

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

Bruna Soares Fernandes

INFLUÊNCIA DA ORIGEM DO INÓCULO E DA ADIÇÃO DE SULFATO
SOBRE A DEGRADAÇÃO DE BTX EM REATOR ANAERÓBIO

~~HORIZONTAL DE LEITO FIXO~~

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço...11.../...05.../...05...

Ass.: *lesar*

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, com parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Associado Marcelo Zaiat

DEDALUS - Acervo - EESC



31100052142



São Carlos, SP

Abril de 2005

TESE-EESC
Cott. 2330 10
Tombo T107/05
Syono 14442,29

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

F363i Fernandes, Bruna Soares
Influência da origem do inóculo e da adição de sulfato sobre a degradação de BTX em reator anaeróbico horizontal de leito fixo / Bruna Soares Fernandes. -- São Carlos, 2005.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Assoc. Marcelo Zaiat.

1. Origem do inóculo. 2. RAHLF. 3. BTX. 4. Aceptores de elétrons. 5. Metanogênese. 6. Redução de sulfato. Ferro (III). I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheira **BRUNA SOARES FERNANDES**

Dissertação defendida e julgada em 11-03-2005 perante a Comissão Julgadora:



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

APROVADA




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

APROVADA



Profa. Dra. **IVANA RIBEIRO DE NARDI**
(Centro Universitário Central Paulista/UNICEP)

APROVADA



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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus maiores incentivadores.

Aos meus companheiros de café, Beto, em primeiro lugar, Arnaldo, Ari, Rogers, Gabriel, Fernandão, Gustavo, Rodrigo, Mercia, Tininha, Luana, Karina, Kelly, Monique, Fábio, Estela, Lara, Dalva e André Mineiro meus maiores inspiradores e conselheiros de pesquisa.

A todo o grupo do SHS, Eduardo, Ana Flávia, Luis Hamilton, Katt, Carol, Edvaldo, Giovana, Edson, Marcos, Claudia, Leonídia, Valquiria, Douglas, Renata, Tiago Momenti, Tiago, Ana Carolina, Renato, Rogério, Glauce, Gláucio, Dirlane, Selma, Alexandre, Roberto, Sidney, Hélio, André Coelho, Márcia, Marcelinho, Andréa, Luis Ricardo, Cascia e Denise.

Aos funcionários do SHS, Flávia, Fernanda, Rose, Bruno, Fábio, Sá, Wagner, André, Roberto Bergamo, Terezinha e Pavi, por todo auxílio e boa vontade.

Ao Gustavo e família, pelo apoio, incentivo, carinho e paciência.

As minhas amigas de longa data, Marcela, Karina, Liliane, Bruna e Larissa, que sempre me apoiaram.

A todas as pessoas, que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, minha sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade da vida, pela saúde, pelas intuições, pelo amor e por mais uma vitória.

Aos meus pais, Paulo e Eliane, meus maiores incentivadores, conselheiros, a quem devo todo meu amor, carinho, vontade de viver e aprender mais.

Aos meus irmãos, Janine e Leonardo, e família pelo carinho e amor, principalmente à Janine pelos conselhos durante a minha pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Marcelo Zaiat, muito mais que um orientador, um amigo, obrigada por sua compreensão, paciência, pelos conselhos e por me permitir criar, pesquisar e ser responsável.

A FAPESP, pela bolsa concedida.

Aos maiores incentivadores do laboratório, meus grandes amigos, Rogers, Samantha, Beto e Ari, pois me acolheram com muito carinho durante o período de estágio, me incentivando a permanecer nesse grupo maravilhoso.

Aos meus grandes amigos do LPB, Tininha, Kelly, Kátia, Cristina, Julia, Ana Paula Miqueleto, Karina, Monique, Neyson, Larissa, Dani, Arnaldo, Leonardo Damasceno, Flavinha, Dalva, Fábio, Mercia, Isabel, Luana, Sandra e Madalena que sempre me aconselharam e me ajudaram nos momentos em que precisei.

Aos professores, Dr. Eugênio Foresti, Dra. Bernadete, Dra. Maria do Carmo Caliajuri e Dra. Ivana de Nardi, pelos conselhos e ensinamentos.

Às técnicas, Maria Angela, Ana Paula, Eloísa, pelo auxílio de todas as horas.

À Professora Beth, sempre pronta para ajudar, obrigada por tudo.

A estagiária Carol, por sua amizade e ajuda.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Considerações gerais	4
3.2. Biodegradações dos BTX com diferentes aceptores de elétrons	5
3.3. Influência do inóculo	8
3.4. Reator Aplicado à Degradação dos BTX	8
3.5. Considerações Finais	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Protocolo Experimental	11
4.2. Configuração do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF)	11
4.3. Meio de Alimentação	13

<i>4.3.1 Extração da Gasolina para Alimentação do Reator</i>	13
<i>4.3.2 Meio Nutricional</i>	14
4.4. Meio Suporte	16
4.5. Fontes de Inóculos	16
4.6. Métodos Analíticos	17
<i>4.6.1. Análises Físico-Químicas</i>	17
<i>4.6.1.1. Análise de ácidos voláteis por cromatografia</i>	17
<i>4.6.1.2. Análise de BTX por cromatografia gasosa</i>	18
<i>4.6.1.3. Análise de S e Fe por Difração de Raio-X (EDX)</i>	18
<i>4.6.2. Análise da Composição dos Gases</i>	18
<i>4.6.3. Avaliação da concentração de BTX na Saída de Gás</i>	19
<i>4.6.4. Exames Microbiológicas</i>	19
<i>4.6.4.1. Microscopia óptica</i>	20
<i>4.6.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	20
<i>4.6.4.3. Caracterização microbiana através da técnica PCR-DGGE</i>	20
4.7. Procedimento experimental	21
<i>4.7.1. Extração da Gasolina para Alimentação do Reator</i>	21
<i>4.7.2. Imobilizações das Biomassas</i>	21
<i>4.7.3. Operações dos RAHLF</i>	21
<i>4.7.3.1. Primeira fase da primeira etapa</i>	21
<i>4.7.3.2. Segunda fase da primeira etapa</i>	22
<i>4.7.3.3. Terceira fase da primeira etapa - stripping de BTX</i>	22
<i>4.7.3.4. Segunda etapa</i>	22

<i>4.7.3.5. Terceira etapa</i>	23
<i>4.7.4. Determinações Analíticas Durante a Operação dos Reatores</i>	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Primeira Etapa - Influência do Inóculo sobre a Partida e Desempenho do RAHLF (fermentação e metanogênese)	25
<i>5.1.1. Primeira fase da primeira Etapa - Influência do inóculo</i>	25
<i>5.1.1.1 Avaliação operacional do RAHLF</i>	25
<i>5.1.1.2. Exames microbiológicos nos reatores</i>	31
<i>5.1.2. Segunda fase da primeira etapa – Cinética de degradação</i>	36
<i>5.1.2.1. Estimativa de parâmetros cinéticos</i>	36
<i>5.1.2.2. Exames microbiológicos nos reatores</i>	42
<i>5.1.3. Terceira Fase da Primeira Etapa – Striping dos BTX</i>	43
5.2. Segunda e Terceira Etapas - Degradações de BTX em presença de sulfato e de Fe(III)	45
<i>5.2.1. Resultados da operação do reator</i>	45
<i>5.2.2. Exames microbiológicos nos reatores</i>	50
6. CONCLUSÕES	55
7. SUGESTÕES	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1	Figura 4.1: Protocolo experimental adotado no trabalho de pesquisa	12
Figura 4.2	Representação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (dimensões em cm.)	13
Figura 4.3	Esquema do aprisionamento de BTX em etanol.	19
Figura 5.1	Concentrações de ácidos nos efluentes: (a) Reator 1, (b) Reator 2, (c) Reator 3. 1 - 500 mg.l ⁻¹ NaHCO ₃ , 2 - 1600 mg.l ⁻¹ , 3- 4000 mg.l ⁻¹ NaHCO ₃ .	26
Figura 5.2	Comparação entre as concentrações de sólidos suspensos voláteis no efluente; a e b representam as alterações de alcalinidade para cada reator; a - 1600 mg.l ⁻¹ e b - 4000 mg.l ⁻¹ .	27
Figura 5.3	Produção de metano nos reatores.	28
Figura 5.4	(a) Concentrações de matéria orgânica dos efluentes dos reatores expressas em DQO, (b) Eficiências de remoções de DQO dos efluentes dos Reatores 1, 2 e 3.	29
Figura 5.5	Concentração de BTX no efluente do Reator 1 (■), Reator 2 (○) e Reator 3 (△) : (a) benzeno, (b) tolueno, (c) m-xileno.	30
Figura 5.6	Fotos de microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos a espuma dos reatores 1, 2 e 3. (a) Reator 1- bacilos de diversos tamanhos; (b) Reator 2- Presença de grande quantidade de microrganismos similares à <i>Methanosarcina</i> sp.; (c) Reator 3 - Interação entre microrganismos; (d) Reato 3- Presença de microrganismos similares à <i>Methanosarcina</i> sp. .	33
Figura 5.7	Visualização das bandas no gel de DGGE para "primer" de	34

eubactéria (i,j,k) i- inóculos originário (1,2,3); j fases (sendo 1 - período de desequilíbrio para ácidos, 2 - equilíbrio dinâmico aparente); k – pontos de amostragem dos reatores (1- P1, 3- P3, 5- P5): (a) Reator 1; (b) Reator 2; e (c) Reator 3.

- Figura 5.8 Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de Arquea 35
(i,j,k) i- inóculos originário (1,2,3); j fases (sendo 1 -período de desequilíbrio para ácidos, 2 - equilíbrio dinâmico aparente); k – pontos de amostragem dos reatores (1- P1, 3- P2, 5- P3): (a) Reator 1; (b) Reator 2; e (c) Reator 3.
- Figura 5.9 Perfis espaciais de concentrações de ácidos nos reatores (a) Reator 37
2, (b) Reator 3.
- Figura 5.10 Ajuste do coeficiente cinético aparente para os reatores 2 (■) e 3 (□) 40
(a) Ajuste para benzeno; (b) Ajuste para tolueno; e (c) Ajuste para m-xileno.
- Figura 5.11 Velocidades ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e velocidades específicas ($\text{mg.mg SSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$) 41
de degradação para os reatores 2 (---) e 3 (—). (a) para benzeno, (b) para tolueno e (c) para m-xileno.
- Figura 5.12 Arraste de BTX por gases, para diferentes TDHs. (a) Benzeno; (b) 44
Tolueno; e (c) m-Xileno.
- Figura 5.13 Degradações de BTX ao longo dos Reatores sob condição (■) 46
Metanogênicos, (●) Redução de sulfato, (▲) Redução de Ferro (III);
a) para benzeno, b) para tolueno e c) para m-xileno.Dados normalizados (C_S/C_0).
- Figura 5.14 Velocidades de degradações de BTX para os Reatores (■) 49

Metanogênicos, (●) Redução de sulfato, (▲) Redução de Ferro (III); a) para benzeno, b) para tolueno e c) para m-xileno.

Figura 5.15 Fotos de microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos 52

aderidos a espuma do reator 3, submetido a redução de sulfato. (a) Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Metanosaeta* sp.; (b) Presença de grande quantidade de bacilos curvos; (c) Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Methanosarcina* sp.; (d) Presença de bacilos de diversos tamanhos.

Figura 5.16 Fotos de microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos 53

aderidos a espuma do reator 3, submetido a redução de sulfato suplementado com Fe(III). (a) Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Metanosaeta* sp.; (b) Diversidade de microrganismos presentes no reator; (c) Presença de bacilos de diversos tamanhos; (d) Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Methanosarcina* sp..

Figura 5.17 Visualização das bandas no gel de DGGE para “primer” de: (a) 54

eubactéria, (b) arquea, para os diferentes pontos de amostragem do reator (P1, P2 e P3) das diferentes condições: (1,2 e3) Metanogênica, (4.5 e 6) Redução de Sulfato e (7, 8 e 9) Redução de Sulfato e Ferro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Degradações de BTX para diferentes aceptores de elétrons.	06
Tabela 4.1	Compostos presentes no afluente da primeira etapa.	14
Tabela 4.2	Compostos presentes no afluente da segunda etapa.	15
Tabela 4.3	Compostos presentes no afluente da terceira etapa.	15
Tabela 4.4	Solução de nutrientes utilizada no afluente das três etapas.	15
Tabela 4.5	Tabela 4.5: Determinação analítica e frequência de análises para monitoramento dos reatores	23
Tabela 5.1	Avaliação dos meios de remoção de BTX dos Reatores 2 e 3 em equilíbrio dinâmico aparente.	31
Tabela 5.2	Caracterização morfológica do desenvolvimento dos microrganismos ao longo do processo de operação dos reatores, 1ª fase da 1ª etapa.	32
Tabela 5.3	Perfis espaciais de concentrações de matéria orgânica (DQO) para os Reatores 2 e 3.	36
Tabela 5.4	Constantes cinéticas obtidas para biodegradação anaeróbia de benzeno, tolueno e m-xileno.	39
Tabela 5.5	Constantes utilizadas para obtenção das constantes cinéticas para biodegradação anaeróbia de benzeno, tolueno e m-xileno.	39
Tabela 5.6	Avaliação dos meios de remoção de BTX obtidos para os Reatores 2 e 3, para TDH de 16hs	42
Tabela 5.7	Caracterização morfológica do desenvolvimento dos microrganismos ao longo dos reatores, para TDH de 16h, nos pontos de amostragem (P1- inicial, P3- meio, P5- final) 2ª fase da 1ª etapa	43
Tabela 5.8	Dados de arraste BTX para os diferentes TDHs e produção de	45

metano.

Tabela 5.9 Resultados de Difração de Raio-X para amostras de biomassa 47
aderidas ao material suporte antes e depois da adição de Fé (III).

Tabela 5.10 Reações bióticas e abióticas envolvendo tolueno, Ferro (III) e 48
enxofre.

Tabela 5.11 Constantes cinéticas obtidas para biodegradação anaeróbia de 50
benzeno, tolueno e m-xileno, sob condição metanogênica (M), com
adição de sulfato (S) e com adição de sulfato e Fe (III) (SF).

Tabela 5.12 Caracterizações morfológicas dos microrganismos ao longo dos 51
reatores, para TDH de 16h, nos pontos de amostragem (P1- inicial,
P3- meio, P5- final) comparação entre 1^a, 2^a e 3^a etapa, sob
diferentes condições.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP - Agencia Nacional do Petróleo

BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno

BTX – Benzeno, Tolueno, Xileno

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

DGGE - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

EDX – Espectroscopia de Difração de Raio-X

EESC - Escola de Engenharia de São Carlos

ETE – Estação de Tratamento de Efluentes

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

RAHLF - Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (*HAIB- Reactor Horizontal-flow Anaerobic Immobilized Biomass*)

SAAE - Serviço Autônomo de Águas e Esgoto

SHS – Departamento de Hidráulica e Saneamento

STAR – Sistema de Tratamento de Água Residuária

UASB - Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

C_s – Concentração de Substrato ao Longo do Tempo (mg.l^{-1})

C_{s0} – Concentração de Substrato Inicial (mg.l^{-1})

C_{SR} – Concentração de Substrato Residual (mg.l^{-1})

C_{ss} – Concentração de Substrato que sofreu Stripping (mg.l^{-1})

C_{SSV} – Concentração de Sólidos Suspensos Totais (mg.l^{-1})

D – Diâmetro (cm)

DQO – Demanda Química de Oxigênio (mg.l^{-1})

k_1^{app} – constante cinética de degradação de primeira ordem (h^{-1})

k_2^{app} – constante cinética de degradação de ordem zero ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

L – Comprimento (cm)

L/D – Relação Comprimento por Diâmetro

P_i , $i = 1..5$ – Pontos intermediários de amostragem do Reator

pH – Potencial hidrogeniônico

r – Velocidade de degradação ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

R^2 – Quadrado do Coeficiente de Correlação

TDH – Tempo de detenção hidráulica (h)

RESUMO

FERNANDES, B. S. (2005). *Influência da Origem do Inóculo e da Adição de Sulfato Sobre a Degradação de BTX em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo*. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

O desenvolvimento industrial tem, como conseqüência, a maior geração de resíduos, muitos deles tóxicos aos seres vivos. Dentre esses, benzeno, tolueno e xilenos (BTX), derivados do petróleo, estão contaminando aquíferos por acidentes no transporte e no armazenamento. Por esse motivo, diversas pesquisas têm sido realizadas buscando formas de biodegradar BTX. Esses trabalhos indicam que os principais fatores que podem influenciar a degradação biológica dos BTX são temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, concentração de tóxicos e diversidade de microrganismos. Visando contribuir com o estudo desses fatores, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do inóculo e de aceptores de elétrons no processo de degradação anaeróbia de BTX. Neste trabalho três inóculos foram pesquisados: 1- biomassa proveniente de reator anteriormente submetido à mistura de gasolina comercial e água; 2- biomassa proveniente de reator da estação de tratamento de esgoto da USP - São Carlos; 3- biomassa proveniente de reator tratando água residuária de abatedouro de aves. Os resultados obtidos comprovaram que a origem do inóculo foi fundamental na degradação anaeróbia de BTX, pois os inóculos apresentaram diferentes períodos de adaptação e porcentagens de degradação do tóxico. Depois de 93 dias de operação os inóculos 1, 2 e 3 apresentaram eficiência de remoção de BTX da ordem de 57%, 83% e 90%, respectivamente. O reator com o inóculo 3 foi submetido a condições metanogênica, sulfetogênica com presença e ausência de Ferro (III). Os resultados demonstraram que a degradação dos BTX foi influenciada pelas diferentes condições adotadas. A adição de Fe (III) melhorou a degradação dos BTX, do reator sob condições sulfetogênicas.

Palavras-chaves: Origem do inóculo, RAHLF, BTX, aceptores de elétrons metanogênese, redução de sulfato, Ferro (III)

ABSTRACT

FERNANDES, B. S. (2005). *Influence of different inoculum sources and Sulphate Addition on Anaerobic BTX Degradation in a Packed-bed Reactor*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

The industrial development has increased the generation of residues. Some of them are toxics and impact the environment. Benzene, toluene and xylenes (BTX), petroleum sub products, are examples of such toxic compounds. These compounds may contaminate aquifers as a result of accidents during transportation or of leakages of storage tanks. Several factors are reported to affect the biodegradation of BTX, such as: temperature, pH, availability of nutrients, concentration of toxics and diversity of microorganisms. This research aimed to study some of these factors, such as different inoculum sources and different electrons acceptors during BTX degradation processes in an Horizontal-Flow Anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor. In this research three inocula were studied: 1- an adapted microbial community for BTX degradation; 2 - Microorganisms collected from a pilot-scale UASB reactor treating domestic wastewater; and (3) - Microorganisms collected from an UASB treating poultry slaughterhouse industry wastewater. The results have shown that the inoculum sources were fundamental to the adaptation period for the toxic biodegradation, producing different BTX removal efficiencies. After 93 days of operation, the inocula 1, 2 and 3 showed BTX removal efficiency of 57, 83 and 90%, respectively. The inoculum 3 was submitted to conditions of methanogenesis and sulfetogenesis in the presence and absence of Fe (III). The results demonstrated that BTX degradation was affected by the different conditions adopted, showing that the addition of Fe (III) improved biodegradation in the reactor under sulfate reduction condition.

Keywords: inoculum sources, packed-bed reactor, HAIB reactor, BTX, electron acceptor, methanogenesis, sulfate reduction, Fe (III)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As atividades industriais apresentam-se em constante desenvolvimento e, como consequência, as quantidades de resíduos geradas crescem em proporções muito superiores à capacidade de assimilação do ambiente. Dentro desse grupo de resíduos gerados, podem ser destacados os compostos aromáticos, dificilmente degradáveis, como por exemplo: benzeno, tolueno e xilenos (BTX).

Os BTX são matérias-primas para a indústria de síntese de plásticos, tintas, pesticidas, resinas e solventes. Entretanto, durante os processos de fabricação, podem ocorrer vazamentos de tanques de armazenamento e de tubulações e parte da matéria-prima pode não se converter em produto, gerando resíduos muitas vezes não recuperáveis pelo processo. Além dessas formas de contaminações do ambiente, vazamentos de tanques e tubulações subterrâneas de estocagem de petróleo e seus derivados são fontes importantes de contaminação (SHIM e YANG, 1999).

No estado de São Paulo, em 2003, diversos casos de autuações foram realizados, pela Agência Nacional do Petróleo (ANP), em postos de combustíveis devido às condições irregulares de armazenamento de gasolina, assim como contaminações dos solos adjacentes, o que aumenta os riscos de contaminação de aquíferos (ANP, 2003). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2003) divulgou que, de 2002 para 2003, houve aumento de 300% no número de vazamentos de tanques de armazenamento de combustível.

A poluição de águas subterrâneas por BTX via acidentes com gasolina atingindo aquíferos pode resultar na contaminação de redes de abastecimento de água. Esse problema é muito grave, pois dos 0,8% de água doce destinada ao consumo humano 97% são provenientes de águas subterrâneas (LANGWALDT e PUHAKKA, 2000).

A necessidade da descontaminação de águas pela presença de BTX é devida a

esses compostos serem persistentes no ambiente e, principalmente, por serem altamente tóxicos aos seres vivos. O Benzeno é listado como carcinogênico pela Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA), podendo levar à leucemia e a exposição a elevadas concentrações pode levar à morte; o tolueno causa disfunção do sistema nervoso central e pode prejudicar o desenvolvimento de fetos; e o xileno leva à falta de coordenação motora, problemas de memória, podendo prejudicar o desenvolvimento de fetos, e é considerado altamente tóxico a seres aquáticos (YEOM e DAUGULIS, 2001). Por serem lentamente decompostos através de processos biológicos e prejudiciais aos seres vivos, torna-se necessário o estudo de formas de acelerar as reações de biodegradação.

Diversos trabalhos já foram desenvolvidos com objetivo de degradar biologicamente esses compostos, entre esses, os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento por de Nardi (2002) e de Nardi *et al.*(2005) demonstraram a aplicabilidade do reator anaeróbio horizontal de leito fixo, assim como otimizaram do tempo de degradação desse compostos para essa configuração de reator, faltando a análise de inóculos, que foi estudado nessa pesquisa, que possibilitaria a aplicação dessa configuração de reator em escala real.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho de pesquisa foi avaliar a influência de inóculos de diferentes origens no desempenho do Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) aplicado ao tratamento de água contaminada com BTX.

Foram objetivos específicos do trabalho:

1. Avaliação da influência de inóculos de diferentes origens sobre os parâmetros cinéticos de degradações de benzeno, tolueno e m-xileno;
2. Comparação das degradações dos BTX sob condições metanogênicas e de redução de sulfato;
3. Avaliação da influência de Ferro (III) nas degradações dos BTX sob condições de redução de sulfato;
4. Acompanhamento dos microrganismos envolvidos nos processos de degradações metanogênicas, sulfetogênicas na presença e na ausência de Ferro (III).

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Considerações gerais

Até meados do século XX, derramamentos de petróleo não eram vistos como problema ambiental. O acidente com o superpetroleiro *Torrey Canyon*, na Inglaterra, e o desenvolvimento da exploração de petróleo no Ártico serviram de alerta para o risco de outros acidentes e para a necessidade da degradação de compostos presentes no petróleo, tais como, benzeno, tolueno e xilenos (CRAPEZ *et al.*, 2002).

Os primeiros indícios de biodegradações anaeróbias de BTX ocorreram em 1908, quando Shormer isolou o *Bacillus hexabovorum*, observando a habilidade desse microrganismo em crescer em contato com tolueno e xileno, degradando-os (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

Em 1946, o microbiologista marinho norte-americano, Claude E. ZoBell, identificou microrganismos capazes de consumir hidrocarbonetos provenientes do petróleo, e utilizá-los como fontes de carbono para geração de biomassa. As pesquisas desenvolvidas, desde então, procuram respostas para diversas perguntas sobre os compostos biodegradáveis do petróleo, os fatores ambientais que influenciam a biodegradação dessas substâncias e sobre a distribuição das populações de microrganismos capazes de degradar esses compostos aromáticos, por meio da biorremediação (CRAPEZ *et al.*, 2002).

O processo de biorremediação tem como objetivo minimizar o impacto de substâncias persistentes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e à atividade microbiana (CRAPEZ *et al.*, 2002). Vários fatores, entretanto, podem influenciar na atividade microbiana, tais como: temperatura, pH, aceptores de elétrons,

presença de microrganismos com capacidades catabólicas necessárias, concentração de tóxico, transferência de massa, período de adaptação microbiana, entre outros (ALVAREZ *et al.*, 1998).

Muitos desses fatores já foram estudados e, dentre os citados, serão enfatizados nos tópicos seguintes: os aceptores de elétrons, os tipos de inóculos e os reatores que podem ser utilizados para degradações dos BTX.

3.2. Biodegradações dos BTX com diferentes aceptores de elétrons

Um fator de grande importância no processo de biodegradação é o aceptor de elétrons utilizado pelos microrganismos no processo de oxidação da matéria orgânica. Diferentes aceptores de elétrons favorecerão o desenvolvimento de diferentes espécies de microrganismos, e, conseqüentemente, de diferentes graus de degradação e de rotas utilizadas para essa finalidade. Os aceptores de elétrons utilizados pelos microrganismos, em ordem decrescente de potencial de oxidação, são: oxigênio, nitrato, ferro III, sulfato e dióxido de carbono. Em geral, a cinética de oxidação de hidrocarbonetos é rápida para aceptores de elétrons com elevado potencial de oxidação (CORSEUIL *et al.* 1998). A degradação de BTX ocorre sob diferentes aceptores de elétrons (Tabela 3.1)

O Processo aeróbio de degradação de BTX é considerado rápido (CORSEUIL *et al.* 1998), entretanto as perdas para atmosfera por stripping (YEAM E DAUGULIS 2001) e os gastos energéticos com a aeração não tornam o processo atrativo. A degradação anaeróbia seria uma alternativa economicamente viável para essa finalidade. A Tabela 3.1 apresenta resultados de processo anaeróbio e aeróbio de degradação de BTX.

Tabela 3.1: Degradação dos BTX para diferentes aceptores de elétrons

Referência	Reator	Origem do inóculo	Hidrocarboneto pesquisado	Hidrocarboneto Degradado	Velocidade de degradação	Constante cinética
Condição aeróbia						
Corseuil <i>et al.</i> 1998	Batelada	microcosmo de praia exposta BTX -Santa Catarina - BR	Benzeno	Benzeno	0,08 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ *	-
			Tolueno	Tolueno	0,06 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ *	-
			o-Xileno	o-Xileno	0,05 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ *	-
Yeam e Daugulis 2001	Reator de duas fases	<i>A. xylosoxidans</i> Y234 isolada de solo contaminado	Benzeno	Benzeno	186 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹	-
Bielefeldt e Stensel 1999	Batelada	Três culturas mistas de sitio contaminado	Benzeno	Benzeno	1,0 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ *	-
			Tolueno	Tolueno	1,1 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ *	-
			o-Xileno	o-Xileno	0,42 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ *	-
Condição anaeróbia						
Fermentativa/metanogênica						
de Nardi . 2002	Reator contínuo de leito fixo	Lodo de UASB de abatedouro de aves	Benzeno	Benzeno	-	0,42 h ⁻¹
			Tolueno	Tolueno	-	0,47 h ⁻¹
			o-Xileno	o-Xileno	-	0,53 h ⁻¹
Ribeiro <i>et al.</i> 2003	Reator contínuo de leito fixo	Lodo de UASB de abatedouro de aves	Benzeno	Benzeno	-	0,53 h ⁻¹
			Tolueno	Tolueno	-	0,55 h ⁻¹
			m-Xileno	m-Xileno	-	0,36 h ⁻¹
Souza <i>et al.</i> 2004	Reator em batelada seqüencial	Lodo de UASB de abatedouro de aves	Tolueno	Tolueno	-	0,41 h ⁻¹ *
			m-Xileno	m-Xileno	-	0,16 h ⁻¹ *
Ulrich e Edwards 2003	Batelada	Cultura enriquecida Sitio Refinaria de óleo	Benzeno	Benzeno	0,11 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹	-
Ulrich e Edwards 2003	Batelada	Cultura enriquecida Sitio Posto de gasolina	Benzeno	Benzeno	0,23 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹	-

ND – Não degradado, * calculado com base nos dados experimentais, para cinéticas de primeira ou zero ordem propostas neste trabalho.

Tabela 3.1: continuação

Referência	Reator	Origem do inoculo	Hidrocarboneto pesquisado	Hidrocarboneto Degradado	Velocidade de degradação	Constante cinética
Desnitrificante						
Ribeiro <i>et al.</i> 2003	Reator contínuo de leito fixo	Lodo de UASB de abatedouro de aves	Benzeno Tolueno m-Xileno	Benzeno Tolueno m-Xileno	- - -	1,29 h ⁻¹ 1,19 h ⁻¹ 1,81 h ⁻¹
Corseuil <i>et al.</i> 1998	Batelada	Microcosmo solo arenoso Pentacrest Iowa- EUA	Benzeno Tolueno	ND Tolueno	- 0,013 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ *	- -
Ulrich e Edwards 2003	Batelada	Cultura enriquecida Sitio de Pântano	Benzeno	Benzeno	0,04 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹	-
Redução de sulfato						
Phelps <i>et al.</i> 1996	Batelada	Cultura enriquecida Sedimento Rio Raritan -NJ-EUA	Benzeno Tolueno	ND Tolueno	- -	- -
Phelps <i>et al.</i> 1996	Batelada	Cultura enriquecida golfo da Califórnia	Benzeno Tolueno	Benzeno Tolueno	- -	- -
Ulrich e Edwards 2003	Batelada	Cultura enriquecida Sitio Refinaria de óleo	Benzeno	Benzeno	0,04 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹	-
Ulrich e Edwards 2003	Batelada	Cultura enriquecida Sitio de pântano	Benzeno	Benzeno	0,02 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹	-
Edwards <i>et al.</i> 1992	Batelada	Sedimento da praia Seal Calofornia -EUA	Tolueno m-Xileno	Tolueno m-Xileno	0,004-0,06 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ 0,004-0,06 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹	- -
Redução de Fe(III)						
Corseuil <i>et al.</i> 1998	Batelada	Microcosmo solo arenoso Pentacrest Iowa- EUA	Benzeno Tolueno	ND Tolueno	- 0,004 mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ *	- -
Weiner <i>et al.</i> 1998	Batelada	Sedimento aquífero próximo refinaria Ponca- Oklahoma	Benzeno	Benzeno	-	-

ND – Não degradado,* calculado com base nos dados experimentais, para cinéticas de primeira ou zero ordem propostas neste trabalho.

3.3. Influência do inóculo

PHELPS *et al.* (1996) pesquisaram a degradação dos BTX, utilizando inóculos distintos submetidos às mesmas condições experimentais (Tabela 3.1). Nesse caso, os inóculos não apresentaram o mesmo comportamento de degradação de benzeno e de tolueno. Outros autores já observaram esse comportamento para diferentes compostos.

MORENO e BUITRÓN (2004 a), comparando cinco diferentes inóculos para a degradação de glicose e fenol, observaram diferentes porcentagens de degradações e diferentes atividades metanogênicas específicas. Os mesmos autores (MORENO e BUITRÓN 2004 b) também compararam desempenhos de inóculos para a degradação do 4-clorofenol em reator operado em bateladas sequenciais: o inóculo com melhor desempenho apresentou velocidade 1,7 vez maior que a observada com o inóculo que apresentou pior desempenho. Esses resultados sugerem que a escolha de inóculo adequado pode influenciar na degradação e em sua velocidade. MORENO e BUITRONS (2004 a e b) atribuem essas diferenças, principalmente, à composição microbiana dos inóculos (maior diversidade microbiana e alta concentração de microrganismos específicos).

3.4. Reator Aplicado à Degradação dos BTX

A Tabela 3.1 apresenta diferentes resultados de velocidade e de cinéticas de degradação, relacionados tanto com os aceptores de elétrons e inóculos utilizados, quanto com os reatores utilizados para o processo de degradação.

Normalmente, trabalhos com degradações de BTX apresentam velocidades mais elevadas para reatores contínuos (Tabela 3.1 – de NARDI, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2003 a).

Diversas configurações de reatores podem ser empregadas, podendo ter biomassa suspensa ou imobilizada.

Os reatores biológicos com biomassa imobilizada apresentam inúmeras vantagens frente aos reatores operados com biomassa suspensa na degradação de poluentes, tais como: elevada concentração de biomassa, elevada atividade metabólica atribuída à elevada concentração de nutrientes aderidos ao biofilme e às diferentes interações entre espécies microbianas, e resistência à toxicidade, principalmente devido ao efeito protetor da matriz extracelular (barreira de difusão) que pode reduzir a

concentração de tóxico no biofilme (COHEN, 2001).

Pesquisa realizada por SHIM e YANG (1999) sobre as degradações de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), em reator de leito fixo, com células imobilizadas, constatou que as velocidades de consumo de BTEX pelas células aderidas foram de 9 a 75 vezes maiores do que as observadas para células livres.

A configuração de células imobilizadas permite que esses reatores apresentem bom desempenho, com grande estabilidade do processo, devido à capacidade de trabalhar com altos tempos de retenção celular, quando operado com baixo tempo de detenção hidráulica.

ZAIAT *et al.* (1994) desenvolveram o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/SHS/USP). O RAHLF tem como principais vantagens, sobre os demais sistemas anaeróbios, tempo de partida curto, estabilidade operacional, flexibilidade de cargas orgânicas aplicadas, altos tempos de retenção celular e alto desempenho na degradação de compostos tóxicos (DAMIANOVIC, 1997).

3.5. Considerações Finais

Nos trabalhos citados, pode-se observar diversas diferenças entre os resultados obtidos para as degradações de BTX. Entretanto, mesmo utilizando os mesmos aceptores de elétrons, os inóculos, equipamentos, entre outras condições, não foram as mesmas. Dessa forma, torna-se difícil concluir sobre as influências que o inóculo e os diferentes aceptores de elétrons têm sobre os resultados de degradações de BTX. Nos trabalhos utilizando diferentes inóculos, aplicados a degradação da glicose, do 4-clorofenol e do fenol, diferentes resultados foram obtidos, levando a supor que o mesmo seria observado para os BTX.

Nesse sentido, foi adotado neste trabalho o reator anaeróbio horizontal de leito fixo, principalmente pelo alto tempo de retenção celular alcançado, entre outras vantagens citadas anteriormente, o que poderia contribuir para resultados mais conclusivos sobre os efeitos da influência do inóculo.

Para a etapa de comparação de aceptores de elétrons foram estudadas condições metanogênicas e de redução de sulfato com presença e ausência de Fe (III), pois como visto na Tabela 3.1, os aceptores de elétrons resultam em diferentes velocidades de

degradações. A adição do ferro teve como objetivo acelerar a degradação sulfetogênica e esclarecer a lacuna de como o Ferro (III) atua no processo de redução de sulfato (BELLER *et al.*, 1992), pois a forma como isso ocorre ainda não é bem compreendida.

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Protocolo Experimental

Os experimentos foram realizados em três reatores, cada um contendo um inóculo obtido de fonte diferente, e foram divididos em três etapas principais, dependendo do acceptor de elétrons disponível. O esquema experimental é apresentado na Figura 4.1.

4.2. Configuração do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF)

Na presente pesquisa foram utilizados três reatores, igualmente projetados, anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) como representado na Figura 4.2. Os reatores apresentaram volumes totais de 1995 ml cada, volumes de escoamento de 798 ml, comprimentos (L) de 100 cm, diâmetros (D) de 5 cm e relações L/D igual a 20. Todos eram dotados de 5 pontos intermediários para amostragem (P1, P2, P3, P4 e P5), sendo que P1 é o ponto mais próximo do ponto de alimentação, P2, P3 e P4 os pontos intermediários e P5 o ponto próximo da saída do efluente, espaçados de 22,5 cm entre si. Os reatores possuíam sistema coletor de gás, com três pontos de saída espaçados de 45 cm entre si (Figura 4.2).

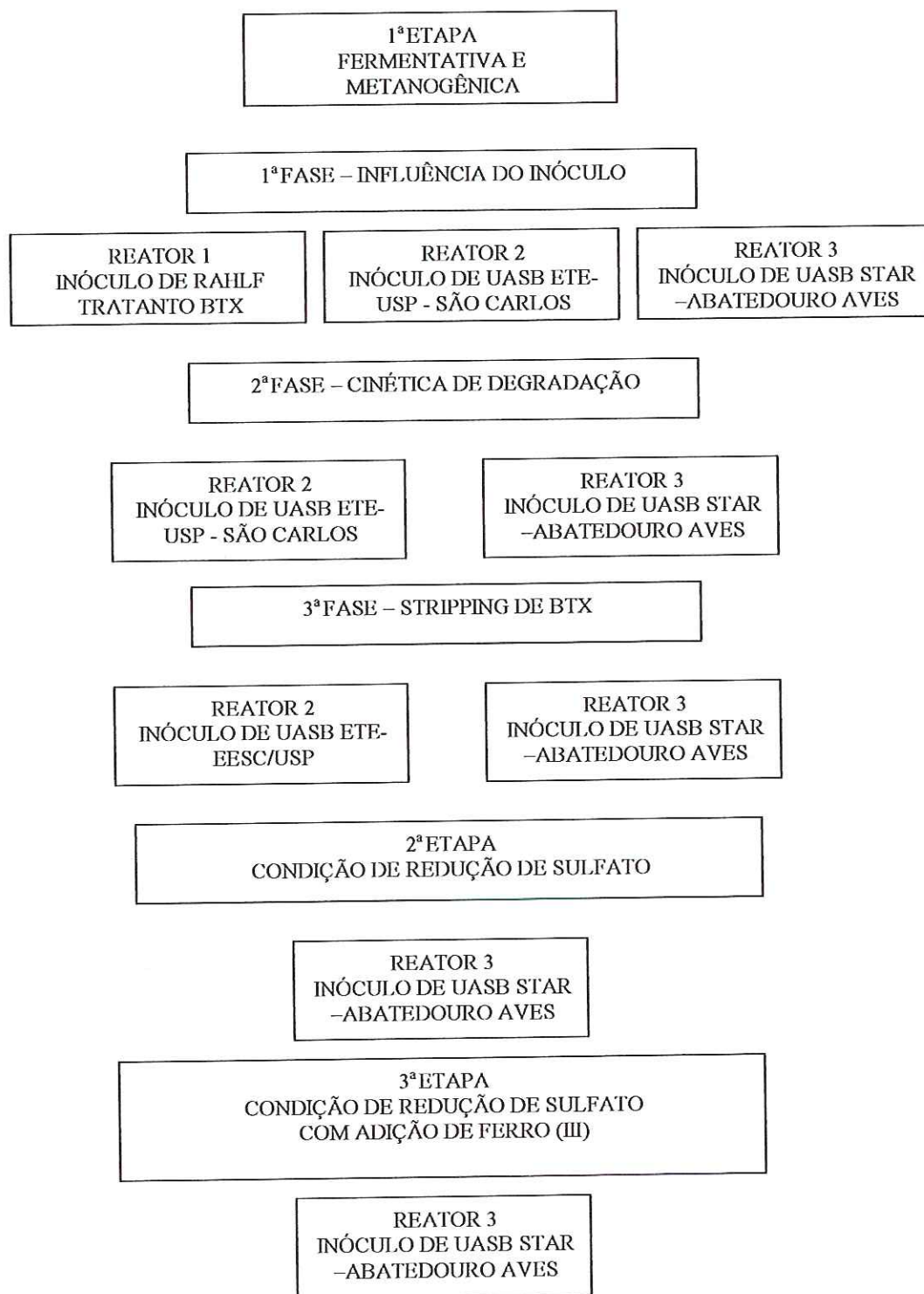


Figura 4.1: Protocolo experimental adotado no trabalho de pesquisa

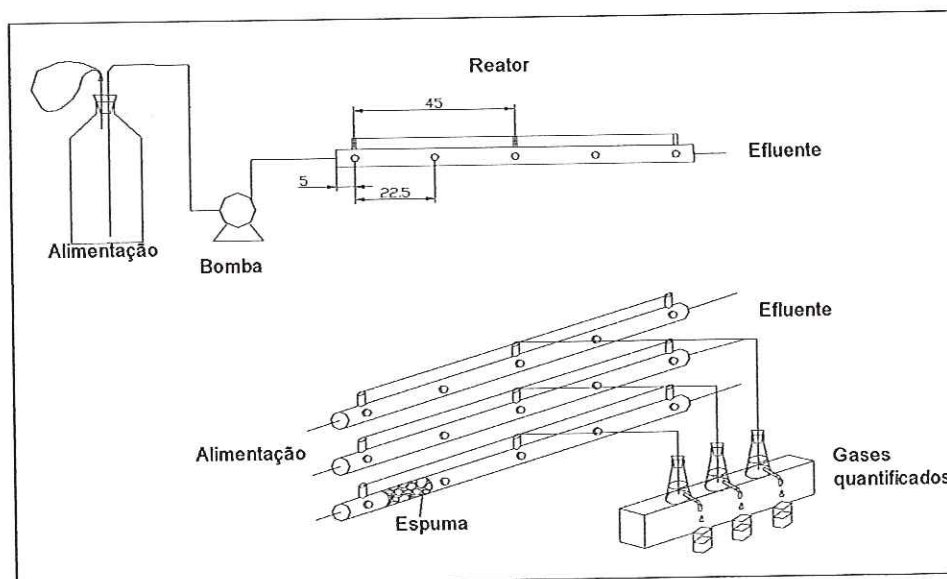


Figura 4.2: Representação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (dimensões em cm)

4.3. Meio de Alimentação

4.3.1. Extração da Gasolina para Alimentação do Reator

Para simulação de contaminação de aquíferos, frações de gasolina e água foram colocadas em contato, em um funil de separação. Foram utilizados, para extração, 45 ml de gasolina para 4 litros de água (de NARDI *et al.*, 2005).

Para promover maior contato entre os constituintes, gasolina e água, o funil de separação foi agitado por duas horas, em incubador rotativo orbital (Superohm - G25). Em seguida, para proporcionar a separação entre as fases, o funil de separação permaneceu em repouso durante 30 minutos. A fase orgânica foi descartada e a fase aquosa foi utilizada como substrato dos reatores. Foram obtidas, por meio da extração para a água, as seguintes concentrações de hidrocarbonetos: 2000 mg. l^{-1} de etanol, 6,0 mg. l^{-1} de benzeno, 6,6 mg. l^{-1} de tolueno e de 3,3 mg. l^{-1} de m-xileno. Os outros compostos extraídos da gasolina não foram quantificados. Os hidrocarbonetos obtidos do processo de extração foram utilizados como única fonte de matéria orgânica e a concentração gerada de matéria orgânica pela extração foi de 3760 (± 369) mg de DQO. l^{-1} .

4.3.2. Meio Nutricional

Na 1ª etapa, os três reatores (reatores 1, 2 e 3) foram alimentados com o produto da extração da gasolina, uréia e bicarbonato de sódio apresentados na Tabela 4.1 e solução de nutrientes contida na Tabela 4.4 (RIBEIRO *et al.*, 2003 a). Durante a 1ª etapa, a concentração de bicarbonato de sódio foi alterada conforme a necessidade de cada reator.

Na 2ª etapa, dois reatores (reatores 2 e 3) foram alimentados com o produto da extração da gasolina, uréia e bicarbonato de sódio apresentados na Tabela 4.2 e solução da Tabela 4.4, produzindo afluente com razão de DQO/SO₄²⁻ de 1,3, razão que SILVA *et al.* (2004) promoveu supressão da metanogênese. Nessa etapa um reator (reator 1) foi descartado.

Na 3ª etapa, um único reator (reator 3) foi alimentado com o produto da extração, uréia e bicarbonato de sódio apresentados Tabela 4.3 e nutrientes da Tabela 4.4.

Fe(OH)₃, utilizado na terceira etapa, foi preparado segundo adaptação da metodologia proposta por BELLER *et al.* (1992.). Inicialmente, preparou-se 1500 ml de solução de NaOH (0,2 M) e colocou-se essa solução em um erlenmeyer sob agitação. Posteriormente, preparou-se 500 ml de FeCl₃ (0,2 M) e colocou-se em um funil de separação. O funil foi colocado sobre o erlenmeyer contendo a solução de NaOH e gotejou-se a solução de FeCl sobre a de NaOH por 4 h. Deixou-se a nova solução sob agitação por 24 h. Finalizada essa etapa, a solução foi filtrada permanecendo no filtro o Fe(OH)₃ formado. O precipitado foi lavado com água destilada a fim de remover traço de Cl⁻.

Tabela 4.1: Compostos presentes no afluente da primeira etapa

Compostos	Concentração (mg. l ⁻¹)
Uréia	500
Bicarbonato de Sódio	500/ 1600 / 4000

Fonte: DEL NERY (1987)

Tabela 4.2: Compostos presentes no afluente da segunda etapa

Compostos	Concentração (mg. l ⁻¹)
Uréia	500
Bicarbonato de Sódio	4000
Na ₂ SO ₄	4550

Fonte: DEL NERY (1987), SILVA *et al.* (2004)

Tabela 4.3: Compostos presentes no afluente da terceira etapa

Compostos	Concentração (mg. l ⁻¹)
Uréia	500
Bicarbonato de Sódio	4000
Na ₂ SO ₄	4550
Fe(OH) ₃	300

Fonte: DEL NERY (1987), SILVA *et al.* (2004)

Os frascos de alimentação permaneceram em condições de temperatura constante de 27°C.

Tabela 4.4: Solução de nutrientes utilizada no afluente das três etapas

Compostos	Concentrações (mg.l ⁻¹)
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,094
SeO ₄	0,00014
KH ₂ PO ₄	0,170
KHPO ₄	0,0434
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,0668
Ni ₂ SO ₄ .6H ₂ O	0,002
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,010
Fe ₂ Cl ₃ .6H ₂ O	0,001
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,00016

Fonte: DEL NERY (1987)

4.4. Meio Suporte

O meio suporte utilizado no experimento foi espuma de poliuretano, cubos de aresta de 5 mm (ZAIAT *et al.*, 1994), com densidade de 23 kg/m^3 e porosidade de 95%, que mostrou ser bom suporte para adesão de microrganismos anaeróbios, com curto período de adaptação (RIBEIRO *et al.*, 2003 c).

4.5. Fontes de Inóculos

Foram utilizados lodos de três origens diferentes:

1. Lodo de RAHLF em escala de bancada, adaptado para degradação de BTX;
2. Lodo de reator de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB) instalado na ETE da USP - São Carlos;
3. Lodo do Reator Anaeróbio de UASB, instalado na STAR do abatedouro de aves Avícola Dacar S.A., no município de Tietê.

O Lodo 1, utilizado no reator 1, foi anteriormente submetido ao produto aquoso da extração da gasolina, com concentração de matéria orgânica de, aproximadamente, $4000 \text{ mg de DQO.l}^{-1}$, e inoculado em espuma de poliuretano. O lodo, após desprendimento do material suporte, apresentava concentração de sólidos suspensos voláteis de $4,7 \text{ mg.l}^{-1}$ e concentração de sólidos suspensos fixos de $3,2 \text{ mg.l}^{-1}$.

O Lodo 2, utilizado no reator 2, apresentava-se flocculento, com concentração de sólidos suspensos voláteis de $4,9 \text{ mg.l}^{-1}$, concentração de sólidos suspensos fixos de $2,4 \text{ mg.l}^{-1}$ e estava submetido a um afluente com concentração de matéria orgânica de $800 \text{ mg de DQO.l}^{-1}$.

O Lodo 3, utilizado no reator 3, apresentava-se granuloso, com concentração de sólidos suspensos voláteis de $6,9 \text{ mg.l}^{-1}$, concentração de sólidos suspensos fixos de $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ e estava submetido a um afluente com concentração de matéria orgânica de $2300 \text{ mg de DQO.l}^{-1}$.

4.6. Métodos Analíticos

4.6.1. Análises Físico-Químicas

As concentrações de BTX, etanol e ácidos voláteis intermediários foram analisadas por cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo HP 6890, com detector de ionização de chama. Foram realizadas análises de DQO (Demanda Química de Oxigênio) de amostras filtradas (DQO filtrada) e não filtradas (DQO total), sólidos suspensos, alcalinidade total, ácidos voláteis, sulfato e sulfeto (STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1998). Foi feita análise de S e Fe no material suporte utilizando a técnica de Difração de Raio-X (EDX).

4.6.1.1. Análise de ácidos voláteis por cromatografia

A análise de ácidos voláteis por cromatografia após extração da fase líquida foi desenvolvida e realizada no Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP (MORAES *et al.*, 2000), utilizando-se ácido crotonico como padrão interno em meio ácido (ácido sulfúrico) e extração com éter dietílico.

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

Cromatógrafo a gás: HP 6890

Coluna capilar: HP INNOWAX – 30m (diâmetro interno 0,25 mm e espessura de filme 0,25 μ m)

Temperatura inicial do injetor: 25° C

Temperatura inicial do detector: 300° C

Programa de temperatura do forno:

Temperatura inicial: 100° C (3 min)

Taxa de aquecimento: 5° C . min⁻¹

Temperatura final: 180° C (5 min)

Razão de split: 20

H₂ para alimentar a chama: 30 ml . min⁻¹

Vazão do gás de make up (N₂): 33 ml . min⁻¹

Detector: ionização de chama

Volume de amostra: 1 μ l

4.6.1.2. Análise de BTX por cromatografia gasosa

Para determinação das concentrações dos BTX nas fases líquidas dos reatores foi utilizado o método cromatográfico do “headspace” estático, adaptado e validado por de NARDI *et al.* (2004). Solução de clorobenzeno em metanol, em concentração de 166 mg.l⁻¹, foi utilizada como padrão interno, sendo adicionados 200 µl da solução em 4,0 ml de amostra.

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições:

Cromatografo a gás: HP 6890

Coluna capilar: HP 1-30 m (diâmetro interno 0,53 mm e espessura de filme 2,65µm)

Temperatura do injetor: 250° C

Temperatura do detector: 300° C

Programa de temperatura da coluna:

Temperatura inicial: 70° C (3 min)

Taxa de aquecimento: 4° C . min⁻¹

Temperatura final: 110° C (3 min)

Razão de split: 40

H₂ para alimentar a chama: 30 ml . min⁻¹

Vazão do gás de make up (N₂): 30,8 ml . min⁻¹

Detector: ionização de chama

Volume da amostra: 400 µl

4.6.1.3. Análise de S e Fe por Espectroscopia de Dispersão de Raio-X (EDX)

Amostras de biomassa imobilizada do reator foram coletadas após o reator atingir o equilíbrio dinâmico aparente. As amostras foram colocadas em estufa a 40°C por 3 horas, recobertas com carbono e analisadas no equipamento modelo Oxford 8070 acoplado ao equipamento utilizado na Microscopia Eletrônica de Varredura (Balzers SCD 050).

4.6.2. Análise da Composição dos Gases

A composição dos gases gerados pela degradação anaeróbica foi monitorada por cromatografia gasosa utilizando-se cromatógrafo Gow-Mac com detector de condutividade térmica e coluna “Porapak Q” (2m x 1/4” – 80 a 100 mesh), sendo o gás de arraste o hidrogênio a 1 ml.s^{-1} , temperatura do forno de 50°C . O volume de injeção foi de $500 \mu\text{l}$.

4.6.3. Avaliação da concentração de BTX na Saída de Gás

Para avaliação da concentração de BTX arrastados pelo biogás, produzidos no reator, foi seguida metodologia proposta nesta pesquisa e desenvolvida no Laboratório de Processos Biológicos. A saída de gás dos reatores foi conectada a um erlenmeyer (300 ml), contendo 200 ml de etanol, por meio de uma rolha de vedação contendo dois tubos: um conectado à saída do gás e mergulhado em etanol; o outro tubo ligando a atmosfera do erlenmeyer com a atmosfera da câmara, de forma a expulsar os gases não solubilizados em etanol (Figura 4.3). O erlenmeyer foi mantido em um banho de gelo, à temperatura constante de 4°C , durante o período de coleta (24 h). As análises dos BTX aprisionados seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente.

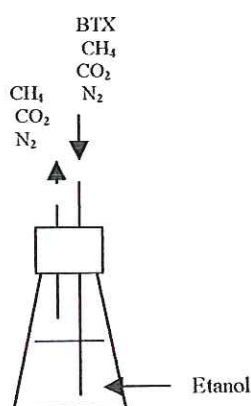


Figura 4.3: Esquema do aprisionamento de BTX em etanol

4.6.4. Exames Microbiológicos

Os lodos e seus inóculos foram analisados por microscopia óptica, utilizando microscópio de fluorescência Olympus BX60, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se microscópio de varredura digital Zeiss DSM-960 e por técnica da Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).

4.6.4.1. Microscopia óptica

As amostras de biomassa coletadas nas diferentes fases de adaptação dos reatores foram analisadas através de microscopia óptica sob contraste de fase e fluorescência. Para essa análise, a biomassa foi desprendida do suporte e fixada em lâmina com gel Agar 2%.

4.6.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O protocolo utilizado para preparação de amostras de espuma de poliuretano contendo biomassa aderida para análise por MEV é descrito a seguir (ARAÚJO, 1995 adaptado de NATION, 1983):

1. Fixação da amostra – amostras de espuma com biomassa foram mergulhadas em glutaraldeído (GTA) 2,5% em solução de fosfato (0,1M), pH de 7,3, as amostras permaneceram nessa solução por 12 h, à temperatura de 4° C.
2. Lavagem – após as 12 h, descartou-se a solução de glutaraldeído e as amostras foram imersas em tampão fosfato (0,1M), pH de 7,3, em temperatura de 4°C, Após 10 min de imersão, a solução foi descartada. A lavagem se repetiu por 3 vezes.
3. Desidratação – as amostras foram imersas em soluções de álcool etílico por 10 min, sendo que as concentrações das soluções de álcool etílico foram: 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, sendo utilizadas em ordem crescente de concentração.
4. Secagem - as amostras previamente desidratadas foram coladas, com esmalte, em suporte para MEV e colocadas em estufa a 60°C, por 2 h.

Finalizadas essas etapas, as amostras foram submetidas ao banho de ouro e analisadas por MEV.

4.6.4.3. Caracterização microbiana por meio da técnica PCR-DGGE

A avaliação da diversidade da comunidade microbiana foi realizada através da técnica do PCR/DGGE. O DNA foi extraído segundo o protocolo de GRIFFITHS *et al.* (2000). Na amplificação dos fragmentos do DNA foram utilizados “primers”

específicos do Domínio *Bactéria* (NIELSEN *et al.*, 1999) e Domínio *Archaea* (KUDO *et al.*, 1997). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante - DGGE (MUYZER *et al.*, 1993).

4.7. Procedimento experimental

4.7.1. Imobilizações das Biomassas

Inicialmente, o lodo proveniente do RAHLF foi desprendido do suporte e os lodos dos reatores UASB foram macerados. Em três recipientes foram colocados 2 l de cada lodo, com concentrações de sólidos suspensos voláteis (SSV) iguais a 4,8 g SSV.l⁻¹. Os lodos foram imobilizados em 25 g de partículas cúbicas de espuma de poliuretano, segundo metodologia proposta por ZAIAT *et al.* (1994).

É importante ressaltar que o lodo que já se encontrava imobilizado em espuma de poliuretano foi desprendido para nova imobilização para que todos os inóculos passassem pelo mesmo procedimento no início da operação do reator.

4.7.2. Operações dos RAHLF

4.7.2.1. Primeira fase da primeira etapa

Na primeira fase da primeira etapa, os três reatores foram operados concomitantemente sob as mesmas condições de operação: temperatura de 27°C e tempos de detenção hidráulica (TDH) de 24 h, diferindo apenas nos inóculos utilizados. O reator 1 foi inoculado com lodo adaptado para degradar BTX, que estava imobilizado em espuma de poliuretano em RAHLF de escala de bancada; o reator 2 com lodo do reator UASB, da estação de tratamento de esgoto do *Campus* da USP - São Carlos, e o reator 3 com o lodo do reator UASB tratando de água residuária de abatedouro de aves.

Todos os reatores foram alimentados com a fase aquosa do processo de extração da gasolina e as soluções citadas no item 4.3. A concentração de bicarbonato de sódio foi elevada em função das fases de adaptação dos reatores.

Durante o período da primeira fase foram feitas análises de composição líquida e gasosa e, ao atingir o equilíbrio dinâmico aparente, foram feitas análises de amostras do afluente, efluente e da saída de gás, com objetivo e fechar o balanço de massa.

4.7.2.2. Segunda fase da primeira etapa

O objetivo, nesta fase, foi a obtenção dos parâmetros cinéticos de degradação dos BTX. Para isso, os reatores 2 e 3 foram operados com TDH de 16 horas (de NARDI *et al.*, 2005). Após se atingir o equilíbrio dinâmico aparente, foram realizadas coletas ao longo do comprimento dos reatores para análise de BTX. Esses perfis espaciais de concentração foram utilizados para estimativa do modelo cinético e das constantes cinéticas aparentes de degradação dos compostos.

Nessa fase o reator 1 não foi utilizado, devido à baixa eficiência de remoção dos BTX, quando comparada aos reatores 2 e 3.

Os reatores 2 e 3 foram submetidos ao TDH de 16 h, até atingirem o equilíbrio, quando foram realizadas coletas ao longo do comprimento dos reatores para determinação de parâmetros cinéticos, além da coleta de BTX nos gases.

4.7.2.3. Terceira fase da primeira etapa - stripping de BTX

Nessa fase os reatores 2 e 3 foram submetidos ao TDH 66 h, até atingir o equilíbrio e foram realizadas coletas de BTX no afluente, efluente e gás. Esses resultados, juntamente com os obtidos de entrada e saída para os TDHs de 16 e 24 h, foram utilizados para avaliar a influência do TDH sobre o processo de arraste dos BTX pelos gases.

4.7.2.4. Segunda etapa

Na segunda etapa, o reator 3, por apresentar melhores resultados de degradação dos BTX, foi alimentado com meio suplementado com Na_2SO_4 , a fim de promover desenvolvimento de microrganismos redutores de sulfato, com objetivo de avaliar a influência de diferentes aceptores de elétrons na degradação de BTX. O TDH adotado foi de 16 h. Dessa forma, ao atingir o equilíbrio dinâmico aparente em relação à remoção de matéria orgânica e de remoção de sulfato, foram realizados perfis de concentração ao longo do reator, para comparação de parâmetros cinéticos entre condições metanogênica e sulfetogênica.

4.7.2.5. Terceira etapa

Na terceira e última etapa, o reator, sob condições de redução de sulfato, teve o afluente suplementado com $\text{Fe}(\text{OH})_3$, com objetivo de verificar a influência de Ferro (III) sobre a degradação dos BTX. O TDH adotado foi de 16 h. Foram realizadas coletas de BTX ao longo do reator e no gás. Essa etapa foi curta devido a problemas de entupimento do leito.

4.7.3. Determinações Analíticas Durante a Operação dos Reatores

Durante o período operacional foram realizadas análises periódicas do afluente, efluente, saída de gás e pontos de intermediários, conforme pode ser observado na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Determinação analítica e frequência de análises para monitoramento dos reatores

Parâmetros	Local de coleta	Frequência	Método Analítico
DQO	Afluente e Efluente	2 vezes por semana	Espectrofotométrico
DQO	Pontos de amostragem	No regime estacionário	Espectrofotométrico
Sólidos Suspensos	Afluente e Efluente	1 vez por semana	Gravimétrico
Alcalinidade	Afluente e Efluente	2 vezes por semana	Titulométrico
Ácidos voláteis	Afluente e Efluente	2 vezes por semana	Titulométrico
Ácidos voláteis	Afluente e Efluente	1 vez por semana	Cromatográfico
Ácidos voláteis	Pontos de amostragem	No regime estacionário	Cromatográfico
Temperatura	Termostato da câmara	diária	-
Sulfeto	Afluente e Efluente	1 vez por semana	Espectrofotométrico
Sulfato	Afluente e Efluente	1 vez por semana	Espectrofotométrico
BTX	Afluente e Efluente	1 vez por semana	Cromatográfico
BTX	Pontos de amostragem	No regime estacionário	Cromatográfico
BTX	Saída de gás	No regime estacionário	Cromatográfico
Composição do biogás	Mangueira de captação	2 vezes por semana	Cromatográfico

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Primeira Etapa - Influência do Inóculo sobre a Partida e Desempenho do RAHLF (fermentação e metanogênese)

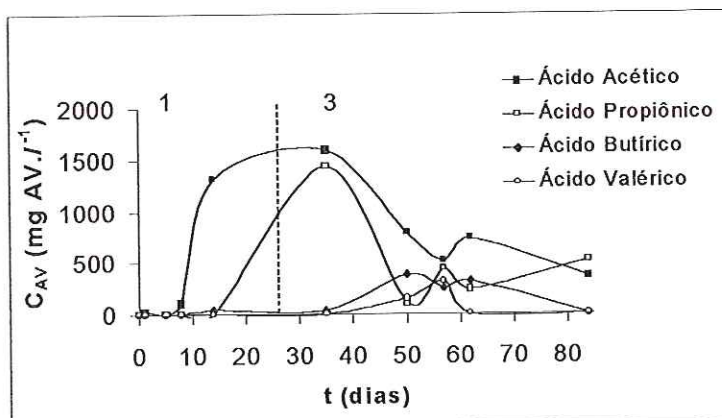
5.1.1. Primeira fase da primeira Etapa - Influência do inóculo

5.1.1.1 Avaliação operacional do RAHLF

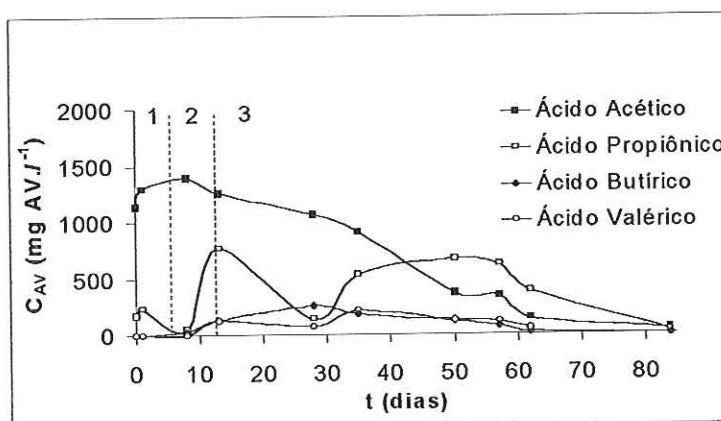
Os reatores 1, 2 e 3 foram inoculados com lodos: originário de RAHLF em escala de bancada, adaptado para degradação de BTX; de UASB da estação de tratamento de esgoto da USP - São Carlos, e de reator UASB instalado em abatedouro de aves, respectivamente.

Os reatores foram operados concomitantemente com TDH de 24 h e temperatura da câmara de $27 (\pm 1)^\circ\text{C}$. O afluente apresentou concentração de matéria orgânica, expressa em DQO, de $3760 (\pm 369) \text{ mg.l}^{-1}$, proveniente de 2000 mg.l^{-1} de etanol, $6,0 \pm 1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de benzeno, $6,6 \pm 0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de tolueno e de $3,3 \pm 0,7 \text{ mg.l}^{-1}$ de m-xileno. A concentração inicial de bicarbonato de sódio adotada foi de 500 mg.l^{-1} .

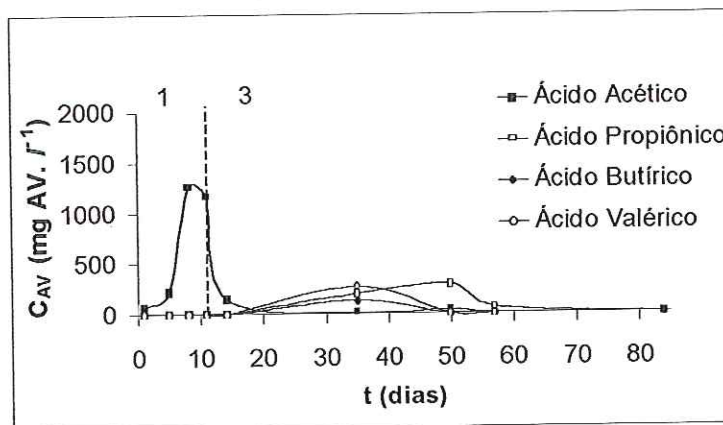
Todos os reatores (Figura 5.1) apresentaram, inicialmente, acúmulo de ácidos graxos voláteis em função, principalmente, da degradação de etanol, indicando desequilíbrio entre as fases acidogênica/acetogênica e metanogênica, atingindo pH mínimo de 5,5 nos efluentes. De acordo com as fases de desequilíbrio de cada inóculo, a concentração de NaHCO_3 foi aumentada para: reator 1, 4000 mg.l^{-1} após vinte sete dias de operação; reator 2, 1600 mg.l^{-1} , após seis dias, e de 1600 mg.l^{-1} para 4000 mg.l^{-1} após doze dias; e reator 3, 4000 mg.l^{-1} após doze dias de operação (Figuras 5.1 e 5.2).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.1: Concentrações de ácidos nos efluentes: (a) Reator 1, (b) Reator 2, (c) Reator 3. 1 - 500 mg.l⁻¹ NaHCO₃, 2 - 1600 mg.l⁻¹, 3- 4000 mg.l⁻¹ NaHCO₃.

O inóculo do Reator 2, originário de reator UASB tratando de esgoto sanitário de baixa carga orgânica (Figura 5.1 b), foi o mais susceptível às condições de

alimentação ao qual foi submetido. Por outro lado, os reatores 1 e 3 não apresentaram desequilíbrio inicial, provavelmente por terem sido submetidos anteriormente a alta concentração de matéria orgânica.

O equilíbrio entre o consumo e produção de ácidos do sistema foi restabelecido (Figura 5.1 a, b,c) após o aumento da concentração de bicarbonato para 4000 mg.l^{-1} , quando houve o tamponamento do meio, atingindo pH estável na faixa de 7,5, o que possibilitou melhor equilíbrio da biomassa evitando acúmulo dos ácidos (Figura 5.1 e Figura 5.2). O desequilíbrio entre formação e consumo de ácidos já havia sido relatado anteriormente por RIBEIRO *et al.* (2003 b), na degradação anaeróbia dos BTX com alta concentração de etanol, para inóculo não adaptado ao tóxico.

Na Figura 5.1 ainda pode ser observado que os inóculos apresentaram diferentes respostas em relação ao restabelecimento do equilíbrio do processo anaeróbio, induzido pelo aumento das concentrações do bicarbonato de sódio. Somente o reator 3 apresentou resposta rápida, o que pode estar associado à menor perda de biomassa nesse reator, expresso em SSV, enquanto que os reatores 1 e 2 apresentaram altas perdas de SSV (Figura 5.2) antes do aumento da concentração de NaHCO_3 .

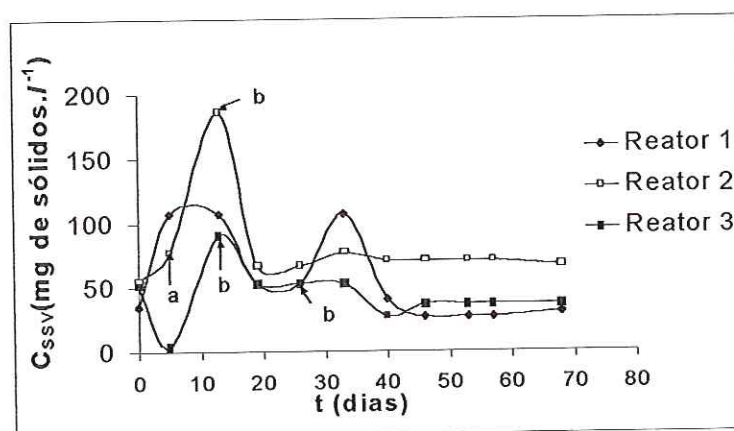


Figura 5.2: Comparação entre as concentrações de sólidos suspensos voláteis no efluente dos reatores; **a** e **b** representam as alterações de alcalinidade para cada reator; **a** – 1600 mg.l^{-1} e **b** – 4000 mg.l^{-1} .

Em função da menor perda de biomassa, o reator 3 apresentou a maior produção de metano ao longo do tempo (Figura 5.3). As produções de metano, após 71 dias de operação, nos reatores 1, 2 e 3 atingiram os seguintes valores: 239 mmol.d^{-1} , 564 mmol.d^{-1} e 1026 mmol.d^{-1} , respectivamente (Figura 5.3).

O fato do reator 3 ter apresentado desequilíbrio durante período mais curto indica que o inóculo, obtido de reator UASB aplicado ao tratamento de água residuária de abatedouro de aves, apresentou rápida adaptação ao afluyente como observado na Figura 5.4a. Após 72 dias de operação, os reatores 2 e 3 apresentavam-se em equilíbrio dinâmico aparente (Figura 5.4.b), com eficiências médias de remoção de DQO de 94% e 95%, respectivamente. O reator 1, que apresentou longo período de perda de biomassa, atingiu eficiência de remoção de DQO de 60%, após 82 dias de operação.

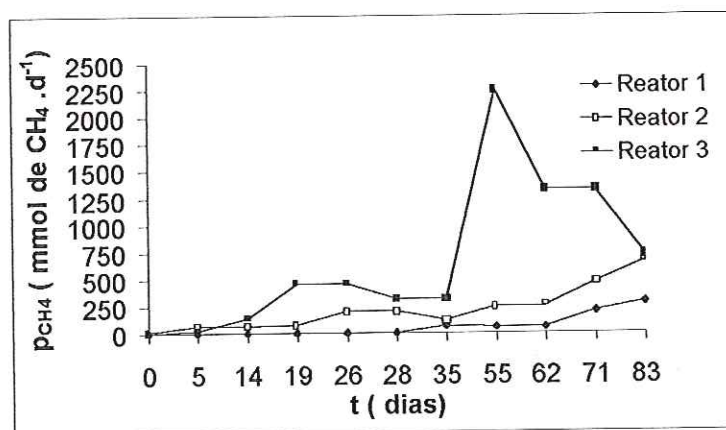
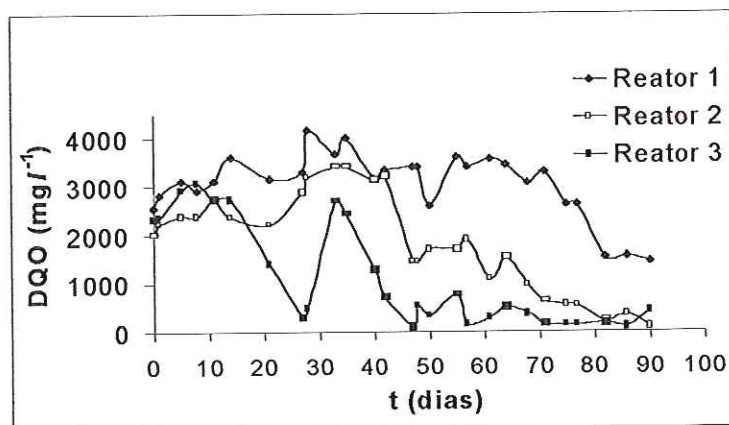


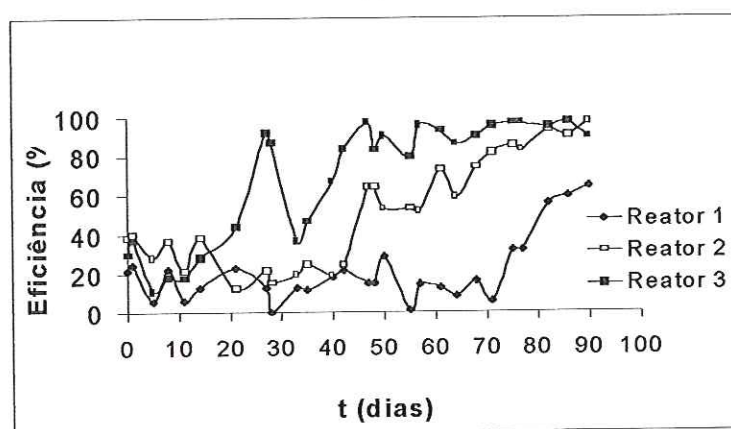
Figura 5.3: Produção de metano nos reatores.

Resultados correlatos aos obtidos para remoção de matéria orgânica foram observados para remoções de BTX. Os reatores apresentaram, após setenta dias, valores máximos de remoção de BTX de 74, 67 e 52% (reator 1); 81, 80, 70% (reator 2) e 94, 93 e 81% (reator 3) para benzeno, tolueno e m-xileno, respectivamente.

No início do processo as remoções de benzeno e tolueno foram elevadas (Figura 5.5) e não foram relacionadas com biodegradações (Figura 5.5), mas com fenômenos de adsorção ao meio suporte e de arraste de BTX pelo biogás. As quantidades adsorvidas de benzeno e tolueno foram calculadas com base nos dados de de NARDI (2002), que observou adsorção máxima de 0,15 mg de cada composto. g⁻¹ de suporte em biopartícula de espuma de poliuretano, para as dez primeiras horas de operação. Dessa forma, a adsorção de cada composto obtida no início do processo foi de 3,75 mg.l⁻¹ e as perdas por arraste foram de, aproximadamente, 1,3 mg.l⁻¹.



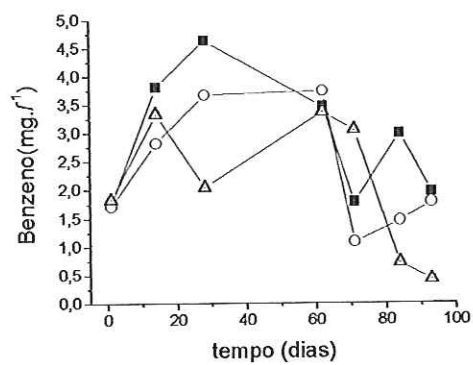
(a)



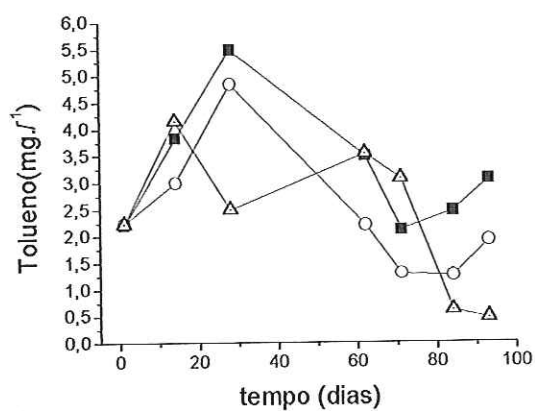
(b)

Figura 5.4: (a) Concentrações de matéria orgânica dos efluentes dos reatores expressas em DQO, (b) Eficiências de remoções de DQO dos efluentes dos Reatores 1, 2 e 3.

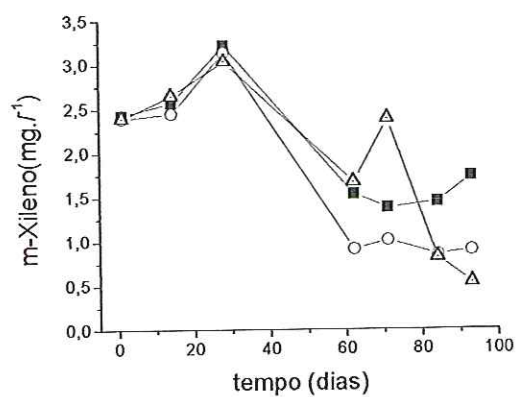
As eficiências máximas de remoção atingidas pelo reator 3 foram semelhantes às obtidas por de NARDI (2002), RIBEIRO *et al.* (2003 a) e CATTONY *et al.* (2003), utilizando a mesma configuração de reator e o mesmo material suporte. Apesar dessas altas eficiências, parte dos autores mencionados não quantificou prováveis formas de perdas dos compostos. Dessa forma, embora tenha havido adsorção dos BTX nas biopartículas, desprezível após 11 dias de operação (com base nos dados de adsorção de de NARDI, 2002), e perdas por arraste desses compostos pelo gás (dados que serão apresentados posteriormente), os resultados mais expressivos das remoções de benzeno, de tolueno e de m-xileno foram devidos às degradações desses compostos por microrganismos (Tabela 5.1).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.5: Concentração de BTX no efluente do Reator 1 (■), Reator 2 (○) e Reator 3 (△) : (a) benzeno, (b) tolueno, (c) m-xileno.

Tabela 5.1: Avaliação dos meios de remoção de BTX dos Reatores 2 e 3 em equilíbrio dinâmico aparente.

Compostos	Degradação (%)			Eliminado no Efluente (%)			Arrastado com os gases (%)		
	benzeno	tolueno	m-xileno	benzeno	tolueno	m-xileno	benzeno	tolueno	m-xileno
Reator 2	55,2	51,0	8,2	24,0	26,5	31,8	20,8	22,5	60,0
Reator 3	73,7	70,0	20,8	20,7	23,5	60,3	5,6	6,5	18,9

A Tabela 5.1 não apresenta resultados para o reator 1, pois esse não se apresentava em equilíbrio dinâmico aparente de concentração, dificultando obter dados de arraste de BTX pelos gases.

5.1.1.2. Exames microbiológicos nos reatores

Como as fontes de inóculo foram distintas, esperava-se que os microrganismos presentes fossem responsáveis pelos diferentes desempenhos dos reatores. Para isso, foi feita caracterização microbiológica dos inóculos, com resultados de observações em microscopia óptica sumarizados na Tabela 5.2.

Dessa forma, o bom desempenho do reator 3 estaria relacionado a uma maior diversidade morfológica de microrganismos presentes no sistema (Tabela 5.2 e Figura 5.6), principalmente devido à maior frequência de microrganismos metanogênicos, quando comparado aos outros inóculos, resultado similar ao obtido por MORENO e BUITRÓN (2004a), para fenol e glicose.

O reator 2 apresentou menores eficiências de degradação quando comparado ao reator 3, o que pode estar relacionado ao processo ao qual o lodo estava submetido anteriormente (baixa carga orgânica), dificultando a adaptação ao novo sistema (alta carga orgânica e tóxica).

Uma suposição levantada para as baixas eficiências de remoção de matéria orgânica e de BTX do reator 1 seria a alta seletividade das morfologias presentes nesse lodo, dificultando a formação do biofilme, como observado nos dados do 56º dia (Tabela 5.2). Cabe ressaltar que o lodo adaptado foi removido da espuma de poliuretano e re-imobilizado em espuma “limpa”. A transferência dos microrganismos pode ter sido

parcial e a estruturação original do consórcio deve ter sido muito modificada.

Tabela 5.2: Caracterização morfológica do desenvolvimento dos microrganismos ao longo do processo de operação dos reatores, 1ª fase da 1ª etapa.

MORFOLOGIA	Lodo imobilizado em espuma de poliuretano								
	Lodo inicial								
	-			56 dias			85 dias		
R1*	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
Arqueas Metanogênicas									
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	++	-	++	++	++	+++	++	
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	
Cistos de sarcinas	++	+	+	++	-	-	-	-	
Bacilos fluorescentes	++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	
Bactérias									
Bacilos com extremidades afiladas	+++	++	++++	++++	+++	++	++	+++	
Bacilos com extremidades arredondadas	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	
Bacilos curvos	+++	+	++	+	++	+++	+++	+	
Bacilos delgados	+++	++	+	++++	++	+++	+++	+++	
Bacilos ovalados	+++	++	++++	++	+++	+++	++	+++	
Bacilos com grânulos	-	-	-	-	-	-	-	+	
Bacilos esporulados	-	-	++	-	+	-	-	-	
Cocos	+++	++++	++	++	++	+++	+++	++	
Cocos em cadeia	++	-	-	-	-	-	-	-	
Espiroqueta	-	-	-	-	+	-	-	+	
Filamentos	+++	+++	+	+	+	++	++	++	
Filamento septado	-	-	-	-	-	-	-	-	

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados.

Como ilustração, são mostradas fotos de MEV de microrganismos aderido a espumas dos reatores 1 e 2 e 3 (Figura 5.6).

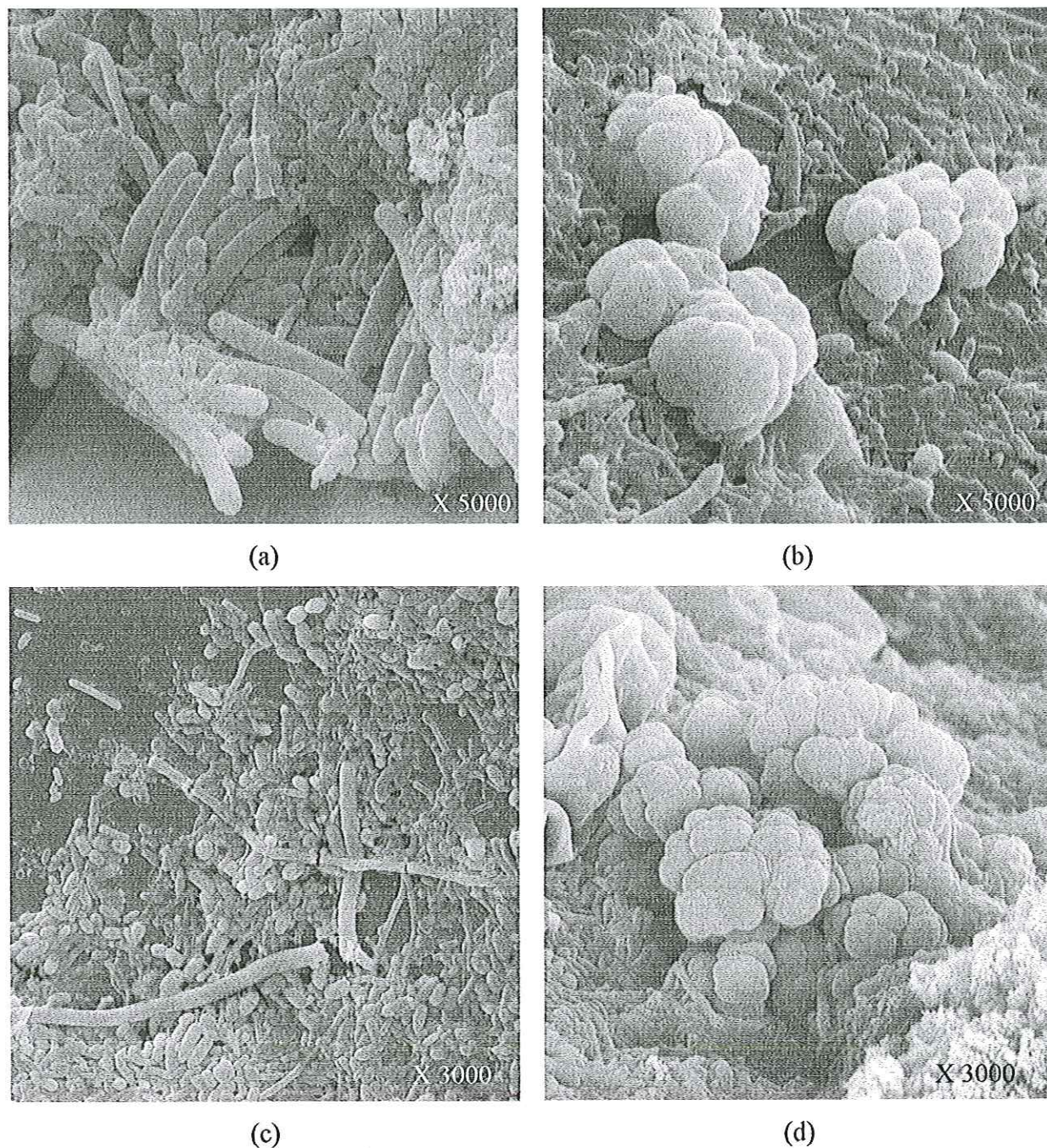


Figura 5.6: Fotos de microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos a espuma dos reatores 1, 2 e 3. (a) Reator 1- bacilos de diversos tamanhos; (b) Reator 2- Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Methanosarcina* sp.; (c) Reator 3 – Interação entre microrganismos; (d) Reator 3- Presença de microrganismos similares à *Methanosarcina* sp. .

A Figura 5.7 mostra as bandas de gel de DGGE para “primers” para o Domínio *Bactéria*.

As bandas marcantes apresentadas nos inóculos originários (canaletas 1, 2 e 3) não foram as mesmas para cada inóculo, demonstrando, inicialmente, a diferença entre os inóculos, já sugerindo comportamentos diferentes perante aos tóxicos, como foi realmente observado nos experimentos e discutido nos itens anteriores.

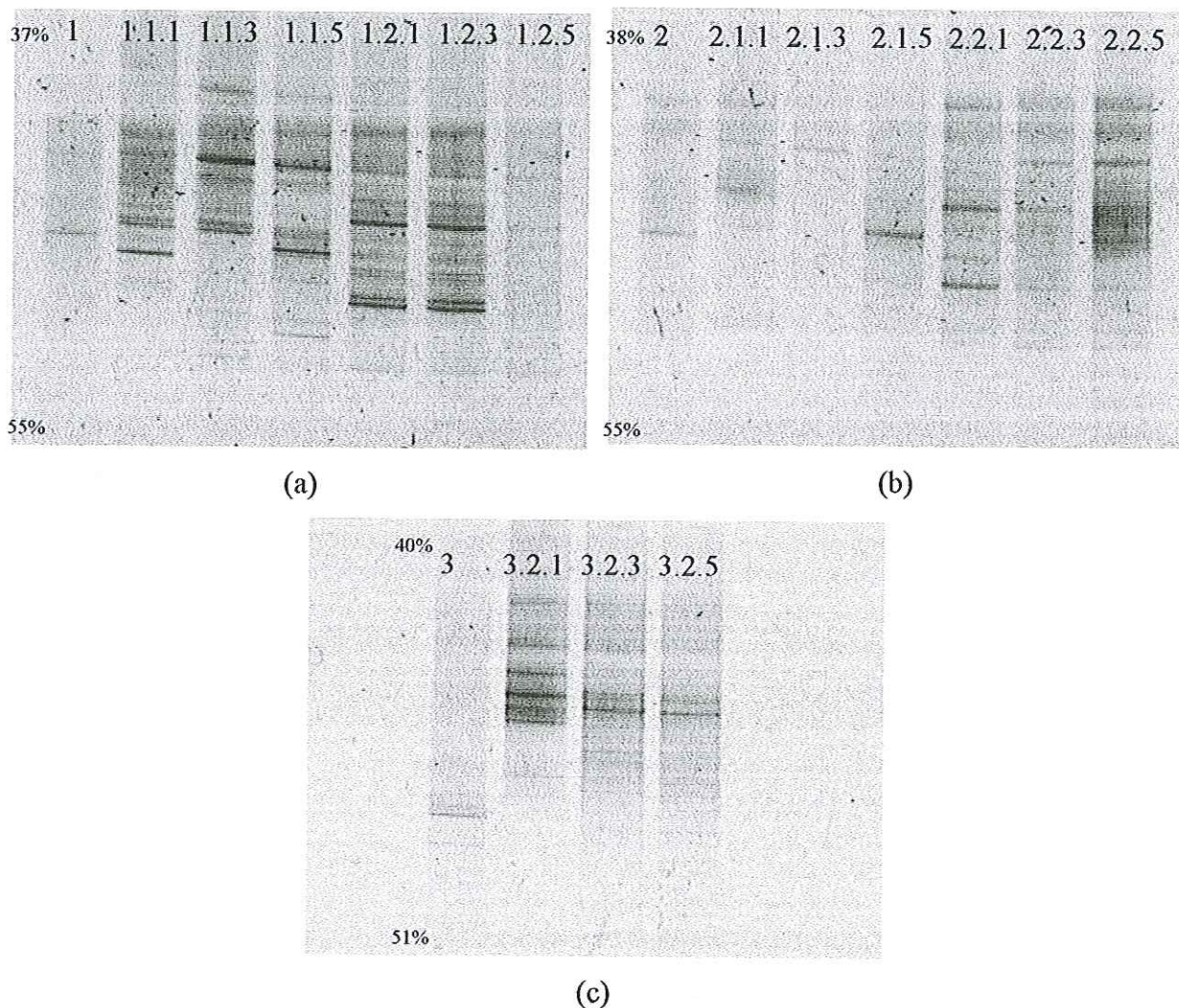


Figura 5.7: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de eubactéria (i.j.k) i- inóculos originário (1,2,3); j fases (sendo 1 -período de desequilíbrio para ácidos, 2 - equilíbrio dinâmico aparente); k – pontos de amostragem dos reatores (1- P1, 3- P2, 5- P3): (a) Reator 1; (b) Reator 2; e (c) Reator 3.

A alta produção de ácidos graxos voláteis, principalmente para o reator 1 e 2 (canaletas 1.1.1, 1.1.3, 1.1.5, 2.1.1, 2.1.3, 2.1.5), no início do processo, levou ao predomínio de espécies adaptadas a essa condição, com bandas marcantes, diferentes das presentes nos inóculos originários.

Com o equilíbrio dos sistemas, as bandas predominantes não foram as mesmas observadas no período de desequilíbrio (canaletas 1.2.1, 1.2.3, 1.2.5, 2.2.1, 2.2.3, 2.2.5, 3.2.1, 3.2.3, 3.2.5). Da mesma forma, as bandas predominantes para cada reator e o número de bandas não foram os mesmos, sugerindo que os microrganismos predominantes presentes nos reatores não foram os mesmos, resultando em comportamentos diferentes.

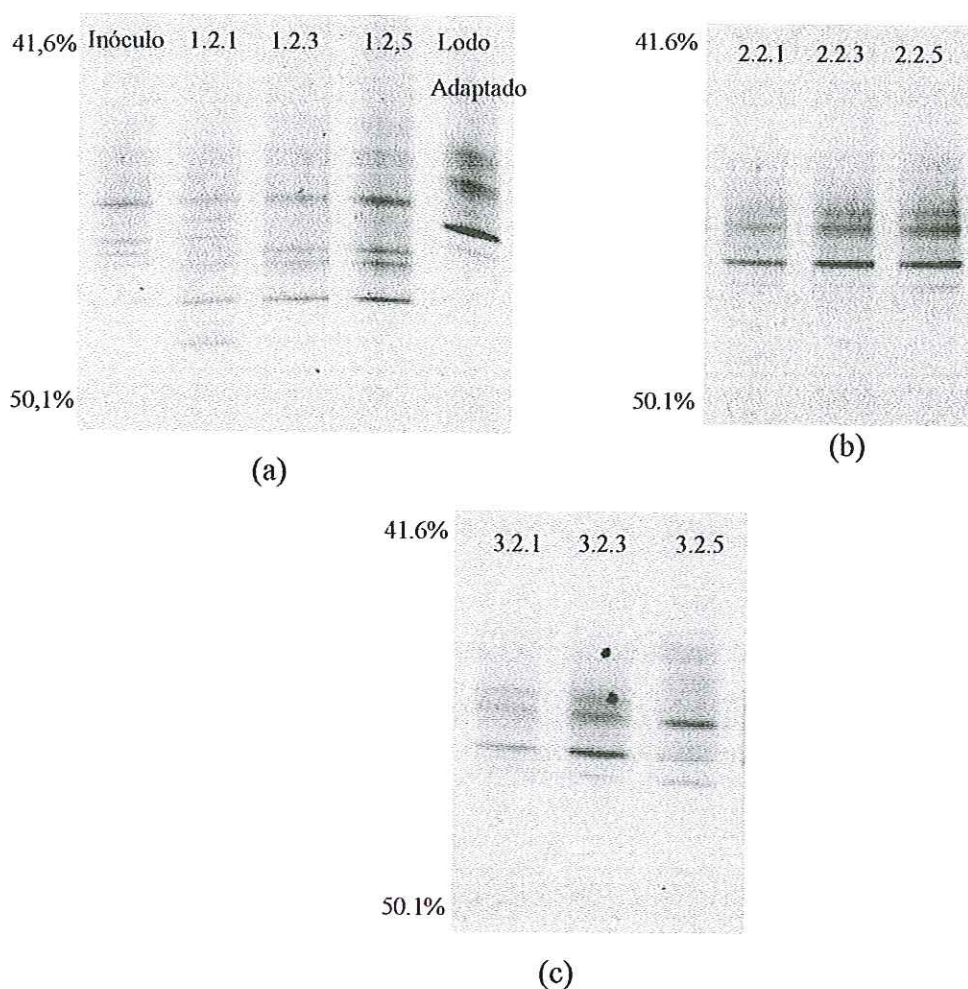


Figura 5.8: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de Arquea (i.j.k) i- inóculos originário (1,2,3); j fases (sendo 1 -período de desequilíbrio para ácidos, 2 - equilíbrio dinâmico aparente); k – pontos de amostragem dos reatores (1- P1, 3- P2, 5- P3): (a) Reator 1; (b) Reator 2; e (c) Reator 3.

Os resultados de DGGE para “*primer*” de Arquea comprovaram que as bancas predominantes, relativa a espécies, do lodo originário do reator 1 foi modificada no processo de desprendimento do lodo originário, o que, provavelmente, ocasionou a baixa eficiência desse inoculo (Figura 5.8).

A semelhança entre as bandas presentes nos inóculos 2 e 3 sugerem que a boa

eficiência do reator 3 não esteja diretamente relacionada com microrganismos do Domínio Arquea.

5.1.2. Segunda fase da primeira etapa – Cinética de degradação

5.1.2.1. Estimativa de parâmetros cinéticos

Estabelecidos os equilíbrios dinâmicos aparentes de concentrações de matéria orgânica dos reatores, para TDH de 24 h, os reatores 2 e 3, que apresentaram melhores desempenhos, foram submetidos a TDH de 16 h, com finalidade de determinar a cinética de degradação dos BTX. O reator 1 foi descartado nessa etapa, pois, após 70 dias de operação, apresentava baixa eficiência de remoção de matéria orgânica (apresentado no tópico anterior).

Foram realizados perfis espaciais de consumo de substrato nos reatores 2 e 3 após os reatores atingirem os equilíbrios dinâmicos aparentes para essa nova condição.

Na Tabela 5.3 estão representados os perfis de decaimento da matéria orgânica expressas em DQO, para os reatores 2 e 3.

Tabela 5.3: Perfis espaciais de concentrações de matéria orgânica (DQO) para os Reatores 2 e 3

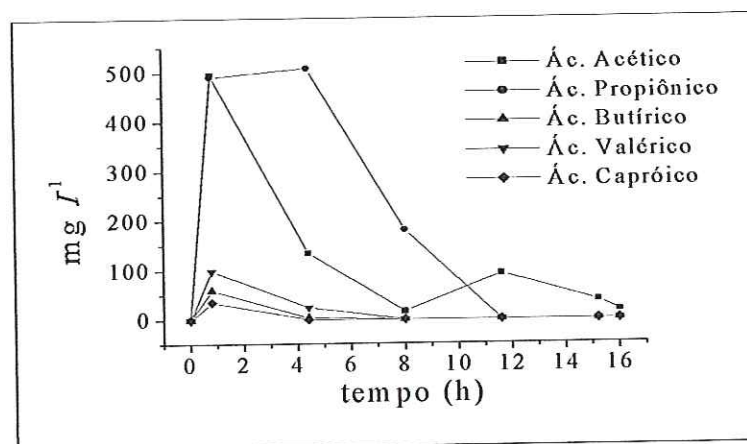
Pontos	L/D	TDH (h)	Matéria Orgânica DQO (mg . l ⁻¹)	
			Reator 2	Reator 3
Afluente	0	0	3617	3617
1	1	0,8	2516	2142
2	5,5	4,4	988	930
3	10	8	395	235
4	14,5	11,6	301	76
5	19	15,2	89	37
Efluente	20	16	86	37

O reator 3 apresentou melhor resultado de remoção de matéria orgânica, sendo que, a partir do quarto ponto de coleta (TDH = 11,6 h), já apresentava concentração inferior à observada no efluente do reator 2.

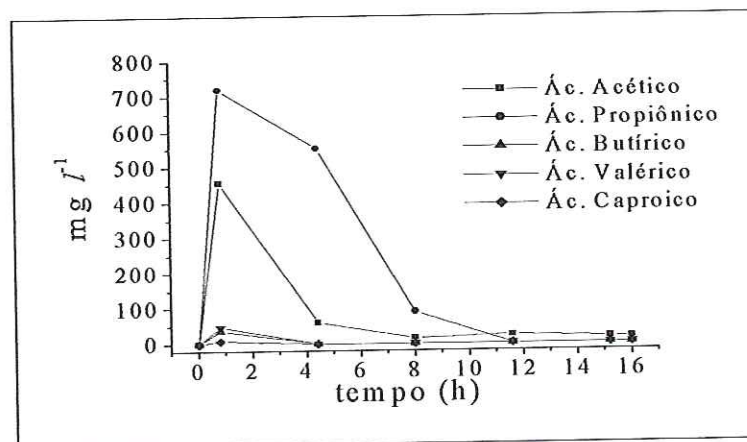
Também foram realizados perfis espaciais de concentrações de ácidos graxos

voláteis (Figura 5.9). O reator 3 teve melhor desempenho, pois a partir do terceiro ponto de coleta (TDH = 8 h) já apresentava baixa concentração de ácidos intermediários.

Os resultados dos perfis de ácidos sugerem que as rotas de degradações não foram as mesmas nos dois reatores, pois diferentes concentrações de ácido acético e propiônico foram observadas ao longo do comprimento do reator. Essa diferença levou a comportamentos cinéticos diferentes, conforme será apresentado posteriormente.



(a)



(b)

Figura 5.9: Perfis espaciais de concentrações de ácidos nos reatores (a) Reator 2, (b) Reator 3.

Para avaliação cinética, modelos foram ajustados aos pontos experimentais, utilizando o Software Microcal Origin 6.1[®] (método de Levenberg-Marquardt), para determinação dos coeficientes cinéticos aparentes. Nesses ajustes, adotou-se que as

perdas de BTX pelos gases ocorreram no primeiro ponto, onde ocorre a maior produção de biogás (Equação 1- primeira ordem e Equação 2 – ordem zero).

Os resultados obtidos nos reatores 2 e 3 apresentaram melhor resposta para o modelo de cinética de primeira ordem (Eq. 1) (Figura 5.10). O balanço de massa considerando reator tubular ideal para cinética de primeira ordem (Eq. 1) resulta em:

$$C_s = C_{SR} + (C_{S0} - C_{SR} - C_{SS}) \cdot e^{(-k_1^{app} \cdot TDH)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Nessa equação, C_s é a concentração de BTX ao longo do comprimento do reator (diferentes TDHs), C_{RS} é a concentração residual de BTX, C_{S0} é a concentração inicial, C_{SS} é a concentração de BTX que sofre stripping, TDH é o tempo de detenção hidráulica teórico, com base no volume líquido e k_1^{app} o coeficiente cinético aparente de primeira ordem.

Os reatores foram considerados como tubular ideal (plug-flow) com base nos estudos hidrodinâmicos realizados por de NARDI *et al.* (1999). O TDH considerado é calculado com base no volume líquido do reator (volume de escoamento), considerando distribuição uniforme do suporte no interior do reator.

Os parâmetros cinéticos obtidos estão apresentados na Tabela 5.4, utilizando constantes definidas na Tabela 5.5.

Os resultados de cinética de degradação para os reatores 2 e 3 foram similares aos obtidos por de NARDI (2002) em solução de BTX e etanol (0,42 h⁻¹ para o benzeno, 0,47 h⁻¹ para o tolueno e 0,53 h⁻¹ para o m-xileno) e por RIBEIRO *et al.* (2003 a) para água contaminada com gasolina (0,53 h⁻¹ para o benzeno, 0,55 h⁻¹ para o tolueno e 0,36 h⁻¹ para o m-xileno). SOUZA *et al.* (2004), por outro lado, observaram valores distintos aos observados nesta pesquisa, provavelmente por ter utilizado outra configuração de reator, reator em batelada seqüencial, e alimentado com cada composto separadamente (0,41 h⁻¹ para o tolueno e 0,16 h⁻¹ para o m-xileno).

As velocidades específicas de degradação dos BTX, de cada reator, foram calculadas utilizando os valores das constantes cinéticas e os valores das diferentes concentrações de biomassa nos reatores, estimadas em 0,531 mg de SSV.g⁻¹ de espuma e 0,822 mg de SSV.g⁻¹ de espuma para os reatores 2 e 3, respectivamente (Figura 5.11).

Tabela 5.4: Constantes cinéticas obtidas para biodegradação anaeróbia de benzeno, tolueno e m-xileno

Composto	Reator 2	Reator 3	Reator 2	Reator 3
	k_1^{app} (h^{-1})	k_1^{app} (h^{-1})	R^2	R^2
Benzeno	$0,44 \pm 0,19$	$0,55 \pm 0,05$	0,984	0,997
Tolueno	$0,15 \pm 0,19$	$0,26 \pm 0,11$	0,907	0,952
m-Xileno	$0,16 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,15$	0,971	0,979

Tabela 5.5: Constantes utilizadas para obtenção das constantes cinéticas para biodegradação anaeróbia de benzeno, tolueno e m-xileno

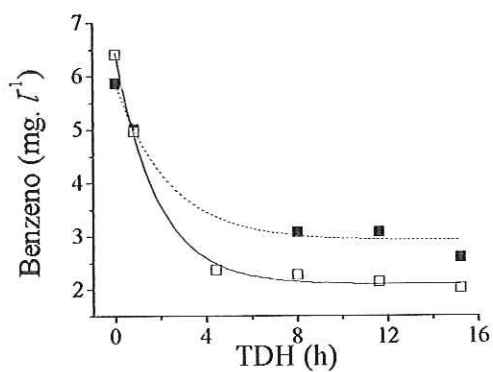
Composto	Reator 2		Reator 3		
	C_{s0}^* ($mg.l^{-1}$)	C_{ss}^* ($mg.l^{-1}$)	C_{s0}^* ($mg.l^{-1}$)	C_{ss}^* ($mg.l^{-1}$)	C_{SR}^* ($mg.l^{-1}$)
Benzeno	6,41	0,54	6,41	0,28	1,44
Tolueno	6,98	0,41	6,98	0,36	0,23
m-Xileno	2,28	0,26	2,28	0,16	< 0,10**

* Citadas anteriormente nos modelos cinéticos, ** Limite de detecção.

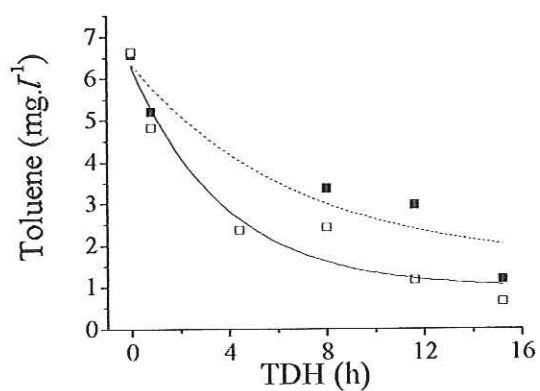
A Figura 5.11 mostra que o inóculo do reator 3 propiciou maior velocidade de degradação na primeira parte do reator, fato que pode estar associado com a maior concentração microbiana específica, que promoveu a maior conversão desses produtos, como visto na Figura 5.8. Por outro lado, o reator 3 apresentou menores velocidades específicas de degradação para BTX, já que a concentração total de biomassa, dada em SSV, no reator 3 foi mais que o dobro da concentração de microrganismos presentes no reator 2 (10,4 e 25 $mg\ SSV.l^{-1}$ de reator, para os reatores 2 e 3, respectivamente).

Os resultados demonstraram que os reatores apresentaram diferentes perfis de velocidade de degradações (Figura 5.11) e, portanto, diferentes porcentagens de degradações de BTX (Tabela 5.6).

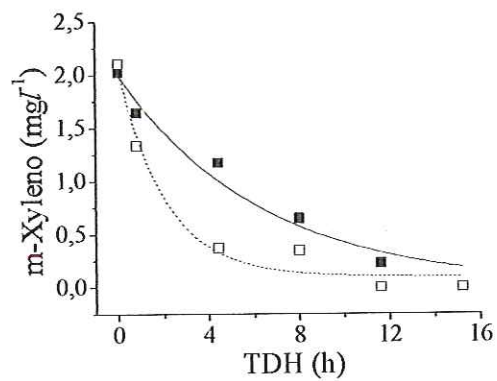
Tanto para o TDH de 24 h quanto para o TDH de 16 h, m-xileno foi o composto que apresentou maior perda para a atmosfera, provavelmente em função da baixa solubilidade em meio aquoso.



(a)

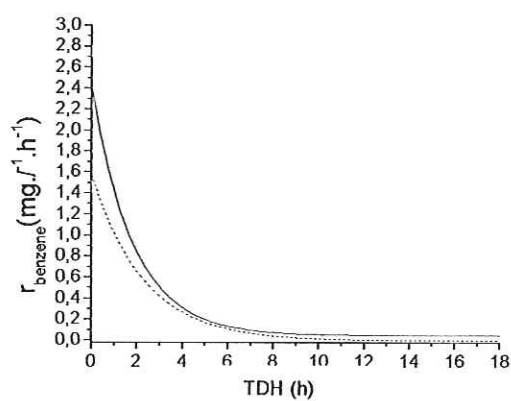


(b)

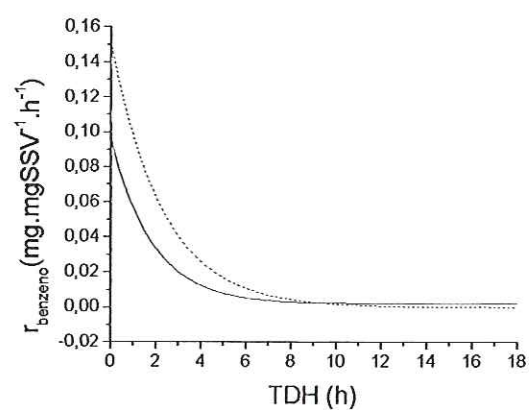


(c)

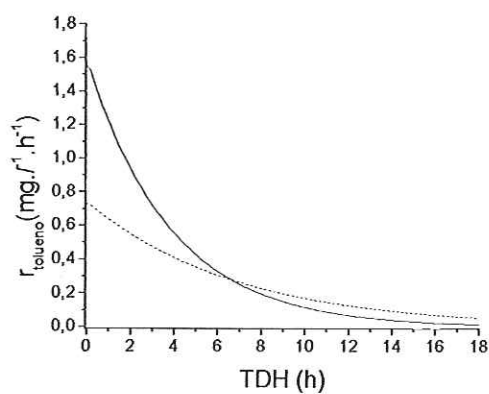
Figura 5.10: Ajuste do coeficiente cinético aparente para os reatores 2 (■) e 3 (□)
 (a) Ajuste para benzeno; (b) Ajuste para tolueno; e (c) Ajuste para m-xileno.



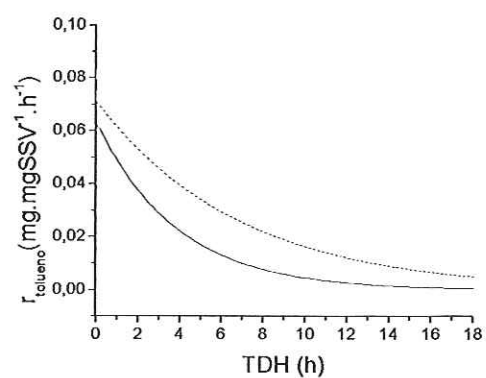
(a)



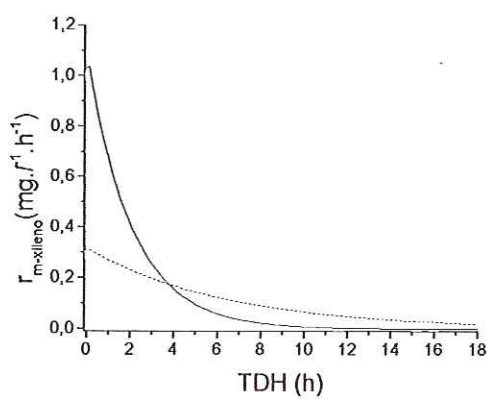
(b)



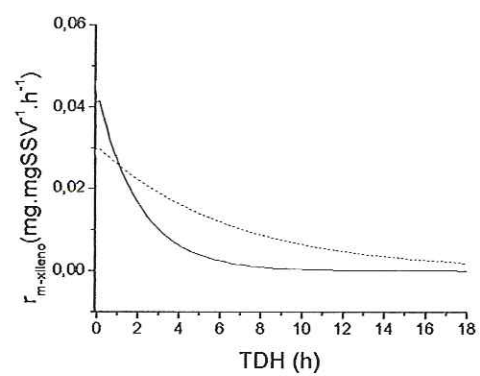
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 5.11: Velocidades ($\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e velocidades específicas ($\text{mg.mg SSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de degradação para os reatores 2 (----) e 3 (—). (a) para benzeno, (b) para tolueno e (c) para m-xileno.

Na Tabela 5.6 e na Tabela 5.4 é possível observar, para o reator 3, que o tolueno não apresentou o maior valor de porcentagem de remoção, assim como de coeficiente cinético de degradação, como esperado (LOVLEY *et al.*, 1995, MECKENSTOCK *et al.*, 2004). Esse resultado poderia estar relacionado a rotas alternativas de degradação dos compostos presentes na gasolina, que teriam como intermediário o tolueno. A rota de degradação do benzeno adicionando o radical metil ao benzeno pela enzima acetil transferase formando tolueno é questionada, e já foi observada em medula óssea (COATES *et al.*, 2002; CHAKRABORTY e COATES, 2004).

Tabela 5.6: Avaliação dos meios de remoção de BTX obtidos para os Reatores 2 e 3, para TDH de 16 h

Compostos	Degradação (%)			Eliminado no Efluente (%)			Arrastado com os gases (%)		
	benzeno	tolueno	m-xileno	Benzeno	tolueno	m-xileno	benzeno	tolueno	m-xileno
Reator 2	53,3	79,2	90,7	40	15,9	-	6,7	4,8	9,3
Reator 3	73,5	92,6	94,3	22	3,3	-	3,5	4,1	5,7

5.1.2.2. Exames microbiológicos nos reatores

Os resultados das diversidades morfológicas dos reatores 2 e 3 demonstram que ambos reatores apresentam altas diversidades morfológicas (Tabela 5.7), principal fator responsável pela adaptação desses inóculos aos tóxicos.

Os diferentes graus de degradação, ao longo do comprimento dos reatores, devem estar associados a microrganismos específicos, que se apresentam em diferentes concentrações em cada reator, justificando seus diferentes comportamentos. Além das diferentes diversidades microbianas observadas nos dados de DGGE descrito no tópico de exames microbiológicos anteriormente apresentado.

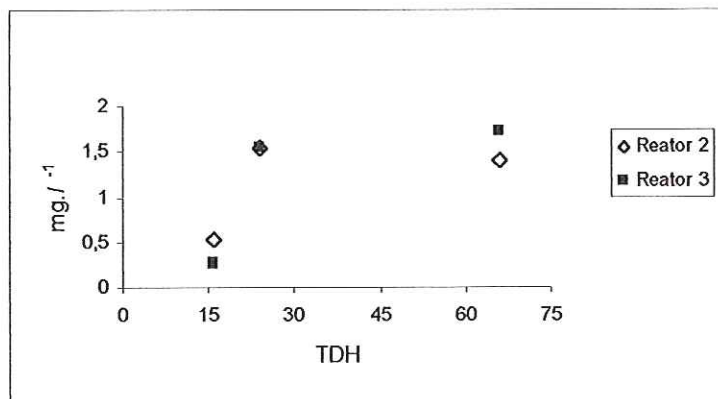
Tabela 5.7: Caracterização morfológica do desenvolvimento dos microrganismos ao longo dos reatores, para TDH de 16h, nos pontos de amostragem (P1- inicial, P3- meio, P5- final) 2ª fase da 1ª etapa.

MORFOLOGIA	Biomassa em espuma de poliuretano					
	R2			R3		
	P1	P3	P5	P1	P3	P5
Arqueas Metanogênicas						
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	-	-	++++	-	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	++++	+++	++	++++	++++
Cistos de sarcinas	-	-	-	-	-	-
Bactérias						
Bacilos com extremidades afiladas	++++	+++	++++	+++	++++	+++
Bacilos com extremidades arredondadas	+++	++++	++++	+++	++++	+++
Bacilos curvos	+	+	-	+	+	++
Bacilos delgados	++++	++++	++++	++++	+++	+++
Bacilos ovalados	++++	++++	++++	++++	+++	+++
Bacilos com grânulos	++	+	-	-	+	+
Bacilos esporulados	-	-	-	-	-	-
Cocos	+++	+++	+	++	+++	-
Cocos em cadeia	-	-	-	-	-	-
Espiroqueta	+	-	-	-	+	+
Filamentos	++	++	+	+	++	++
Filamento septado	-	-	-	-	-	-

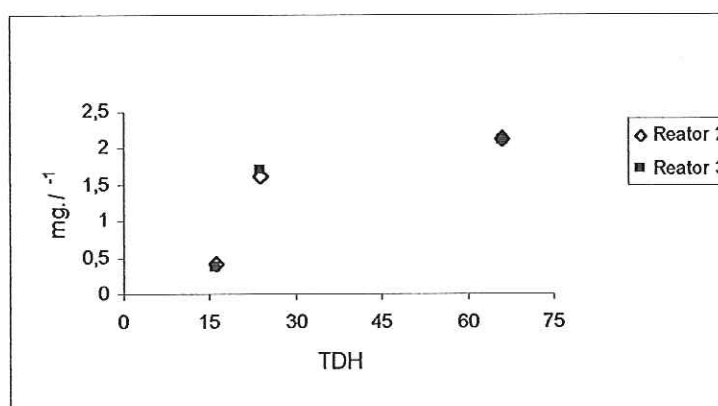
(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados

5.1.3. Terceira Fase da Primeira Etapa – Stripping dos BTX

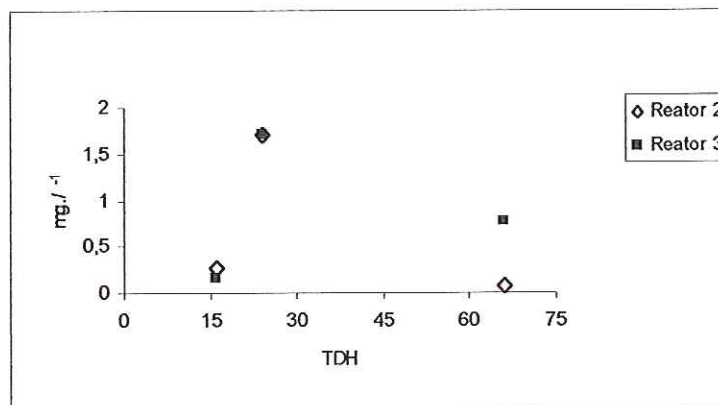
Com objetivo de obter-se relação entre as perdas de BTX, com arrastê pelos gases, e o TDH aplicado ao reator, coletas de BTX foram feitas na saída de gás para TDHs de 16, 24 e 66 h, quando os reatores apresentavam-se em equilíbrios dinâmicos aparentes (Figura 5.12e Tabela 5.8).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.12: Arraste de BTX por gases, para diferentes TDHs. (a) Benzeno; (b) Tolueno; e (c) m-Xileno

Tabela 5.8: Dados de arraste BTX para os diferentes TDHs e produção de metano.

Reatores	Arraste de BTX (mg.l^{-1})			THD (h)	Produção de metano (mmol/TDH)
	Benzeno	Tolueno	m-Xileno		
Reator2	0,54	0,42	0,26	16	317
	1,55	1,62	1,70	24	337
	1,41	2,13	0,09	66	1764
Reator 3	0,28	0,36	0,16	16	586
	1,54	1,70	1,71	24	968
	1,71	2,11	0,75	66	1946

Os resultados demonstram que o aumento do TDH favorece maior perda de BTX para atmosfera, provavelmente relacionados à maior produção de gás (Tabela 5.8)

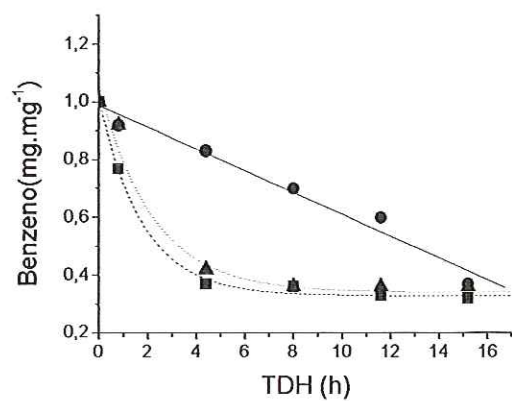
5.2. Segunda e Terceira Etapas - Degradação de BTX em presença de sulfato e de Fe(III)

5.2.1. Resultados da operação do reator

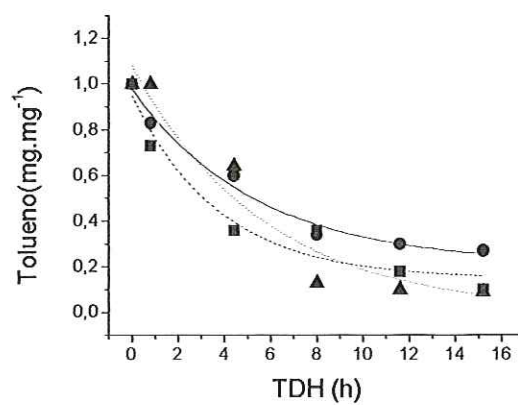
Na segunda etapa, o afluente do reator 3 foi suplementado com sulfato, na forma de Na_2SO_4 , a uma razão de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 1,3 (SILVA *et al.*, 2004), e na terceira etapa além da adição de Na_2SO_4 houve a adição de $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Os resultados obtidos para remoção de benzeno, tolueno e m-xileno para condições metanogênicas, sulfetogênicas e sulfetogênicas na presença de Fe (III) estão apresentados na Figura 5.13.

Após três meses de operação da segunda etapa, o reator atingiu uma condição de equilíbrio, com 60% de redução de sulfato, 60% de redução do metano produzido, em relação à fase metanogênica, e eficiência de 96% de remoção de matéria orgânica. Apesar dos bons resultados de remoção de matéria orgânica, o mesmo não foi observado para degradação de BTX (Figura 5.13).

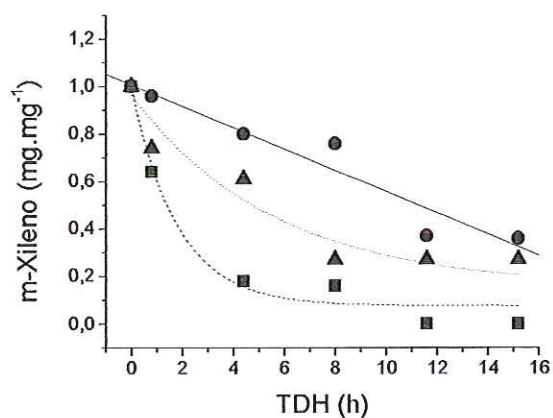
Outros autores também observaram este comportamento (ULRICH e EDWARDS, 2003), atribuindo à presença do H_2S , produzido por culturas redutoras de sulfato, que inibiram as degradações de BTX.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.13: Degradações de BTX ao longo dos Reatores sob condição (■) Metanogênicos, (●) Redução de sulfato, (▲) Redução de Ferro (III); a) para benzeno, b) para tolueno e c) para m-xileno. Dados normalizados (C_s/C_0).

SPEECE (1996) e BUITRON *et al.* (2004) descrevem que o H_2S e suas formas solúveis seriam tóxicos tanto para microrganismos metanogênicos, quanto para sulfetogênicos, em concentrações mínimas de 83 mg.l^{-1} H_2S total, e como nesse trabalho as concentrações variaram de 120 a 285 mg.l^{-1} de H_2S total, provavelmente o H_2S e formas solúveis pioraram o desempenho do reator nessa etapa.

Na terceira etapa, o afluente do reator, sob condição de redução de sulfato, foi suplementado com $Fe(OH)_3$, com finalidade de melhorar as degradações de BTX, como observado por BELLER *et al.* (1992). Realmente ocorreram aumentos nas degradações de BTX, possivelmente relacionados à precipitação de sulfeto, observados pelos dados de EDX (Tabela 5.9), e queda da concentração de enxofre no meio aquoso, que teve redução da concentração no efluente de 120 mg.l^{-1} para 28 mg.l^{-1} de H_2S total.

A precipitação do enxofre poderia se dar abioticamente nas formas de FeS e S^0 , ou pela ação de microrganismos redutores de Ferro (III), que gerariam Fe_3O_4 .

Tabela 5.9: Resultados de Difração de Raio-X para amostras de biomassa aderidas ao material suporte antes e depois da adição de Fe (III).

Elemento	2ª Etapa sem Fe (III)		3ª Etapa com Fe (III)	
	Massa [%]	Átomo [%]	Massa [%]	Átomo [%]
S	24,08	22,72	66,84	64,09
Fe	3,20	1,73	1,11	0,61

Comparando-se os resultados de EDX da Tabela 5.9 com as formas de utilização do $Fe(OH)_3$ apresentadas por BELLER *et al.* (1992), para degradação do tolueno (Tabela 5.10), é possível fazer uma estimativa das formas de consumo de Fe (III) no reator. A reação de oxidação abiótica de H_2S levando a S^0 , sem formação de FeS , torna-se mais condizente com a baixa concentração de Fe precipitada na terceira etapa.

A degradação biológica de BTX via redução de Ferro (III) pode ser descartada, pois para que houvesse oxidação de BTX via redutoras de Ferro, gerando Fe_3O_4 , seria necessário a adição de uma concentração de $Fe(OH)_3$ cinco vezes maior para atender a estequiométrica da reação biológica.

Na Figura 5.14 estão representadas as velocidades de degradações de BTX sob condições metanogênica, de redução de sulfato, e de redução de sulfato em presença de $Fe(III)$. Com os dados de degradações de BTX obtidos na Figura 5.13, foi possível

determinar-se os coeficientes cinéticos aparentes para cada etapa, sendo que para a metanogênica e em presença de Ferro(III), a cinética ajustada foi de primeira ordem, conforme Equação 1, citada em tópico anterior, e para a condição de redução de sulfato, foi de ordem zero (Eq. 2), para o benzeno e m-xileno, Equação 2, e primeira ordem para o tolueno, conforme Equações 1, citada anteriormente (Tabela 5.11). Dessa forma, traçaram-se os gráficos de velocidade a fim de comparar os resultados de degradação.

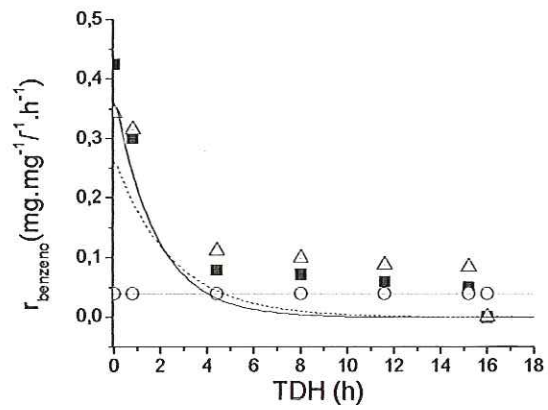
$$C_s - C_{SR} = C_{s0} - C_{SR} - C_{SS} - k^{app} \cdot TDH \quad (\text{Eq. 2})$$

Tabela 5.10: Reações bióticas e abióticas envolvendo tolueno, Ferro (III) e enxofre.

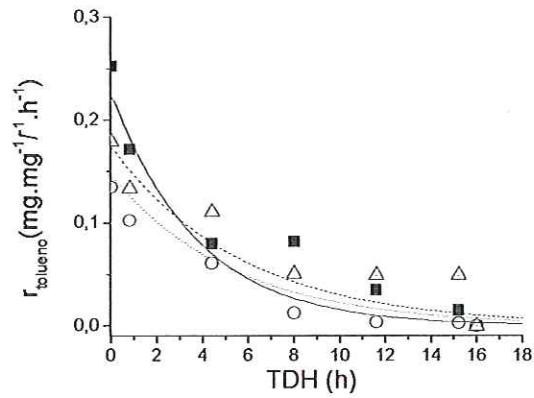
Reação	Descrição
$C_7H_8 + 4,5SO_4^{2-} + 3H_2O \leftrightarrow 2,25H_2S + 2,25HS^- + 7HCO_3^- + 0,25H^+$	Oxidação biótica de tolueno com sulfato sem crescimento celular
$C_7H_8 + 4,09SO_4^{2-} + 0,17HN_4^+ + 2,49H_2O \leftrightarrow 2,04H_2S + 2,04HS^- + 0,17C_3H_7O_2N + 6,16HCO_3^- + 0,2H^+$	Oxidação biótica de tolueno com sulfato com crescimento celular
$C_7H_8 + 108Fe(OH)_3(s) \leftrightarrow 36Fe_3O_4(s) + 7HCO_3^- + 159H_2O + 7H^+$	Oxidação biótica de tolueno com $Fe(OH)_3$ com crescimento celular
$4Fe(OH)_3(s) + 3H_2S + 3HS^- \leftrightarrow 2S^0(s) + 4FeS(s) + 9H_2O + 3OH^-$	Oxidação abiótica de H_2S a S^0 , com formação de FeS
$4Fe(OH)_3(s) + H_2S + HS^- \leftrightarrow 2S^0(s) + 4Fe^{2+} + 3H_2O + 9OH^-$	Oxidação abiótica de H_2S a S^0 , sem formação de FeS
$4Fe(OH)_3(s) + 1,28H_2S + 1,28HS^- + 3,48HCO_3^- \leftrightarrow 2S^0(s) + 0,52FeS(s) + 3,48FeCO_3(s) + 7,18H_2O + 4,72OH^-$	Oxidação abiótica de H_2S a S^0 , com limitada formação de FeS e formação de $FeCO_3$

Fonte: BELLER *et al.* (1992)

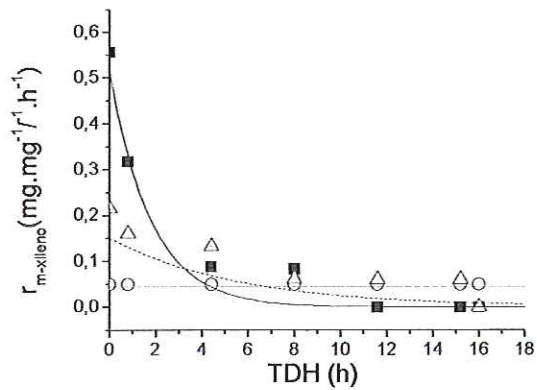
As velocidades iniciais de degradações de BTX foram maiores para a condição metanogênica (Figura 5.13). As baixas eficiências observadas na condição sulfetogênica poderiam estar associadas à alta produção de sulfeto. Dessa forma, a adição de $Fe(III)$ aumentou as velocidades no primeiro trecho do reator, precipitando o enxofre, o que provavelmente causou o entupimento do reator e problemas hidrodinâmicos. Os valores máximos de velocidade de degradação dos compostos no reator contínuo foram maiores que os observados pelos autores ULRICH e EDWARDS (2003) e CORSEUIL *et al.* (1998), para condições em batelada (Tabela 3.1).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.14: Velocidades de degradações de BTX para os Reatores (■) Metanogênicos, (○) Redução de sulfato, (△) Redução de Ferro (III); a) para benzeno, b) para tolueno e c) para m-xileno.

Tabela 5.11: Constantes cinéticas obtidas para biodegradação anaeróbia de benzeno, tolueno e m-xileno, sob condição metanogênica (M), com adição de sulfato (S) e com adição de sulfato e Fe (III) (SF)

Composto	M	S	SF	R ²	R ²	R ²
	k ₁ ^{app}	k ₀ ^{app} - k ₁ ^{app}	k ₁ ^{app}	M	S	SF
Benzeno	0,56 ± 0,06 h ⁻¹	0,04 ± 0,01 mg.l ⁻¹ .h ⁻¹	0,41 ± 0,11 h ⁻¹	0,998	0,988	0,980
Tolueno	0,27 ± 0,11 h ⁻¹	0,19 ± 0,05 h ⁻¹	0,18 ± 0,03 h ⁻¹	0,957	0,985	0,949
m-Xileno	0,56 ± 0,10 h ⁻¹	0,05 ± 0,06 mg.l ⁻¹ .h ⁻¹	0,18 ± 0,10 h ⁻¹	0,979	0,964	0,931

5.2.2. Exames microbiológicos nos reatores

Na Tabela 5.12 são comparadas as morfologias observadas na microscopia ótica. Nas fases em que o reator foi submetido a sulfato, houve um aumento significativo de bacilos curvos, entretanto sem grandes diferenciações entre as condições de redução de sulfato em presença ou ausência de Ferro (III).

Como ilustração, são mostradas fotos de MEV de microrganismos aderidos a espumas dos reatores sob condição de redução de sulfato (Figura 5.15) e de sulfato com adição de Fe (III) (Figura 5.16).

Os resultados de DGGE (Figura 5.17) demonstraram que da etapa metanogênica para de redução de sulfato houve aumento das bandas predominantes do Domínio Eubactéria, provavelmente relativo a microrganismos redutores de sulfato, e para etapa com adição de Ferro (III) também houve o aparecimento de novas bandas tanto do Domínio Eubactéria quanto do Domínio Arquea que podem estar relacionado com o aparecimento de microrganismos redutores de ferro, para o Domínio Eubactéria, e principalmente com o aparecimento de espécies que necessitem de altas concentrações de Fe (III), no meio, como elemento essencial.



Tabela 5.12: Caracterizações morfológicas dos microrganismos ao longo dos reatores, para TDH de 16h, nos pontos de amostragem (P1- inicial, P3- meio, P5- final) comparação entre 1^a, 2^a e 3^a etapa, sob diferentes condições.

MORFOLOGIA	Biomassa em espuma de poliuretano								
	Redução de sulfato			Redução de sulfato/Fe(III)			Metanogêse		
	P1	P3	P5	P1	P3	P5	P1	P3	P5
Arqueas Metanogênicas									
<i>Methanosarcina</i> sp.	+	-	-	++++	++	++	++++	-	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++++	++++
Cistos de sarcinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bactérias									
Bacilos com extremidades afiladas	+	+	+	++	+	+	+++	++++	++++
Bacilos com extremidades arredondadas	+	+	++	+	+	++	+++	++++	++++
Bacilos curvos	+++	++++	++++	++++	+++	++++	+	+	++
Bacilos delgados	++++	++	++	++	++	++	++++	+++	+++
Bacilos ovalados	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	+++
Bacilos com grânulos	*	*	*	*	*	*	-	+	+
Bacilos esporulados	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cocos	++	+++	++	++	+	++	++	+++	-
Cocos em cadeia	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Espiroqueta	+	-	-	-	+	+	-	+	+
Filamentos	+	+	+	+	+	++	+	++	++
Filamento septado	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados

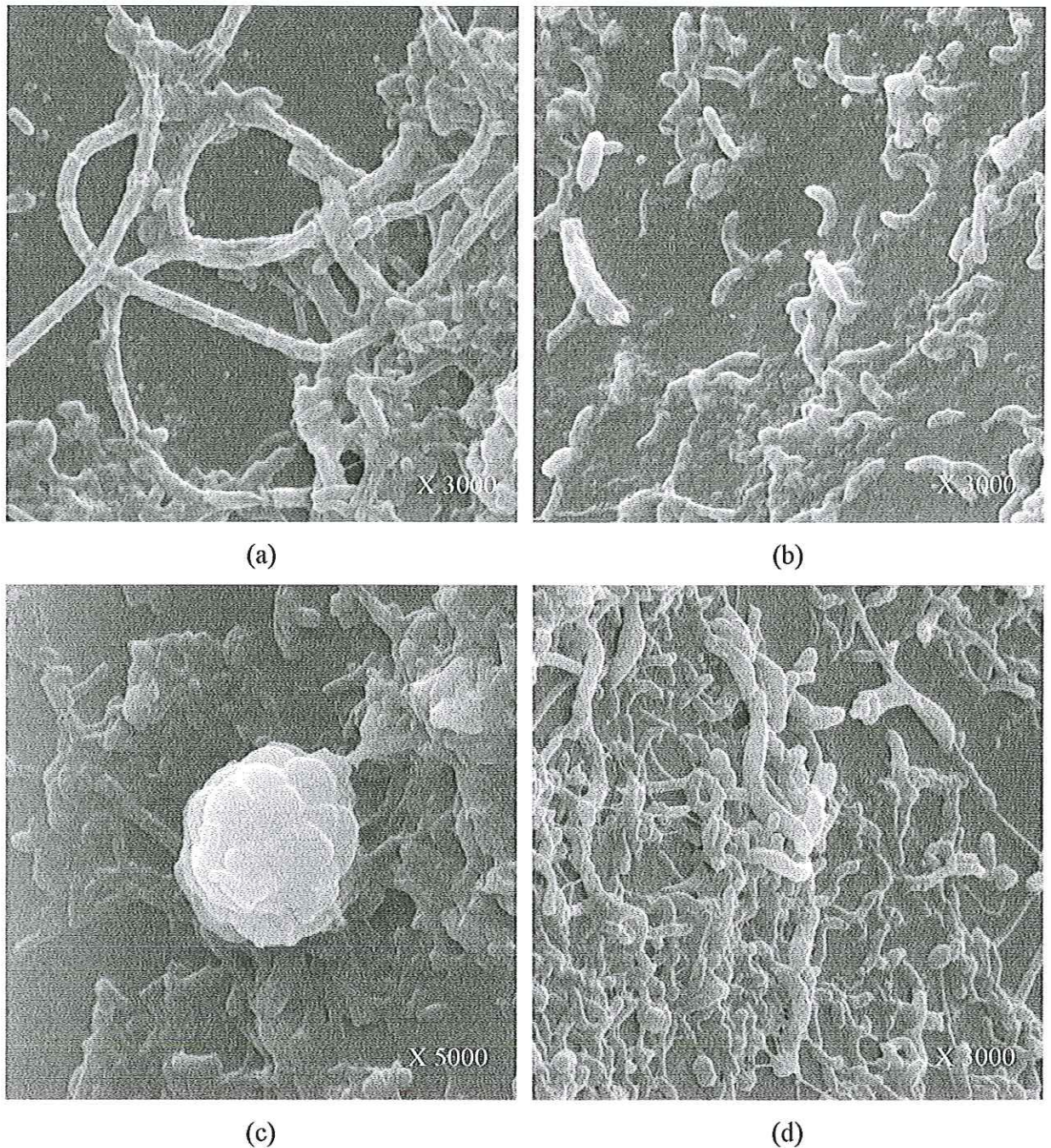


Figura 5.15: Fotos de microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos a espuma do reator 3, submetido a redução de sulfato. (a) Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Metanosaeta* sp.; (b) Presença de grande quantidade de bacilos curvos; (c) Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Methanosarcina* sp.; (d) Presença de bacilos de diversos tamanhos.

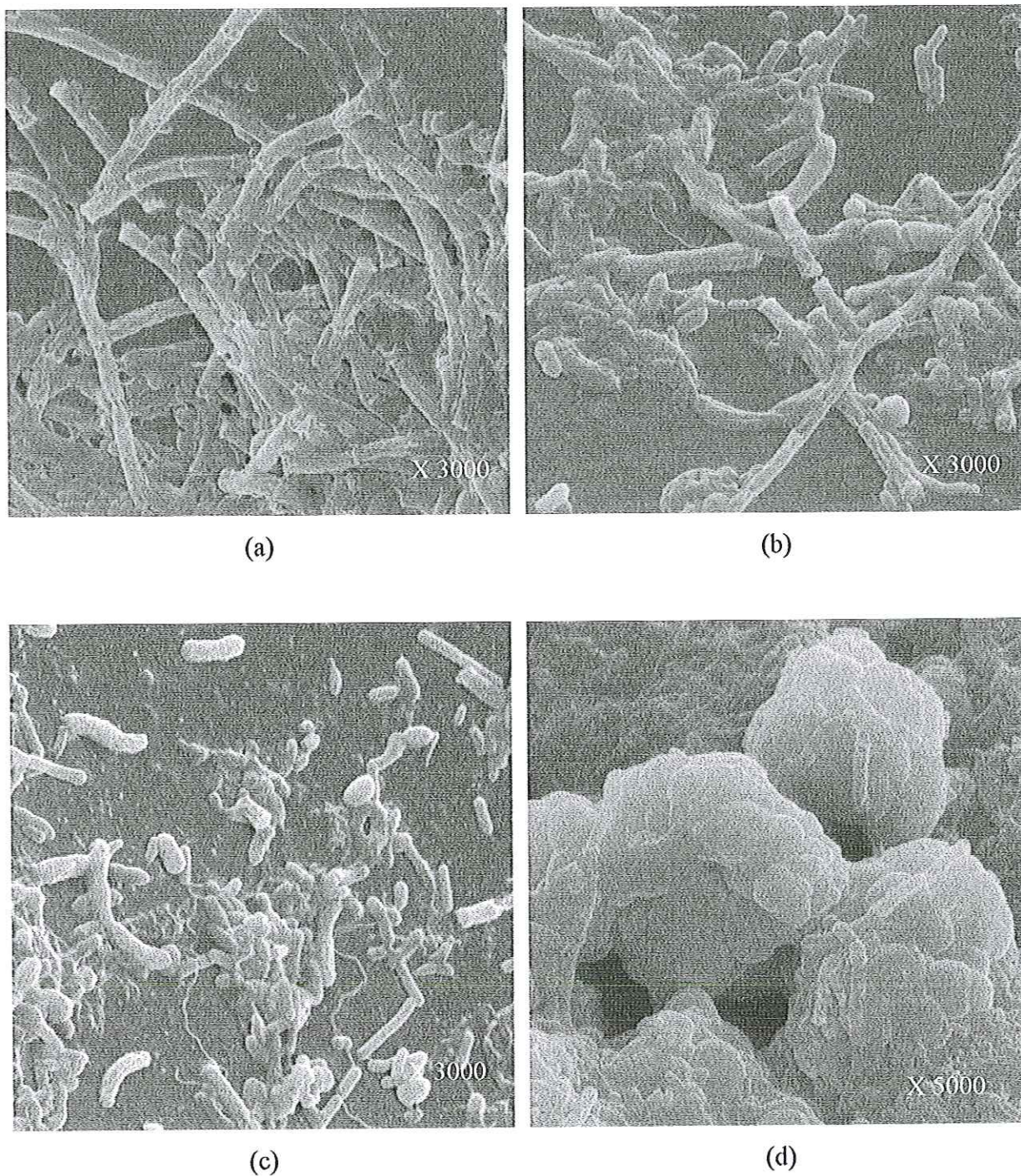
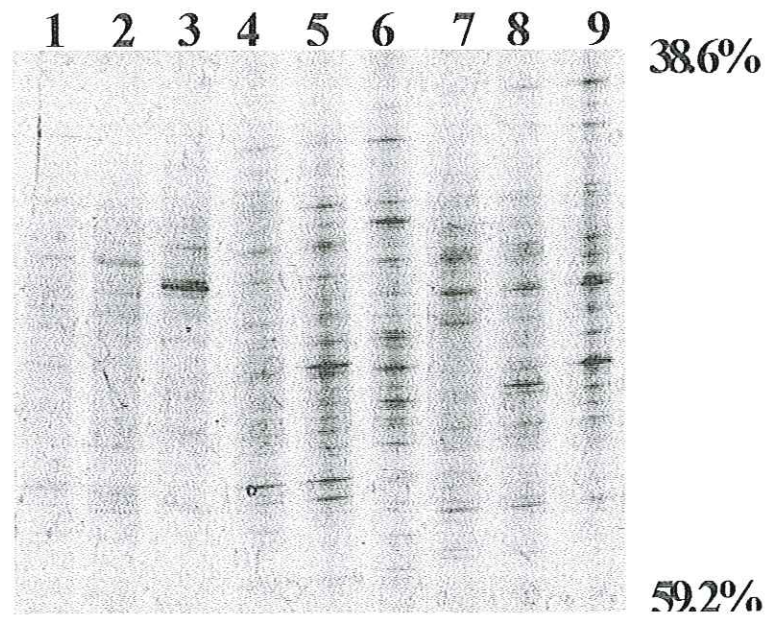
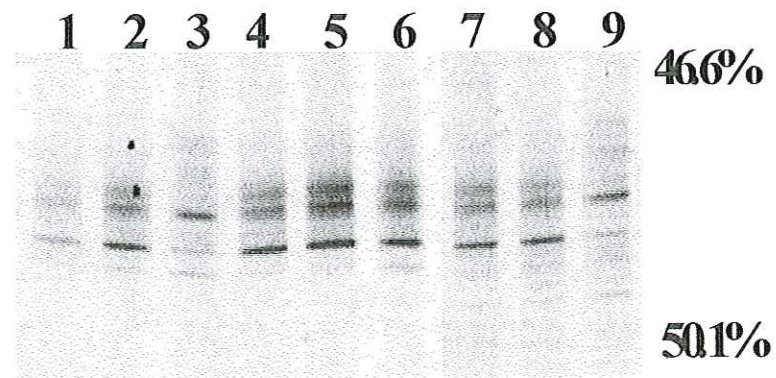


Figura 5.16: Fotos de microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos a espuma do reator 3, submetido a redução de sulfato suplementado com Fe(III). (a) Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Metanosaeta* sp.; (b) Diversidade de microrganismos presentes no reator; (c) Presença de bacilos de diversos tamanhos; (d) Presença de grande quantidade de microrganismos similares à *Methanosarcina* sp..



(a)



(b)

Figura 5.17: Visualização das bandas no gel de DGGE para “*primer*” de: (a) eubactéria, (b) arquea, para os diferentes pontos de amostragem do reator (P1, P2 e P3) das diferentes condições: (1,2 e3) Metanogênica, (4,5 e 6) Redução de Sulfato e (7, 8 e 9) Redução de Sulfato e Ferro.

CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas três etapas do trabalho permitiram concluir que:

- Os três inóculos apresentaram capacidade de remover os BTX, sendo que os inóculos originários do reator UASB do STAR da avicultura e do reator UASB da ETE da USP apresentaram capacidade, comprovada, de degradar os BTX.
- Os inóculos apresentaram diferentes períodos de adaptação ao afluente, sendo que o inóculo de UASB aplicado ao tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves apresentou os melhores resultados para adaptação e degradações de BTX.
- A escolha do inóculo mostrou ser fundamental para a partida de sistemas de biorremediação.
- Inóculo com alta diversidade de microrganismos e alta concentração de microrganismos metanogênicos apresenta maior probabilidade de apresentar melhores resultados de degradação completa.
- Inóculos de origens distintas podem apresentar velocidades e cinéticas diferentes para degradação de mesmos compostos, como observado para os Reatores 2 e 3. Os comportamentos distintos podem estar relacionados com diferentes rotas utilizadas nos processos de degradação e como consequência diferentes concentrações de microrganismos específicos.
- Ficou evidente que ocorrem perdas de BTX, em função do arraste causado pelos gases produzidos pela degradação.
- As perdas devem ser quantificadas, evitando-se equívocos e superestimativa do efeito da degradação, bem como da transferência dos tóxicos para a atmosfera.

- Provavelmente para TDHs inferiores a 24 h, as perdas por stripping são minimizadas em função da melhor transferência de massa externa à partícula.
- A adição de sulfato no reator metanogênico promoveu o desenvolvimento de microrganismos redutores de sulfato, mas o sulfeto gerado da redução do sulfato foi tóxico para o sistema, diminuindo as degradações de BTX ao longo do reator.
- Os diferentes aceptores de elétrons estudados apresentaram diferentes papéis nos processos de degradações de BTX, assim como diferentes modelos cinéticos.
- A adição de Ferro (III) no sistema foi fundamental para redução da toxicidade de sulfeto e aumento das degradações de BTX. Por outro lado, reatores de leito fixo não são os mais adequados para aplicação de Ferro (III) com sulfato, uma vez que problemas hidrodinâmicos e de entupimento podem inviabilizar a operação.

CAPÍTULO 7

SUGESTÕES

Com base nos resultados obtidos, sugere-se:

- Realizar teste de atividade metanogênica e análise de diversidade microbiana para a escolha do inóculo para pesquisa;
- Avaliar a degradação dos BTX separadamente, possibilitando avaliar as rotas de degradação de cada composto e seus intermediários.
- Analisar mais profundamente a perda de BTX por arraste. Apesar dos dados de perdas com relação ao TDH serem interessantes, ainda não está clara a influência que o TDH apresenta sobre a perda. Seria interessante que essa análise fosse feita em relação à total produção de gás e com mais pontos de amostragem.
- Avaliar a condição de redução de sulfato para diferentes inóculos.
- Avaliar a influência do ferro no processo de degradação dos BTX sob condições de redução de sulfato em outra configuração de reator, provavelmente de leito móvel ou em batelada, o que dificultaria o entupimento do leito.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, P.J.J.; CRONKHITE, L.A.; HUNT, C.S.; (1998). "Use of benzoate to establish reactive buffer zones of enhanced attenuation of BTX migration aquifer column experiments." *Environ. Scienci Tech.*, **32(4)**: 509- 515.
- ANP, Agência Nacional do Petróleo; (2003). www.anp.gov.br, Adquirido em 01 de Agosto de 2003.
- ARAÚJO, J.C.; (1995). "Caracterização e evolução de biofilme em reator aaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético." *Dissertação de mestrado*, SHS, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.
- BELLER, H.R.; GRIBC-GALIC, D.; REINHARD, M.; (1992). "Microbial degradation of toluene under sulfate-reduction condition and the influence on the process." *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 786-793.
- BIELEFELD, A.R.; STENSEL, H.D.; (1998). "Evaluation of biodegradation kinetic testing methods and longterm variability in biokinetics for BTEX metabolism." *Water Res.*, **3**: 733-740.
- BUITRÓN, G.; MORENO, G.; GARCIA, M. E.; MORENO, J.; (2004). "Sulfate concentration on the performance of a control strategy used to determinate the anaerobic phase length of an anaerobic/aerobic SBR degradation p-nitrophenol." *Anais do congresso 10th Anaerobic Digestion*, Montreal, Canada, **1**: 59-64.
- CATTONY, E.B.M.; MORAES, E.M; ADORNO, M.A.T; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; VARESCHE, M.B.; (2003). "Determinação de tolueno em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHFL) em condições sulfetogênicas." *Anais do II seminário do projeto temático*, UFSCar São Carlos, SP, **Julho**: 1-10.

- CETESB,(2003) Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental; (2003) www.cetesb.sp.gov.br, Adquirido em 01 de dezembro de 2003.
- CHAKRABORTY, R.; COATES, J.D; (2004). "Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons." *Appl. Microbial Biotechnol.*, **64**: 437-446.
- COATES, J.D.; CHAKRABORTY, R.; McINERNEY, M.J.; (2001). "Anaerobic benzene biodegradation – a new era." *Research in Microbiology*, **153**: 621-628.
- COHEN, Y.; (2001). "Biofiltration the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review." *Bioresource Tech.*, **77**: 257-274.
- CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J.; (1996). "Natural bioremediation perspective for BTX- contaminated groundwater in Brazil." *Wat. Sci. Tech.*, **35**: 9-16.
- CORSEUIL, H.X.; HUNT, C.S; SANTES, R.C.F; ALVAREZ, P.J.J.; (1998). "The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation." *Wat. Sci.*, **32**: 2065-2072.
- CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.; PEREIRA, D.C.; (2002). "Tratamento para derramamento de petróleo." *Ciência Hoje, SBPC*, **30** (179): 32-37.
- DAMIANOVIC, M.H.R.Z., (1997). "Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)." *Tese de doutorado*, LPB, SHS, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.
- de NARDI, I.R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (1999). "Influence of the Tracer Characteristics on Hydrodynamic Models of Packed-Bed Bioreactors". *Bioprocess Engineering*, **21**: 469-476.
- de NARDI, I.R., (2002). " Degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno, e xileno, BTEX em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)." *Tese de doutorado* SHS, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.
- de NARDI, I.R., MORAES, ADORNO, M.A.T., FORESTI, E.; (2004). "Static headspace gas chromatography using internal standard for benzene, toluene, etilbenzene and xylenes (BTEX) analysis in wastewater samples." *Anais do 10º Congresso Latino-Americano de cromatografia e técnicas afins*, **Outubro**: 104.
- de NARDI, I.R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; (2005). " Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers." *Process Biochemistry*, **40**: 587-592.

- DEL NERY, V.; (1987). "Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo." *Dissertação de mestrado*, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.
- EDWARDS, E.A.; WILL, L.E., REINHARD, M.; GRBIC-GALIC, D.; (1992). "Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reduction condition." *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 794-800.
- GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J.; (2000). "Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition." *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5488-5491.
- KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAZI, H.; (1997). "Methanogen flora of paddy soils in Japan". *FEMS Microbiology Ecology*, **22**: 39-48.
- LANGWALDT, J.H.; PUHAKKA, J.A.; (2000). "On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review." *Environ. Pollution*, **107**: 187-197.
- LOVLEY, D.R.; COATES, J.D.; WOODWARD, J.C.; PHILLIPS, E.J.P.; (1995) "Benzene Oxidation Coupled to Sulfate Reduction." *Appl. Environ. Microb.*, **Mar.** 953-958.
- MECKENSTOCK, R.U.; WARTHMAN, R.J.; SCHÄFER, W.; (2004). "Inhibition of anaerobic microbial o-xylene degradation in sulfidogenic sediment columns and pure culture." *FEMS Microbiology Ecology*, **47**: 381-386.
- MORAES, E.M; ADORNO, M.A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E.; (2000). "Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos". *Anais da Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia*, Recife-PE. Editora Universitária da UFPE. **2**: 235-238.
- MORENO, A.; BUITRÓN, G.; (2004 a). "Influence of the origin of the inoculum on the anaerobic biodegradability test." *Water Science and Technology*, **49(1)**: 53-59
- MORENO, A.; BUITRÓN, G.; (2004 b). "Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol." *Bioresource Technology*, **94**: 215-218.
- MUYZER, G. D. E.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G.; (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 695-700.

- NATION, J.L.; (1983) "A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electrons microscopy." *Stain technology*, **58**: 347-351.
- NIELSEN, T.A.; LIU, W.E.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D.A.; (1999). "Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor". *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 1251-1258.
- PHHELPS, C.D, KAZUMI, J., YOUNG, L.Y.; (1996). "Anaerobic degradation of benzene in BTX mixtures dependent on sulfate reduction." *FEMS Microbiology Letters*, **145**: 433-437.
- RIBEIRO, R.; FORESTI, E.; ZAIAT, M.; (2003 a). "Degradação de efluente contaminado com gasolina em reator anaeróbio horizontal de leito fixo." *Anais do II seminário do projeto temático*. UFSCar São Carlos, SP **Julho**: 25-32.
- RIBEIRO, R.; FERNANDES, B.S.; FORESTI, E.; ZAIAT, M.; (2003 b). "Degradação de BTX em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo sob condições Desnitrificantes." *XIV SINAFERM*, Florianópolis, SC.
- RIBEIRO, R.; VARESCHE, M.B.A.; FORESTI, E.; ZAIAT, M.; (2003 c). "Influence of Extracellular Polymeric Substances on the Anaerobic Biofilm Formation onto Polyurethane Foam Matrices." *Environmental Eng. Science*, **20**: 3 :249-257.
- SILVA, A. J.; TAVARES, A.C.; FORESTI, E.; ZAIAT, M.; (2004). "Kinetic evaluation of microbial interactions in an anaerobic sequencing batch reactor treating sulfate-rich wastewater." *Anais do congresso 10th Anaerobic Digestion*, Montreal, Canada, **3**: 1543-1556.
- SHIM, H.; YANG, S.T; (1999). "Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xilene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in fibrous-bed bioreactor." *Jou. Biotech.*, **67**: 99-112.
- SPEECE, R.E.; (1996) "Anaerobic biotechnology for industrial wastewater." *Archae Press*.
- SOUZA, D.A.; RIBEIRO. R.; CHINALIA, F.A; FORESTI, E. ; ZAIAT, M.; (2004). "Evaluation of toluene degradation in an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR)." *The first International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (1 IMEBE)*. **Setembro**: 149.
- STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER; (1998). AWWA, WEF, *American Public Health Association*, **20a. edição**.

- ULRICH, A.C., EDWARDS, E.A.(2003). "Physiological and molecular characterization of anaerobic benzene-degradation mixed cultures." *Environmental Microbiology*, **5(2)**: 92-102
- WEINER, J.M., LOVLEY, D.R., 1998, " Anaerobic Benzene Degradation in Petroleum-Contaminated Aquifer Sediments after Inoculation with a Benzene-Oxidizing Enrichment." *Appl. Environ. Microbiology*, **Feb.** 775-778.
- YEOM, S.H.; DAUGULIS, A.J.; (2001). "Benzene degradation in a two-phase partitioning bioreactor by *Alcaligenes xylooxidans* Y234." *Proc. Biochem.*, **36**: 765-772.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E.; (1994). " Reator anaeróbio horizontal de leito fixo(RAHLF) para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho." *Revista Brasileira de Engenharia- Caderno de Engenharia Química*, **11(2)**: 33- 42