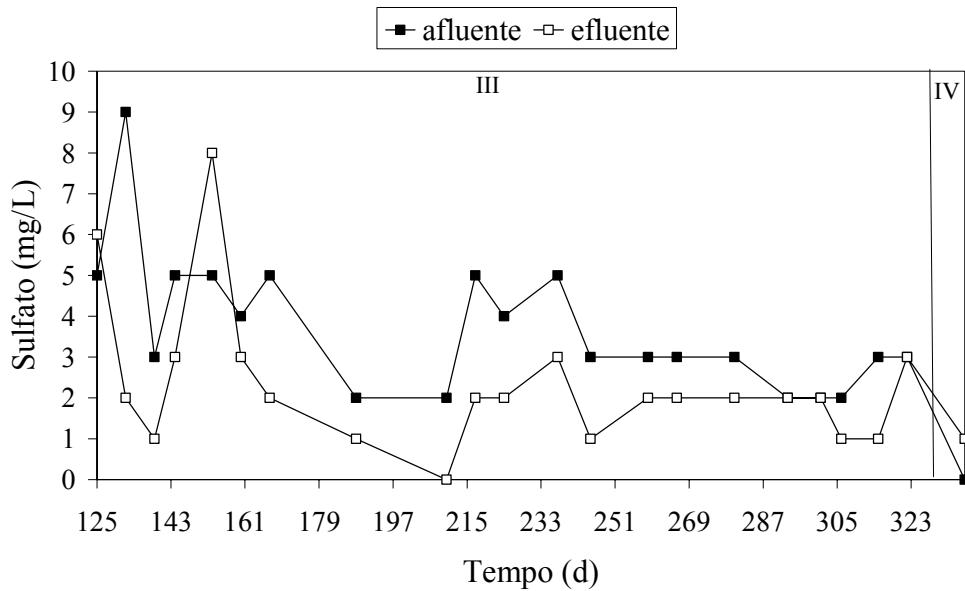


Figura 5.12 – Variação temporal do sulfato afluente e efluente

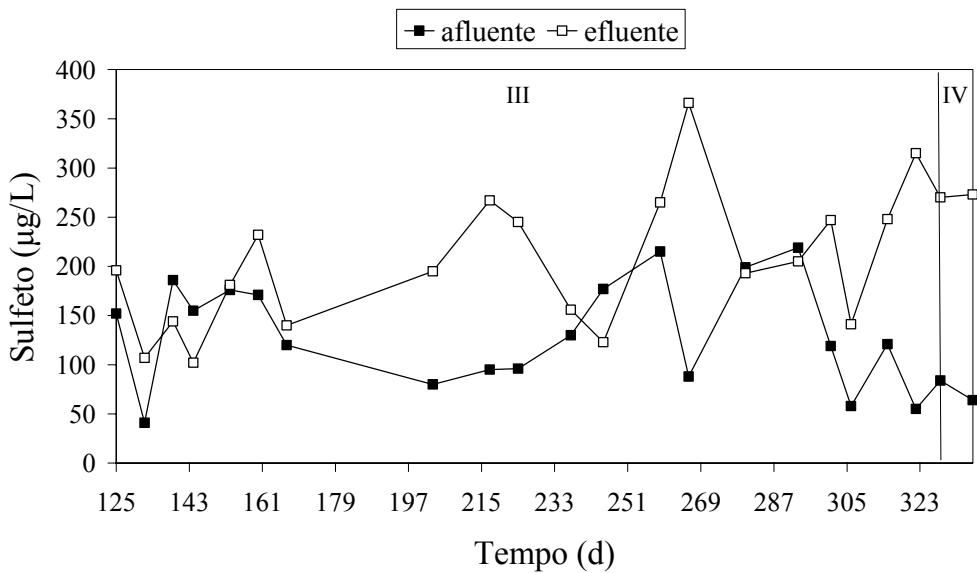


Figura 5.13 – Variação temporal do sulfeto afluente e efluente

Os valores de sulfato afluente e efluente variaram muito, até aparente estabilização a partir do 245º dia, com valores de 2 mg/L de sulfato afluente e 1 mg/L efluente. Ressalta-se que a quantidade de sulfato afluente ( $3,4 \pm 1,2$  mg/L) (Tabela 5.6) foi maior que a concentração efluente ( $2,4 \pm 1,8$  mg/L) durante quase a totalidade do período analisado, indicando provável consumo deste durante o tempo de detenção hidráulica. A variação na

concentração de sulfato efluente pode estar relacionada com variações na composição do extrato de levedura.

*Tabela 5.6 - Concentração média de sulfato e sulfeto afluente e efluente durante as etapas de operação*

Etapa	Sulfato (mg/L)		Sulfeto (µg /L)	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
III	3,4 ± 1,2	2,4 ± 1,8	135 ± 51	212 ± 68
IV	0	1	74	273

A concentração de sulfeto variou durante o monitoramento, não se estabilizando durante a etapa III. A quantidade de sulfeto efluente foi maior que o afluente em quase todo o período analisado, indicando produção de sulfeto no reator, que ocorreu, provavelmente, devido à utilização do sulfato no metabolismo desassimilativo de alguns microrganismos. Oliveira (2006) e Duarte (2006) obtiveram variações semelhantes dos compostos de enxofre quando da operação de RAHLF alimentados com LAS.

## 5.2. *Variação espacial*

Conforme mencionado anteriormente foram realizadas cinco variações espaciais, ou seja, análise das amostras coletadas ao longo do comprimento dos reatores nos pontos de amostragem (L/D igual a 1, 6, 10, 14, 19), afluente (L/D = 0) e efluente (L/D = 20) (Figura 5.14). Na Figura 5.14 também está representado o tempo de detenção hidráulica, em horas, entre cada trecho do reator. Os resultados das análises estão apresentados no Apêndice B.

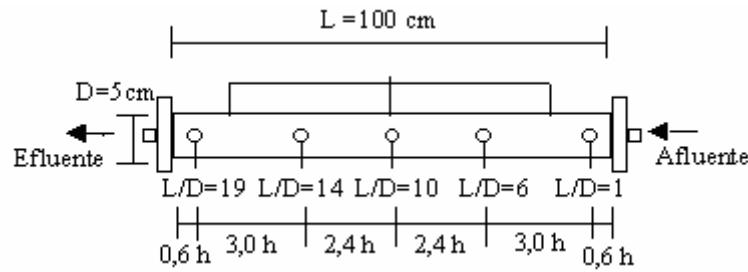


Figura 5.14 – Pontos de amostragem e tempo teórico necessário para o líquido percorrer cada trecho do reator

Analizando os resultados de DQO obtidos durante as variações espaciais (Figuras 5.15, 5.16, 5.17, 5.18), pode-se observar que a maior remoção de matéria orgânica ocorreu predominantemente entre afluente e ponto 1 de amostragem ( $L/D = 1$ ). Nessa zona havia maior disponibilidade de matéria orgânica, devido à proximidade com o ponto de inserção da alimentação. Verificou-se visualmente a existência de polímero extracelular em grande quantidade produzido pela atividade bacteriana, que permite melhor agregamento das bactérias.

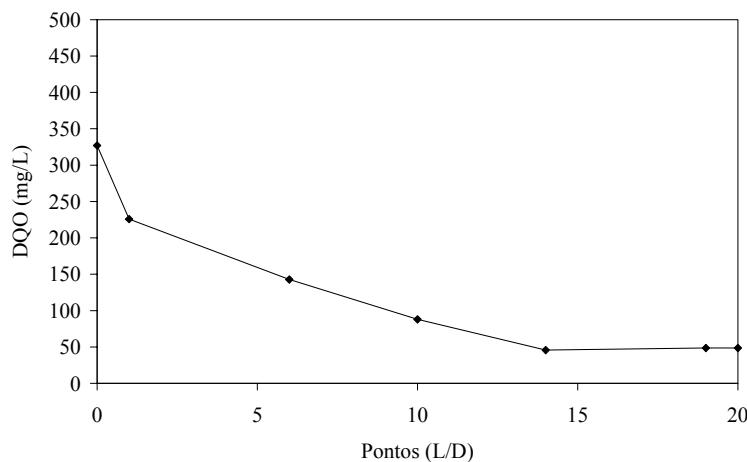


Figura 5.15 – Variação espacial da matéria orgânica (DQO filtrada) no 34º dia de operação

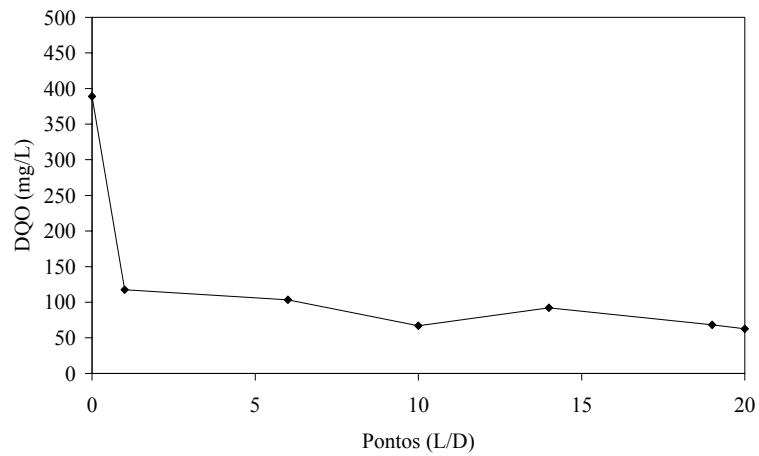


Figura 5.16 – Variação espacial da DQO filtrada no 118º dia de operação

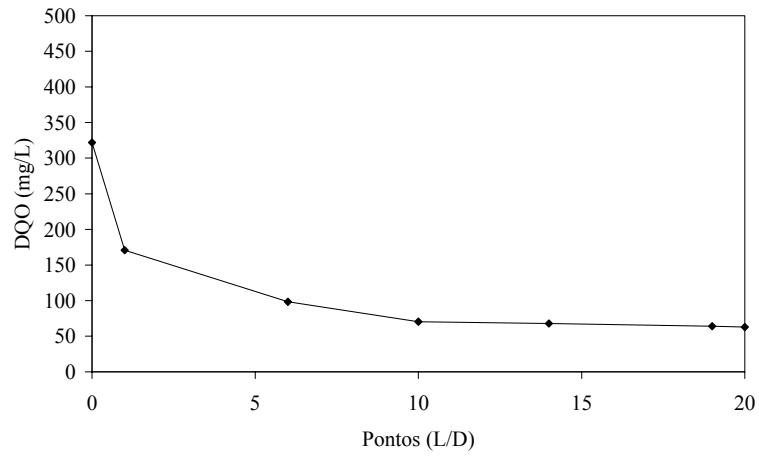


Figura 5.17 – Variação espacial da DQO filtrada no 231º dia de operação

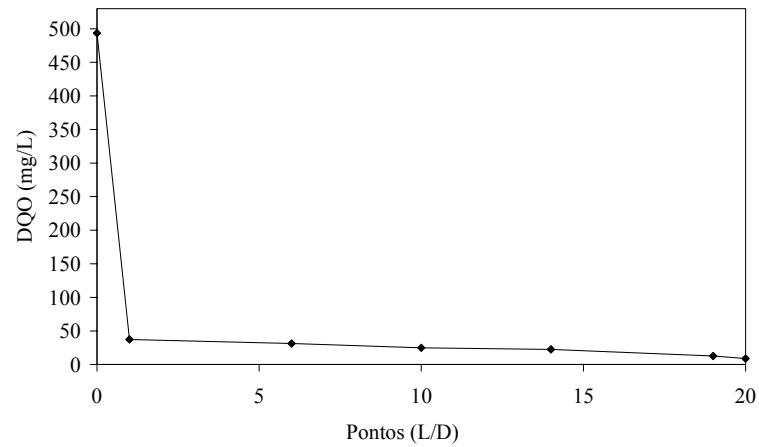


Figura 5.18 – Variação espacial da DQO filtrada no 287º dia de operação

Durante o perfil 1 (Figura 5.15), realizado ao final da etapa I, no 34º dia de operação, houve remoção de aproximadamente 31% da DQO no primeiro trecho do reator, para concentração inicial de 327 mg/L. A partir de L/D=1 até o ponto de L/D=14, a remoção da DQO diminuiu constantemente, o que pode ser observado pela inclinação linear do gráfico nesse trecho do reator, resultando numa remoção de aproximadamente 54% da matéria orgânica. A partir de L/D=14, a concentração de matéria orgânica permaneceu praticamente constante. A remoção total de DQO foi de 85%.

Com a estabilização do reator, ou maior tempo de operação, ou ainda devido à adição de LAS (etapas II e III) à alimentação, o perfil espacial da DQO durante o 118º, 231º e 287º dia foram diferentes em relação à primeira variação, apresentando remoção acentuada da DQO no primeiro trecho. Ressalta-se que a elevada remoção nesse trecho diminui a quantidade de matéria orgânica disponível para os próximos trechos. No segundo perfil (118º dia) houve remoção total de 84% da DQO, para concentração inicial de 389 mg/L, sendo que 70% desta ocorreu no primeiro trecho. Os demais trechos foram responsáveis pela remoção dos demais 14%.

Durante o terceiro perfil (231º dia) houve remoção de 80% da DQO, para concentração inicial de 322 mg/L. No primeiro trecho a remoção foi de 47% e no trecho subsequente foi de 23%.

No quarto perfil (287º dia), também na etapa III de operação, houve aumento da remoção da DQO em relação à variação espacial anterior. Essa foi de 98%, sendo maior inclusive que a média da etapa, que foi de  $85 \pm 8\%$ . Ressalta-se, entretanto, que a concentração efluente de 8,9 mg/L obtida encontra-se abaixo da curva de calibração do espectrofotômetro em que as amostras foram analisadas, podendo, desse modo, ter ocorrido erro relacionado à extração dessa curva.

De qualquer modo, verificou-se que a remoção de matéria orgânica foi maior no primeiro trecho, representando aproximadamente 92% desta.

Quanto à variação espacial do LAS (Figuras 5.19, 5.20, 5.21, 5.22), notou-se que a concentração deste ao longo do comprimento do reator foi variável, apresentando comportamento distinto em cada etapa de operação.

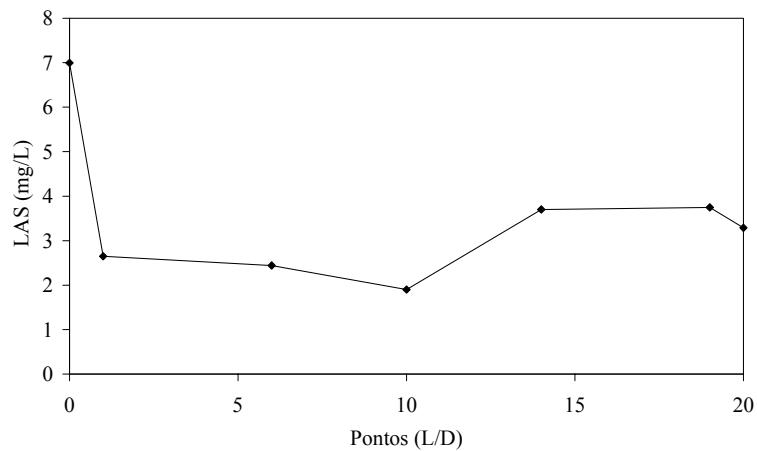


Figura 5.19 – Variação espacial do LAS no 118º dia de operação

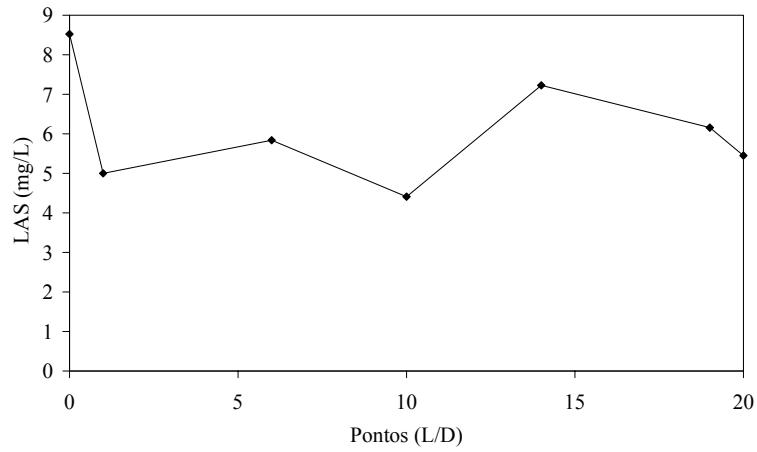


Figura 5.20 – Variação espacial do LAS no 231º dia de operação

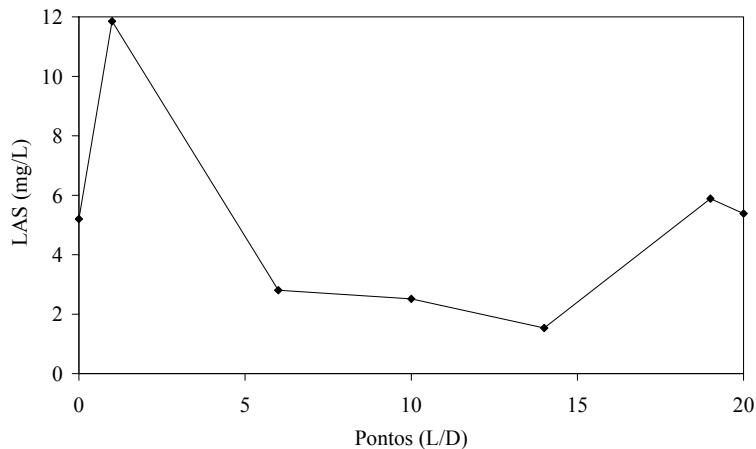


Figura 5.21 – Variação espacial do LAS no 298º dia de operação

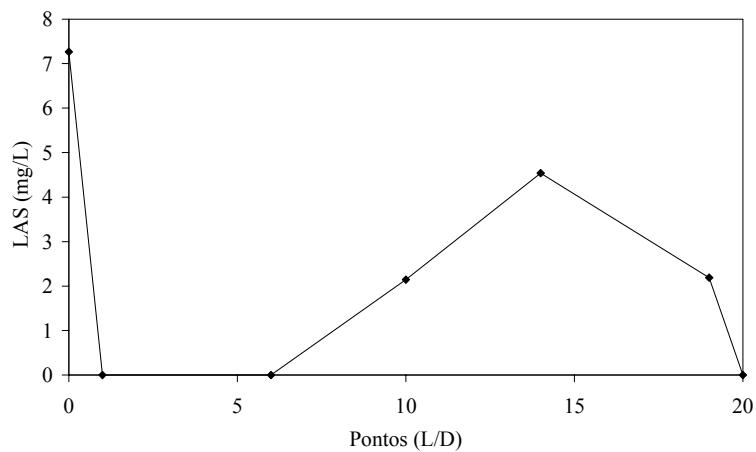


Figura 5.22 – Variação espacial do LAS no 399º dia de operação

Na segunda variação espacial, verificou-se diminuição da concentração de LAS entre os dois primeiros trechos, seguida de aumento da concentração efluente. Considerando apenas o valor afluente e efluente, houve remoção de 53% do LAS, para concentração inicial de 7 mg/L.

Na terceira variação espacial (231º dia) a remoção total foi de 36%, para concentração afluente de 8,5 mg/L.

Na quarta variação (287º dia) a concentração de LAS afluente foi de 8,5 mg/L, diminuindo para valores próximos a 5 mg/L (L/D 1, 6, 10) e, novamente, aumentando para

valores próximos a 7,2 mg/L no ponto de L/D 14. Segundo Sanz et al. (2003), o perfil de concentração de LAS é complexo, pois diversos mecanismos e processos acontecem, tais como: ad-/absorção, precipitação de sais de LAS insolúveis, e degradação para metabólitos com cinéticas desconhecidas. Entretanto não se conhece exatamente o motivo do comportamento observado para o LAS.

Na quinta variação espacial (299º dia), que ocorreu após a remoção de todas as fontes de matéria orgânica complementares, houve remoção de todo o LAS afluente (7,2 mg/L). Pode-se, então, concluir, conjuntamente com os dados operacionais, que a ausência de co-substratos aumentou a remoção do surfactante. Deve-se, contudo, levar-se em consideração que o reator estava operando sem co-substratos por apenas 12 dias quando a avaliação espacial foi realizada. A manutenção dessa condição a longo prazo poderia ocasionar a morte de microrganismos sensíveis ao surfactante e o colapso do reator. Notou-se que a presença do extrato de levedura como fornecedor de vitaminas e aminoácidos para as bactérias, nas demais etapas, foi preferencialmente consumido em relação ao LAS por ser matéria orgânica facilmente assimilável.

Quanto aos ácidos voláteis (Figuras 5.23, 5.24, 5.25, 5.26 e 5.27), houve diminuição da concentração no decorrer das fases. Essa redução foi verificada após a adição de LAS e pode estar relacionada à presença do surfactante.

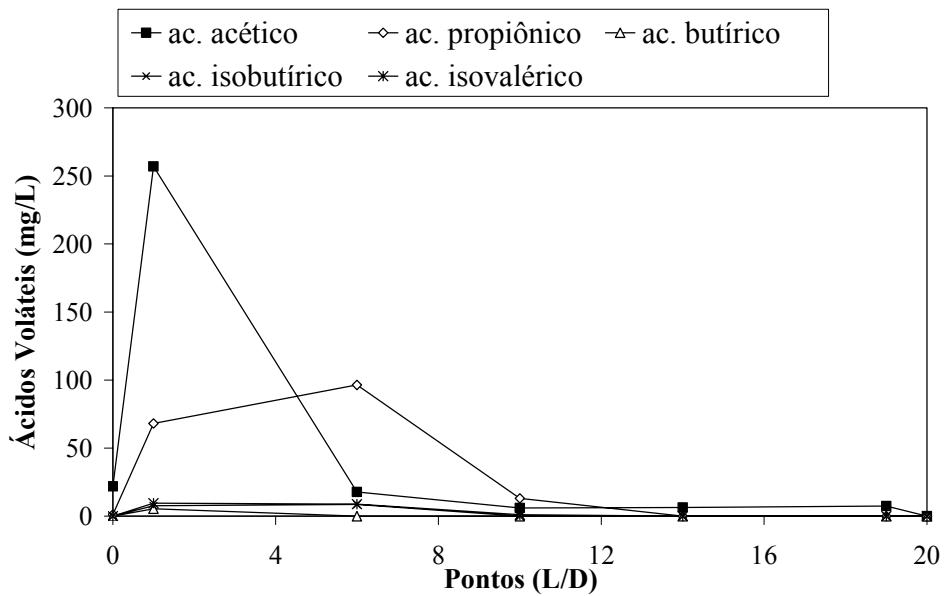


Figura 5.23 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 34º dia de operação

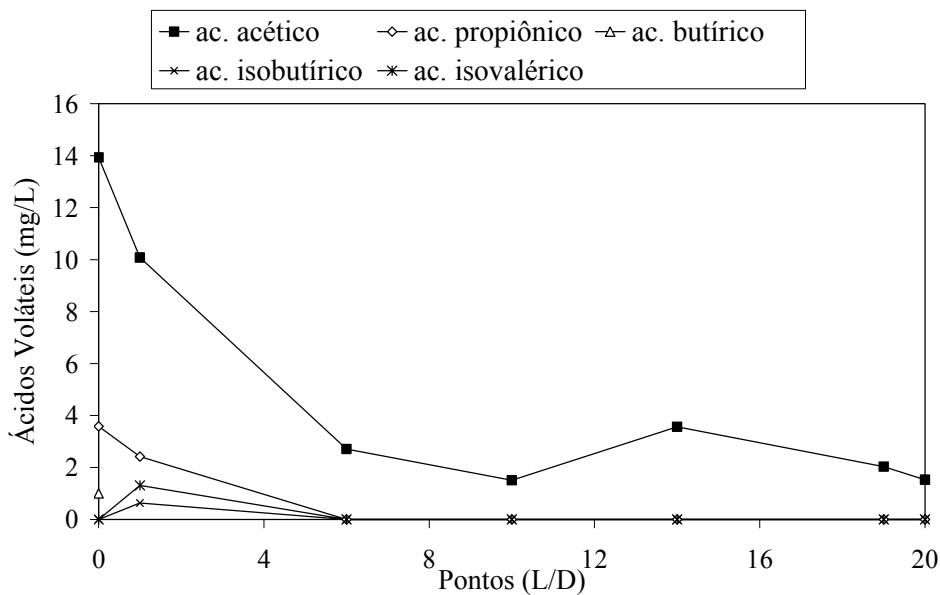


Figura 5.24 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 118º dia de operação

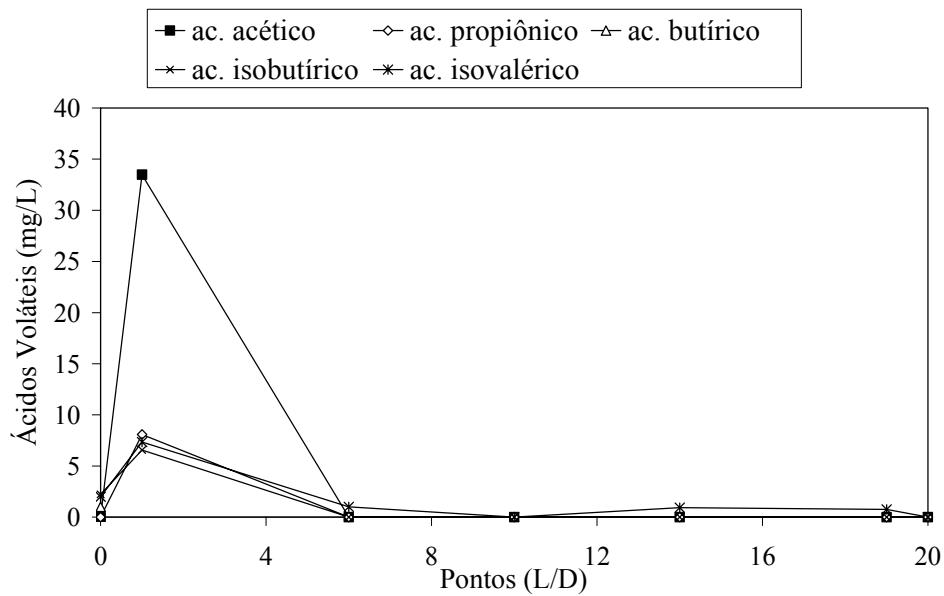


Figura 5.25 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 231º dia de operação

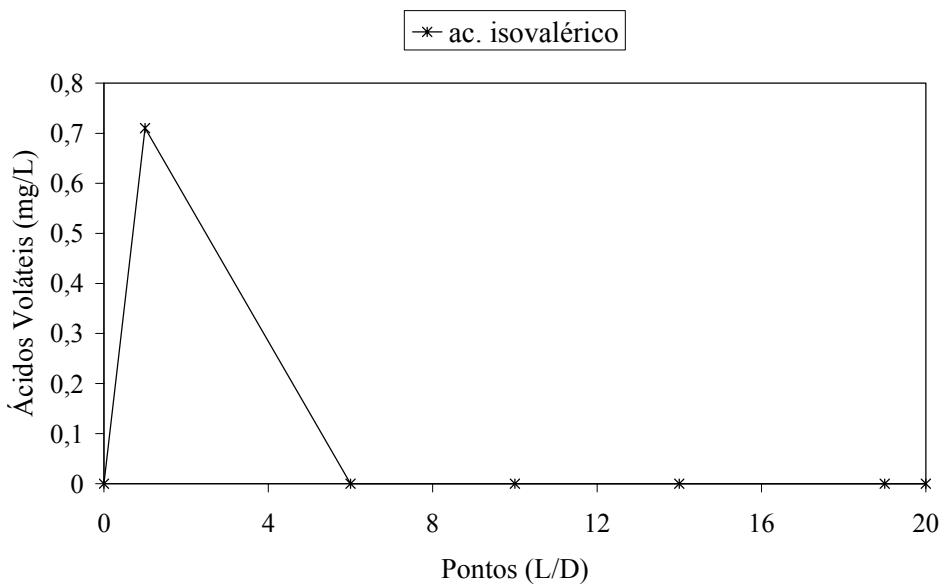


Figura 5.26 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 287º dia de operação

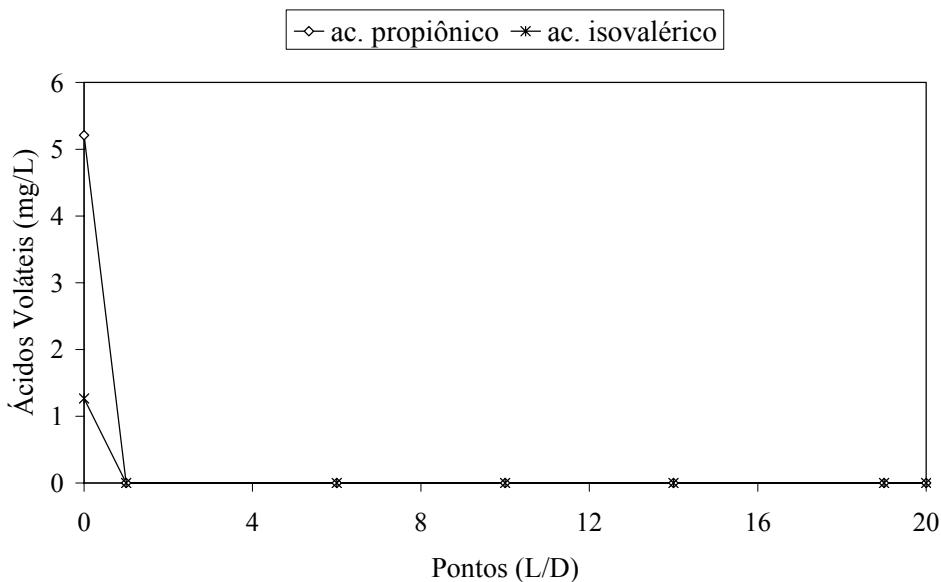


Figura 5.27 – Variação espacial dos ácidos voláteis no 339º dia de operação

Na primeira variação espacial (etapa I) foi detectada produção de ácidos voláteis até o ponto de amostragem L/D=19. Essa produção ocorreu em maior quantidade nos pontos com remoção de DQO mais elevada. Desse modo, o ponto referente à L/D = 1 apresentou a produção de maior diversidade de ácidos, como ácido butírico (5 mg/L), acético (257 mg/L), propiônico (68 mg/L), isobutírico (8 mg/L) e isovalérico (10 mg/L). Em relação às demais etapas, verificou-se, na etapa I, maior produção de ácidos voláteis. O perfil espacial obtido nesse trabalho foi semelhante ao observado por Oliveira, que obteve concentrações menores de ácidos voláteis gerados e produção apenas dos ácidos acético e propiônico.

Na segunda variação espacial (etapa II), os ácidos se encontravam em maior concentração afluente, e não mais no ponto de L/D = 1. Pode-se inferir que os ácidos voláteis estavam presentes na alimentação e foram apenas consumidos ao longo do reator. Salienta-se, contudo, que como grande parte da DQO foi degradada antes de L/D=1 e a geração e consumo de ácidos se relacionam com essa degradação, a geração de ácidos pode não ter sido detectada por estes terem sido rapidamente consumidos, não atingindo nenhum ponto de amostragem. Verificando-se a Figura 5.23 (1º perfil espacial), observa-se aumento na

concentração de ácidos em  $L/D = 1$ , em relação ao afluente, seguida de menores concentrações nos demais pontos de amostragem.

Observou-se, ainda, na segunda variação, a presença de ácido acético no efluente do reator e, pela Figura 5.24, certo aumento na concentração deste em  $L/D = 14$ . A redução na produção de ácidos voláteis nesta variação espacial em relação à anterior pode, ainda, estar relacionada com a presença do LAS.

Após a retirada da sacarose da alimentação (etapa III), durante a terceira variação espacial, não foi verificada a presença de ácido acético e propiônico afluente. Contudo, em  $L/D = 1$ , esses ácidos foram encontrados nas concentrações de 33 e 8 mg/L, respectivamente. Em relação às análises espaciais anteriores, verificou-se a presença de ácido isobutírico (2 mg/L), isovalérico (2 mg/L), valérico (4 mg/L) e capróico (3 mg/L) afluente. O ácido isovalérico esteve presente em quase todos os pontos amostrados, indicando mudança do perfil de geração de ácidos.

Na quarta variação espacial, ainda na etapa III, foi constatada apenas a presença de ácido isovalérico na concentração de 0,7 mg/L no ponto  $L/D=1$ . Não foi detectada a presença de ácidos afluente.

Na etapa IV (quinta análise espacial), foram detectados os ácidos propiônico e isovalérico afluente, nas concentrações de 5,2 mg/L e 1,3 mg/L, respectivamente. Ressalta-se que a redução na geração de ácidos pode ter ocorrido, provavelmente, devido à retirada dos co-substratos da alimentação e consequente diminuição da concentração de matéria orgânica de fácil degradação disponível.

Verificou-se a presença de sulfato e sulfeto em concentrações variáveis (Figuras 5.28, 5.29, 5.30, 5.31 e 5.32) nas variações espaciais realizadas.

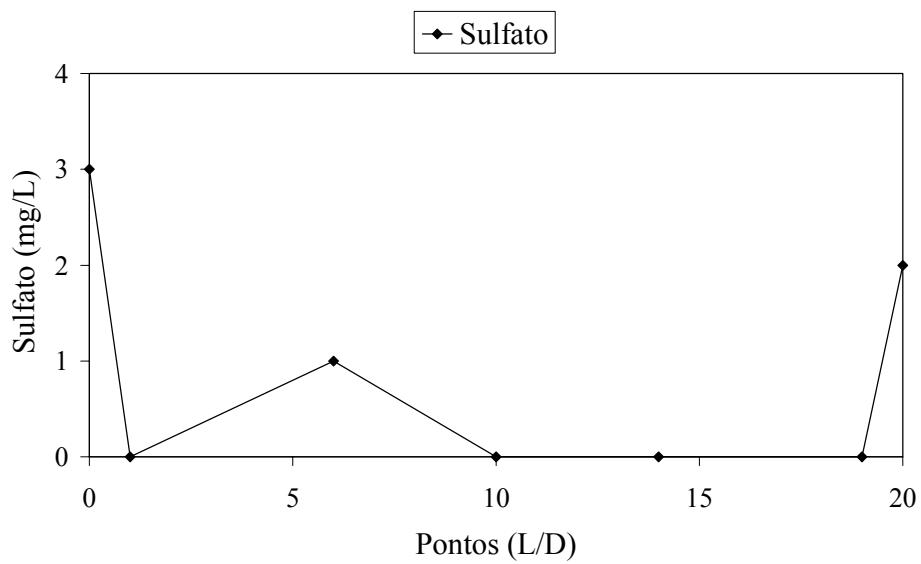


Figura 5.28 – Variação espacial do sulfato no 34º dia de operação

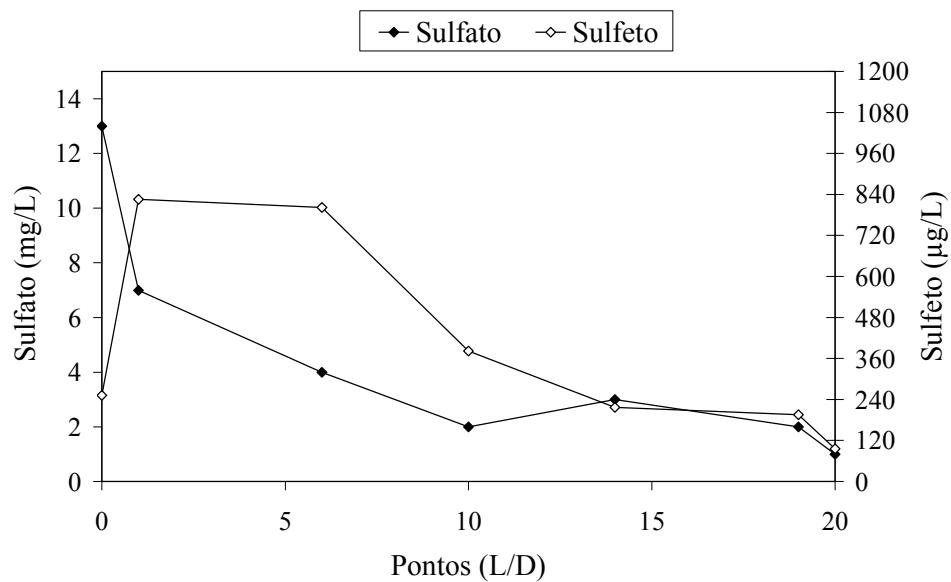


Figura 5.29 – Variação espacial do sulfato e sulfeto no 118º dia de operação

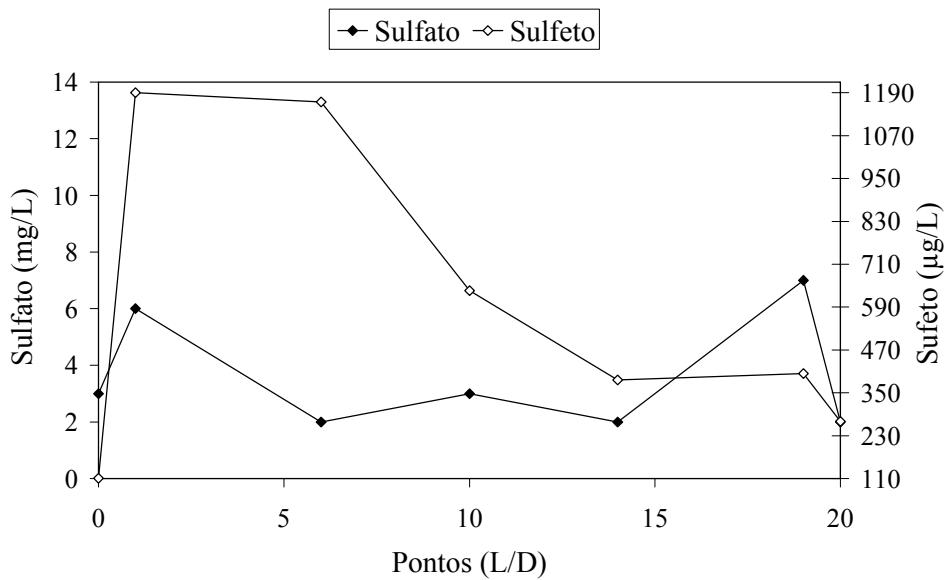


Figura 5.30 – Variação espacial do sulfato e sulfeto no 231º dia de operação

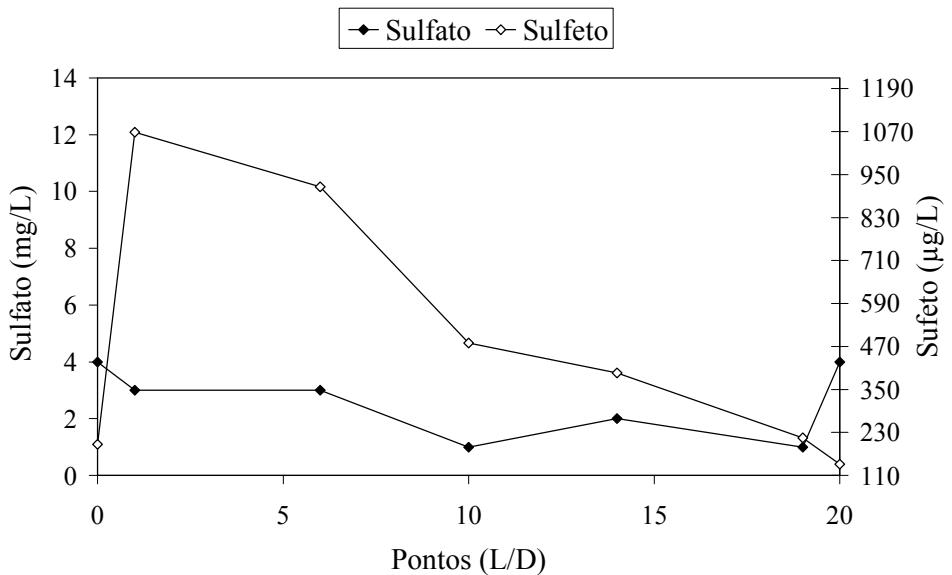


Figura 5.31 – Variação espacial do sulfato e sulfeto no 287º dia de operação

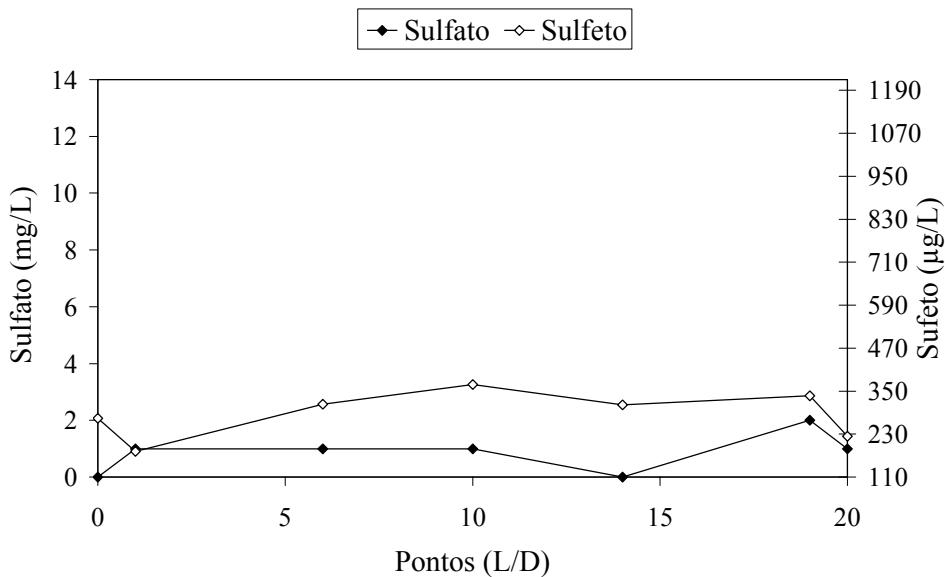


Figura 5.32 – Variação espacial do sulfato e sulfeto no 339º dia de operação

No 34º dia foi verificada a presença de 3 mg/L de sulfato afluente proveniente, provavelmente do extrato de levedura.

Durante a segunda variação espacial, pode-se observar aumento na concentração de sulfeto principalmente no primeiro trecho do reator. Simultaneamente, ocorreu diminuição da concentração de sulfato. Presume-se, então, que os microrganismos presentes nessa região podem ter utilizado o sulfato tanto para assimilação quanto para redução desassimilativa, produzindo sulfeto.

Ressalta-se que, no processo aeróbio de degradação da molécula de LAS, ocorre a formação de sulfato como subproduto (SCHÖBERL, 1989). Em condições anaeróbias, não se conhece ao certo o mecanismo de degradação dessa molécula. Contudo, acredita-se que possa ocorrer a quebra do anel aromático em condições anaeróbias (SHCHERBAKOVA et al., 1999), havendo, então, liberação do sulfato. Isso poderia explicar o fato de na terceira e quarta variações espaciais ter ocorrido maior produção de sulfeto que na segunda variação. O sulfato poderia estar sendo gerado pela quebra da molécula de LAS, repondo, assim, as moléculas convertidas em sulfeto.

Na terceira variação espacial verificou-se, inclusive, aumento na concentração de sulfato no ponto  $L/D = 1$  em relação ao afluente, passando da concentração de 3 mg/L para 6 mg/L, chegando a 7 mg/L em  $L/D = 19$ .

Com a retirada do extrato de levedura, a concentração de sulfato afluente foi abaixo do nível de detecção do método utilizado. Entretanto, no interior do reator, a concentração de sulfato foi próxima a 1 mg/L. A concentração de sulfeto se manteve praticamente constante após o primeiro trecho.

### **5.3. *Balanço de massa de LAS***

No final da operação do reator foram retiradas três amostras de 5 gramas do meio suporte, após homogeneização, para a realização da extração de LAS.

As amostras, após extração, tiveram que ser diluídas 10 vezes para se adequarem à curva do LAS utilizada no HPLC. Obteve-se concentração média de 0,84 mg de LAS por grama de carvão, considerando-se essa diluição. Como a massa total de carvão utilizada no reator foi de 348 gramas, o total de LAS adsorvido no meio suporte foi de 292 mgLAS.

Para o cálculo da quantidade de LAS afluente ao reator durante o período operacional, considerou-se vazão constante de 100 mL/h e, também, concentração de LAS acumulado entre cada análise realizada como a média entre as concentrações obtidas multiplicada pelo número de dias do período. O cálculo da quantidade de LAS efluente foi realizado da mesma maneira.

Depois de realizadas tais considerações, obteve-se que a quantidade de LAS afluente foi de 3910 mg/L e que a quantidade efluente foi de 2281 mg/L.

A quantidade de LAS degradada biologicamente pode ser calculada pela Equação (3).

$$LAS\ Biodegradado = Afluente - Efluente - Adsorção \quad (3)$$

Desse modo, obteve-se que a quantidade de LAS biodegradado foi de 1337 mg, que corresponde a 34% da quantidade de LAS afluente, como pode ser verificado na Tabela 5.7.

*Tabela 5.7 – Balanço de Massa do LAS*

<b>Afluente</b>	3910 mg
<b>Efluente</b>	2281 mg
<b>Adsorvido + Degradção</b>	1629 mg
<b>Adsorvido</b>	292 mg
<b>Biodegradado</b>	1337 mg

Também se realizou a verificação da quantidade de LAS acumulada por etapa operacional (Figura 5.33 e Tabela 5.8). Na etapa II, adicionou-se cerca de 1076 mg de LAS, 417 mg saíram no efluente e 659 mg foram removidos da água residuária sintética, correspondendo à remoção de 61%. Na etapa III, houve adição de 2578 mg de LAS, com remoção de 831 mg, correspondente a 32 %. Na etapa IV, a remoção foi de 54 %, para adição de 256 mg de LAS.

Verificou-se, desse modo, que a etapa III foi a que apresentou a menor remoção de LAS. Isso pode ter ocorrido porque na etapa II houve ação predominante de efeitos de adsorção e, na etapa IV, a ausência de outras fontes de carbono, de degradação mais fácil que a molécula de LAS, facilitou sua remoção.

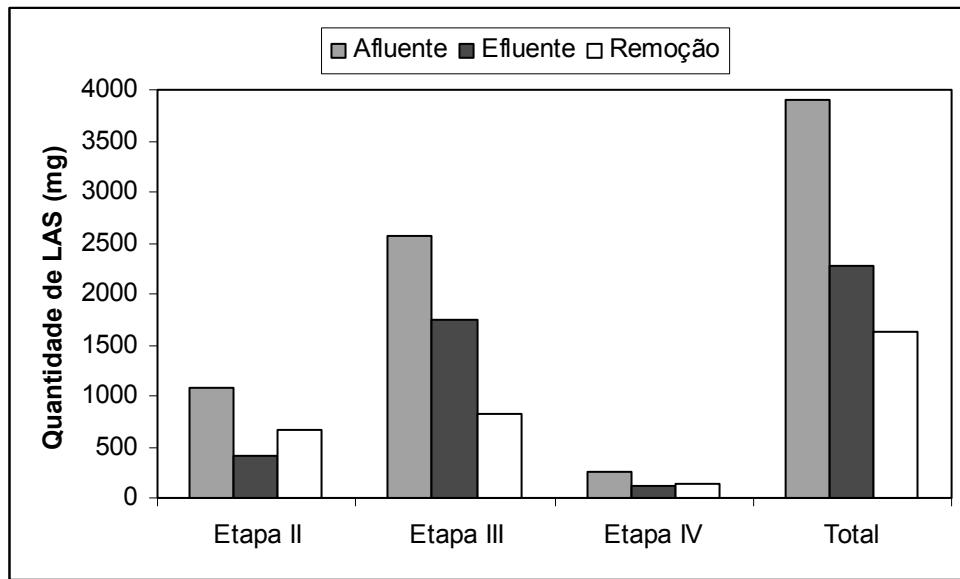


Figura 5.33 – Quantidade de LAS aplicada, efluente e removida em cada etapa

Tabela 5.8 – Quantidade de LAS afluente, efluente e removida em cada etapa

Etapa	Quantidade de LAS (mg)			
	Afluente	Efluente	Removida	Remoção (%)
II	1076	417	659	61
III	2578	1746	831	32
IV	256	118	138	54
Total	3910	2281	1629	42

#### 5.4. Análise de sólidos

Foi realizada a análise da quantidade de sólidos totais, fixos e voláteis presentes no inóculo e em amostras coletadas ao final da operação do reator.

A concentração de sólidos totais presentes no inóculo foi de 30,5 g/L (Tabela 5.9), sendo que cerca de 27 g/L (89%) corresponderam aos sólidos voláteis, ou seja, a parte biodegradável dos sólidos totais (principalmente composta de matéria orgânica). O restante correspondeu aos sólidos fixos, ou seja, a parte inorgânica.

*Tabela 5.9 – Concentração de sólidos do inóculo utilizado no reator*

Amostra	Sólidos (mg/L)				
	Totais	Fixos	Voláteis	% Fixos	% Voláteis
<b>1</b>	33.200	4.400	28.800	13	87
<b>2</b>	27.800	2.200	25.600	8	92
<b>Média</b>	30.500	3.300	27.200	11	89

Considerando-se que foram utilizados 1,5 L de inóculo no reator, pode-se concluir que a quantidade de sólidos totais inserida neste foi de 49,80 g, dos quais cerca de 5,48 g correspondem a sólidos fixos e 44,32 g a sólidos voláteis.

Para a amostras relativas ao final do período operacional, utilizou-se as massas de 6,66 g de carvão (amostra 1) e de 4,22 g de carvão (amostra 2). Obteve-se aproximadamente 190 mg sólidos/g de carvão (Tabela 5.10), dos quais 171 mg sólidos/g de carvão (90%) corresponderam aos sólidos voláteis. Desse modo, pode-se observar que a porcentagem de sólidos aumentou cerca de 1% em relação aos sólidos voláteis obtidos na análise do inóculo e, conseqüentemente, diminuiu 1% em relação à concentração de sólidos fixos.

*Tabela 5.10 – Concentração de sólidos no final do período operacional por grama de carvão*

Amostra	Sólidos (mg/g carvão)				
	Totais	Fixos	Voláteis	% Fixos	% Voláteis
<b>1</b>	185	21	164	11	89
<b>2</b>	195	18	177	9	91
<b>Média</b>	190	19	171	10	90

Considerando-se que o reator possuía 348 gramas de carvão vegetal e que a distribuição de sólidos foi uniforme. Pode-se inferir que a quantidade final de sólidos foi de 66,1 g de sólidos, dos quais 6,6 g corresponderam a sólidos fixos e 59,5 g a sólidos voláteis, ou seja, à matéria orgânica, correspondendo à massa microbiana total presente no reator. Devido ao fato da análise de sólidos ter sido realizada no final da etapa IV, quando havia apenas LAS como fonte de carbono, pode ter ocorrido morte microbiana pela redução brusca

da quantia de carbono prontamente disponível para uso pelas bactérias. Sendo assim, o reator, nas etapas anteriores de operação, poderia possuir maior concentração de sólidos totais que no final da operação.

Não obstante, pode-se observar aumento de 33% na concentração de sólidos totais na etapa final de operação em relação ao inóculo. O aumento da concentração de sólidos fixos foi de 21%, enquanto a de sólidos voláteis foi de 34%, demonstrando crescimento dos microrganismos em meio contendo LAS, visto que os sólidos voláteis correspondem principalmente a material orgânico.

### 5.5. Exames microscópicos

As microscopias de contraste de fase foram realizadas para avaliar a diversidade microbiana do inóculo, proveniente de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura, e de amostras de material suporte aos 118, 203 e 340 dias de operação (etapas II, III e IV). As Figuras 5.34, 5.35, 5.36 e 5.37 destacam as morfologias predominantes nas amostras do biofilme constituído no carvão vegetal.

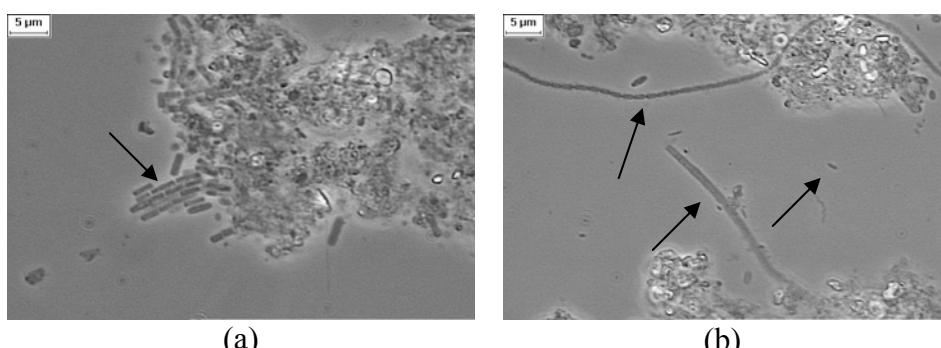


Figura 5.34 – Microscopia de contraste de fase de morfologias observadas no inóculo: (a) bacilos semelhantes à *Methanosaeta* sp., (b) bacilos, bacilos em cadeia e filamentos

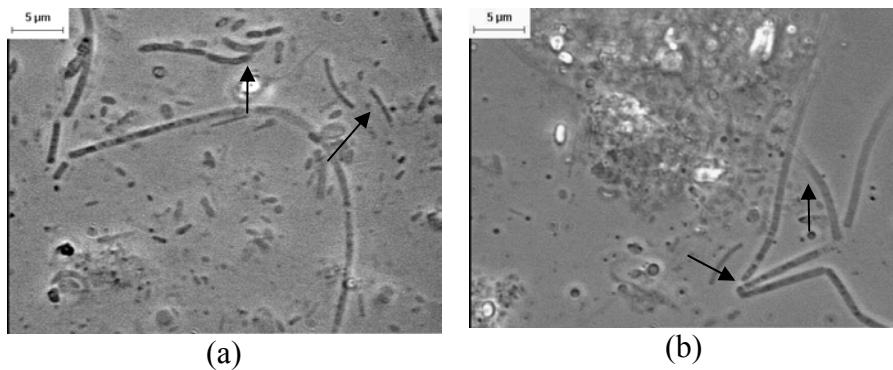


Figura 5.35 – Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas, após 118 dias de operação: (a) e (b) bacilos, bacilos curvos e filamentos

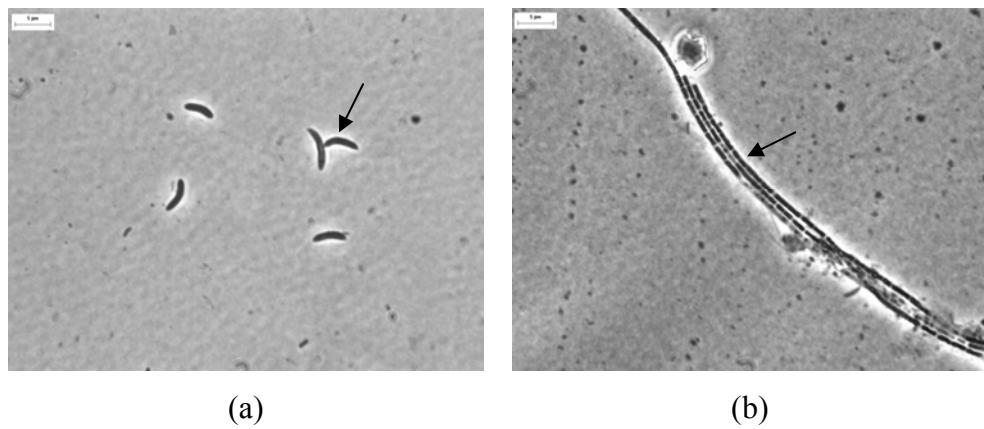


Figura 5.36 – Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas , após 203 dias de operação: (a) bacilos curvos, (b) filamentos

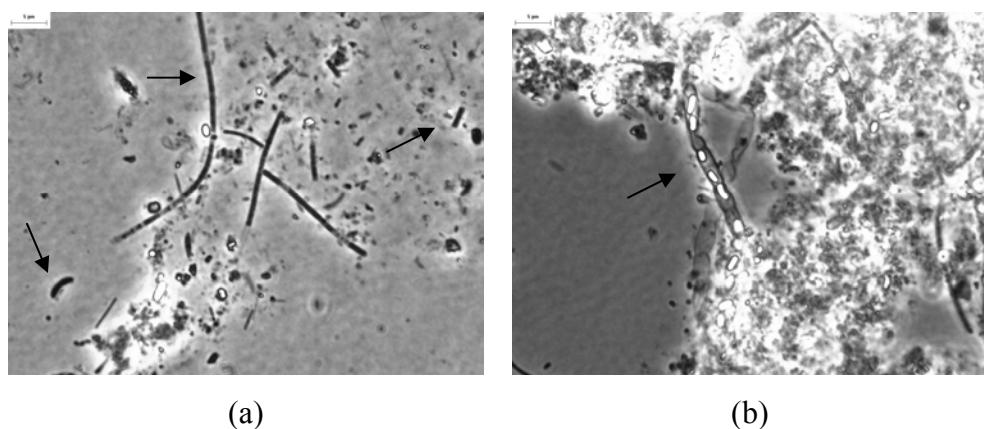


Figura 5.37 – Microscopia óptica de contraste de fase das morfologias microbianas , após 340 dias de operação: (a) filamentos, bacilos curvos, bacilos e (b) bacilos com endósporos

Na análise do inóculo (Figura 5.34) verificou-se ampla diversidade morfológica de microrganismos, com a presença de filamentos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e bacilos em cadeia. Após 118 dias de operação (Figura 5.35) não foi verificada mudança significativa das morfologias, verificando-se a presença de bacilos, bacilos curvos e filamentos. Aos 203 dias de operação (Figura 5.36) observou-se predomínio de bacilos curvos nas amostras, possíveis responsáveis pelo metabolismo desassimilativo do sulfato. Também verificou-se a presença de bacilos retos e filamentos. Após 340 dias de operação (Figura 5.37), observou-se predomínio de células mortas dentro do reator. Observou-se a presença de bacilos curvos, filamentos, bacilos retos em cadeia e endósporos.

De maneira geral, notou-se a presença de filamentos e bacilos durante todo o período de operação do reator. Contudo, no período final, verificou-se maior presença de bacilos curvos, os quais podem estar relacionados com a degradação do LAS, e de endósporos, que podem estar relacionados à retirada dos co-substratos, nas amostras analisadas.

Após a finalização da operação do reator, o material suporte com os microrganismos aderidos foi homogeneizado em recipiente adequado, procedendo-se, então, à coleta de amostras para a realização da microscopia eletrônica de varredura, extração de DNA e demais metodologias de biologia molecular, além da realização da análise da concentração de sólidos.

Por meio da MEV constatou-se a presença de bacilos, coco-bacilos, filamentos e morfologia semelhante à *Methanosarcina* sp. (Figura 5.38).

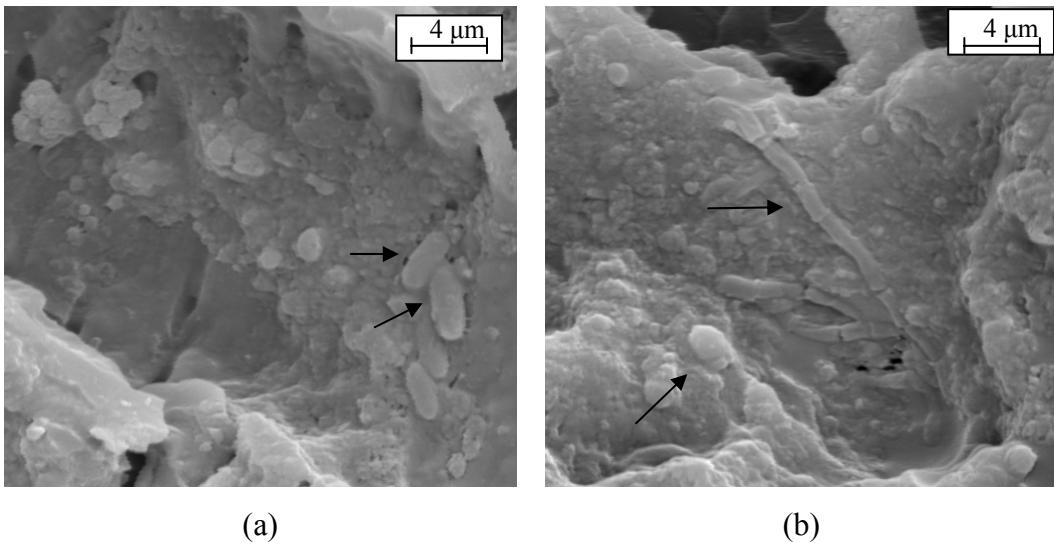


Figura 5.38 – Microscopia eletrônica de varredura do material suporte ao final da operação (340 dias de operação): (a) bacilos e (b) coco-bacilos e filamentos

## 5.6. Análise Filogenética

Amostras da biomassa foram retiradas ao final do período operacional, quando a alimentação continha cerca de 6 mg/L de LAS, sem nenhuma fonte adicional de carbono. A biomassa foi, então, submetida à extração de DNA, reação de PCR, clonagem e seqüenciamento do fragmento de RNAr 16S para a identificação dos microrganismos.

Foram obtidos 28 clones contendo o inserto do gene RNAr 16S. Após a análise em banco de dados (Genbank), verificou-se a presença de clones relacionados ao Filo Proteobacteria, Classe Deltaproteobacteria; clones relacionados ao Filo Spirochaetes, Classe Spirochaetes; clones relacionados ao Filo Firmicutes, Classe Clostridia; clones associados ao Filo Bacteroidetes, Classe Sphingobacteria; clones relacionados ao Filo Deferribacteres, Classe Deferribacteres; além de clones associados às bactérias não cultivadas. As subdivisões podem ser observadas na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Afiliação das seqüências obtidas dos clones das amostras de biomassa do RAHLF

Clone	nº de Acesso	Similaridade (%)	Referência	Filo	Classe	Ordem	Família	Afiliação
1,3,5,9,13, 14,15, 24 e 29	EU399680	99	Chen,C. L. <i>et al.</i> (2008a)	Proteobacteria	Delta proteobacteria			
	AF229784	99	Wu, J.H. <i>et al.</i> (2001)	Proteobacteria	Delta proteobacteria			
	AB212873	99	Qiu,Y.L. <i>et al.</i> (2008)	Proteobacteria	Delta proteobacteria		Syntrophorhabdaceae	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i>
	EF198031	99	Chen,C.-L. <i>et al.</i> (2008b)	Proteobacteria	Delta proteobacteria			
	AB091329	99	Qiu,Y.L. <i>et al.</i> (2004)	Proteobacteria	Delta proteobacteria			
	EF029299	98	Baertsch,C. <i>et al.</i> (2007)					Não cultivada
	EF515569	98	Dryden, S.K. <i>et al.</i> (não publicado)					Não cultivada
	AJ249102	99	Schlötelburg, C. <i>et al.</i> (2000)	Proteobacteria	Delta proteobacteria			
2,6,12 e 28	DQ478737	99	Diaz,E.E. <i>et al.</i> (2006)					Não cultivada
	CT574137	98	Chouari,R. <i>et al.</i> (2005)					Não cultivada
	AY426466	99	Roest,K. <i>et al.</i> (2005)	Deferrribacteres	Deferrribacteres	Deferrribacteriales	Incerto	<i>Synergistes</i>
4	DQ238245	91	Keyser, M. <i>et al.</i> (2007)					Não cultivada

Continua

Continuação da Tabela 5.11

	EF686999	95	Souidi,K. <i>et al.</i> (2007)					Não cultivada
8, 21 e 27	AY214182	93	Alfreider,A. & Vogt, C. (não publicado)	Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	
	AB244312	93	Shigematsu,T. <i>et al.</i> (2006)	Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	
	EU633249	93	Pace,N. <i>et al.</i> (não publicado)					Espiroqueta não cultivada
10 e 22	AJ853575	93	Huang,L.N. <i>et al.</i> (2005)					Não cultivada
11 e 30	AM183076	99	Guo,Y. <i>et al.</i> (2007)					Não cultivada
16	AY133086	93	Carroll, A.B. & Zinder,S.H. (não publicado)	Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>
	DQ664027	94	Allen,J.P. <i>et al.</i> (2007)					Não cultivada
17	EF459843	97	Edlund,A. <i>et al.</i> (2008)					Não cultivada
18	AY953232	99	Von Arb,M. <i>et al.</i> (não publicado)	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	
	M62421	94	Kane, M.D. <i>et al.</i> (1991)	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Clostridium</i>
	X76750	98	Collins,M.D. <i>et al.</i> (1994)	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Clostridium glycolicum</i>
19	AJ306773	97	Schlöetelburg,C. (2000)	Proteobacteria	Delta proteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Syntrophus</i> <i>Continua</i>

Conclusão da Tabela 5.11

20	EU046272	99	Lai,R. <i>et al.</i> (não publicado)	Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>
23	EF686960	93	Souidi,K. <i>et al.</i> (2007)					Não cultivada
	AJ853524	93	Huang,L.N. <i>et al.</i> (2005)					Não cultivada

Devido à dificuldade encontrada em se obter o alinhamento das seqüências, estas foram divididas em duas árvores filogenéticas como observado nas Figuras 5.39 e 5.40.

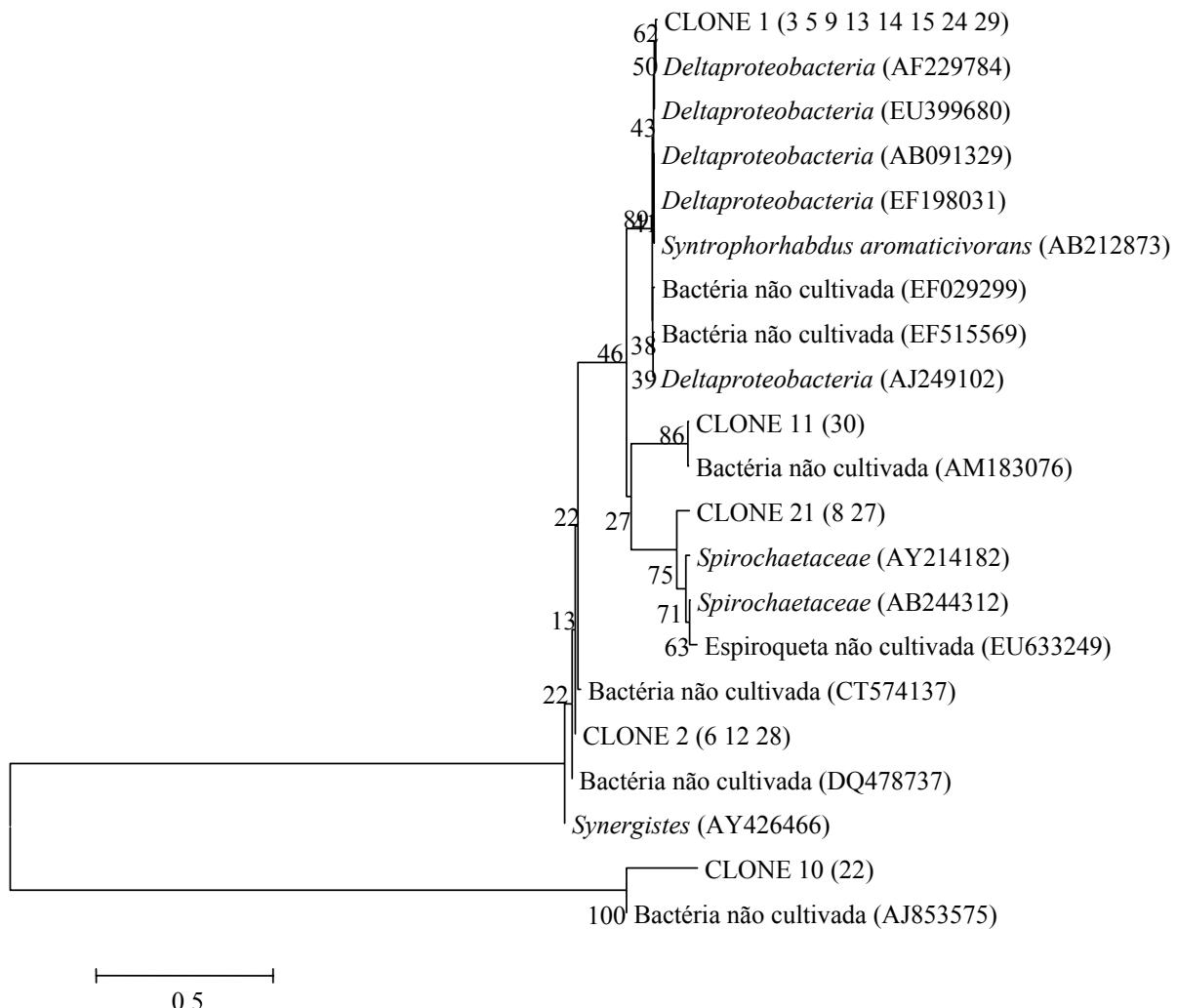


Figura 5.39 – Árvore filogenética de consenso apresentando afiliação entre os clones (primers específicos para Domínio Bacteria). Árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining.

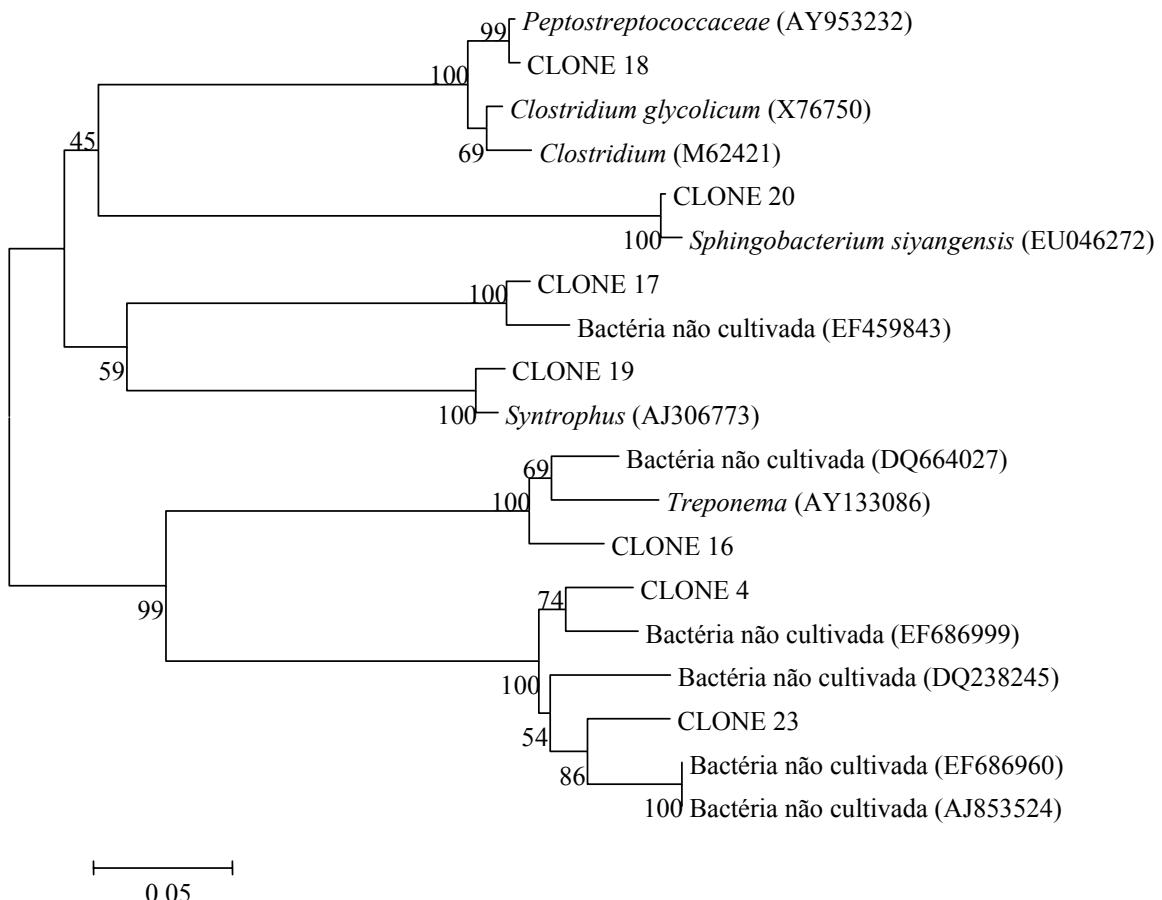


Figura 5.40 – Árvore filogenética de consenso apresentando afiliação entre os clones (primers específicos para Domínio Bacteria). Árvore foi construída pelo método de Neighbor-Joining.

Os clones 1, 3, 9, 13, 14, 15, 24 e 29 e o clone 19 foram associados principalmente à Classe Deltaproteobacteria inserida no Filo *Proteobacteria*. As proteobactérias constituem o maior filo conhecido do Domínio *Bacteria*. Esse filo é dividido em subdivisões alfa, beta, gama, delta e epsilon. São todas gram-negativas, apresentando grande diversidade metabólica (MADINGAN, 2004).

A classe Deltaproteobacteria é a mais peculiar em relação ao modo de vida e à morfologia entre as proteobactérias. Os maiores subgrupos dessa classe são: (1) as mixobactérias, organismos predominantemente aeróbios, com mobilidade e que formam corpos frutíferos; (2) os bdellovibrios que são organismos tipicamente predadores de outras bactérias gram-positivas; (3) as bactérias redutoras de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*,

*Desulfococcus*, *Desulfonema*, etc.) e de enxofre (por exemplo, *Desulfuromonas*). São organismos estritamente anaeróbios, (4) algumas bactérias sintróficas que transformam benzoato (*Syntrophus*) a acetato, CO<sub>2</sub> e hidrogênio em co-cultura com metanogênicas que consomem hidrogênio (RAMOS, 2006).

Algumas deltaproteobactérias foram relacionadas com a degradação de compostos xenobióticos, como fenol (CHEN et al., 2008a), que possui um anel aromático associado a radical hidroxila (OH), além de moléculas mais complexas, como o ácido tereftálico, também conhecido como IUPAC (WU et al., 2001; QIU et al., 2004), composto formado por anel aromático ligado a dois grupos carboxila (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(COOH)<sub>2</sub>) e dicloropropano (SCHLÖTELBURG et al., 2000).

Qiu et al. (2008) descreveu a bactéria *Syntrophorhabdus aromaticivorans* como sendo a primeira cultura anaeróbia capaz de degradar fenol a acetato em associações sintróficas obrigatórias com metanogênicas hidrogenotróficas.

*Syntrophorhabdus aromaticivorans* é um organismo anaeróbio mesofílico, com formato de bacilo, gram-negativo e sem mecanismos de mobilidade. A temperatura ótima de crescimento é de 25 a 37°C. Em associação com metanogênicas hidrogenotróficas, podem utilizar fenol, *p*-cresol, isoftalato e benzoato. Devido à sua capacidade de degradar compostos aromáticos, esse organismo pode estar relacionado com a degradação do anel aromático do LAS.

O clone 19 foi afiliado, com 97% de similaridade, a *Syntrophus* sp.. Essas bactérias são, em geral, capazes de degradar, por meio de metabolismo sintrófico, amplo número de compostos, tais como ácidos graxos, lactato, açúcares, hidrocarbonetos, incluindo o metano, certos aminoácidos e compostos aromáticos, tais como benzoato. Vivem em co-culturas com metanogênicas hidrogenotróficas e redutoras de sulfato (JACKSON et al., 1999; McNERNEY et al., 2007; CHEN et al., 2008b). Baseado nessas características supõe-se que

este microrganismo pode estar associado à degradação da sacarose, extrato de levedura e até mesmo da molécula de LAS.

Os clones 2, 6, 12 e 28 foram associados ao Filo *Deferrribacteres*, Ordem *Deferribacterales*. Essas bactérias foram encontradas em reator UASB usado no tratamento de água residuária de indústria de papel, após o lodo coletado ter sido enriquecido em meio contendo propionato e butirato na ausência de sulfato (ROEST et al., 2005). Podem ter aparecido devido à baixa concentração de sulfato presente no reator.

Os clones 2, 6, 12 e 28 também foram afiliados a *Synergistes* (99% de similaridade). Porém, segundo Vartoukian et al. (2007), “*Synergistes*” representam um grupo de organismos anaeróbios, gram-negativos, suficientemente distinto de todos os outros filos, a ponto de ser considerado um filo ou divisão distinta. São amplamente distribuídos na natureza, embora normalmente representem apenas uma pequena parcela da comunidade bacteriana em todos os habitats. Apresentam ampla variedade de características fisiológicas e bioquímicas, contudo todos os táxons até hoje estudados tem a capacidade de degradar aminoácidos. Entretanto, ainda permanece incerta sua taxonomia, devido ao fato da sociedade científica não ter entrado em consenso. Provavelmente, a presença dessas bactérias foi favorecida pela adição de extrato de levedura. Mesmo sendo retirado na última etapa de operação, com certeza essas células permaneceram no reator após 13 dias de operação sem esse substrato.

Os clones 2, 6, 12 e 28 também foram associados a bactérias não cultivadas, estando presentes em lodo de reator UASB tratando água residuária de cervejaria (DIAZ et al., 2006) e em amostras de lodo da estação de tratamento anaeróbia de Evry, Paris, França (CHOUARI et al., 2005).

O clone 4 foi associado a dois gêneros de bactéria não cultivadas, encontradas em grânulos de reator UASB usado no tratamento de água residuária proveniente de indústria vinícola (número de identificação DQ238245, similaridade de 91%) (KEYSER et al., 2006) e

em co-fermentação de biogás a partir de silagem de milho e esterco bovino (95%, número de identificação EF686999) (SOUIDI et al., 2007). Assim, a presença dessas bactérias é justificada pela origem do inóculo proveniente de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura.

Os clones 8, 21 e 27 e o clone 16 apresentaram 93% de similaridade com o Filo Spirochaetes. As espiroquetas são bactérias gram-negativas móveis, intensamente espiraladas (formato helicoidal), tipicamente delgadas e flexíveis. Esses procariotos de morfologia singular constituem uma das principais linhagens filogenéticas do Domínio *Bacteria*. Anaeróbias facultativas, ou aeróbias, e quimioheterotróficas. Consomem carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos ou álcoois de cadeia longa como fonte de energia e carbono. Possuem dois a mais de 100 flagelos, os quais permitem a mobilidade da célula em três tipos de movimento, a saber, locomoção, rotação no eixo longitudinal e flexão. Espiroquetas em suspensão capazes de se locomover mesmo quando suas células não possuem flagelos (Bergey's, 1994).

As espiroquetas são classificadas em oito gêneros, a saber, *Cristispira*, *Spirochaeta*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Leptonema*, *Brachyspira* e *Brevinema* (MADINGAN, 2004). Tais bactérias foram encontradas em populações de microrganismos em águas contaminadas com benzeno (ALFREIDER et al., 2002; ALFREIDER & VOGT, não publicado) e em consórcio mesofílico metanogênico capaz de degradar ácidos graxos em reator de mistura completa (SHIGEMATSU et al., 2006).

O clone 16 foi associado, com 93% de similaridade, a *Treponema*. Este gênero engloba as espiroquetas anaeróbias ou microaeróbias, são quimiorganotróficas, utilizando ampla variedade de carboidratos e aminoácidos como fonte de carbono e energia (Bergey's, 1994). Este organismo foi encontrado em solos contaminados com TCE (tricloroetileno) (CAROLL, não pulicado).

O clone 16 também foi relacionado, com 94% de similaridade, com bactérias encontradas em sedimentos contaminados com petróleo e hidrocarbonetos (ALLEN et al, 2007). Ressalta-se que os hidrocarbonetos são constituídos basicamente de ligações de carbono e hidrogênio, e podem conter em sua molécula oxigênio, enxofre e nitrogênio formando elevada gama de moléculas com diferentes propriedades, podendo, inclusive, formar compostos cílicos e aromáticos. Deste modo, pode-se inferir que esta bactéria pode estar relacionada com a degradação do LAS, tanto da cadeia alquílica quanto do anel benzênico.

Os clones 10 e 22 foram associados, com 93% de similaridade, às bactérias não cultivadas encontradas em aterro sanitário de resíduos urbanos (HUANG et al., 2005).

Os clones 11 e 30 foram associados, com 93% de similaridade, às bactérias encontradas em pilhas de compostagem utilizadas para digestão de resíduos sólidos de fazendas de suínos (GUO et al., 2007). O aparecimento dessa bactéria no RAHLF pode estar relacionado ao inóculo utilizado no reator.

O clone 17 foi associado, com 97% de similaridade, às bactérias encontradas em sedimentos marinhos do mar Báltico. Edlund (2007) em sua pesquisa relata as modificações causadas por atividades humanas no mar Báltico e adiciona que nos sedimentos amostrados foram encontradas concentrações de diversos poluentes, como PCBs (Bifenilas policloradas), PAHs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e metais pesados acumulados nos sedimentos devido à sua baixa degradabilidade.

O clone 18 foi associado, com 94 a 99% de similaridade, às bactérias do Filo Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales e família Peptostreptococcaceae e ao gênero *Clostridium*.

O filo Firmicutes é composto por bactérias gram-positivas aeróbias e anaeróbias e com baixo teor G+C. Os organismos pertencentes a este filo apresentam metabolismo

caracterizado por homo e heterofermentação e respiração. Alguns destes são formadores de endósporos e, freqüentemente, encontrados em solos (CANNAVAN, 2007). Este filo é formado por três classes: Bacilli, Clostridia e Mollicutes. Membros deste filo ocupam amplo número de habitats e podem ser benéficos ou lesivos para diversos setores industriais, como o de alimentos e bebidas (HAAKENSEN, 2008).

Os clostrídios têm formato de bacilos, são pleomórficos, possuindo formato oval ou esférico. A maioria das espécies são quimiorganotróficas, outras são quimioautotrófica ou quimiolitotrófica. Alguns clostrídeos fermentam açúcares e produzem ácido butírico como principal produto final, outros também produzem acetona e butanol. Existem alguns grupos do gênero *Clostridium* com a capacidade de fermentar carboidratos, como celulose, açúcares, amido e pectina. Outros fermentam aminoácidos ou purina, e ainda há grupos que fermentam etanol e ácidos graxos. Não fazem redução dissimilativa de sulfato e, usualmente, são anaeróbias obrigatórias (MADINGAN, 2004).

Duarte et al. (2008) encontraram bactérias do Filo Firmicutes como os maiores componentes da comunidade bacteriana em reatores de leito fixo (RAHLF) usados no tratamento de esgoto sintético contendo LAS. Os autores associaram essas bactérias como prováveis responsáveis pela degradação do alquilbenzeno linear sulfonado. Lara-Martín et al. (2007) também associaram o gênero *Clostridium* pertencente ao Filo Firmicutes à degradação do LAS, levando em consideração que várias espécies estão confirmadas de serem capazes de dessulfonar alquil e arilsulfonados, como *Clostridium beijerinckii* strain EV4 (CHIEN, 2005). *Clostridium pasteurianum* strain DSM 12136, usam o grupo sulfônico do 4-toluenosulfonado como fonte de enxofre (CAO et al., 2003).

O clone 20 foi associado, com 99% de similaridade, ao filo Bacteroidetes, classe Sphingobacteria, ordem Sphingobacteriaceae e espécie *Sphingobacterium siyangensis*. Bacteroidetes é um filo do Domínio *Bacteria* que engloba três grandes grupos, divididos em

três classes, cada uma com uma única ordem, a saber, Bacteroides, Flavobactérias e Sphingobactérias. Este filo contém bacilos anaeróbios, gram-negativos, não formadores de endósporos e sem mecanismos para mobilidade (HOLMES, 2006).

O gênero *Sphingobacterium* corresponde a bacilos estreitos, não formadores de endósporos, gram-negativos e sem flagelos. Possuem metabolismo quimiorganotrófico, sem requerimentos específicos para crescimento, produzem ácidos por meio da oxidação de carboidratos (Berkey's, 1994; LIU et al., 2008).

O clone 23 foi associado, com 93% de similaridade, à bactérias não cultivadas encontradas em aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos (HUANG et al., 2005) e à bactérias co-produtoras de biogás a partir da fermentação (SOUIDI et al., 2007).

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

A remoção de LAS variou durante o período operacional. Na etapa II, com a adição do surfactante ao substrato sintético, constituído de extrato de levedura, bicarbonato de sódio, sacarose e solução de metais traço, considerou-se que grande parte da remoção deveu-se à processos de adsorção do LAS no material suporte, devido às características físico-químicas da molécula. Na etapa III, que teve duração de 210 dias, a remoção média foi de surfactante foi de  $40 \pm 33\%$ , com remoção de  $92 \pm 19\%$  a partir do 293º dia de operação, sugerindo certa estabilização no decorrer dessa etapa. Com a retirada das outras fontes de carbono (etapa IV), verificou-se perda inicial de eficiência na remoção do surfactante, a qual pode ter ocorrido devido à desestabilização do sistema, com modificações nos parâmetros físico-químicos, como aumento do pH. Houve, novamente, aumento da eficiência de remoção para valores próximos a 60%, conjuntamente com a manutenção da concentração efluente do surfactante próxima a 2,4 mg/L. Ressalta-se que esse valor ainda é elevado para o lançamento em corpos receptores, visto que ainda apresenta toxicidade potencial para diversas espécies.

A utilização do LAS como única fonte de carbono pode ter ocasionado a morte dos microrganismos mais sensíveis e a diminuição da diversidade microbiana, resultando em certa seleção dos microrganismos apesar dessa etapa ter durado apenas 13 dias.

A remoção média de LAS foi de  $47\% \pm 34\%$  do LAS, para concentração inicial média de  $5,3 \pm 1,7$  mg/L. A partir do cálculo do balanço de massa, obteve-se que a quantidade de LAS degradado biologicamente correspondeu a 34% da quantidade adicionada, indicando que os microrganismos presentes no reator foram capazes de degradar o surfactante.

Observou-se, pela análise filogenética, a presença de microrganismos capazes de degradar compostos aromáticos, pertencentes, principalmente, à Classe Deltaproteobacteria, ao Filo Firmicutes e ao Filo Spirochaetes, podendo ser os responsáveis pela degradação do surfactante.

Como o LAS não prejudicou a remoção da matéria orgânica, acredita-se que o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) possa ser utilizado para tratamento de águas residuárias contendo este surfactante com concentração afluente próxima a 6 mg/L.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFREIDER, A.; VOGT, C.; BABEL, W. Microbial diversity in a *in situ* reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analyses. *Systematic Applied Microbiology*, v.25, p. 232-240, 2002.

ALFREIDER, A.; VOGT, C. Analysis of bacterial populations in benzene-contaminated groundwater. Não publicado.

ALLEN, J.P.; ATEKWANA, E.A.; ATEKWANA, E.A.; DURIS, J.W.; WERKEMA, D.D.; ROSSBACH, S. The microbial community structure in petroleum-contaminated sediments corresponds to geophysical signatures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 2860-2870, 2007.

ÁLVAREZ-MUÑOZ, D.; LARA-MARTÍN, P.A.; BLASCO, J.; GÓMEZ-PARRA, A.; GONZÁLEZ-MAZO, E. Presence, biotransformation and effects of sulfophenilcarboxilic acids in the benthic fish *Solea senegalensis*. *Environmental International*, v. 33, p. 565-570, 2007.

AMANN, R.I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v.59, p.143-169, 1995.

ANDRADE NETTO, C.O.; CAMPOS, J.R. Introdução. In: Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Projeto PROSAB (Programa de Pesquisa em Saneamento Básico), p.1-28, editora ABES, 1999.

ARAÚJO, J C; TÉRAN, F C; OLIVEIRA, R A; NOUR, E A A; MONTENEGRO, M A P; CAMPOS, J R; VAZOLLER, R F. Comparison of hexamethyldisilazane and critical point

drying treatment for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *Journal of Electron Microscopy*, v. 52(4), p. 429-433, 2003.

APHA/AWWA/Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington, DC, USA, 1998.

BAERTSCH, C.; PAEZ-RUBIO, T.; VIAU, E.; PECCIA, J. Source tracking aerosols released from land-applied class B biosolids during high-wind events. *Applied Environmental Microbiology*, v.73, p.4522-4531, 2007.

BASAR, C.A.; KARAGUNDUZ, A.; CAKICI, A.; KESKINLER, B. Removal of surfactants by powered activated carbon and microfiltration. *Water Research*, v. 38, p. 2127-2124, 2004.

*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> Edition. Editora Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1994

BERNA. J. L.; FERRIER, J.; PRATS, D.; BEVIA, F. R. The fate of LAS in the environment. *Tenside surfactants detergents*, v. 26, p. 101-107, 1989.

BORSATO, D.; GALÃO, O.F.; MOREIRA, I. Detergentes naturais e sintéticos. Londrina. Editora UEL, 131 p., 1999.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G.P. Recursos microbiológicos para biotecnologia, 2001. Disponível em: [http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct\\_recursos\\_biologicos.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf). Acessado em 18/07/2008.

CANNAVAN, F. S. Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental. *Dissertação de Mestrado*, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CAO, X.; LIU, X.; DONG, X. *Alkaliphilus crotonatoxidans* sp. nov, a strictly anaerobic, crotonate-dismutating bacterium isolated from a methanogenic environment. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 971-975, 2003.

CARROLL, A.B.; ZINDER, S.H. Microbial populations at a TCE-contaminated site before and after in situ bioremediation treatment. Não publicado.

CHANG, M.-Y.; JUANG, R.-S. Equilibrium and kinetics studies on the adsorption of surfactant, organic acids and dyes from water onto natural biopolymers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 269, p. 35-46, 2005.

CHEN, C. L., WU, J. H., LIANG, T. M.; LIU, W. T. Diversity and localization of microbial consortium in a full-scale phenol-degrading granular activated carbon anaerobic reactor. Submissão direta (13/01/2008) na Divisão de Engenharia e Ciência Ambiental da Universidade Federal de Singapura, Singapura, 2008a.

CHEN, C. L.; WUC, J. H.; LIUB, W. T. Identification of important microbial populations in the mesophilic and thermophilic phenol-degrading methanogenic consortia. *Water Research*, v. 42, p.1963-1976, 2008b.

CHERNICHARO, C. A. L. Reatores anaeróbios. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 1997. 246 p. (Princípios do Tratamento de Águas Residuárias; 5).

CHIEN, C. C. Arylsulfonates as sole source of sulfur for *Clostridium pasteurianum* DSM 12136. *Journal of Basic Microbiology*, v.45, p. 274- 278, 2005.

CHOUARI, R.; Le PASLIER, D.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WEISSENBACH, J.; SGHIR, A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology*, v. 7, nº 8, p. 1104-1115, 2005.

CLARA, M.; SCHARF, S.; SCHEFFKNECHT, C.; GANS, O. Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. *Water Research*, v.41, p. 4339-4348, 2007.

COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J.J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J.A. The phylogeny of the

genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, p. 812-826, 1994.

CONRAD, A.; CADORET, A.; CORTEEL, P.; LEROY, P.; BLOCK, J.-C. Adsorption/desorption of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) and azoproteins by/from activated sludge flocs. *Chemosphere*, v. 62, p. 53-60, 2006.

CSERHÁTI, T.; FORGÁES, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, v. 28, p.137-148, 2002.

DAMASCENO, L. H. S.; MARTINS, M. E.; ZAIAT, M. Degradação do aldicarbe no reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições metanogênicas, sulfetogênicas e desnitrificantes. In: I Seminário do Projeto Temático, São Carlos, SP. Anais. p.348-355, 2006.

DIAZ, E.E.; STAMS, A.J.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied Environmental Microbiology*, v. 72, n° 7, p. 4942-4949, 2006.

DILLALO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile acids by direct titration. *Journal WPCF*, v.33, p.356-365, 1961.

DORIGO, U.; VOLATIER, L.; HUMBERT, J.F. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, v. 39, p. 2207-2218, 2005.

DRYDEN, S.K.; HE, Z.; LEY, R.E.; ANGENENT, L.T. Electricigen Enrichment in a MFC. Não publicado.

DUARTE, I.C.S. Caracterização microbiológica da remoção e degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reatores anaeróbios com biofilme e células planctônicas. *Tese de Doutorado*, Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 2006.

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

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

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

EDLUND, A. Microbial diversity in Baltic sea sediments. *Tese de doutorado*, Swedish University of Agricultural Sciences (Universidade sueca de ciências agrícolas), Uppsala, 2007.

EDLUND, A.; HÅRDEMAN, F.; JANSSON, J. K.; SJÖLING, S. Active bacterial community structure along vertical redox gradients in Baltic Sea sediment. *Environmental Microbiology*, 2008. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01624.x

EICHHORN, P.; RODRIGUES, S. V.; MAUMANN, W.; KNEPPER, T. P. Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. *The Science of the Total Environmental*, v. 284, p. 123-134, 2002.

FAORO, H. Determinação da biodiversidade de Archaea e Bacteria da mata atlântica paranaense. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FEDERLI, T. W.; SCHWAB, B. S. Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a Laundromat waste-water pond. *Water Research*, v.26, p. 123-127, 1992.

FERNANDES, B. S.; LAZARO, C. Z.; CHINÁLIA, F.; DUARTE, I. C. S.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Tratamento de compostos presentes na gasolina em reator anaeróbio horizontal de leito fixo: avaliação de diferentes fontes de inóculo e da adição de sulfato e ferro (III). In: IV Seminário do Projeto Temático, São Carlos, SP. Anais. p.11-19, 2005.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; DEL NERI, V. Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor for paper industry wastewater treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.12, p.235-239, 1995.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M; CAVALCANTI, P.F.F. Fundamentos do tratamento anaeróbio. In: Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Projeto PROSAB (Programa de Pesquisa em Saneamento Básico), p.29-52, editora ABES, 1999.

GARCIA, E.S.; CHAMAS, C.I. Genética molecular: avanços e problemas. Caderno de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 12, p.103-107, 1996

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; RIBOSA, I.; LATORRE, A.; SÁNCHEZ-LEAL, J. Anaerobic digestion of linear alkylbenzene sulfonates: biodegradation kinetics and metabolite analysis. *Chemosphere*, v. 60. p. 1636-1643, 2005.

GARCIA, M. T.; CAMPOS, E.; SÁNCHEZ-LEAL, J.; RIBOSA, I. Effect of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) on anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, v. 40, p.2958-2964, 2006.

GAVALA, H. N.; AHRING, B. K. Inhibition of the anaerobic digestion process by linear alkylbenzene sulfonates. *Biodegradation*, v. 13, p. 201-209, 2002.

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

GUO, Y.; ZHU, N.; ZHU, S.; DENG, C.Y. Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 1344-1354, 2007.

GUSMÃO, V. R.; MARTINS, T. H.; CHINALIA, F. A.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Remoção de etanol, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno por cultura desnitrificante em reator anaeróbio horizontal de leito fixo. In: IV Seminário do Projeto Temático, São Carlos, SP. Anais. p.67-76, 2005.

HAAKENSEN, M.; DOBSON, C. M.; DENEER, H.; ZIOLA, B. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *International Journal of Food Microbiology*, v. 125, p. 236-241, 2008.

HAMPEL, M.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; VALE, C.; BLASCO, J. Derivation of predicted no effect concentrations (PNEC) for marine environmental risk assessment: Application of different approaches to the model contaminant Linear Alkylbenzene Sulphonates (LAS) in a site-specific environment. *Environment International*, v. 33, p. 486-491, 2007.

HARRISON, I.M.; CANDAU, F.; ZANA, R. Interactions between polyampholytes and ionic surfactants. *Colloid Polymer Science*, v.277, p. 48-57, 1999.

HOFER, R.; JENEY, Z.; BUCHER, F. Chronic effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and ammonia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry at water criteria limits. *Water Research*, v. 29, nº 12, p.2725-2729, 1995.

HOLMES, B. The genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium* and *Weeksella*. In: The Prokaryotes – A handbook on the Biology of Bacteria, v. 7, 3<sup>a</sup> ed., p. 539-548, Editora Springer, 2006.

HUANG, L.N.; ZHU, S.; ZHOU, H.; QU, L.H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill. *FEMS Microbiology Letters*, v. 242, p. 297-303, 2005.

- HUNGENHOTLZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Tibtech*, v. 14, p. 190-197, 1996.
- JACKSON, E. B.; BHUPATHIRAJU, V. K.; TANNER, R. S.; WOESE, C. R.; McINERNEY, M. J. *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids. *Archives of Microbiology*, v. 171, p. 107-114, 1999.
- KANE, M. D.; BRAUMAN, A.; BREZNAK, J. A. *Clostridium mayombei* sp. nov., an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> acetogenic bacterium from the gut of the African soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Archives of Microbiology*, v. 156, p. 99-104, 1991.
- KATO, M.; ANDRADE NETTO, C.O.; 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. Projeto PROSAB (Programa de Pesquisa em Saneamento Básico), p.29-52, editora ABES, 1999.
- KEYSER, M. PCR detection, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting and identification of the microbial consortium in different types of UASB granules. *Tese de doutorado apresentada à Faculty of AgriSciences*, University of Stellenbosch, Cabo Ocidental, África do Sul, 2006.
- KEYSER, M., WITTHUHN,C.R., BRITZ,T.J. AND COETZEE,M.P.A. Fingerprinting and identification of Bacteria present in four different types of UASB granules. *S. Afr. J. Enol. Vitic*, v. 28, p. 69-79, 2007.
- KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions trough comparative studies of nucleotides sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p.111-120, 1980.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001.

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

LAI, R.; LIU, H.; LIU, R. A novel bacteria of *Sphingobacterium* isolated from Jiangsu province of China. Não publicado.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics, p.115-148, editado por Stackebrandt, E; Goodfellow, M.. *Academic, Chichester, UK*, 1991.

LIU, R.; LIU, H.; ZHANG, C. X.; YANG, S. Y.; LIU, X. H.; ZHANG, K. Y.; LAI, R. *Sphingobacterium siyangense* sp. nov., isolated from farm soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.58, p.1458-1462, 2008.

LIWARSKA-BIZUKOJC, E.; BIZUKOJC, M. Effect of selected anionic surfactants on activated sludge flocs. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p.660-668, 2006.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*, 10rd ed, 608p., editora Pearson Education do Brasil, 2004.

MANOUSAKI, E.; PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, D. Degradation of sodium dodecybenzene sulfonate in water by ultrasonic irradiation. *Water Research*, v. 38, p. 3751-3759, 2004.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G.S. *Molecular biology of pathogenic fungi. A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., 577p., 1994.

MATTHIJS, E.; DE HENAU, H. Determination of linear alkylbenzene in aqueous samples, sediments, sludges and soils using HPLC. *Tenside Surfactants Detergents*, v.24, p. 193-198, 1987.

McNERNEY, M. J.; ROHLIN, L.; MOUTTAKI, H.; KIM, U.; KRUPP, R. S.; RIOS-HERNANDEZ, L.; SIEBER, J.; STRUCHTEMAYER, C.G.; BHATTACHARYYA, A.; CAMPBELL, J.W.; GUNSLUS, R. P. The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: Life at the

thermodynamic limit of microbial growth., *PNAS*, 2007. In: <http://www.pnas.org/content/104/18/7600.full.pdf+html>. Acesso: 09/07/2008

MEZZANOTTE, V.; CASTIGLIONI, F.; TODESCHINI, R.; PAVAN, M. Study on anaerobic and aerobic degradation of different non-ionic surfactants. *Bioresorce Technology*, v.87, p.87-91, 2003.

MONGENSEN, A. S.; HAAGENSEN, F.; AHRING, B. K. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, p. 706-711, 2003.

MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: *VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, Recife, PE*. Anais. Editora Universitária – UFPE, p.2813-2823, 2000.

MÖSCHE, M.; MEYER, U. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic digestion: influence of exposure time. *Water Research*, v.36, p.3253-3260, 2002.

*National Center for Biotechnology Information* (NCBI). In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Último acesso: 17/07/2008.

OLIVEIRA, L.L. Influência do material suporte na degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reator anaeróbio. *Dissertação de Mestrado*, Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 2006.

OLIVEIRA, L.L; DUARTE, I.C.S.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A. Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. *Journaul of environmental management*, v.90, p. 1261-1268, 2009.

OU, Z.; YEDILER, A.; HE, Y.; JIA, L.; KETTRUP, A.; SUN, T. Adsorption of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on soils. *Chemosphere*, v. 32, p. 827-839, 1996.

PACE, N.; FAZEL, L.; PETERSON, K. 16S rRNA gene sequences from showerhead swabs and water samples. Submetido em 10/04/2008 na MCD Biology, University of Colorado-Boulder, Boulder, CO 80309, USA.

PENTEADO, J. C. P.; EL SEOUD, O. A.; CARVALHO, L. R. F. Alquilbenzeno sulfonado linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Química Nova*, v.29, nº5, p.1038-1046, 2006.

PERALES, J. A.; MANZANO, M. A.; SALES, D.; QUIROGA, J. A. Biodegradation kinetics of LAS in river water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.43, p. 155-160, 1999.

QIU, Y. L.; SEKIGUCHII, Y., IMACHI, H.; KAMAGATA, Y.; TSENG, I.C.; CHENG, S.S.; OHASHI,A.; HARADA,H. Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomer-degrading microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Applied Environmental Microbiology*, v.70, p.1617-1626, 2004.

QIU, Y. L.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y.; SEKIGUCHII, Y. *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology*, v.74, nº 7, p. 2051-2058, 2008.

RAMOS, C. P. S. Análise dos padrões de utilização de códons sinônimos no genoma da bactéria *Chromobacterium violaceum*. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT II (RDP). In: <http://rdp.cme.msu.edu/>

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, L. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, v.58, p.106-411, 1986.

ROEST, K.; HEILIG, H.G.H.J.; SMIDT, H., DE VOS, W.M., STAMS, A.J.M.; AKKERMANS, A.D.L. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Systematic Applied Microbiology*, v. 28, nº 2, p. 175-185, 2005.

SANTEK, B.; IVANCIC, M.; HORVAT, P.; NOVAK, S.; MARIC, V. Horizontal Tubular Biorreactors in Biotechnology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 20, p.389-399, 2006.

SANZ, J. L.; RODRIGUEZ, N.; FERRER, J.; MORENO, A.; BERNA, J. L. Evaluation of the inhibition potential of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to the methanogenic process. *The Cleer Reviews*, v.6, p.26-30, 2000.

SANZ, J. L.; CULUBRET, E.; de FERRER, J.; MORENO, A; BERNA, J. L. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanked (UASB) reactors. *Biodegradation*, v. 14, p. 57-64, 2003.

SCHLÖTELBURG, C.; VON WINTZINGERODE, F., HAUCK, R., HEGEMANN, W.; GOBEL, U.B. Bacteria of an anaerobic 1,2-dichloropropane-dechlorinating mixed culture are phylogenetically related to those of other anaerobic dechlorinating consortia. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.50, p.1505-1511, 2000.

SCHÖRBEL, P. Basic principles of LAS biodegradation. *Tenside Surfactants Detergents*, 26, p.86-94, 1989.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. The biodegradation of the surfactants in the environment. *Biochimica of Biophysica acta*, v. 1508, p. 235-251, 2000.

SINGLETON, P.; SAINSBURY, D. Introduction to bacteria for students in the biological sciences, 1<sup>a</sup> ed, 167 p., Editora Wiley, 1981.

SHCHERBAKOVA, V. A.; LAURINAVICHIIUS, K. S.; AKIMENKO, V. K. Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. *Chemosphere*, 39, p. 1861-1870, 1999.

SHIGEMATSU, T.; TANG, Y.; MIZUNO, Y.; KAWAGUCHI, H.; MORIMURA, S.; KIDA, K. Microbial diversity of mesophilic methanogenic consortium that can degrade long-chain fatty acids in chemostat cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.102, p.535-544, 2006.

SOUIDI, K.; MUMME, J.; MUNDT, K.; NETTMANN, E.; BERGMANN, I., LINKE, B.; KLOCKE, M. Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Submissão direta no Instituto Leibniz de Engenharia Agrícola* em 18/06/2007.

TORRES, P. (1992). Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação. Dissertação (*Mestrado*) – Escola de Engenharia de São Carlos, São Paulo, 1992.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. The division “Synergistes”. *Elsevier*, v. 13, p. 99-106, 2007.

VERGE, C; MORENO, A.; BRAVO, J.; BERNA, J. L. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Chemosphere*, v. 44, p. 1749-1757, 2001.

VON ARB, M.; HENNY, C.; CONRADT, J.M.; SHUKLA, S.K.; MAGLIA, A.; BURKEN, J.G.; MORMILE, M.R. Unique Microbial Diversity of Anaerobic Swine Lagoons. Não publicado.

WHITE, G. F.; RUSSEL, N. J. Biodegradation of anionic surfactants and related molecules, p.143-177, in *Biochemistry of Microbial Degradation*, editado por Ratledge, C. *Kluwer Academic Publishers*, 1994.

YANG, K.; LIZHONG, Z.; XING, B. Sorption of sodium dodecylbenzene sulphonate by montmorillonite. *Environmental Pollution*, v.145, p. 571-576, 2007.

YING, G. G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environmental International* , v.32, p. 417-431, 2006.

WU, J.H., LIU, W.T., TSENG, I.C. and CHENG, S.S. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology*, v.147, p. 373-382, 2001.

ZAIAT, M.; CABRAL, A. K.A.; FORESTI, E. Reator anaeróbio de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química*, v.11, p. 33-42, 1994.

ZAIAT, M. Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias. *Tese de Doutorado*, Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 1996.

ZHANG, C.; BENETT, G. N. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Application of Microbiol. Biotechnology*, v.67, p.600-618, 2005.

## ANEXO A – Análises de Monitoramento

*Tabela A.1 – Valores de monitoramento do LAS no reator*

Tempo de operação(dias)	Afluente (mg/L)	Efluente (mg/L)	Eficiência (%)
<b>Etapa II</b>			
42	4,8	0	100
48	3,9	0	100
55	4	1,3	69,1
63	4,2	1,3	69,4
69	5,9	0	100
76	6,7	4,6	31,6
81	5	3,9	21,6
90	9,1	3,8	58,2
97	4,2	2,9	31,4
104	5	3,9	22,5
111	4,8	1,3	73,6
<b>Etapa III</b>			
125	4,5	3,2	28,1
132	6,7	4,1	38,6
139	4,5	3,9	12,7
144	6	4,2	30,3
153	3,8	3,2	15,6
160	3,4	2,7	21,8
167	5,2	3,5	33,1
182	3,8	4,9	0
188	6,4	4,3	33,1
196	6,2	5,2	15,1
203	5,9	4,7	19,3
210	5	3,7	26,5
217	5,5	5	8,2
224	5,9	3,1	47,2
237	4,9	5,4	0
245	4,5	2,7	40,6
259	7	5,2	26,4
266	6,5	4	37,8
272	4,3	4,2	3,3
280	8,5	5,1	40,6
293	7,4	0	100
301	2,7	0	100

306	2,5	0	100
315	2,3	0	100
322	4,8	2,2	54
327	2,6	0	100
<b>Etapa IV</b>			
328	-	2,5	-
329	8,6	8,2	4
332	-	2,3	-
333	-	6,7	-
334	-	2,5	-
335	-	2,2	-
336	7,0	2,4	65
337	-	2,4	-
338	-	2,4	-
339	7,3	2,2	69

Tabela A.2 – Valores de monitoramento do pH e da DQO do reator

Tempo de operação (dias)	pH Af	pH Ef	DQOb Af (mg/L)	DQOb Ef (mg/L)	DQOf Af (mg/L)	DQOf Ef (mg/L)	E <sub>DQOb</sub> (%) (1)	E <sub>DQOf</sub> (%) (2)
<b>Etapa I</b>								
6	7,3	7,2	674,0	120,5	483,4	112,6	82,1	76,7
13	7,2	7,1	822,8	187,0	470,3	145,3	77,3	69,1
20	7,3	7,2	688,3	164,8	469,0	150,5	76,1	67,9
25	7,3	7,2	390,4	86,6	331,3	78,1	77,8	76,4
26	-	-	394,6	99,2	339,8	95,0	74,9	72,0
27	7,4	7,1	408,7	99,2	344,0	69,7	75,7	79,7
32	-	-	730,8	78,1	387,6	61,2	89,3	84,2
<b>Etapa II</b>								
42	-	-	562,0	52,8	550,8	33,1	90,6	94,0
48	7,2	7,3	421,4	78,1	306,0	57,0	81,5	81,4
55	7,1	7,2	387,6	68,3	279,3	43,0	82,4	84,6
63	7,3	7,4	382,0	57,0	286,3	26,1	85,1	90,9
69	7,1	7,4	435,4	79,5	303,2	55,6	81,7	81,7
76	7,3	7,4	296,2	85,2	206,1	66,9	71,2	67,6
81	7,1	7,5	445,3	71,1	224,4	69,7	84,0	69,0
90	6,9	7,4	449,5	86,6	376,3	41,5	80,7	89,0
97	7,1	7,6	442,5	58,4	348,2	43,0	86,8	87,7
104	7,2	7,4	334,1	90,8	201,9	48,6	72,8	75,9
105	-	-	569,1	75,3	231,5	51,4	86,8	77,8
111	7,0	7,4	441,0	19,0	230,0	6,4	95,7	97,2
<b>Etapa III</b>								
125	7,5	7,5	500,1	106,2	453,9	77,9	78,8	82,8
132	7,6	7,4	513,0	88,2	488,6	54,8	82,8	88,8

139	7,5	7,4	258,9	79,2	214,0	74,1	69,4	65,4
144	7,5	7,4	249,9	66,4	197,3	58,7	73,4	70,3
153	7,4	7,4	153,0	299,9	79,2	284,5	60,0	78,9
160	7,4	7,6	293,5	86,9	211,4	66,4	70,4	68,6
167	7,3	7,4	338,4	86,9	310,2	54,8	74,3	82,3
188	7,4	7,7	353,8	58,7	238,3	45,9	83,41	80,8
203	7,9	7,6	381,6	75,5	357,5	65,3	80,21	81,7
210	7,7	7,2	499,7	490,8	490,8	74,2	80,06	84,9
217	7,2	7,5	380,3	61,5	349,8	57,7	83,82	83,5
224	7,6	7,5	493,4	60,3	465,4	20,9	87,78	95,5
237	7,5	7,6	234,3	39,9	196,2	20,9	82,95	89,3
245	7,6	7,5	484,5	83,1	432,4	55,2	82,84	87,2
259	7,4	7,43	390,6	54,7	327,4	32,4	85,99	90,1
266	7,8	7,43	518,2	533,1	518,2	51,0	87,88	90,2
280	7,47	7,69	203,4	56,0	203,4	34,9	79,30	82,9
293	7,73	7,66	510,8	31,2	510,8	26,2	93,90	94,9
301	7,62	7,63	509,5	42,3	500,9	25,0	91,69	95,0
306	7,71	7,53	502,1	26,2	214,6	22,5	94,78	89,5
315	7,7	7,5	500,9	68,3	483,5	31,2	86,4	93,6
322	7,8	7,5	533,1	90,7	481,0	60,9	83,0	87,3
<b>Etapa IV</b>								
328	7,9	7,7	10,1	-	7,6	-	-	-
336	8,2	8,1	15,1	11,3	13,8	18,8	24,7	0,0

<sup>(1)</sup>eficiência da DQO bruta

<sup>(2)</sup>eficiência da DQO filtrada

*Tabela A.3 – Valores de monitoramento da alcalinidade do reator*

Tempo de operação (dias)	Parcial (mgCaCO <sub>3</sub> /L) Afluente Afluente	Total (mgCaCO <sub>3</sub> /L) Afluente Afluente	AB <sup>(1)</sup> (mgCaCO <sub>3</sub> /L) Efluente	AVT <sup>(2)</sup> (mgHAc/L) Efluente
<b>Etapa I</b>				
6	177,9	356,3	255,2	474,8
13	173,6	296,0	251,7	430,5
20	177,9	299,5	260,4	417,5
25	187,5	276,9	260,4	394,1
27	185,8	285,6	256,1	394,9
<b>Etapa II</b>				
48	204,0	307,9	275,2	399,9
55	178,3	295,1	261,3	408,0
63	203,1	322,9	269,1	386,3
69	175,6	309,9	252,3	399,3
76	240,5	336,8	287,4	409,5
81	210,1	316,0	288,2	404,5
90	174,5	314,2	269,1	393,2
97	184,9	297,7	260,4	370,6
104	238,7	303,8	290,8	381,9
111	171,9	320,4	266,5	395,2
				381,9
				18,8

<b>Etapa III</b>						
125	204,0	279,0	270,8	345,4	333,3	17,1
132	193,8	320,4	250,9	382,5	372,0	14,9
139	253,4	310,5	315,5	376,3	364,3	16,9
144	265,8	320,4	329,1	380,1	368,1	16,8
153	233,5	308,0	315,5	385,0	372,2	18,0
160	299,4	321,4	363,7	391,2	378,6	17,8
167	216,1	322,9	280,7	395,9	381,5	20,3
188	251,5	338,5	321,4	398,6	381,5	24,2
203	207,4	315,2	262,062	397,4	379,9	24,7
210	214,2	336,9	263,9	420,7	403,8	23,9
217	231,3	322,9	299,6	372,6	356,5	22,6
224	237,4	314,6	299,5	400,2	383,3	23,8
237	254,6	309,3	322,9	387,5	373,0	20,5
245	199,3	302,7	260,0	388,1	371,0	24,1
259	227,7	293,4	300,2	378,8	357,7	29,8
266	193,8	291,9	260,8	381,9	367,3	20,6
280	239,7	319,8	310,5	392,8	376,5	22,9
293	204,9	318,3	254,6	400,5	385,4	21,3
301	209,6	332,4	263,9	398,2	382,8	21,6
306	201,8	350,9	253,1	403,7	387,5	22,8
315	194,1	324,5	246,8	403,7	391,3	17,3
322	191,0	330,7	251,5	406,8	392,9	19,6
<b>Etapa IV</b>						
328	194,1	319,9	232,9	385,8	369,7	22,7
336	198,7	208,1	232,9	248,4	241,8	9,4

<sup>(1)</sup> alcalinidade a bicarbonato

<sup>(2)</sup> ácidos voláteis totais

*Tabela A.4 – Valores de monitoramento do sulfato e sulfeto na terceira etapa de operação*

Tempo de operação (dias)	Sulfato (mg/L)		Sulfeto (μg/L)	
	Afluente	efluente	afluente	efluente
125	5	6	152	196
132	9	2	41	107
139	3	1	186	144
144	5	3	155	102
153	5	8	176	181
160	4	3	171	232
167	5	2	120	140
188	2,0	1,0	-	-
203	-	-	80,0	195,0
210	2,0	0,0	-	-
217	5,0	2,0	95,0	267,0
224	4,0	2,0	96,0	245,0
237	5,0	3,0	130,0	156,0
245	3,0	1,0	177,0	123,0
259	3,0	2,0	215,0	265,0
266	3,0	2,0	88,0	366,0

280	3,0	2,0	199,0	193,0
293	2,0	2,0	219,0	205,0
301	2,0	2,0	119,0	247,0
306	2,0	1,0	58,0	141,0
315	3,0	1,0	121,0	248,0
322	3,0	3,0	55,0	315,0
<b>Etapa IV</b>				
328	-	-	84,0	270,0
336	0,0	1,0	64,0	273,0

## ANEXO B – ANÁLISES ESPACIAIS

*Tabela B.1 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a primeira variação espacial (34º dia)*

Pontos de Amostragem (L/D)	Matéria orgânica (mg/L)	Sulfato (mg/L)	Ácidos Voláteis (mg/L)				
			acético	propiônico	butírico	isobutírico	isovalélico
0	327,1	3	22,0	1,2	-	-	-
1	225,8	0	256,9	68,1	5,4	7,7	9,6
6	142,8	1	17,8	96,4	-	8,6	8,8
10	88,0	0	6,0	13,0	-	-	1,0
14	45,8	0	6,4	-	-	-	-
19	48,6	0	7,5	-	-	-	-
20	48,6	2	-	-	-	-	-

*Tabela B.0.2 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a segunda variação espacial (118º dia)*

Pontos de Amostragem (L/D)	Matéria Orgânica (mg/L)	LAS (mg/L)	Sulfeto (mg/L)	Sulfato (mg/L)	Ácidos Voláteis (mg/L)			
					acético	propiônico	isobutírico	isovalélico
0	389,0	5,4	252	13	13,9	3,6	-	-
1	117,5	0,4	826	7	10,1	2,4	0,6	1,3
6	103,4	0	802	4	2,7	-	-	-
10	66,9	1,9	382	2	1,5	-	-	-
14	92,2	3,7	217	3	3,6	-	-	-
19	68,3	1,7	196	2	2,0	-	-	-
20	62,6	3,3	96	1	1,5	-	-	-

*Tabela B.3 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a terceira variação espacial (241º dia)*

Pontos de Amostragem (L/D)	Matéria Orgânica (mg/L)	LAS (mg/L)	Sulfeto (mg/L)	Sulfato (mg/L)
0	321,9	8,5	111	3
1	170,8	5,0	1190	6
6	98,4	5,8	1164	2
10	70,4	4,4	636	3
14	67,9	7,2	386	2
19	64,1	6,2	404	7
20	62,8	5,5	270	2

*Tabela B.4 – Resultados da análise de ácidos voláteis durante a terceira variação espacial (241º dia)*

Pontos de Amostragem (L/D)	Ácidos Voláteis (mg/L)					
	acético	propiônico	isobutírico	isovalélico	valérico	capróico
0	-	-	2,2	2,0	3,8	2,7
1	33,5	8,1	6,6	7,4	2,5	0,4
6	-	-	-	1,0	-	-
10	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	0,9	-	-
19	-	-	-	0,7	-	-
20	-	-	-	-	-	-

*Tabela B.5 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a quarta variação espacial (287º dia)*

Pontos de Amostragem (L/D)	DQO (mg/L)	LAS (mg/L)	Sulfeto (µg/L)	Sulfato (mg/L)	Ácido isovalélico
					(mg/L)
0	493,4	5,2	197	4	-
1	37,4	11,9	1068	3	0,7
6	31,2	2,8	916	3	-
10	25,0	2,5	480	1	-
14	22,5	1,5	396	2	-
19	12,6	5,9	215	1	-
20	8,9	5,4	141	4	-

*Tabela B.6 – Resultados dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos para a quinta variação espacial (349º dia)*

Pontos de Amostragem (L/D)	Máteria Orgânica (mg/L)	LAS (mg/L)	Sulfeto (mg/L)	Sulfato (mg/L)	Ácidos Voláteis (mg/L)	
					propiônico	isovalélico
0	389,0	5,4	252	13	5,2	1,3
1	117,5	0,4	826	7	-	-
6	103,4	0	802	4	-	-
10	66,9	1,9	382	2	-	-
14	92,2	3,7	217	3	-	-
19	68,3	1,7	196	2	-	-
20	62,6	3,3	96	1	-	-

## ANEXO C – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO LAS

*Tabela C.1 – Curvas de calibração para a determinação do LAS*

	<b>Curva</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Pico 1</b>	$LAS = 116.133 \times \text{área} - 70.972$	0,9697
<b>Pico 2</b>	$LAS = 113.392 \times \text{área} - 114.901$	0,9848
<b>Pico 3</b>	$LAS = 116.553 \times \text{área} - 108.282$	0,99113
<b>Pico 4</b>	$LAS = 116.316 \times \text{área} - 68.760$	0,99265