

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE PENTACLOROFENOL POR CONSÓRCIOS METANOGENÉTICOS ENRIQUECIDOS



Sérgio Fernando Larizzatti

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

ORIENTADORA: Prof. Dra. Rosana Filomena Vazoller



São Carlos
1997

Class.	
Cutt.	2768
Tombo	

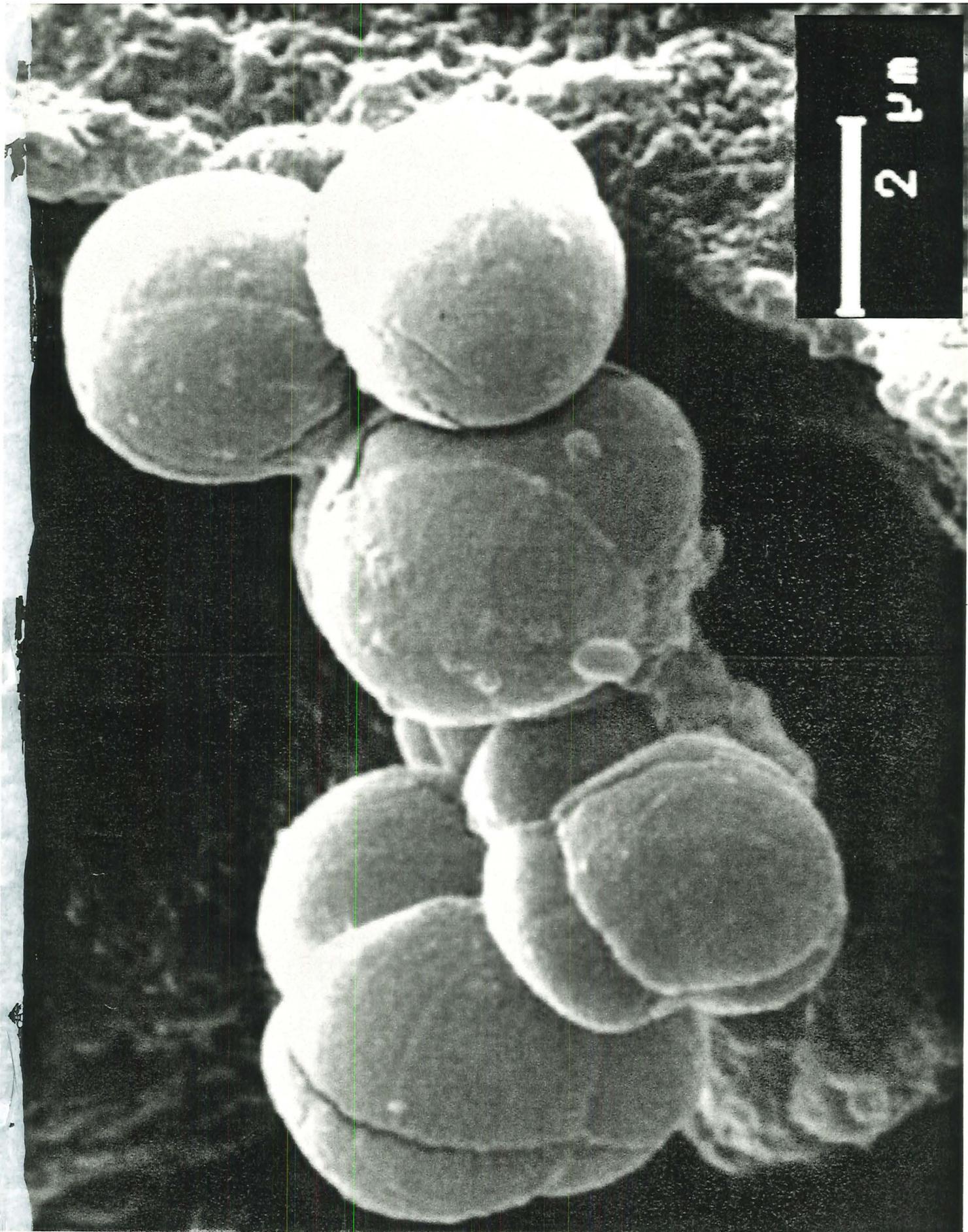
21104712.43

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

L323a Larizzatti, Sérgio Fernando
Avaliação da degradação anaeróbia de
pentaclorofenol por consórcios metanogênicos
enriquecidos / Sérgio Fernando Larizzatti. -- São
Carlos, 1997.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia
de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1997.
Área: Hidráulica e Saneamento
orientador: Prof^a . Dr^a . Rosana Filomena
Vazoller

1. Biodegradação anaeróbia. 2. Organoclorados.
3. Pentaclorofenol (PCP) . 4. Metano. 5. Bactérias
metanogênicas. I. Título.



FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: Bacharel **SERGIO FERNANDO LARIZZATTI**

Dissertação defendida e aprovada em 07-11-1997
pela Comissão Julgadora:



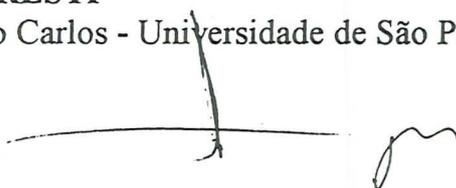
Profa. Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Pesquisadora - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



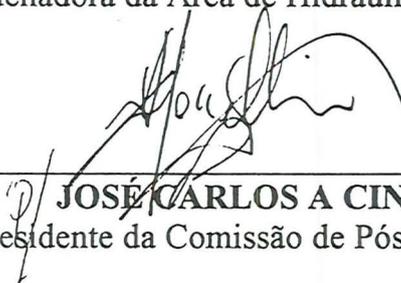
Profa. Doutora **VIVIAN HELENA PELLIZARI**
(Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)



Prof. Titular **EUGÊNIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



Prof. Titular **FAZAL HUSSAIN CHAUDHRY**
Coordenadora da Área de Hidráulica e Saneamento



JOSÉ CARLOS A CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Dedico este trabalho à minha família, especialmente a cinco
pessoas:

Aos meus pais, Guy e Eunice, pelo carinho e apoio sempre
incondicionais.

À minha esposa, Karin, minha companheira, minha amiga,
meu amor...

Aos meus filhos, Luiza e Lucas, minhas mais fortes molas
propulsoras.

"Nada na natureza está sozinho."

John Hunter, 1786

"... na dependência mútua de suas funções e no auxílio prestam reciprocamente, fica evidente que a harmonia conveniente entre os organismos, que agem uns sobre os outros, é condição necessária da existência do meio ao qual pertencem..."

Georges J. L. N. - F. Cuvier, 1800

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller, pela orientação precisa e dedicada, pela confiança depositada em mim e pelo prazer da convivência.

Ao prof. Dr. Eugênio Foresti, pelo apoio e sugestões oferecidas durante o trabalho.

À profa. Elizabeth de Mattos Moraes e Dra. Márcia H. R. Z. Damianovic, pela paciência e disponibilidade em ensinar, pela amizade e imenso auxílio nas análises cromatográficas.

Aos companheiros do Laboratório de Processos Anaeróbios, Marcelo Zaiat, Fernando H. Passig, Ariuska K. A. Cabral, Francisco Vela, Ivana R. Nardi e Lorena G. T. Vieira pela convivência fraterna, auxílio na tabulação dos dados e sugestões no decorrer do trabalho.

Às companheiras do Laboratório de Microbiologia, Eloísa P. Gianotti, Maria Bernadete A. V. Silva, Kátia Prates, Juliana C. Araújo, Suzi S. Oliveira e Silvana de Queiroz Silva pela amizade e auxílio em muitos ensaios microbiológicos.

Ao meu pai, pelo apoio durante todo o trabalho e revisão do texto.

Ao meu irmão, Marcelo V. Larizzatti pela realização da impressão deste trabalho.

Às "meninas" da Secretaria do Departamento de Hidráulica e Saneamento, Pavi, Sá, Cecília, Márcia, Valderes e Rose pela amizade e disponibilidade em resolver não só os problemas burocráticos.

Aos amigos Dimitrios (Grego) e Alexandre (Carioca) pela amizade e apoio oferecidos no decorrer do trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1. Importância dos compostos orgânicos halogenados.....	8
3.2. Degradação microbiana.....	15
3.2.1. Metabolismo microbiano para a degradação de compostos orgânicos halogenados.....	15
3.2.1.1. Metabolismo e microrganismos envolvidos na degradação aeróbia dos clorofenóis.....	25
3.2.1.2. Degradação microbiana anaeróbia dos clorofenóis e microrganismos envolvidos - ênfase à degradação do PCP.....	30
3.2.1.3. Vantagens da desalogenação reductiva.....	48
3.2.1.4. Considerações termodinâmicas.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1. Introdução.....	52
4.2. Equipamentos.....	54
4.2.1. Sistema de distribuição simultânea de gases.....	54

4.2.2. Coluna catalítica para remoção de traços de oxigênio dos gases.....	55
4.2.3. Cromatógrafos.....	56
4.2.4. Centrífuga e microcentrífuga.....	58
4.2.5. Microscópios.....	58
4.2.6. Manômetro.....	60
4.2.7. Outros equipamentos.....	61
4.2.8. Vidraria e outros materiais.....	62
4.3. Métodos experimentais.....	64
4.3.1. Procedimentos para a preparação, distribuição e preservação do meio de cultivo e soluções estoque.....	64
4.3.1.1. Composição e preparação do meio de cultivo utilizado e soluções estoque.....	64
4.3.1.1.1. Composição e preparo do meio de cultivo.....	64
4.3.1.1.2. Preparação da solução traço de metais.....	66
4.3.1.1.3. Preparação das soluções estoque.....	67
4.3.1.1.4. Preparação das soluções estoque de substratos.....	68
4.3.2. Procedimento para o enriquecimento e cultivo das culturas enriquecidas.....	70
4.3.2.1. Procedimento para inoculação.....	70
4.3.2.2. Procedimento para o enriquecimento.....	70
4.3.3. Procedimento para análises microscópicas.....	72
4.3.4. Procedimentos para as análises cromatográficas.....	74
4.3.4.1. Análises cromatográficas da produção de metano.....	74
4.3.4.2. Análises cromatográficas dos compostos organoclorados.....	75
4.3.5. Procedimentos para o cálculo da concentração de metano produzido com a utilização dos valores de pressão antes da purga.....	78

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1. Procedimentos técnicos empregados.....	79
5.2. Enriquecimento das culturas em substratos orgânicos adicionados com PCP.....	83
5.3. Análise das características morfológicas das bactérias presentes nos lodos estudados.....	107
5.4. Importância dos resultados obtidos para a tecnologia da biodigestão anaeróbia.....	114
6. CONCLUSÕES	117
7. RECOMENDAÇÕES	119
ANEXO A	120
ANEXO B	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
GLOSSÁRIO	137

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Carbono e os elementos do grupo 17 da Tabela Periódica....	9
FIGURA 2: Mecanismos genéricos de desalogenação catalisados por bactérias.....	17
FIGURA 3: Vias metabólicas envolvendo a degradação do 3-clorobenzoato, sob condições aeróbias (A) e metanogênicas (B).....	25
FIGURA 4: Vias de biodegradação aeróbia do pentaclorofenol.....	29
FIGURA 5: Exemplos de desalogenação reductiva.....	37
FIGURA 6: Vias metabólicas da degradação do PCP observadas no reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB).....	44
FIGURA 7: Esquema das vias metabólicas de descloração reductiva previamente observadas em consórcios anaeróbios adaptados e não adaptados.....	46
FIGURA 8: Fotografia do sistema de distribuição simultânea de gases....	55
FIGURA 9: Cromatógrafo Gow-Mac.....	57
FIGURA 10: Cromatógrafo HP 5890 série II.....	57
FIGURA 11: Microscópio ótico marca Olympus modelo BHT.....	59
FIGURA 12: Microscópio eletrônico marca Zeiss modelo DSM - 960.....	59
FIGURA 13: Manômetro digital.....	60
FIGURA 14: Agitador com temperatura controlada da marca Superohm modelo G-25.....	61
FIGURA 15: Frascos-reatores de 250 mL - ensaio 1.....	63
FIGURA 16: Frascos-reatores de 1.000 mL - ensaio 2.....	63
FIGURA 17: Desenho esquemático da derivatização do PCP.....	76

FIGURA 18:	Gráfico da variação dos organoclorados reator R1 ensaio 1.	85
FIGURA 19:	Gráfico da variação do metano reator R1 ensaio 1.....	85
FIGURA 20:	Gráfico da variação dos organoclorados reator R2 ensaio 1.	85
FIGURA 21:	Gráfico da variação do metano reator R2 ensaio 1.....	85
FIGURA 22:	Gráfico da variação dos organoclorados reator R3 ensaio 1.	86
FIGURA 23:	Gráfico da variação do metano reator R3 ensaio 1.....	86
FIGURA 24:	Gráfico da variação dos organoclorados reator R4 ensaio 1.	86
FIGURA 25:	Gráfico da variação do metano reator R4 ensaio 1.....	86
FIGURA 26:	Gráfico da variação da produção pontual de metano no ensaio 1.....	93
FIGURA 27:	Gráfico da variação da produção de metano corrigida com a pressão ensaio 1.....	93
FIGURA 28:	Gráfico da variação dos organoclorados reator RI ensaio 2..	98
FIGURA 29:	Gráfico da variação do metano reator RI ensaio 2.....	98
FIGURA 30:	Gráfico da variação dos organoclorados reator RII ensaio 2.	98
FIGURA 31:	Gráfico da variação do metano reator RII ensaio 2.....	98
FIGURA 32:	Gráfico da variação dos organoclorados reator RIII ensaio2.....	99
FIGURA 33:	Gráfico da variação do metano reator RIII ensaio 2.....	99
FIGURA 34:	Gráfico da variação dos organoclorados reator RIV ensaio 2.....	99
FIGURA 35:	Gráfico da variação do metano reator RIV ensaio 2.....	99
FIGURA 36:	Gráfico da variação da produção pontual de metano ensaio 2.....	100
FIGURA 37:	Gráfico da variação da produção de metano corrigida com a pressão ensaio 2.....	100

FIGURA 38:	Gráfico da variação dos organoclorados reator CII+PCP ensaio 2.....	104
FIGURA 39:	Gráfico da variação do metano reator CII+PCP ensaio 2.....	104
FIGURA 40:	Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. analisadas sob microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).....	110
FIGURA 41:	Mesmo campo da figura 40 analisado sob microscopia de fluorescência (aumento 1.240x).....	110
FIGURA 42:	Células em formato de sarcinas (<i>Methanosarcina</i> sp.), cocos e bacilos não fluorescentes - microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).....	110
FIGURA 43:	Células em formato de cocos e bacilos não fluorescentes - microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).....	110
FIGURA 44:	Células em formato de sarcina relacionadas ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. - microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).....	111
FIGURA 45:	Células em formato de sarcinas e células filamentosas relacionados aos gêneros <i>Methanosarcina</i> sp. e <i>Methanothrix</i> sp., respectivamente - microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).....	111
FIGURA 46:	Células filamentosas relacionadas ao gênero <i>Methanothrix</i> sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 7.500x).	111
FIGURA 47:	Células filamentosas relacionadas ao gênero <i>Methanothrix</i> sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 5.000x).	111
FIGURA 48:	Células em formato de sarcina relacionadas ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 3.000x).....	112
FIGURA 49:	Células em formato de sarcina relacionadas ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 5.000x).....	112
FIGURA 50:	Células arranjadas em "clusters" passíveis de serem relacionadas ao gênero <i>Methanosphaera</i> sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 7250x).....	112

FIGURA 51:	Arranjo celular semelhante ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. observado nas FIGURAS 48 e 49.....	112
FIGURA 52:	Curva de calibração para o gás metano.....	121
FIGURA 53:	Curva de calibração para o PCP.....	121
FIGURA 54:	Curva de calibração para o TCP.....	122
FIGURA 55:	Curva de calibração para o DCP.....	122
FIGURA 56:	Cromatograma típico para análise dos compostos PCP, TCP e DCP.....	123

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Fontes antropogênicas de poluentes aromáticos.....	11
TABELA 2: Exemplos de isolados microbianos capazes de degradar clorofenóis.....	19
TABELA 3: Hidrocarbonetos aromáticos homocíclicos suscetíveis a transformação sob condições anaeróbias com culturas mistas ou consórcios microbianos.....	32
TABELA 4: Hidrocarbonetos aromáticos heterocíclicos suscetíveis a transformação sob condições anaeróbias com culturas mistas ou consórcios microbianos.....	33
TABELA 5: Energia da degradação aeróbia e anaeróbia do benzoato.....	50
TABELA 6: Energia da degradação anaeróbia de alguns compostos organoclorados.....	51
TABELA 7: Relação dos procedimentos de ensaios e análises e métodos analíticos empregados.....	54
TABELA 8: Composição do meio Zinder.....	65
TABELA 9: Composição da solução traço de metais - meio Zinder.....	66
TABELA 10: Composição da solução de vitaminas.....	67
TABELA 11: Reagentes e suas concentrações na soluções estoque e nos reatores.....	69
TABELA 12: Concentração das soluções estoque e volumes inoculados nos reatores - ensaio 1.....	71
TABELA 13: Concentração das soluções estoque e volumes inoculados nos reatores - ensaio 2.....	72
TABELA 14: Dados comparativos entre o presente trabalho, MIKESSELL e BOYD (1986); NICHOLSON et al. (1992) e WU et al. (1993).....	80
TABELA 15: Taxas de remoção do PCP - ensaio 1.....	88

TABELA 16:	Taxas de remoção do PCP - ensaio 2.....	102
TABELA 17:	Gêneros metanogênicos encontrados ao longo do ensaio 1...	108
TABELA 18:	Gêneros metanogênicos encontrados ao longo do ensaio 2...	108
TABELA 19:	Concentração (mg/L) dos compostos organoclorados nos frascos-reactores ensaio 1.....	125
TABELA 20:	Concentração (mg/L) dos compostos organoclorados nos frascos-reactores ensaio 2.....	126
TABELA 21:	Concentração de metano (moles/L) - ensaio 1. Dados pontuais.....	127
TABELA 22:	Concentração de metano (moles/L) - ensaio 2. Dados pontuais.....	129

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- Ø - diâmetro
- ® - marca registrada
- µg - micrograma
- ΔG° - variação da energia livre de Gibbs
- µL - microlitro
- µm - micrometro
- µM - micromol
- ATP - adenosina trifosfato
- CG - cromatografia gasosa
- CP - clorofenol
- DCP - diclorofenol
- E° - potencial de oxiredução
- HCB - hexaclorobenzeno
- HMDS - hexametildisilano
- HPLC - cromatografia líquida de alta resolução
- IDE - detector de captura de elétrons
- KJ - quilojoule
- KV - quilovolt
- L - litro
- M - molar
- M/V - solução feita em massa/volume
- mA - miliampère
- MCP - monoclорofenol
- mg - miligrama
- mL - mililitro
- mM - milimolar
- P_{atm} - pressão atmosférica
- PCB - pentaclorobenzeno
- PCP - pentaclorofenol

Plida - pressão lida no manômetro

psi - unidade de pressão

rpm - rotações por minuto

SSV - sólidos suspensos voláteis

TCE - tetracloroetileno

TeCP - tetraclorofenol

UASB - reator de fluxo ascendente e manta de lodo

UV - ultravioleta

x_{CH_4} - fração molar do metano

RESUMO

LARIZZATTI, S.F. (1997). Avaliação da degradação anaeróbia de pentaclorofenol por consórcios metanogênicos enriquecidos. São Carlos, 1997. 138p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Com o objetivo de enriquecer culturas de bactérias metanogênicas, verificar as morfologias predominantes e avaliar seu potencial de degradar pentaclorofenol (PCP), estudou-se um consórcio metanogênico que já havia sido inibido quando exposto a concentração de 10 mg/L de PCP. Foram realizados ensaios com 5mg PCP/g SSV utilizando-se reatores de 250 e 1.000 mL. Tais ensaios foram denominados ensaio 1 e 2, respectivamente. Ácidos acético, propiônico, butírico e o álcool metanol foram adicionados como fontes de carbono. Para verificação do potencial de biodegradação foram monitorados PCP, TCP, DCP e o gás CH₄. As taxas de remoção de PCP, no ensaio 1, variaram entre 75 e 97% e, no ensaio 2, entre 90 e 97%. Os consórcios metanogênicos produziram cerca de 0,07 moles/L e de 0,03 moles/L de CH₄, respectivamente. Os principais tipos bacterianos metanogênicos encontrados foram *Methanosarcina* sp., *Methanococcus* sp., *Methanotherix* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp. e, possivelmente, *Methanosphaera* sp.. Bactérias não-metanogênicas na forma de cocos, espirilos e bacilos também estavam presentes. Não houve predominância de tipos morfológicos, metanogênicos ou não, que pudessem ser relacionados como possíveis degradadores de PCP.

Palavras-chave: Biodegradação anaeróbia, organoclorados, pentaclorofenol (PCP), metano, bactérias metanogênicas.

ABSTRACT

LARIZZATTI, S.F. (1997). Evaluation of the Pentachlorophenol anaerobic degradation by enriched bacteria consortia. São Carlos, 1997. 138p. - M S Dissertation - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

This work reports on experiments aiming at the evaluation of the potential for pentachlorophenol degradation by methanogenic consortium. The inoculum used was previously inhibited to PCP at concentrations of 10 mg/L. The experiments were carried out using reactors with total volumes of 250 mL (experiment 1) and 1000 mL (experiment 2) and substrate containing 5mg PCP/g volatile suspended solids. Acetic, propionic and butiric acids besides methanol were added as carbon sources. The concentration of pentachlorophenol, trichlorophenol, dichlorophenol and methane gas were monitored in order to verify the potential of degradation. The PCP removal rates ranged from 75 and 97% in the experiment 1 and from 90 to 97% in the experiment 2. The methane concentrations 0.07 mol/L and 0.03 mol/L, respectively. *Methanosarcina* sp., *Methanococcus* sp., *Methanotherix* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp. were the main methanogenic bacteria observed in the reactor. Another genus, probably *Methanosphaera* sp., was also observed. Non-methanogenic bacteria as cocci, spirilla and rods were also observed. It was not observed none particular cell morphology that could be related with PCP degraders or co-metabolism activity, besides the fluorescent methanogenic sarcinas predominance.

Key-words: Anaerobic biodegradation, organochlorinated, pentachlorophenol (PCP), methane, methanogenic bacteria.

1. Introdução

A entrada de contaminantes na biosfera excede a taxa de destruição deste material, pois o processo evolutivo dos organismos adaptados a degradar compostos naturais não acompanhou os passos dos novos e diversos compostos químicos introduzidos no ambiente (LIU e SUFLITA, 1993). Os compostos estranhos à biota, ou seja, não naturais são denominados compostos xenobióticos.

Os compostos aromáticos formam o segundo maior grupo de compostos orgânicos presentes na biosfera depois dos carboidratos (FIELD et al., 1995). A persistência dos aromáticos antropogênicos no ambiente tem causado grande preocupação pública devido à sua toxicidade, mutagenicidade, e bioconcentração em organismos superiores (HUTZINGER e VEERKAMP* apud FIELD, 1995).

Os sistemas biológicos, ao contrário dos sistemas físicos, tendem a concentrar os produtos tóxicos persistentes encontrados no ambiente em que vivem por um processo conhecido por magnificação biológica. Assim, os peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, que são predadores finais nas cadeias alimentares, podem apresentar concentrações de tóxicos 10, 100, 1.000 ou mesmo milhões de vezes maiores do que aquela das águas em que vivem ou freqüentam (CETESB, 1984).

* HUTZINGER, O; VEERKAMP, W.(1981). Xenobiotic compounds with pollution potential. In: LEISINGER, T.; COOK, A. ; HUTTER, R.; NUESCH, J. (org.). Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds. London. Academic Press apud FIELD, J.A. ; STAMS, A.J.M.; KATO, M.; SCHRAA, G. (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Leeuwenhoek* 67:47-67.

Muitos hidrocarbonetos clorados são mutagênicos, sendo capazes de introduzir mutações que não apenas reduzem a vitalidade dos animais, por interferir com os hormônios sexuais, como também transmitem essa perda de vigor aos seus descendentes. São ainda responsáveis por alterações na consistência da casca dos ovos das aves, que fazem com que estes se quebrem com facilidade. Muitos produtos clorados persistentes foram banidos do comércio em países europeus, mas esta é apenas uma medida isolada, uma vez que tais produtos circulam por toda a biosfera, existindo mesmo na gordura dos ursos polares e pinguins da Antártida (CETESB, 1984).

Em estudos conduzidos pela Food and Drug Administration - FDA, nos Estados Unidos, foram detectados resíduos de DDT (pesticida organoclorado) em tecido adiposo humano e no leite materno. No Brasil, o Instituto Adolfo Lutz encontrou resíduos de diversos pesticidas organoclorados no leite consumido em São Paulo, no leite materno, na carne bovina, na água de poços e córregos de São Paulo, no arroz, feijão, farinha, hortaliças, óleos vegetais e ovos de granja (CETESB, 1984).

Na região de São José do Rio Preto - SP, o Instituto Adolfo Lutz encontrou até 1,07 mg/L de Dieldrin (pesticida organoclorado) no sangue de lavradores que trabalhavam na aplicação deste pesticida. Na Área de Proteção Ambiental de Corumbataí, que inclui a região de São Carlos - SP, foi constatada a utilização de diversos pesticidas organoclorados, entre eles os clorofenóis. A intoxicação por clorofenóis pode causar distúrbios digestivos, manifestações neurológicas e musculares, ataxia, torpor, coma e morte. (CETESB, 1984).

Além dos pesticidas, existem outras fontes de compostos organoclorados, como, por exemplo, a formação destes durante o processo de cloração da água

potável que possua substâncias húmicas (DETRICK* apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995), ou através da incineração de material orgânico na presença de cloro. Existem ainda as indústrias de papel e celulose que produzem cerca de 100 a 300g de compostos fenólicos clorados por tonelada de polpa branqueada (HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Em estudos realizados por AHLBORG e THUMBERG** apud HÄGGBLÖM e VALO (1995), estimou-se que, na década de 80, a produção mundial de clorofenóis estava acima de 200.000 toneladas/ano. Com relação ao pentaclorofenol (PCP), sua produção foi estimada, no ano de 1984, entre 35.000 e 40.000 toneladas (KORTE apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

O PCP é considerado um biocida de amplo espectro, sendo largamente utilizado na agricultura e na preservação de madeira (MIKESELL e BOYD, 1986). Foi durante décadas utilizado na formulação de agroquímicos, mas sua toxicidade e persistência no meio ambiente induziram a proibição de sua produção e utilização em muitos países. No Brasil, a utilização de PCP em produtos agrotóxicos foi proibida, de acordo com a Portaria nº 329 de 02/09/1985 do Ministério da Agricultura, e seu transporte, estocagem e uso foram declarados atividades potencialmente poluidoras pelo CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente - na Resolução nº 5 de 20/11/1985. Contudo, inúmeras áreas contaminadas pelo PCP ainda persistem.

* DETRICK, R.S. (1977). Pentachlorophenol, possible sources of human exposure. *Forests Products J* 27:13-16; ** AHLBORG, U.G.; THUMBERG, T.M. (1980). Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism and environmental impact. *CRC Crit Rev Toxicol* 7:1-35 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

Técnicas de disposição inadequadas e/ou lançamentos acidentais de resíduos contendo clorofenóis têm elevado suas concentrações no ambiente, havendo necessidade de implementação de procedimentos efetivos para a recuperação das áreas degradadas, bem como para o tratamento de efluentes contendo estes compostos.

A degradação microbiana é uma alternativa para a transformação de compostos tóxicos xenobióticos (HOLLIGER et al., 1988). Os resultados da ação microbiana devem possibilitar modificações estruturais de um determinado composto promovendo a redução ou eliminação da toxicidade ou, ainda, proporcionar sua total mineralização (LIU e SUFLITA, 1993; BOWER e ZEHNDER, 1993). A vantagem no uso de microorganismos para degradar os poluentes aromáticos está no baixo custo e alta eficiência dos sistemas biológicos de tratamento. Além disso, processos biológicos como os anaeróbios podem ainda produzir energia - o gás metano.

Tratando especificamente da biodegradação anaeróbia do PCP, a bibliografia disponível até o presente momento é escassa no que se refere à fisiologia, rotas bioquímicas e ecologia dos tipos microbianos envolvidos.

As espécies bacterianas capazes de degradar compostos químicos na ausência de oxigênio encontram-se em diversos habitats, tais como solo, sedimentos aquáticos, lodo de esgotos, fezes de animais, trato digestivo de ruminantes e em biodigestores. As atividades metabólicas anaeróbias consistem basicamente da respiração anaeróbia e da fermentação (LIU e SUFLITA, 1993).

Nos últimos anos, foi verificada a boa eficiência dos processos anaeróbios no tratamento de compostos organoclorados e, como consequência, tornou-se uma alternativa para a remoção dos químicos chamados recalcitrantes, como substâncias

sintéticas ou naturais de estrutura complexa. Particularmente, no Brasil, os processos biológicos anaeróbios metanogênicos de tratamento de resíduos têm grande importância tanto para a estabilização da matéria orgânica poluente de origem doméstica, como a de origem industrial (CAMPOS, 1994), cujos os rejeitos podem conter diferentes compostos recalcitrantes.

O conceito de recalcitrância (persistência) é relativo, pois depende das condições em que o composto se encontra. A persistência de uma molécula pode ser em virtude de sua estrutura química, ou fatores ambientais. Os fatores ambientais compreendem condições físicas (temperatura, acesso ao composto, etc.), condições químicas (pH, potencial redox, concentração do composto, presença de substratos adicionais, efeitos sinérgicos ou antagônicos com outras moléculas, etc.) e condições biológicas (presença de certos organismos ou combinação de organismos e informação genética e tempo para adaptação) (HOLLIGER et al., 1988). Muitos compostos são recalcitrantes em condições aeróbias, mas podem ser degradados mais rapidamente em condições anaeróbias.

Dentre as substâncias ditas recalcitrantes, os compostos aromáticos halogenados são de grande importância e já foi demonstrado que muitos podem ser metabolizados via desalogenação redutiva.

Os microorganismos exibem, coletivamente, habilidade para degradar uma ampla faixa de compostos químicos empregando sistemas enzimáticos comuns ao catabolismo da matéria orgânica natural.

Apesar da importância das culturas puras na digestão anaeróbia de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, naturais ou sintéticos, o grande potencial do metabolismo anaeróbio está nas interações microbianas existentes em culturas mistas.

A formação de consórcios bacterianos promove uma seqüência de reações catabólicas na quebra de um composto orgânico, através da interação entre as espécies bacterianas. Como resultado, muitas vezes, ocorre a mineralização completa do composto. Contudo, podem ocorrer diversos tipos de interações ecológicas, positivas ou negativas, que irão influenciar diretamente na efetividade do sistema. Mais recentemente, a biodegradação anaeróbia de compostos tóxicos tem sido constatada pela ação de culturas puras anaeróbias. Além da capacidade natural dos microrganismos em degradar compostos tóxicos, a manipulação genética é outro aspecto a ser considerado, pois pode alterar o metabolismo bacteriano e criar novas habilidades degradativas. Porém, esse processo pode ser muito dispendioso e demandar um tempo excessivamente longo (HOLLIGER et al., 1988; BOLAÑOS ROJAS, 1997; DAMIANOVIC, 1997).

Assim, o presente trabalho procurou estudar a degradação do PCP através do enriquecimento de culturas anaeróbias, sob condições metanogênicas.

2. Objetivos

Enriquecer, em meio de cultivo contendo PCP, culturas de bactérias anaeróbias metanogênicas e não metanogênicas oriundas de um biodigestor anaeróbio de mistura completa operado com PCP em escala de laboratório.

Avaliar o potencial de degradação do PCP das culturas enriquecidas, através da análise de remoção do composto no meio cultivado e de formação de produtos, como o gás metano.

Verificar as morfologias bacterianas predominantes nas culturas enriquecidas e caracterizar aquelas relacionadas às arqueobactérias metanogênicas.

3. Revisão da literatura

3.1 Importância dos compostos orgânicos halogenados

Desde 1896, quando DRECHSEL detectou pela primeira vez o composto halogenado 3-5 Diiodotirosina como produto biossintético de algas, mais de 700 produtos halogenados naturais foram descobertos. Milhares de compostos orgânicos halogenados, naturais ou industriais, estão listados no “Chemical Abstracts Registry” (HUNTZER e VERRKAMP* apud WACKETT, 1995). Existe também uma vasta literatura descrevendo produtos halogenados naturais (NEIDLEMAN e GEIGERT** apud WACKETT, 1995).

A produção antropogênica de compostos halogenados não representa a única fonte destes compostos para o ambiente. Cloro, bromo, iodo de origem biológica estão largamente distribuídos na biosfera, particularmente em ambientes marinhos. Existem centenas de compostos organohalogenados isolados de fontes naturais, incluindo compostos homocíclicos e heterocíclicos. Devido a esta diversidade de compostos orgânicos naturais, não é surpresa as bactérias serem capazes de degradar

* HUTZINGER, O.; VEERKAMP, W.(1981). Xenobiotic compounds with pollution potential. In: LEISINGER, T.; COOK, A. ; HUTTER, R.; NUESCH, J. (org.). Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds. London. Academic Press; ** NEIDLEMAN, S.L.; GEIGERT, J. (1986). Biohalogenation: Principles, basic roles and applications. Chichester. England. Ellis Horwood Ltd. Apud WACKETT, L.P. (1995). Bacterial co-metabolism of halogenated organic compounds. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 5, p. 215-241

compostos orgânicos halogenados (SUFLITA e TOWNSEND, 1995). Como exemplo de composto orgânico halogenado natural, pode-se citar o 2,6 DCP que é um ferormônio sexual de carrapatos (BERGER* ; MACDOWELL e WALADDE** apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Os halogênios ocupam a penúltima coluna no lado direito da Tabela Periódica. A este grupo pertencem os elementos flúor, cloro, bromo, iodo, e astato. A FIGURA 1 ilustra o átomo de carbono do grupo 14 e o grupo 17 da Tabela Periódica dos Elementos Químicos.

GRUPO 14	GRUPO 17
77 6 C 12,011 Carbono	64 9 F 18,998 Fluor
	99 17 Cl 35,45 Cloro
	114 35 Br 79,904 Bromo
	133 53 I 126,905 Iodo
	85 At 210 Astato
	HALOGÊNIOS

FIGURA .1: Carbono e os elementos do grupo 17 da Tabela Periódica. Os números do lado esquerdo superior, lado direito superior e inferiores ao centro indicam, respectivamente, os raios atômicos, os números atômicos e a massa atômica relativa ($^{12}\text{C}=12.000$).

Fonte: adaptado de WACKETT, 1995.

* BERGER, R.S. (1972). 2,6-diclorophenol, sex pheromone of the lone star tick. *Science* 177:704-705; ** MACDOWELL, P.G.; WALADDE, S.M. (1986). 2,6-diclorophenol in the tick *Rhicephalus appendicalatus* Neumann. A . reappraisal. *J. Chem Ecol* 12:69-81 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

↓
REACT. DOS HALOGENIOS

Os halogênios são extremamente eletronegativos e, freqüentemente, existem como ânions em solução aquosa. Todos os halogênios formam ligações estáveis com o átomo de carbono. A força de ligação diminui com o aumento do peso molecular na seguinte ordem: C-F > C-Cl > C-Br > C-I. A ligação C-F é a mais forte necessitando de cerca de 106 a 115 Kcal/mol como energia de dissociação, enquanto que a ligação mais fraca C-I necessita de aproximadamente 70 Kcal/mol, e pode sofrer fotólise (REINEKE, 1984). A reatividade da ligação carbono-halogênio é fortemente influenciada pelo tipo de ligação entre os átomos de carbono presentes na ligação. Por exemplo, a remoção do íon fluoreto de um perfluoralcano é difícil de ocorrer. No entanto, na substituição aromática nucleofílica, os aril fluoretos são mais reativos que os aril cloretos, brometos e iodetos (MARCH* apud WACKETT, 1995).

Dentre os compostos orgânicos halogenados, os compostos aromáticos sintéticos são de grande importância devido a sua larga utilização como biocidas, desinfetantes, solventes, fluidos hidráulicos, desengraxantes, materiais anti-chama e na fabricação de borrachas, plásticos, corantes, lubrificantes, materiais elétricos e eletrônicos (GERHARTZ** apud SUFLITA e TOWNSEND, 1995).

A técnica de formulação de clorofenóis produz diversas impurezas como fenoxifenóis policlorados, diazo-p-dioxinas e dibenzenofuranos, que muitas vezes são mais tóxicos que os clorofenóis. Devido a impurezas, toxicidade e persistência dos

*MARCH, J. (1985). Advanced organic chemistry: Reactions, mechanisms and structure. New York. John Wiley e Sons apud WACKETT, L.P. (1995). Bacterial co-metabolism of halogenated organic compounds. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 5, p. 215-241.

** GERHARTZ, W. (1986). Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. New York.. Weinheim, vol. A6, p. 233-398 apud SUFLITA, J.M.; TOWNSEND, G.T. (1995). The microbial ecology and physiology and aryl dehalogenation reactions and implications for bioremediation. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 5, p. 243-268.

clorofenóis no ambiente, seu uso foi recentemente proibido em diversos países, como Suécia, Finlândia, Alemanha e Japão (AHLBORG e THUMBERG* ; HUMPPI et al** ; KITUNEN***; NILSSON et al**** apud HÄGGBLUM e VALO, 1995).

Além dos clorofenóis utilizados como biocidas, outras fontes antropogênicas de compostos aromáticos podem ser identificadas, como ilustrado na Tabela 1.

TABELA 1: Fontes antropogênicas de poluentes aromáticos

COMPOSTOS AROMÁTICOS	FONTES INDUSTRIAIS
BTEX*	Combustíveis fósseis, solventes
Estireno	Plásticos
PAH**	Combustíveis fósseis, preservação de madeira
Alquilfenóis	Surfactantes, detergentes
Sulfoaromáticos	Surfactantes, detergentes, despulpamento com sulfitos, corantes
Aminoaromáticos	Pesticidas, corantes, pigmentos, fármacos
Azoaromáticos	Corantes
Nitroaromáticos	Explosivos, fármacos, pesticidas, corantes
Clorofenóis e dioxinas	Preservação de madeira, pesticidas, efluentes de branqueamento de polpa
Hidrocarbonetos cloroaromáticos e PCB***	Pesticidas, solventes, fluidos hidráulicos e dielétricos

BTEX* = benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno; PAH**= hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; PCB*** = bifenilas policloradas.

Fonte: adaptado de FIELD et al., 1995.

Uma grande variedade de compostos orgânicos é produzida durante o processo de branqueamento de papel. Este processo gera aproximadamente 100 a

*AHLBORG, U.G.; THUMBERG, T.M. (1980). Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism and environmental impact. *CRC Crit Ver Toxicol* 7:1-35; ** HUMPPI, T. et al. (1984). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of chlorinated phenoxyphenols in the technical chlorophenol formulation Ky-5. *J. Chromatogr* 291:135-144; *** KITUNEN, V. H. N. (1990). The use and formation of CPs, PCPPs and PCDDs/PCDFs in mechanical and chemical wood processing industries. Ph. D. Thesis. University of Helsinki; **** NILSSON, C.A. et al. (1978). Impurities in commercial products related to pentachlorophenol. In Rao KR (ed.). *Pentachlorophenol: Chemistry, pharmacology and environmental Toxicology*. New York. Plenum Press, p. 313-324 apud HÄGGBLUM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

300g de compostos fenólicos clorados por tonelada de polpa. Porém, a quantidade de compostos gerados no branqueamento de papel consiste em uma pequena porcentagem do total de compostos orgânicos clorados lançados no ambiente (JOKELA e SALKINOJA-SOLANEN^{*} ; SALKINOJA-SOLANEN et al.^{**} apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Os clorofenóis são também formados durante a cloração de água potável que possua substâncias húmicas (DETRICK^{***} apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995), e durante a combustão de material orgânico na presença de cloro, como na incineração de resíduos sólidos ou queima de madeira fresca (AHLING e LINDSKOG^{****}; PAASIVIRTA et al.^{*****} apud HÄGGBLÖM e VALO, 1996).

A produção anual mundial de clorofenóis está acima de 200.000 toneladas e aproximadamente 80% desta produção é utilizada na preservação de madeiras (AHLBORG e THUNBERG^{*****} apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995). Já, a produção mundial anual de PCP em 1984 foi estimada entre 35.000 e 40.000

^{*} JOKELA, J.K.; SALKINOJA-SALONEN, M. (1992). Molecular weight distributions of organic halogens in bleached kraft pulp mill effluents. *Environ Sci Technol* 26:1190-1197; ^{**} SALKINOJA-SALONEN, M. et al. (1981). Analysis of toxicity and biodegradability of organochlorine compounds released into the environment in bleaching effluents of kraft pulping. In Keith LH(ed). *Advances in the identification and analysis of organic pollutants in water*. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science, vol 2, p. 1131-1164; ^{***} DETRICK, R.S. (1977). Pentachlorophenol, possible sources of human exposure. *Forests Products J* 27:13-16 ; ^{****} AHLING, B.; LINDSKOG, A. (1982). Emission of chlorinated organic substances from combustion. In Hutzinger O, Frei RW, Merian E, Pocchiari F (eds): *Chlorinated dioxins and related compounds*. Oxford, Pergamon Press, p. 215-225; ^{*****} PAASIVIRTA, J. et al. (1990). Organic chlorine compounds in lake sediments.III. Chlorohydrocarbons, free and chemically bound chlorophenols. *Chemosphere* 21:1355-1379; ^{*****} AHLBORG, U.G.; THUNBERG, T.M. (1980). Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism and environmental impact. *CRC Crit Rev Toxicol* 7:1-35 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

toneladas (KORTE* apud HÄGGBLOM e VALO, 1995). Esta estimativa não levou em conta os países do leste europeu.

Os clorofenóis são muito versáteis devido à sua solubilidade em solventes orgânicos e como sais de sódio (HÄGGBLOM e VALO, 1995). Segundo o "THE MERK INDEX" (1996), o *o*-clorofenol e o *m*-clorofenol são pouco solúveis em água, mas livremente solúveis em álcool, éter, e soluções alcalinas. Já o *p*-clorofenol, é levemente solúvel em água e em um líquido derivado de petróleo e livremente solúvel em álcool, éter, clorofórmio, glicerina e óleos voláteis. Os fenóis clorados, principalmente o pentaclorofenol (PCP) e o tetraclorofenol (TeCP), são utilizados como biocidas na indústria e agricultura desde a década de 20 (HÄGGBLOM e VALO, 1995). O pentaclorofenol (PCP), especificamente, é largamente utilizado como preservante de madeira, herbicida e moluscocida (MIKESSELL e BOYD, 1986).

O PCP já foi encontrado em camadas sedimentares datadas com mais de 50 anos, antes da produção industrial e, provavelmente, originado da queima de florestas.(BERGER** ; MCDOWELL e WALADDE*** apud HÄGGBLOM e VALO, 1995).

Um método para preservação de madeiras comumente utilizado em muitos países europeus é a submersão das tábuas em solução de clorofenolato sódico de 1 a 2 %. Outra técnica é a aspersão de PCP de 3 a 6 % solubilizado em óleo de petróleo.

* KORTE, F. (1987). Lehrbuch der ökologischen chemie. 2nd. ed. Stuttgart. George Thieme Verlag;
 ** BERGER, R.S. (1972). 2,6-dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. Science 177:704-705;
 *** MACDOWELL, P.G.; WALADDE, S.M. (1986). 2,6-dichlorophenol in the tick *Rhicephalus appendicalatus* Neumann. A . reappraisal. J. Chem Ecol 12:69-81 apud HÄGGBLOM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

O uso contínuo desse clorofenol na preservação de madeira, por várias décadas, tem causado sérias contaminações locais durante operações normais da indústria ou quando ocorrem derramamentos acidentais. Estudos têm demonstrado que várias áreas utilizadas para este processo possuem diversas gramas de clorofenóis (ou PCP) por quilo de solo (KITUNEN et al.^{*}; VALO et al.^{**}. apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995). A exemplo disso, na Califórnia, foi encontrado PCP em um aquífero distante mais de 500 metros de um local de tratamento de madeira. Em águas subterrâneas ácidas, a solubilidade e mobilidade do PCP são mais limitadas (GOERLITZ et al.^{***} apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995). Além do pH e da solubilidade, também a matéria orgânica contida no solo influencia a migração de clorofenóis no solo e em águas subterrâneas devido à provável formação de compostos complexados (KITUNEN et al.^{*} apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Uma contaminação em larga escala foi detectada na Finlândia em 1987 numa serraria em que clorofenóis foram utilizados por várias décadas. O volume de água contaminada foi estimado em 100.000 m³ com concentrações de clorofenóis de até 200 mg/L. Em 1987, a água de abastecimento continha entre 70 e 140 µg/L de clorofenóis. Cinco anos após a descoberta da contaminação, a concentração de

^{*} KITUNEN, V. H. N. (1990). The use and formation of CPs, PCPPs and PCDDs/PCDFs in mechanical and chemical wood processing industries. Ph. D. Thesis. University of Helsinki; ^{**} VALO, R. (1990). Occurrence and metabolism of chlorophenolic wood preservative in the environment. Ph Thesis. Helsinki, Finland: University of Helsinki, Department of General Microbiology; ^{***} GOERLITZ, D.F. (1992). A review of studies of contaminated groundwater conducted by U.S. Geological Survey Organics Project, Menlo Park, California, 1961-1990. In Lesage S, Jackson RE (eds): Groundwater contamination and analysis at hazardous waste sites. New York. Marcel Dekker, p. 295-355 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

clorofenóis no aquífero mantinha-se entre 30 e 50 µg/L (LAMPI et al.* apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

3.2 Degradação microbiana

3.2.1 Metabolismo microbiano para a degradação de compostos orgânicos halogenados

A diversidade de estruturas e a química dos compostos organohalogenados podem tornar difícil a degradação microbiana.

Uma questão importante no estudo da biodegradação de compostos xenobióticos é a de determinar se os microrganismos são capazes de degradar estes compostos ou adaptam-se a isto.

Segundo MARGULIS** apud MEER et al. (1994), os microrganismos geralmente utilizam pequenas moléculas como açúcares, aminoácidos ou ácidos carboxílicos para a produção de energia embora, provavelmente, possuam diversas vias metabólicas capazes de degradar outros compostos que contenham carbono.

Estudos têm mostrado que comunidades microbianas podem ser capazes de degradar poluentes após um longo período de contato com os mesmos, sugerindo adaptação. Culturas puras também podem crescer em laboratório e o surgimento de novas capacidades metabólicas parece ser possível (MEER et al., 1994).

* LAMPI, P. et al. (1992). Cancer incidence following chlorophenol exposure in a community in southern Finland. *Arch Environ Health* 47:167-175 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

** MARGULIS, L. (1993). *Symbiosis in cell evolution*. Freeman Co., New York apud MEER, J.R.; LEVEAU, J.; WERLEN, C. (1994). Genetic adaptation of microorganisms to environmental pollutants. *Eawag News*, 35 E, p. 8-15.

Existem algumas razões pelas quais os microrganismos não seriam capazes de utilizar certos hidrocarbonetos como alimento. Primeiramente, essas moléculas têm que entrar na célula e isto nem sempre é possível pelo processo de difusão, seja ela passiva ou ativa. Além disso, determinadas moléculas necessitam ser quebradas antes de entrar na célula. Quando o composto entra na célula, tem que ser reconhecido como fonte de alimento, o que a célula faz através de proteínas reguladoras que interagem com o composto e estimulam a expressão dos genes responsáveis pela produção das enzimas que o degradarão. Caso isto não aconteça, o composto não é utilizável como alimento. Outra possibilidade dos hidrocarbonetos não serem utilizados é a sua digestão incompleta (MEER et al., 1994).

Resumindo, a adaptação dos organismos em degradar um determinado composto pode ocorrer de duas maneiras: 1) o composto é reconhecido como alimento e os genes necessários somente necessitam ser ativados - adaptação bioquímica; e 2) o composto não é reconhecido e mudanças na informação genética são necessárias para alterar as enzimas ao novo substrato - adaptação genética.

A FIGURA 2 mostra esquemas de reações genéricas que representam o co-metabolismo de organohalogenados mediado pelas atividades microbianas. Os mecanismos de clivagem das ligações carbono-halogênio catalisados por bactérias podem ser explicados, resumidamente, como a seguir : (A) oxigenação, normalmente o oxigênio possui baixa reatividade e apenas após a introdução de elétrons torna-se altamente reativo com substratos orgânicos. As enzimas oxigenases são as responsáveis pela inserção dos átomos de oxigênio no substrato orgânico, atuando na ligação e ativação do oxigênio com o substrato; (B) redução, é uma hidrogenação da molécula, que se processa em dois passos pela atividade de hidrogenases, ligação do

hidrogênio com o substrato e transferência de elétrons, assim na hidrogenólise e na desalogenação vicinal é necessária a entrada de elétrons; (C) substituição, é uma reação em que um átomo substitui um outro na molécula. No caso da substituição hidrolítica em moléculas orgânicas a reação consiste na substituição do íon haleto por uma hidroxila e (D) eliminação, consiste na remoção do haleto juntamente com um dos átomos de hidrogênio ligado ao átomo de carbono adjacente àquele em que se encontra ligado o haleto (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991; MORRISON e BOYD, 1992; WACKET, 1995).

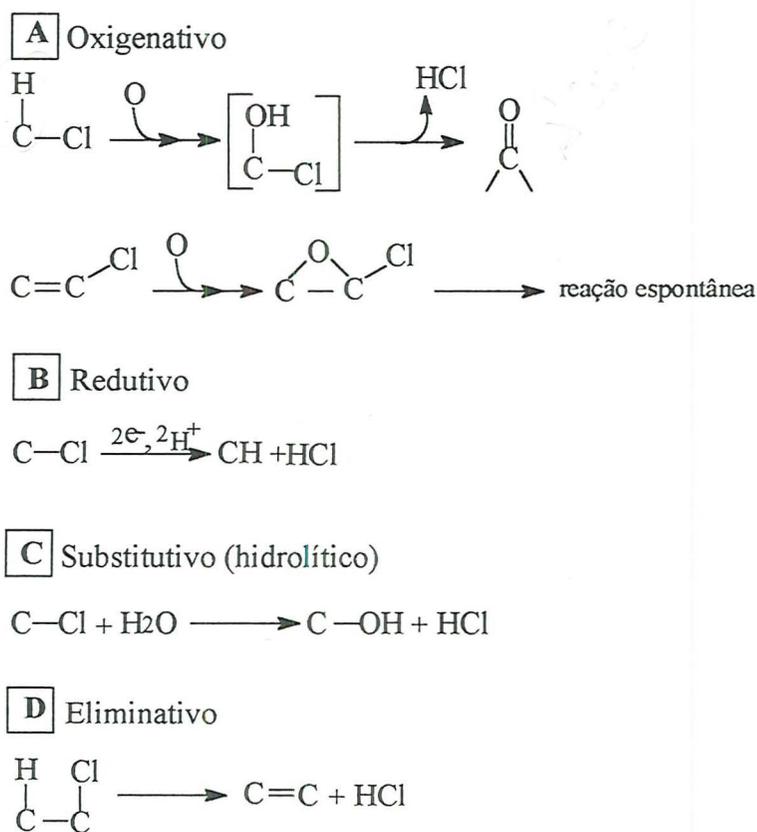


FIGURA 2: Mecanismos genéricos de desalogenação catalisados por bactérias
Fonte: adaptado de WACKETT, 1995.

Para um halogênio orgânico entrar no metabolismo intermediário, todos os halogênios têm que ser removidos e os esqueletos de carbono têm que ser transformados até um intermediário comum que, geralmente, é um ácido carboxílico.

Tal remoção pode dar-se através de um dos mecanismos citados na FIGURA 2. Além disso, a rota metabólica não pode gerar grupos químicos altamente reativos. Estas restrições limitam a assimilação de organoclorados pelas bactérias. Adicionalmente, deve-se considerar o tempo necessário para que os organismos desenvolvam a série de enzimas necessárias à construção de uma nova via metabólica para a degradação de compostos altamente clorados.

Apesar destas limitações, segundo WACKETT (1995), as bactérias têm êxito na transformação de compostos orgânicos halogenados através de três vias metabólicas, a saber:

- 1) metabolismo das vias bioquímicas centrais;
- 2) utilização de carbonos halogenados como acceptor final de elétrons para geração de ATP, via transporte de elétrons; e,
- 3) cometabolismo

Muitas bactérias aeróbias e fungos capazes de degradar clorofenóis já foram isolados, como ilustrado na TABELA 2. Bactérias anaeróbias que degradam redutivamente clorofenóis estão relacionados nesta tabela, que também indica os mecanismos de degradação dos hidrocarbonetos clorados pelas diferentes cepas.

TABELA 2: Exemplos de isolados microbianos capazes de degradar clorofenóis.

Microorganismo	Substratos ^a	Mecanismo ^b	Referências
BACTÉRIAS			
<i>Pseudomonas</i> sp. linhagem B13	CPs	A	Knackmuss e Hellwig (1978)
<i>Pseudomonas</i> sp. linhagem JS6	2,5-DCP	A	Spain e Gibson (1988)
<i>Rhodococcus</i> sp. linhagem An117 e An213	3-CP, 4-CP	A	Inh et al. (1989)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	4-CP, 2,4-DCP	A	Gorlatov et al. (1989)
<i>Azotobacter chroococcum</i> linhagem MSB1	4-CP	A	Balajee e Mahadevan (1990)
<i>Arthrobacter</i> sp.	4-CP	-	Kramer e Kory (1992)
<i>Alcaligenes</i> sp. Linhagem A7-2	4-CP	A	Schiwien e Schmidt (1982)
<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134	2,4-DCP (2,4-D)	A	Don et al. (1985), Pemberton et al. (1979), Pflug e Burton (1988)
<i>Pseudomonas</i> sp. Linhagem NCIB 9340	2,4-DCP (2,4-D)	A	Evans et al. (1971)
<i>Pseudomonas cepacia</i> BR16001	2,4-DCP (2,4-D)	A	Greer et al. (1990)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	2,4-DCP (2,4-D)	A	Radjendirane et al. (1991)

TABELA 2 (continuação): Exemplos de isolados microbianos capazes de degradar clorofenóis.

<i>Acinetobacter</i> sp.	2,4-DCP (2,4-D)	A	Beadle e Smith (1982)
<i>Xanthobacter</i> sp. Linhagem CP	2,4-DCP (2,4-D)	A	Ditzelmüller et al. (1989)
<i>Flavobacterium</i> sp. Linhagem 50001	2,4-DCP (2,4-D)	A	Chaudry e Huang (1988)
<i>Arthrobacter</i> sp.	2,4-DCP (2,4-D)	A	Bollag et al. (1986)
<i>Flavobacterium</i> sp. Linhagem MH	2,4-DCP (2,4-DP)	A	Horvath et al. (1990)
<i>Pseudomonas cepacia</i> linhagem AC1100	2,4,5-TCP (2,4,5-T), PCP	H	Karns et al. (1983), Sangodkar et al. (1988)
<i>Nocardioides simplex</i> linhagem 3E	2,4,5-TCP (2,4,5-T)	-	Golovleva et al. (1990)
<i>Pseudomonas pickettii</i>	2,4,6-TCP	H	Kiyohara et al. (1992)
<i>Azotobacter</i> sp. Linhagem GP1	2,4,6-TCP	H	Li et al. (1991)
<i>Streptomyces rochei</i> 303	2,4,6-TCP, TeCPs, PCP	H	Golovleva et al (1992)
<i>Mycobacterium (Rhodococcus) chlorophenolicum</i> linhagem PCP-1	PCP, TeCPs, TCPs	H, R	Apajalahti et al. (1986), Apajalahti e Salkinoja-Salonen (1987)
<i>Mycobacterium (Rhodococcus) chlorophenolicum</i> linhagem CP-2	PCP, TeCPs, TCPs	H, R	Hägglom et al. (1988, 1989)

TABELA 2 (continuação): Exemplos de isolados microbianos capazes de degradar clorofenóis.

<i>Mycobacterium (Rhodococcus) chlorophenolicum</i> linhagem CG-1	PCP, TeCPs, TCPs	H	Hägglom et al. (1988)
<i>Mycobacterium fortuitum</i> linhagem CG-2	PCP, TeCPs, TCPs	H, R	Hägglom et al. (1988), Nohynek et al. (1993), Uotila et al. (1992)
<i>Arthrobacter</i> sp. Linhagem ATCC 33790	PCP	H	Edgehill e Finn (1982), Schenk et al. (1989)
<i>Arthrobacter</i> sp. Linhagem NC	PCP	-	Stanlake e Finn (1982)
<i>Arthrobacter</i> sp. Linhagem KC-3	PCP, 2,3,4,6-TeCP, 2,4,6-TCP	H, R	Chu e Kirsh (1972, 1973), Reiner et al. (1978)
<i>Flavobacterium</i> sp. Linhagem 39723	PCP, TeCPs, TCPs	H, R	Saber e Crawford (1985), Steirt e Crawford (1986)
<i>Pseudomonas</i> sp.	PCP	-	Watanabe (1973)
<i>Pseudomonas</i> sp.	PCP	-	Suzuki (1977)
<i>Pseudomonas</i> spp.	PCP	-	Trevors (1982)
<i>Pseudomonas</i> sp. Linhagem RA2	PCP	-	Radehaus e Schmidt (1992)
<i>Pseudomonas</i> sp. Linhagem SR3	PCP	-	Middaugh et al. (1993)

TABELA 2 (continuação): Exemplos de isolados microbianos capazes de degradar clorofenóis.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PCP	-	Premalatha e Rajakumar (1994)
<i>Pseudomonas saccharophila</i> linhagem KF1, NKF1	2,4,6-TCP, 2,3,4,6-TeCP	-	Puhakka et al. (1994)
<i>Clostridium</i> sp.	PCP, TCPs, DCPs, CPs	R	Madsen e Licht (1992)
<i>Desulfomonile tiedjei</i> linhagem DCB-1	PCP, DCPs, TeCPs	R	Mohn e Kennedy (1992)
<i>Desulfomonile tiedjei</i> linhagem DCB-2	2,4,6-TCP, DCPs	R	Madsen e Licht (1992)
<i>Desulfitumbacterium dehalogens</i> linhagem JW/IU-DC1	2,4-DCP	R	Utkin et al. (1994)
<i>Desulfitumbacterium dehalogens</i> linhagem 2 CP-1	2-CP	R	Cole et al. (1994)
FUNGOS			
<i>Candida tropicalis</i>	3-CP, 4-CP	A	Ivoilov et al. (1983)
<i>Candida maltosa</i>	3-CP, 4-CP	A	Polisch et al. (1992)
<i>Penicillium frequentans</i> Bi 7/2	4-CP, CPs	A	Hofrichter et al. (1993, 1994)
<i>Phanaerochaete cryssosporium</i>	PCP, 2,4,5-TCP, 2,4-DCP	O	Joshi e Gold (1993), Mileski et al. (1988), Vallie Gold (1991)

TABELA 2 (continuação): Exemplos de isolados microbianos capazes de degradar clorofenóis.

<i>Phanaerochaete sordida</i>	PCP	-	Lamar et al. (1990)
<i>Mycena avenacea</i>	PCP	O	Kremer et al. (1992)
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	2,4,5-TCP, 2,4,6-TCP	-	Seeholzer-Nguyen e Hock (1991)

^a: 2,4-DP, "2-(2,4dichlorophenoxy) acid propionic"; PCP, pentaclorofenol; TeCP, tetraclorofenol; TCP, triclorofenol; DCP, diclorofenol; CP, monoclorofenol; 2,4-D, "2,4-dichlorophenoxyacetic acid"; 2,4,5-T, "2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid".

^b: A, hidroxilação até clorocatecol com desalogenação após a clivagem do anel; H, hidroxilação até clorohidroquinonas, hidroxilação e descloração; R, descloração redutiva; O, oxidação até clorobenzenoquinona, seguida de uma redução e metilação da quinona; - não reportado.

Fonte: modificado de HÄGGBLOM e VALO, 1995 e MADSEN e LICHT, 1992.

As bactérias aeróbias degradadoras de clorofenóis podem ser divididas em dois grupos distintos, de acordo com sua especificidade pelo substrato e ao mecanismo de degradação do clorofenol, a saber: (1) linhagens capazes de degradar PCP, TeCP e TCP; e, (2) linhagens capazes de degradar DCP e MCP. Os fenóis policlorados são em geral degradados por uma descloração inicial via hidroxilação e desclorações redutivas com a clivagem do anel ocorrendo somente depois de todos os cloros terem sido removidos (ver FIGURA 2). Os intermediários centrais típicos da degradação aeróbia dos penta, tetra e triclorofenóis são as *p*-hidroquinonas. Por outro lado, mono e diclorofenóis são degradados via catecóis clorados, com descloração após a clivagem do anel.

Sob condições aeróbias, os microrganismos removem inicialmente o cloro do anel aromático através da ação de oxigenases e, posteriormente, ocorre a fissão do anel. Os intermediários da quebra são metabolizados a compostos como o acetato de maleila e, finalmente, a dióxido de carbono via outras reações do metabolismo intermediário aeróbio. A transformação do 3-clorobenzoato sob condições anaeróbias envolve consórcios bacterianos capazes de desalogenar a molécula aromática a metano e dióxido de carbono, via redução do anel. A bactéria *Desulfomonile tiedjei*, que é capaz de conservar energia a partir da desalogenação redutiva do 3-clorobenzoato, é um exemplo de microrganismo isolado de um consórcio bacteriano anaeróbio responsável pela quebra da molécula aromática (MOHN TIEDJE, 1992; FIELD et al., 1995). As vias metabólicas envolvendo a degradação do 3-clorobenzoato sob condições aeróbia e anaeróbias estão representadas na FIGURA 3.

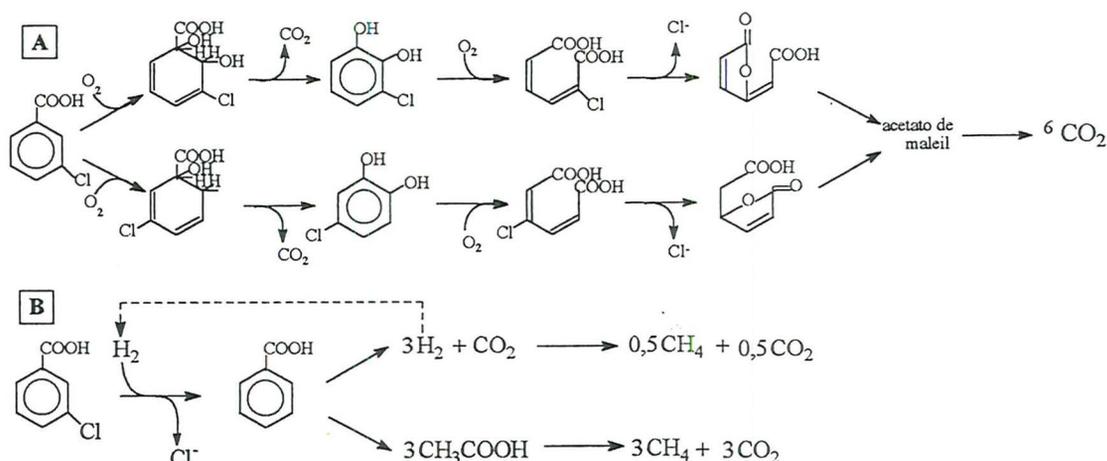


FIGURA 3: Vias metabólicas envolvendo a degradação do 3-clorobenzoato, sob condições aeróbias (A) e metanogênicas (B).

Fonte: (MOHN e TIEDJE, 1992; ROCHKIND-DUBINSKY et al.* apud FIELD et al., 1995).

3.2.1.1 - Metabolismo e microrganismos envolvidos na degradação aeróbia microbiana dos clorofenóis .

As capacidades biodegradativas aeróbias ou anaeróbias podem ser selecionadas dependendo da presença ou ausência do oxigênio molecular. Na biosfera, o oxigênio molecular excede cerca de 40.000 vezes a quantidade de carbono orgânico, indicando que a degradação da maior parte da matéria orgânica ocorre em ambientes aeróbios (SCHINK** apud FIELD et al., 1995). Entretanto, se a poluição orgânica ocorre em ambientes saturados, é provável que a degradação anaeróbia predomine devido a baixa solubilidade e lento transporte do oxigênio na água. Estas capacidades biodegradativas podem ser desenvolvidas selecionando, cuidadosamente,

*ROCHKIND-DUBINSKY, M.L.; SAYLER, G.S.; BLACKBURN, J.W. (1987). Microbiological decomposition of chlorinated aromatic compounds. Microbiology series, vol 18. Marcel Dekker, New York; ** SCHINK, B. (1988). Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. In Zehnder, A.J.B (ed), Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley e sons, New York, p. 771-846 apud FIELD, J.A.; STAMS, A.J.M.; KATO, M.; SCHRAA, G. (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. Antonie Leeuwenhoek 67:47-67.

a combinação correta de doadores e aceptores de elétrons e, no caso do cometabolismo, o substrato primário (FIELD et al., 1995).

Os microrganismos requerem oxigênio para duas funções: - comoceptor final de elétrons liberados durante a oxidação de substratos orgânicos com geração de energia; - como um substrato para uma reação bioquímica, em que é incorporado num produto orgânico a ser posteriormente utilizado. A importância metabólica do oxigênio é devida, basicamente, ao seu alto potencial de oxi-redução ($E^0 = + 0,86 \text{ V}$). Como anteriormente mencionado, o oxigênio possui baixa reatividade e apenas após a introdução de elétrons, pela ação das oxigenases (monoxigenases e dioxigenases), torna-se altamente reativo com substratos orgânicos (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991).

A degradação aeróbia de compostos aromáticos clorados está ligada ao grau de cloração da molécula. Quanto maior o número de cloros na molécula, mais resistente ela será à degradação aeróbia (SUFLITA e TOWNSEND, 1995).

Muitas linhagens degradadoras de clorofenóis do gênero *Rhodococcus* sp foram hábeis em hidroxilar mono, di e triclorofenóis. Mas, os clorocatecóis resultantes não foram degradados. Esta resposta foi observada em outras espécies bacterianas mas, no entanto, linhagens de *Pseudomonas* sp têm demonstrado sua capacidade na quebra de catecóis, em que o halogênio é liberado após a fissão do anel. (HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Os fenóis policlorados são mais resistentes à degradação microbiana. As primeiras bactérias capazes de degradar o PCP foram isoladas na década de 70 (CHU

e KIRSCH* ; SUZUKI e NOSE** ; WATANABE*** apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Contrastando com os mono e diclorofenóis, os fenóis policlorados (penta, tetra e triclorofenóis) sofrem hidroxilação inicial seguida da desalogenação, tendo como intermediários centrais *p*-hidroquinonas cloradas (HÄGGBLÖM e VALO, 1995). O acúmulo de tetraclorohidroquinona durante a degradação do PCP foi inicialmente relatado por REINER et al.**** apud HÄGGBLÖM e VALO (1995). Este composto tem sido observado como intermediário na degradação do PCP por outros gêneros bacterianos, tais como *Rhodococcus chlorophenolicus*, *Mycobacterium* sp, *Arthrobacter* sp, *Flavobacterium* sp e *Streptomyces* sp. A tetraclorohidroquinona e o tetraclorocatecol foram identificados durante a degradação de PCP pelo gênero *Pseudomonas* sp. (HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

O gênero *Azotobacter* sp. durante a degradação aeróbia dos fenóis policlorados e dos mono e diclorofenóis pode apresentar dois intermediários, respectivamente, clorohidroquinona e clorocatecol, semelhante ao observado pelas bactérias anteriormente descritas. O estudo com este microrganismo mostrou que a degradação do composto 2,4,6-TCP ocorreu via 2,6-diclorohidroquinona, enquanto

* CHU, J.P.; KIRSCH, E.J.(1973). Utilization of halophenols by pentachlorophenol metabolizing bacterium. *Dev Ind Microbiol* 14:264-273; ** SUZUKI, T.; NOSE, K. (1971). Decomposition of pentachlorophenol in farm soil, part 2: PCP metabolism by a microorganism isolated from soil [in japanese]. *Noyaku Gijutsu* 26:21-24; *** WATANABE, I. (1973). Isolation of pentachlorophenol decomposing bacteria from soil. *Soil Sci Plant nutr* 19:109-116; **** REINER, E.A.; CHU,J.; KIRCH, E.J. (1978). Microbial metabolism of pentachlorophenol. In Rao KR (ed), *Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology, and enviromental Toxicology*. New York. Plenum Press, p. 67-81 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

monoclorofenóis foram hidroxilados até catecóis (LI et al.* apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Os experimentos sobre a degradação do PCP pela espécie *Mycobacterium chlorophenolicum* indicaram que o grupo hidroxila foi derivado da água, apesar da reação necessitar de oxigênio molecular. Foi demonstrado, posteriormente, que tanto a água como o oxigênio molecular podem servir como fonte de oxigênio na *para*-hidroxilação do PCP, e a ação da enzima é dependente das condições ambientais (HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Finalmente, tem-se demonstrado que a tetraclorohidroquinona, o primeiro intermediário na degradação do PCP, parece ser degradada a dióxido de carbono por duas vias diferentes, como ilustrado na FIGURA 4. Na primeira, a tetraclorohidroquinona é desalogenada redutivamente a 2,6-diclorohidroquinona. Isso foi demonstrado pela primeira vez em mutantes de bactérias coriniformes e posteriormente em *Flavobacterium* sp. A enzima tetraclorohidroquinona desalogenase redutiva, responsável por essa redução, foi recentemente purificada (XUN et al.** apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995). A segunda via, realizada por outras bactérias (*Mycobacterium* sp) apresenta a degradação da tetraclorohidroquinona pela hidroxilação do triclorofenol (tricloro 1,2,4

*LI, D-Y; EBERSPÄCHER, J.; WAGNER, B.; KUNTZER, J.; LINGENS, F. (1991). Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Azotobacter* sp. Strain GP1. Appl Environ Microbiol 57:1920-1928; ** XUN, L.; ORSER, C.S.(1991). Purification and properties of pentachlorophenol hydroxylase, a flavoprotein from *Flavobacterium* sp. Strain ATCC 39723. J Bacteriol 173:4447-4453 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

trihidroxibenzeno), seguida de três desalogações redutivas a 1,2,4 trihidroxibenzeno (REINER et al.* apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

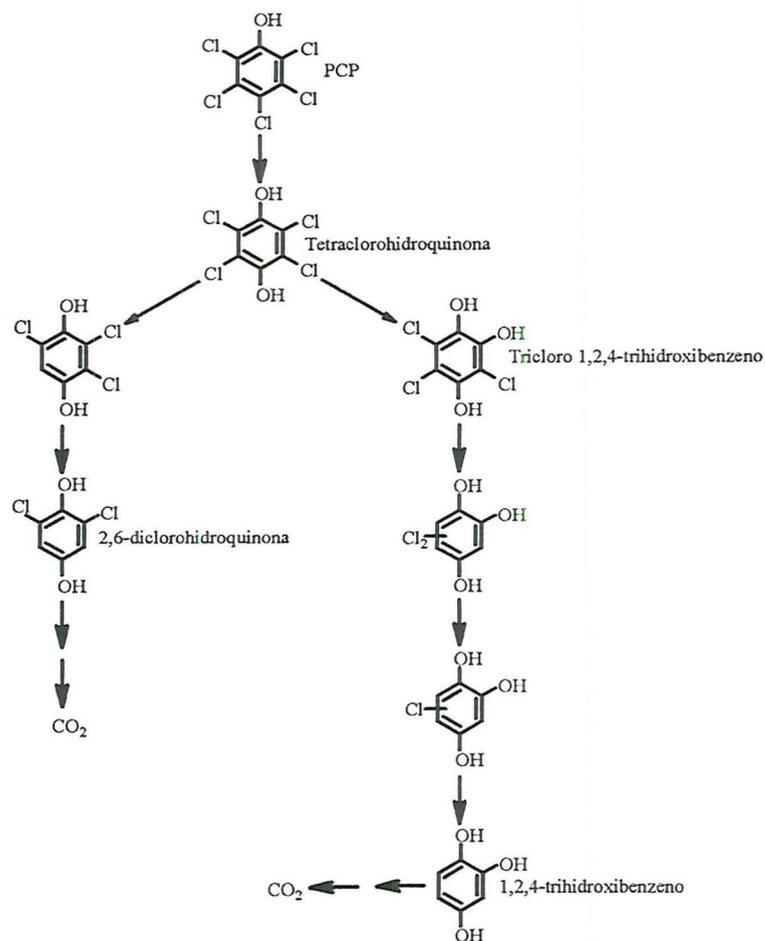


FIGURA 4: Vias de biodegradação aeróbia do pentaclorofenol.
Fonte: modificado de HÄGGBLÖM e VALO, 1995.

A desalogenação redutiva ocorre pela ação das bactérias aeróbias na degradação de compostos aromáticos altamente clorados, que não são vulneráveis a

* REINER, E.A.; CHU, J.; KIRCH, E.J. (1978). Microbial metabolism of pentachlorophenol. In Rao KR (ed), Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology, and environmental Toxicology. New York. Plenum Press, p. 67-81 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

quebra do anel através de oxigenases. Embora esses organismos vivam em ambientes oxidados, seu citoplasma tem baixo potencial de oxi-redução que pode ser favorável às reações redutivas (MOHN e TIEDJE, 1992).

Alguns compostos são mais eletronegativos que o oxigênio e podem ser redutivamente desalogenados sob condições aeróbias. Compostos halogenados têm que competir com outros aceptores fisiológicos de elétrons para serem incorporados no ciclo energético microbiano.

3.2.1.2 - Degradação microbiana anaeróbia dos clorofenóis e microrganismos envolvidos - ênfase à degradação do PCP

A degradação anaeróbia de compostos aromáticos por culturas mistas foi demonstrada pela primeira vez em 1934 (TARVIN e BUSWELL* apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). IDE et al.(1972) foram os primeiros a sugerir que os clorofenóis eram desclorados redutivamente em solos anaeróbios.

Sob condições anaeróbias, o oxigênio molecular não está envolvido na quebra dos compostos aromáticos. Como consequência, alguns tipos de compostos aromáticos são difíceis de serem degradados sob anaerobiose, em particular compostos aromáticos sem grupos funcionais (benzeno, tolueno, naftaleno, etc.). Entretanto, compostos aromáticos altamente clorados, por exemplo o hexaclorobenzeno, são melhor degradados pela atividade microbiana anaeróbia.

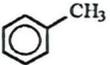
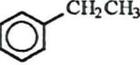
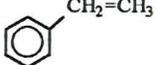
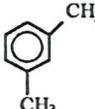
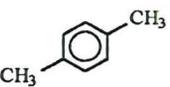
*TARVIN, D.; BUSWELL, A.M.(1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. J. Amer. Chem. Soc., 56:1751-1755 apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste In: Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology. (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

Nestas condições, alguns organismos são capazes de remover halogênios de um anel aromático e colocar um próton no lugar. Este processo, conhecido como desalogenação redutiva de arila, resulta na formação de moléculas menos halogenadas. Diferente do processo aeróbio, um aumento no grau de halogenação não impede esta transformação e, de fato, poluentes altamente clorados parecem ser mais suscetíveis a desalogenação anaeróbia. Os metabólitos desalogenados são, geralmente, mais sensíveis aos processos de biodegradação. Em muitos casos, a diminuição no número de halogênios está associada à diminuição da toxicidade (FIELD et al., 1995).

Diversos compostos aromáticos, homocíclicos ou heterocíclicos, podem sofrer degradação sob condições anaeróbias pela ação de culturas mistas. Os principais compostos estão ilustrados nas TABELAS 3 e 4.

Diferentes tipos de compostos podem atuar como aceptores finais de elétrons na ausência de O_2 , como nitrato, sulfato, enxofre, íons metálicos oxidados (por exemplo, Fe^{3+} e Mn^{4+}), prótons e bicarbonato (FIELD et al., 1995). Algumas espécies de bactérias fototróficas também podem usar os compostos aromáticos como fontes de carbono e doadores de elétrons na ausência de O_2 se houver disponibilidade de luz. Neste caso, a degradação dos compostos aromáticos gera mais biomassa do que produtos gasosos. (EVANS e FUCHS** apud FIELD et al., 1995).

TABELA 3: Hidrocarbonetos aromáticos homocíclicos suscetíveis a transformação sob condições anaeróbias com culturas mistas ou consórcios microbianos.

COMPOSTO	CONDIÇÕES	MINERALIZAÇÃO
benzeno 	desnitrificante metanogênica	ND + ^a
tolueno 	desnitrificante metanogênica	+ +
etilbenzeno 	metanogênica	ND
estireno 	fermentativa ^b	- ^c
o-xileno 	desnitrificante metanogênica	ND ND
m-xileno 	desnitrificante metanogênica	+ ND
p-xileno 	desnitrificante metanogênica	ND ND
indeno 	metanogênica	+
naftaleno 	metanogênica	+
acenaftano 	desnitrificante	ND

ND = não determinado

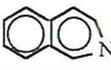
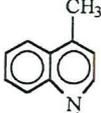
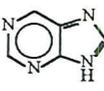
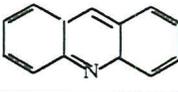
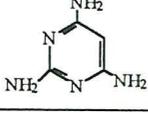
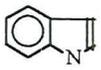
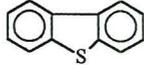
^a = mineralização do composto

^b = inóculo metanogênico, mas sem produção de metano

^c = compostos com vários carbonos persistentes até o final da incubação (além de carbono)

Fonte: adaptado de BHATNAGAR e FATHEPURE, 1992.

TABELA 4: Hidrocarbonetos aromáticos heterocíclicos suscetíveis a transformação sob condições anaeróbias com culturas mistas ou consórcios microbianos

COMPOSTO	CONDIÇÕES	MINERALIZAÇÃO
indol 	desnitrificante metanogênica reduzora de sulfato	ND + +
quinol 	metanogênica reduzora de sulfato	\pm^a ND
isoquinol 	metanogênica	\pm
4-metilquinol 	metanogênica	-
purina 	fermentativa ^b	+
acridina 	metanogênica	+
melamina 	desnitrificante	+
benzotiofano 	metanogênica fermentativa ^c	+ +
dibenzotiofano 	fermentativa ^c	+

ND= não determinado

^a = sem produtos de mineralização. somente intermediários detectados

^b = culturas puras de bactérias fermentativas obrigatórias ou facultativas

^c = enriquecimentos fermentativos

Fonte: adaptado de BHATNAGAR e FATHEPURE, 1992.

A desalogenação reductiva de arila tem sido observada em diversos habitats incluindo sedimentos marinhos, lodo de esgoto, material de aquíferos e uma variedade de amostras de solo. A desalogenação pode ser demonstrada em amostras de ambientes anóxicos com relativa facilidade, e o aumento das taxas de desalogenação com o decorrer do tempo nestas amostras sugere que os microrganismos têm que ser inicialmente enriquecidos para que haja um aumento na eficiência deste tipo de degradação (SUFLITA e TOWNSEND, 1995).

As comunidades microbianas anaeróbias possuem relações sintróficas ou mutualísticas entre seus membros, e a troca de micronutrientes parece ser uma das razões que dificulta o isolamento de organismos desalogenantes em cultura pura (SUFLITA e TOWNSEND, 1995).

Um problema particularmente característico das reações promovidas experimentalmente é o longo tempo de adaptação inicial seguido de rápida transformação. Este período de adaptação é, freqüentemente, da ordem de semanas, meses e, algumas vezes, anos. Um fator que pode afetar o período de adaptação é a presença de compostos estruturalmente semelhantes no mesmo ambiente. Estes substratos adicionais podem inibir ou estimular a desalogenação (SUFLITA e TOWNSEND, 1995).

A concentração do substrato também influencia a suscetibilidade do composto à decomposição. Um exemplo disso, é o caso do halobenzoato, um agente bacteriostático, que em baixas concentrações é rapidamente degradado, mas em concentrações elevadas torna-se recalcitrante. Inibição semelhante foi notada em estudos com clorofenóis (MONH e KENNEDY, 1992).

Os microrganismos anaeróbios realizam reações de degradação de compostos tóxicos dificilmente realizadas pelos aeróbios, tais como a desalogenação reductiva de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos altamente clorados, redução de anéis aromáticos a estruturas aromáticas alicíclicas, e fissão do anel (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991).

Sob condições metanogênicas, os compostos aromáticos servem como substrato para comunidades com muitas espécies, ou consórcios microbianos (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). Pelo menos duas comunidades microbianas anaeróbias estão envolvidas na degradação de compostos aromáticos como o benzoato: (1) organismos responsáveis pela clivagem reductiva do anel aromático em ácidos alifáticos e então a ácido acético, CO₂, H₂ etc.; (2) metanogênicas que utilizam esses substratos para produzir CH₄ (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). O conceito de desalogenação reductiva dos aromáticos halogenados por culturas anaeróbias mistas foi reconhecido em 1982 (SUFLITA et al.* apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991).

Comunidades anaeróbias mistas capazes de catalisar a desalogenação reductiva de benzenos clorados e bifenilas policloradas (PCBs) podem fornecer uma solução via biotratamento para problemas de poluição ambiental em sedimentos aquáticos (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1992). Sabe-se que compostos apolares altamente clorados como o hexaclorobenzeno (HCB), triclorobenzeno, e uma variedade de PCBs podem sofrer desalogenação reductiva. As taxas de desalogenação no caso do

* SUFLITA, J.M.; HOROWITZ, A. ; SHELTON, D.R.; TIEDJE, J.M. (1982). Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic degradation of haloaromatic compounds. *Science*, 218:1115-1116. apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. In: *Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology*. (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

HCB e PCBs são muito menores do que para os clorobenzoatos e clorofenóis (TIEDJE et al., 1987; FATHEPURE et al. ; QUENSEN et al. * apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991).

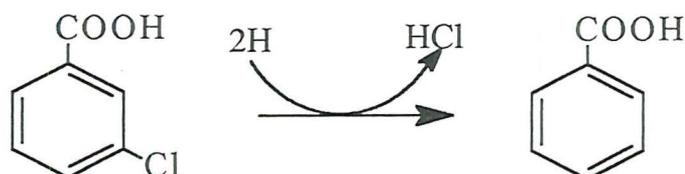
Mais recentemente, a biodegradação de compostos tóxicos tem sido constatada pela atuação de culturas puras anaeróbias. São exemplos, a ação sobre clorobenzoatos e cloroetanos da bactéria *Desulfomonile tiedjei* (linhagem DCB-1) e transformação de clorofenóis por bactérias do gênero *Clostridium* sp., a desalogenação redutiva de orto-clorofenóis pela espécie *Desulfitobacterium dehalogenans* e a desalogenação redutiva do tetracloroetano pela bactéria *Dehalobacter restrictus* (MOHN e TIEDJE, 1992; MADSEN e LICHT, 1992; HOLLIGER e SCHUMACHER, 1994; UTIKIN et al., 1995).

A desalogenação redutiva parece ser o mecanismo mais importante na degradação de compostos organoclorados. Segundo MOHN E TIEDJE (1992), a desalogenação redutiva envolve a remoção do halogênio da molécula com simultânea adição de elétrons na mesma. Essencialmente, dois processos fazem parte do mecanismo global:

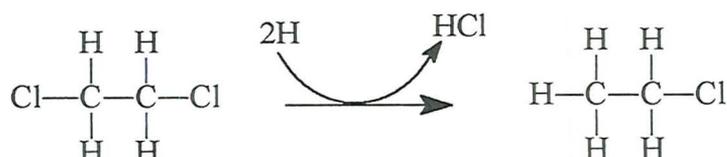
- 1) o primeiro processo, hidrogenólise, é a substituição do halogênio da molécula por um átomo de hidrogênio (FIGURA 5 A e B);
- 2) o segundo processo, redução vicinal (dihaloeliminação), é a remoção de dois halogênios dos átomos de carbono adjacentes com a formação de uma ligação adicional entre os átomos de carbono (FIGURA 5 C)

* QUENSEN, J.F.; TIEDJE, J.M., BOYD, S.A (1988). Reductive dechlorination of polychlorinate biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. Science 242:752 apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste In: Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology. (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

A: aril hidrogenólise



B: alquil hidrogenólise



C: redução vicinal

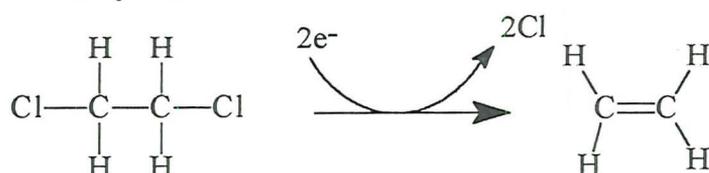


FIGURA 5: Exemplos de desalogenação redutiva.
Fonte: MOHN e TIEDJE, 1992.

MOHN e TIEDJE (1992) sugeriram que os compostos aromáticos clorados serviriam como aceptores de elétrons para a comunidade anaeróbia. A adição de fontes de carbono auxiliares frequentemente aumentam as taxas de descloração, seja pela ação de um doador de elétrons para a descloração, ou por servir como substrato de crescimento para a população microbiana. Cálculos termodinâmicos indicaram que a descloração redutiva dos clorofenóis podem também produzir energia (DOLFING e HARRISON, 1992), o que suportaria o crescimento de microrganismos desalogenantes no ambiente.

Na revisão de MOHN e TIEDJE (1992), os autores indicaram que sulfato ou outros aceptores de elétrons inibiriam a descloração redutiva por comunidades metanogênicas. Esta inibição poderia envolver uma competição intraespecífica por doadores de elétrons (MOHN e TIEDJE, 1992). Entretanto, a descloração de clorofenóis acoplada à redução do sulfato foi demonstrada por HÄGGBLÖM e YOUNG* apud HÄGGBLÖM e VALO (1995).

Os diferentes isômeros do monoclórofenol são certamente degradados sob uma variedade de condições redutoras, incluindo metanogênese, sulfidogênese e redução do ferro (KAZUMI et al.** apud HÄGGBLÖM e VALO, 1995). Sob condições desnitrificantes, somente o 2-clórofenol foi degradado (HÄGGBLÖM e VALO, 1995).

Foram descritas muitas situações metabólicas em que ocorre a degradação de compostos tóxicos aromáticos substituídos: desnitrificação (BRAUN e GIBSON*** apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991), redução do sulfato

* HÄGGBLÖM, M.M.; YOUNG, L.Y. (1990). Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. *Appl Environ Microbiol* 56:3255-3260; ** KAZUMI, J.; HÄGGBLÖM, M.M.; YOUNG, L.Y. (1993). Biodegradation of monochlorinated and non chlorinated aromatic compounds under iron (III) reducing conditions. In American Society for Microbiology 93 General Meeting, Atlanta. Washington, DC. American Society for Microbiology, abstract Q-370, p.414 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

*** BRAUN, K.; GIBSON, D.T. (1984). Anaerobic degradation of L-aminobenzoate (anthranilic acid) by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:102-107 apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. In: *Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology*. (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

(PFENNIG et al.* apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991), fermentação (SCHINK e PFENNIG** apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991)., metanogênese (FERRY e WOLFE***; KAISER e HANSELMANN****; YOUNG*****, apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). e fotossíntese anaeróbia (EVANS***** apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991).

A conversão de aromáticos como o benzoato, fenol e p-hidroxibenzoato são termodinamicamente desfavoráveis. Desta maneira, para ocorrer a clivagem do anel, faz-se necessária a contínua remoção dos intermediários e isto é efetivamente realizado sob condições metanogênicas. A clivagem do anel parece estar relacionada à utilização do produto, resultando numa associação sintrófica obrigatória entre a clivagem do anel e organismos metanogênicos (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991).

Uma série de estudos usando uma comunidade microbiana de lodo de esgoto enriquecida em ácido ferúlico (3-metoxi-4-hidroxi-ácido cinâmico) como única fonte

* PFENNIG, N.; WIDDELL, F.; TRUPER, H.G.(1981). The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*, vol. 1 p. 926-940, Springer-Verlag, Heidelberg; ** SCHINK, B.; PFENNIG, N. (1982). Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. Nov., a new strictly anaerobic, non-sporoforming bacterium. *Arch. Microbiol.* 133:195; *** FERRY, J.G.; WOLFE, R.S. (1976). Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. *Arch. Microbiol.* 107:33, **** KAISER, J.P.; HANSELMANN, K.W. (1982). Fermentative metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. *Arch. Microbiol.* 133:185. ***** YOUNG, L.Y. (1984). Anaerobic degradation of aromatic compounds. In *Microbial Degradation of aromatic compounds*. Marcel Dekker, New York; ***** EVANS, W.C. (1977). Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature* 270:17-22; apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste In: Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology. (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

de energia e carbono foram conduzidos por VOGEL e GRBIC-GALIC* ; GRBIC-GALIC e VOGEL** apud BHATNAGAR e FATHEPURE (1992). Foram propostas vias metabólicas para a degradação do ácido ferúlico até CO₂ e CH₄.

Tolueno ou benzeno foram marcados radioativamente no anel (¹⁴C) e utilizados junto com água, também marcada (H₂¹⁸O), para estudos de degradação que envolviam o desaparecimento do substrato, formação de intermediários e produtos, e o mecanismo inicial de transformação. Foi observado que benzeno e tolueno, como única fonte de carbono e energia, ou junto com metanol, foram completamente mineralizados por uma comunidade anaeróbia metanogênica. Em 60 dias, foi observada a conversão de mais de 50% do benzeno e tolueno a dióxido de carbono e metano. O restante foi incorporado nas células ou persistiram no meio de cultivo como vários intermediários (anéis alicíclicos e ácidos alifáticos). Depois de uma incubação prolongada foi observada a completa mineralização.

MIHELICIC e LUTHY*** apud BHATNAGAR e FATHEPURE (1991) demonstraram a degradação no solo de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, incluindo naftaleno e acenaftaleno, sob condições desnitrificantes. Após um mês de adaptação, a transformação do naftaleno resultou em intermediários aromáticos, e a completa degradação ocorreu em 30 semanas. A transformação, através de culturas

* VOGEL, T.M.; GRBIC-GALIC,D. (1986) Incorporation of oxigen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:200-202;
GRBIC-GALIC, D.; VOGEL, T.M. (1987). Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 254-260; * MIHELICIC, J.R.; LUTHY, R.G. (1988). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1182-1187 apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE,B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste In: *Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology.* (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

mistas anaeróbias, de hidrocarbonetos que contenham enxofre e nitrogênio também foi observada.

A mineralização de hidrocarbonetos saturados à CH_4 e CO_2 , sob condições anaeróbias, é termodinamicamente possível (THAUER et al^{*}. apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991), como ilustrado para o etano:



$$\Delta G^{\circ} = -34,4 \text{ KJ mol etano}^{-1}$$

Os clorobenzoatos têm sido largamente utilizados como compostos-modelo para estudos de degradação por fazerem parte de muitos resíduos perigosos e são produtos intermediários de muitos poluentes (por exemplo, PCBs e clorofenóis), e componentes de muitos herbicidas. Foi mostrado que 85% do 3-clorobenzoato foi mineralizado a CH_4 e CO_2 usando culturas mistas em lodo anaeróbio (SHELTON e TIEDJE, 1984) com benzoato como intermediário (SUFLITA et al.^{**} apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). Foi mostrada uma desalogenação através de culturas mistas no sedimento e lodo de uma série mono, di e trihalobenzoatos (TIEDJE et al. ^{***}. apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). Curiosamente, todos os cloros da posição META eram especificamente removidos.

A cultura mista que promoveu a descloração do 3-clorobenzoato foi caracterizada (SHELTON e TIEDJE, 1984). Dos nove organismos isolados, apenas

^{*}THAUER, R.K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Review* 41:100; ^{**} SUFLITA, J.M.; HOROWITZ, [†]; SHELTON, D.R.; TIEDJE, J.M. (1982). Dehalogenation: A novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science* 218: 1115-1117; ^{***} TIEDJE, J.M.; BOYD, S.A. ; FATHEPURE, B.Z. (1987). Anaerobic degradation of chlorinated aromatic hydrocarbons. *Dev. Ind. Microbiol.* 27:117 apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. *In: Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology.* (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

cinco tinham uma maior importância no fluxo de elétrons e carbono. Os diferentes parceiros deste consórcio que degradaram o clorobenzoato até CH_4 e CO_2 foram: (1) o organismo que promove a descloração, DCB-1, que produz benzoato; (2) a linhagem que degrada benzoato, BZ-2, que produz H_2 e acetato; e, (3) os metanogênicos consumidores de hidrogênio *Methanospirillum* sp e *Methanobacterium* sp e o metanogênico acetoclástico *Methanothrix* sp que utiliza acetato para produzir CO_2 e CH_4 .

Aromáticos clorados, incluindo os clorofenóis, clorocatecóis e cloroguaiacóis em efluente de fábrica de papel, foram transformados e degradados em um reator anaeróbio de leito fluidificado (HAKULINEN e SALKINOJA-SALONEN* ; SALKINOJA-SALONEN et al.** apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991).

A degradação extensiva do PCP foi reportada por GUTHRIE et al.*** apud BHATNAGAR e FATHEPURE (1991) em lodo anaeróbio. A remoção do clorofenol deu-se mais rapidamente no reator anaeróbio do que na lagoa aerada ou no processo de lodo ativado.

Estudos de culturas em ensaio descontínuo com lodo de esgoto, mostraram que o PCP foi convertido seqüencialmente a 3,4,5-triclorofenol (3,4,5-TCP), 3,5-

*HAKULINEN, R.; SALKINOJA-SALONEN; M. (1982). Treatment of pulp paper industry wastewaters in a anaerobic fluidized bed reactor. *Process Biochem.* 17:18-22; ** SALKINOJA-SALONEN, M.; VALO, R.; APAJALAHTI, J.; HAKULINEN, R.; SILAKOSKI, L.; JAAKKOLA, T. (1984). Biodegradation of chlorophenolic compounds in waste from wood processing industry. In *Current Perspective in Microbial Ecology*, America Society for Microbiology, Washington, DC; *** GUTHRIE, M.A. ; KIRSCH, E.J.; WUKASCH, R.F.; GRADY, C.P.L. (1984). Pentachlorophenol biodegradation-II. *Anaerobic. Water Res.* 18:451-461 apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. In: *Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology*. (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

diclorofenol que, finalmente, foi metabolizado a CH_4 e CO_2 (MIKESELL e BOYD, 1986).

BHATNAGAR et al.* apud BHATNAGAR e FATHEPURE (1992) estudaram culturas mistas enriquecidas em PCP, que descloraram este composto via 2,4,6-TCP e 4-CP num reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) com produção de metano. Estes dados sugerem que a *meta* descloração é o passo inicial do processo de descloração. O PCP nunca foi detectado no efluente após o tratamento anaeróbio. Quando o sistema foi inibido, muitos intermediários foram detectados e identificados: 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol, e 4-clorofenol, demonstrando que a descloração ocorreu inicialmente na posição *meta*, sugerindo uma nova via metabólica catalisada por este consórcio anaeróbio. Em estudos com culturas anaeróbias em ensaios descontínuos, o 2,4,6-triclorofenol, o 2,4-diclorofenol e 2,6-diclorofenol não foram inibidores para a bioconversão catalisada pelas culturas bacterianas presentes no lodo granulado. Entretanto, o 3,4,5-triclorofenol e o 3,4-diclorofenol foram muito tóxicos. Com a utilização de traçadores radioativos (^{14}C), foi demonstrado que mais de 75% do PCP foi mineralizado até $^{14}\text{CO}_2$ e $^{14}\text{CH}_4$. Este tipo de reator de tratamento de resíduos que contenham PCP com desenvolvimento especial de grânulos metanogênicos anaeróbios, possui potencial prático para aplicação comercial no tratamento de águas subterrâneas e percolado de resíduo

*BHATNAGAR, L.; LI, S.P.; JAIN, M.K.; ZEIKUS, J.G. (1989). Growth of methanogenic and acidogenic bacteria with pentachlorophenol as co-substrate. In *Biotchnology Applications in Hazardous Waste Treatment*, New Jersey Institute of Technology, Newark, N.J. apud BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z. (1992). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. In: *Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology*. (Eds). G. Zeikus e E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.

sólido. As vias metabólicas da degradação do PCP no reator tipo UASB estão ilustradas na FIGURA 6.

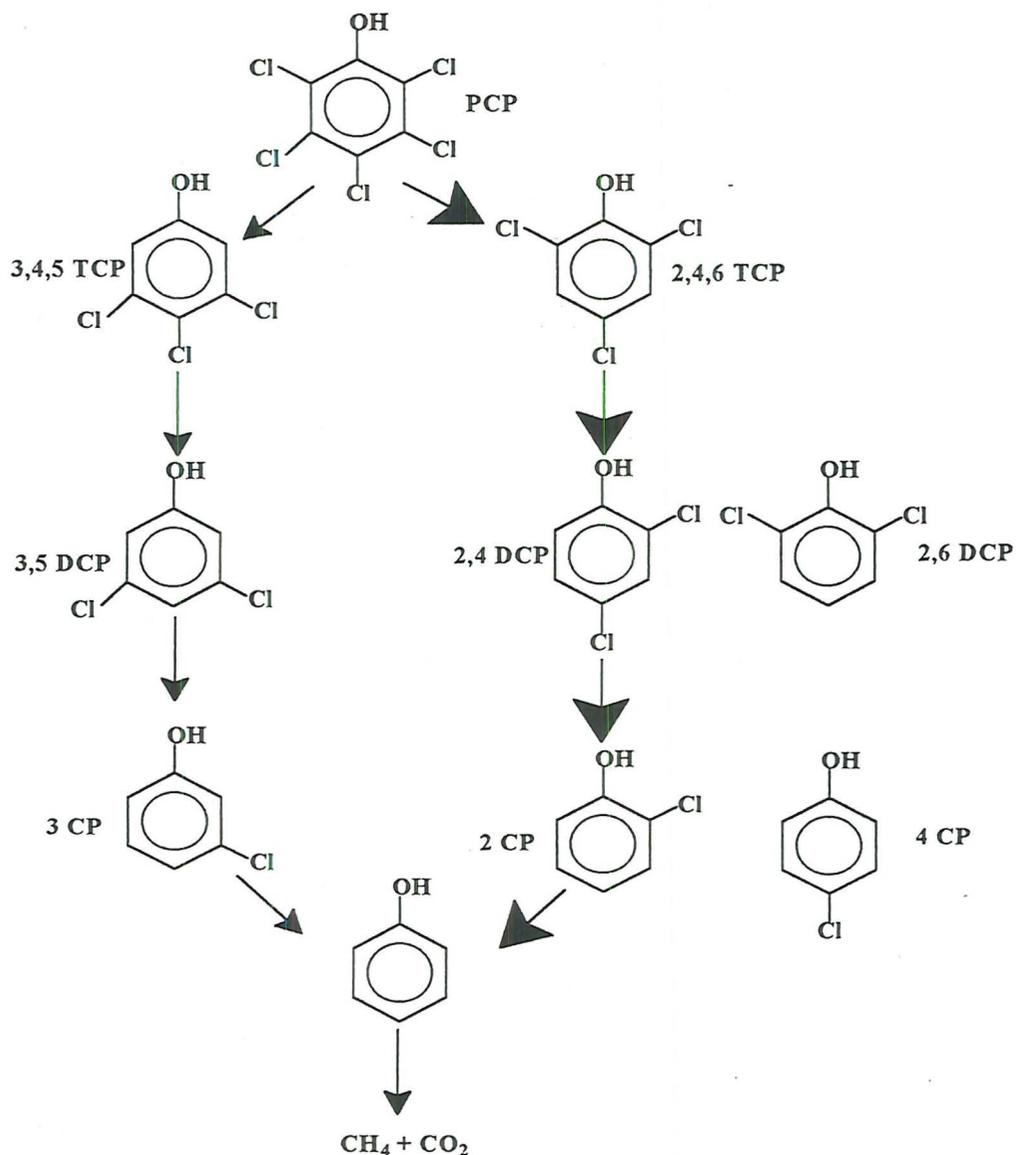


FIGURA 6: Vias metabólicas da degradação do PCP observadas no reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB).

As setas maiores indicam a via preferencial observada no reator

Fonte: adaptado de BHATNAGAR et al. apud BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991.

KUWATSUKA e IGARASHI (1975) e MURTHY et al. (1979) relataram desclorações do PCP, sugerindo a remoção preferencial dos cloros das posições *orto* e *para*. Uma seqüência de transformações comumente observadas para o PCP, é a via

inicial de desclorações da posição *orto* produzindo 3,4,5-TCP, seguido de uma *para* descloração até 3,5-DCP. Foram também observadas as desclorações iniciais das posições *meta* ou *para* do PCP (BRYANT et al., 1991; HENDRIKSEN et al., 1992; LARSEN et al., 1991). Frequentemente, a descloração não é completa, mas di, tri e tetraclorofenóis são formados (LARSEN et al., 1991; MOHN e KENNEDY, 1992, NICHOLSON et al., 1992). Entretanto, a completa mineralização dos monoclorofenóis e do pentaclorofenol é bem documentada (BOYD e SHELTON, 1984; MIKESELL e BOYD, 1986).

NICHOLSON et al. (1992) descreveram diversas vias metabólicas observadas por diferentes autores. Estas vias estão ilustradas na FIGURA 7.

HENDRIKSEN et al. (1992) e WU et al. (1993), estudando a eficiência de degradação do PCP por lodos granulados, observaram a importância da presença de outras fontes orgânicas, respectivamente, glicose e ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico e butírico). Além disso, WU et al. (1993) indicaram que o metanol em conjunto com os ácidos voláteis melhorou a taxa de degradação do composto.

HENDRIKSEN et al. (1992), utilizando dois reatores UASB com volume de 2 litros, tempo de retenção hidráulico de 3 dias, temperatura de 37°C, pH 7,0 a 7,5, com 0,9 g/L de glicose e 4,5 mg/L de PCP, observaram, após 10 meses de operação, a descloração de 94% do PCP. Além disso, a biomassa do reator que continha glicose aumentou 150% em comparação com o reator controle que não apresentou aumento do lodo.

No trabalho de WU et al. (1993) a taxa máxima de remoção de PCP por lodos granulados, cultivados previamente na mistura de fontes de carbono citada e a 28°C,

foi de 14,6 mg PCP/SSV.d, a uma taxa volumétrica de remoção de PCP de 90 mg/L em um reator UASB.

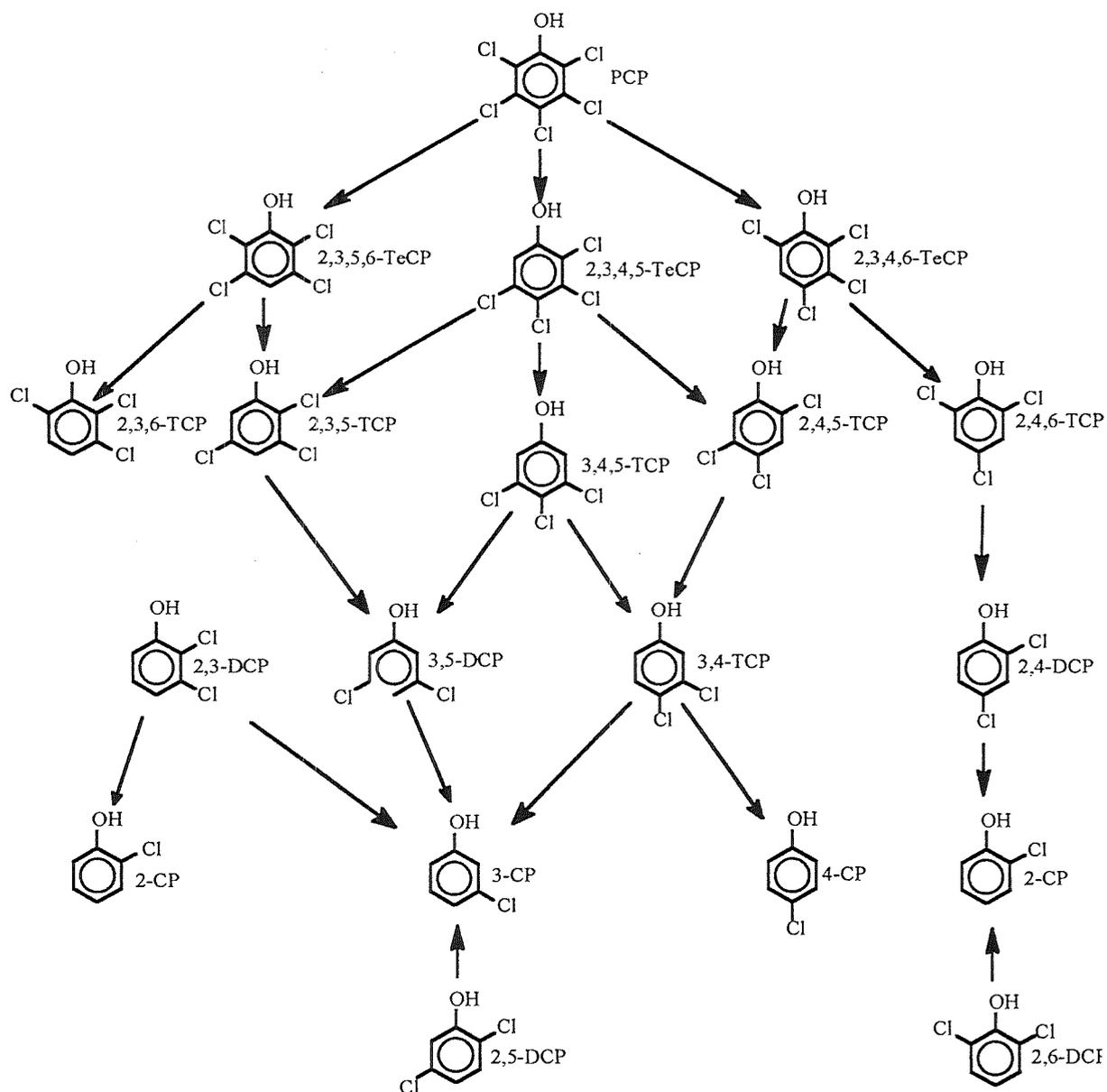


FIGURA 7: Esquema das vias metabólicas de descloração redutiva previamente observadas em consórcios anaeróbios adaptados e não adaptados. Fonte: adaptado de NICHOLSON et al., 1992.

NICHOLSON et al. (1992) realizando ensaios descontínuos com reatores de 2,5 L alimentados com acetato (5.300 mg/L), nutrientes inorgânicos, vitaminas e PCP (3,4 μ M), observaram a biotransformação do PCP através de uma seqüência de *orto* desclorações produzindo 2,3,4,5 TeCP e 3,4,5 TCP. Após adaptação de 6 meses do lodo em 3,4 μ M de PCP, o consórcio metanogênico removeu os cloros das posições *orto*, *para* e *meta*.

Segundo MADSEN e LICHT (1992), MOHN e KENNEDY (1992), UTKIN et al. (1995), o maior obstáculo para o estudo da descloração anaeróbia está na dificuldade de isolar os microrganismos desalogenantes. Até 1994, somente três bactérias anaeróbias obrigatórias desalogenantes haviam sido descritas. *Desulfomonile tiedjei* cepa DCB-1, originariamente isolada para desclorar 3-clorobenzoato (SHELTON e TIEDJE, 1984), que foi capaz de desclorar PCP e outros clorofenóis (MOHN e KENNEDY, 1992). Outra bactéria desalogenante, cepa DCB-2, foi recentemente isolada e possui a capacidade de desclorar clorofenóis na posição *para* (MADSEN e LICHT, 1992). O composto 2,4,6-TCP, utilizado como substrato no enriquecimento, foi também o substrato preferido da bactéria do gênero *Clostridium* sp. Neste caso, os cloros da posição *para* não foram removidos, e a *meta* descloração foi observada somente com 3,5-DCP. Os autores UTKIN et al. (1995) relataram o isolamento da *Desulfitobacterium dehalogens*, que removeu os cloros da posição *meta* do 2,4-DCP. DIETRICH e WINTER* apud HÄGGBLÖM e VALO (1996) relataram a descloração do 2-clorofenol por um consórcio formado por 3 tipos

* DIETRICH, G.; WINTER, J. (1990). Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. Appl Environ Microbiol, 34:253-258 apud HÄGGBLÖM, M.M.; VALO, R.J. (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In: CERNIGLIA, C.E. e YOUNG, L.Y., ed. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p. 389-434.

morfológicos distintos em que uma bactéria do gênero *Spirochaeta* sp. era, provavelmente, o organismo desalogenante.

DAMIANOVIC (1997) estudou a remoção de PCP em reatores do tipo "RAHLF" (reator anaeróbio horizontal de leito fixo) com células imobilizadas em espuma de poliuretano alimentados semi-continuamente com substratos sintéticos, utilizando glicose e ácidos acético e fórmico como fontes de carbono. Foram utilizados dois reatores com volumes de 1.991 mL e 296 mL, com taxas de carregamento orgânico máximo (T.C.O.) de 1,12 KgDQO/m³ dia e 1,71 KgDQO/m³ dia, respectivamente. O tempo de detenção hidráulico no reator de 1.991 mL foi de 24 horas e no reator de 296 mL 18 horas. Os reatores foram submetidos a taxas crescentes de PCP que variaram de 0,05 a 2,59 mg/L (reator de 1.991 mL) e de 0,06 a 4,15 mg/L (reator de 296 mL). O autor concluiu que a adição de PCP, nas concentrações estudadas, não afetou o desempenho dos reatores, e a eficiência de remoção de DQO em ambos os reatores permaneceu próxima aos 98%, e a presença de metano no biogás produzido esteve entre 95 e 98 %.

3.2.1.3 - Vantagens da desalogenação redutiva

Certamente os microrganismos realizam a desalogenação para obter algum tipo de vantagem, seja ela energética ou estrutural. Como já descrito, freqüentemente são observados períodos de adaptação seguidos por uma rápida degradação, e, no caso da desalogenação redutiva estes períodos podem ser longos. Freqüentemente, os períodos de adaptação são atribuídos a um crescimento de um pequeno número de microrganismos até atingirem biomassa suficiente para promover a desalogenação do substrato.

Muitas vezes, a desalogenação redutiva não funciona como fonte de carbono para os microrganismos, mas pode fornecer energia para as células. Os microrganismos desalogenantes transferem elétrons, provavelmente, para uma série de transportadores intermediários, até o composto aromático halogenado. Este processo pode estar acoplado com a conservação de energia, com o composto halogenado servindo como acceptor final de elétrons (SUFLITA e TOWNSEND, 1995).

Cálculos termodinâmicos sugerem que a energia livre padrão da oxidação do hidrogênio usando um composto aromático halogenado como acceptor de elétrons pode ser maior do que quando o acceptor final de elétrons é o comum disponível em ambientes anaeróbios (DOLFING e HARRISON, 1992). A habilidade para utilizar um acceptor final de elétrons alternativo, particularmente um dentre outros, pode ser a única etapa limitante na competição em ambientes com energia limitada e pode favorecer células desalogenantes com alguma vantagem. Esta vantagem pode manifestar-se com um aumento das taxas de crescimento e um enriquecimento seletivo de comunidades desalogenantes em ambientes que recebem quantidades substanciais de compostos aromáticos halogenados. Esta evidência suporta a hipótese que a desalogenação redutiva pode ser uma forma de respiração anaeróbia resultando em alguma vantagem energética para os organismos desalogenantes (SUFLITA e TOWNSEND, 1995).

3.2.1.4 - Considerações termodinâmicas

A quantidade de energia que pode ser conservada pelos microrganismos na forma de ATP ou de um gradiente iônico é dependente da energia livre de Gibbs da degradação de compostos. A mudança da energia livre de Gibbs resultante do catabolismo de um dado composto aromático é altamente dependente da natureza do acceptor final de elétrons. Como exemplo, na TABELA 5 estão listados os valores de energia livre de Gibbs para a oxidação do benzoato com diferentes aceptores finais de elétrons e, na TABELA 6 estão relacionados os valores da energia gerada e os produtos da degradação do PCP, 2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP e 3,5-DCP.

TABELA 5 - Energia da degradação aeróbia e anaeróbia do benzoato

REAÇÕES	ΔG° (Kj)
Benzoato + 7,5 O ₂ → 7CO ₂	- 3174,6
Benzoato + 6NO ₃ ⁻ → 7CO ₂ + 3N ₂	- 2977,3
Benzoato + 7,35NO ₃ ⁻ → 7CO ₂ + 3,75NH ₄ ⁺	- 1864,3
Benzoato + 30 Fe ⁺ → 7CO ₂ + 30Fe ²⁺	- 3043,3
Benzoato + 3,75 SO ₄ ²⁻ → 7CO ₂ + 3,75HS ⁻	- 185,4
Benzoato + 15S ⁰ → 7CO ₂ + 15HS ⁻	- 35,8
Benzoato → 3,25CO ₂ + 3,75CH ₄	- 124,3

Fonte: FIELD et al. (1995)

Observando os valores ilustrados na TABELA 5, pode-se notar que a quantidade de energia disponível é maior sob condições aeróbias do que anaeróbias. Consequentemente, a produção molar de ATP celular sob condições metanogênicas e sulfidogênicas é mais baixa. A conservação de energia acontece durante o transporte de elétrons para o acceptor final. A quantidade de energia que se torna disponível quando equivalentes redutores são canalizados para o oxigênio, nitrato ou Fe³⁺ é alta. Entretanto, quando sulfato, enxofre ou bicarbonato são os aceptores de elétrons,



muito mais energia fica disponível para o transporte de elétrons na fosforilação (THAUER et al* apud FIELD et al., 1995).

TABELA 6: Energia da degradação anaeróbia de alguns compostos organoclorados

SUBSTRATO	PRODUTO	ΔG° (Kj)
PCP	2,3,4,5-TeCP	-156
2,3,4,5-TeCP	3,4,5-TCP	-141
3,4,5-TCP	3,5-DCP	-156
3,5-DCP	3-CP	-135

Fonte: DOLFING e HARRISON, 1992.

Pode-se notar na TABELA 6 que todas as reações ilustradas são exergônicas, mostrando que a degradação dos compostos fenólicos clorados pode ser vantajosa para os microorganismos.

* THAUER, R.K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Review* 41:100 apud FIELD, J.A. ; STAMS, A.J.M.; KATO, M.; SCHRAA, G. (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie Leeuwenhoek* 67:47-67.

4. Materiais e métodos

4.1 Introdução

Serão reportados aspectos do presente trabalho que se referem aos equipamentos e materiais utilizados, à formulação e preparação dos meios de cultura e soluções estoque, bem como as análises microscópicas e cromatográficas.

Foi estudado um lodo proveniente de um reator anaeróbio de mistura completa alimentado com PCP. Segundo ^{BOLAJOS} ROJAS (1996), este reator havia sido inoculado com uma mistura de lodos, a saber: lodo anaeróbio oriundo de estação de tratamento de águas residuárias de uma indústria de papel e celulose misturado com sedimento de rio coletado próximo ao local de lançamento do efluente desta indústria; lodo granulado de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo -UASB- que faz parte do processo de tratamento de águas residuárias desta mesma indústria; e, um lodo proveniente da estação de tratamento de esgotos de Barueri - SP. Este reator já havia recebido adição de PCP até 10 mg/L, apresentando inibição dos microrganismos.

Para inoculação, o lodo foi “reativado” com acetato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio e metanol. A inoculação foi realizada quando o lodo atingiu o valor de 70% de metano.

Foram realizados dois ensaios com este lodo, um com frascos de 250 mL e outro com frascos de 1.000 mL. Os ensaios tiveram a duração de 234 e 92 dias, respectivamente.

O ensaio com frascos de 250 mL contava com 5 frascos denominados controle (C1), reator 1 (R1), reator 2 (R2), reator 3 (R3) e reator 4 (R4). O ensaio com frascos de 1.000 mL contava com 6 frascos denominados controle I (CI), controle II (CII), reator I (RI), reator II (RII), reator III (RIII) e reator IV (RIV).

O estudo do lodo compreendeu a avaliação morfo-fisiológica das culturas microbianas, bem como a capacidade de metabolizar o composto organoclorado em estudo. Os trabalhos experimentais foram realizados no Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, com exceção da microscopia eletrônica de varredura que foi realizada no Laboratório de Microscopia e Análises do Departamento de Física da mesma universidade.

A fim de facilitar a visualização geral dos experimentos e técnicas utilizadas é apresentada na TABELA 7 os procedimentos de ensaios e análises, e métodos analíticos empregados.

TABELA 7 - Relação dos procedimentos de ensaios e análises e métodos analíticos empregados.

Procedimentos de ensaios e análises	Métodos analíticos empregados
Análise das características morfológicas do lodo anaeróbio	Microscopia de luz comum, por contraste de fase e fluorescência
Enriquecimento de culturas bacterianas metanogênicas e não-metanogênicas	Cultivo em meio líquido sob condições de anaerobiose, cromatografia gasosa (% dos gases na atmosfera dos frascos), microscopia ótica de luz comum por contraste de fase e fluorescência.
Avaliação das culturas enriquecidas	Microscopia ótica de luz comum por contraste de fase e fluorescência e microscopia eletrônica de varredura
Avaliação da degradação do PCP com produção de intermediários	cromatografia gasosa (cromatógrafo HP)
Medida do potencial metanogênico do lodo	Cromatografia gasosa (cromatógrafo GOW-MAC)

4.2 Equipamentos

4.2.1 Sistema de distribuição simultânea de gases

O sistema de distribuição simultânea de gases utilizado para manutenção das condições de anaerobiose nos frascos utilizados nos trabalhos experimentais, consistiu de uma canalização com 3 saídas de gases simultâneas e controle de fluxo por válvulas de agulha, baseado no sistema desenvolvido por BALCH, 1977. Em cada saída foi instalada uma mangueira com cerca de 30 cm apropriada para gases que, na extremidade oposta, estava instalada uma seringa de 3 mL. Nas seringas com sistema de trava eram afixadas agulhas. Através das mangueiras, seringas e agulhas fazia-se passar um fluxo gasoso a ser inserido nos frascos. Ainda, neste mesmo sistema, ficava acoplada uma bomba de vácuo que permitia a aplicação de pressão negativa nos

frascos, utilizada na troca de atmosfera dos reatores. A FIGURA 8 mostra o sistema utilizado.

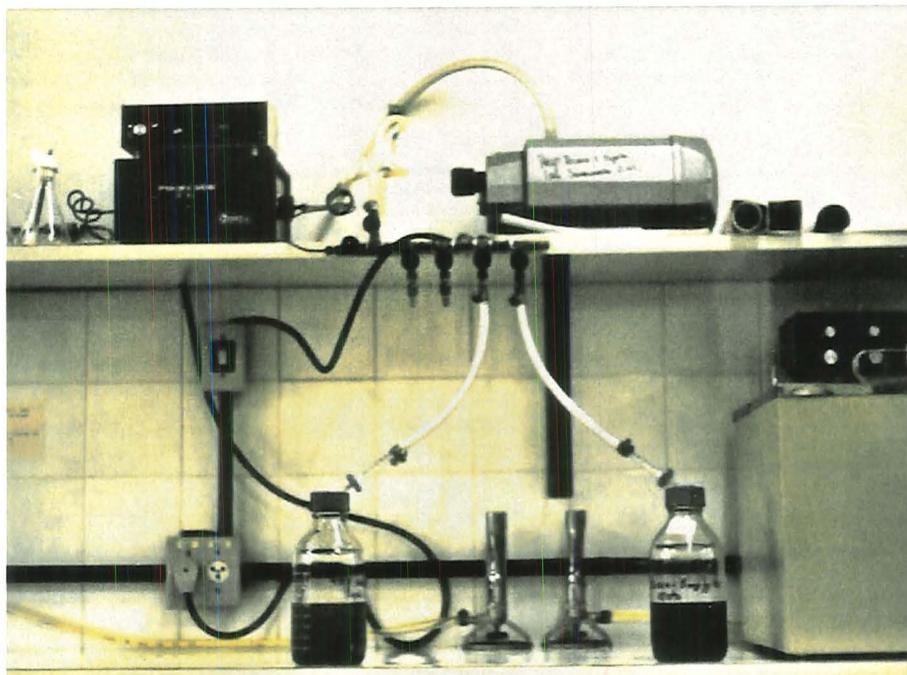


FIGURA 8 - Fotografia do sistema de distribuição simultânea de gases

4.2.2 - Coluna catalítica para remoção de traços de oxigênio dos gases

A coluna catalítica tinha por objetivo a remoção de traços de oxigênio presente nos gases utilizados no cultivo de anaeróbios estritos. A coluna era constituída de um cilindro de cobre com cerca de 20 cm de diâmetro, internamente preenchido com pedaços de cobre, segundo a CG-Equipamentos científicos. O cilindro era revestido com amianto e inserido em uma caixa de aço, que continha um sistema de aquecimento elétrico. A entrada dos gases era feita através de uma cânula de cobre ligada aos cilindros de gases. Outra cânula de cobre ligava a saída de gases da coluna catalítica e a entrada dos gases no sistema de distribuição simultânea de

gases. A coluna funcionava aquecida a 300°C, e o gás oxigênio era assim retido pela reação com o cobre reduzido. A reativação da coluna era feita a cada dois meses pela passagem da mistura gasosa 80% hidrogênio e 20% dióxido de carbono, a 300°C, por 10 horas.

4.2.3 Cromatógrafos

Para análise dos gases produzidos pela atividade bacteriana, foi utilizado cromatógrafo a gás da marca Gow-Mac série 150. A coluna utilizada foi Porapak-Q (comprimento de 2 metros e diâmetro interno de 1/4", de 80 a 100 mesh) . O detetor era de condutividade térmica (série 150). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio super seco (White Martins), e o integrador era HP 3396 série II. Condições de operação dos aparelhos: vazão do gás de arraste 1mL; temperatura do detector, coluna e injetor, 55°C; corrente 150mA; volume de injeção 0,5 mL.

Para análise da degradação do PCP e metabólitos intermediários, também foi utilizada a cromatografia gasosa. Os experimentos para avaliação destes compostos utilizaram cromatógrafo da marca HP modelo 5890 série II. O detetor utilizado foi o IDE (captura de elétrons). Utilizou-se uma coluna capilar megabore, diâmetro de 0,53 mm, comprimento de 30 metros, espessura do filme 0,5 µm, marca Supelco. Os gases utilizados foram hidrogênio (arraste) e o nitrogênio ("make up"). O integrador utilizado foi um computador PC - Pentium 100 da marca HP, e o programa era o Chemstation-HP5890A. As FIGURAS 9 e 10 mostram, respectivamente , os cromatógrafos Gow-Mac e HP5890 série II.



FIGURA 9: Cromatógrafo Gow-Mac.

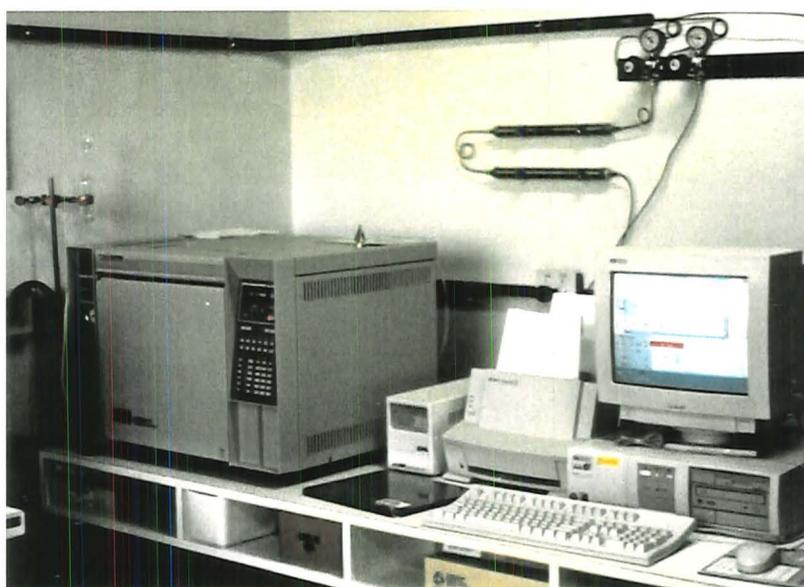


FIGURA 10: Cromatógrafo HP 5890 série II.

4.2.4 Centrífuga e microcentrífuga

Foi utilizada centrífuga para preparação do inóculo e análise de sólidos suspensos voláteis. A microcentrífuga foi utilizada na preparação de amostras para cromatografia gasosa de alta resolução, microscopia ótica e eletrônica de varredura. As marcas e modelos das centrífuga e microcentrífuga eram, respectivamente, Fanen modelo 215 e Fanen modelo 212.

4.2.5 Microscópios

As análises das amostras por microscopia ótica comum, de contraste de fase, e fluorescência foram realizadas em aparelho da marca Olympus modelo BHT.

As análises das amostras por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em aparelho da marca Zeiss, modelo DSM-960 em 20 KV e fotografadas com um vídeo processador de cópias Mitsubishi, com chapa fotográfica CK 100s. Para o recobrimento das amostras com ouro foi utilizado um metalizador da marca Balzers modelo SDC 050.

As fotomicrografias de microscopia ótica realizadas empregaram filmes Kodak ou Fujifilm - asa 100 e 400 e as fotomicrografias de microscopia eletrônica Fujifilm NEOPAN SS - 120.

As FIGURAS 11 e 12 mostram os microscópios ótico e eletrônico, respectivamente.

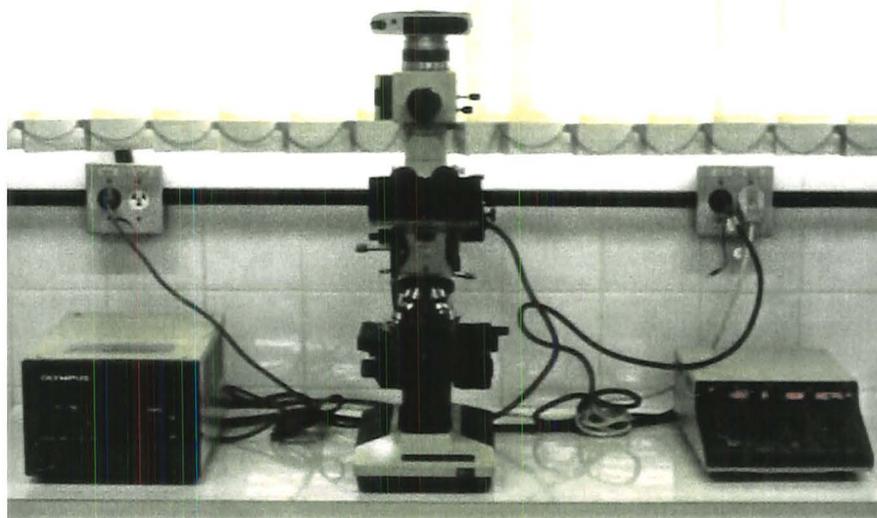


FIGURA 11: Microscópio ótico marca Olympus modelo BHT.

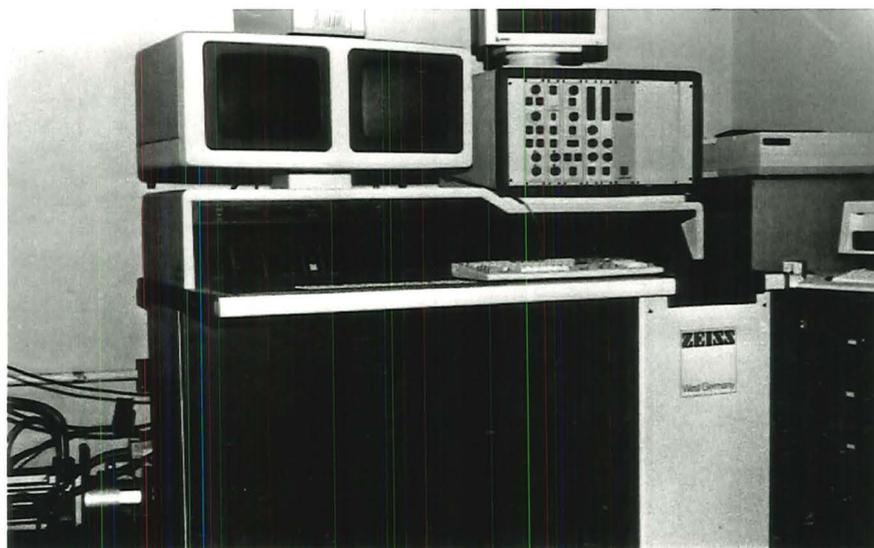


FIGURA 12: Microscópio eletrônico marca Zeiss modelo DSM - 960

4.2.6 Manômetro

A medida de pressão interna dos reatores foi realizada utilizando manômetro digital que media a pressão em mmHg. Este aparelho foi desenvolvido por técnicos do Laboratório de Fenômenos de Transporte da Universidade de São Paulo - Campus São Carlos.

O manômetro era constituído de um módulo eletrônico de onde saía uma mangueira na qual estava acoplada uma agulha. Esta agulha era inserida nos frascos para realização das leituras de pressão. O manômetro está ilustrado na FIGURA 13.

Para a realização das medidas, uma agulha estéril era inserida nos frascos através das tampas de borracha de butila e, assim que o manômetro estabilizasse, a leitura era realizada.

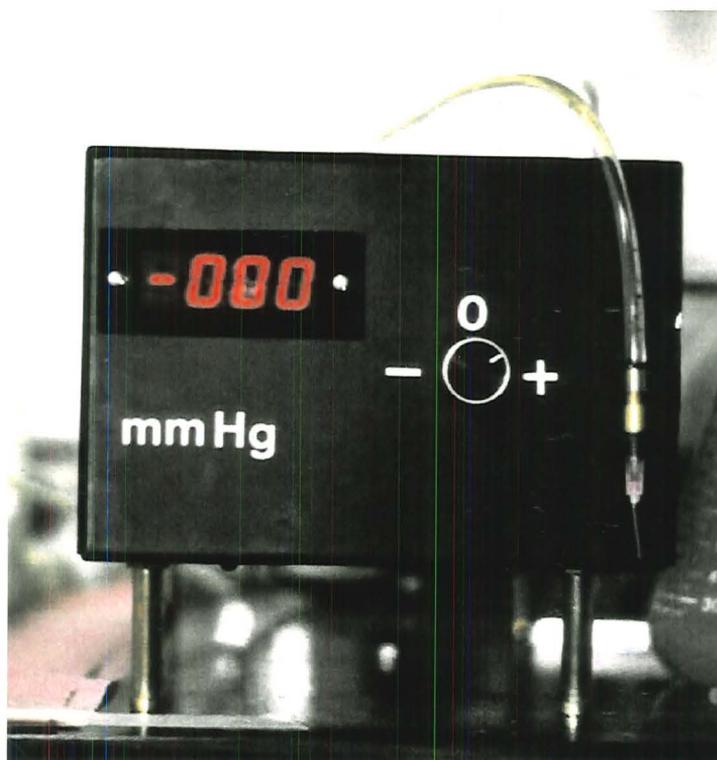


FIGURA 13: Manômetro digital.

4.2.7 Outros equipamentos

Foram utilizadas autoclaves verticais, destiladores de água e aparelho da Millipore para fornecimento de água padrão Milli-Q. Balanças analíticas foram utilizadas na pesagem de reagentes. Na homogeneização de soluções utilizou-se placa magnética aquecida, e para tubos de ensaio a homogeneização foi feita no aparelho Vortex. As medidas de pH foram feitas em aparelhos da marca Micronal.

Os reatores foram mantidos abrigados da luz, em temperatura controlada ($35^{\circ}\text{C} \pm 1$) e sob agitação constante (60 rpm). Para isso, foi utilizado um agitador com temperatura controlada da marca Superohm, modelo G-25, ilustrado na FIGURA 14.



FIGURA 14: Agitador com temperatura controlada da marca Superohm modelo G-25.

4.2.8 Vidraria e outros materiais

Para a realização dos experimentos foram empregados diferentes tipos de frascos, a saber: frascos de antibióticos de 20, 30 e 50 mL, frascos de vidro borossilicato de 250 mL, frascos de Duran da marca SCHOTT de 1.000 mL.

Foram utilizados para soluções estoque, balões de vidro de fundo chato de 250 e 500 mL, e frascos de antibiótico de 30 mL. Para preparação do meio de cultura foram empregados erlenmeyers de 1.000 e 2.000 mL e balões de fundo chato de 1.000 mL.

Os frascos de antibiótico e os frascos de 250 mL utilizados como reatores eram vedados com batoques de borracha de butila, marca Wheaton, revestidos internamente com teflon, e lacrados com lacres de alumínio, utilizando-se lacrador manual. Os frascos de 1.000 mL utilizados como reatores eram fechados com tampas de rosca de abertura central e batoques de borracha de butila. As FIGURAs 15 e 16 mostram, respectivamente, os frascos de 250 mL e 1.000 mL.

Foram utilizadas pipetas de vidro com diferentes volumes na preparação e distribuição dos meios de cultura e soluções. Pipetas eletrônicas Rainin® modelo epd2 e micropipetas Gilson® também foram utilizadas na preparação das amostras para análise cromatográfica. Na maioria das inoculações e adições de soluções aos meios de cultura e retiradas de amostra, empregou-se seringas estéreis de insulina descartáveis e de vidro de 1mL da B&D®. Seringas de 3, 5, 10 e 20 mL foram utilizadas para retiradas de amostras de maior volume.

Nas análises cromatográficas, para avaliação dos gases presentes na atmosfera dos reatores foram empregadas seringas Hamilton-Gastight de 1 mL. Uma válvula Mininert, colocada entre a seringa e a agulha, também foi utilizada. As

amostras líquidas, analisadas por cromatografia gasosa, foram injetadas com uma seringa de vidro de 10 µl da marca HP modelo 9301-0246.

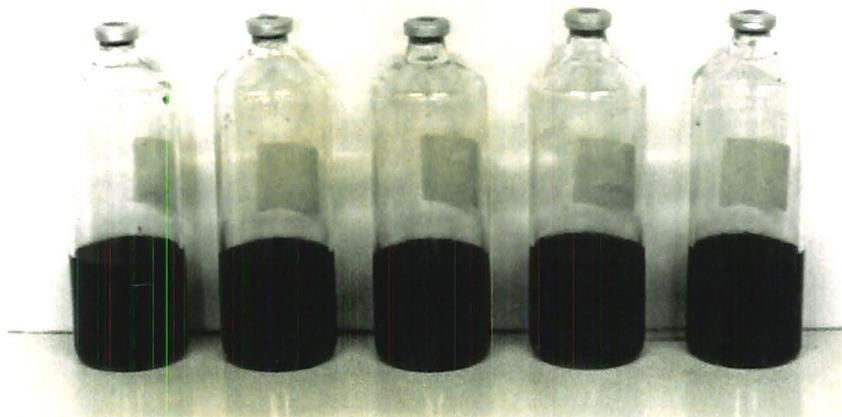


FIGURA 15: Frascos-reatores de 250 mL - ensaio 1.

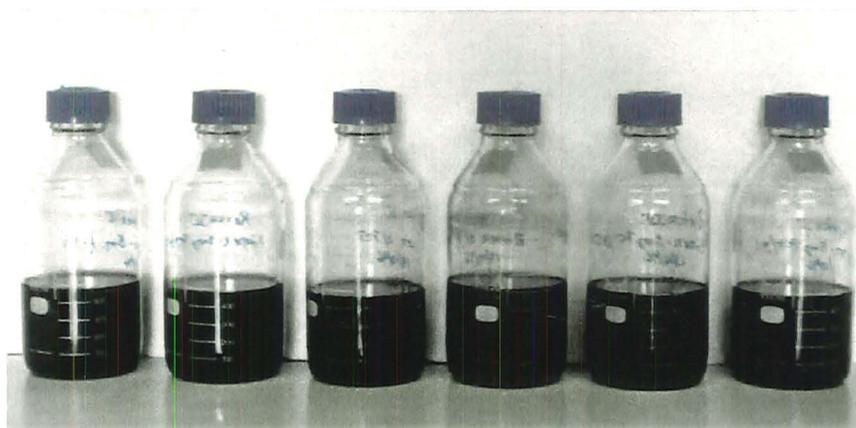


FIGURA16: Frascos-reatores de 1.000 mL - ensaio 2.

Os gases utilizados nos experimentos foram o nitrogênio puro - grau analítico e mistura gasosa de 70% nitrogênio e 30% dióxido de carbono, fornecidos pela White Martins.

4.3 Métodos experimentais

As técnicas utilizadas foram baseadas na literatura disponível sobre a manipulação de anaeróbios estritos (HUNGATE, 1969; BRYANT, 1972; MILLER e WOLIN, 1974; BALCH et al., 1977), bem como nas técnicas comumente utilizadas no Laboratório de Processos Anaeróbios - Área de Microbiologia (DUBOURGUIER, 1987), do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP.

4.3.1 Procedimentos para a preparação, distribuição e preservação do meio de cultivo e soluções estoque

4.3.1.1 Composição e preparação do meio de cultivo utilizado e soluções estoque

4.3.1.1.1 Composição e preparo do meio de cultivo

O meio de cultura empregado no presente trabalho foi o Zinder (ZINDER et al., 1984). A característica deste meio é possuir uma composição básica que pode ser acrescida de outras substâncias, orgânicas ou inorgânicas, se necessário. A TABELA 8 apresenta a composição do meio Zinder.

O meio Zinder era preparado em erlenmeyers de volume igual a 1.000 mL e os componentes eram adicionados a 500 mL de água padrão Milli-Q (volume final de meio de cultura) de acordo com a ordem apresentada na TABELA 8. Após a homogeneização dos componentes, propiciava-se o borbulhamento de nitrogênio 100% por 30 minutos. Mantendo-se o fluxo de nitrogênio no meio de cultivo,

distribuíam-se os volumes desejados (83 mL nos frascos do ensaio 1 e 400 mL nos frascos do ensaio 2). Os frascos eram mantidos, durante a distribuição do meio, sob fluxo de 100% de nitrogênio, através do sistema de distribuição simultânea de gases.

TABELA 8: Composição do meio Zinder.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000 mL de água padrão Milli-Q
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g
solução de resazurina 0,1 %	1,0 mL
solução traço de metais	10,0 mL

Fonte: Adaptado de ZINDER et al.* apud VAZOLLER, 1995

Após o fechamento, os frascos eram esterilizados por autoclavação a 120°C por 20 minutos e 15 psi, a atmosfera era trocada, sob pressurização, para 70% de nitrogênio e 30% de dióxido de carbono, antes das demais soluções e inoculação. Os frascos submetidos a troca de atmosfera gasosa eram ligados ao sistema de distribuição simultânea de gases através de filtros, seringas e agulhas, e a realização de pressão negativa, através de uma bomba de vácuo, lavava a atmosfera de 100% nitrogênio. A entrada da mistura gasosa era então promovida. Este procedimento era realizado várias vezes. Antes da adição das demais soluções os frascos eram despressurizados. Os frascos lacrados e esterilizados foram mantidos estocados, até o

* ZINDER, S.H. ;CARDWELL,S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.;KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotherix* sp. as na important acetoclastic methanogen. Appl Environ Microbiol, 47:796-807 apud VAZOLLER, R.F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofilicas. São Carlos, 1995. 259p. [Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica & Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo].

momento de sua utilização, sob atmosfera de 100% nitrogênio, abrigados da luz e a temperatura ambiente.

4.3.1.1.2 Preparação da solução traço de metais

A solução traço de metais era preparada adicionando-se primeiramente o NTA na água padrão Milli-Q, seguido pelos outros componentes como observado na TABELA 9. O pH era ajustado para 7,0 com uma solução de KOH 10 M. A solução era mantida sob refrigeração em frascos de soro de 250 mL, fechados com rolhas de borracha e tampas de rosca. A retirada de volumes para preparação do meio de cultivo era feita sob condições de assepsia.

TABELA 9: Composição da solução traço de metais - meio Zinder.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000 mL de água padrão Milli-Q
NTA	4,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,086 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21 g
H ₃ BO ₃	0,19 g
NiCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g

Fonte: Adaptado de ZINDER et al.* apud VAZOLLER, 1995

* ZINDER, S.H. ;CARDWELL,S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.;KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotherix* sp. as the important acetoclastic methanogen. Appl Environ Microbiol, 47:796-807 apud VAZOLLER, R.F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 1995. 259p. [Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica & Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo].

4.3.1.1.3 Preparação das soluções estoque

O meio basal era acrescido de soluções estoque após autoclavação. Para manutenção do pH adicionava-se ao meio uma solução de bicarbonato de sódio a 10%, seguida da solução de vitaminas descrita na TABELA 10. A solução de bicarbonato de sódio 10% era previamente preparada e distribuída em frascos de antibiótico de 30 mL, sob fluxo de 100% de nitrogênio e, após autoclavação por 20 minutos a 120°C e 15 psi, era estocada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

TABELA 10: Composição da solução de vitaminas.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000 mL de água padrão Milli-Q
biotina	0,002 g
ácido fólico	0,002 g
tiamina.HCl	0,005 g
riboflavina	0,005 g
ácido nicotínico	0,005 g
pantotenato de cálcio	0,005 g
piridoxina.HCl	0,010 g
vitamina B ₁₂	0,0001 g
ácido lipóico	0,005 g

Fonte: Adaptado de TOUZEL e ALBAGNAC* apud VAZOLLER, 1995.

A solução indicadora do potencial de oxi-redução do meio de cultivo foi a de resazurina 0,1%, era preparada pesando-se 1g do corante resazurina e diluindo-o em 100 mL de água. A solução indicadora era mantida sob refrigeração, em frasco âmbar.

* TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. FEMS Microbiology Letters, 16:241-245 apud VAZOLLER, R.F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 1995. 259p. [Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica & Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo].

A redução do meio de cultura era feita pela adição de uma solução redutora, mantida em estoque, composta de sulfeto de sódio. No preparo desta solução, 5,0 g de sulfeto de sódio. $9 \text{ H}_2\text{O}$ eram dissolvidos em 100 mL de água padrão Milli-Q. A solução era distribuída rapidamente em frascos de antibiótico de 30 mL, sob fluxo de 100% de nitrogênio. A esterilização da solução era feita por autoclavação ou filtração rápida em membrana $0,45 \mu\text{m}$ pelo sistema Milipore, sob condições de assepsia. A solução redutora estéril era mantida a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

4.3.1.1.4 Preparação das soluções estoque de substratos

As soluções de carbono empregadas nos trabalhos experimentais foram preparadas sob fluxo de 100% de nitrogênio. Quatro substâncias foram utilizadas como fonte de carbono, a saber: acetato, propionato, butirato e metanol.

A solução de acetato de sódio 2M foi preparada pesando-se o reagente e diluindo-o em água padrão Milli-Q, submetido ao fluxo de nitrogênio 100% por 10 a 15 minutos, e então a solução era distribuída em alíquotas de 20 mL em frascos de antibiótico de 30 mL sob fluxo de nitrogênio 100%. Após autoclavação por 20 minutos a 120°C e 15 psi, os frascos eram estocados ao abrigo da luz.

As soluções de propionato de sódio e butirato de sódio foram preparadas a partir dos ácidos butírico e propiônico, respectivamente. Os ácidos eram neutralizados com uma solução de hidróxido de sódio, para a formação do sal desejado.

Para a preparação de 200 mL de uma solução de propionato de sódio 2M, 100 mL de ácido propiônico 4M eram neutralizados com 100 mL de hidróxido de

sódio 4M e o pH corrigido para 9,58. Feito isso, a solução era submetida ao fluxo de nitrogênio 100% por 10 a 15 minutos e distribuída em frascos de antibiótico em alíquotas de 20 mL. A esterilização era feita através de autoclavação por 20 minutos a 120°C e 15 psi e os frascos eram estocados ao abrigo da luz.

Para a preparação de 200 mL de uma solução de butirato de sódio 2M, 100 mL de ácido butírico 4M eram neutralizados com 100 mL de hidróxido de sódio 4M e o pH corrigido para 9,55. Feito isso, a solução era submetida ao fluxo de nitrogênio 100% por 10 a 15 minutos e distribuída em frascos de antibiótico em alíquotas de 20 mL. A esterilização era feita através de autoclavação por 20 minutos a 120°C e 15 psi e os frascos eram estocados ao abrigo da luz.

A solução de metanol 2M era preparada após autoclavação em separado da água padrão Milli-Q e do álcool. Para preparação de 100 mL de solução, 8 mL de metanol eram adicionados em 92 mL de água. Os volumes necessários para a formulação da solução estoque eram tomados em seringas estéreis e transferidos para um frasco estéril, fechado sob atmosfera de 100% nitrogênio. Após a homogeneização da mistura, os frascos eram estocados a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A TABELA 11 mostra os reagentes, as concentrações das soluções estoque e as concentrações finais no meio de cultivo das fontes de carbono.

TABELA 11: Reagentes e suas concentrações nas soluções estoque e nos reatores.

Reagentes	Concentração da solução estoque (Molar)	Concentração final das fontes de carbono no meio de cultivo (mM)
Acetato de sódio	2	40
Propionato de sódio	2	20
Butirato de sódio	2	20
Metanol	2	40

4.3.2 Procedimento para o enriquecimento e cultivo das culturas enriquecidas

Foram realizados dois ensaios nas mesmas condições de operação, diferenciando-se apenas o volume dos reatores. Os ensaios foram denominados ensaio 1 e ensaio 2 com reatores de 250 e 1.000 mL respectivamente.

4.3.2.1 Procedimento para inoculação

O enriquecimento das culturas foi feito a partir do inóculo retirado de um reator previamente alimentado com PCP, que já havia apresentado inibição (BOLAÑOS ROJAS, 1997). Este lodo não recebia nenhum tipo de substrato há 67 dias. Antes da realização do inóculo, o lodo foi realimentado com, aproximadamente, 40mM de acetato, 20 mM de propionato, 20 mM butirato e 40 mM de metanol. Somente quando o lodo produziu 70% de metano o inóculo foi realizado.

Na preparação do inóculo, o lodo foi retirado dos reatores através de uma pipeta invertida e depositado em um béquer previamente esterilizados. A amostra foi então homogeneizada e inoculada nos reatores sob condições de assepsia.

Para o cálculo do volume a ser inoculado em cada reator, foi realizada uma análise de SSV antes da coleta. A metodologia utilizada nesta análise foi a descrita por PENNA (1994).

4.3.2.2 Procedimento para o enriquecimento

As técnicas de enriquecimento empregaram o meio basal Zinder, suplementado por fontes de carbono precursoras direta e indiretas da produção de

metano, e portanto, estimuladoras do crescimento bacteriano de culturas acidogênicas e metanogênicas.

No ensaio 1, volumes de 83 mL do meio de cultura foram distribuídos em frascos de 250 mL, e após autoclavação foram adicionadas soluções de bicarbonato de sódio, vitaminas, solução redutora e das fontes de carbono, retiradas das soluções estoque. O volume de lodo inoculado foi de 8 mL, totalizando 100 mL de volume ocupado no reator. As concentrações das soluções estoque e volumes inoculados no ensaio 1 são apresentados na TABELA 12.

TABELA 12:- Concentração das soluções estoque e volumes inoculados nos reatores - ensaio 1.

Reagente	Concentração das soluções estoque	Volumes inoculados
Bicarbonato de sódio	10 %	1 mL
Vitaminas	-	1 mL
Solução redutora	2%	1 mL
Metanol	2M	2 mL
Acetato de sódio	2M	2 mL
Propionato de sódio	2M	1 mL
Butirato de sódio	2M	1 mL

No ensaio 2, volumes de 400 mL do meio de cultura foram distribuídos em frascos de 1.000 mL, e após autoclavação foram acrescidos de soluções de bicarbonato de sódio, vitaminas, solução redutora e das fontes de carbono, retiradas das soluções estoque. O volume de lodo inoculado foi de 64 mL, totalizando 500 mL de volume ocupado no reator. As concentrações das soluções estoque e volumes inoculados no ensaio 2 são apresentados na TABELA 13.

TABELA 13: Concentração das soluções estoque e volumes inoculados nos reatores - ensaio 2

Reagente	Concentração das soluções estoque	Volumes inoculados
Bicarbonato de sódio	10 %	5 mL
Vitaminas	-	5 mL
Solução redutora	2%	5 mL
Metanol	20M	1 mL
Acetato de sódio	2M	10 mL
Propionato de sódio	2M	5 mL
Butirato de sódio	2M	5 mL

Os lodos foram inoculados imediatamente após a coleta. A quantidade de inóculo foi calculada baseada nos dados obtidos na análise de SSV, de forma a manter a relação entre concentração de PCP e quantidade de células em 5 mg PCP/g SSV.

Os enriquecimentos foram acompanhados por análises cromatográficas dos gases produzidos, decaimento do PCP, surgimento de intermediários e quantidade de gás produzido. As análises através de microscopia de luz comum, por contraste de fase e fluorescência, foram feitas durante todo o enriquecimento. As análises através de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas somente no final dos enriquecimentos.

4.3.3 Procedimentos para análises microscópicas

As amostras analisadas microscópicamente foram: lodo utilizado como inóculo e culturas obtidas durante os ensaios de enriquecimento.

Nas análises sob microscopia ótica de luz comum e por contraste de fase das amostras cultivadas por enriquecimento, alíquotas eram retiradas dos reatores com seringas de insulina previamente lavadas com nitrogênio 100%, centrifugadas e

resuspensas em água destilada ou diretamente dispostas entre lâmina e lamínula. Foi utilizada uma técnica de preparação de lâminas em que uma solução 2% de ágar liquefeito era disposto na superfície da lâmina e, após solidificação, a alíquota da amostra era derramada sobre a superfície gelatinosa, e uma lamínula colocada sobre a amostra a ser analisada. Essa técnica descrita pela DSM* apud VAZOLLER (1995) possibilitava que o excesso de água fosse absorvido pela gelatina, melhorando a qualidade da observação e realização de fotografias.

As análises sob microscopia de fluorescência, empregando-se uma lâmpada de ultravioleta, eram feitas rapidamente colocando-se diretamente na lâmina alíquotas do meio cultivado e cobrindo-as com lamínula. A ocorrência de fluorescência indicava a presença de bactérias metanogênicas, cujas células em boas condições de crescimento fluoesciam na cor azul esverdeada.

Para análise sob microscopia eletrônica de varredura, as amostras sofriam tratamento prévio antes da observação. Inicialmente as amostras eram fixadas em solução de glutaraldeído (SIGMA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) por um período de 5 horas, à temperatura de 4°C. Após fixação, as amostras eram submetidas a lavagem em tampão fosfato gelado 0,1M (pH 7,3) por 10 minutos. Repetiu-se essa lavagem por mais duas vezes. A seguir o material foi desidratado numa série gradativa de alcoóis em diversas concentrações (50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100%), permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma das concentrações. Repetiu-se a desidratação em

* DSM - DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKRRORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH-DSM (1991).Curso: Scientific services of cultures collections - The DSM experience. Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello". Campinas -SP apud VAZOLLER, R.F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 1995. 259p. [Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica & Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo].

álcool 100% mais duas vezes. Desidratadas, as amostras eram secas com HMDS (hexametildisilano). Para tanto, adicionou-se o HMDS (menos de 0,5 mL) ao material por 30 segundos, 2 vezes seguidas. O HMDS foi rapidamente retirado e as amostras foram secas à temperatura ambiente por 10 minutos. Depois de secas, as amostras foram coladas utilizando esmalte incolor para unhas, em suportes específicos de alumínio. Antes da observação as amostras foram recobertas por uma camada de ouro (99,99%) num metalizador.

Esta metodologia foi desenvolvida por NATION (1983) e modificada por ARAÚJO (1995).

As observações feitas através de microscopia ótica foram realizadas com o seguinte aumento: ocular 10, objetiva 100 e zoom de 1,25. Nas análises realizadas através de microscopia eletrônica de varredura o aumento obtido variou de 3.000 a 30.000x.

4.3.4 Procedimento para as análises cromatográficas

4.3.4.1 Análises cromatográficas da produção de metano

O gás metano produzido pelo metabolismo bacteriano foi determinado por cromatografia gasosa. As amostras eram retiradas rotineiramente após medida de pressão seguida de purga do gás. Padronizou-se a retirada de 0,50 mL da atmosfera dos frascos, sob condições estéreis. As agulhas adaptadas à seringa e à válvula Mininert para as injeções no cromatógrafo eram previamente esterilizadas por

autoclavação; as tampas dos frascos eram molhadas em álcool etílico e flambadas imediatamente antes da coleta.

Os resultados obtidos foram expressos em moles/L. Para a determinação quantitativa foi preparada uma curva de calibração utilizando um padrão de metano $97\pm 1\%$. A curva de calibração foi traçada utilizando-se os valores das áreas medidas pelo cromatógrafo versus a concentração injetada expressa $\mu\text{moles/L}$. A curva de calibração é apresentada no anexo A.

4.3.4.2 Análises cromatográficas dos compostos organoclorados

As análises da degradação bacteriana do PCP e formação de possíveis metabólitos intermediários também foram feitas por cromatografia gasosa, segundo a técnica desenvolvida por DAMIANOVIC (1997). As amostras eram retiradas em intervalos aleatórios e preservadas por congelamento. Os intervalos de coleta, ilustrados nas TABELAS 19 e 20 - ANEXO B, foram determinados pelo surgimento de variantes morfológicas de células (formas esporuladas) e pelas realimentações realizadas com PCP (amostragem antes e após adição de PCP). Na preparação das amostras, após descongeladas, alíquotas de 1,5 mL eram centrifugadas em “ependorfs” a 1600 rpm por 5 minutos, a fim de retirar o material em suspensão. 0,70 mL (volume padronizado para análise) do sobrenadante eram transferidos para outro frasco e então eram adicionados 0,15 g de NaCl para diminuir a solubilidade do composto orgânico na amostra. A amostra era acidificada através da adição de duas gotas de ácido sulfúrico 1M, garantindo assim, que o PCP ficaria na forma ácida (covalente) e, portanto, solúvel em solvente orgânico (hexano), utilizado para a extração, que foi também adicionado. Feito isto, amostra era agitada no aparelho

Apesar de, DAMINOVIC (1997) ter relatado a baixa absorção do PCP em vidro e poliuretano, os frascos utilizados como reatores foram confeccionados em vidro borossilicato e lacrados com rolhas revestidas de Teflon ®.

Convém salientar que, para todas as amostras e padrões, foi feita somente uma extração.

Os resultados obtidos foram expressos em mg/L. Para isso foram preparadas curvas de calibração para o PCP, TCP e DCP. As soluções padrão foram preparadas em água Milli-Q em diversas concentrações e injetadas no cromatógrafo. As curvas de calibração foram traçadas utilizando-se os valores da área medida pelo cromatógrafo versus a concentração injetada expressa em mg/L. As curvas de calibração são apresentadas no anexo A.

Não foi possível preparar as curvas de calibração e determinar o tempo de retenção do TeCP e MCP devido a indisponibilidade de padrões específicos. Outro problema encontrado foi a impossibilidade de identificar os isômeros de um mesmo composto.

É importante comentar que o limite de detecção para o TCP foi de 0,004 mg/L e para o DCP 0,002 mg/L. Concentrações encontradas abaixo destes valores foram consideradas como traço. Para a elaboração das tabelas e gráficos os valores obtidos abaixo dos limites de detecção foram igualados aos respectivos limites.

Um cromatograma típico é mostrado no anexo A.

4.3.5 Procedimentos para o cálculo da concentração de metano produzido com a utilização dos valores de pressão antes da purga

Antes da retirada das amostras para cromatografia do biogás, realizava-se a purga dos gases até que a pressão interna dos reatores igualasse com a pressão atmosférica.

Quando este procedimento era realizado ocorria a perda de massa de metano e, portanto, fazia-se necessária a correção dos valores obtidos nas análises cromatográficas por meio do cálculo dos valores de concentração de metano perdido..

Tal correção era feita da seguinte maneira:

- Considerando gás ideal: $P_{x_{CH_4}} = C_{CH_4} \cdot R \cdot T$

Após o dreno, a fração molar (x_{CH_4}) é a mesma

Antes da purga	Depois da purga
$x_{CH_4} = \frac{C_{CH_4 A} R T}{P_{lida}}$	$x_{CH_4} = \frac{C_{CH_4 D} R T}{P_{atmosférica}}$

Igualando : $C_{CH_4 D} = C_{CH_4 A} \cdot \frac{P_{atm}}{P_{lida}}$

ou

$$C_{CH_4 A} = C_{CH_4 D} \cdot \frac{P_{lida}}{P_{atm}}$$

Concentração perdida:

$$C_{CH_4 P} = C_{CH_4 A} - C_{CH_4 D}$$

Perda acumulada

$$C_{CH_4 P} = \sum C_{CH_4 P_i}$$

Concentração real:

$$C_{CH_4 R} = C_{CH_4 A} + \sum C_{CH_4 P_i}$$

5. Resultados e discussão

5.1. Procedimentos técnicos empregados

As condições experimentais implementadas no presente trabalho de pesquisa basearam-se nos artigos de MIKESSELL e BOYD (1986); NICHOLSON et al. (1992) e WU et al. (1993). As concentrações de ácidos orgânicos e metanol utilizadas basearam-se, principalmente, no trabalho de WU et al. (1993). Para efeito de comparação, a TABELA 14 ilustra as condições de ensaio, análises e alguns resultados apresentados por esses autores com os do trabalho em discussão.

As técnicas empregadas para a manutenção da anaerobiose, baseadas em DUBOURGUIER (1987) e VAZOLLER (1995), foram adequadas para o enriquecimento de anaeróbios nas condições estudadas. As análises cromatográficas para a determinação de PCP e dos gases metano e dióxido de carbono seguiram, respectivamente, os procedimentos de DAMIANOVIC (1997) e os tradicionalmente empregados no Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento - EESC - USP (Manual LPA - Análises qualitativa e quantitativa de gases produzidos durante a fermentação anaeróbia - no prelo, 1997).

TABELA 14: Dados comparativos entre o presente trabalho, MIKESELL e BOYD (1986); NICHOLSON et al. (1992) e WU et al. (1993)

PARÂMETROS	PRESENTE TRABALHO	MIKESELL e BOYD ¹	NICHOLSON et al. ¹	WU et al. ¹
CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO REATOR	descontínuo, agitação de 60 rpm, volumes de 250 mL e 500 mL	descontínuo, sem agitação, volume de 160 mL	descontínuo, com agitação, volume de 2.500 mL	UASB, volume total do sistema 325 mL
TEMPERATURA	35°C	37°C	31°C	28°C
MEIO DE CULTURA	meio basal ZINDER ²	não relatado	meio basal descrito por OWEN et al. (1979) ³	água residuária sintética
TIPOS BACTERIANOS RELATADOS	<i>Methanosarcina</i> sp., <i>Methanococcus</i> sp., <i>Methanothrix</i> sp., <i>Methanobacterium</i> sp., <i>Methanobrevibacter</i> sp	não relatado	não relatado	<i>Methanothrix</i> sp., <i>Methanosarcina</i> sp., <i>Methanobacterium</i> sp.
FONTES DE CARBONO (CO-SUBSTRATO)	acetato, propionato, butirato e metanol	nenhuma	acetato de sódio ⁴ , ácido acético ⁴ e bicarbonato	acetato, propionato, butirato e metanol
CONCENTRAÇÃO DE PCP	5,0 mg PCP/g SSV	40 µM	3,4 µM (0,9 mg/L)	2,5 a 20,0 mg PCP/L
MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DOS CLOROFENÓIS	cromatografia gasosa CG	cromatografia líquida - HPLC	cromatografia gasosa CG	cromatografia líquida - HPLC
CROMATÓGRAFO UTILIZADO	HP 5890 II	Waters associates, Inc.	HP 5890 A	não relatado

TABELA 14 (continuação): Dados comparativos entre o presente trabalho, MIKESELL e BOYD (1986); NICHOLSON et al. (1992) e WU et al. (1993)

<p>CONDIÇÕES DE ANÁLISE DO CROMATÓGRAFO</p>	<p>coluna SBP-5 com 0,53mm Ø e 30 m de comprimento, detector de captura de elétrons, gás de arraste hidrogênio 8 mL/min e nitrogênio 60 ml/min, temp. do injetor 280°C, temp. do detector 300°C</p>	<p>coluna C₁₈, detector UV, fase móvel acetonitrila e ácido acético aquoso</p>	<p>coluna capilar de sílica fundida DB-5, detector de captura de elétrons ⁶³Ni, gás de arraste 95% argônio e 5% metano, temp. do injetor 250°C, temp do detector 320°C</p>	<p>coluna Radial-Pak C₁₈, detector UV, fase móvel acetonitrila e ácido acético aquoso</p>
<p>INTERMEDIÁRIOS ENCONTRADOS</p>	<p>TCP; DCP obs: não foram identificados os diferentes isômeros.</p>	<p>2,3,4,6-TeCP; 2,3,5,6-TeCP; 2,3,5-TCP; 3,4,5-TCP; 2,4,6-TCP; 3,5-DCP; 3-CP</p>	<p>2,3,4,5-TeCP; 2,3,4,6-TeCP; 2,3,5,6-TeCP 3,4,5-TCP; 2,4,6-TCP; 2,4,5-TCP; 2,3,5-TCP 3,4-DCP 3,5-DCP 2,4-DCP 4-CP</p>	<p>3,4,5-TCP; 2,4,6-TCP; 3,5-DCP; 2,4-DCP</p>

Fontes: 1 MIKESELL e BOYD (1986); NICHOLSON et al. (1992) e WU et al. (1993); 2 ZINDER et al. (1984); 3 OWEN et al. (1979).
4 fonte orgânica adicionada como ácido e como sal.

O método de análise do PCP foi eficaz para avaliar o comportamento do lodo nas condições experimentais estudadas. Particularmente, a extração única do PCP das amostras analisadas esteve de acordo com as indicações de DAMIANOVIC (1997), considerando-se a concentração do composto estudada. O autor (DAMIANOVIC, 1997) sugeriu que concentrações de PCP da ordem de 4,0 e 10,0 mg/L no meio de cultura podem ser determinadas por uma única extração, pois a variação em relação aos resultados com duas extrações da mesma amostra foi de 10,5%, somando-se o fato de que o aumento da manipulação das amostras pode levar a um aumento da concentração do composto nas mesmas, devido ao caráter altamente volátil do extrator (hexano).

Os valores de clorofenóis calculados durante os enriquecimentos de culturas no presente trabalho foram obtidos a partir das curvas de calibração preparadas por DAMIANOVIC (1997), como apresentado no ANEXO A. A similaridade dos meios de cultivo, nos quais os clorofenóis (mistura de PCP, TCP e DCP) foram adicionados para a preparação das curvas de calibração, permitiram esse procedimento. O presente trabalho de pesquisa estudou a degradação do PCP em meio mineral descrito por ZINDER et al. (1984), e DAMIANOVIC (1997) estudou a degradação desse composto em meio ANGELIDAKI et al.* apud DAMIANOVIC (1997). As diferenças dos meios foram constatadas em relação às fontes orgânicas e suas concentrações, o primeiro empregou os ácidos acético, butírico e propiônico, bem como metanol; e o segundo, os ácidos acético e fórmico, glicose e extrato de levedura.

* ANGELIDAK et al. (1990). Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of inhibition upon addition of bentonit. *Appl. Microbiol and Biotch.*, 33:46472 apud DAMIANOVIC, M.H.R.Z. (1997). Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RHHLF). São Carlos. 174p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

As orientações referidas por DAMIANOVIC (1997) para análise do PCP foram também obedecidas durante a estocagem das amostras congeladas, ou seja, os testes realizados por esse autor, resultaram na certificação de que o congelamento das amostras não altera as propriedades para a determinação de PCP. No presente trabalho as amostras foram congeladas por períodos de tempo variáveis, mas nunca superiores a 23 dias

Outro aspecto a ser considerado é o relatado por DAMIANOVIC (1997), em relação a adsorção do PCP em um lodo anaeróbio. Os resultados do autor indicaram valores baixos de adsorção do composto no lodo, da ordem de μg , com ocorrência de posterior degradação. Assim, nesse trabalho não houve preocupação em avaliar a adsorção do composto no lodo, mas apenas determinar a presença dos clorofenóis ao longo do tempo do enriquecimento de culturas anaeróbias.

5.2 Enriquecimento das culturas em substratos orgânicos adicionados com PCP

Os ensaios de enriquecimento das culturas foram realizados com a finalidade de avaliar a influência do PCP no metabolismo dos lodos anaeróbios estudados, e a capacidade dos grupos bacterianos presentes nos lodos em degradar o PCP. Para isso, fontes energéticas precursoras diretas e indiretas da formação de metano foram acrescidas ao meio basal Zinder a fim de sustentar o crescimento celular e/ou servir como co-substrato durante a desalogenação redutiva da molécula de PCP. Os substratos orgânicos estudados foram escolhidos com base no trabalho realizado por WU et al. (1993), em que os autores testaram os compostos orgânicos ácidos acético,

propiónico, butírico e o álcool metanol (TABELA 14). A concentração inicial de PCP (5mg/gSSV) adicionada às amostras nos ensaios 1 e 2 foram também baseadas nos estudos de WU et al. (1993).

Os lodos utilizados como inóculo dos ensaios 1 e 2 foram retirados de um reator anaeróbio operado sob condição descontínua, que já havia apresentado inibição quando submetido a concentração de 10 mg/L de PCP (BOLAÑOS ROJAS, 1997⁶ e DAMIANOVIC, 1997). Previamente à utilização dos lodos, estes foram submetidos a uma alimentação contendo mistura de ácidos orgânicos sem PCP, e incubados por um período não superior a 13 dias, sob temperatura de 30°C. Os lodos foram inoculados após a verificação de 70% de metano na composição dos gases presentes na atmosfera do reator. As concentrações iniciais de sólidos em suspensão voláteis nos ensaios 1 e 2 foram próximas, respectivamente, de 0,83 e 1,02 gSSV/L.

Considerando as concentrações iniciais de PCP em mg/L, respectivamente para os ensaios 1 e 2, calculou-se 4,16 e 5mg/L, o que não diferiu de uma das quantidades estudadas por WU et al. (1993), em reatores contínuos do tipo UASB.

As FIGURAS de 18 a 25 (TABELAS 19 e 21, ANEXO B) apresentam os resultados do enriquecimento de lodos anaeróbios no ensaio 1 em sistemas mantidos sob anaerobiose, quanto a degradação de PCP e produção de metano. Esse ensaio, cuja duração de incubação foi aproximadamente 8 meses, compreende os quatro reatores operados sob mesmas condições, anteriormente descritas no item 4.2.7 do capítulo Materiais e Métodos.

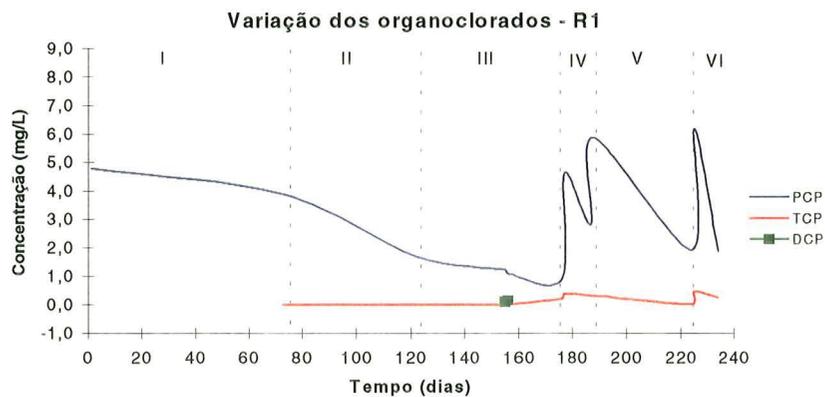


FIGURA 18: Gráfico da variação dos organoclorados reator R1 ensaio 1.

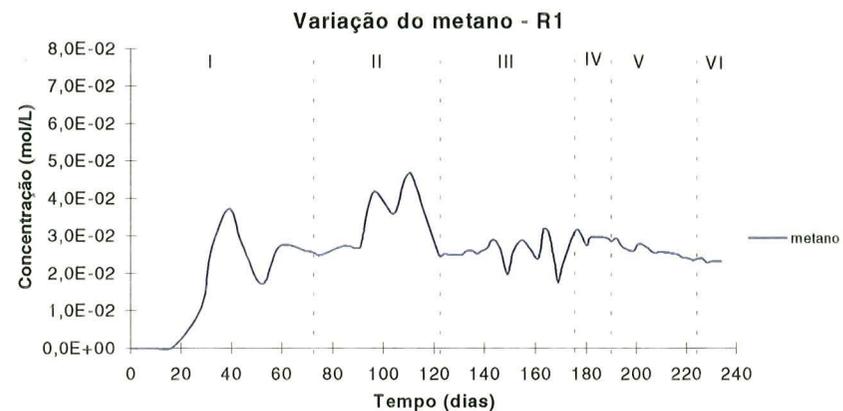


FIGURA 19: Gráfico da variação do metano reator R1 ensaio 1.

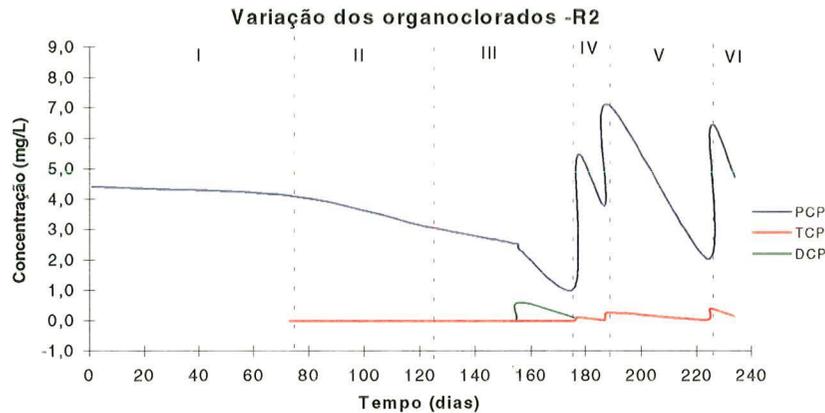


FIGURA 20: Gráfico da variação dos organoclorados reator R2 ensaio 1.

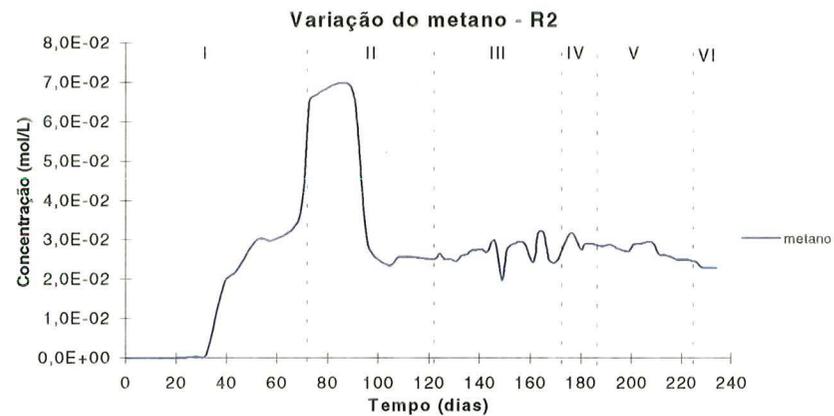


FIGURA 21: Gráfico da variação do metano reator R2 ensaio 1.

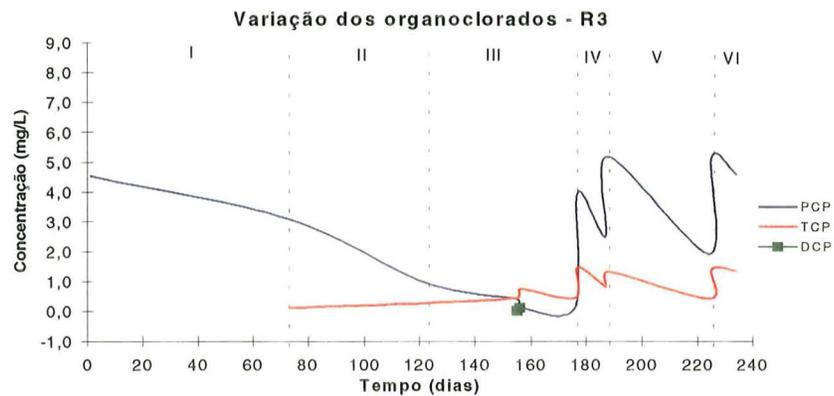


FIGURA 22: Gráfico da variação dos organoclorados reator R3 ensaio 1.

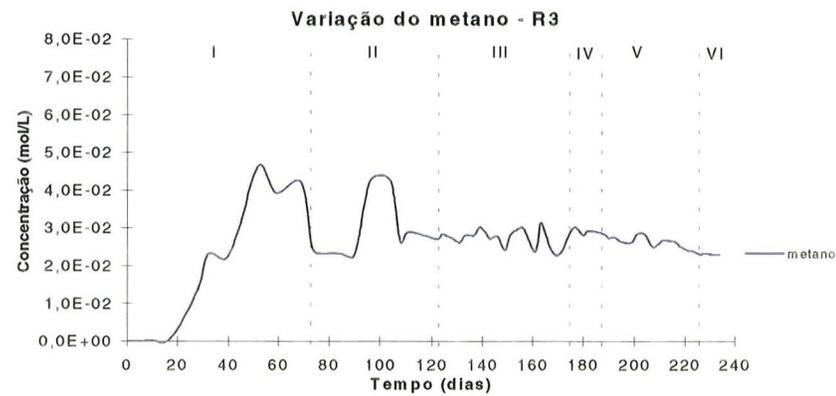


FIGURA 23: Gráfico da variação do metano reator R3 ensaio 1.

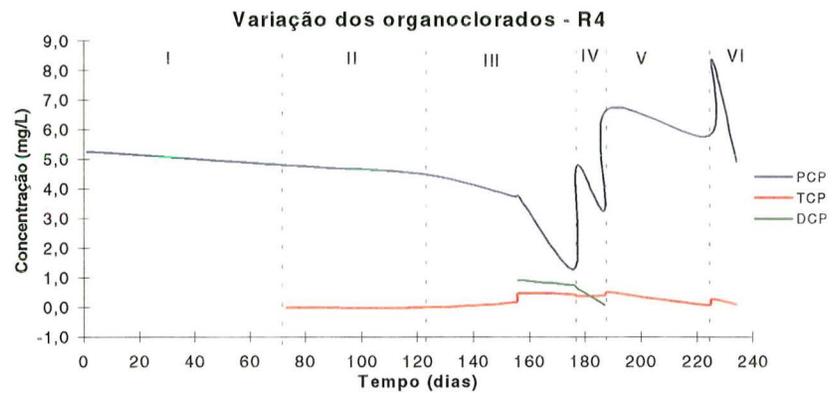


FIGURA 24: Gráfico da variação dos organoclorados reator R4 ensaio 1.

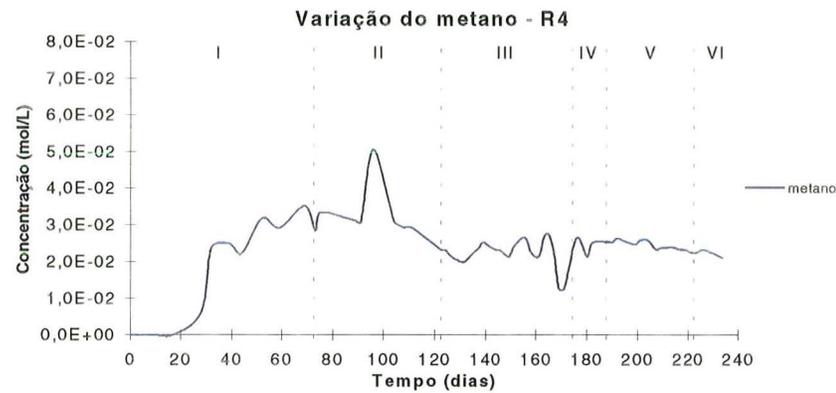


FIGURA 25: Gráfico da variação do metano reator R4 ensaio 1.

Nas figuras, a identificação de I a VI corresponde às fases de resposta dos sistemas após cada alimentação efetuada. As alimentações referentes às fases II e III consistiram de apenas ácidos orgânicos nas mesmas concentrações inicialmente adicionadas por g de SSV. Os outros períodos corresponderam a adição de PCP em metanol. Nos gráficos de produção de metano ao longo do tempo, também estão representados as fases referentes a cada alimentação.

Nesse ensaio, observa-se nas figuras referentes a variação da concentração do PCP devida a sua degradação ao longo do tempo, estimulada inicialmente pelas adições dos ácidos orgânicos nos períodos II e III. Avaliando-se as porcentagens de remoção do PCP nos reatores, nos primeiros 73 dias de incubação, a remoção foi mais elevada nos reatores 1 e 3, respectivamente de 19 e 31,8%. As TABELAS 15 e 16 mostram valores de remoção de PCP em porcentagem e em mg/L, considerando os intervalos de coleta para a determinação do PCP, bem como por dia de incubação.

TABELA 15: Taxas de remoção do PCP - ensaio 1.

AMOSTRA	DIAS	PCP (mg/L)	REMOÇÃO PERÍODO (%)	REMOÇÃO PERÍODO (mg/L)	ADIÇÃO PCP (mg/l)
R1	1	4,784	-	-	-
R1	73	3,875	19,0	0,91	-
R1	122	1,709	55,9	2,17	-
R1	155	1,237	27,6	0,47	-
R1	156	1,112	10,1	0,13	-
R1	176	0,902	18,9	0,21	-
R1	177	4,612	-	-	3,71
R1	187	2,832	38,6	1,78	-
R1	188	5,865	-	-	3,03
R1	224	1,927	67,1	3,94	-
R1	225	6,189	-	-	4,26
R1	234	1,869	69,8	4,32	-
R2	1	4,403	-	-	-
R2	73	4,119	6,5	0,28	-
R2	122	3,106	24,6	1,01	-
R2	155	2,518	18,9	0,59	-
R2	156	2,323	7,7	0,20	-
R2	176	1,092	53,0	1,23	-
R2	177	5,413	-	-	4,3
R2	187	3,805	29,7	1,61	-
R2	188	7,1	-	-	3,3
R2	224	2,027	71,5	5,07	-
R2	225	6,37	-	-	4,35
R2	234	4,739	25,6	1,63	-

TABELA 15 (continuação): Taxas de remoção do PCP - ensaio 1.

AMOSTRA	DIAS	PCP (mg/L)	REMOÇÃO PERÍODO (%)	REMOÇÃO PERÍODO (mg/L)	ADIÇÃO PCP (mg/l)
R3	1	4,538	-	-	-
R3	73	3,097	31,8	1,44	-
R3	122	0,958	69,1	2,14	-
R3	155	0,414	56,8	0,54	-
R3	156	0,142	65,7	0,27	-
R3	176	0,139	2,1	0,00	-
R3	177	3,964	-	-	3,82
R3	187	2,522	36,4	1,44	-
R3	188	5,193	-	-	2,67
R3	224	1,922	63,0	3,27	-
R3	225	5,18	-	-	3,25
R3	234	4,582	11,5	0,60	-
R4	1	5,267	-	-	-
R4	73	4,797	8,9	0,47	-
R4	122	4,506	6,1	0,29	-
R4	155	3,74	17,0	0,77	-
R4	156	3,775	-	-	-
R4	176	1,298	65,6	2,48	-
R4	177	4,764	-	-	3,46
R4	187	3,278	31,2	1,49	-
R4	188	6,689	-	-	3,41
R4	224	5,796	13,4	0,89	-
R4	225	8,364	-	-	2,56
R4	234	4,934	41,0	3,43	-

Após a segunda e a terceira alimentações, o decréscimo do PCP foi constatado nos reatores 1, 2 e 3, como pode ser observado nas FIGURAS 18, 20 e 22. As porcentagens de remoção aumentaram após a adição da segunda alimentação, particularmente nos reatores 1 e 3 (respectivamente, de 56 e 69%), e a diminuição do PCP continuou como uma resposta à terceira alimentação. Os valores de decaimento do PCP no reator 4 (FIGURA 24) não foram coerentes com os encontrados nas outras réplicas, apesar da variação dos valores de remoção entre as mesmas. Nesse reator, a remoção de PCP acima de 50% foi constatada apenas entre o 156^o. e o 176^o. dias de incubação.

Porém, os quatro reatores ao final de 176 dias de incubação apresentaram a remoção na faixa de 75 a 97%. As menores porcentagens podem ser explicadas por alguns fatores : - quantidade inicial de inóculo diferente nos sistemas, uma vez que lodos anaeróbios são geralmente constituídos por material floculento que pode dificultar a homogeneização dos mesmos antes da inoculação dos quatro reatores; - agitação insuficiente dos sistemas, em função das características dos inóculos. A variação das porcentagens de remoção entre as réplicas no período podem também ser relacionadas às justificativas anteriores.

Posteriormente a esse período, os quatro reatores receberam uma nova adição de PCP (IV), seguida por duas outras adições em intervalos curtos, estabelecidos aleatoriamente. A alimentação com PCP no 177^o. dia mostrou que os quatro sistemas responderam semelhantemente em 10 dias, com remoção do composto na faixa entre 30 e 40%. Na seqüência das adições, a remoção de cerca 60 a 70% em 36 dias de incubação foi observada apenas nos reatores 1, 2 e 3. A última alimentação ao longo de 9 dias de incubação revelou valores de remoção diferentes para os quatro reatores,

respectivamente de 69,8; 25,6; 11,5 e 41,0%. No entanto, a amostragem para análise cromatográfica do PCP não permitiu concluir se um maior período de incubação revelaria porcentagens maiores e semelhantes de remoção.

Além disso, se a alimentação com PCP nas fases IV e V revelou uma faixa crescente de remoção de PCP, aproximadamente 40 a 70% , respectivamente, a diminuição na taxa de remoção em VI poderia ser também explicada pela menor disponibilidade de elétrons nessa fase, após o período total de incubação. As diferenças na última alimentação podem ser atribuídas à menor presença de substratos doadores de elétrons para a ocorrência da desalogenação redutiva da molécula, pelo menos para os reatores 2, 3 e 4. Além disso, os ácidos adicionados durante o início dos enriquecimentos podem ter sido esgotados ao longo dos 176 dias de incubação, e a dinâmica metabólica do sistema, mesmo recebendo o PCP estaria também relacionada à disponibilidade de elétrons, não suprida pelo metanol. Nota-se que a remoção no reator 4 não foi novamente semelhante às demais réplicas, após a segunda alimentação com PCP.

O metanol adicionado em conjunto com o PCP, solvente desse composto, é também fonte direta do metano, pois arqueobactérias metanogênicas do gênero *Methanosarcina* sp. utilizam o álcool como fonte energética e conseqüente formação do gás metano (OREMLAND, 1988). No presente trabalho, contudo, não foi possível correlacioná-lo como doador de elétrons para a desalogenação redutiva do PCP, uma vez que, como será visto adiante, células metanogênicas típicas de meios contendo metanol se desenvolveram em abundância durante os enriquecimentos das quatro culturas. Na revisão de PEREIRA et al. (1992) os autores relataram a degradação de um alifático halogenado, o tetracloretileno (TCE), na presença de metanol sob

condições metanogênicas. ZINDER et al. (1991) verificaram em estudos preliminares sobre o enriquecimento de culturas em TCE e metanol, o predomínio de arqueobactérias metanogênicas do gênero *Methanosarcina* sp. WU et al. (1993), que estudaram fontes semelhantes às do trabalho em discussão, também não relacionaram o metanol como fonte responsável pela descloração da molécula de PCP nos ensaios com lodos granulados metanogênicos.

As taxas de remoção de PCP foram diferentes para os quatro sistemas, e nem sempre apresentaram o mesmo comportamento referente a remoção de PCP em intervalos iguais de incubação, em um mesmo reator. Nesse ponto, a discussão dos procedimentos analíticos cromatográficos para a determinação do PCP e seus produtos não pode ser negligenciada, e deve facilitar a explicação para essas diferenças nos reatores. Observando-se a TABELA 15, os valores iniciais de PCP nas alimentações IV, V e VI foram relativamente distintos entre si, considerando que a concentração adicionada de PCP era de 4,15 mg/L em todos os reatores. As variações nos valores estiveram próximas do coeficiente de variância indicado por DAMIANOVIC (1997), que em testes de reprodutibilidade de extração de PCP na concentração de 4,0 mg/L, em 6 análises de PCP em meio de cultivo, indicou 7,6% de variação. Considerando-se esse valor, os valores iniciais de PCP foram mais incoerentes para a alimentação da fase V dos quatro reatores, e também na fase VI do reator 4.

Os sistemas operaram próximo à condição descontínua de alimentação, e a concentração de PCP no meio de cultivo em I, era idêntica nos quatro reatores. A FIGURA 26 mostra os valores de metano no reator controle em relação aos acrescidos de PCP. Esses valores de metano correspondem a determinações

cromatográficas pontuais, ou seja, são valores obtidos a cada amostragem, e após purgar a pressão interna dos sistemas de reação. A FIGURA 27 mostra os valores de metano calculados a partir da determinação da pressão interna dos sistemas, nas fases de III a VI, e correspondem a quantidade real de metano formada nos reatores. A purga realizada antes de cada leitura, a fim de manter os reatores na pressão atmosférica, resultou na diminuição relativa dos gases formados, em alguns casos superior a 95%, mas, ainda assim, possibilitou a correlação da degradação do PCP e formação do metano nas fases I e II.

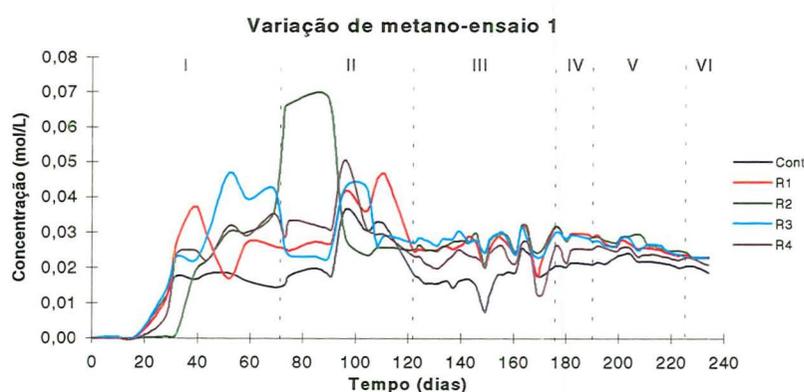


FIGURA 26: Gráfico da variação da produção pontual de metano no ensaio 1.

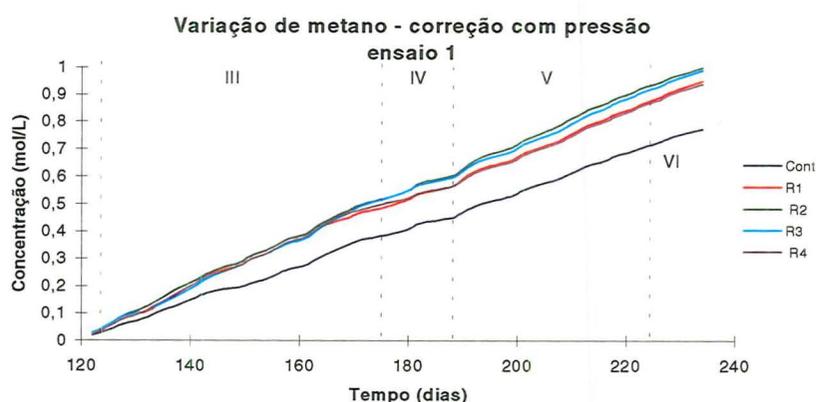


FIGURA 27: Gráfico da variação da produção de metano corrigida com a pressão ensaio 1.

Analisando-se a produção de metano das FIGURAS 19 a 25, observa-se que nos reatores 1, 3 e 4 esse gás atingiu valores máximos bastante semelhantes, da ordem de 0,050 moles/L após a primeira e segunda alimentações, e no reator 2 o valor foi de 0,070 moles/L.

Os quatro reatores, no entanto, após a terceira alimentação apresentaram valores de metano máximos próximos a 0,030 moles/L. A produção de metano nos sistemas, com pequenas variações, permaneceu em valores dessa ordem até o final do experimento (aproximadamente 8 meses). A FIGURA 26 revela que os valores de metano do reator controle foram menores do que os quatro reatores alimentados com PCP, mas as concentrações foram cerca 95% menores do que a calculada pela pressão, no final da fase III.

A FIGURA 27 acentua a resposta de maior produção de metano nos reatores de 1 a 4 em relação ao reator controle nas fases III a VI, em que as pressões foram avaliadas. As quantidades máximas de metano foram cerca de 1 mol/L. As quantidades somadas em conjunto das fontes orgânicas adicionadas nas alimentações e sua conversão estequiométrica a metano, resulta em valores teóricos de metano total nos sistemas da ordem de 0,82 moles/L (ver ANEXO B), e os valores determinados nos reatores 1 a 4, mostrados nessa Figura, superam o teórico, e são menores para o reator controle. Nesse ponto, seria possível argumentar que a presença do PCP pode ter influenciado as quantidades de metano produzidas durante o experimento, permitindo maiores concentrações de metano ao final do ensaio 1. WU et al. (1993) estudando a influência de mistura dos ácidos orgânicos acético, propiônico e butírico, bem como do metanol na degradação do PCP (1 a 2,5 mg/L), em lodos granulados não adaptados, verificaram que na presença do PCP o lodo

produziu quantidades sempre menores de metano do que as determinadas para o reator controle, em cerca de 200 dias de experimento. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram que lodos adaptados a PCP resultaram em uma resposta superior quando da adição de 1,0 mg/L de PCP em ensaios semelhantes aos anteriormente referidos, ou seja, o sistema produziu metano como no reator controle.

Uma característica importante a ser considerada em relação à produção de metano superior nos quatro reatores que receberam PCP em sua alimentação, estaria relacionada à dinâmica das reações nos reatores anaeróbios, ou seja, a degradação da matéria orgânica complexa nesses sistemas ocorre em etapas cujos produtos intermediários - ácidos orgânicos voláteis e álcoois - são então utilizados por determinados grupos de bactérias em direção à formação dos substratos metanogênicos (VAZOLLER, 1995). Assim, a degradação do PCP poderia estar ocorrendo na direção de propiciar um aumento dos intermediários metabólicos no sistema, com conseqüente aumento de precursores do metano, possibilitando maiores quantidades desse gás nos reatores estudados. Como comentado anteriormente, considerando as afirmações de BATHNAGAR e FATHEPURE (1992) para a degradação de aromáticos, "sob condições metanogênicas, os compostos aromáticos servem como substrato para comunidades com muitas espécies, ou consórcios microbianos, e pelo menos duas comunidades microbianas anaeróbias podem ser responsáveis pela degradação de compostos aromáticos, organismos atuantes na clivagem redutiva do anel aromático em ácidos alifáticos, e então a ácido acético, CO₂, H₂ etc., e as arqueobactérias metanogênicas que utilizam esses substratos para produzir CH₄".

A adaptação do lodo ao sistema com PCP é importante, pois define a não toxicidade do composto, porém, pode levar dias. NICHOLSON et al. (1992) mostraram que em baixas concentrações iniciais de PCP, cerca de 1,35 moles/L, um lodo anaeróbio foi capaz de degradar o composto após 5 dias de incubação, com 97% de degradação em 10 dias. Após 6 meses de incubação do lodo com PCP, a fase de adaptação desapareceu, e maiores concentrações de PCP foram facilmente degradadas a produtos como TeCP, TCP e DCP em menos de 1 dia. Os autores não comentaram a produção de metano. O presente trabalho mostrou diferenças no início de incubação dos quatro sistemas com PCP, porém é possível constatar que a fase para começar a degradação do composto foi superior a 50 dias (FIGURAS 18, 20, 22, e 24) Como também observado em relação a produção de metano (FIGURAS 19, 21, 23 e 25) foram necessários 20 dias para iniciar a produção do gás. Nesse período, os frascos sofreram séria variação na temperatura de incubação, ficando os reatores sujeitos a faixa de temperatura entre 20-25°C. A temperatura foi então mantida a 35°C, e metano foi produzido.

Como anteriormente observado, PCP começou a ser acentuadamente degradado nas fases II e III, após o acréscimo das novas alimentações de ácidos. Nas 6 fases, metano foi continuamente gerado (FIGURA 27) pela presença das fontes orgânicas, inclusive na fase I, em que PCP não foi degradado ou degradado lentamente (FIGURAS 18 a 25). Foi notável no ensaio, a maior produção de metano nos reatores que receberam a alimentação acrescida de PCP, e que, ao final de cerca 8 meses de operação, a produção ainda estava aumentando. O reator controle sempre esteve com valores de metano inferiores, mas é necessário ter o cuidado de avaliar o

ensaio apenas por um reator controle, considerando inóculos passíveis de diferenças marcantes.

Sem dúvida, a presença de PCP não influenciou o comportamento metanogênico do lodo, previamente submetido a concentrações de PCP elevadas (10 mg/L) e a capacidade de degradação do lodo foi observada na presença de ácidos orgânicos e do metanol. Destaca-se o fato de que a adição de metanol (fases IV, V e VI) pareceu favorecer o lodo na degradação do PCP. O metabolismo de desalogenação redutiva de um organoclorado em função da presença de substratos doadores de elétrons (MOHN e TIEDJE, 1992) pode ser indicado para o lodo metanogênico estudado no ensaio 1, sem contudo, afirmar a rota metabólica de degradação do PCP a metano.

Analisando-se os resultados obtidos durante o enriquecimento de culturas no ensaio 2 (FIGURAS 28 a 35 - TABELAS 20 e 22, ANEXO B) verifica-se que a degradação do PCP ocorreu em períodos inferiores de adaptação, em relação ao ensaio 1. No ensaio 2, os procedimentos para avaliar a degradação do PCP foram semelhantes ao ensaio 1, exceto pelo volume dos reatores. A escolha em estudar o enriquecimento em reatores de maior volume foi feita a fim de minimizar possíveis erros na leitura de amostras gasosas e líquidas durante as análises dos produtos, uma vez que o ensaio teria um menor período de duração (aproximadamente 3 meses) e um maior número de amostras. As fases que correspondem a primeira e segunda alimentações estão marcadas nas FIGURAS como I e II, respectivamente.

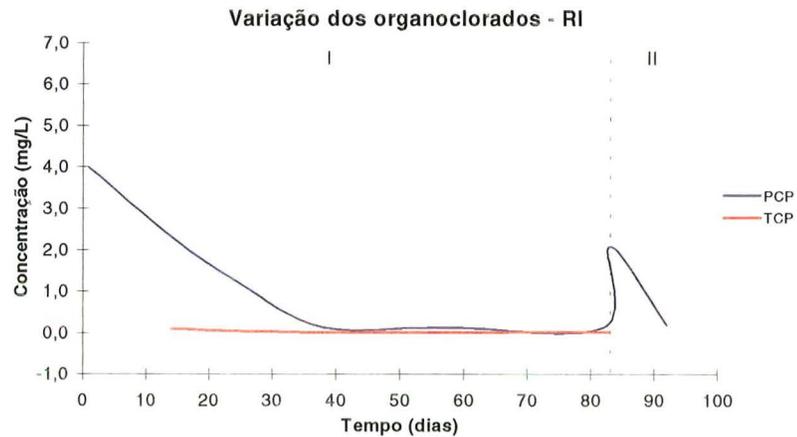


FIGURA 28: Gráfico da variação dos organoclorados reator RI ensaio 2.
Obs: DCP não detectado

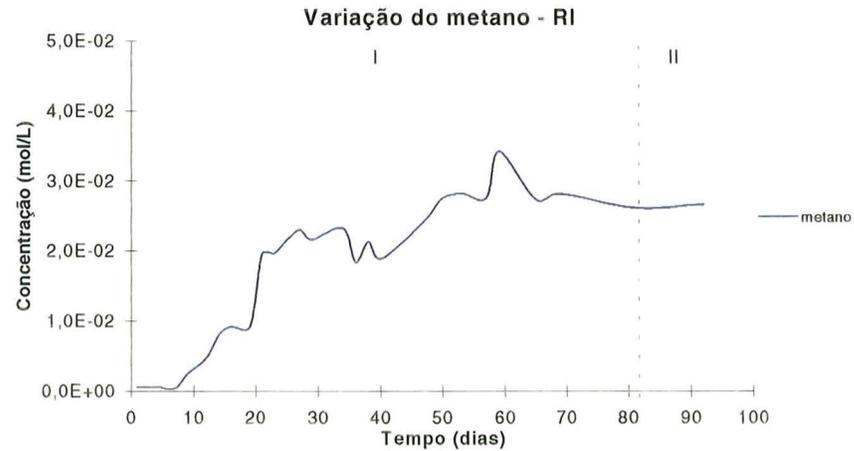


FIGURA 29: Gráfico da variação do metano reator RI ensaio 2.

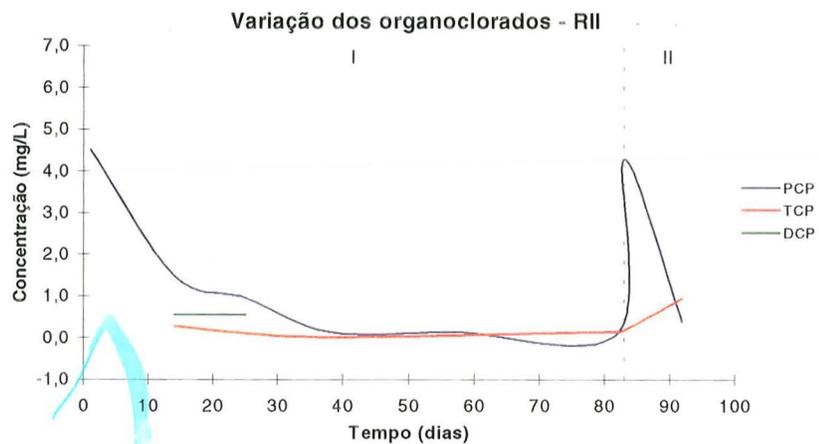


FIGURA 30: Gráfico da variação dos organoclorados reator RII ensaio 2.

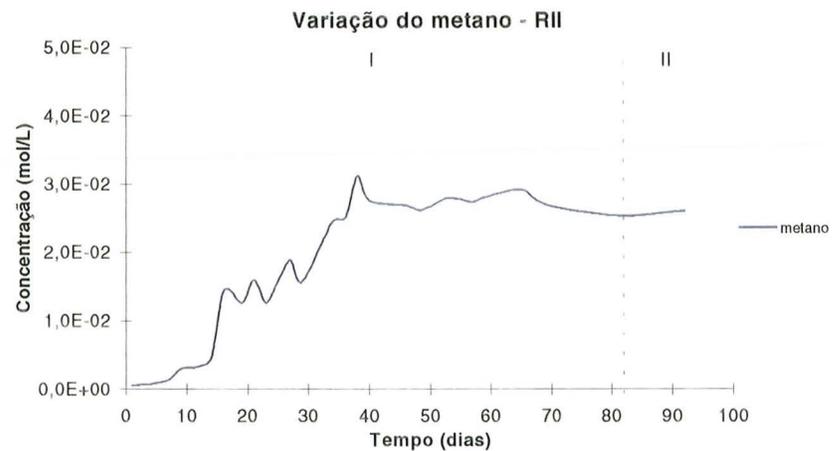


FIGURA 31: Gráfico da variação do metano reator RII ensaio 2.

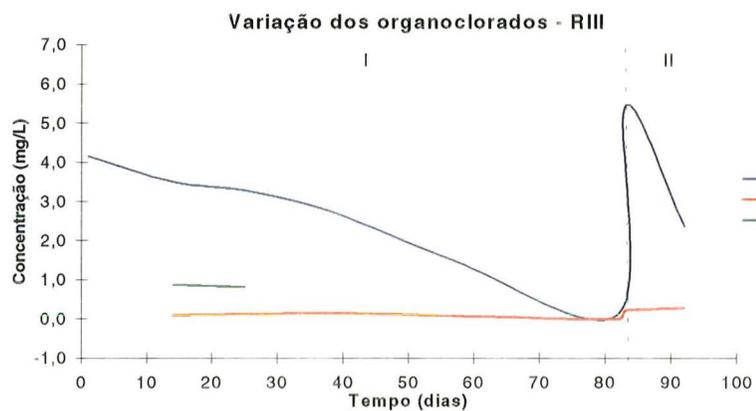


FIGURA 32: Gráfico da variação dos organoclorados reator RIII ensaio 2.

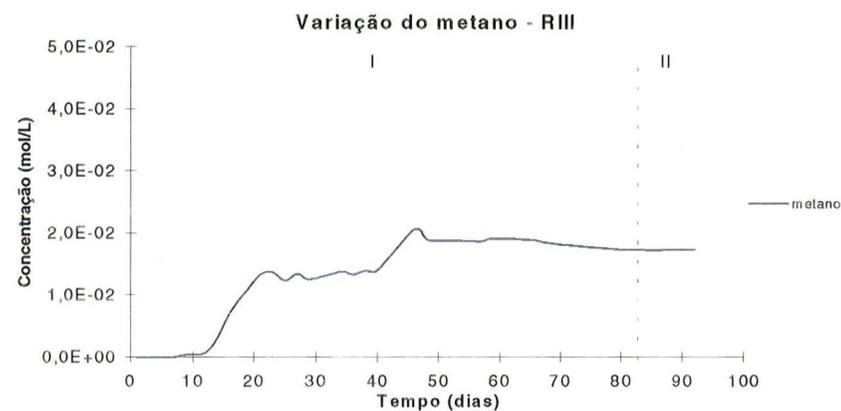


FIGURA 33: Gráfico da variação do metano reator RIII ensaio 2.

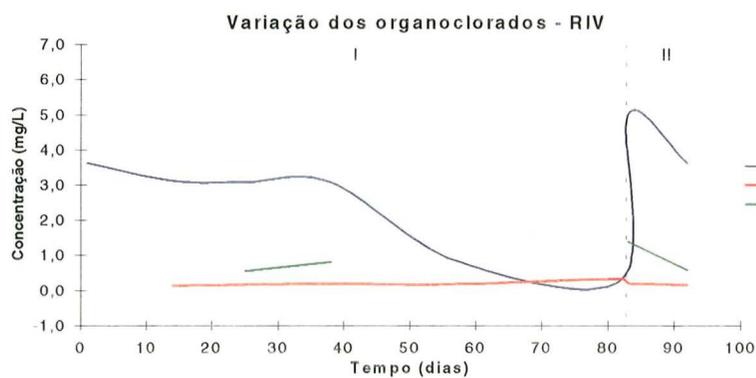


FIGURA 34: Gráfico da variação dos organoclorados reator RIV ensaio 2.

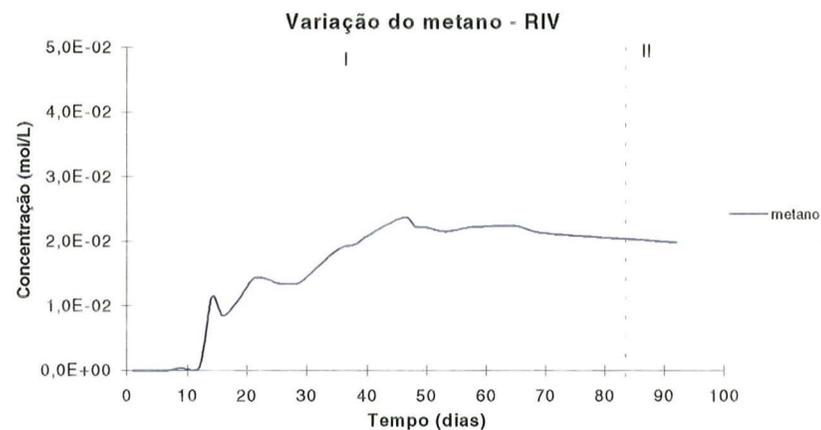


FIGURA 35: Gráfico da variação do metano reator RIV ensaio 2.

No ensaio 2, dois controles foram preparados para garantir a existência de maior produção de metano nos reatores alimentados com PCP. As FIGURAS 36 e 37 mostram os valores de metano obtidos no ensaio 2, respectivamente, por determinações cromatográficas pontuais e por medidas da variação de pressão ao longo do tempo de incubação dos sistemas.

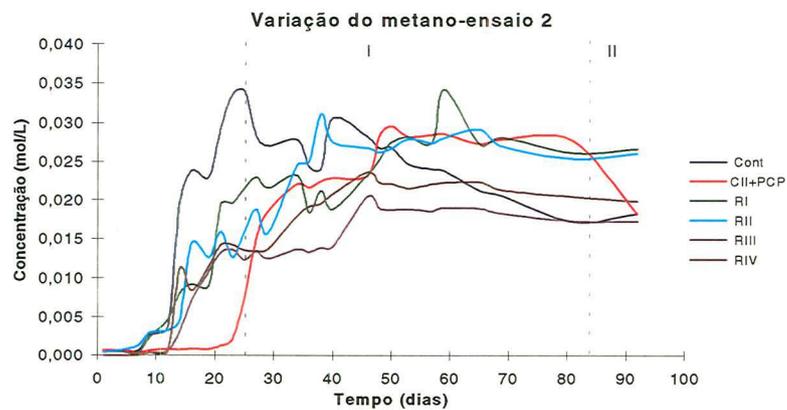


FIGURA 36: Gráfico da variação da produção pontual de metano ensaio 2.

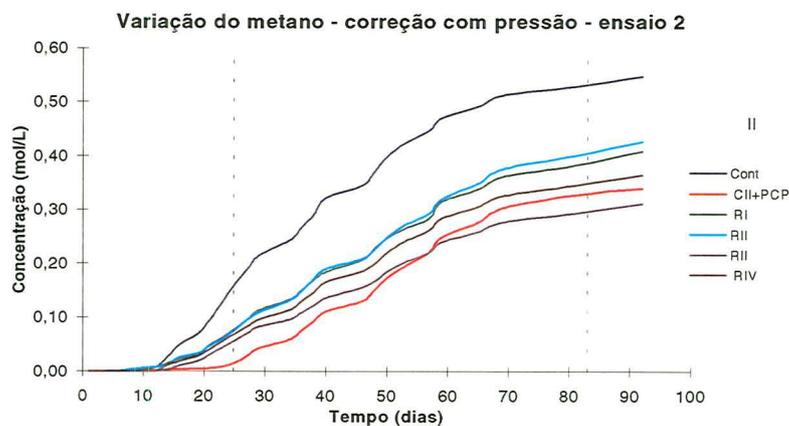


FIGURA 37: Gráfico da variação da produção de metano corrigida com a pressão ensaio 2.

Os reatores I a IV apresentaram um período em torno de 10 dias para iniciar a produção de metano, apesar da ocorrência de decaimento do PCP no mesmo período. Observando-se os dados da TABELA 16 constata-se que as réplicas I e II foram bastante semelhantes na resposta de remoção de PCP, ou seja, cerca de 97% do total adicionado do composto foi removido entre o 38o. e o 57o dias de incubação. Já, os reatores III e IV apresentaram remoção de 90% em períodos superiores, próximos a 82 dias de ensaio. Analisando as remoções diárias, mais uma vez, como observado no ensaio 1, certifica-se que em intervalos de incubação parecidos (11 a 19 dias) as taxas de remoção diárias na primeira alimentação foram muito diferentes.

A segunda alimentação para os reatores I e II também resultou em uma porcentagem elevada de remoção de PCP, aproximadamente 90% em 9 dias de incubação. Os reatores III e IV, por sua vez, apresentaram menores porcentagens, respectivamente de 56 e 28% .

As diferenças constatadas nas réplicas nas duas alimentações efetuadas podem, como indicado no ensaio 1, estarem relacionadas ao inóculo e sua homogeneidade durante a inoculação dos reatores. Observando-se as FIGURAS 29, 31, 33, e 35 verifica-se que a produção de metano pontual também diferiu entre os reatores, e foi mais elevada para os reatores I e II (cerca de 0,03 moles/L), considerando-se a fase de alimentação. Os valores pontuais de metano da fase II não foram conclusivos para as réplicas, tanto pelos procedimentos de amostragem, como já discutidos, como pelo baixo número de coletas das mesmas.

TABELA 16: Taxas de remoção do PCP - ensaio 2.

AMOSTRA	DIAS	PCP (mg/L)	REMOÇÃO PERÍODO (%)	REMOÇÃO PERÍODO (mg/L)	ADIÇÃO PCP (mg/l)
CII+PCP	1	-	-	-	-
CII+PCP	14	-	-	-	-
CII+PCP	25	3,455	-	-	3,45
CII+PCP	38	2,589	25,1	0,87	-
CII+PCP	57	0,643	75,2	1,95	-
CII+PCP	82	0,149	76,8	0,49	-
CII+PCP	83	3,161	-	-	3,01
CII+PCP	92	1,651	47,8	1,51	-
RI	1	3,98	-	-	3,98
RI	14	2,326	41,6	1,65	-
RI	25	1,182	49,2	1,14	-
RI	38	0,136	88,5	1,05	-
RI	57	0,136	0,0	0,00	-
RI	82	0,136	0,0	0,00	-
RI	83	2,095	-	-	1,96
RI	92	0,19	90,9	1,91	-

TABELA 16 (continuação): Taxas de remoção do PCP - ensaio 2.

AMOSTRA	DIAS	PCP (mg/L)	REMOÇÃO PERÍODO (%)	REMOÇÃO PERÍODO (mg/L)	ADIÇÃO PCP (mg/L)
RII	1	4,513	-	-	4,51
RII	14	1,49	67,0	3,02	-
RII	25	0,956	35,8	0,53	-
RII	38	0,136	85,8	0,82	-
RII	57	0,136	0,0	0,00	-
RII	82	0,112	17,6	0,02	-
RII	83	4,29	-	-	4,18
RII	92	0,38	91,1	3,91	-
RIII	1	4,151	-	-	4,15
RIII	14	3,496	15,8	0,66	-
RIII	25	3,274	6,4	0,22	-
RIII	38	2,751	16,0	0,52	-
RIII	57	1,49	45,8	1,26	-
RIII	82	0,136	90,9	1,35	-
RIII	83	5,428	-	-	5,29
RIII	92	2,38	56,2	3,05	-
RIV	1	3,632	-	-	3,63
RIV	14	3,114	14,3	0,52	-
RIV	25	3,083	1,0	0,03	-
RIV	38	3,078	0,2	0,01	-
RIV	57	0,845	72,5	2,23	-
RIV	82	0,316	62,6	0,53	-
RIV	83	5,022	-	-	4,71
RIV	92	3,617	28,0	1,41	-

As FIGURAS 36 e 37 revelam a resposta acentuadamente diferente do ensaio 2 em relação ao ensaio 1. No ensaio 2 um dos controles apresentou maiores valores de metano em relação aos reatores com PCP, e interessante o segundo controle foi bastante inferior, FIGURA 36. O segundo controle sofreu, então, a adição de PCP e ácidos orgânicos no 25º dia de incubação para se verificar, de alguma forma, o sistema seria estimulado. A resposta foi surpreendente, pois o sistema removeu 96% de PCP em 57 dias de incubação, e produziu metano na ordem de 0,03 moles/L, de acordo com os valores obtidos através da determinação pontual de metano (FIGURAS 38 e 39). Além disso, a segunda alimentação também resultou em 48% de remoção do PCP. O lodo, sem dúvida, respondeu ao estímulo, que de alguma maneira estava ligado ao composto PCP.

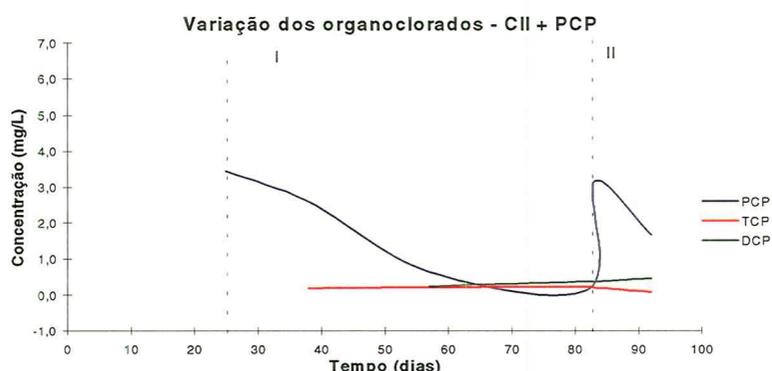


FIGURA 38: Gráfico da variação dos organoclorados reator CII+PCP ensaio 2.

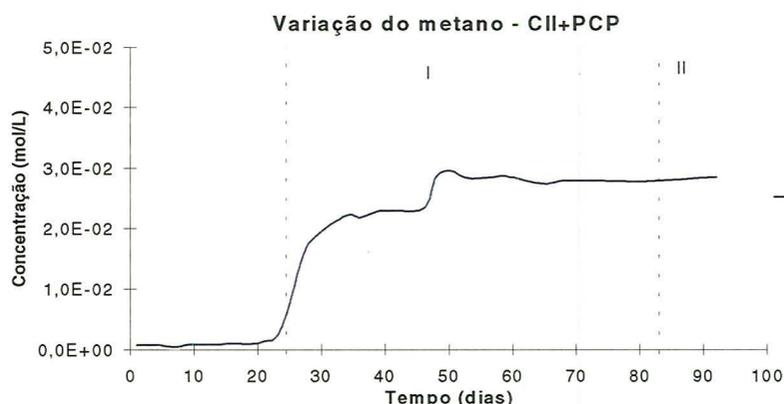


FIGURA 39: Gráfico da variação do metano reator CII+PCP ensaio 2.

A avaliação da FIGURA 39 - metano calculado a partir da pressão e determinações cromatográficas (determinações feitas desde o início do ensaio) - confirma a superioridade dos valores de metano de um dos reatores controle. A comparação dos resultados dos ensaios 1 e 2 dificulta afirmar a participação no estímulo de produção de metano pela presença do PCP nos lodos, consideradas as diferenças dos inóculos. Mas, é certo que em tempos semelhantes a produção total de metano foi muito próxima de 0,5 moles/L em ambos os ensaios, após as alimentações.

A análise do comportamento dos valores de metano na fase II foi prejudicada pelo número de amostras realizadas, em função da necessidade do término da parte experimental da presente dissertação. Mas, parece haver uma tendência dos reatores em continuar a produção do gás.

Com os valores obtidos do ensaio 2 pode-se confirmar a degradação do composto PCP, sem prejuízo ao consórcio metanogênico estudado. Os lodos enriquecidos em ambos os ensaios foram de mesma origem. A diferença da segunda inoculação em relação a primeira, esteve no tempo de estocagem do inóculo. O inóculo do ensaio 2 foi mantido mais tempo estocado (143 dias, sob temperatura de 30°C) sob agitação constante e abrigado da luz.

O aparecimento de produtos intermediários, TCP e DCP, foi verificado nos reatores II, III, IV e CII. No reator II, entre o 15° e o 30° dias de incubação, constatou-se principalmente a presença do DCP, em paralelo à degradação do PCP; nos reatores III e IV, DCP foi também determinado em períodos menores. O reator CII apresentou DCP após cerca de 35 dias da alimentação, ou após a degradação de 77% de PCP. O produto TCP foi formado em quantidades baixas em todos os

sistemas de reação. Como anteriormente abordado, os produtos medidos estão coerentes com aqueles encontrados na literatura especializada.

Os resultados do ensaio 2 foram coerentes com os resultados de WU et al. (1993), em relação a um dos controles. Como referido, os autores constataram degradação de PCP na presença de fontes orgânicas semelhantes às utilizadas nesse trabalho de pesquisa, com os reatores controles apresentando produção de metano superior aos alimentados com PCP, em períodos de incubação entre 150 e 200 dias, a 35°C. Além disso, os autores atribuíram o possível efeito inibitório do PCP nos lodos granulados testados em ensaios descontínuos, em concentrações entre 1 a 2,5 mg/L, com posterior adaptação, e reforçaram a necessidade de cargas orgânicas elevadas para uma segura remoção do composto em reatores UASB (contínuos), desde que mantidas as concentrações de PCP não superiores a 1,0 mg/L.

O efeito inibitório do PCP em lodos não adaptados foi sempre pontuado pelos autores (MIKESELL e BOYD, 1986; HENDRIKSEN et al., 1992; NICHOLSON et al., 1992; WU et al., 1993) citados nesse trabalho. Em geral, lodos adaptados produzem metano em concentrações de PCP da ordem de 1 a 5mg/L, desde que na presença de doadores de elétrons adequados. O enriquecimento dos lodos nos ensaios 1 e 2 mostrou que a adaptação prévia em concentrações de PCP de até 10 mg/L e ácidos acético e fórmico, bem como de glicose e etanol, possibilitou o desenvolvimento das células metanogênicas e não metanogênicas em concentrações iniciais de PCP em torno de 5mg/L, com valores de metano coerentes com os teoricamente calculados para as fontes orgânicas mais simples.

5.3 Análise das características morfológicas das bactérias presentes nos lodos estudados

As análises para verificação das morfologias bacterianas presentes no lodo utilizado como inóculo e no ensaio de enriquecimento foram feitas por meio de microscopia ótica (contraste de fase e fluorescência) e microscopia eletrônica de varredura. A microscopia ótica foi utilizada como instrumento de análise no decorrer dos ensaios e a microscopia eletrônica de varredura foi realizada somente ao final destes.

O exame microscópico dos inóculos mostraram a presença de células em formato de sarcinas (relacionados ao gênero *Methanosarcina* sp.), cocos irregulares e móveis que apresentavam fluorescência (relacionados ao gênero *Methanococcus* sp.), bactérias filamentosas não fluorescentes (relacionados ao gênero *Methanothrix* sp.), e bacilos pequenos e fluorescentes (*Methanobrevibacter* sp.), e bacilos maiores que os anteriores, fluorescentes (relacionados ao gênero *Methanobacterium* sp.).

No decorrer dos ensaios de enriquecimento em PCP, amostras do lodo foram examinadas sob microscopia de luz, contraste de fase e ultra-violeta, e as TABELAS 17 e 18 apresentam os gêneros metanogênicos encontrados. O predomínio dos tipos celulares metanogênicos foi determinado pela frequência de aparecimento das morfologias ao longo dos ensaios 1 e 2. Os gêneros foram indicados tomando-se como base as descrições das arqueobactérias metanogênicas encontradas no Manual de BERGEY de Sistemática Bacteriana (1988) e a presença de fluorescência celular sob luz ultra-violeta (DODDEMA e VOGELS, 1978).

TABELA 17: Gêneros metanogênicos encontrados ao longo do ensaio 1.

Tipos ¹ Bacterianos Metanogênicos	FASES DO ENSAIO 1					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Methanosarcina</i> sp.	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Methanococcus</i> sp.	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>Methanotrix</i> sp.	+	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Methanospirillum</i> sp.	+	+	++	+	++	+
<i>Methanobacterium</i> sp.	++	++	++	++	++	++
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	+	++	+	++	++	+

Legenda: + pouco freqüente, ++ freqüente, +++ muito freqüente.

¹: relacionado com as morfologias descritas no Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana (1988).

TABELA 18: Gêneros metanogênicos encontrados ao longo do ensaio 2.

Tipos ¹ Bacterianos Metanogênicos	FASES DO ENSAIO 2	
	I	II
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	+++
<i>Methanococcus</i> sp.	++	+++
<i>Methanotrix</i> sp.	++	+++
<i>Methanospirillum</i> sp.	+	+
<i>Methanobacterium</i> sp.	++	++
<i>Methanobrevibacter</i> sp.	+	+

Legenda: + pouco freqüente, ++ freqüente, +++ muito freqüente.

¹: relacionado com as morfologias descritas no Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana (1988).

As amostras dos ensaios 1 e 2 revelaram que o lodo inoculado em ambos os ensaios apresentava-se floculento, com o predomínio de morfologias celulares semelhantes aos gêneros metanogênicos *Methanosarcina* sp. e *Methanococcus* sp. (cocos livres fluorescentes). Células em formato de cocos e bacilos foram abundantes.

As FIGURAS 40 e 41 apresentam as sarcinas metanogênicas relacionadas a espécie *Methanosarcina barkeri* observadas, respectivamente, sob contraste de fase e luz ultra-violeta. As sarcinas metanogênicas foram abundantes em todas as fases dos

ensaios. As FIGURAS 42 e 43 apresentam cocos e bacilos não-fluorescentes, geralmente verificados nas amostras estudadas.

Além da relação dos tipos morfológicos apresentados nas TABELAS 17 e 18, deve-se destacar a presença de bacilos espiralados, cocos livres fluorescentes e filamentos muito finos. Esses últimos foram relacionados a "thin filaments", filamentos descritos em lodos anaeróbios granulados (VAZOLLER et al., 1991 e GUIOT et al., 1991).

Na FIGURA 44 são apresentadas células em formato de sarcinas relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp. A FIGURA 45 ilustra células em formato de sarcinas, cocos, bacilos e filamentos não fluorescentes. Os filamentos foram associados ao gênero metanogênico *Methanothrix* sp.

As FIGURAS 46 e 47 apresentam as morfologias bacterianas relacionadas ao gênero metanogênico *Methanothrix* sp., que não fluoresceu sob luz ultra-violeta. Nas FIGURAS 48 e 49 estão ilustrados aglomerados bacterianos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp., descritos no Manual de BERGEY de Sistemática Bacteriana (1988).

A FIGURA 50 apresenta uma morfologia bacteriana passível de ser relacionada com o gênero metanogênico *Methanosphaera* sp. (BERGEY, 1988), que pode ocorrer em pares, tétrades e aglomerados. A célula possui aproximadamente 1 μm de diâmetro, e os representantes desse grupo metanogênico são anaeróbios estritos, imóveis, cuja temperatura ótima de crescimento é 37°C e os substratos energéticos são o metanol e o hidrogênio. O tipo morfológico da FIGURA 51 assemelha-se aos observados nas FIGURAS 48 e 49.

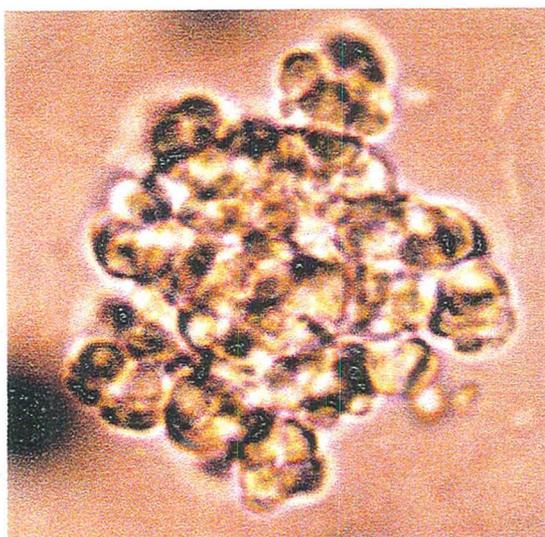


FIGURA 40

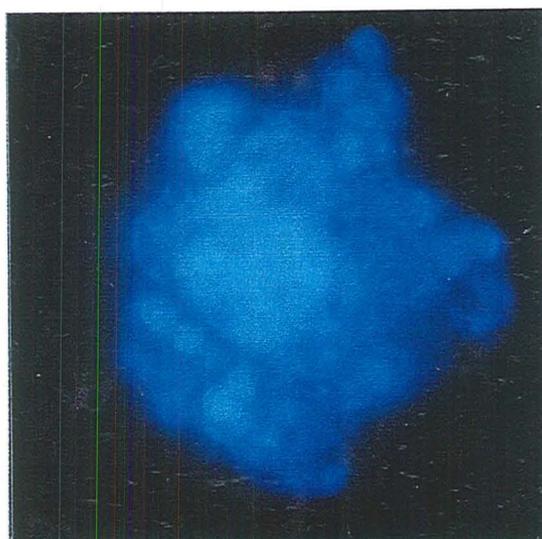


FIGURA 41



FIGURA 42



FIGURA 43

Legenda:

FIGURA 40: Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp. analisadas sob microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).

FIGURA 41: Mesmo campo da figura 40 analisado sob microscopia de fluorescência (aumento 1.240x).

FIGURA 42: Células em formato de sarcinas (*Methanosarcina* sp.), cocos e bacilos não fluorescentes - microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).

FIGURA 43: Células em formato de cocos e bacilos não fluorescentes - microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).

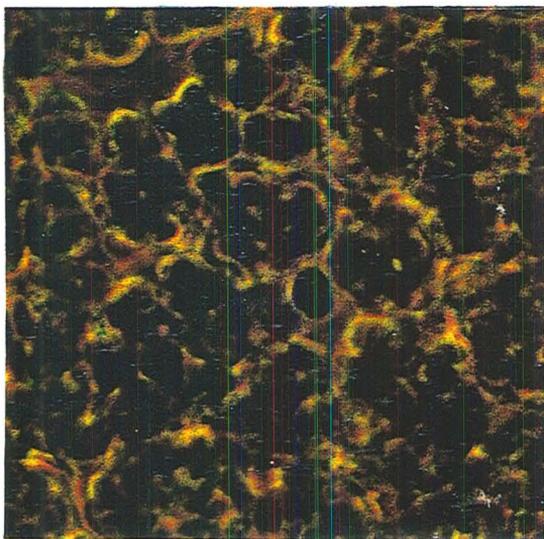


FIGURA 44:



FIGURA 45:

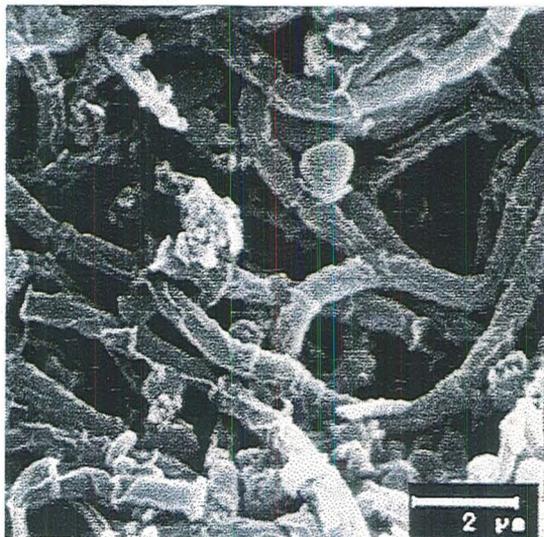


FIGURA 46



FIGURA 47

Legenda:

FIGURA 44: Células em formato de sarcina relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp. - microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).

FIGURA 45: Células em formato de sarcinas e células filamentosas relacionados aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanothrix* sp., respectivamente - microscopia de contraste de fase (aumento 1.240x).

FIGURA 46: Células filamentosas relacionadas ao gênero *Methanothrix* sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 7.500x)

FIGURA 47: Células filamentosas relacionadas ao gênero *Methanothrix* sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 5.000x)

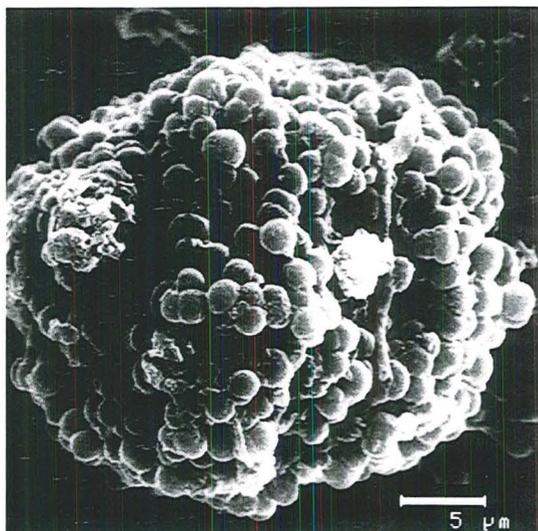


FIGURA 48

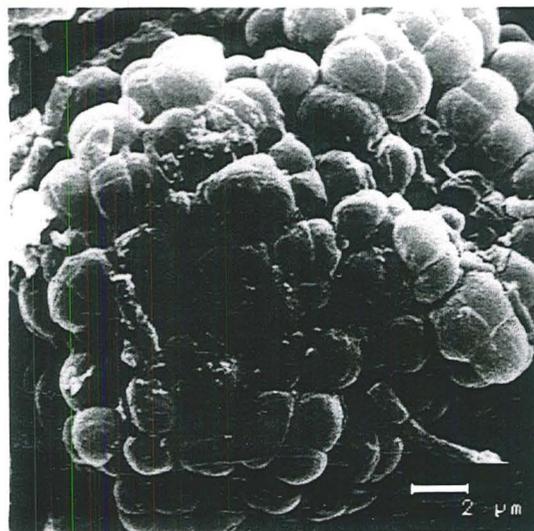


FIGURA 49

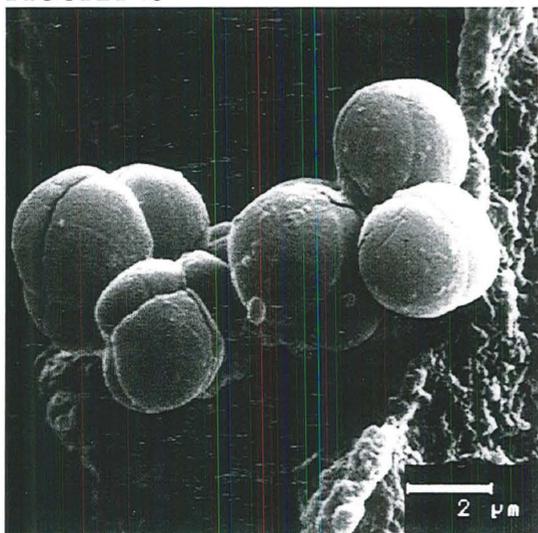


FIGURA 50

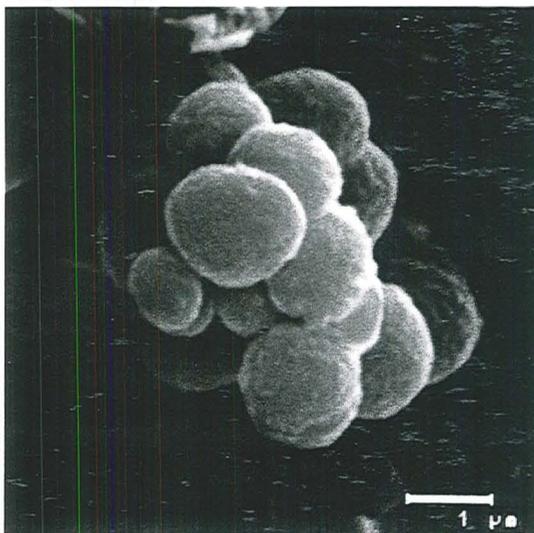


FIGURA 51

Legenda:

FIGURA 48: Células em formato de sarcina relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 3.000x).

FIGURA 49: Células em formato de sarcina relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 5.000x).

FIGURA 50: Células arranjadas em "clusters" passíveis de serem relacionadas ao gênero *Methanosphaera* sp. - microscopia eletrônica de varredura (aumento 7250x).

FIGURA 51: Arranjo celular semelhante ao gênero *Methanosarcina* sp. observado nas FIGURAS 48 e 49.

As morfologias descritas com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura foram verificadas ao final dos dois ensaios, e sugerem o predomínio de tipos metanogênicos acetoclásticos. Particularmente, a verificação do gênero *Methanosarcina* sp. em quantidade, pode ser justificada também pela adição de metanol nos frascos-reatores durante a alimentação de PCP. É interessante salientar que em sistemas de biodigestão anaeróbia, um ou outro dos dois tipos mais comuns nesses sistemas produtores de metano a partir de ácido acético, *Methanosarcina* sp. e *Methanotherix* sp., é que prevalece no meio, em função da concentração do substrato e afinidade das culturas pelo mesmo (SPEECE, 1996). No entanto, nos ensaios 1 e 2, ambas as culturas permaneceram ativas no meio, e o metano formado foi oriundo da mistura de ácidos e do metanol. A presença de *Methanotherix* sp. sugere ainda, baixas concentrações de ácidos orgânicos voláteis, notadamente do ácido acético (SPEECE, 1996).

As condições de enriquecimento em PCP, considerando as alimentações efetuadas ao longo dos experimentos não alteraram os tipos microbianos inoculados, destacados nas TABELAS 17 e 18. As características do lodo granulado estudado por WU et al. (1993) revelaram gêneros metanogênicos semelhantes aos analisados nos ensaios 1 e 2, por exemplo, *Methanotherix* sp. e *Methanosarcina* sp., mas os autores não comentaram morfologias não-metanogênicas, e tão pouco relacionaram algum tipo celular específico na degradação do PCP.

A TABELA 2 do capítulo Revisão de Literatura procurou reunir os tipos bacterianos aeróbios e anaeróbios relatados como responsáveis pela degradação do PCP. Nota-se também em outros trabalhos sobre a degradação do PCP (HENDRIKESSEN, 1992; NICHOLSON, 1992) a preocupação em relatar a espécie

Desulfomonile tiedjei como degradadora desse composto, mas não sem indicação conclusiva sobre a presença dessa no meio analisado.

Nos ensaios 1 e 2, não foi possível relacionar os gêneros degradadores de PCP, mas o consórcio metanogênico estudado revelou diferentes morfologias de bactérias não-metanogênicas que poderiam estar ativas no clorofenol.

As diversas análises microscópicas realizadas para a avaliação das morfologias celulares não demonstraram o predomínio de nenhuma espécie em particular, apesar do evidente predomínio dos tipos metanogênicos. Portanto, não foi possível relacionar atividade de degradação de PCP com tipos morfológicos presentes, mas a presença marcante de sarcinas fluorescentes metanogênicas foi significativa para indicar a participação dessas bactérias no processo além da produção de metano.

É importante salientar que a observação de bactérias metanogênicas deu-se em ensaios de batelada.

5.4 Importância dos resultados obtidos para a tecnologia da biodigestão anaeróbia

A tecnologia da biodigestão anaeróbia, ou comumente denominada biotecnologia anaeróbia para o tratamento de resíduos (SPEECE, 1996), tem, atualmente, avançado muito em função de seu enorme potencial na degradação de compostos xenobióticos. Nesse trabalho, de acordo com resultados alcançados, pode-se verificar uma rápida resposta de lodos anaeróbios estocados e adaptados previamente ao pentaclorofenol (PCP), na estabilização deste composto em conjunto

com os co-substratos ácidos orgânicos acético, butírico, propiônico e o álcool metanol.

A resposta de degradação do PCP com formação de metano, especialmente verificada no ensaio 1, mesmo considerando 20 dias de adaptação para iniciar a produção do gás (salvo as condições iniciais de variação de temperatura) é promissora quando se analisa as condições necessárias para a partida de biodigestores anaeróbios. Muitas vezes, a limitação do processo encontra-se no longo período de adaptação frente a um determinado tipo de rejeito. A utilização de PCP com formação de metano foi característica original do lodo anaeróbio estudado, como descrito anteriormente por BOLAÑOS ROJAS (1997), e após estoque à temperatura verificou-se que o lodo gerou metano na presença de 5 mg/L de PCP. Particularmente, a rápida produção de metano do reator controle II do ensaio 2, com decréscimo de PCP, foi importante para mostrar que pareceu ocorrer um estímulo do lodo pelo composto, uma vez que apenas a alimentação de ácidos orgânicos e metanol não foi suficiente para a produção de metano. Os resultados dos enriquecimentos - ensaios 1 e 2 -, em que lodos anaeróbios inibidos com 10 mg/L de PCP e estocados à temperatura ambiente por um período não superior a 6 meses, produziram metano, não foram inibidos em 5mg/L de PCP, e degradaram essa quantidade de composto forneceu uma boa informação à partida de biorreatores anaeróbios empregando lodos adaptados.

O presente trabalho buscou verificar se as condições estudadas por WU et al. (1993) eram adequadas ao desenvolvimento de um consórcio metanogênico que permitisse a verificação dos tipos bacterianos capazes de se desenvolver na presença de PCP, especialmente as arqueobactérias metanogênicas. Em períodos inferiores aos

citados pelos referidos autores, bem como sob maiores concentrações de PCP, os resultados obtidos foram conclusivos, em ambos os ensaios, sobre os tipos bacterianos prevalentes no lodo. Não foi possível identificar as morfologias típicas não metanogênicas que pudessem ser relacionadas como responsáveis pela degradação do organoclorado. Mas é certo que o consórcio metanogênico respondeu às condições estudadas sugerindo fortemente que a bactéria metanogênica pertencente ao gênero *Methanosarcina* sp. fosse um dos principais grupos bacterianos presentes nos sistemas. Para a engenharia do processo de digestão, esta resposta sugere que o meio em fermentação mantém uma certa concentração de ácidos orgânicos, particularmente de ácido acético, que promove o crescimento do gênero metanogênico em formato de sarcinas. Como relacionado por outros autores (NICHOLSON et al., 1992; DAMIANOVIC, 1997), é provável que a degradação de PCP na presença de co-substratos adequados facilite a produção de precursores ácidos para a formação de metano. Esta resposta é importante para a determinação de parâmetros de operação de sistemas contínuos anaeróbios.

Apesar de não terem sido identificadas as vias metabólicas da degradação do PCP no presente estudo, inferir a ocorrência da desalogenação reductiva seguida de posterior fissão do anel aromático e produção de metano somente poderia ser feita mediante estudos com marcadores. No entanto, a concentração de PCP estudada e seus intermediários metabólicos medidos não interferiram com a metanogênese do sistema.

6. Conclusões

As técnicas de manipulação de anaeróbios estritos, bem como as analíticas de determinação de gases e, particularmente, a de pentaclorofenol (PCP) recomendada por DAMIANOVIC (1997), foram adequadas ao estudo proposto.

O consórcio metanogênico estudado, previamente adaptado ao PCP e inibido a concentrações de 10 mg/L, foi capaz de degradar novamente o composto nas condições dos ensaios 1 e 2, ou seja, na presença de aproximadamente 5 mg/L de PCP, e dos ácidos orgânicos acético, butírico e propiônico, bem como do metanol.

O consórcio metanogênico produziu metano nas condições estudadas para a degradação de PCP, e os compostos intermediários determinados em baixas concentrações foram TCP e DCP.

O ensaio 1 apresentou valores de metano próximo aos teoricamente calculados para a concentração de substratos orgânicos utilizados, e foram superiores na presença do pentaclorofenol em relação aos valores de metano do reator controle.

As porcentagens de remoção do PCP foram de até 97%, bastante elevadas. A capacidade do consórcio metanogênico indica o enorme potencial dos microrganismos anaeróbios na estabilização desse composto tóxico.

Os ensaios 1 e 2 favoreceram o enriquecimento de culturas bacterianas metanogênicas, destacando-se a presença de células fluorescentes morfológicamente semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* sp., *Methanococcus* sp.,

Methanobacterium sp., *Methanobrevibacter* sp., e particularmente *Methanosphaera* sp..

Não foi observada nenhuma morfologia celular que pudesse ser relacionada com degradadores de PCP ou atividade de cometabolismo, entretanto os tipos bacterianos metanogênicos, especialmente o gênero *Methanosarcina* sp., foram predominantes.

7. Recomendações

As coletas realizadas em intervalos aleatórios dificultaram a comparação dos dados obtidos. Para melhor avaliar os resultados, recomenda-se que as amostragens sejam realizadas em intervalos padronizados.

Para determinação de prováveis vias metabólicas, faz-se necessário a determinação dos intermediários, inclusive isômeros, de todos os metabólitos surgidos durante a degradação do PCP até CH_4 . Indica-se ainda, a utilização de um padrão externo nas análises cromatográficas dos compostos organoclorados.

A análise dos microrganismos metanogênicos somente pelas morfologias não permitiu uma identificação segura até o Táxon espécie. Para atingir este nível de identificação, é fundamental a utilização de ensaios bioquímicos associados à técnicas de biologia molecular. Seria interessante também o estudo do cometabolismo metanogênico.

A identificação de todas as bactérias não-metanogênicas presentes no consórcio também é fundamental, pois estas poderiam estar relacionadas com a degradação do composto estudado.

Além da identificação de todos os tipos bacterianos, a quantificação relativa entre as espécies presentes poderiam indicar uma possível relação entre as bactérias responsáveis pela degradação e o grau de estabilização do PCP.

ANEXO A

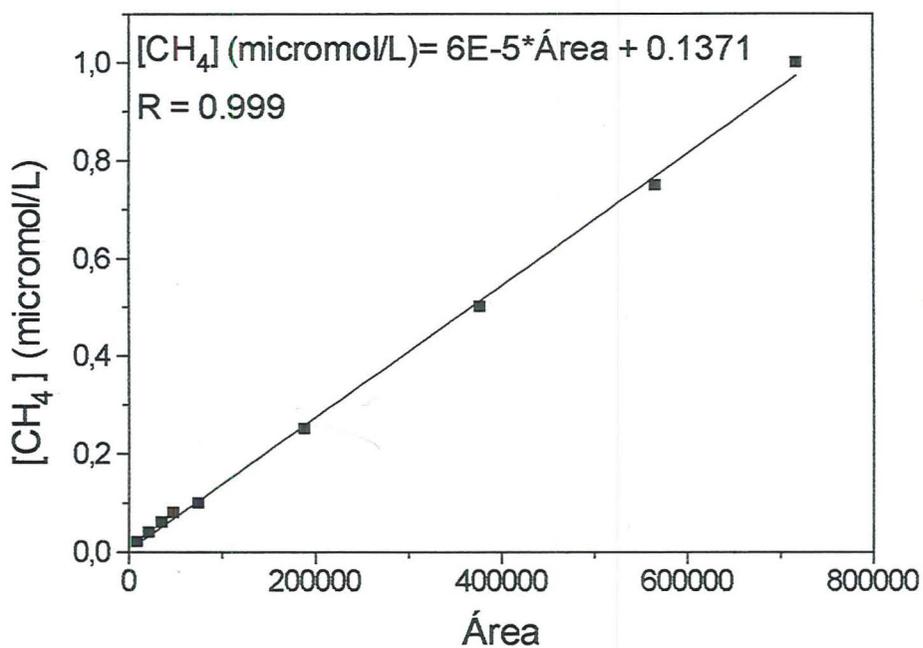


FIGURA 52: Curva de calibração para o gás metano.

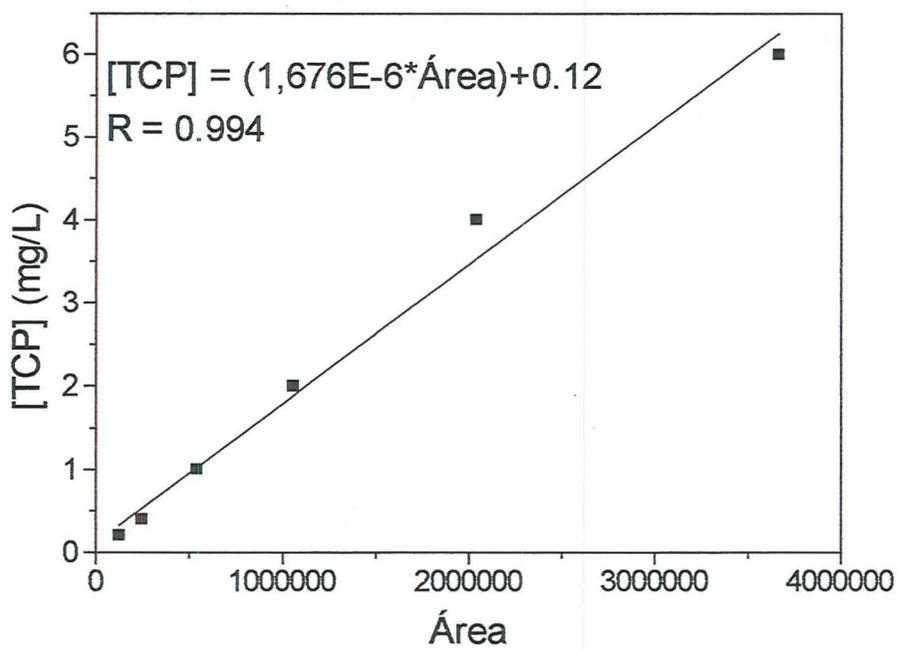


FIGURA 53: Curva de calibração para o PCP.

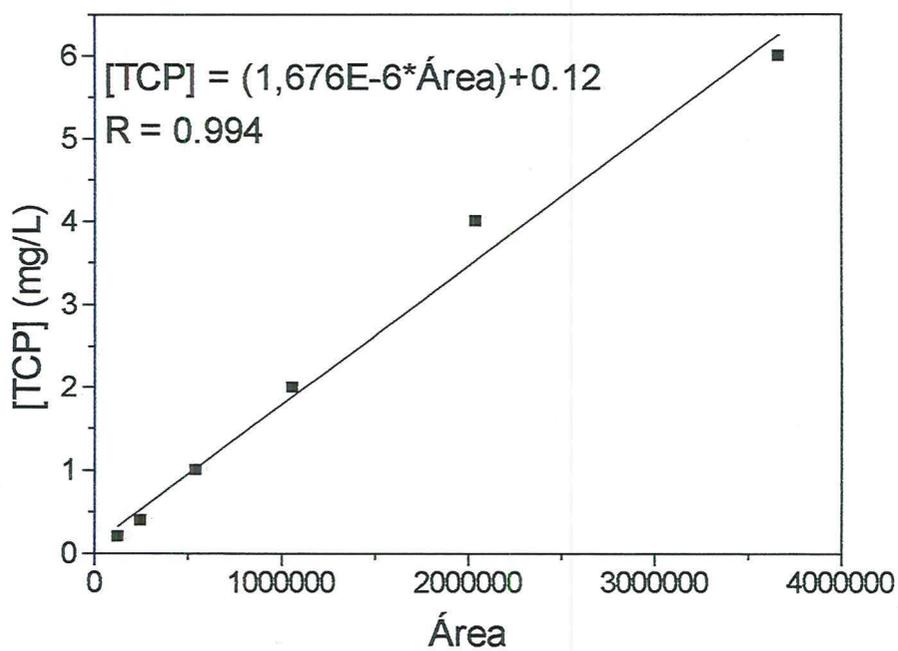


FIGURA 54: Curva de calibração para o TCP.

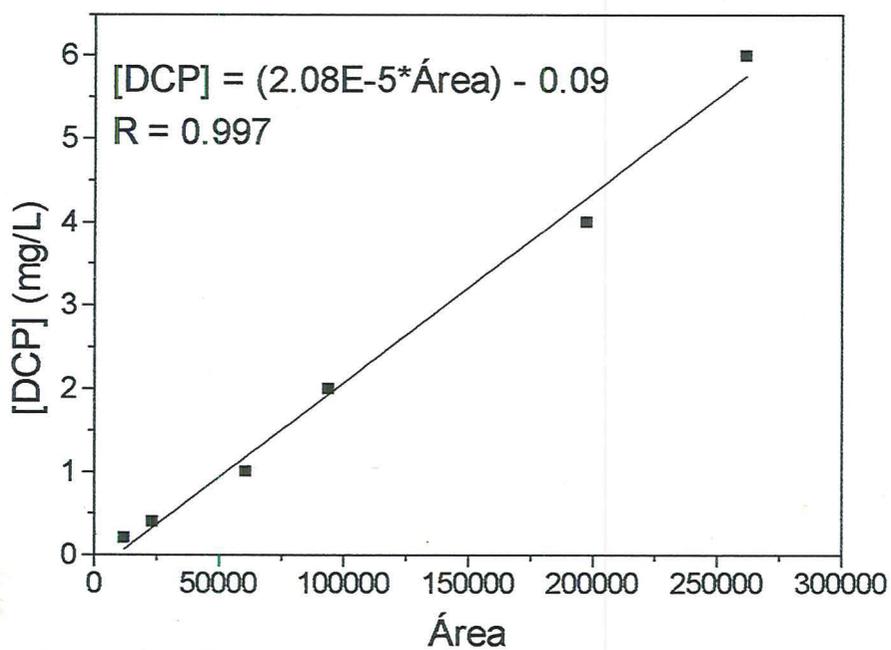


FIGURA 55: Curva de calibração para o DCP.

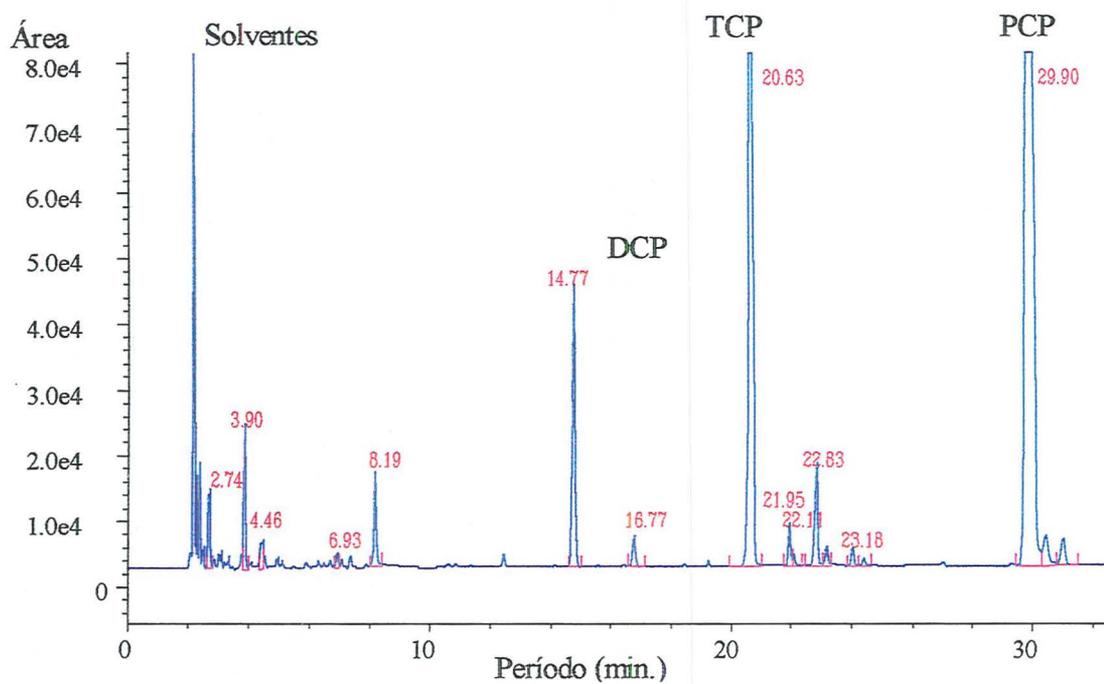


FIGURA 56: Cromatograma típico para análise dos compostos PCP, TCP e DCP.

ANEXO B

TABELA 19: Concentração (mg/L) dos compostos organoclorados nos frascos-reatores ensaio 1.

AMOSTRA	DIAS	PCP	TCP	DCP	OBSERVAÇÕES
R1	1	4,784	ND	ND	
R1	73	3,875	0,004	ND	antes da real. 4 FONTES (73º dia)
R1	122	1,709	0,004	ND	4 FONTES (122º dia)
R1	155	1,237	0,004	0,117	
R1	156	1,112	0,004	0,168	
R1	176	0,902	0,206	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R1	177	4,612	0,388	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (177º dia)
R1	187	2,832	0,320	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R1	188	5,865	0,326	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (188º dia)
R1	224	1,927	0,018	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R1	225	6,189	0,464	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (225º dia)
R1	234	1,869	0,252	ND	
R2	1	4,403	ND	ND	
R2	73	4,119	0,004	ND	antes da real. 4 FONTES (73º dia)
R2	122	3,106	0,004	ND	4 FONTES (122º dia)
R2	155	2,518	0,004	0,043	
R2	156	2,323	0,004	0,609	
R2	176	1,092	0,004	0,102	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R2	177	5,413	0,116	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (177º dia)
R2	187	3,805	0,036	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R2	188	7,100	0,273	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (188º dia)
R2	224	2,027	0,032	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R2	225	6,370	0,391	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (225º dia)
R2	234	4,739	0,143	ND	
R3	1	4,538	ND	ND	
R3	73	3,097	0,130	ND	antes da real. 4 FONTES (73º dia)
R3	122	0,958	0,283	ND	4 FONTES (122º dia)
R3	155	0,414	0,457	0,042	
R3	156	0,142	0,762	0,145	
R3	176	0,139	0,449	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R3	177	3,964	1,491	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (177º dia)
R3	187	2,522	0,849	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R3	188	5,193	1,341	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (188º dia)
R3	224	1,922	0,429	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R3	225	5,180	1,429	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (225º dia)
R3	234	4,582	1,367	ND	
R4	1	5,267	ND	ND	
R4	73	4,797	0,004	ND	antes da real. 4 FONTES (73º dia)
R4	122	4,506	0,004	ND	4 FONTES (122º dia)
R4	155	3,740	0,181	ND	
R4	156	3,775	0,471	0,926	
R4	176	1,298	0,450	0,750	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R4	177	4,764	0,395	0,659	após real. PCP + CH ₃ OH (177º dia)
R4	187	3,278	0,408	0,075	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R4	188	6,689	0,520	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (188º dia)
R4	224	5,796	0,073	ND	antes da real. PCP + CH ₃ OH
R4	225	8,364	0,279	ND	após real. PCP + CH ₃ OH (225º dia)
R4	234	4,934	0,110	ND	

ND: não detectado

4 FONTES: realimentação com as quatro fontes orgânicas (metanol, acetato, propionato e butirato de sódio).

PCP + CH₃OH: realimentação com PCP utilizando metanol como veículo.

TABELA 20: Concentração (mg/L) dos compostos organoclorados nos frascos-reatores ensaio 2.

AMOSTRA	DIAS	PCP	TCP	DCP	OBSERVAÇÕES
CII+PCP	25	3,455	ND	ND	INÍCIO DO PCP (PCP + CH ₃ OH)
CII+PCP	38	2,589	0,194	ND	
CII+PCP	57	0,643	0,218	0,240	
CII+PCP	82	0,149	0,228	0,378	
CII+PCP	83	3,161	0,210	0,363	PCP + CH ₃ OH (83° dia)
CII+PCP	92	1,651	0,073	0,458	
RI	1	3,980	ND	ND	
RI	14	2,326	0,095	ND	
RI	25	1,182	0,051	ND	
RI	38	0,136	0,021	ND	
RI	57	0,136	0,021	ND	
RI	82	0,136	0,025	ND	
RI	83	2,095	0,012	ND	PCP + CH ₃ OH (83° dia)
RI	92	0,190	ND	ND	
RII	1	4,513	ND	ND	
RII	14	1,490	0,280	0,554	
RII	25	0,956	0,109	0,549	
RII	38	0,136	0,013	ND	
RII	57	0,136	0,061	ND	
RII	82	0,112	0,152	ND	
RII	83	4,290	0,186	ND	PCP + CH ₃ OH (83° dia)
RII	92	0,380	0,956	ND	
RIII	1	4,151	ND	ND	
RIII	14	3,496	0,101	0,886	
RIII	25	3,274	0,119	0,813	
RIII	38	2,751	0,149	ND	
RIII	57	1,490	0,082	ND	
RIII	82	0,136	0,004	ND	
RIII	83	5,428	0,213	ND	PCP + CH ₃ OH (83° dia)
RIII	92	2,380	0,282	ND	
RIV	1	3,632	ND	ND	
RIV	14	3,114	0,128	ND	
RIV	25	3,083	0,170	0,550	
RIV	38	3,078	0,193	0,818	
RIV	57	0,845	0,186	ND	
RIV	82	0,316	0,332	ND	
RIV	83	5,022	0,215	1,379	PCP + CH ₃ OH (83° dia)
RIV	92	3,617	0,164	0,584	

ND: não detectado

PCP + CH₃OH: realimentação com PCP utilizando metanol como veículo.

TABELA 21: Concentração de metano (moles/L) - ensaio 1. Dados pontuais.

DIAS	C (moles/L)	R1 (moles/L)	R2 (moles/L)	R3 (moles/L)	R4 (moles/L)	OBSERVAÇÕES
0	ND	ND	ND	ND	ND	
9	ND	ND	ND	ND	ND	
17	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	
28	0,012	0,011	0,000	0,014	0,006	
32	0,018	0,027	0,001	0,023	0,024	
39	0,017	0,037	0,019	0,022	0,025	
44	0,018	0,028	0,022	0,030	0,022	
52	0,019	0,017	0,030	0,047	0,032	
59	0,016	0,027	0,030	0,039	0,029	
69	0,015	0,026	0,036	0,042	0,035	
73	0,015	0,025	0,065	0,026	0,029	4 FONTES (73° dia)
75	0,018	0,025	0,067	0,023	0,033	
84	0,020	0,027	0,070	0,023	0,032	
89	0,019	0,027	0,069	0,022	0,031	
91	0,018	0,027	0,064	0,026	0,031	
96	0,036	0,042	0,029	0,043	0,051	
104	0,030	0,036	0,024	0,043	0,031	
108	0,033	0,045	0,026	0,026	0,029	
111	0,032	0,046	0,026	0,029	0,029	
122	0,018	0,025	0,025	0,027	0,023	4 FONTES (122° dia)
124	0,017	0,025	0,027	0,028	0,023	
126	0,016	0,025	0,025	0,028	0,022	
128	0,016	0,025	0,025	0,027	0,021	
131	0,016	0,025	0,025	0,026	0,020	
133	0,016	0,026	0,026	0,028	0,021	
135	0,016	0,026	0,026	0,028	0,022	
137	0,014	0,025	0,027	0,028	0,024	
139	0,016	0,026	0,027	0,030	0,025	
141	0,017	0,027	0,028	0,029	0,024	
143	0,017	0,029	0,027	0,027	0,023	
146	0,015	0,027	0,030	0,028	0,023	
149	0,008	0,020	0,020	0,024	0,021	
151	0,012	0,025	0,028	0,028	0,024	
154	0,018	0,029	0,029	0,030	0,026	
156	0,018	0,028	0,030	0,030	0,026	
158	0,019	0,027	0,029	0,027	0,023	
161	0,019	0,024	0,024	0,024	0,021	
163	0,025	0,032	0,032	0,031	0,027	
165	0,024	0,031	0,032	0,028	0,028	
167	0,023	0,024	0,025	0,024	0,023	
169	0,018	0,018	0,024	0,023	0,012	
171	0,018	0,023	0,025	0,023	0,013	PCP+CH3OH (177° dia)
176	0,021	0,032	0,032	0,030	0,026	
180	0,020	0,028	0,028	0,028	0,021	

TABELA 21 (continuação): Concentração de metano (moles/L) - ensaio 1. Dados pontuais.

DIAS	C (moles/L)	R1 (moles/L)	R2 (moles/L)	R3 (moles/L)	R4 (moles/L)	OBSERVAÇÕES
182	0,022	0,030	0,029	0,029	0,025	
188	0,021	0,030	0,029	0,028	0,025	PCP+CH ₃ OH (188° dia)
190	0,021	0,029	0,029	0,027	0,025	
192	0,022	0,029	0,029	0,028	0,026	
195	0,021	0,027	0,028	0,026	0,026	
199	0,023	0,026	0,027	0,026	0,025	
201	0,024	0,028	0,029	0,028	0,026	
204	0,024	0,027	0,029	0,028	0,026	
207	0,022	0,026	0,030	0,025	0,023	
209	0,022	0,026	0,029	0,026	0,024	
211	0,022	0,026	0,026	0,027	0,024	
213	0,022	0,026	0,026	0,027	0,024	
216	0,022	0,025	0,026	0,026	0,024	
218	0,021	0,024	0,025	0,025	0,023	
221	0,021	0,024	0,025	0,024	0,023	
223	0,020	0,024	0,025	0,024	0,022	
226	0,021	0,024	0,024	0,023	0,023	PCP+CH ₃ OH (225° dia)
228	0,021	0,023	0,023	0,023	0,023	
231	0,020	0,023	0,023	0,023	0,022	
234	0,019	0,023	0,023	0,023	0,021	

ND: não detectado

4 FONTES: realimentação com as quatro fontes orgânicas (metanol, acetato, propionato e butirato de sódio).

PCP + CH₃OH: realimentação com PCP utilizando metanol como veículo.

TABELA 22: Concentração de metano (moles/L) - ensaio 2. Dados pontuais.

DIAS	CON (moles/L)	CII+PCP (moles/L)	RI (moles/L)	CH4 RII (moles/L)	RIII (moles/L)	RIV (moles/L)	OBSERVAÇÕES
1	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	
4	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	
7	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	
9	0,003	0,001	0,003	0,003	0,000	0,000	
12	0,004	0,001	0,005	0,003	0,001	0,001	
14	0,020	0,001	0,008	0,005	0,003	0,011	
16	0,024	0,001	0,009	0,014	0,007	0,008	
19	0,023	0,001	0,009	0,013	0,011	0,012	
21	0,029	0,001	0,020	0,016	0,013	0,014	
23	0,034	0,002	0,020	0,013	0,014	0,014	
25	0,034	0,007	0,022	0,016	0,012	0,014	início PCP no CII + PCP
27	0,028	0,015	0,023	0,019	0,013	0,014	
29	0,027	0,019	0,022	0,016	0,013	0,014	
34	0,028	0,022	0,023	0,025	0,014	0,018	
36	0,024	0,022	0,018	0,025	0,013	0,019	
38	0,024	0,022	0,021	0,031	0,014	0,020	
40	0,031	0,023	0,019	0,028	0,014	0,021	
46	0,028	0,023	0,023	0,027	0,021	0,024	
48	0,027	0,028	0,025	0,026	0,019	0,022	
50	0,027	0,030	0,028	0,027	0,019	0,022	
53	0,025	0,028	0,028	0,028	0,019	0,022	
57	0,024	0,029	0,028	0,027	0,019	0,022	
59	0,024	0,029	0,034	0,028	0,019	0,022	
65	0,021	0,027	0,027	0,029	0,019	0,022	
69	0,021	0,028	0,028	0,027	0,018	0,021	
81	0,017	0,028	0,026	0,025	0,017	0,020	PCP + CH ₃ OH (83° dia)
92	0,018	0,018	0,027	0,026	0,017	0,020	

ND: não detectado

4 FONTES: realimentação com as quatro fontes orgânicas (metanol, acetato, propionato e butirato de sódio).

PCP + CH₃OH: realimentação com PCP utilizando metanol como veículo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J.C.** (1995). Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leite fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético. São Carlos. 158p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo.
- BALCH, W.E.; FOX, G.E.; MAGRUM, J.L.; WOESE, C.R.; WOLFE, R.S.** (1977). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Review*, v.43, p.260-296.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY** (1988). Archaeobacteria. 1^a. ed. (Eds.) J.T. Stanley, M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt. Baltimore, Williams & Wilkins, v 3.
- BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B.Z.** (1991). Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. *Mixed Cultures in Biotechnology - Environmental Biotechnology*. (Eds). G. Zeikus & E. A. Johnson. Capítulo 11 -, p.293-340.
- BOLAÑOS ROJAS, M.L.** (1997). Estudo comparativo da capacidade de inóculos de diferentes fontes de degradar PCP sob condições anaeróbias. São Carlos. 134p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- BOWER, E.J.; ZEHNDER, A.J.B.** (1993). Biorremediation of organic compounds - putting microbial metabolism. *TIBTECH*, v.11, p.360-367.
- BOYD, S.A.; SHELTON, D.R.** (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl Environ Microbiol*, v.47, p.272-277.

BRYANT, F.O.; HALE, D.D; ROGERS, J.E. (1991). Regiospecific dechlorination of pentachlorophenol by dichlorophenol-adapted microorganisms in fresh water, anaerobic sediment slurries. *Appl Environ Microbiol*, v.57, p.2293-2301.

BRYANT, M.P. (1972). Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.25, p.1324-1328.

CAMPOS, J.R. (1994). Alternativas para tratamento de esgotos - pré-tratamento de águas para abastecimento. Americana: Consórcio intermunicipal das bacias dos rios Piracicaba e Capivari, São Paulo. 112p..

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. (1984). Diagnóstico da área de proteção ambiental de Corumbataí. v. 3: Uso das terras e diagnóstico do uso de agroquímicos.

COOKSON Jr., J.T. (1995). *Biorremediation Engineering-design and applications*, McGraw-Hill, New York. 554p.

DAMIANOVIC, M.H.R.Z. (1997). Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RHHLF). São Carlos. 174p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DODDEMA, H.J. ; VOGELS, G (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 36, p.752-754.

DOLFING, J.; HARRISON, B.K. (1992). Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environ Sci Technol*, v. 26, p.2213-2218.

- DUBOURGUIER, H.C.** (1987). Curso Ecologia da Digestão Anaeróbia .
Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo,
CETESB, São Paulo.
- FIELD, J.A .; STAMS, A.J.M.; KATO, M.; SCHRAA, G.** (1995). Enhanced
biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic
bacterial consortia. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 67, p.47-67.
- GUIOT, S.R.; PAUSS, A.; COSTERTON, J.W.** (1991). A structure model of the
anaerobic granule consortium. In 6th International Symposium on Anaerobic
Digestion. Paper Pre - prints. CETESB, IPT, SABESP e IAWPRC. P.1-10, São
Paulo, 12 - 16 mai.
- HÄGGBLOM, M.M.; VALO, R.J.** (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes.
In: CERNIGLIA, C.E. & YOUNG, L.Y., (Eds.) *Microbial transformation and
degradation of toxic organic chemicals*, ed. Wiley-Liss. New York. Cap. 11, p.
389-434.
- HENDRIKSEN, H.V.; LARSEN, S.; AHRING, B.K.** (1992). Influence of a
supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in
granular sludge. *Appl Environ Microbiol.* V 58, p. 365-370.
- HOLLIGER, C.; STAMS, A.J.M.; ZEHNDER, A.J.B.** (1988). Anaerobic
degradation of recalcitrant compounds. In *Anaerobic Digestion .* (Eds.) E.r. Hall
and P.N. Hobison. Pergamon Press, New York, p.211-224.
- HOLLIGER, C.J.; SCHUMACHER W.** (1994). Reductive dehalogenation as a
respiratory process *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 66, p.239-246.

- HUNGATE, R.E.**(1969). A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *METHODS in microbiology*, Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (Eds). New York, v.38, p. 117-32 .
- IDE, A.; NIKI, Y.; SAKAMOTO, F.; WATANABE, H.** (1972). Decomposition of pentachlorophenol in paddy soil. *Agric Biol Chem*, v.36, p.1937-1944.
- KUWATSUKA, S.; IGARASHI, M.** (1975). Degradation of PCP in soils. II The relationship between the degradation of PCP and the properties of soils, and the identification of the degradation products of PCP. *Soil Sci. Plant nutr.*, v.21, p.405-414.
- LARSEN, S.; HENDRIKSEN, H.V.; AHRING, B.K.** (1991). Potential for thermophilic (50°C) anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, p.2085-2090.
- LIU, S.; SUFLITA, J.M.** (1993). Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *TIBTECH*, v.11, p.344-352.
- MADSEN, T.; LICHT, D** (1992). Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *App.Environ. Microbiol.*, n° 9, v. 58, p.2874-2878.
- MEER , J.R.; LEVEAU, J.; WERLEN, C.** (1994). Genetic adaptation of microorganisms to environmental pollutants. *Eawag News*, v.35 E, p. 8-15.
- MIKESSEL, M.D.; BOYD, S.A.** (1986). Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *Applied and Environ. Microbiol.*, vol 52, n° 4, p. 861-865.

- MILLER, T.L.; WOLIN, M.J.** (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivation obligate anaerobes. *Appl Environ Microbiol.*, v.27, p.985-987.
- MOHN, W.W.; KENNEDY, K.J.** (1992). Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Appl Environ Microbiol.*, v.58, p.1367-1370.
- MOHN, W.W.; TIEDJE, J.M.** (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbial Review*, v.56, n.3, p. 482-507.
- MURTHY, N.B.K.; KAUFMAN, D.D.; FRIES, G.F.** (1979). Degradation of pentachlorophenol (PCP). Aerobic and anaerobic soil. *J. Environ Sci Health B.*, v.14, p.1-14.
- NATION, J.L.** (1983). A new method using hexamethyldisilane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*, v.58, p.347-351.
- NICHOLSON, D.K.; WOODS, S.L.; ISTOK, J.D.; PEEK, D.C.N** (1992). Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol*, v.58, p. 2280-2286.
- OREMLAND, R.S.** (1988). Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In *Biology of anaerobic organisms*. (Eds.) Alexander J. B. Zehnder. John Wiley & Sons, Inc., EUA, p. 641-705.
- PEREIRA, E.C.** (1992). Aplicações da cromatografia gasosa de alta resolução em estudos preliminares sobre a degradação de poluentes orgânicos clorados por microorganismos anaeróbios de sedimentos lacustres brasileiros. São Carlos. 145p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química e Física de São Carlos. Universidade de São Paulo.

- REINEK, W.** (1984). Microbial degradation of halogenated aromatic compounds. In: Gibson DT (org): Microbial degradation of organic compounds. New York. Marcel Dekker, p. 319-360.
- SHELTON, D.R.; TIEDJE, J.M.** (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl Environ Microbiol*, v.47, n.4, p. 850-857.
- SUFLITA, J.M.; TOWNSEND, G.T.** (1995). The microbial ecology and physiology and aryl dehalogenation reactions and implications for bioremediation. . Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. CERNIGLIA, C.E. & YOUNG, L.Y., (Eds.), Wiley-Liss. New York. Cap. 5, p. 243-268.
- THE MERCK INDEX** (1996).. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals Twelfth edition. New Jersey. Merck & Co., Inc..
- UTKIN, I; DALTON, D.D.; WIEGEL, J.** (1995). Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogens* JW/IU-DC-1. *Appl Environ Microbiol*, v.61, p.346-351.
- VAZOLLER, R.F.** (1995) Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos,. 259p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- WACKETT, L.P.** (1995). Bacterial co-metabolism of halogenated organic compounds. .Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. CERNIGLIA, C.E. & YOUNG, L.Y., (Eds.). Wiley-Liss. New York. Cap. 5, p. 215-241.

WU, W.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, G. (1993). Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. *Appl Environ Microbiol*, v.59, p.389-397.

ZINDER, S.; DISTEFANO, T.; GOSSET, J.; JUANG, Y.L.; VAZOLLER, R.F.; ANGUISH, T. (1991). Preliminary microbiological characterization of an anaerobic enrichment culture which converts tetrachloroethylene to ethylene. ASM Meeting, American Society Microbiology - Dallas, USA.

ZINDER, S.H.; SOWERS, K.R.; FERRY, J.G. (1984). *Methanosarcina thermophila* sp. nov.. a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.35, p.522-523.

GLOSSÁRIO

COMETABOLISMO: Cometabolismo não é metabolismo no senso comum, ou seja, é uma atividade metabólica que não envolve geração de energia celular, ou síntese celular. Tem-se a ocorrência de uma transformação microbiana fortuita de um composto. Tradicionalmente, todo organismo obtém energia através do metabolismo de degradação de um composto. Entretanto, enzimas geradas por um organismo que utiliza um determinado substrato orgânico, podem transformar diferentes substratos que não estão associados com produção de energia, assimilação de carbono, ou qualquer outro processo celular. A essa ação microbiana denomina-se cometabolismo. Portanto, definiu-se cometabolismo como a degradação de um composto somente na presença de outra matéria orgânica que serve como a fonte primária de energia à célula (McCARTY apud COOKSON, Jr., 1995; WACKET, 1995)].

COSUBSTRATO: É formado por um composto ou conjunto de diversos compostos que funcionam como fonte adicional de energia e carbono. Quando o composto-alvo da degradação está abaixo das concentrações necessárias para uma boa resposta biológica, faz-se necessária a adição de uma nova fonte de energia e carbono. Quando esta fonte adicional fica disponível para estimular o crescimento biológico, é chamada de substrato primário, e o composto-alvo será degradado como substrato secundário (COOKSON Jr., 1995).