

392 - REPIVISA

T 163/97
✓

**DEGRADAÇÃO DE PENTACLOROFENOL (PCP) EM REATORES
ANAERÓBIOS HORIZONTAIS DE LEITO FIXO (RAHLF)**

MÁRCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC

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

DEDALUS - Acervo - EESC



31100016611

ORIENTADOR: PROF. DR. EUGENIO FORESTI



SÃO CARLOS - 1997

Class.	TESE - EESC
Curr.	1784
Tombo	T163197

Área: Hidráulica e Saneamento

31100016611

at 0927486

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

D158d Damianovic, Márcia Helena Rissato Zamariolli
Degradação de Pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) / Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic. -- São Carlos, 1997.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1997.
Área: Hidráulica e Saneamento
Orientador: Prof. Dr. Eugenio Foresti

1. Tratamento de águas residuárias.
2. Degradação de Pentaclorofenol (PCP).
3. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). I. Título

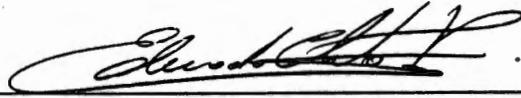
FOLHA DE APROVAÇÃO

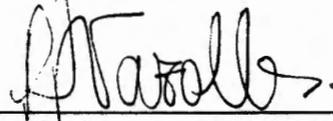
Candidata: Engenheira **MÁRCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC**

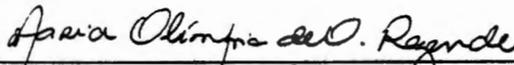
Tese defendida e aprovada em 01-8-1997

pela Comissão Julgadora:


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

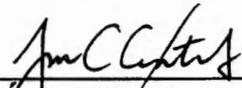

Prof. Associado **EDUARDO CLETO PIRES**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)


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


Profª. Doutora **MARIA OLÍMPIA OLIVEIRA REZENDE**
(Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo)


Profª. Doutora **DIONE MARI MORITA**
(Escola Politécnica - Universidade de São Paulo)


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


Prof. **JOSE CARLOS A CINTRA**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Ao meu querido Pedro

Aos meus pais, meus exemplos de vida

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eugenio Foresti pela orientação e pela liberdade concedida na realização deste trabalho.

À Profa. Elizabeth de Mattos Moraes pelo auxílio na condução deste trabalho, pelo incentivo e pela grande amizade.

À Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller pelo auxílio nas análises microbiológicas e incentivo para realização deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Processos Anaeróbios pela convivência fraterna.

Aos colegas e grandes amigos Dr. Marcelo Zaiat, Eng^a Deize Dias Lopes, Eng^a Maria Lyda Bolaños Rojas e Francisco José Vela pelo auxílio na realização experimental e sugestões recebidas durante a elaboração deste trabalho.

Aos colegas e grandes amigos, Eng^a Ariuska Karla Amorim Cabral, Eng^a Deize Dias Lopes, Ivana Ribeiro de Nardi, Lorena Grein Tavares Vieira e Sérgio Larizzatti pelo auxílio na realização da parte gráfica deste trabalho.

À Dra. Eloisa Pozzi Gianoti pela realização de ensaios microbiológicos.

À Dra. Diva Landgraf, à Profa. Dra. Maria Olímpia Rezende e demais componentes do Grupo de Radioquímica e Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos -USP, pelo auxílio no desenvolvimento das análises cromatográficas.

À Profa. Dra. Sioni Maluf Barbieri *in memoriam*.

Aos professores, funcionários e colegas do SHS/EESC/USP.

À Digmotor pelo apoio na manutenção de equipamentos eletrônicos e pela fabricação e doação de mesa agitadora.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado.

À FAPESP pelo apoio na aquisição de equipamentos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1. Compostos halogenados-aspectos gerais.....	5
3.1.1. Clorofenóis.....	9
3.2. Mecanismos de remoção de compostos aromáticos halogenados.....	11
3.2.1. Degradação fotocatalítica	12
3.2.2. Adsorção.....	12
3.2.3. Biodegradação	15
3.3. Microrganismos envolvidos na descloração reductiva.....	22
3.4. Adaptação de microrganismos ao substrato	28
3.5. Imobilização de microrganismos.....	29
3.6. Estudos sobre degradação de compostos aromáticos halogenados citados na literatura.....	33
3.6.1. Estudos com alimentação em batelada ou semi-contínua.....	34
3.6.2. Estudo de degradação de compostos orgânicos halogenados em cultura pura	48
3.6.3. Estudos sobre aril desalogenação em reatores com alimentação contínua	53

3.7.Determinações analíticas de clorofenóis.....	58
3.7.1.Aspectos gerais.....	58
3.7.2.Derivatização.....	60
3.7.3 Determinação de clorofenóis.....	62

4. INSTALAÇÕES, TÉCNICAS EXPERIMENTAIS E MÉTODOS

ANALÍTICOS..... 69

4.1. Aspectos gerais.....	69
4.2. Testes cromatográficos para determinação de clorofenóis.....	72
4.2.1. Aspectos gerais.....	72
4.2.1.1. Preparação das soluções padrões.....	73
4.2.1.2. Condições de temperatura utilizadas.....	73
4.2.1.3. Metodologia para extração e derivatização de clorofenóis.....	74
4.2.2. Teste de recuperação de PCP do substrato em função do número de extrações sequenciais.....	74
4.2.3. Teste de recuperação de clorofenóis da solução de substrato.....	75
4.2.4. Verificação do intervalo de linearidade e preparação de equações, relacionando concentração de clorofenóis e áreas dos picos cromatográficos.....	75
4.2.5. Teste de reprodutibilidade de extração e injeção.....	76
4.2.6. Teste de decaimento do PCP no substrato.....	76
4.2.7. Avaliação do decaimento da concentração de PCP em amostras armazenadas em “freezer”.....	77
4.3. Degradação de PCP e sua influência nos reatores RAHLF.....	77
4.3.1. Reatores utilizados.....	77
4.3.2. Inóculo.....	79
4.3.3. Imobilização do lodo utilizado nos reatores.....	81
4.3.4. Substrato.....	81
4.3.5. Cuidados com a manipulação de PCP.....	85
4.3.6. Determinações analíticas e exames realizados durante a operação dos reatores.....	85

4.3.6.1. Avaliação da adsorção do PCP no meio suporte	86
4.3.6.2. Avaliação da adsorção de PCP no lodo imobilizado após período de operação do reator.....	86
4.3.6.3. Análises físico-químicas.....	87
4.3.6.4. Composição do biogás por cromatografia	87
4.3.7. Exames microbiológicos do lodo.	87
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	89
5.1. Resultados dos testes cromatográficos para determinação de clorfenóis	89
5.1.1. Teste para comparação da capacidade de recuperação do PCP em função do número de extrações.....	92
5.1.2. Teste para avaliação da capacidade de extração de clorfenóis	93
5.1.3. Elaboração de equações de reta relacionando concentração de clorfenóis e áreas dos picos cromatográficos.....	98
5.1.3.1. Equação para determinação de PCP em solução de substrato.....	98
5.1.3.2. Equação para determinação de clorfenóis nos afluente e efluentes dos reatores.....	99
5.1.4. Teste de reprodutibilidade de extração de PCP	100
5.1.5. Teste de decaimento do PCP no substrato	102
5.1.6. Teste para avaliação do decaimento de PCP durante armazenamento das amostras em “freezer”	104
5.1.7. Teste de adsorção de PCP no meio suporte	104
5.2. Desempenho dos reatores durante adição de PCP.....	105
5.3. Degradação de PCP nos reatores.....	125
5.3.1. Adsorção de clorfenóis no lodo imobilizado.....	151
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	161
7. BIBLIOGRAFIA	163
ANEXO	

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Modelo de desalogenação de PCP	17
Figura 3.2. Reações típicas de cloro e nitrofenóis usadas para derivatização.....	62
Figura 4.1. Etapas experimentais efetuadas durante esta pesquisa.....	71
Figura 4.2. Esquema dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo.(a) RAHLF ₁ e (b) RAHLF ₂	79
Figura 5.1. Cromatograma de solução em substrato extraída em hexano (a) 6 mg/L de PCP; 2,3,5 TCP; 3,5 DCP(b) amostra em branco	90
Figura 5.2. Cromatograma de amostra de efluente do reator RAHLF ₂ durante adição de 8,0 mg/L de PCP ao substrato	91
Figura 5.3 Fotos do lodo de inóculo - microscopia ótica de fluorescência.	106
Figura 5.4.Fotos de flocos biológicos aderidos ao meio suporte RAHLF ₁	106
Figura 5.5 Foto de morfologia de bactérias <i>Methanotrix</i> sp.	107
Figura 5.6 Foto de distribuição das células no meio suporte.	108
Figura 5.7. Valores médios dos parâmetros estudados no RAHLF ₁ (a) DQO; (b) eficiência de remoção de DQO; (c) taxa de aplicação de PCP.....	117
Figura 5.8. Valores médios dos parâmetros estudados no RAHLF ₂ (a) DQO; (b) eficiência de remoção de DQO; (c) taxa de aplicação de PCP	122
Figura 5.9. Concentração de clorofenóis no efluente do reator RAHLF ₁	131
Figura 5.10. Perfil de concentração de clorofenóis no RAHLF ₁ 74º dia de operação [PCP] _{teórica} = 8,0 mg/L.....	134
Figura 5.11. Perfil de concentração de clorofenóis no RAHLF ₁ 76º dia de operação [PCP] _{teórica} = 8,0 mg/L.....	135

Figura 5.12. Perfil de concentração de clorofenóis no 85º dia de operação $[PCP]_{teórica} = 4,0 \text{ mg/L}$	138
Figura 5.13. Concentração de clorofenóis no efluente do reator RAHLF ₂	139
Figura 5.14. Fotos de bactérias <i>Methanosarcina</i> sp - RAHLF ₁	143
Figura 5.15. Fotos de cocobacilos e bacilos fluorescentes - RAHLF ₁	143
Figura 5.16. Fotos de filamento longo e bacilos de pontas retas - RAHLF ₁ após 100 dias de adição de PCP.....	144
Figura 5.17. Fotos de bacilos -RAHLF ₁ após 100 dias de adição de PCP.....	145
Figura 5.18. Fotos de víbrios e bacilos RAHLF ₁ após 100 dias de adição de PCP.....	145
Figura 5.19. Fotos : predominância de bactérias metanogênicas relacionadas ao gênero <i>Methanotrix</i> sp RAHLF ₁ - ponto 1 após 100 dias de adição de PCP.....	146
Figura 5.20. Fotos :bactérias metanogênicas relacionadas ao gênero <i>Methanotrix</i> sp em conjunto com outras estruturas celularesRAHLF ₁ - ponto 4- após 100 dias de adição de PCP.....	147
Figura 5.21. Floços de aglomerados de víbrios - RAHLF ₂ - após 100 dias de adição de PCP.....	147
Figura 5.22. Floços de bacilos e outras morfologias celulares RAHLF ₂ após 100 dias de adição de PCP.....	148
Figura 5.23. Perfil de concentração de clorofenóis no lodo imobilizado do RAHLF ₁	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Variação de energia livre de Gibbs	21
Tabela 4.1. Composição do substrato.....	83
Tabela 4.2 A. Concentração e massa de PCP aplicadas ao RAHLF ₁	84
Tabela 4.2 B. Concentração e massa de PCP aplicadas ao RAHLF ₂	84
Tabela 4.3. Frequência e métodos das determinações analíticas e exames realizados nos reatores.....	85
Tabela 5.1. Comparação da capacidade de extração de PCP.....	92
Tabela 5.2A. Comparação das áreas de picos de PCP em hexano por solubilização direta e após extração do substrato.....	95
Tabela 5.2B. Comparação das áreas de picos de TCP em hexano por solubilização direta e após extração do substrato.....	96
Tabela 5.2C. Comparação das áreas de picos de DCP em hexano por solubilização direta e após extração do substrato.....	97
Tabela 5.3. Valores de áreas dos picos cromatográficos correlacionados a concentrações de PCP presentes em meio de cultura extraídos em hexano	98
Tabela 5.4 A. Valores médios das áreas dos pico obtidos para soluções de PCP	99
Tabela 5.4 B. Valores médios das áreas dos pico obtidos para soluções de TCP	99
Tabela 5.4 C. Valores médios das áreas dos pico obtidos para soluções de DCP.....	100
Tabela 5.5. Teste de reprodutibilidade de extração de PCP.....	101
Tabela 5.6:Concentração de PCP no substrato ao longo do tempo	103
Tabela 5.7. Avaliação da concentração de PCP após armazenamento das amostras	104

Tabela 5.8. Teste de adsorção de PCP no meio suporte.....	105
Tabela 5.9. Análise descritiva dos parâmetros físico-químicos dos reatores RAHLF ₁ e RAHLF ₂ anteriormente a adição de PCP	110
Tabela 5.10. Valores extremos dos parâmetros físico-químicos do RAHLF ₁ ...	111
Tabela 5.11. Valores extremos dos parâmetros físico-químicos do RAHLF ₂ ...	114
Tabela 5.12. Perfil de DQO-[PCP] = 4,0 mg/L 87 ^o dia de operação.....	120
Tabela 5.13. Concentrações de clorofenóis no efluente dos reatores.....	126
Tabela 5.14. Perfil de concentrações de clofenóis no RAHLF ₁ 74 ^o dia [PCP] = 8,0 mg/L.....	133
Tabela 5.15. Perfil de concentrações de clofenóis no RAHLF ₁ 76 ^o dia [PCP] = 8,0 mg/L.....	135
Tabela 5.16. Perfil de concentrações de clofenóis no RAHLF ₁ 85 ^o dia [PCP] = 4,0 mg/L.....	137
Tabela 5.17. Perfil de concentrações de clofenóis no RAHLF ₂ 75 ^o dia [PCP] = 8,0 mg/L.....	141
Tabela 5.18. Comparação com resultados citados na literatura	150
Tabela 5.19. Perfil de adsorção de clorofenóis no lodo imobilizado RAHLF ₁ (93 ^o dia de operação-[PCP] _{teórica} = 8,0 mg/L).....	152
Tabela 5.20. Perfil de adsorção de clorofenóis no lodo imobilizado RAHLF ₂ (96 ^o dia de operação-[PCP] _{teórica} = 8,0 mg/L).....	153
Tabela 5.21. Concentração de sólidos aderidos à espuma anteriormente à adição de PCP (RAHLF ₁ e RAHLF ₂)	154
Tabela 5.22. Concentração de sólidos aderidos à espuma após 100 dias de operação com PCP (RAHLF ₁).....	154
Tabela 5.23. Concentração de sólidos aderidos à espuma após 100 dias de operação com PCP (RAHLF ₂).....	155

Tabela 5.24. Avaliação da massa de lodo imobilizado presente no RAHLF₁ e da massa de PCP adsorvida..... 157

Tabela 5.25. Avaliação da massa de lodo imobilizado presente no RAHLF₂ e da massa de PCP adsorvida..... 159

Tabela A1. Parâmetros físico-químicos dos reatores

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BrES - bromoetanosulfônico (inibidor da metanogênese)

BRS - bactéria redutora de sulfato

CP - monoclorofenol

CB - clorobenzoato

C.G. cromatografia gasosa

DCP - diclorofenol

DQO - demanda química de oxigênio

ECD - detector de captura de elétrons

EPS - substratos poliméricos extracelulares

IR - infravermelho

PM - peso molecular

mM - milimol

μ M - micromol

M - mol

M.E.V. - microscopia eletrônica de varredura

M.O.C. - microscopia ótica comum

n - número de amostras

PCB - pentaclorobenzeno

PCe - pentacloroetileno

PCP - pentaclorofenol

Q- vazão (L^3T^{-1})

r - taxa de incremento de temperatura ($^{\circ}C/min$)

RAHLF - Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo

s_{n-1} - desvio padrão

SSV - sólidos suspensos voláteis

SV - sólidos voláteis

θ_h - tempo de retenção hidráulica (T)

t - temperatura (°C)

t_i - temperatura inicial (°C)

t_f - temperatura final (°C)

TCD - detector de condutividade térmica

TCP - triclorofenol

TeCB - tetraclorobenzeno

TeCP - tetraclorofenol

TCH - taxa de carregamento hidráulico (m^3 DQO/ m^3 .dia)

TCO - taxa de carregamento orgânico (kg DQO/ m^3 .dia)

TPCP - taxa de aplicação de PCP (mg PCP/ m^3 .dia)

UASB - Reator Anaeróbio de Manta de Lodo

UV - ultra-violeta

\bar{x} - média

RESUMO

Estudou-se a degradação e a influência de pentaclorofenol (PCP), no tratamento de substrato orgânico, em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF).

Dois reatores RAHLF, com volumes de 1.991 mL (R₁) e 296 mL (R₂) foram preenchidos com cubos de espuma de poliuretano (0,3 cm de lado), contendo lodo anaeróbio imobilizado. O lodo, composto por inóculos de diversas fontes, foi exposto previamente a PCP, em reatores de 2,0L, alimentados semi-continuamente, com taxa de aplicação de 2,0µgPCP/g SV.

Os reatores R₁ e R₂ foram alimentados continuamente com substrato sintético, utilizando glicose e ácidos fórmico e acético como fontes de carbono. As Taxas de Carregamento Orgânico máximas (T.C.O) aplicadas foram de 1,12 KgDQO/m³ dia e 1,71 KgDQO/m³ dia, respectivamente, para os reatores R₁ e R₂, com tempos de retenção hidráulica de 24 e 18 horas. Os reatores foram submetidos a taxas crescentes de aplicação do tóxico de 0,05 a 2,59 mg/L_r dia para R₁ e de 0,06 a 4,15 mg/L_r dia, para R₂.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o desempenho dos reatores não foi afetado pela presença de PCP nas taxas estudadas. R₂ apresentou eficiência de remoção de DQO constante, próxima a 98%, semelhante à de R₁, excluindo o período em que este reator foi afetado por um curto-circuito.

A degradação de PCP nos reatores foi acompanhada por análises cromatográficas de clorofenóis, PCP e metabólitos, nos afluentes e efluentes dos reatores.

Ambos reatores apresentaram habilidade em desalogenar, quase completamente, PCP em seus metabólitos. DCP, em concentração média de 0,23 mg/L, e traços de outros metabólitos foram detectados nos reatores.

Análises em amostras do lodo imobilizado, retiradas ao longo dos reatores indicaram que a adsorção de PCP e metabólitos foi desprezível, comparada às quantidades adicionadas.

O reator RAHLF mostrou-se adequado para o tratamento de substrato contendo Pentaclorofenol, nas condições estudadas.

ABSTRACT

The performance of horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactors subjected to increasing influent pentachlorophenol concentrations and their ability to degrade this compound was investigated.

Two HAIS reactors with volumes of 1,991 mL (R_1) and 296 mL (R_2) were filled with polyurethane foam cubic matrices (near side size of 0,3 cm) containing immobilized anaerobic sludge. Such sludge was previously exposed to PCP containing wastewaters in 2,0L flasks semicontinuously fed, at rate of 2.0 $\mu\text{g PCP/g VS}$.

The reactors R_1 e R_2 were continuously fed with a synthetic substrate composed of acetic and formic acids, and glucose as the main carbon sources, besides a culture medium. The organic loading rates (OLR) applied were 1.12 and 1.71 Kg COD/m^3 day, respectively for R_1 e R_2 , for the hydraulic detention times (HDT) of 24 and 18 hours. Both the reactors were subjected to increasing influent loadings from 0.05 to 2.59 mg PCP/L day for R_1 and 0.06 to 4.15 mg PCP/L day for R_2 .

The results obtained permitted to conclude that the performance of reactors was not affected by the presence of PCP in the substrate. The R_2 operated at constant COD removal efficiency of 98%. R_1 operated also at a similar COD removal efficiency excluding the operational period when short-circuiting affected the reactor performance.

PCP degradation within the reactors was monitored by subjecting influent and effluent samples to gas chromatographic analyses for determination of chlorinated compounds.

Both the reactors exhibited the ability to convert completely PCP to its metabolites. DCP at a mean concentration of 0,23 mg/L and traces of other metabolites were detected in reactors effluent samples

Analyses of immobilized sludge samples taken along the reactors indicated that adsorption of PCP and metabolites was negligible, compared to the amount of PCP added.

HAIS reactor were found to be adequate for the treatment of PCP containing wastewaters in conditions assayed.

1. INTRODUÇÃO

Acompanhando os avanços tecnológicos que têm permitido ao Homem sintetizar muitos compostos que, normalmente, causam impactos ao atingirem o ambiente, a Engenharia Sanitária necessita também avançar nas tecnologias de tratamento de resíduos, impedindo ou minimizando impactos indesejáveis à biota.

Compostos orgânicos halogenados estão entre as substâncias xenobióticas ambientalmente nocivas, por sua toxicidade inerente, intensificada pela sua difícil degradação, propiciando conseqüentemente, seu acúmulo em ecossistemas.

O Pentaclorofenol (PCP) foi utilizado durante décadas na formulação de agroquímicos, mas suas características de biocida de largo espectro e de persistência, devido à sua alta estabilidade molecular nas condições atmosféricas, induziram à 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 do Ministério da Agricultura de 02/29/1985 e seu transporte, estocagem e uso foram declarados atividades potencialmente poluidoras, na Resolução nº 5 do CONAMA de 20/11/1985. Contudo, inúmeras áreas ainda contaminadas pelo PCP e seus derivados precisam ser recuperadas. Além disso, organoclorados aparecem como subprodutos em alguns processos utilizados mundialmente: o branqueamento de celulose em indústrias de papel, bem como processos de desinfecção utilizando cloro ou hipoclorito de sódio.

Técnicas de disposição inadequadas e/ou lançamentos acidentais de resíduos contendo clorofenóis têm elevado suas concentrações no ambiente, havendo necessidade de implementação de técnicas efetivas para recuperação das áreas degradadas, bem como para tratamento de efluentes contendo estes compostos, impedindo novas contaminações.

A persistência de uma substância, intimamente relacionada à sua biodegradabilidade, é um conceito relativo: na natureza, um composto é considerado

recalcitrante ou persistente quando permanece no ambiente por meses ou anos; em sistemas de tratamento de efluentes este período é de dias ou horas. Este é um dos fatores limitantes do tratamento de organoclorados, que deve ser considerado na elaboração de projetos de tratamento.

A existência de compostos orgânicos halogenados naturais, a observação da degradação lenta destes compostos sintéticos sob determinadas condições na natureza, bem como os elevados custos e resultados discutíveis de outras tecnologias de tratamento, têm aumentado o interesse por processos biológicos para degradação destes compostos.

A utilização de tecnologias de transferência de fases, bem como processos físico-químicos de degradação, podem levar à concentração do composto e formação de compostos mais tóxicos e/ou persistentes, enquanto o tratamento por processo biológico permite sua transformação em produtos menos ou totalmente inócuos.

A dificuldade de degradação de compostos altamente clorados por processo aeróbio, e a constatação de degradação destes compostos em ambientes anaeróbios naturais, têm aumentado o interesse pela utilização de processos anaeróbios de tratamento, iniciado por desalogenação redutiva catalisadas por microrganismos específicos, sob condições fisicoquímicas muito bem controladas.

O reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), desenvolvido no Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos -USP (ZAIAT, 1996; ZAIAT et al.1994), apresenta características positivas sobre os demais sistemas anaeróbios de tratamento, como: breve período de partida; diminuição da perda de microrganismos pela aderência ao meio suporte e altas taxas de carregamento orgânico (TCO).

A utilização de reatores com alimentação contínua pode favorecer a degradação dos compostos halogenados, minimizando o acúmulo do composto original e metabólitos. O reator RAHLF pode favorecer a degradação de PCP, devido às características descritas, importantes no tratamento de efluentes contendo PCP. Além disto, a capacidade de adsorção do meio suporte poderá aumentar o tempo de retenção da substância, também imprescindível na degradação de clorofenóis.

A adequação de fatores ambientais nos reatores, como: pH, potencial redox, manutenção da comunidade de microrganismos aptos, obtida através de adaptação aos compostos, tem sido exaustivamente buscada, embora a complexidade do processo exija ainda muitos estudos.

O acompanhamento das reações de degradação de clorofenóis em águas residuárias encontra sérias dificuldades analíticas: a quantificação de cloretos, como um dos produtos da degradação, além da baixa concentração, não permite a identificação dos metabólitos orgânicos, imprescindíveis na tentativa de identificação do mecanismo de degradação; métodos espectrofotométricos não apresentam especificidade para os diferentes clorofenóis derivados, isômeros ou não; a utilização de ^{14}C é útil apenas quando se alcança a mineralização do composto.

Técnicas cromatográficas permitem a separação e a identificação de pentaclorofenol (PCP) e de metabólitos, incluindo os isômeros, e conseqüentemente o acompanhamento dos mecanismos das reações de degradação. A cromatografia gasosa tem sido utilizada na determinação de clorofenóis há décadas. Contudo, muitas das técnicas descritas na literatura não se mostraram adequadas para este trabalho, induzindo à necessidade de adaptação de metodologias.

2.OBJETIVOS

-Adaptar métodos analíticos para determinações qualitativas e quantitativas de clorofenóis;

-Verificar a influência do PCP no desempenho de reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF);

-Estudar a degradação de PCP nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. COMPOSTOS HALOGENADOS - ASPECTOS GERAIS

Muitos compostos xenobióticos ambientalmente importantes são halogenados, característica que, frequentemente, determina sua persistência. Dentre estes, os mais conhecidos e estudados são os compostos clorados. Possivelmente, isto é devido à alta publicidade dada aos problemas causados por pesticidas, entre eles o DDT e por numerosos solventes industriais (VARGAS & AHLERT, 1987). Segundo FRETZER & LINGENS (1994) e outros autores, compostos orgânicos halogenados fazem parte dos principais poluentes ambientais.

Por conveniência, os hidrocarbonetos halogenados são agrupados em três classes: alifáticos, policíclicos e aromáticos. Muitos dos compostos alifáticos halogenados, como alcanos bromados ou clorados, entre eles triclorometano e alcenos, como também ácidos alcaóides halogenados, dibromoetileno e tricloroetileno são comumente utilizados na fabricação de refrigerantes, vernizes e semi condutores e como solventes para lavagens a seco. Etileno dibromado tem sido utilizado como fumigante de solo e como anti-explosivo para gasolina (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991). Esses compostos podem ser considerados solúveis em água, sendo potencialmente contaminantes do solo e das águas subterrâneas (MOHN & TIEDJE, 1992).

Hidrocarbonetos aromáticos poli-cíclicos clorados são encontrados como constituintes e produtos de combustíveis fósseis, estando entre eles os difenil policlorados, além de outros como o DDT. Os difenil policlorados são praticamente insolúveis em água, não polares, solúveis em gorduras e praticamente inertes. São utilizados em componentes eletrônicos, herbicidas, como agentes anti- microbiano, entre

outros. Seu uso foi proibido, devido à sua toxicidade a humanos e animais (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991).

Compostos aromáticos clorados representam os principais poluentes ambientais, em virtude de sua larga utilização como biocidas, até recentemente, e as quantidades substanciais que ainda são introduzidas no meio ambiente. Nessa classe de compostos incluem-se os compostos fenólicos clorados utilizados na preservação de madeira, herbicidas, fungicidas, biocidas em geral e compostos benzênicos, utilizados com fumigantes, na produção de pesticidas e tinturas. Os clorofenóis foram, por décadas, amplamente utilizados como biocidas de largo espectro. Além desses, também fazem parte dessa classe de compostos os fenóxi-ácidos, utilizados há 40 anos como herbicidas, que têm mostrado ser degradáveis no solo, porém a baixas taxas (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991). Contudo, a utilização de compostos organoclorados tem sido proibida em muitos países, devido à sua toxicidade aos seres vivos.

A distribuição e os metabolismos microbianos de compostos orgânicos halogenados têm sido importantes alvos de estudos de microbiologistas, químicos e de todos os profissionais associados às ciências de saúde (KING, 1988), bem como de profissionais envolvidos no tratamento de resíduos. HOLLIGER et al (1988) & KING (1988) citaram como causa principal desse interesse a grande diversidade de compostos halogenados xenobióticos, muitos dos quais tóxicos e/ou recalcitrantes e o impacto que podem causar ao ambiente, interferindo diretamente na qualidade de vida, bem como nos sistemas de tratamento de efluentes.

O caráter recalcitrante de um composto pode ser devido a: -resistência inerente à degradação, motivado pela sua estrutura química; -fatores ambientais (temperatura, pH, potencial redox, concentração do substrato, salinidade, biodisponibilidade, toxicidade, compostos adicionais, sinergismo e antagonismo) e -condições biológicas (tempo de adaptação, concentração de microrganismos aptos) (LARSEN et al. (1991); FIELD et al. (1995); BOWER & ZEHNDER(1993); HOLLIGER et al. (1988); COOKSON(1995). Dessa forma, o caráter recalcitrante pode não ser característica do composto e sim das condições ambientais. Pouco é conhecido

sobre a influência desses fatores ambientais na atividade desalogenante de haloaromáticos (LASRSEN et al., 1991).

Nem todos os compostos recalcitrantes halogenados são xenobióticos. Alguns originam-se de materiais fósseis como petróleo, enquanto outros são produzidos por organismos vivos, como compostos alifáticos contendo cloro, bromo e iôdo, característicos da microbiota vegetal e animal marinha (KING, 1986). Grande parte desses compostos, nas concentrações em que são encontrados próximos aos locais de acúmulo, demonstraram ser tóxicos a organismos aeróbios, o mesmo não ocorrendo com relação a organismos anaeróbios (KING, 1989). Segundo citações de FRETZER & LINGENS (1994), até 1986 mais de 700 compostos halogenados naturais foram identificados e FIELD et al (1995) reportaram que mais de 1.500 compostos aromáticos naturais já foram identificados. Portanto, essa classe de compostos não é incomum na natureza, fato esse de grande importância na adaptação de microrganismos a compostos halogenados xenobióticos.

Ao contrário dos compostos naturais, muitos compostos xenobióticos são menos susceptíveis à biodegradação, possivelmente pela inabilidade dos microrganismos em produzir enzimas necessárias aos metabolismos destes compostos. Até o início da década de 80, compostos halogenados eram considerados recalcitrantes. A observação de sua degradação em áreas contaminadas, indicando atividade biológica (COOKSON, 1995), bem como a possibilidade de conversão a compostos inócuos, têm impulsionado o desenvolvimento da biotecnologia com esse propósito (FREDMAN & GOSSET, 1989).

Quantidades significativas de clorofenóis podem ser formadas e alcançar o ambiente, como subprodutos do processo de branqueamento de papel utilizando cloro (PARKER et al, 1993), incineração de resíduos municipais, cloração de águas residuárias (BASU et al, 1996) e transformação de hexaclorobenzeno e lindano (BOYD & SHELTON, 1984). Como resultado do uso extensivo dessa classe de compostos, níveis significativos têm sido encontrados em muitos locais. Segundo citações de BARBIERE (1994), estudos sugerem que a contaminação de tecidos humanos com pentaclorofenol (PCP), em países industrializados, está entre 10 e 20 ppb.

Processos físico-químicos, como: arraste com ar e adsorção em carvão, escavações, isolamento hidrodinâmico ou imobilização com agentes químicos são técnicas frequentemente aplicadas à recuperação de locais poluídos e no tratamento de resíduos de difícil degradação. Segundo LU et al. (1988) apud BRYANT et al. (1991), técnicas de remediação que não transformam o composto, não reduzem os riscos potenciais dos mesmos.

O aumento no interesse pela utilização de processos biológicos deve-se à possibilidade de conversão dos contaminantes em produtos inócuos, ao invés de transferi-lo de um ambiente para outro (FREEDMAN & GOSSET 1989), e ao seu custo reduzido, quando comparado às demais técnicas de tratamento de compostos perigosos (FIELD et al., 1995).

Atualmente, tem sido impulsionado o desenvolvimento de técnicas de "biorremediação", que é um termo utilizado para definir a aplicação de tratamento biológico para remoção de compostos químicos perigosos na natureza. Essa técnica requer controle e manipulação de processos microbiológicos em reatores ou no próprio ambiente "in situ". Embora esse processo apresente vantagens de custos reduzidos, são necessárias muitas pesquisas visando otimizar e controlar as transformações bioquímicas dos compostos (COOKSON, 1995).

Através de regulamentações governamentais e pressões do mercado, em alguns países, indústrias estão lentamente modificando seus processos para diminuição do uso e produção de compostos perigosos. A completa prevenção da poluição por compostos aromáticos tem sido proposta como objetivo a longo prazo. Entretanto, há necessidade de recuperação de áreas contaminadas com descargas já efetuadas, bem como de minimizar os efeitos desses poluentes através do tratamento de efluentes das fontes geradoras (FIELD et al., 1995).

A biotransformação aeróbia dos compostos orgânicos clorados é bastante documentada, contudo, em condições anaeróbias, este estudo é recente. O desconhecimento dos microrganismos responsáveis pela atividade desalogenante torna seu estudo mais difícil, uma vez que não se conhecem as condições ideais para sua ocorrência. Segundo ZHANG & WIEGEL (1990), a degradação anaeróbia pode ocorrer a taxas iguais ou superiores às da degradação aeróbia.

3.1.1. CLOROFENÓIS

Como grupo, os clorofenóis são altamente tóxicos a largo espectro de organismos. Os clorofenóis são persistentes no ambiente, potencialmente carcinogênicos, além de alterarem as propriedades organolépticas, como cor e odor da água (FLORA et al., 1994). Essa classe de compostos está presente na lista de poluentes prioritários da EPA (SPEIDEL et al., 1988). Há alguns anos tem surgido inquietação quanto ao destino de clorofenóis no ambiente, não somente devido às suas propriedades tóxicas como também por serem precursores de dioxinas, que podem resultar da incineração de lodos de esgoto municipais e de produtos de madeira contendo clorofenóis (BOYD & SHELTON, 1984).

Lodos de esgoto apresentam depósitos de compostos químicos orgânicos e inorgânicos. Enquanto as informações sobre presença de metais são disponíveis, as relativas à presença de compostos orgânicos são ainda escassas. Os clorofenóis são uma classe de compostos potencialmente presente nos lodos, devido ao seu uso em vasta gama de produtos manufaturados de usos doméstico, industrial e agrícola (WILD et al., 1993). Estes autores concluíram que a concentração de clorofenóis nos lodos das diversas fontes testadas, variou de 10 a 60 mg/Kg (35 - 100 µg/L) e que 2,4, Diclorofenol (2,4DCP) foi a espécie dominante (10 a 50 mg/Kg), possivelmente pelo seu uso industrial e agrícola, e por ser um metabólito da degradação do PCP, resistente à degradação anaeróbia.

Dentre os clorofenóis, o pentaclorofenol (PCP) é um poluente prioritário, sendo utilizado principalmente na preservação de madeira. É relativamente resistente à degradação, razão pela qual seu uso cria problemas de poluição quando atinge a natureza (GALIL & NOVAK, 1995). De acordo com SABER & CRAWFORD (1985), o pentaclorofenol (PCP) e seu sal (Na-PCP) estão entre os biocidas mais versáteis e foram muito utilizados nos EUA até a década de 80.

PCP é letal para grande variedade de organismos, quer animais ou vegetais. Essa substância parece ser mutagênica ou pelo menos co-mutagênica, sendo a exposição a ela causadora de riscos à saúde. Em concentrações tão baixas quanto 10^{-6} e 10^{-7} M há impedimento da fosforilação oxidativa "in vitro" (MIKESELL & BOYD,

1986), uma vez que o PCP previne a incorporação de fósforo orgânico ao ATP, sem influenciar no transporte de elétrons. A respiração na célula prossegue, mas as reservas de energia necessárias ao crescimento são exauridas (MATOLCSY, 1988).

A DL50 do PCP é 210 mg/Kg para ratos. Em soluções aquosas mais fortes que 1% causa severa irritação à pele, mas não apresenta efeito tóxico crônico devido à sua rápida excreção ou metabolização (MATOLCSY, 1988).

PCP tem sido muito utilizado na preservação de madeira, estando presente na mistura 2,4,6Triclorofenol (2,4,6TCP) e 2,3,4,6 Tetraclorofenol (2,3,4,6TeCP). Os derivados 2,4Diclofenol (2,4DCP) e 2,4,5Triclorofenol (2,4,5TCP) são usados como intermediários na manufatura de herbicidas, sendo encontrados também como impurezas na mistura (WILD et al., 1993). Os herbicidas 2,4-diclorofenoxiacético e ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético são fabricados a partir dos correspondentes di e triclorofenóis.

Clorofenóis podem ser degradados biologicamente, bem como abioticamente através de hidrólise e fotólise (HWANG et al. apud ZHANG & WIEGEL, 1990).

Os passos metabólicos para biodegradação do PCP foram identificados, fornecendo uma rota complexa, baseada em intermediários clorados, que eventualmente podem ser totalmente desclorados e mineralizados (MIKESELL & BOYD, 1986).

Existem discrepâncias na literatura com respeito à solubilidade do PCP, que segundo STAPLETON et al. (1994) podem ser resultado do controle inadequado do pH e temperatura. Segundo o autor, a solubilidade do PCP aumenta com o aumento da força iônica.

A solubilidade e o coeficiente de distribuição são propriedades dos compostos orgânicos ionizáveis que variam significativamente em função do pH. Essas substâncias, em fase aquosa, podem existir tanto com espécies protonadas quanto desprotonadas, sendo o equilíbrio dependente do pH em relação à constante de dissociação (pKa). Muitos poluentes importantes como clorofenóis, nitrofenóis e dinitrofenóis são ionizáveis.

O PCP é um ácido fraco com pKa de 4,75. Segundo VALSARAJ et al. apud STAPLETON et al. (1994), a solubilidade varia entre 30 e 15.000 μM (8 a 4.000

mg/L), para variação de pH de 2,5 a 8,0. A taxa de distribuição entre octanol e água decresce de 4,8 para 1,1, quando o pH aumenta de 4,0 para 10,0.

3.2.MECANISMOS DE REMOÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS HALOGENADOS

A remoção de clorofenóis do meio ambiente pode ocorrer por adsorção, neste caso ocorrendo apenas transferência de ambientes e sua concentração, ou por foto-decomposição e degradação biológica, quando há a transformação dos compostos.

A remoção natural de clorofenóis pode ocorrer por fotodecomposição ou biodegradação. A fotodecomposição é o principal mecanismo nas águas superficiais, enquanto a biodegradação predomina em solos, águas profundas e sedimentos aquáticos (FLORA et al., 1994).

A biodegradação de clorofenóis pode ocorrer por processo aeróbio ou anaeróbio, sendo os compostos mais clorados degradados preferencialmente por processo biológico anaeróbio. A biodegradação desta classe de compostos permite sua transformação em compostos inócuos ou, em geral, menos tóxicos que seus precursores (MOHN & TIEDJE, 1992).

Degradação fotocatalítica pode potencialmente substituir técnicas de adsorção em carvão ativado e arraste com ar, que são tecnologias atualmente utilizadas no tratamento de compostos orgânicos tóxicos em águas residuárias. A degradação fotocatalítica destrói os compostos perigosos, sendo preferível em relação às tecnologias de transferência de fase. Entretanto, a degradação catalítica somente resulta em mineralização, sob irradiação prolongada. Portanto, a aplicabilidade da técnica depende da energia disponível e da viabilidade econômica (MANILAL et al., 1992). Segundo os autores, a técnica pode ser otimizada por modificações catalíticas, pH, presença de oxidantes, entre outros.

PIGNATELLO et al. (1983) observaram em água corrente de canal, simulando o curso de um rio, que o PCP adicionado foi removido por uma combinação de mecanismos: adsorção, volatilização, fotólise e biodegradação. A fotólise foi mais evidente na superfície e muito atenuada no fundo. A fotólise foi responsável por 5 a

28% da remoção, em função da luminosidade; a volatilização contribuiu com menos de 0,006%; a adsorção com menos de 5% e a degradação microbiológica entre 26 e 46%.

3.2.1. DEGRADAÇÃO FOTOCATALÍTICA

ALBERICI & JARDIM (1994) estudaram a fotodegradação de fenol, 2,4 diclorofenol, 2,3,5 triclorofenol e pentaclorofenol, em reator de fluxo ascendente. A melhor taxa de degradação foi obtida com 250 mg/L de TiO_2 , na presença de H_2O_2 e 1,7 L/min de ar. Para concentrações de 10^{-4} M de cada composto, as taxas de degradação obtidas foram da ordem de $0,04 \text{ min}^{-1}$ para os compostos estudados. Para fotodegradação, cada grama de fenol consumiu 1,7 KW. Segundo os autores, a degradação fotocatalítica, usando TiO_2 é atrativa devido ao TiO_2 ser barato e não tóxico, apresentar estabilidade química em variados pHs, recobrir meios suportes e ser ativado com a luz do sol.

Segundo MANILAL et al. (1992), o tratamento catalítico de PCP (pentaclorofenol), na concentração de 75 mg/L, por 9 horas na luz do sol, na presença de 1000mg/L de TiO_2 , levou à completa destoxificação da substância. Em testes com DCP (diclorofenol), nas mesmas condições, a destoxificação ocorreu em 6 horas. Em períodos de exposição inferiores aos citados, houve a formação de compostos tóxicos.

3.2.2. ADSORÇÃO

Muitos poluentes aromáticos, como hidrocarbonetos aromáticos policlorados, são altamente apolares, apresentando baixa solubilidade em água e tendência à adsorção em matéria orgânica de solos e sedimentos (MEANS et al. apud FIELD et al. (1995).

Quando atinge corpos d'água superficiais ou profundos, o PCP pode complexar-se com co-solventes, como ácidos fúlvico e húmico, diminuindo sua capacidade de adsorção e facilitando o mecanismo de transporte como partícula coloidal (GALIL & NOVAK, 1995). A adsorção do PCP é limitada pela diferença de solubilidade da forma protonada a baixo pH e pela forma desprotonada a elevado pH.

Segundo GALIL & NOVAK (1995), a forma neutra do PCP é fortemente hidrofóbica, com solubilidade de 11 a 14 mg/l e coeficiente de partição, octanol/ água, de 5:1. Dessa forma, espera-se que a substância seja fortemente adsorvida de soluções aquosas, tanto em sistema de águas superficiais, profundas, ou de tratamento de efluentes.

Em sistemas de tratamentos biológicos convencionais, em que o tempo de contato é insuficiente para biodegradação de compostos tóxicos, a bioadsorção resulta na remoção destes compostos da fase aquosa e seu acúmulo no lodo biológico. A disposição final do lodo pode ocasionar novos problemas ambientais, uma vez que os poluentes podem ser posteriormente desadsorvidos da biomassa (KENNEDY et al., 1992). Problemas semelhantes são encontrados na disposição de adsorventes, como carvão ativado, utilizados como pré-tratamento para remoção de resíduos tóxicos.

Enquanto o real mecanismo de descloração é desconhecido, a bioadsorção de AOX (adsorbable organic halogen) em biomassa anaeróbia é um passo essencial no processo de descloração (KENNEDY & PHAM, 1995).

TZEZOS & BELL apud KENNEDY & PHAM (1995) compararam a capacidade de adsorção em biomassa aeróbia viva e morta. Para cultura pura, a adsorção em PCP foi superior em biomassa morta, enquanto o contrário foi observado em lodos ativados. Segundo os autores, a adsorção superior em biomassa morta parece ser influenciada pela ausência de metabolismo de proteção contra transporte celular de poluentes, aumento na permeabilidade da membrana celular e alterações nas propriedades de adsorção da superfície dessas.

Segundo KENNEDY & PHAM (1995), reatores UASB, que têm sua aceitação ampliada para tratamento de diversas águas residuárias industriais, estão atualmente sendo aplicados ao tratamento de compostos aromáticos clorados. Foram estudadas as isotermas de adsorção de PCP em lodos granulados e dispersos de diferentes fontes de sistemas de tratamentos de efluentes industriais. Porém, não foram observadas diferenças significativas na capacidade de adsorção dos lodos granulados e dispersos, tratando o mesmo tipo de efluente, que se comportaram de forma diferenciada de acordo com a origem, possivelmente influenciados pela formação de lípidos na biomassa, que pode variar em função do substrato. Comparando a

capacidade de adsorção com as de outros autores, concluíram que a adsorção em lodo anaeróbio é menor quando comparada ao aeróbio.

Segundo KENNEDY et al. (1992), em estudos sobre biossorção de clorofenóis em lodo de reator UASB, os clorofenóis foram rapidamente adsorvidos no grânulo e a isoterma de Freundlich adequou-se muito bem aos resultados obtidos. Segundo os autores, a capacidade de biossorção do lodo anaeróbio vivo é muito menor (cerca de 16 vezes) que em microrganismos aeróbios, de lodos ativados, vivos ou mortos. Essa diferença deve-se possivelmente a diferenças na composição ou conteúdo de lipídios. Os autores constataram ainda que o aumento de temperatura pareceu reduzir a capacidade adsorvente da biomassa e a adsorção de 3,4DCP e 2,4,6TCP foi quase completamente reversível, enquanto para 3CP parece haver certo grau de irreversibilidade. Os autores constaram ainda que as relações entre adsorção e número de substituintes não foram claramente explicadas.

Segundo BALCH et al. apud KENNEDY & PHAM (1995), o lodo aeróbio, composto principalmente por eubactérias, possui lipídeos na membrana consistindo de ácidos graxos, que são esterificados a glicol. A membrana de lodo anaeróbio, principalmente das arqueobactérias (metanogênicas) consiste de escaleno e éter ligados a lipídeos polares, influenciando a capacidade de adsorção.

Muitos pesquisadores têm usado com sucesso, a equação de Freundlich para construir isotermas de adsorção para vários poluentes orgânicos perigosos, incluindo PCP (KENNEDY & PHAM, 1995).

STAPLETON et al. (1994) estudaram a adsorção de PCP em areia, à qual foi adicionado surfactante hexadeciltilamônia, que melhora a capacidade de adsorção, atuando seletivamente. A faixa de concentração de PCP durante o estudo esteve abaixo do limite de solubilidade. A faixa de pH estudada foi entre 4,0 e 8,5, que segundo os autores é o intervalo de ocorrência em águas superficiais e subterrâneas. Entre pH 4,0 e 8,5, a adsorção decresceu da ordem de 3 vezes e a solubilidade aumentou da mesma ordem. O modelo proposto pelos autores representa a adsorção das espécies desprotonadas, por isoterma de Langmuir, acima de pH 6,0 e, por isoterma linear, até esse valor. Em pH superior a 8,0, há aumento significativo da adsorção com a força iônica. Os autores concluíram que pela alteração na forma da isoterma, existem pelo

menos dois mecanismos distintos de adsorção. Eles não afirmaram ser possível aplicar o modelo a solos e sedimentos.

DUFF et al. (1995) declararam que a manta de lodo de reatores UASB atua como uma coluna cromatográfica catalítica, com compostos fenólicos sendo eluídos em função das condições de fluxo, concentrações, capacidade de ligação e reatividade. Em estudos de adsorção em grânulos de reator UASB, os autores obtiveram taxa de adsorção entre 0,75 a 0,95 (0,20 a 0,25 mg) μ mol PCP/ g SSV.h, superior à taxa de desalogenação obtida anteriormente à saturação da manta. Para os autores, a biossorção parece ter sido um mecanismo importante no período que precedeu a atividade de descloração e que a taxa de degradação diferiu da esperada por ser limitada pela cinética de adsorção.

Segundo WU et al. (1993), a remoção abiótica de PCP em grânulos de reatores UASB foi 0,83 mg/g SSV, praticamente desprezível se comparada à biológica de 9,2 mg/gSSV, quando a concentração de PCP no substrato foi de 0,5 mg/L.

3.2.3. BIODEGRADAÇÃO

Compostos aromáticos são susceptíveis à biodegradação, sob condições aeróbias e anaeróbias. Nos processos aeróbios, oxigênio molecular está envolvido em dois passos: primeiramente é incorporado ao anel aromático por dioxigenases, anteriormente à quebra do anel; posteriormente, o oxigênio serve como acceptor terminal de elétrons de equivalente reduzido. Em ambientes anaeróbios, alguns compostos aromáticos, sem grupo funcional, dificilmente são degradados, entretanto, compostos aromáticos altamente clorados são melhor degradados sob essa condição. De acordo com SHELTON & TIEDJE (1984), muitos estudos de degradação anaeróbia de compostos orgânicos aromáticos clorados mostram que a remoção do ión cloreto ocorre anteriormente à quebra do anel aromático, requerendo menos energia que o processo aeróbio. Diferentes substâncias como: NO_3^- , SO_4^{2-} , enxofre, metais oxidados (Fe^{+3} , Mn^{+4}), prótons e bicarbonato podem atuar como aceptores finais de elétrons (FIELD et al, 1995). Sulfato e nitrato frequentemente encontram-se presentes no solo, bem como em ambientes contaminados por poluentes orgânicos, podendo alterar o fluxo de

carbono e as interações entre membros da comunidade microbiológica. Sulfato pode ser utilizado como aceptor de elétrons, inibindo muitas vezes a atividade de desalogenação (ALLARD et al., 1992; DE WEERD et al., 1991; KORING et al., 1989; MADSEN & AAMAND, 1991), possivelmente devido à competição por hidrogênio, durante a redução de sulfato.

Segundo ZHANG & WIEGEL (1990), além dos diferentes aceptores de elétrons utilizados por organismos aeróbios e anaeróbios, há diferenças significativas entre a degradação de compostos fenólicos por esses dois processos. De acordo com os autores, uma única espécie aeróbia pode mineralizar totalmente compostos fenólicos clorados. Em contraste, a degradação de compostos cloroaromáticos por processo anaeróbio, aparentemente requer mais de uma espécie de organismos. De acordo com LIU & SUFLITA (1993), em geral, compostos haloaromáticos são recalcitrantes sob condições aeróbias e passíveis de degradação em condições anaeróbias. O caráter recalcitrante de compostos haloaromáticos está relacionado ao número, posição e tipo do halo-substituinte.

Muitos compostos, total ou parcialmente desalogenados, são menos tóxicos que seus precursores, sendo mais susceptíveis aos passos sucessivos da degradação biológica. Estes compostos tornam-se, após a desalogenação, melhores doadores que aceptores de elétrons, podendo sofrer degradação por processo aeróbio (LIU & SUFLITA, 1993; FIELD et al., 1995; BASU et al., 1996 e MOHN & TIEDJE, 1992). A degradação de fenóis clorados inicia-se pela descloração reductiva, passando à quebra do anel aromático e finalmente a metano e dióxido de carbono (BOYD & SHELTON, 1984; GIBSON & SUFLITA, 1986; MIKESSELL & BOYD, 1986; GENTHNER et al., 1989; DIETRICH & WINTER, 1990). A completa mineralização de monoclороfenóis a CH_4 e CO_2 foi observada em 50-100% dos lodos de esgoto (BOYD & SHELTON, 1984), e em sedimentos por GENTHNER et al. (1989) & HAGGABLOM et al. (1993), indicando a capacidade de populações indígenas dos inóculos, para as reações.

Muitos estudos com compostos xenobióticos, efetuados no campo e em laboratório, têm demonstrado a lenta biodegradabilidade desses compostos. A lentidão da biodegradação pode ser causada por condições físico-químicas desfavoráveis, ser

afetada pela disponibilidade de nutrientes ou de substratos, devido à baixa solubilidade, adsorção, ou outros. Por outro lado, a lenta biodegradabilidade pode dever-se à incapacidade dos microrganismos presentes no meio em metabolizar poluentes com estruturas químicas ou propriedades incomuns (ROELOF et al., 1992).

Descloração redutiva

A descloração redutiva é o passo inicial para degradação de compostos orgânicos halogenados, em ambientes anaeróbios. Nesse passo, o composto orgânico halogenado desempenha papel de acceptor de elétrons e um halogênio é permutado por um átomo de hidrogênio, com transferência de dois elétrons (MOHN & TIEDJE, 1984; BOWWER & ZEHNDER, 1993). A desalogenação redutiva pode ocorrer também em processo aeróbio, sendo contudo mais comum em processos anaeróbios (FETZNER & LINGENS, 1994).

Na Figura 3.1 apresenta-se a reação esquemática de desalogenação anaeróbia de PCP, proposta por MADSEN & AAMAND (1991).

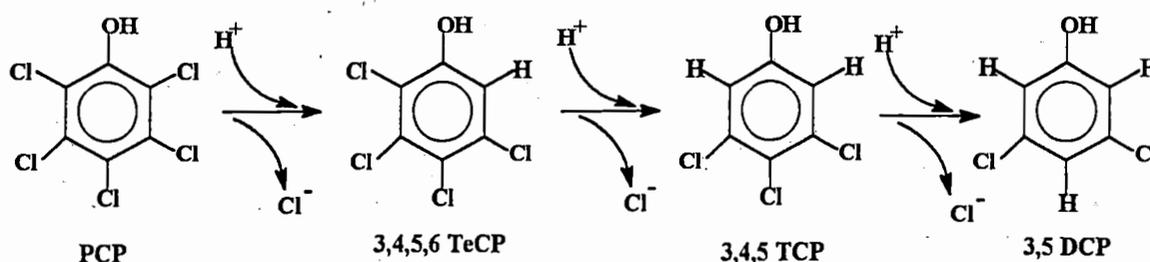


Figura 3.1: Modelo de desalogenação anaeróbia de PCP proposto por MADSEN & AAMAND (1991)

A desalogenação redutiva requer a presença de um redutor, que pode ser um produto da atividade biológica. Segundo MOHN & KENNEDY (1992), os efeitos do co-substrato atuam via pressão seletiva nos componentes da comunidade, em maior grau que a influência direta na atividade de degradação. MOHN & KENNEDY (1984) e

BASU et al. (1996) observaram que, na ausência de doadores de elétrons, ocorre queda na atividade desalogenante até sua interrupção.

O ecossistema global pode ser visto com uma série de reações de oxido-redução integradas. Microrganismos catalisam muitas dessas reações, desempenhando papel essencial no balanço de elétrons de sistemas complexos. Um composto perigoso, para ser incorporado nas reações de oxidorredução, deve estar disponível como doador ou aceptor de elétrons, sendo essa tendência (doar ou receber) dependente da composição química dos compostos envolvidos (LIU & SUFLITA, 1993; COOKSON, 1995). O potencial redox do meio parece influenciar preponderantemente a atividade desalogenante, uma vez que condições metanogênicas são citadas em muitos trabalhos sobre atividade desalogenante.

De acordo com NIELS & VOGEL (1990), há relação entre potencial de redução, número de cloro-substituintes, padrão de substituição de cloro e taxas de descloração. Em geral, a desalogenação redutiva é favorecida sob condições altamente reduzidas.

A cinética dos processos de biodegradação pode ser muito mais lenta que a desejada, quando são consideradas a saúde pública e a conservação ambiental (ROELOF et al., 1992).

Segundo REINEKE & KNACKMUSS (1988), a reação de descloração parece ser enzimática, uma vez que ocorre após indução e devido à sua baixa afinidade pelo substrato (K_s 64 μ M), baixa atividade em temperatura superior a 39°C e ao alto grau de especificidade com a posição do cloro substituinte na molécula.

Segundo FETZNER & LINGENS(1994), a ligação carbono halogênio é quebrada por desalogenação enzimática, em que a quebra é catalisada por enzimas específicas (desalogenases), ou por enzimas que catalisam conversão de compostos análogos ou relacionados (desalogenação fortuita) ou ainda por desalogenação espontânea de intermediários instáveis.

Embora detalhes dos passos e enzimas envolvidos na degradação de haloaromáticos na ausência de oxigênio serem ainda desconhecidos, esse procedimento ocorre em pelo menos cinco situações diferentes (REINEKE & KNACKMUSS, 1988):
-Através de foto-metabolismo;-Sob condições de redução de nitrato em culturas mistas

ou puras de *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp e *Moraxella* sp;-Com sulfato como aceptor de elétrons;-Em consórcios, através da fermentação acoplada à metanogênese;-Através de fermentação.

HOLLIGER & SCUMACHER(1994) concluíram em sua revisão, que algumas bactérias anaeróbias catalisam reações de desalogenação redutiva em processos de co-metabolismo, enquanto outras desalogenam em processos respiratórios. Em processos de co-metabolismo, as desalogações não estão acopladas à conservação de energia, ocorrendo de forma não específica em reações de "bypass" por certos sistemas de enzimas.

Os efeitos de nutrientes na descloração redutiva não têm sido muito estudados. Além disso, muitos nutrientes necessários ao crescimento microbiano são fornecidos pelo inóculo, pela adição de substratos indefinidos como extrato de levedura ou fluido de rúmem, ou mesmo por microrganismos participantes da associação sintrófica (MOHN & TIEDJE, 1992).

A temperatura afeta a desalogenação redutiva pelo seu efeito direto nas taxas de reação e por exercer pressão seletiva nas populações. Os limites de temperatura, apresentados nos estudos de desalogenação redutiva pesquisados, evidenciam a catalisação da atividade desalogenante por microrganismos.

Da mesma forma que a temperatura, o pH dos meios de cultura, necessários para viabilização da desalogenação, foi mantido próximo a 7 nos estudos citados, reforçando a hipótese da mediação biológica da atividade desalogenante.

A hidrofobicidade de muitos compostos aromáticos afeta sua desalogenação biológica em função da não disponibilidade do composto aos microrganismos participantes do processo de desalogenação.

Devido à pequena disponibilidade de microrganismos com respiração desclorante, ou seja, que utilizam compostos halogenados para crescimento em cultura pura, conclui-se que esses microrganismos apresentam limitado espectro de doadores de elétrons, que suportam crescimento (HOLLIGER & SCUMACHER, 1994). Segundo os autores, hidrogênio molecular, formiato e acetato são provavelmente os doadores de elétrons mais promissores para enriquecimento com estes organismos.

Alguns autores têm demonstrado a degradação de compostos aromáticos halogenados sob condições metanogênicas, comprovando que os mesmos não são considerados recalcitrantes sob condições anaeróbias. Segundo HAGGABLOOM et al. (1993), dispõe-se de poucas informações sobre conversão de compostos aromáticos halogenados em condições não metanogênicas. A ocorrência de metanogênese pode ser necessária à atividade desalogenante, possivelmente devido às associações sintróficas, que mantêm muitas comunidades anaeróbias, sustentando certas condições físico-químicas (MOHN & TIEDJE, 1992).

A tendência da descloração de compostos fenólicos muito clorados pela bactéria *D. tiedjei*, baseia-se em considerações termodinâmicas e de solubilidade. Compostos fenólicos mais clorados apresentam energia livre mais negativa (DOLFING & HARRISON, 1992). Segundo DOLFING et al (no prelo), apud MOHN & KENNEDY (1992), a desalogenação redutiva necessita de pelo menos -140 KJ/reação. Quanto à solubilidade, compostos fenólicos mais clorados são mais lipofílicos ou seja, podem ser absorvidos mais prontamente pelas células. Quanto à posição de descloração, os autores não propõem explicação (MOHN & KENNEDY, 1992).

Segundo MOHN & TIEDJE (1992), a sequência de desalogenação pode ter muitas explicações, como as citadas a seguir: -a desalogenação de congêneres mais halogenados pode ser termodinamicamente mais favorável; -os congêneres mais halogenados podem inibir a desalogenação dos menos halogenados; -organismos diferentes podem catalisar diferentes passos da desalogenação.

Fenômenos como adsorção, volatilização, lixiviação, hidrólises químicas e fotólise podem afetar as concentrações do composto na fase aquosa, e portanto suas taxas de degradação.

Segundo DOLFING & HARRISON(1992), evidências teóricas suportam a tese de obtenção de energia pelos organismos nas reações de descloração, através do cálculo de variação de Energia Livre de Gibbs. Testes experimentais com consórcio de microrganismos na presença de 3-Clorobenzoato (3-CB), mostraram maior produção celular que na presença de benzoato e aumento do nível de ATP, durante metabolização de 3-CB.

A quantidade de energia livre que pode ser conservada pelos microrganismos, como ATP ou gradiente iônico, é dependente da Energia Livre de Gibbs da degradação. A mudança de energia livre de Gibbs, resultante do catabolismo de dado composto aromático é fortemente dependente do acceptor terminal de elétrons (FIELD et al, 1995).

DOLFING & HARRISON(1992) calcularam Energia Livre de Gibbs pelo método de Benson, utilizando temperatura de 25°C e pressão de hidrogênio de 1 atmosfera. Na tabela 1 são apresentadas as variações de energia livre para as reações que compõem modelo de degradação proposto por MADSEN & LICHT(1992).

Tabela 1: Variações da Energia Livre de Gibbs

SUBSTRATO	PRODUTO	ΔG^0 (KJ/reação)	E^0 (mV)
PCP	2,3,4,5-TeCP	-156	-399
2,3,4,5-TeCP	3,4,5-TCP	-141	-316
3,4,5-TCP	3,5-DCP	-156	-395
3,5-DCP	3-CP	-135	-290

Fonte: DOLFING & HARRISON(1992)

As estimativas indicam potenciais redox entre -290 e -399 mV, demonstrando que microrganismos podem obter energia a partir de compostos haloaromáticos como aceptores de elétrons, sob condições anaeróbias.

Em ecossistemas anaeróbios, a concentração de hidrogênio fica geralmente entre 10 e 100ppm, levando os valores de ΔG^0 para -23 a -29 KJ.mol, segundo THAUER et al. apud DOLFING & HARRISON(1992).

As variações de energia livre para redução de sulfato e metanogênese, respectivamente, nas mesmas condições de cálculo são -152 (SO_4^{2-} , como substrato e HS^- , como produto) e -136 (CO_2 , como substrato e CH_4 , como produto).

$\Delta G < 0$ implica que microrganismos podem ser potencialmente beneficiados pela utilização de compostos aromáticos halogenados como aceptores de elétrons sob condições anaeróbias. Contudo, essa medida não deve ser tida como causa e efeito. Estritamente, o parâmetro $\Delta G^0 < 0$ está diretamente relacionado à constante de equilíbrio, não fornecendo informações sobre a taxa ou facilidades das reações em sistemas biológicos (DOLFING & HARRISON, 1992).

Através do índice QSARs (Quantitative Structure Activity Relationship), PEIJNENBURG et al. apud UTKIN et al (1995), previram o potencial de aril-desalogenação redutiva em sedimentos anóxicos. Embora esse índice seja útil na previsão de taxas de desalogenação potenciais, não utiliza informações essenciais sobre mecanismos de reação de desalogenação redutiva devido aos fatores como difusividade do substrato, e existência de exo-enzimas, que podem interferir nas taxas de desalogenação.

3.3.MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA DESCLORAÇÃO REDUTIVA

Em quatro bilhões de anos, microrganismos têm desenvolvido grande gama de enzimas, rotas e mecanismos de controle, visando capacitarem-se aos diversos compostos aromáticos de origem natural. Contudo, a relação de microrganismos capazes de processar compostos haloaromáticos é pequena (REINEKE & KNACKMUSS, 1988).

Espécies de microrganismos com capacidade de assimilação de haloaromáticos têm sido obtidas através de enriquecimentos naturais, manipulação genética "in vivo", e engenharia genética "in vitro".

A teoria do enriquecimento de culturas é simples: o composto haloaromático é fornecido em concentrações crescentes no meio de cultura. Dos muitos organismos presentes no inóculo, crescerão significativamente aqueles com habilidade de degradação do composto.

Certos compostos xenobióticos, particularmente os com anéis aromáticos policlorados, não são reconhecidos como substratos para crescimento, sendo contudo objetos de co-metabolismo. Muitos compostos potencialmente perigosos são recalcitrantes, altamente tóxicos ou insolúveis, escapando da degradação ou perturbando sistemas convencionais de tratamento de efluentes (REINEKE & KNACKMUSS, 1988).

Para estabelecer o potencial de biodegradação de compostos aromáticos clorados, como propriedade estável da microbiota indígena do sistema de tratamento, alguns requisitos devem ser alcançados: -o sistema deve quebrar o composto químico até que o aumento da biomassa no sistema possa responder transientemente ao aumento de carga; -características catabólicas devem ser transmissíveis para assegurar que, através do recrutamento das enzimas catabólicas existentes e de reguladores de genes com especificidade ao substrato, possa ser gerado nova rota para haloaromáticos. Portanto, além da flexibilidade fisiológica, a adaptabilidade do sistema a grupos de substratos poderão ser garantidas (REINEKE & KNACKMUSS, 1988).

Normalmente a membrana celular, devido à sua constituição química, atua como barreira a compostos hidrofóbicos, forçando os microrganismos a desenvolver algum mecanismo de assimilação destas substâncias (BARBIERE, 1994).

Segundo MIURA et al. (1977), microrganismos distintos apresentam diferentes níveis de afinidade por hidrocarbonetos líquidos. Aqueles que permitem maior aderência do composto podem utilizá-lo com maior prontidão. Os autores citam que o processo de transporte de compostos para o interior da célula e entre membranas intracelulares são inúmeros, contudo não estão bem compreendidos. Um mecanismo comum de transporte é a desorção espontânea e transferência através da fase aquosa.

Bactérias frequentemente aumentam suas chances de reprodução e sobrevivência pela produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). O papel funcional dessa substância é o seu envolvimento na fixação, na formação de microcolônia, do floco, na proteção contra metais pesados, predações, flutuações ambientais e aumento da resistência contra biocidas (COSTERTON et al. apud WOEFARDT et al, 1995). Um aspecto funcional, ainda não esclarecido, é o envolvimento do EPS no acúmulo e subsequente utilização de nutrientes (PHAM &

ALEXANDER(1993) apud WOEFARDT et al., 1995). Segundo os autores, é possível que compostos xenobióticos sejam acumulados em EPS, pelo mesmo mecanismo de acúmulo de compostos naturais.

O substrato de crescimento das bactérias descolorantes em culturas enriquecidas ainda não foi esclarecido. Provavelmente, um ou mais organismos são bactérias descolorantes, que utilizam produtos das demais bactérias envolvidas (REINEKE & KNACKMUSS, 1988).

A capacidade de adaptação de comunidades microbianas a compostos xenobióticos é evidenciada pela resistência de microrganismos a antibióticos. ACLISON et al. apud LIU & SUFLITA(1993) sugeriram que podem ocorrer adaptações similares a outros contaminantes. Segundo ROELOF et al. (1992), frequentemente comunidades expostas a esses compostos podem adaptar-se a eles. Contudo, pouco se sabe a respeito de interações moleculares que levam à adaptação das comunidades microbianas.

Segundo citações de ROELOF et al. (1992), diferentes processos a nível molecular e bioquímico podem causar respostas na adaptação. O primeiro é a indução de enzimas específicas em membros da comunidade, resultando em um aumento da capacidade degradativa observada na comunidade total; outro processo é o crescimento de subpopulações específicas de uma comunidade microbiana, capaz de absorver e metabolizar o substrato; como última hipótese, a adaptação também pode envolver a seleção de mutantes que alteram sua capacidade enzimática, ou novas atividades metabólicas que não estavam presentes anteriormente à exposição da comunidade aos compostos introduzidos. Como processo seletivo, pode requerer períodos de adaptação, indução e crescimento mais longos que os anteriores.

Microrganismos capazes de transformar compostos aromáticos são de interesse tanto para auxiliar na compreensão da persistência desses compostos, quanto no seu uso potencial para remoção desses compostos de áreas contaminadas e de efluentes industriais (STEVENS et al., 1988).

O consórcio de microrganismos responsáveis pela desalogenação tem sido buscado em lodo de esgoto, sedimentos marinhos e de água doce, solo e aquíferos profundos (SUFLITA et al., 1982; BOYD & SHELTON, 1984; GIBSON & SUFLITA, 1986; GENTHNER et al., 1989; KORING et al., 1989; DIETRICH & WINTER, 1990;

LARSEN et al, 1991; HENDRIKSEN et al., 1992), lodos de estação de tratamento de efluentes industriais (KENNEDY & PHAM, 1995), entre outros.

Estudos em comunidades indefinidas podem identificar fatores ecológicos que afetam a desalogenação redutiva, mas apresentam limitações na determinação dos mecanismos desses efeitos. Já os estudos em culturas puras podem fornecer respostas como os organismos que desempenham a atividade desalogenante, as enzimas e cofatores envolvidos na atividade, os mecanismos químicos envolvidos, a interferência de fatores ambientais, bem como os benefícios ou prejuízos da população participante (MOHN & TIEDJE, 1992).

Muitos estudos têm demonstrado a biodegradação de clorofenóis em ambientes aeróbios e anaeróbios. Em ambientes anaeróbios, os estudos foram efetuados sob condições metanogênicas, de redução de sulfato e de desnitrificação. Além disso, grande variedade de inóculos tem sido empregada. É consenso entre os pesquisadores, que embora biodegradáveis, os clorofenóis podem provocar inibição nos microrganismos participantes do processo de degradação, que requerem usualmente, longos intervalos de tempo para adaptação.

Muitas culturas puras têm demonstrado capacidade de catalisar alquil desalogenação redutiva. Contudo, a desalogenação redutiva pode ser catalisada por organismos restritos, como *D. tiedjei* (MOHN & TIEDJE, 1992). Segundo HOLLIGER & SCUMACHER(1994), enquanto para compostos halogenados aromáticos ainda não são conhecidos muitos microrganismos participantes do processo de degradação, já foram identificadas várias culturas puras de bactérias anaeróbias, responsáveis pela degradação de alifáticos clorados. Segundo a revisão dos autores, as bactérias envolvidas na descloração de compostos alifáticos não são bactérias acetogênicas, nem metanogênicas.

Atualmente, estão descritas culturas de bactérias isoladas pela capacidade de desalogenar compostos aromáticos, entre elas a *Desulfomonile tiedjei* (SHELTON & TIEDJE, 1984); espécie DCB-1 (STEVENS et al., 1988); bactérias do gênero *Clostridium* (MADSEN & AAMAND, 1991) e *Desulfitobacterium dehalogens* JW/IU-DC1 (UTKIN et al., 1995), além de uma bactéria gram negativa, na forma de bastão, relatada como mixobactéria por COLE et al. apud BASU et al. (1996).



De acordo com STEVENS et al. (1988) e MOHN & KENNEDY (1992), a espécie DCB-1 é uma bactéria anaeróbia estrita, isolada a partir de lodo anaeróbio enriquecido, utilizado na degradação de 3-clorobenzoato. Esta foi a primeira espécie anaeróbia, em cultura pura, capaz de promover a desalogenação redutiva de compostos aromáticos. Segundo MOHN & KENNEDY (1992), essa bactéria é capaz de obter energia para crescimento a partir de descloração de 3-CB, através de mecanismo respiratório quimiosmótico. A aril desalogenação redutiva, por esse microrganismo, ocorre preferencialmente, mas não exclusivamente na posição meta. *D. tiedjei* também apresenta atividade alquil desalogenante, não estando claro se nesse microrganismo, as diferentes reações de desalogenação têm a participação das mesmas reações catalíticas (MOHN & TIEDJE, 1992).

A habilidade da espécie *D. tiedjei* em utilizar o mecanismo de desalogenação para obtenção de energia para seu metabolismo, indica uma vantagem seletiva dessa atividade, ou necessidade de destoxificação. A indução específica pela bactéria, sugere que pelo menos a regulação desta atividade tenha sido escolhida (MOHN & TIEDJE, 1992).

A aparente distinção entre passos enzimáticos da desalogenação e metabolismo de ânions sulfônicos pela *D. tiedjei*, indica que a primeira atividade não é apenas uma consequência fortuíta da última. A desalogenação suporta translocação de prótons pelas células com formação de força próton motiva. Efeitos negativos de inibidores na eficiência da descloração, dependente da síntese de ATP, sugerem força próton motriz acoplada à descloração e síntese de ATP (MOHN & TIEDJE, 1992). Segundo os autores, a ação de porfinóides contendo níquel pode explicar a habilidade de certas bactérias em catalisar alquil desalogenação redutiva. A atividade de F430 está de acordo com a habilidade de muitas bactérias metanogênicas em catalisar alquil desalogenações redutivas; a atividade de corrinóides é consistente com a habilidade de organismos que utilizam a rota acetil CoA para caracterizar essa atividade.

De acordo com citação de DeWEERD & SUFLITA (1990), as reações de desalogenação, catalisadas por consórcio definido de *D. tiedjei*, obedecem à equação de Michaelis-Menten e exibem estreita especificidade por benzoatos clorados sobre outros substratos haloaromáticos.

Atualmente, têm sido desenvolvidos estudos na área de engenharia genética, visando combinar características de alguns microrganismos, tornando o novo microrganismo apto à metabolização de compostos de difícil degradação. Contudo, os riscos desta técnica são ainda desconhecidos (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991).

Dados termodinâmicos revelaram que a descloração redutiva de 3 clorobenzoato (3CB) é exergônica ^{levando} à hipótese que essa reação produz energia para uso biológico. Para comprovar a hipótese, DOLFING (1990) cultivou a cultura pura de DCB-1 com cloroaromáticos sob condições definidas (meio basal, acetato e formiato). Observou-se a descloração estequiométrica de 3 CB a benzoato, com crescimento celular obedecendo à mesma relação. O crescimento celular não foi afetado quando formiato foi omitido ou permutado por hidrogênio. Quando 3CB foi substituído por benzoato, não foi observado crescimento. A adição de 3CB a células desnutridas levou ao rápido aumento de ATP de 3 para 9 nmol/mg proteína. Esses resultados confirmaram a hipótese que a espécie DCB-1 é capaz de obter energia para crescimento a partir da descloração redutiva de 3CB.

Segundo MOHN & TIEDJE (1990), a recuperação estequiométrica de benzoato, a partir de 3,5DCB e 3 CB, indicou que a descloração redutiva e não a utilização de benzoato foi responsável pela maior produção celular observada na presença de cloro benzoatos. O crescimento celular por mol de Cl⁻ removidos foi semelhante para os clorofenóis testados, sendo o crescimento para culturas em 3,5DCB aproximadamente o dobro do com 3CB. Formiato e ferro puderam ser utilizados como doadores de elétron, o último indicando que o doador de elétrons não precisa ser também o doador de prótons. Os resultados indicaram que cultura pura de DCB-1 pode acoplar oxidação de formiato e provavelmente de hidrogênio à descloração de 3CB e 3,5DCB, podendo conservar energia para crescimento a partir das reações de oxido-redução. Uma vez que nenhum dos substratos parece suportar fosforilação a nível de substrato, parece que a conservação de energia se dá via fosforilação pelo transporte de elétrons.

3.4. ADAPTAÇÃO DE MICRORGANISMOS AO SUBSTRATO

O termo adaptação é utilizado, em muitos relatos sobre biodegradação, especificamente de compostos orgânicos halogenados, para descrever o período inicial de uma incubação, durante o qual não se detecta desalogenação reductiva. Muitas vezes esse período é denominado fase "lag".

Segundo MOHN & TIEDJE (1992), períodos de adaptação para degradação de compostos orgânicos halogenados parecem estar mais relacionados a desalogenação de compostos aromáticos que a de compostos alifáticos, sugerindo que os microrganismos responsáveis pela alquil desalogenação são mais raros na natureza. Segundo citações dos autores, as possíveis explicações para o período de adaptação são: mudança genética, indução, exaustão do substrato preferido ou crescimento da atividade populacional com densidade inicial baixa. Aos autores, parece ser a indução a explicação mais plausível, uma vez que a alteração genética parece não ocorrer, já que observa-se crescimento nessa fase. Através de parâmetros cinéticos, os autores não observaram atividade microbiológica de degradação no período, além do sedimento armazenado ter apresentado o mesmo período de adaptação do fresco, contrariando a hipótese de exaustão do substrato preferido. Uma possível explicação, combinada às demais, é que a sucessão ecológica é necessária para o estabelecimento de população ou populações capazes da atividade desalogenante. Nesse caso, comunidades clímax possivelmente catalisam a reação, uma vez que a atividade persiste após a adaptação.

O período de adaptação pode ser afetado por diferentes substratos, diferentes inóculos, bem como pelas condições ambientais fornecidas. Além disso, desconhece-se se a desalogenação interfere no crescimento dos microrganismos envolvidos. A especificidade ao substrato, na aril desalogenação, pode ser devida ao tipo de composto aromático ou à posição do halogênio no anel. Essas especificidades têm proporcionado hipóteses que as atividades envolvidas são catalisadas por diferentes organismos, com diferentes enzimas desalogenantes. Apenas reduzido número de reações alquil reductivas apresentam especificidade ao substrato (MOHN & TIEDJE, 1992).

O enriquecimento de culturas com atividade desalogenante é possível, indicando seleção para essa atividade. Necessariamente, a adaptação e enriquecimentos não suportam o crescimento dos microrganismos. Este é o caso de desalogenações parciais, em que a adaptação e o enriquecimento claramente indicam pressão seletiva para desalogenação redutiva. A pressão seletiva pode ser positiva, no caso de utilização como substrato, ou negativa, quando necessária para destoxificação (MOHN & TIEDJE, 1992).

DOLFING & TIEDJE apud REINEKE & KNACKMUSS (1988), observaram que o poder -redutor necessário para descloração redutiva de 3-clorobenzoato por um consórcio contendo DCB-1, que é um organismo desclorante, BZ-1, que degrada benzoatos e *Methanospirillum* PM-1, bactéria metanogênica autótrofa, foi obtido pelo hidrogênio produzido na oxidação acetogênica de benzoato. Um terço do hidrogênio foi consumido via descloração redutiva, enquanto dois terços foram utilizados na metanogênese.

FIELD et al. (1995) sugeriram que consórcios de microrganismos aeróbios e anaeróbios devam estar presentes no mesmo reator, uma vez que compostos fenólicos altamente clorados são mais susceptíveis à degradação anaeróbia, levando à formação de compostos menos clorados, prontamente degradados por microrganismos aeróbios. Segundo os autores, o controle dos níveis de oxigênio dissolvido nos diversos nichos do reator poderia ser feito pelos próprios microrganismos. Além da capacidade de proteção de microrganismos anaeróbios contra oxigênio no meio, os mesmos teriam que competir com os aeróbios pelo substrato.

3.5. IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Segundo O'KELLY & CRAWFORD (1989), a estabilidade catalítica pode ser superior em células imobilizadas que em células livres, sendo que muitos organismos suportam cargas mais elevadas de compostos tóxicos quando imobilizados.

A retenção de microrganismos nos reatores biológicos, utilizados no tratamento anaeróbio de efluentes, privilegiou a desvinculação do tempo de detenção hidráulico do tempo de detenção celular, tornando a alternativa de tratamento

anaeróbio mais atraente, quando comparada ao tratamento aeróbio. Essa retenção foi conseguida de várias formas: através da imobilização dos microrganismos em grânulos de reatores UASB, ou em biofilmes de filtros biológicos, pela adesão dos microrganismos ao meio suporte de reatores de leitos fluidificados, ou pela sua imobilização em meio orgânico ou inorgânico, na forma de matrizes.

As principais vantagens da imobilização de microrganismos são: - facilidade de separação da biomassa do efluente tratado; - alteração do fluxo de substrato aos microrganismos; - melhora nas interrelações entre os microrganismos participantes da associação simbiótica do processo de degradação (DEL NERY, 1993).

De acordo com DEL NERY (1993), a aplicação da técnica de imobilização das células de microrganismos na digestão anaeróbia é bastante promissora para o estudo de algumas rotas de degradação.

Na imobilização, a difusão do substrato e produtos é uma das propriedades físicas mais importantes do imobilizado, uma vez que dela depende o sucesso da conversão do substrato (KAUL apud DEL NERY, 1993). Quando a difusão do substrato for muito lenta, a taxa de utilização do substrato será limitada pelo transporte de massa. Caso seja mais rápida que a taxa máxima de conversão, o desempenho será limitado pela cinética de conversão do substrato pelos microrganismos.

Segundo DEL NERY (1987), com cargas orgânicas de até 3 Kg/m³ dia, o reator UASB inoculado com lodo livre, apresentou melhor desempenho com relação à eficiência de remoção de DQO. Contudo, a cargas mais elevadas, o comportamento do reator com lodo imobilizado foi melhor. A autora sugere que a baixas cargas, a produção de gás é insuficiente para promover boa agitação do meio, dificultando o contato alimento/ microrganismo.

DEL NERY (1993) sugeriu a concentração de sólidos em matriz metanogênica de gel agar de 35 mg/L, uma vez que em concentrações maiores observou-se baixa resistência das matrizes, além da atividade não ser melhorada. Para lodos acidogênico e metanogênico, imobilizados separadamente e dispostos no mesmo reator, a autora sugeriu a proporção de 10 a 30% de lodo acidogênico e 70 a 90% de lodo metanogênico.

SIAHPUSH et al. (1991) propuseram a co-imobilização de microrganismos com material adsorvente para o tratamento de compostos orgânicos tóxicos. Segundo o autor, as principais vantagens dessa técnica sobre a imobilização são: -remoção rápida de contaminante pelo material adsorvente, permitindo altas taxas hidráulicas; -amortecimento nas variações de carga do contaminante; -retenção de enzimas extracelulares. O autor cita que a concentração de contaminante disponível pode ser controlada pelo uso de agentes apropriados, assegurando mínima toxicidade e máxima taxa de degradação. Segundo os autores, com células co-imobilizadas de 0,5 a 5mm e espessura de 200 mm +/- 50%, não foram observadas alterações significativas na mineralização e variações no coeficiente de transferência de massa de 5×10^{-3} para 5×10^{-6} cm/s resultaram em 17% de variação na mineralização de PCP.

CRAIK et al. (1992) estudaram a degradação de fenol por biomassa granulada imobilizada em carvão ativado. Os autores concluíram que a atividade específica de degradação com carvão ativado não foi superior à atividade da biomassa em suspensão ou ao lodo granulado, próximos ao estado estacionário.

Grânulos anaeróbios são formados por consórcios de microrganismos que se auto imobilizam, formando uma matriz estrutural com diâmetro variando entre 0,1 e 5mm. Essa estrutura granular auxilia na proteção de bactérias anaeróbias contra condições ambientais desfavoráveis, como mudança de pH, exposição a oxigênio, entre outras. Além disso, a estrutura fornece condições favoráveis para o metabolismo sintrófico de substâncias necessárias ao crescimento de diferentes espécies microbianas. Grânulos anaeróbios apresentam densidade celular muito superior às das culturas com células em suspensão, apresentando portanto, alta atividade metabólica por unidade de volume (WU et al., 1992).

Segundo WU et al., (1992) grânulos formados com águas residuárias isentas de produtos clorados, normalmente, não apresentam atividade desclorante significativa.

Sabe-se que uma das grandes barreiras na adaptação de microrganismos a determinados substratos é sua introdução quando as concentrações atingem níveis tóxicos, bem como os possíveis efeitos negativos dos metabólitos. Essas situações ocorrem com frequência em reatores com alimentação em batelada.

Segundo KRUME & BOYD (1988), biorreatores de fluxo ascendente têm sido utilizados com sistemas de tratamento contínuo, visando explorar as atividades enzimáticas envolvidas na descloração e degradação de clorofenóis.

Nos reatores com alimentação semi-continua, pode-se lançar mão da introdução de substratos em concentrações abaixo do nível tóxico aos microrganismos, além da possibilidade de drenagem periódica dos mesmos, retirando metabólitos do meio. Este tipo de operação requer muitos cuidados operacionais, devido aos problemas de contaminação das amostras e introdução de oxigênio.

Em reatores com alimentação contínua, há possibilidade de operação com cargas crescentes, em função das respostas dos microrganismos participantes do processo de degradação.

Em função dos longos períodos de tempo requeridos para adaptação, o reator com células imobilizadas parece ser mais adequado, uma vez que protege a lavagem dos microrganismos e promove a melhor distribuição do composto tóxico. As dificuldades na obtenção de grânulos com capacidade de degradação de clorofenóis, ou mesmo na manutenção de grânulos biológicos, durante adaptação aos compostos haloaromáticos, além dos problemas de separação das fases gasosa e sólida em reatores UASB de bancada, levaram à exclusão desta alternativa para elaboração deste trabalho.

O'KEILLY & CRAWFORD (1989) utilizaram para imobilização de microrganismos aeróbios, espuma de poliuretano, que é uma classe de polímeros sintetizados a partir de compostos contendo grupo isocianato e compostos contendo grupo hidroxila. Segundo os autores, dados sobre o uso de microrganismos imobilizados em poliuretano para degradação de compostos aromáticos foram apresentados na US Patent em janeiro de 1987.

Segundo ZAIAT et al. (1994), para o desenvolvimento de reatores com células imobilizadas são necessários a escolha do suporte e métodos de imobilização adequados.

Os principais parâmetros a serem considerados na escolha do suporte são: permeabilidade, geometria, compressibilidade, resistência mecânica, sensibilidade ao cisalhamento, toxicidade, composição iônica e característica hidrofóbica/hidrofílica (BAILEY & OLLIS apud ZAIAT et al., 1994).

Além desses parâmetros, para o tratamento de resíduos contendo haloaromáticos é muito importante a avaliação da afinidade e reatividade do composto com o meio suporte. A afinidade do composto com o meio suporte pode auxiliar na regulação da concentração do composto no meio. Contudo, durante o período anterior à saturação do meio suporte, podem ocorrer equívocos quanto à avaliação da capacidade de remoção do sistema.

Segundo ZAIAT et al. (1994), quando se seleciona um método de imobilização, é necessário avaliar um ou mais dos seguintes fatores: características das reações e das espécies de microrganismos; manutenção de alta atividade metabólica celular; manutenção da estabilidade da célula; resistência mecânica das partículas de células imobilizadas e viabilidade dos suportes de imobilização. Estes autores utilizaram um biorreator alimentado continuamente, com volume de 2,0L e comprimento de 98,8 cm e diâmetro de 5,04 cm, mantendo uma relação comprimento/ diâmetro igual a 20. O reator possuía na parte superior, tubo perfurado, com diâmetro de 0,94 cm, para coleta de biogás. O reator foi inoculado com lodo proveniente de reator UASB de indústria de reciclagem de papel, após ser macerado para diminuição do tamanho da partícula, em espuma de poliuretano com densidade de 20 Kg/m³. Os autores observaram eficiência de remoção média de DQO de 82%, com 79% de metano no biogás, para carga aplicada de 2 Kg/m³ dia, tempo de detenção hidráulico de 3 horas e temperatura média de 23°C. A partir do oitavo dia de operação, foi observada colonização total da espuma de poliuretano por parte das bactérias, não sendo observado arraste de microrganismos com TCH de 1 m³/m² dia.

3.6. ESTUDOS SOBRE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS HALOGENADOS

Na avaliação de resultados obtidos por diferentes pesquisadores, é importante estar atento para as condições em que ocorreram a degradação de compostos xenobióticos, uma vez que cada habitat do qual origina-se o inóculo é diferente entre si, além das condições de realização dos testes serem distintas.

3.6.1. ESTUDOS COM ALIMENTAÇÃO EM BATELADA OU SEMI-CONTÍNUA

BASU et al. (1996) estudaram o comportamento de diferentes inóculos: - Lodo de esgoto digerido anaerobiamente; - Sedimento de lagoa aerada de efluente de branqueamento de papel; - Lodo de biorreator anaeróbio de efluentes de branqueamento de papel, na degradação de 0,38 mM (50 mg/L) de 2CP, em meio mineral suplementado com extrato de levedura. H_2 , acetato, formiato e etanol foram testados como doadores de elétrons. Na presença de 80% de H_2 houve inibição da desalogenação, enquanto todos os compostos orgânicos propiciaram desempenho satisfatório. Sem adição de doador de elétrons houve, após certo tempo, inibição da atividade desalogenante. Os autores obtiveram fase lag de 97 dias para lodo de esgoto digerido e 250 dias para os demais. Esses longos períodos foram assumidos como o tempo necessário para o desenvolvimento dos microrganismos, antes que a atividade desalogenante pudesse ser detectada. Após 426 dias de operação, a taxa de degradação aumentou de 9 para 24 $\mu\text{M}/\text{dia}$, sugerindo adaptação e crescimento da população microbiana que utiliza 2CP. Os resultados indicaram melhor comportamento do lodo de esgoto digerido, contrariando a expectativa, uma vez que os demais inóculos foram expostos anteriormente a compostos clorados. Em testes para avaliação da taxa de CP aplicada à biomassa, não se observou relação linear. Contudo, o aumento na concentração da biomassa aumentou a taxa de desalogenação.

HAGGABLON et al. (1993) estudaram a biodegradabilidade de fenóis monoclorados e ácido clorobenzóico, sob condições de diversos aceptores de elétrons como, nitrato, sulfato e carbonato e seus efeitos nas taxas específicas de degradação do substrato. Como inóculo utilizaram sedimentos de estuário, com salinidade de 23% e sedimento de água doce. Os autores concluíram que a biodegradação de clorofenóis e de clorobenzoatos dependeu do aceptor de elétrons disponível e da posição do cloro substituinte na molécula, e que para os inóculos utilizados não foi observada diferença de comportamento. Na presença de nitrato como aceptor de elétrons, observou-se a mineralização de 3 e 4 -clorobenzoatos, com formação transitória de nitrito. Para os clorofenóis não foi observada degradação sob essa condição. Utilizando-se sulfato

como aceptor de elétrons, observou-se degradação de 2,3 e 4-clorofenóis, e apenas de 3-clorobenzoato. Nesta condição, as culturas não apresentaram produção de metano, reforçando que sulfato foi o principal aceptor de elétrons. Na ausência de sulfato e de nitrato foram degradados os clorofenóis estudados e os clorobenzoatos, com exceção de 2-clorobenzoato. Os autores observaram também que a reintrodução dos compostos degradados em cada cultura provocou degradação mais rápida dos mesmos, comparadas às iniciais. Nenhuma condição estudada permitiu a degradação de todos os compostos pesquisados, reforçando a hipótese que o metabolismo depende tanto do aceptor de elétrons quanto da posição do halogênio. Contudo, a degradação em pelo menos uma condição, sugeriu que a habilidade dos microrganismos é a determinante da biodegradação.

BOYD E SHELTON (1984) estudaram o potencial de degradação de clorofenóis em lodo de esgoto anaeróbio, adaptado e não adaptado, observando que para lodo não adaptado, cada um dos isômeros de monoclorofenol foi degradado. As taxas de degradação foram decrescentes, das posições orto, meta e para. O lodo adaptado apresentou, em geral, padrões de degradação distintos do lodo fresco. Presumivelmente, a descloração redutiva ocorreu anteriormente à mineralização de clorofenóis. O lodo adaptado a 2-CP degradou tanto 2 quanto 4-CP, em três a quatro dias, sem que fosse observada fase lag. A degradação de 3-CP não foi observada no período de 30 dias. Somente o lodo adaptado com 4-CP foi capaz de degradar os três isômeros de monoclorofenóis, além de degradar 2,4 e 3,4-diclorofenóis, sugerindo que sua população foi uma mistura das demais. O padrão de retro-alimentação específica observado para degradação de monoclorofenóis demonstrou a existência de duas populações microbianas ativas, provenientes do lodo de esgoto a condições diferenciadas. Nesse estudo observou-se mineralização dos compostos clorados nas posições orto e para clorofenóis e de 2,4-diclorofenol.

MIKESEL & BOYD (1986) adaptaram culturas de lodo de esgoto anaeróbio a monoclorofenóis, separadamente, por período de dois anos. Os autores testaram a degradação de 10 mg/L de pentaclofenol (PCP), frente a estas culturas, e observaram que a conversão ocorreu em 3 dias em cultura adaptada com 2-CP e em 12 dias nas demais. Houve acúmulo de di, tri e tetraclorofenóis quando PCP foi adicionado

aos lodos separadamente. As rotas de degradação de PCP foram diferentes em função das culturas utilizadas. Quando volumes iguais dos lodos adaptados foram misturados, PCP foi completamente desclorado. Resultado semelhante foi observado em lodo adaptado simultaneamente aos três monoclorofenóis. Essas constatações levaram os autores a acreditar que as populações nos três lodos eram distintas. Com repetidas adições de PCP houve acúmulo de 3,4,5-triclorofenol, 3,5-diclorofenol e 3-clorofenol, desaparecendo após cessar a adição de PCP. Em testes com PCP contendo ^{14}C , observou-se mineralização de 66% do PCP com produção de CO_2 e CH_4 . Não ocorreu degradação de PCP em reatores com culturas autoclavadas.

KING (1988) observou mineralização de halofenóis, como diclorofenóis e dibromofenóis, em reatores inoculados com sedimento marinho em estado anóxico. Os produtos obtidos foram CO_2 e H_2S , via redução de sulfato. Uma espécie de bactéria não redutora de sulfato pareceu estar envolvida na desalogenação desses compostos. Durante os testes os autores observaram existência de fase lag de 10 a 20 horas quando foram utilizadas concentrações de 10 a 1000 μM (2,5 a 250 mg/L) de dibromofenol. Concentrações superiores a 10 μM pareceram tóxicas às bactérias redutoras de sulfato, uma vez que após a desalogenação a inibição foi revertida. Segundo os autores, esse grupo de bactérias foi responsável pela oxidação de fenóis.

ZHANG & WIEGEL (1990) reportaram a caracterização de uma comunidade microbiana, originada de sedimento de rio, que degradou 3,1 mM (0,5 g/L) de 2,4-diclorofenol a metano e dióxido de carbono. De acordo com os resultados, 2,4-diclorofenol foi degradado anaerobiamente por microrganismos presentes em sedimentos de água doce, através da provável rota: 2,4-DCP \rightarrow 4-CP \rightarrow fenol \rightarrow benzoato \rightarrow CH_4 \rightarrow CO_2 , envolvendo pelo menos cinco espécies diferentes de microrganismos. As reações ocorreram a maiores taxas na temperatura de 31 $^{\circ}$ C. A conversão de 4-CP a fenol é o passo limitante com taxa de conversão de 78 $\mu\text{mol/L.dia}$ (10mg/L dia) e fase lag de 37 dias, bem como sua população foi a mais difícil de ser enriquecida. Os estudos demonstraram também que 4-CP é mais tóxico que o composto original e em concentrações superiores a 4,5 mM (0,5 g/L) provocou inibição da conversão de 2,4-DCP. As concentrações de 200 μM (26,6 mg/L) e de 1,5 mM (192 mg/L) de 4-CP provocaram inibição parcial e total da degradação de fenol,

respectivamente. A concentração de 3 mM (0,38g/L) de 4CP inibiu a degradação de benzoato. Pressões de hidrogênio superiores a 65 KPa inibiram a descloração de 4-CP e demais passos da degradação.

GIBSON & SUFLITA (1986) compararam a degradação de compostos fenólicos clorados, benzoatos e herbicidas ácidos fenoxiacéticos com inóculos de diferentes habitats anóxicos, como: sedimentos de charco, lodos de digestor primário, amostra de aquífero subterrâneo com bactérias metanogênicas e amostra de aquífero com presença de bactérias redutoras de sulfato. As concentrações dos compostos fenólicos variaram de 300 a 500 μM e como co-substrato foram testados metanol, acetato e sulfato. Os autores observaram que nos diferentes habitats ocorreu metabolização de benzoato e fenol a metano e dióxido de carbono, mas para fenoxiacetatos, benzoatos e compostos fenólicos clorados foram observadas diferenças na habilidade de degradação. Inóculo do aquífero, rico em sulfato, mostrou-se ineficiente na degradação de haloaromáticos, contudo, após a remoção de sulfato observou-se desalogenação do substrato. Nenhum inóculo foi eficiente na desalogenação de todos substratos. O sedimento de charco foi o inóculo que apresentou maior eficiência de conversão, sendo que apenas 1, entre os 14 compostos haloaromáticos clorados estudados não sofreu desalogenação superior a 50%. Para o aquífero metanogênico esse número foi 3 e para o lodo de esgoto, 8. Os autores salientaram que somente houve reações de aril desalogenação em condições metanogênicas. Entretanto, desalogenação e metanogênese não estiveram diretamente relacionadas, uma vez que a adição de acetato ao inóculo, com alta concentração de sulfato, não levou à desalogenação de 2,4,5-TCP, mesmo havendo estímulo para população metanogênica. Portanto, a mera produção de metano não assegura a atividade de desalogenação.

MADSEN & AAMAND (1991) pesquisaram a degradação de fenóis halogenados por consórcio de bactérias degradadoras de pentaclorofenol (PCP), obtidas a partir de lodo de esgoto enriquecido por dois anos, sob condições metanogênicas e de redução de sulfato, este último frequentemente presente em habitats anaeróbios, como sedimentos aquáticos, solo e outros, sujeitos à contaminação por compostos aromáticos halogenados. Segundo os autores, a presença de sulfato, tiosulfato e sulfito inibiram a descloração de pentaclorofenol (PCP) e seus metabólitos

e a adição de hidrogênio estimulou a descloração, anulando parcialmente os efeitos dos ânions sulfônicos. A transformação de PCP em 2,3,4,5 TeCP (tetraclorofenol) e desse para 3,4,5TCP (triclorofenol) ocorreram, cada um, em períodos de tempo da ordem de 30 horas, após breve fase lag. 3,4,5TCP foi desalogenado a 3,5DCP (diclorofenol), espécie muito mais persistente, tendo sido detectado apenas eventualmente 3CP (monoclorofenol). Contudo, em testes com TCPs e DCPs como substrato, observou-se que para 2,4,5-TCP, ocorreram longas fases lags e baixas taxas de desalogenação, enquanto para os demais isômeros do TCP as fases lags foram da ordem de 20 horas e as taxas de desalogenação variaram de 4,4 a 20 $\mu\text{mol/L}$ dia. Para os DCP as fases lags variaram de 0 a 20 horas e as taxas de 0,4 a 8,8 $\mu\text{mol/L}$ dia, sendo que 3,4 DCP não foi degradado em 720 horas. Os monoclorofenóis não apresentaram qualquer degradação no período de duas semanas. Os autores concluíram que uma possível explicação para os efeitos dos ânions sulfônicos foi a competição por H_2 pelos microrganismos envolvidos nas duas reações, bem como os efeitos tóxicos causados por esses ânions. Os autores ressaltaram também que, sob condições metanogênicas, o consórcio de bactérias pode degradar compostos com cloro substituintes nas posições orto e meta.

BRYANT et al. (1991) estudaram a rota de degradação em sedimentos anaeróbios não adaptados e adaptados a 2,4diclorofenol (2,4DCP) e 3,4diclorofenol (3,4DCP). Ambas comunidades adaptadas desalogenaram todos os seis isômeros de DCP, em concentrações de 5 e 10 mg/L. A comunidade adaptada a 2,4DCP efetuou, preferencialmente, desalogenação na posição orto e também na posição para, enquanto a adaptada a 3,4DCP removeu cloro preferencialmente da posição para, além de desalogenar as posições orto e meta. Em testes de degradação de PCP, com lodos adaptados ou não, foram mantidas as rotas preferenciais citadas anteriormente. A mistura dos lodos adaptados resultou na eliminação de fase lag, bem como na degradação mais rápida do composto. Os produtos intermediários formados foram: 2,3,5,6TeCP (tetraclorofenol), 2,3,5TCP, 3,5DCP, 3CP (monoclorofenol) e fenol. Os autores concluíram que as comunidades testadas têm atuação diferenciada quanto à região específica de descloração, bem como na gama de clorofenóis que podem ser tratados.

KOHRING et al. (1989a) demonstraram a descloração de 2,4-DCP (diclorofenol) e 4-CP (monoclorofenol) durante a redução de sulfato, utilizando sedimento anaeróbio com potencial redox de - 300mV e concentração de sulfato de 0,5 a 15 mg/L. As concentrações de sulfato e nitrato, como sais de sódio, utilizadas durante o teste foram 25 mM. Os autores observaram que na presença de sulfato houve transformação de 130 μ M (27 mg/L) de 2,4-DCP, no intervalo de temperatura de 19 a 40 $^{\circ}$ C. A 22 $^{\circ}$ C, o período demandado foi de 50 dias, enquanto a 28 $^{\circ}$ C foi de 90 dias e a 40 $^{\circ}$ C de 366 dias. As taxas de descloração foram notadamente inferiores ao testes sem a adição de sulfato, independentemente da temperatura. Os autores não puderam concluir se os organismos envolvidos na descloração, na presença de sulfato, foram os mesmos sem a adição de sulfato. A adição de nitrato inibiu a descloração no período de estudo que foi de 130 dias, independentemente da temperatura. Observou-se redução de nitrato a N₂, sem detectar-se a formação de CH₄.

KORING et al. (1989b) estudaram a degradação anaeróbia de 2,4-DCP em diferentes temperaturas utilizando sedimento de lago, anteriormente exposto a compostos fenólicos de pesticidas e herbicidas, e sedimento não exposto a esses compostos há pelo menos 12 anos, como inóculo. Ambos sedimentos eram predominantemente metanogênicos. Em ambos os sedimentos, os autores observaram biodegradação no intervalo de temperatura de 5 a 40 $^{\circ}$ C. Houve degradação de 2,4-DCP (diclorofenol) a 4-CP (monoclorofenol), após período de adaptação, segundo relações estequiométricas. Após segundo período de adaptação, 4-CP foi degradado. Observou-se perda abiótica do substrato original, principalmente a altas temperaturas. No intervalo de temperatura de 25 a 35 $^{\circ}$ C, o período de adaptação foi de 7 a 11 dias. Abaixo de 25 $^{\circ}$ C e acima de 40 $^{\circ}$ C, esse intervalo foi maior. As taxas de degradação aumentaram exponencialmente entre 15 e 30 $^{\circ}$ C, apresentando um segundo pico a 35 $^{\circ}$ C, sugerindo a participação de dois grupos de microrganismos. Segundo os autores, o passo limitante da degradação de 2,4-DCP foi a descloração de 4-CP, independentemente da temperatura e com os dois inóculos testados.

GENTHNER et al. (1989a) estudaram a degradação de monoclorofenóis e monoclorobenzoatos em sedimentos aquáticos de diversas procedências, sob quatro condições de enriquecimento: -metanogênica; -com presença de nitrato; -

com presença de sulfato e - com presença de BrES, que é inibidor da metanogênese. A temperatura foi mantida em 30°C durante todo o ensaio. O tempo necessário à adaptação variou de 1 a 12 meses, dependendo do inóculo e do composto aromático testado. Os autores observaram degradação de maior número de compostos aromáticos, com inóculo previamente exposto a efluentes industriais. Dos quatro enriquecimentos testados, o metanogênico apresentou melhores resultados seguido pelos meios enriquecidos com sulfato e nitrato. A presença de 10 mM de BrES (inibidor de metanogênese) previniu ou inibiu a degradação da maioria dos compostos testados. Quanto à classe dos compostos aromáticos, os clorofenóis foram degradados mais prontamente que os clorobenzoatos. Na classe dos clorofenóis, a ordem relativa de biodegradabilidade foi das posições orto, meta e para, enquanto para os clorobenzoatos foi nas posições meta, orto e para.

HAGGBLON & YOUNG (1990) estudaram a degradação de clorofenol sob condições sulfato redutoras, utilizando como inóculo sedimentos de estuários e lodo de reator anaeróbio de leito fluidizado em escala de bancada, alimentado com efluentes de branqueamento de papel. Para inóculos de estuários, os autores observaram que após fase lag de 50 a 100 dias, 2-CP (monoclofenol), 3-CP, 4-CP e 2,4-DCP (diclorofenol), nas concentrações de 0,1 a 0,2 mM (12 a 25 mg/L), que foram completamente removidas entre 120 e 200 dias, evidenciando a adaptação. A realimentação de clorofenóis levou à remoção dos compostos em 45 dias ou menos. Durante esse período, não ocorreu atividade metanogênica, e sim redução de sulfato, demonstrando que o consumidor de elétrons foi a redução de sulfato, uma vez que essa reação ocorreu concomitantemente à desalogenação. A desalogenação de 2,4-DCP levou a 4-CP, que foi completamente removido. A adição de molibdato, que inibe a redução de sulfato, levou à inibição da atividade desalogenante, sugerindo serem as bactérias redutoras de sulfato responsáveis por essa reação. As taxas de degradação de clorofenóis variaram de 8 a 37 $\mu\text{mol/L dia}$, em função de cada composto e da origem do inóculo utilizado, sendo as taxas decrescentes na seguinte ordem de compostos: 4-CP, 3-CP, 2-CP e 2,4-DCP. Em estudo da degradação de 2,4-DCP e 2,6-DCP, com lodo de reator aneróbio, sob condição de redução de sulfato, os autores observaram persistência de 4-CP na degradação de 2,4-DCP e de 2-CP, na degradação de 2,6-DCP.

MOHN & KENNEDY (1992) estudaram a degradação de tri, di e monoclorofenóis, nas concentrações de 6 a 340 mg/L, em testes em batelada, utilizando como inóculo grânulo de reatores UASB, que tratavam individualmente 2,3,6,TCP (triclorofenol), 2,4,6TCP e 3,5DCP(diclorofenol) e de UASB sem a adição de clorofenóis. Aos reatores eram adicionados sacarose e acetato em meio mineral. Em testes com inóculo adaptado a 2,3,6TCP houve conversão deste a 2,3,DCP como intermediário, e a 3CP como produto final, havendo portanto orto- desalogenação. Com lodo não adaptado, não foi observada degradação. A concentração de 340 mg/L inibiu aparentemente a reação de desalogenação, sem causar efeito à metanogênese do acetato. A taxa de desalogenação não variou na faixa de pH de 6,7 a 8,5. O teste com 2,3,6TCP em lodo adaptado ao composto levou à formação de 4CP (clorofenol), devido à orto desalogenação. Em teste com lodo adaptado a 3,5DCP, observou-se a presença de 3CP, tendo havido meta-desalogenação. Nos demais testes, os autores observaram especificidade da comunidade adaptada, uma vez que o inóculo adaptado a 2,4,6TCP não degradou 3,5DCP e vice-versa. Nenhum dos inóculos testados demonstrou habilidade na degradação de monoclorofenóis, apesar de ter ocorrido desaparecimento de 2CP, em teste com lodo adaptado a 2,3,6TCP, sem contudo detectar os produtos do metabolismo. Na ausência de doadores de elétrons houve inibição da atividade desalogenante após 11 dias. Sacarose demonstrou ser o doador mais estimulante. A adição de BrES causou redução de 12% na metanogênese, sem apresentar efeito significativo na desalogenação. Segundo os autores, possivelmente os microrganismos foram protegidos nos grânulos.

LARSEN et al. (1991) investigaram o potencial anaeróbio de degradação de PCP, sob condições termofílicas (50°C), utilizando com inóculo sedimento de água doce, lodos de digestores de estação de tratamento de esgoto que recebe efluentes sanitários e industriais e lodo de biodigestores rurais. Fenol e etanol foram utilizados com solventes do pentaclorofenol (PCP). Os autores observaram que a realimentação com PCP reduziu bastante o tempo para degradação do composto, confirmando a hipótese de adaptação ao substrato. Em lodos de esgoto as taxas de descloração observadas foram bastante baixas (0,41 µM dia), se comparadas às do teste com sedimento de lago que apresentou taxa de 7,5 µM dia, quando recebeu adição de 37,5

μM (10 mg/L) de PCP. Os autores acharam interessante que o potencial de descloração de PCP a 50°C foi muito superior frente a inóculos de ambientes naturais (sedimentos de lagos, rios, etc.) que no lodo de esgoto, já exposto a fenóis. Possivelmente isso ocorreu devido à maior diversidade de organismos presentes em ambientes naturais. Os autores verificaram que a degradação de PCP ocorreu por duas vias de descloração distintas, sendo que ambas levaram ao subproduto 3,5-DCP (diclorofenol). Os complexos padrões de formação dos intermediários levou os autores a acreditarem na participação de pelo menos duas populações distintas no processo de descloração.

BOYLE et al. (1993) estudaram a degradação de difenil policlorados (Aroclor) através da suplementação de sedimentos com cultura anaeróbia enriquecida a partir de sedimento de rio, com capacidade de degradação de Aroclor 1242. Os autores observaram meta descloração de 2,3,6-clorodifenil (2,3,6CB). A introdução de sedimento esterilizar, em geral, levou ao aumento da descloração. Houve acúmulo de 2,6clorobifenil (2,6-CB), formado estequiometricamente a partir do composto original, sem contudo afetar a degradação desse composto. A suplementação de sedimento levou a aumento na taxa de descloração de difenil policlorados (PCB) superiores a cem vezes, passando de 2,1 $\mu\text{M/L}$ dia para 300 $\mu\text{M/L}$ dia, para 1,0 a 2,0 μM de 2,3,6-CB, com diminuição da atividade metanogênica.

QUENSEN III et al. (1988) estudaram a descloração redutiva de difenil policlorados (PCBs) por microrganismos anaeróbios originados de sedimentos com capacidade de degradação de Aroclor 1242. Os autores observaram a natureza progressiva da descloração, em função da alteração nas proporções relativas de mono, di, tri, tetra, penta e hexafenis ao longo do tempo. A descloração foi mais extensiva em concentrações maiores de PCBs, possivelmente devido à disponibilidade do composto, uma vez que eles podem sedimentar, tornando apenas a parcela solúvel disponível aos microrganismos. Além disso, os autores observaram o papel positivo do sedimento no fornecimento de aceptores de elétrons. Portanto, esses organismos poderiam promover a atividade desclorante "in situ".

BROWN et al. (1987) estudaram a descloração redutiva de difenil policlorados (PCBs), em seis locais distintos de lançamento desses compostos. Os autores observaram que a descloração dos difenil policlorados exibiu diferentes padrões, sugerindo a atuação de populações distintas. Embora não tenha sido observada descloração completa, a destoxificação dos compostos possibilitou a metabolização dos produtos por microrganismos aeróbios.

MORRIS et al. (1992) estudaram a descloração de difenil utilizando com inóculo sobrenadante de sedimento de rio contaminado com Aroclor 1242, bem como de sedimento não contaminado. Ao meio de cultura adicionou-se sedimento, que pareceu atuar no fornecimento de nutrientes, além de aumentar a mobilidade de PCBs, pouco solúveis em água. Em certas culturas enriquecidas, a utilização de piruvato como co-substrato levou aos melhores resultados de descloração. O piruvato não pareceu ser doador imediato de elétrons, uma vez que foi totalmente consumido anteriormente ao início da descloração. Acetato, como produto transiente, teve seu consumo simultâneo à produção de metano e descloração. A adição de hidrogênio e acetato forneceram resultados semelhantes aos da adição de piruvato. A adição de sulfato e BrES reduziu a atividade de descloração em cerca de 50%, comparada à adição de NO_3^- ou CO_2 , estando de acordo com o potencial de envolvimento desses grupos de organismos na descloração. Segundo os autores, nas culturas enriquecidas predominou a atividade meta desalogenante, sugerindo a presença de microrganismos especializados nessa função ou sua predominância.

ADRIAN & SUFLITA (1990) estudaram a desalogenação de herbicida heterocíclico utilizando como inóculo lodo de aquífero profundo, caracterizado como metanogênico, e solo. A concentração inicial do composto estudado, Bromacil (nome comercial), foi de 280mM. Em reatores inoculados com lodo de aquífero observou-se rápida perda de Bromacil, com o aparecimento de metabólitos que não puderam ser identificados. Observou-se também pequena remoção não biológica. Nos reatores inoculados com solo não foi observada degradação significativa do composto. Os autores concluíram que o Bromacil é redutivamente desbromado frente ao inóculo de sedimento de aquífero, em condições metanogênicas. O estudo não permitiu concluir se

os produtos desbromados formados são mais facilmente metabolizados que o composto original.

HOLLIGER et al (1992) estudaram a descloração redutiva de hexaclorobenzeno (HCB) e pentaclorobenzeno (PCB), isômeros do tetraclorobenzeno e do triclorobenzeno, utilizando como inóculo lodo enriquecido, por dois anos e meio, a partir de sedimento anaeróbio de rio, e lodo anaeróbio granulado de sistema de tratamento de efluentes de indústria de cana de açúcar. A primeira geração inoculada com lodo granulado não apresentou capacidade de descloração frente a nenhum substrato. Com sedimento de rio, após intervalos de 1 a 3 meses, observou-se a atividade desclorante. A segunda geração enriquecida a partir de sedimento de rio apresentou fases "lags" reduzidas. A descloração somente pode ser mantida com a adição de doador de elétrons, como lactato, glicose, etanol ou isopropanol. Lactato, foi o melhor doador de elétrons, levando às maiores taxas de descloração. Etanol e hidrogênio puderam substituir o lactato como doadores de elétrons. Outros doadores de elétrons testados como piruvato, propionato, succinato ou propanol não apresentaram resultados satisfatórios. As proporções adequadas de doadores de elétrons obtidas foram para 10% de inóculo, 5mM de doador e para 50% de inóculo, 1mM. A temperatura influenciou os testes, mostrando ser adequada no intervalo de 25 a 30°C, levando à interrupção da atividade a 37 °C. O pH ideal foi 7,2. Durante os testes observou-se redução do número de cloro substituintes, sem contudo ser observada mineralização. A adição de extrato de levedura aumentou a produção de cloretos e a adição de 2 BrES, inibidor da metanogênese, não reduziu a atividade desclorante. Culturas puras de bactérias acetogênicas, isoladas a partir de cultura enriquecida de isômero de triclorobenzeno, não apresentaram atividade desclorante, indicando que esse grupo de bactéria não está envolvido na atividade desclorante desse isômero. Através de técnica de número mais provável, os autores observaram que entre 0,2 a 20% dos microorganismos presentes na cultura estudada foram responsáveis pela atividade desalogenante. Segundo os autores, a descloração redutiva de HCB, PCB e TeCB em culturas enriquecidas, inoculadas com sedimento de rio, indicaram que os microorganismos indígenas do sedimento apresentam capacidade de degradar os compostos benzênicos altamente clorados. Além disso, observou-se também a

especificidade aos substrato menos clorados nas culturas enriquecidas, sugerindo que bactérias distintas presentes no inóculo catalisaram reações de descloração distintas.

HOROWITZ et al. (1983), pesquisando a desalogenação redutiva de halobenzoatos, utilizando sedimento anaeróbio de lago como inóculo, concluíram que, após sucessivas adições dos compostos halogenados à cultura, não foi observada "fase lag". Os autores observaram também que a mineralização somente ocorreu após desalogenação completa do composto e que a desalogenação ocorreu sempre simultaneamente à produção de metano. A introdução de oxigênio inibiu imediatamente a atividade desalogenante. Segundo os autores, a ocorrência de aparente especificidade ao substrato, o período "lag", o período de adaptação, bem como a faixa de temperatura em que as reações ocorreram sugerem que a reação foi biologicamente catalisada.

SUFLITA et al. (1982) estudaram a desalogenação de benzoatos halogenados, nas concentrações de 0,2 a 0,8 mM, com sedimento anaeróbio ou lodo de esgoto, na ausência de luz. O consórcio enriquecido a partir de lodo de esgoto degradou os compostos mais prontamente que o sedimento. Porém, ocorreu mineralização com os dois inóculos nos compostos completamente desalogenados. Compostos clorados foram desalogenados em menor número que aqueles com iôdo ou bromo. A desalogenação ocorreu preferencialmente na posição meta.

SCHENNEN et al. (1985) estudaram a degradação de 2-fluorbenzoato, na concentração de 5mM (0,55g/L), por três espécies de bactérias desnitrificantes, com nitrato na concentração de 0,02M (1,24g/L). Os experimentos mostraram que as três espécies de *Pseudomonas* sp, utilizadoras de benzoato, foram também capazes de crescer anaerobiamente na presença de nitrato e 2-fluorbenzoato como única fonte de carbono e energia, sem que fosse observada fase lag. O crescimento das células, em meio anaeróbio, demonstrou alta atividade de Acetil CoA sintetase. Células cultivadas com benzoato, nunca expostas anteriormente a 2-fluorbenzoato, cresceram instantaneamente na presença deste último, e vice-versa. Em contraste, os isômeros 3 e 4-fluorbenzoato não foram degradados, demonstrando que a eliminação de flúor é seletiva quanto à posição do halogênio.

KUHN et al. (1990) investigaram as rotas do metabolismo das cloroanilinas, bem como examinaram os efeitos do sulfato e butirato no destino dos compostos formados. No experimento, utilizou-se sedimento de água subterrânea como inóculo, com presença de bactérias metanogênicas. O meio de cultura utilizado foi água do próprio local contaminado. Os autores observaram que a degradação mais significativa de 2,3,4-tricloroanilina ocorreu entre 8 e 10 meses de incubação, com formação de 2,4 e 3,4-dicloroanilina, que se acumularam durante todo o período de duração do experimento. Nesse estudo, observou-se perda abiótica de cerca de 50% do substrato original, possivelmente devido à adsorção no lodo. Contudo, comprovou-se a desalogenação por interferência da microbiota, através de evidências como fase lag, anteriormente à fase de degradação e adaptação das culturas por adições sucessivas. Durante ensaio com 2,3,4,5-tetracloroanilina, observou-se sua degradação pela remoção sequencial de halogênios da posição meta, para e orto, formando 2,5-dicloroanilina. Com a adição de 4mM (288 mg/L) de butirato ao meio de cultura, surgiu um passo adicional na rota de degradação, que permaneceu inexplicado. A adição de 8 mM (0,77g/L) de sulfato levou à diminuição da taxa de degradação de 2,3,4,5-tetracloroanilina, com formação preferencial de tricloroanilinas e as reações subsequentes foram bloqueadas. Segundo os autores, este fato ocorreu possivelmente, devido ao aumento do potencial redox pela presença de sulfato, levando a condições desfavoráveis à desalogenação redutiva.

NIES & VOGEL (1990) estudaram a utilização de co-substratos como doadores de elétrons, durante a descloração de difenil policlorados, utilizando sedimento de rio, naturalmente contaminado com PCBs como inóculo. Os autores observaram que a taxa de descloração redutiva do Aroclor 1242 variou de acordo com os co-substratos adicionados, contudo, o padrão de descloração foi similar a todos eles. Frente a esse inóculo, não foi observada perda não biológica do composto estudado. Em experimentos utilizando acetona e metanol, solventes de PCBs normalmente utilizados, observou-se descloração significativa. Não foi observada descloração na ausência de co-substrato orgânico, indicando limitação dos organismos envolvidos no processo pela ausência de substrato orgânico e pela necessidade de doadores de elétrons disponíveis para mediar as reações. Os autores observaram descloração principalmente

nas posições meta e para, resultando no acúmulo de compostos menos clorados. Os autores sugeriram três mecanismos diferentes de descloração: - o enriquecimento seleciona organismos ou consórcios capazes de suprir o potencial elétron-doador para os organismos desclorantes; - a variação da eficiência aparente é devida à termodinâmica do par doador de elétron/ PCB; - descloração é um mecanismo de destoxificação.

FATHEPURE et al. (1988) estudaram a descloração redutiva de hexaclorobenzeno (HCB) a tri e diclorobenzenos, utilizando lodo de digestor primário de tratamento de efluentes industriais e domésticos na proporção de 40 para 60%. A descloração de cerca de 50 mg/L de HCB completou-se em 3 semanas com fase lag de 1 semana. A taxa máxima de descloração observada foi de 13,6 $\mu\text{mol/L dia}$. Observou-se a degradação por duas rotas distintas, ambas envolvendo remoção sequencial de íons cloro do anel aromático. Na rota principal, 90% do PCB foi convertido a 1,3,5-triclorobenzeno, que persistiu após 14 semanas de incubação. A outra rota levou à formação de diclorobenzenos. As explicações possíveis para as duas rotas, segundo o autor, são: - existência de duas populações, cada qual utilizando passos diferentes; - os produtos refletem a distribuição de intermediários reativos do anel aromático no qual cloro, entre outros átomos de cloro, é mais prontamente retirado; - uma vez que não há cloros adjacentes (1,3,5-triclorobenzeno), cessa a descloração.

ALLARD et al. (1992) estudaram a orto-desmetilação e a descloração de guaicóis catecóis clorados, utilizando como inóculo sedimentos supostamente contaminados com compostos organoclorados, presentes em efluentes de branqueamento de indústria de papel, examinando também o papel do sulfato nessas reações. Os autores efetuaram vários enriquecimentos a partir do inóculo para utilização nos testes. Enquanto a orto-desmetilação foi observada em todas as culturas, a descloração foi mais restritiva e os isômeros formados dependeram do substrato utilizado no enriquecimento. Culturas que receberam adições iniciais de sulfato apresentaram redução na atividade desclorante de 3,4,5-clorocatecol. Em culturas com concentrações de sulfato, inicialmente baixas, a posterior adição de sulfato não causou efeitos negativos, possivelmente pelo desenvolvimento de populações capazes de promover a descloração.

GIBSON & SUFLITA (1990) estudaram a biodegradação anaeróbia do herbicida 2,4,5 ácido triclorofenoxiacético (2,4,5-T), na presença de lodo metanogênico de aquífero. Os autores observaram desalogenação do composto após período de adaptação, com a formação de muitos compostos intermediários. O principal produto formado foi ácido 2,5-diclorofenoxiacético. Outros metabólitos formados foram ácidos 2, 3 e 4 clorofenoxiacéticos, fenol, 3CP e 4CP (clorofenol), 2,3-DCP(diclorofenol) e 2,5-DCP. A adição de sulfato, em concentrações superiores a 2 mM 200 mg/L), provocou efeito negativo na atividade desalogenante, mesmo com adição de fonte suplementar de carbono. Os autores levantaram algumas hipóteses sobre as causas da inibição como:-a inibição por sulfato pode ocorrer em função dos microrganismos com atividade desalogenante serem as bactérias redutoras de sulfato, sendo que o sulfato é o acceptor de elétrons favorito, inibindo a atividade desalogenante, até que o sulfato seja completamente consumido ou a competição entre os grupos de bactérias redutoras de sulfato e com atividade desalogenante por doadores de elétrons, favorecer as BRS, em altas concentrações de sulfato;- a adição de BrES também inibiu a desalogenação do composto. Talvez a inibição esteja, ao menos parcialmente, relacionada às alterações no tipo ou na quantidade de doadores de elétrons disponíveis aos organismos desalogenantes. Segundo os autores, a disponibilidades de elétrons influencia o início e o grau de degradação do 2,4,5-T (ácido triclorofenoxiacético). Butirato demonstrou ser o melhor doador de elétrons para a atividade desalogenante, relativamente a outros compostos orgânicos como metanol, acetato, etanol, propionato e formiato. Os autores verificaram também que, em contraste com o lodo de esgoto, a microbiota originada de sedimentos de aquíferos possibilitou a remoção de halogênio da posição meta do 2,4,5-T, formando 2,4-D (diclorofenoxiacético).

3.6.2. ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS HALOGENADOS EM CULTURA PURA

MADSEN & LICHT (1992) isolaram e caracterizaram um consórcio de bactérias anaeróbias com capacidade de transformar clorofenóis, a partir de lodo de

esgoto sanitário. Desse consórcio foi isolada DCB-2, que mostrou-se capaz de promover a descloração de 300 μM (59 mg/L) de 2,4,6-TCP (triclorofenol), via 2,4diclorofenol (2,4DCP) e 4monoclorofenol (4CP), à taxa de 1,8 mM Cl / h.g proteína, promovendo portanto descloração nas posições orto e meta. A presença de 20 mM (3,9g/L) de sulfato ou 10 mM (0,62 mg/L) de nitrato não influenciou na descloração do composto. Essa bactéria promoveu lentamente, a descloração de 40 μM (10,6 mg/L) de PCP via 2,3,4,5 tetraclorofenol (2,3,4,5TeCP), acumulando-se com 3,4,5triclorofenol (3,4,5TCP), com desalogenação na posição orto. Em testes com 3,5 DCP, ocorreu desalogenação a 3CP, mostrando que a descloração não foi limitada à posição orto, uma vez que ocorreu também na posição meta, levando a 3-CP. Nos testes realizados não foi observada descloração na posição para. Contudo, a degradação foi fortemente limitada pela concentração inicial e inibida a altas concentrações. A bactéria DCB-2 parece não requerer co-substrato para indução da descloração. Essa bactéria não reduziu sulfato, porém reduziu nitrato a nitrito. O doador de elétrons preferido foi piruvato.

MOHN & KENNEDY (1990) estudaram a desalogenação de Pentaclorofenol (PCP) pela cultura pura de *Desulfomonile tiedjei*, para determinar os clorofenóis desalogenados pela bactéria e comparar sua desalogenação com a de clorobenzoatos. Os autores obtiveram como resultados a desalogenação de PCP até concentração de 10 μM (2,5 mg/L) a 2,4,6triclorofenol (2,4,6TCP), que não foi degradado em 72 horas subsequentes. A taxa de desalogenação de PCP foi de 54 $\mu\text{Mol Cl / h.g}$ de proteína e sob condições similares observou-se descloração de 3-CB a taxa de 1,1 $\mu\text{M Cl / g}$ proteína. O formiato foi utilizado como doador de elétrons. A desalogenação do PCP necessitou ser induzida por 3-clorobenzoato (3CB). Nos compostos fenólicos clorados testados com a bactéria *D. tiedjei*, foi observada descloração apenas na posição meta. Segundo os autores, possivelmente a descloração em outras posições seja de responsabilidade de outros microrganismos, ou da própria bactéria sob condições distintas. Ocorreu inibição reversível da desalogenação de PCP em concentrações superiores a 10 μM (1,7 mmol/g proteína).

MORRIS et al. (1992) testaram a habilidade de dez culturas puras, incluindo metanobactérias, *Desulfomonile tiedjei*, além de seis espécies de

microrganismos isolados a partir de sobrenadante de sedimentos de rio, contaminados ou não com Aroclor 1242. Nenhuma das culturas demonstrou habilidade em degradar o composto Aroclor 1242. Os autores concluíram que, possivelmente, esses organismos não estejam envolvidos no processo de descloração.

STEVENS et al. (1988) testaram a bactéria DCB-1, a única bactéria sulfidogênica, até esse momento, capaz de promover desalogenação de compostos aromáticos halogenados. Os autores utilizaram 800 μM (100 mg/L) de 3-clorobenzoato em meio mineral, testando 55 fontes de carbono como doadores de elétrons. Os autores observaram que a adição de fluido de rúmem foi imprescindível para realização do ensaio. A temperatura durante o ensaio foi mantida em 37° C e o ensaio realizado na ausência de luz. Os autores observaram que embora a DCB-1 seja responsável pela taxa limitante na reação de degradação de 3-clorobenzoato, parece pouco provável que desempenhe papel fundamental na cadeia alimentar do lodo de esgoto, de onde foi isolada. Essa espécie parece reduzir compostos intermediários excretados por outros organismos anaeróbios. DCB-1 cresce como membro da associação sintrófica que obteve energia através da descloração de 3-clorobenzoato (3CB).

SHELTON & TIEDJE (1984) objetivaram nesse estudo isolar e caracterizar a bactéria responsável pela descloração redutiva de ácido 3-clorobenzóico (3CB), bem como outras bactérias envolvidas na cadeia alimentar, isoladas a partir de lodo de esgoto enriquecido com o composto em estudo. O consórcio obtido continha bactérias metanogênicas hidrogenotróficas, redutoras de sulfato, oxidantes de benzoato, oxidantes de butirato, além de bactéria desclorante (DCB-1). Segundo os autores, devido à variação de energia livre dessas reações ser positiva, sob condições padrões, a presença de bactérias consumidoras de hidrogênio na associação sintrófica foi necessária. Após 3 a 4 semanas de incubação, a 37° C e ausência de luz, os autores observaram que possivelmente, a degradação do composto ocorria em três etapas: $3\text{CB} \rightarrow \text{B}$ (benzoato) $\rightarrow \text{Ac}$ (ácido acético) + CO_2 + CH_4 e H_2 + $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$. Segundo os autores, além da bactéria DCB-1 dominante, haveriam outras bactérias participantes do processo de descloração na cultura. A presença de bactérias oxidantes de butirato e sulfidogênica é inexplicável, uma vez que não aparecem no fluxo de carbono, possivelmente devido à sua participação no mecanismo de retro-alimentação, durante a



oxidação de 3-CB. As bactérias metanogênicas e redutoras de sulfato desempenham papel fundamental no consumo de H_2 , possibilitando a continuidade das reações. Os autores observaram ainda que a reação de descloração pareceu ser enzimática, uma vez que ocorre após indução, sendo altamente influenciada pela temperatura. O mutualismo entre, pelo menos, bactérias com atividade desclorante e bactérias metanogênicas foi aparentemente necessário para a utilização de 3CB:

DeWEERD & SUFLITA (1990) testaram a desalogenação redutiva por cultura pura de *D. tiedjei*, bem como em extratos de células, desses microrganismos frente a compostos mono e dihalogenados, com bromo, cloro, iôdo e flúor. Os autores observaram que a taxa de remoção de cada halogênio da posição meta de halobenzoatos foi proporcional ao raio atômico do halogênio, sendo a maior taxa observada para 3-iodobenzoato, enquanto 3-fluorbenzoato não foi metabolizado. Segundo os autores, compostos aromáticos halogenados que não contêm grupo aril carboxil não foram desalogenados por extratos de células. Extrato de células apresentaram características consistentes com reação catalisada por enzima, além disso, apresentou especificidade idêntica à célula íntegra, mas com taxas de desprendimento de haletos superiores, provavelmente devido à dificuldade de transporte dos substratos aos sítios de atividade enzimática da célula. A retirada de cofatores ou proteínas, individualmente, não influenciou a aril desalogenação em extratos celulares. Apenas a retirada de metil viologen, que tem o mais baixo potencial redox (-424 mV) dos cofatores testados, causou diminuição na taxa de desalogenação, demonstrando que esse carregador de elétrons foi insubstituível durante o ensaio. A presença de 3CB, como indutor, somente foi dispensada na desidratação. Observou-se em alguns casos a inibição da reação do composto testado pela introdução de composto aromático com halogênio diferente, sugerindo que suas transformações ocorrem no mesmo sítio enzimático. A adição de sulfato ao meio não inibiu a atividade desalogenante, contudo a introdução de outros ânions sulfônicos reduziu a taxa de desalogenação em até 46%, possivelmente devido às suas reatividades com grupos sulfidríla das proteínas, envolvidos na aril desalogenação. Os autores atribuíram, em grande parte, a atividade desalogenante à membrana celular.

DeWEERD et al (1991) utilizaram suspensão de células de *D. tiedjei* para estudar o consumo de hidrogênio e a atividade desalogenante na presença de vários

doadores e aceptores de elétrons, como 3clorobenzoato (3CB), 3bromobenzoato (3BB), 3iodobenzoato (3IB), 3fluorobenzoato (3FB) e benzoato (B). Os autores observaram que a taxa de desalogenação foi estimulada pela adição de H_2 , piruvato e formiato, sendo formiato preferido ao piruvato. As maiores taxas de desalogenação foram obtidas em halo-benzoatos com menores massas atômicas. Na desalogenação de benzoato, as taxas de desalogenação observadas frente a H_2 , formiato e piruvato estiveram próximas a 80 η mol/h. Após adição de H_2 nas culturas com outros doadores de elétrons, as taxas aumentaram para valores próximos a 120 η mol/h. Quando ânions sulfônicos estiveram presentes em lugar dos compostos haloaromáticos observou-se consumo de hidrogênio cerca de 4 vezes maior, uma vez que essa reação é mais energética para o microrganismo envolvido. A introdução de acetileno, molibdato, selenato e metronidazol inibiram a desalogenação e a utilização de H_2 . Os autores concluíram que o controle da desalogenação possivelmente dependeu da disponibilidade de aceptores de elétrons alternativos, e da habilidade dos organismos desalogenantes em competir por doadores de elétrons com outras bactérias presentes no meio.

GENTHNER et al (1989) caracterizaram consórcios anaeróbios metanogênicos e com nitrato, com atividade desclorante, de culturas enriquecidas, a partir de sedimento aquático. Os consórcios metanogênicos foram enriquecidos cada um com 2monoclorofenol (2CP), 3monoclorofenol (3CP), 2clorobenzoato (2CB) e 3clorobenzoato (3CB). Os consórcios enriquecidos com 3CP e 3CB degradaram também 2CP, não sendo observado mais nenhum mecanismo de retro-alimentação. Os consórcios metanogênicos, após desalogenação, mineralizaram os compostos. Fenol foi convertido a benzoato e posteriormente a metano e dióxido de carbono. O consórcio com bactérias redutoras de nitrato foi enriquecido com 3-CB, degradando também 4-CB e benzoato, na presença de nitrato. Observou-se também a degradação aeróbia de benzoato por esse consórcio.

3.6.3. ESTUDOS SOBRE A RIL DESALOGENAÇÃO EM REATORES COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA

Biorreatores de fluxo ascendente têm sido utilizados como sistemas de tratamento contínuo, visando explorar as atividades enzimáticas envolvidas na descloração e degradação de clorofenóis (KRUME & BOYD 1988).

DUFF et al. (1995) operaram um reator UASB, com 6L de volume e taxa de recirculação de 5,4:1, ao qual foi aplicada taxa de carregamento orgânico (TCO) de 0,40g DQO/g SSV dia, com DQO de 1.200 mg/L e tempo de retenção hidráulica de 3 dias. A única fonte de carbono e energia utilizada foi fenol, obtendo-se 95% de eficiência de remoção de DQO, 75% de metano no biogás e 5% em relação à produção teórica. Com a adição de pentaclorofenol (PCP) entre 1 e 3 mg/L, com taxa máxima de aplicação de 1mg PCP/L dia, os autores detectaram no efluente a presença de 2,3,5triclorofenol (2,3,5TCP), posteriormente 3,5diclorofenol (3,5DCP) e após 50 dias de operação 3monoclorofenol (3CP), com desempenho estável, tendo havido descloração nas posições orto e para. Em testes em batelada, com o lodo do reator como inóculo, detectou-se inibição da metanogênese a concentrações de PCP (pentaclorofenol) entre 2 e 3 mg/L, sendo que o limite para toxicidade acetoclástica esteve no intervalo de 320 a 350 µg PCP/ gSSV, para lodos não adaptados.

FLORA et al. (1994) estudaram a decomposição anaeróbia de 2,4,6-triclorofenol (2,4,6TCP), 2,4-diclorofenol (2,4DCP) e 2-clorofenol (2CP), em reator de leito de carvão fluidizado. O metabólito 4-clorofenol (4CP) apresentou difícil metabolização. Segundo os autores, o reator apresenta como vantagem a combinação de mecanismos de adsorção e biodegradação do resíduo a ser tratado. A adsorção proporcionou longos tempos de retenção do composto, tornando o reator mais estável às variações de carga e redução dos efeitos de carga de choque. Além disso, o carvão granulado foi um excelente meio suporte para os microrganismos, por possuir alta superfície específica, proporcionando o crescimento de filmes finos e densos, com grande retenção de biomassa. As concentrações estudadas atingiram 2400 mg/L, e durante todo ensaio as eficiências de remoção de DQO e fenóis não foram inferiores a 98%. A produção de metano indicou períodos de adsorção e desorção, com produção

de gás próxima à teórica. Com interrupção da adição de carvão, encerrou a remoção por adsorção, com aumento da carga aplicada ao lodo. A dispersão de 4CP nesta fase acarretou problemas de toxicidade.

A degradação de pentaclorofenol (PCP) e fenol em meio mineral, nas concentrações de 1 a 2 mg/L e 4 a 6 mg/L, respectivamente, em reator anaeróbio de leito fixo, com 250 mL de volume e inoculado com lodo de esgoto sanitário digerido, foi estudada por HENDRIKSEN et al. (1991). Um reator semelhante, que recebeu glicose foi operado simultaneamente. Os reatores foram operados com tempo de detenção inicial de 5 dias, sendo reduzido gradativamente para 2,9 dias, após 96 dias de operação. Após 6 meses de operação, o reator privado de glicose apresentou 60% de eficiência de remoção de PCP, enquanto o que recebeu glicose apresentou 98% de eficiência de remoção, com taxa de aplicação de PCP de 0,7 mg/L dia. Como produto de degradação foram detectados tetraclorofenol (TeCP) e triclorofenol (TCP) em ambos reatores, e diclorofenol (DCP) apenas no reator com glicose. A remoção de TeCP e TCP foi maior no reator que recebeu glicose. Segundo os autores, os resultados indicam que a desalogenação pode ser um processo de co-metabolismo, na qual glicose atua como substrato primário. Alternativamente, a degradação de glicose pelas bactérias fermentativas poderia prover doadores de elétrons para deslogenação reductiva.

WU et al. (1993) verificaram o desempenho de grânulos anaeróbios, originados a partir de sedimentos de locais contaminados com pentaclorofenol (PCP), na degradação de pentaclorofenol (PCP). Inicialmente, os autores determinaram a toxicidade do composto às populações metanogênicas e demais bactérias, nas concentrações entre 2,5 e 20,0 mg/L. Para grânulos não adaptados a PCP (início do teste), 2,5 mg/L do compostos levaram a efeitos inibidores, enquanto para grânulos adaptados (após 200 dias) a tolerância foi maior. A partir dos dados de toxicidade iniciais, os autores partiram para alimentação de um reator UASB, com aumento gradual na concentração de PCP, que variou de 0,5 a 36 mg/L. Utilizaram-se grânulos desenvolvidos com ácidos voláteis e de lodo enriquecido com PCP, tendo como fonte de carbono, para suportar o crescimento, acetato, propionato, butirato e metanol. Foram efetuados testes de adsorção do composto em grânulos não adaptados ao PCP, concluindo-se que parte do composto foi adsorvida na biomassa que, se adaptada, pode

degradá-lo. Contudo, a taxa de remoção abiótica foi praticamente desprezível se comparada àquela mediada por microrganismos. Em testes com PCP foi observado que cerca de 52% foram recuperados como metano, cerca de 18% com dióxido de carbono e cerca de 21% como bicarbonato e outros compostos solúveis. Após ser atingido o equilíbrio do reator, com tempo de retenção hidráulica de 10,8 horas, a taxa de degradação esteve entre 13,6 e 14,6 mg PCP/ g SSV dia, sendo a taxa máxima obtida de 18 mg PCP/g SSV dia. As taxas de aplicação de DQO estiveram entre 0,5 e 1,5 g DQO/ g SSV dia. Segundo os autores, foi necessária a avaliação da toxicidade do compostos xenobióticos nos diversos níveis tróficos. Nesse estudo, os autores mantiveram a concentração de PCP em 1,0 mg/L através da recirculação. As taxas de remoção volumétrica estiveram entre 88 e 97 mg/L dia, com 99% de eficiência de remoção de PCP. Segundo os autores essa taxa foi limitada pela configuração do reator que apresentou 70% de seu volume total como decantador.

DIETRICH & WINTER (1990) estudaram a degradação de 2clorofenol (2CP) e 2,6diclorofenol (2,6DCP), utilizando como inóculo lodo anaeróbio de esgoto enriquecido com 125 mg/L (0,975 mM) de 2CP, até que, após repetidas adições, ocorreu a degradação em 10 dias. A cultura adaptada foi utilizada para inoculação de reator de leito fixo, com areia como suporte, alimentado continuamente. Na presença de extrato de levedura e peptona, a máxima taxa de degradação foi aproximadamente 375 mg 2CP/L dia, para taxa de diluição de $0,2 \text{ d}^{-1}$ e tempo de retenção hidráulica de 5 dias, após 160 dias de operação. Com a introdução de O_2 houve inibição na degradação de fenol, sem contudo afetar significativamente a desalogenação. Quando extrato de levedura e peptona foram omitidos houve interrupção completa da desalogenação. Utilizando n-butirato como co-sustrato os autores observaram que a desalogenação e a oxidação de butirato a acetato ocorreram concomitantemente, sendo necessário 1M de butirato para 2 mM de 2CP.

WU et al. (1992) realizaram experimentos com reatores UASB alimentados com efluentes contendo organoclorados, alicíclico (PCP) e alifáticos, tetracloroetileno (PCE), visando o desenvolvimento de grânulos adaptados a esses substratos. Os autores estudaram também o passos da degradação e mineralização dos compostos, em reatores alimentados em regime de batelada. Segundo os autores, foram

necessários 200 dias para o desenvolvimento de grânulos com capacidade de degradar PCP, utilizando lodo de esgoto como inóculo. A concentração do PCP aumentou gradativamente de 0,5 a 60 mg/L, e a concentração efluente foi mantida em 0,1 mg/L. A DQO do substrato, ao qual foi adicionado PCP foi mantida em 10 g/L com adição de ácidos voláteis. Parte do lodo produzido nesse reator foi utilizada para inocular uma novo reator complementado com lodo de esgoto. A DQO e a concentração de PCP, neste reator, foram aumentadas gradativamente de 3 a 10 g/L e 0,5 a 30 mg/L, respectivamente, em período de três meses. A eficiência de remoção de DQO foi mantida em 99% e a concentração de PCP no efluente, inferior ao limite de detecção, com tempo de detenção hidráulica de 11 horas. Após dois meses de operação, ocorreu granulação completa, com aumento significativo da manta de lodo. Segundo os autores, nas condições de carregamento do teste, o sistema mostrou-se competitivo com reatores aeróbios, especialmente com altas concentrações de DQO, em função da economia de energia de aeração.

HENDRIKSEN et al. (1992) investigaram o potencial e a taxa de transformação de pentaclorofenol (PCP) em grânulos não adaptados ao composto, além de examinarem a influência da fonte de carbono na atividade desalogenante. Para tanto utilizaram dois reatores UASB, inoculados com grânulos desenvolvidos em açúcar, operados com tempo de detenção hidráulico de 3 dias, vazão de recirculação de 1:4, temperatura de 37^o C e pH entre 7,0 e 7,5. Os resultados indicaram que 75% do PCP presente no substrato (3mg/L) foi removido em 4 dias de operação, tendo sido detectados no efluente como compostos menos clorados. Os autores observaram que a presença de glicose, como doador de elétrons melhorou a atividade desclorante. Omitindo-se glicose, a taxa de transferência foi de 35%. Após o sexagésimo dia de operação, a remoção de 4,5 mg/L de PCP foi quase 100%, sendo contudo instável, uma vez que a concentração no efluente variou de 200 a 5000 µg/L. Após dez meses de operação contínua, a eficiência de remoção de PCP foi próxima a 99%, no reator que recebeu glicose. A taxa de desalogenação foi mantida próxima a 2,2 mg PCP/L reator dia. Os principais produtos observados no efluente foram diclorofenóis, enquanto no reator que não recebeu glicose, os produtos foram tetraclorofenol (TeCP) e triclorofenol (TCP). A percentagem de metano no reator que recebeu glicose variou entre 30 e 60%,

enquanto no que não recebeu glicose ficou entre 10 e 30%. Em testes efetuados em batelada, os autores concluíram que a degradação de PCP, com e sem glicose ocorreram segundo a mesma rota. Os autores sugeriram que na ausência de glicose o crescimento de biomassa foi menor, havendo portanto, menor quantidade de biomassa disponível. Contudo, em testes de batelada observaram que a descloração de PCP por unidade de biomassa foi maior na presença de glicose. Existem várias explicações possíveis para o estímulo causado pela glicose, como: fornecimento de elétrons para desalogenação, fornecimento de vitaminas e cofatores pelo consórcio que degrada glicose, ou mesmo a geração de menores potências redox, favorecendo a desalogenação.

KRUME & BOYD (1988) estudaram a descloração redutiva de compostos fenólicos clorados em reatores UASB híbridos com filtro anaeróbio. Os reatores foram inoculados com lodo de esgoto de digestor anaeróbio, adaptado por dois anos com clorofenóis ou com lodos enriquecidos com clorofenóis, separadamente. Durante o estudo, a concentração do substrato variou de 30 a 150 mg/L e tempo de retenção hidráulica de 3 a 10 dias, com eficiência de conversão mantida superior a 90%. Para o reator 1, inoculado com lodo adaptado ao meta clorofenol (3CP), com taxa de carregamento de 60 mg/L dia e tempo de detenção hidráulico de 4 dias, ocorreu a conversão de 100% de 3CP. Para o reator 2, inoculado com lodos adaptados a cada um dos monoclorofenóis, taxa de carregamento de 70 mg/L dia e tempo de detenção hidráulica de 2 dias, observou-se remoção de 100% dos três monoclorofenóis adicionados, indicando a capacidade deste sistema no tratamento de resíduos mais complexos. Adicionando-se 2,4,6triclорofenol (2,4,6TCP) ou pentaclorofenol (PCP) ao reator 2 não foi observada degradação, contrariando as expectativas dos autores, que atribuíram a falha às condições experimentais. Os autores observaram que a maior parcela de microrganismos ativos na degradação estavam presentes na manta de lodo.

3.7.DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DE CLOROFENÓIS

3.7.1.ASPECTOS GERAIS

Análises químicas desempenham papel fundamental em estudos de química ambiental, tanto no monitoramento de áreas de risco, investigações de acidentes e catástrofes na natureza, bem como outras causas de contaminações por compostos químicos (KRYLOV, 1995).

As técnicas analíticas e métodos de investigação devem ser selecionados dependendo dos objetivos e problemas do trabalho como um todo. A efetividade dos resultados das análises químicas depende de muitos fatores que vão desde a definição dos problemas, escolha de metodologias analíticas e disponibilidade de suporte metodológico e instrumental, até a experiência e habilidade dos técnicos envolvidos.

De acordo com KRYLOV (1995), o método selecionado deve apresentar seletividade razoável para o preparo das amostras, características de identificação confiável, exatidão e sensibilidade satisfatórias ao problema de interesse. Este autor cita que, na maioria das publicações na área de química, é dada ênfase às análises de substâncias ou grupos de substâncias, enquanto sua aplicação a problemas ambientais, em geral, e na solução de problemas específicos, recebem menos atenção.

Um procedimento analítico para determinação de substâncias na concentração de traços inclui os seguintes estágios: -coleta de amostra representativa; -preparação das amostras; -pré-concentração; -"clean up" para separação de substâncias interferentes; -extração; -análise instrumental, incluindo separação, identificação e determinações quantitativas dos componentes.

Vários métodos de determinação de clorofenóis têm sido empregados em amostras de águas naturais. Métodos colorimétricos, descritos no APHA (1995) não permitem a diferenciação de clorofenóis em geral. Segundo VILLOSLADA et al. (1995), a concentração total de clorofenóis tem sido determinada por espectrofotometria com U.V.-visível, usando diferentes reações cromogênicas em sistemas batelada e por FIA (flow injection analysis).

Segundo VILLOSLADA et al. (1995), a cromatografia líquida alcança limites de detecção de ng/mL e a cromatografia gasosa apresenta limites de detecção semelhantes. Contudo KRIIGSMAN et al. (1977) citam a necessidade de derivatização dos compostos, tornando-os menos polares.

A cromatografia gasosa tem sido utilizada na determinação de clorofenóis há algumas décadas. Entretanto, no início de sua utilização, alguns problemas como as altas polaridades e baixas pressões de vapor dos compostos desestimularam o uso dessa técnica (KRIIGSMAN et al. 1977). Segundo os autores, os picos obtidos eram assimétricos e a separação dos compostos, incompleta. O uso de fases estacionárias polares levou à diminuição das caudas nos picos.

Clorofenóis não apresentam propriedades muito favoráveis à cromatografia gasosa, devido sua alta polaridade e baixa pressão de vapor, causando adsorção e caudas dos picos cromatográficos. A utilização de métodos de derivatização dos compostos, transformando-os em éteres, ésteres, entre outros, têm favorecido a utilização da cromatografia gasosa (LANÇAS, 1991).

Métodos envolvendo derivatização são mais demorados, contudo os compostos formados são usualmente mais facilmente analisados por cromatografia gasosa, mais sensíveis aos detectores de captura de elétrons e permitem a limpeza mais fácil da coluna que seus precursores (LEE et al., 1984).

Segundo VILLOSLADA et al. (1995), embora técnicas cromatográficas e de eletromigração permitam altas eficiências de separação de grande número de compostos em uma única corrida, são relativamente demorados.

De acordo com DONNELLY et al. (1993), a cromatografia gasosa tem sido utilizada tanto na identificação quanto separação de amostras de origem ambiental. Colunas capilares de alta resolução e detectores seletivos têm otimizado separações e a capacidade de identificação, respectivamente.

A identificação de um composto pode ocorrer a nível comparativo com padrão, ou com a estrutura da substância. A cromatografia gasosa, associada à espectrofotometria de massa, tem emergido como rotina tecnológica extremamente importante para análises ambientais e análises confirmatórias.

Em análise cromatográfica, os componentes da amostra podem ser identificados com base em parâmetros de retenção e informações adicionais como espectrometria de massa. A identificação por este processo é feita pela comparação do espectro de massa do analito, com espectros de referência, geralmente disponíveis em bibliotecas de computadores dedicados a esse fim.

Para identificação de compostos desconhecidos, existe um número maior de complicações, como separação e extração prévias, elucidação da estrutura dos componentes e determinação quantitativa em espectrometria U.V. e I.V., além dos parâmetros de retenção que auxiliam na solução do problema.

3.7.2.DERIVATIZAÇÃO

Como citado anteriormente, a derivatização viabiliza a determinação de clorofenóis por cromatografia gasosa. O termo derivatização, em cromatografia, refere-se à transformação de um composto químico em outro, visando obter-se uma análise mais rápida, conveniente e exata. O novo composto formado, geralmente apresenta uma ou mais das seguintes vantagens em relação ao precursor: é mais facilmente extraído ou cromatografado; sua medida é mais sensível e exata; é mais facilmente separado dos interferentes (LANÇAS, 1991). Segundo KRIIGSMAN & WANDERKAMP (1977), a alteração das amostras contendo clorofenóis pode favorecer: a seletividade da extração, o poder de separação das colunas capilares e a sensibilidade do detector de captura de elétrons.

Segundo LANÇAS (1991), compostos contendo massa molecular elevada e grupos poli-funcionais não são, usualmente, adequadas às análises diretas por cromatografia gasosa. Em geral, os grupos funcionais tornam o composto muito polar e reduzem sua volatilidade, aumentando o tempo de retenção e dificultando a eluição. Compostos de alta polaridade eluídos em cromatografia gasosa, geralmente sofrem adsorção ou decomposição na coluna e no injetor, dificultando a obtenção de resultados quantitativos confiáveis.

Em alguns casos, a derivatização em cromatografia gasosa pode ser utilizada para introdução de grupos específicos, para os quais os detectores sejam mais sensíveis.

Apesar da derivatização ser uma reação que pode viabilizar uma análise, é também uma fonte potencial de erros, caso não seja realizada adequadamente. Fatores como a pureza dos reagentes e solventes, estabilidade dos derivados formados, tempo de reação, entre outros, interferem nos resultados obtidos (LANÇAS, 1991).

A derivatização dos compostos químicos pode ser realizada anteriormente ou posteriormente à sua extração em solvente orgânico. O derivado mais comumente utilizado é o éster metílico, pela reação com diazometano ou dimetil sulfato, após extração ou "cleanup". Este procedimento tem sido usado na determinação combinada de fungicidas fenólicos clorados, bactericidas hidroxiter e herbicidas clorofenoxiácidos em tecidos orgânicos, solos e água, após separação inicial em coluna de troca iônica. Metilação usando diazometano também tem sido aplicada a análises de PCP em urina, fezes, água e sedimentos, além de tecidos orgânicos (CRUZ & WELLS, 1992).

Um dos métodos utilizados na obtenção de derivados para cromatografia gasosa consiste na formação de éteres, de acordo com a reação:



Esta reação é conduzida em meio anidro porque o diazometano reage com água. Diazometano usualmente proporciona alto rendimento de ésteres e éteres, mas é instável e tóxico, pode explodir e consome tempo relativamente longo na obtenção dos derivados. Segundo CRUZ & WELLS (1992), este método apresenta boa capacidade de recuperação em amostras ambientais, contaminadas por pentaclorofenol.

Em PERRY (1981), SEIBER e colaboradores citam que optaram por éteres sobre ésteres como derivados fenólicos devido à instabilidade hidrolítica dos ésteres. A estabilidade e a relativa facilidade de formação, respostas excelentes por

captura de elétrons, tempo de retenção relativamente curtos para éteres e ésteres de pentafluorbenzil, permitiram seu uso para rápida análise qualitativa da fração fenólica de águas de rio.

Na Figura 3.2 são apresentadas as reações típicas de cloro e nitrofenóis como usadas em suas análises.

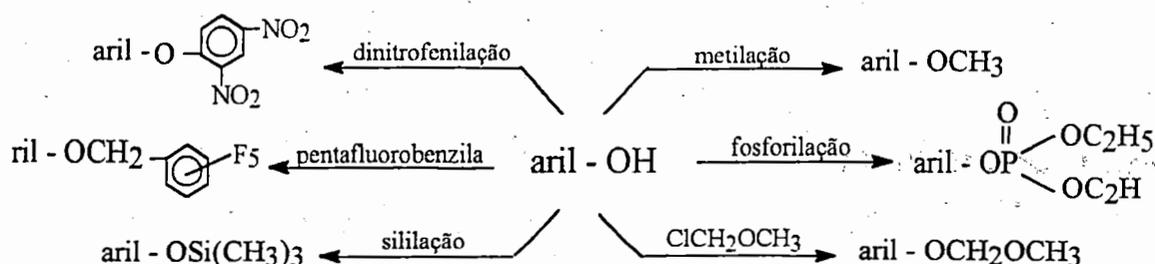


Figura 3.2. Reações típicas de cloro e nitrofenóis como usadas em suas análises (FREI LAWRENCE, 1981)

3.7.3. DETERMINAÇÃO DE CLOROFENÓIS

Nos trabalhos consultados, os métodos cromatográficos para determinação de clorofenóis foram predominantes, tendo em vista que a cromatografia é utilizada para separação das espécies presentes, fornecendo um panorama mais detalhado do composto original e seus metabólitos. Contudo, alguns autores têm utilizado o eletrodo seletivo de íons cloreto para avaliação da degradação de clorofenóis.

KRIIGSMAN & WANDERKAMP (1977) determinaram a presença de 19 clorofenóis, por cromatografia gasosa, em concentrações da ordem de ng/L. Os autores realizaram extração de 200 mL de solução aquosa com tolueno, sucessivamente, 40, 40 e 20 mL, cada um com agitação vigorosa por 1 minuto. As amostras foram posteriormente derivatizadas com 0,5 mL de anidrido acético na presença de carbonato de potássio. A mistura foi extraída com 5 mL de n-hexano e 1 µL foi injetado em

cromatógrafo a gás, equipado com detector de captura de elétrons. A reprodutibilidade dos tempos de retenção (t_r) para todos os compostos variou apenas de 1% no período de duração dos experimentos. A capacidade de recuperação variou de 80 a 100%. Os autores testaram várias condições de temperatura, com eluições isocráticas a 150 e 180°C e eluição gradiente com temperatura inicial de 95°C e temperatura final de 180°C, com taxa de 3°C/minuto. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas, respectivamente a 215 e 290°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, à vazão de 2 a 3 mL/minuto, nitrogênio como "make up", 80 a 100 mL/minuto e "split" de 0 a 60 mL/min. A separação de todos os isômeros ocorreu durante a eluição isocrática, à temperatura de 150°C, e na gradiente, com tempos de corrida, respectivamente de 17,5 e 25,5 minutos. A altura relativa dos picos foi: mono (0,5); di (15); tri (30); tetra (55) e penta (100) na eluição gradiente.

ABRAHAMSSON & XIE (1983) estudaram a determinação de clorofenóis (DCP, TCP, TeCP, PCP), por cromatografia gasosa com concentrações superiores a 1 µg/L, em águas limpas, águas residuárias e água do mar. A 4,5mL de amostras tamponadas com 0,5mL de Na₂PO₄ -0,5M adicionaram 1,00 mL de hexano e 46 µL de anidrido acético, mantendo sob agitação por três minutos. Após operação simultânea de derivatização e extração, foi injetado 1,00 µL da fração orgânica no cromatógrafo. Os autores observaram que o pH adequado para reação foi 9,0. A eficiência de extração de clorofenóis foi próxima a 100%, para relação água/hexano de 5/1. Segundo os autores, a eficiência da extração foi maior para fenóis mais clorados. A precisão e linearidade do método foi determinada utilizando-se 5 amostras para 7 concentrações diferentes, entre 1 e 1.000 ng/L. O desvio padrão permaneceu entre 1 e 8,9%, a concentrações superiores a 10ng/L e entre 10 e 20% a concentrações entre 1 e 5ng/L. O coeficiente de correlação foi de 0,999 para cada um dos clorofenóis. Durante testes de recuperação, os autores obtiveram resultados superiores a 90%

LEE et al. (1984) analisaram 15 clorofenóis em águas naturais, utilizando acetilação "in situ" e determinação por cromatografia gasosa, com detector de captura de elétrons. Como gás de arraste foi utilizado mistura de metano e argônio (5:95). Foram testadas 3 colunas: 2 empacotadas e 1 capilar, com 12m de comprimento e diâmetro de 0,2mm. As condições de injeção para coluna capilar foram: temperatura

inicial de 70°C, mantida por 30 segundos, taxa de 10°C/minuto até 120°C, mantida por 5 minutos e taxa de 2°C/minuto até 160°C. A velocidade linear foi de 25 cm/s, com "split" de 0,5. Para extração foram utilizados 1L da amostra, em fase aquosa, 5,0g de KHCO₃, e após dissolução, 5mL de anidrido acético e éter de petróleo, mantido entre 30 e 60°C. Foi mantida agitação lenta até evolução de CO₂, passando para agitação vigorosa por 60 minutos, sendo feita posteriormente separação das fases. Foi feito "clean up" das amostra utilizando-se mini-colunas de vidro, com lã de vidro silanizada e cobertura de Na₂SO₄ anidro. A amostra, juntamente com isoctano foi colocada na coluna pré-umidecida com hexano. A eluição foi efetuada com hexano:tolueno, 50:50, após lavagem da coluna. A fração coletada foi diluída e injetada no cromatógrafo. As eluições isocráticas a 150 e 130°C não forneceram resultados satisfatórios, ocorrendo "overlapping" e alargamento dos picos, respectivamente. Em estudo de recuperação da amostra, houve recuperação de 90 a 105%, para concentrações entre 0,1 e 10ppb. Segundo os autores, o método, de fácil aplicação e com boa reprodutibilidade, aplicou-se às concentrações entre 0,01 e 100 ppb.

JENKINS & BAEYAH (1993) avaliaram métodos de extração e derivatização de amostras contendo PCP, com concentrações da ordem de µg/L, para análises por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa. As amostras originaram-se de águas de rios, sedimentos, solo, lodos, etc. Compararam-se a extração em fase líquida, utilizando tolueno, hexano e diclorometano, com extração em fase sólida. A capacidade de recuperação dos solventes orgânicos permaneceu entre 64 e 73%, sendo menor para o tolueno e maior para o diclorometano. O "clean up" das amostras, com base e ácido sucessivamente, demonstrou perda de PCP, principalmente com a utilização de tolueno. Extração por arraste de vapor em fase sólida, levou à recuperação de 91%, em 4 horas. Para sedimentos, a recuperação foi de 101 +/- 2,2%, em 16 horas, utilizando 50g de material, dopado com 20ppb de PCP em acetonitrila, 500mL de água, pH 1,00 e 25 mL de hexano.

CRUZ & WELLS (1992) estudaram a determinação de PCP, em lodos de esgoto e águas residuárias, por cromatografia gasosa após derivatização. Os autores testaram derivatização com pentafluorbenzil, após extração com diclorometano, metilação com diazometano e acetilação com anidrido acético. A derivatização com

pentafluorbenzil foi considerada imprópria, devido à presença de interferentes, mesmo após "clean up" das amostras. Embora a acetilação com anidrido acético tenha produzido recuperação aceitável de PCP e tenha sido reprodutível, houve muita dificuldade para determinação do PCP. Além dos problemas de manipulação, devido ao elevado volume de amostra requerido, as perdas pela liberação de CO₂, a presença de numerosos picos, correspondentes a compostos polares extraídos, interferiu na medida dos clorofenóis. Segundo os autores, a contaminação veio do anidrido acético, que exigiria cuidados na purificação. A metilação com diazometano, que apresenta dificuldade e periculosidade de manipulação, foi substituída pela utilização de iodeto de metila. 200µL de iodeto de metila e 200µL de hidróxido de amônio tetrabutyl foram adicionados, simultaneamente, a 1,00 mL de solução de PCP em hexano. A mistura foi aquecida a 40°C por 90 minutos. A fração orgânica foi seca e ressuspensa em isoctano. Os autores observaram que os passos desta derivatização precisaram ser seguidos rigorosamente, sob pena de não ocorrer a reação. Observou-se também grande número de picos desconhecidos, devido a impurezas contidas no agente derivatizante. Os autores testaram a extração de água do mar com n-pentano e de partículas sólidas com mistura de hexano/acetona (40:60), com adição de ácido sulfúrico, com iodeto de metila, como agente derivatizante, como descrito anteriormente. Não houve necessidade de "clean up" das amostras. A metilação mostrou ser o processo de derivatização mais eficiente. Contudo, a precisão na execução do método foi adequada, levando à recuperação de cerca de 70% e desvio padrão de 10%, indicando boa reprodutibilidade.

TAN (1992) comparou a extração de amostras naturais, contaminadas com organoclorados em concentrações entre 1 e 5 µg/L, em fase sólida, octadecil (C18), sílica porosa e em fase líquida com hexano e freon (triclorofluoretano). A recuperação durante utilização de C18 foi, em média, de 80%, enquanto a extração em fase líquida foi superior a 90%. Segundo o autor, o "clean up" das amostras utilizando Florisil, melhorou as respostas obtidas.

Através do método do eletrodo seletivo pode-se medir a desalogenção, como observou com sucesso O'KEILLY & CRAWFORD (1989), o que não foi observado por BARBIERE (1994), que teve suas tentativas de determinação frustradas por este método.

MADSEN & AAMAND (1991); LARSEN et al. (1991); HENDRIKSEN et al. (1992) utilizaram cromatografia gasosa para analisar compostos fenólicos halogenados. O modelo do cromatógrafo utilizado foi HP 5890, equipado com detector de captura de elétrons. As concentrações testadas foram da ordem de mg/L, com limite de detecção de $\mu\text{g/L}$.

MADSEN & AAMAND (1991) utilizaram também detector de ionização de chama. A coluna utilizada por esses autores foi capilar com sílica SPB-5, de fabricação Supelco, com espessura do filme de 1,5 μm , diâmetro de 0,53 mm e comprimento de 15m. As condições de análise foram: Vazão de N_2 de 20mL/min; temperatura de injeção de 275 °C, temperatura do detector 320°C; temperatura da coluna mantida por 2 minutos em 120 °C e aumentada até 230°C, a 20 °C por minuto. A identificação dos compostos foi confirmada por espectrômetro de massa, acoplada ao cromatógrafo. As amostras foram tratadas com tetraborato dissódico decahidratado, acetiladas com 40 μL de anidrido acético e extraídas com 2,00 mL de pentano.

LARSEN et al. (1991) utilizaram coluna Megabore DB-5, com diâmetro de 0,53 mm e comprimento de 15m. As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente, de 250 e 285 °C. N_2 foi utilizado como gás de arraste e "makeup", com vazões de 15 e 45 mL/min, respectivamente. A coluna foi operada em condições gradientes, iniciando a 115 °C, aumentando para 180°C, a 15 °C por minuto e até 250°C, a 10 °C por minuto, com período isotermal de 5 minutos até o final. O limite de detecção foi de 5 ppb. As amostras foram diluídas com tampão Na_2HPO_4 , com pH 8,3; acetiladas com anidrido acético e extraídas com n-pentano. Os frascos foram agitados vigorosamente por 1 min antes da remoção da fase orgânica para análise. O método mostrou insensibilidade para monoclórofenóis. Fenol foi determinado por cromatografia líquida.

HENDRIKSEN et al. (1992) centrifugaram as amostras e, anteriormente à derivatização adicionaram, a 0,3 mL da amostra, 2,55 mL de Na_2HPO_4 (0,0588mM), com pH 9 e 0,15 mL de padrão interno (2,4,6TBP). 20 μL de anidrido acético e 1 mL de pentano foram adicionados à mistura, que foi agitada vigorosamente por 1 minutos. 2 μL da amostra foram utilizados para injeção. O método mostrou insensibilidade para o monoclórofenóis.

NICHOLSON et al. (1992) as concentrações de clorofenóis, da ordem de mg/L, utilizando cromatografia gasosa. O equipamento utilizado foi HP5890 II, equipado com detector de captura de elétrons. A coluna utilizada foi DB-5, com 0,323mm de diâmetro e 30m de comprimento. Como gás de arraste foi utilizado hélio e como gás auxiliar, mistura de argônio e metano (95:5). A condição de temperatura utilizada foi: inicial de 45°C, mantida por 2 minutos, aumentando à taxa de 15°C/minuto, até 105°C, e à taxa de 5°C/ minuto até 215°C, sendo mantida por 5 minutos. Para separação dos isômeros de tetraclorofenol e triclorofenol, foi feita modificação na condição de temperatura, sendo a taxa de 1°C/minuto utilizada no intervalo entre 105 e 150°C, seguindo a 5°C/ minuto até a temperatura final de 215°C.

VIDAL et al. (1994) determinaram pesticidas organoclorados presentes em água por cromatografia gasosa, utilizando detector de captura de elétrons. N₂ foi utilizado como gás de arraste e para "make up". Os autores compararam a extração de pesticidas organoclorados, presentes em água, através de extração em fase sólida e líquida, observando que a extração em fase sólida, utilizando coluna C-18 foi mais eficiente. Contudo, concluíram que para extração em águas residuárias, o método de extração com solvente é mais adequado.

MIKESELL & BOYD (1986) e WU et al. (1993) determinaram a concentração de clorofenóis por cromatografia líquida de alta resolução, equipados com detector de UV. As colunas utilizadas foram C-18 de 4,6 mm de diâmetro por 25 cm de comprimento. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e 5% de ácido acético em solução aquosa, variando de 70:30 a 45:55, com vazão de 2,0 mL/min. WU et al. (1993), adicionaram a 1 mL de amostra 0,5 mL de acetonitrila em agitador e centrifugaram por 5 minutos a 5500 rpm. As amostras foram filtradas em seringa com filtros de 0,45µm.

BARBIERE (1994) manteve as amostras, contaminadas com PCP, à temperatura de -20 °C, acidificadas com HCL. Após descongelamento das amostras adicionou-se 10 mg de octano, com pico de referência interna para cromatografia gasosa. As amostra foram transferidas para um funil de separação de 125 mL. A extração das amostras foi feita por três vezes, com volumes iguais de cloreto de metila, resultando em fase orgânica e fase aquosa. A fase aquosa foi extraída com o mesmo solvente. A remoção de 40 mL do extrato deu-se pela adição de sulfato de sódio anidro.

Procedeu-se a transferência da fase orgânica contendo compostos fenólicos (aproximadamente 10 mL) para balão volumétrico. Adicionou-se solvente para lavagem do sulfato de sódio da amostra, que foi concentrada para 2,5 mL.

4. INSTALAÇÕES, TÉCNICAS EXPERIMENTAIS E MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1. ASPECTOS GERAIS

A degradação anaeróbia de PCP foi pesquisada através da operação em paralelo de dois reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), preenchidos com espuma de poliuretano contendo lodo, previamente exposto ao PCP. O reator maior tinha volume de 1.991 mL e o menor 296 mL.

As etapas experimentais da pesquisa compreenderam, inicialmente, a adaptação de métodos e técnicas para permitir a identificação e quantificação dos compostos fenólicos clorados, isto é, do pentaclorofenol (PCP) originalmente presente no substrato e os metabólitos clorados, resultantes do processo bioquímico de descloração reductiva: tetraclorofenol (TeCP), triclorofenol (TCP) e diclorofenol (DCP).

A determinação cromatográfica dos clorofenóis exigiu o estabelecimento de condições adequadas, que permitissem otimizar a separação dos clorofenóis em PCP, TeCP, TCP e DCP. Não foi possível detectar monoclorofenóis e a determinação de isômeros foi dificultada, pela indisponibilidade de padrões específicos.

As condições para a extração de PCP do substrato tiveram também que ser estabelecidas, considerando-se: a escolha do extrator; diferentes relações entre volume de amostra e extrator; adição de auxiliares de extração, bem como técnicas de manipulação das amostras. As melhores condições de extração foram estabelecidas em testes de recuperação dos clorofenóis, a partir do substrato e testes de reprodutibilidade. Foram testados também diferentes métodos de derivatização dos clorofenóis, visando torná-los adequados ao processo cromatográfico.

Em vista da possibilidade de decaimento na concentração de PCP entre o período de preparo das soluções e sua utilização na alimentação dos reatores, foram realizados testes com substrato, imediatamente após sua preparação e após 12 e 48

horas. Foram feitos testes também para avaliação de decaimento de PCP em amostras durante seu armazenamento em “freezer”.

O desempenho dos reatores foi avaliado em função da remoção de matéria orgânica, expressa como DQO (Demanda Química de Oxigênio), concentração de ácidos voláteis no efluente, pH e alcalinidade a bicarbonato no afluente e efluente, relacionados à aplicação de PCP aos mesmos.

A avaliação do desempenho dos reatores na remoção de PCP foi baseada nas concentrações afluentes e efluentes de PCP e nas efluentes de metabólitos, além, de amostragens realizadas ao longo dos reatores, determinando-se os perfis de clorofenóis.

A Figura 4.1, apresentada a seguir, mostra as etapas experimentais cumpridas nesta pesquisa.

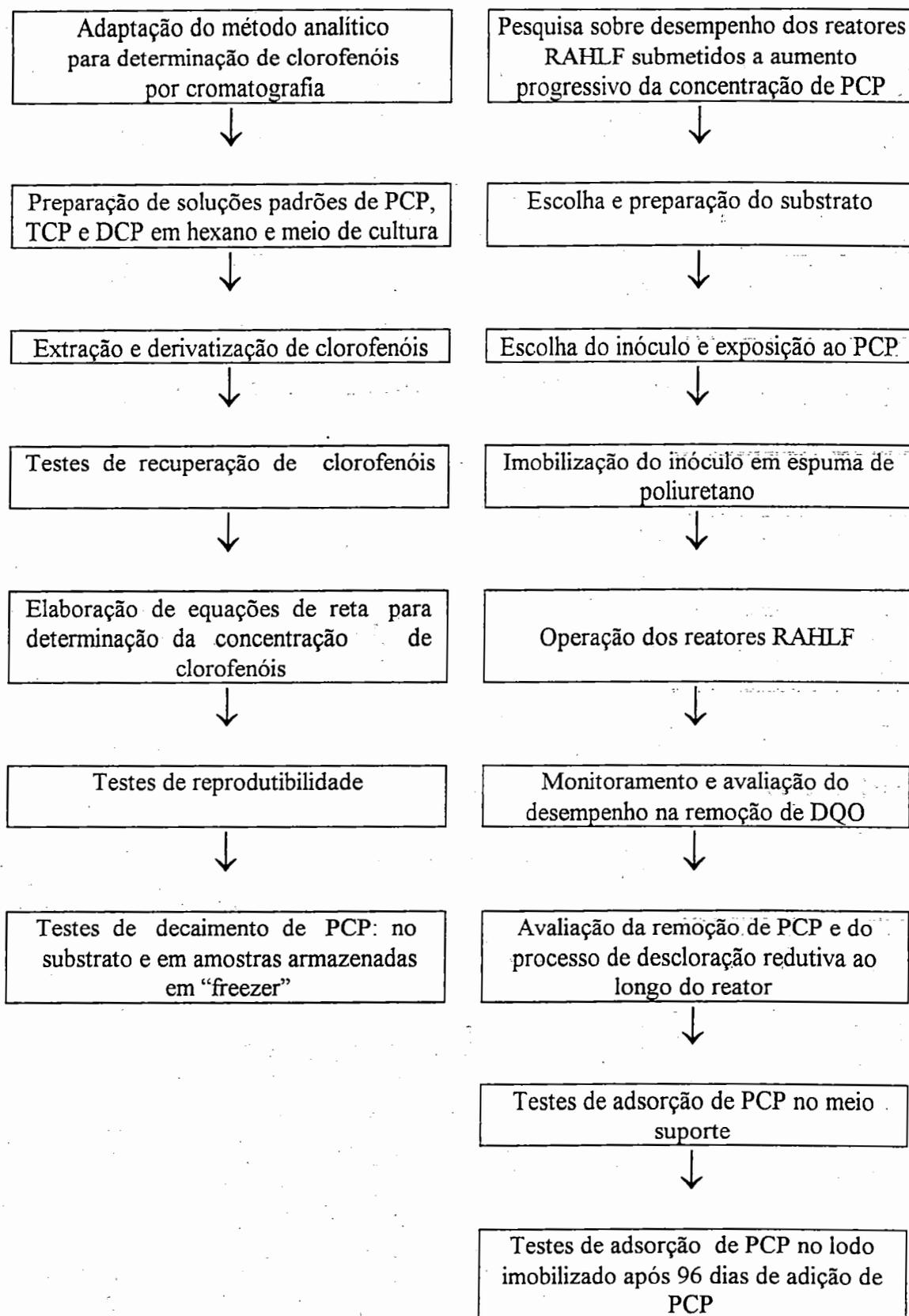


Figura 4.1. Etapas experimentais efetuadas durante esta pesquisa

4.2. TESTES CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROFENÓIS

4.2.1. ASPECTOS GERAIS

Para determinação de clorofenóis foi utilizado cromatógrafo a gás HP5890 série II, equipado com detector de captura de elétrons (ECD). Durante o experimento foram utilizadas duas colunas: SBP-5 com 0,22 mm de diâmetro e 30m de comprimento e SBP-5 com 0,53mm de diâmetro e 30m de comprimento. A coluna com diâmetro menor foi utilizada na realização de testes preliminares, cujos resultados não serão apresentados. Nos testes, citados nesta tese, utilizou-se coluna com diâmetro 0,53mm, vantajosa sob alguns aspectos, tendo em vista o meio complexo em que os organoclorados estavam presentes.

Como gás de arraste utilizou-se hidrogênio, à vazão de 8 mL/min, e nitrogênio como 60 mL/min. Utilizou-se sistema "split", em que apenas 1/12 da amostra injetada era conduzida à coluna.

Foram utilizados padrões de clorofenóis ultra-puros, fornecidos pela Supelco.

Os testes cromatográficos realizados, foram:

- 1- Teste de recuperação de PCP do substrato em função do número de extrações sequenciais;
- 2- Teste de recuperação de clorofenóis do substrato, comparando-se com soluções padrões em hexano;
- 3- Verificação do intervalo de linearidade e elaboração de equações relacionando concentrações de clorofenóis em função das áreas dos picos dos cromatogramas.
- 4- Teste de reprodutibilidade de extração e injeção de soluções de PCP no substrato;
- 5- Verificação do decaimento da concentração de PCP no substrato, no intervalo entre preparação e aplicação aos reatores;
- 6- Avaliação do decaimento da concentração de PCP em amostras armazenadas em "freezer".

4.2.1.1. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES

Para realização dos testes cromatográficos, foram feitas soluções com concentrações conhecidas de PCP, TCP e DCP no substrato. Esta prática teve como objetivos eliminar a necessidade de correção da capacidade de extração, de concentração das amostras, bem como minimizar eventuais interferências do substrato. As soluções estoque dos clorofenóis, nas concentrações de 10 g/L cada um, foram feitas em etanol.

As soluções de clorofenóis no substrato foram preparadas pela adição das soluções etanólicas de clorofenóis para obtenção das concentrações desejadas.

Para determinações cromatográficas, as amostras foram extraídas em hexano e derivatizadas com diazometano, de acordo com metodologia descrita a seguir.

Na avaliação da capacidade de extração do método proposto foram comparados os resultados obtidos com soluções em hexano e extratos do substrato em hexano, que eram derivatizadas com diazometano.

4.2.1.2. CONDIÇÕES DE TEMPERATURA UTILIZADAS

Para realização dos testes cromatográficos de: -testes de recuperação de PCP, -teste de reprodutibilidade de extração, -verificação do decaimento de PCP no substrato anteriormente à aplicação nos reatores e nas amostras armazenadas utilizou-se a seguinte condição de temperatura: temperatura inicial (t_i) de 210°C, taxa de incremento (r) de 5°C/minuto e temperatura final (t_f) de 220°C, mantida por 10 minutos. Nesses testes objetivou-se apenas a determinação de PCP, tendo sido desnecessária a utilização da condição que permitisse a separação dos diferentes clorofenóis, ausentes das soluções.

Para os testes de: -recuperação de clorofenóis e verificação do intervalo de linearidade, -preparação das equações de concentração relacionada às áreas dos picos e durante operação dos reatores foi utilizada a seguinte condição de temperatura: temperatura inicial (t_i) de 90°C, taxa de incremento (r) de 5°C/minuto e temperatura final (t_f) de 200°C, mantida por 15 minutos, com tempo de corrida de 37 minutos. Esta

condição de temperatura foi utilizada por permitir a separação dos diferentes compostos de clorofenóis presentes nas amostras.

4.2.1.3. METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO DE CLOROFENÓIS

Vários métodos de extração foram testados, variando-se o extrator orgânico, o pH, bem como a relação do volume de amostra e extrator. Além disso, testou-se a utilização de sais que favorecessem a extração de clorofenóis pela fração orgânica. Para derivatização foram testados: anidrido acético e solução etérea de diazometano. Somente a alternativa que forneceu os melhores resultados será citada.

A 6,0 mL das amostras contidas em tubos de ensaio adaptáveis à centrífuga foram adicionados 900 mg de NaCl, 2 gotas de solução concentrada de H₂SO₄ e 2,0 mL de hexano grau HPLC.

As misturas foram agitadas, durante 1 minuto, em agitador orbital de tubos Pachame PA162, com rotação máxima e posteriormente centrifugadas a 16.000 rpm por 5 minutos, para efetivar a separação da fração orgânica da aquosa.

1,0 mL da fração orgânica límpida foi transferido para tubos de ensaio específicos com marca de 1,0 mL, ao qual adicionou-se 1,0 mL de solução etérea de diazometano, preparada de acordo com CASEY et al. (1990).

Os tubos foram mantidos fechados por 40 minutos, então, as soluções foram submetidas à evaporação sob fluxo de nitrogênio, até obter-se o volume de 1,0 mL. 1 µL destas soluções foi injetado no cromatógrafo.

A concentração das amostras visou favorecer a recuperação das pequenas concentrações de metabólitos presentes no efluente.

4.2.2. TESTE DE RECUPERAÇÃO DE PCP DO SUBSTRATO EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS

Este teste foi realizado visando otimizar a técnica de extração, uma vez que, embora o aumento de extrações sequenciais possa levar ao aumento da

recuperação do PCP, há o risco de se cometer erros devido ao aumento da manipulação das amostras.

As comparações foram feitas utilizando-se extração única de 6,0 mL de amostra com 2,0 mL de hexano e de 6,0 mL de amostra com duas extrações consecutivas de 1,0 mL de hexano.

Utilizaram-se soluções de 0,4; 4,0 e 10 mg/L de PCP, com extrações em triplicata.

4.2.3. TESTE DE RECUPERAÇÃO DE CLOROFENÓIS DA SOLUÇÃO DE SUBSTRATO

O teste de recuperação de clorofenóis do substrato foi feito a partir da utilização de padrões de PCP, 2,3,5TCP e 3,5DCP.

As áreas obtidas nos cromatogramas para soluções feitas diretamente em hexano foram comparadas com aquelas feitas em substrato e extraídas em hexano, de acordo com técnica citada no item 4.2.1.3.

As concentrações utilizadas de cada um dos clorofenóis foram: 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/L. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4. VERIFICAÇÃO DO INTERVALO DE LINEARIDADE E PREPARAÇÃO DE EQUAÇÕES, RELACIONANDO CONCENTRAÇÃO DE CLOROFENÓIS E ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS

Para realização dos testes de adsorção de clorofenóis no lodo imobilizado e avaliação da capacidade de extração e acompanhamento da degradação de PCP nos reatores foram elaboradas equações, relacionando áreas dos picos cromatográficos e concentrações de clorofenóis.

Os testes de reprodutibilidade de extração de PCP, avaliação do armazenamento das amostras, decaimento da concentração entre preparo e alimentação dos reatores e adsorção ao meio suporte, foram realizados testes exclusivamente com soluções de PCP como clorofenol, dispensando o longo gradiente de temperatura usado



para separação dos demais clorofenóis. Foi necessário elaborar equações, a partir de dados obtidos com as mesmas características de realização dos testes: $T_i = 210^{\circ}\text{C}$; $T_f = 220^{\circ}\text{C}$; taxa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mantida por 10 minutos.

Para acompanhamento da degradação de PCP nos reatores RAHLF foram preparadas soluções de substrato, contendo quantidades conhecidas de clorofenóis, extraídas de acordo com metodologia citada no item 4.2.1.3. e determinadas segundo a condição de temperatura: $T_i = 90^{\circ}\text{C}$; $T_f = 200^{\circ}\text{C}$; taxa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mantida por 15 minutos. Equações de reta foram formuladas a partir das médias das áreas dos picos obtidos para cada concentração em função das concentrações.

4.2.5. TESTE DE REPRODUTIBILIDADE DE EXTRAÇÃO E INJEÇÃO

Este teste apresentou grande importância para realização dos demais experimentos, tendo em vista as pequenas concentrações estudadas e a necessidade de confiabilidade dos resultados obtidos durante operação dos reatores.

Foram feitos padrões de 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 mg/L de PCP, de acordo com descrito no item 4.2.2.1. Para cada uma das concentrações, foram efetuadas 6 extrações, visando avaliar a reprodutibilidade na extração das amostras.

b não vai 5? olha pag 50

4.2.6. TESTE DE DECAIMENTO DO PCP NO SUBSTRATO

Este teste foi realizado para que fosse avaliada a permanência do PCP na solução de substrato, desde sua preparação até sua transferência aos reatores.

Foram utilizadas soluções padrão, nas concentrações de 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 mg/L de PCP.

Foram retiradas amostras nos tempos: inicial (t_0); após 12h (t_1); após 36h (t_2) e após 48h (t_3). Foram realizadas triplicatas de extração para cada concentração estudada.

4.2.7. AVALIAÇÃO DO DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE PCP EM AMOSTRAS ARMAZENADAS EM "FREEZER"

O teste foi efetuado para que pudesse ser avaliada a possibilidade de armazenamento das amostras, para posterior análise.

Foram efetuados testes em triplicata com soluções nas concentrações teóricas de 0,4; 4,0 e 10,0 mg/L de PCP, representando o intervalo de concentrações utilizado durante operação dos reatores.

Realizaram-se análises das amostras recém preparadas e após 36 horas de congelamento.

4.3. DEGRADAÇÃO DE PCP E SUA INFLUÊNCIA NOS REATORES RAHLF

4.3.1. REATORES UTILIZADOS

Conforme citado anteriormente, foram utilizados dois reatores anaeróbios horizontais de leito fixo:

Um dos reatores utilizados apresentou volume total (V_t) de 1.991 mL; volume útil (V_u) de 1.735 mL, com comprimento (L) de 995 cm e diâmetro (D) de 5 cm, com relação L/D correspondente de aproximadamente 20. O reator foi dotado de 4 pontos intermediários para amostragem, espaçados entre si e das extremidades, de 20 cm. O reator apresentou sistema coletor de gás, contudo, a separação do gás/líquido era efetuada externamente.

O reator foi preenchido com 1.040 mL (20,8g) de espuma de poliuretano, no formato de cubos com 0,3cm de lado, impregnados com 500mL de inóculo, com concentração de Sólidos Voláteis (SV) de 25mg/L. O volume de vazios mantido no reator foi de aproximadamente 690 mL, considerando-se porosidade no leito de 40%.

A vazão média afluente ao reator foi mantida próxima a 650mL/dia, correspondendo ao tempo de detenção hidráulica de 25 horas. O reator foi instalado em câmara com temperatura controlada de 30 +/- 3°C.

$$\theta_h = \frac{690 \text{ mL}}{650 \text{ mL/dia}} \Rightarrow 1,06 \text{ dia} = \underline{25 \text{ horas}}$$

O outro reator utilizado apresentou as seguintes dimensões: comprimento (L) de 52cm; diâmetro (D) de 2,7cm, com volume de 296 mL, com relação L/D de 19. O volume de vazios foi de aproximadamente 120 mL, considerando-se porosidade do leito de 40%. Para inoculação foram utilizados 180mL (3,6g) de espuma, impregnados de 90 mL de lodo com SV de 25 g/L. Os pontos de amostragem, utilizados para purga do biogás eram dois: um a 20 cm da entrada e outro próximo à saída.

O reator foi operado com vazão média de 120mL/dia, correspondendo à 24 horas de tempo de detenção hidráulica até o 9^o dia de operação e 140 ml/dia até o 17^o dia. Então, a vazão média passou a ser de 160 mL/dia, e o tempo de detenção foi reduzido para 18 horas.

O reator foi mantido em câmara termostaticada com temperatura de 30 \pm 3^oC.

Para partida dos reatores procedeu-se ao aumento gradativo de carga orgânica, iniciando-se com concentração de matéria orgânica no substrato, avaliada como DQO, de 1.000 mg/L até atingir 2.800 mg/L. O desempenho do reator foi avaliado pela determinação de parâmetros físico-químicos como DQO afluente e efluente; ácidos voláteis; pH; composição do biogás, bem como por exame microscópico do lodo.

A partir da estabilização dos reatores, nas condições desejadas, iniciou-se a adição de PCP ao meio de cultura.

Na Figura 4.2 apresentam-se os esquemas dos reatores.

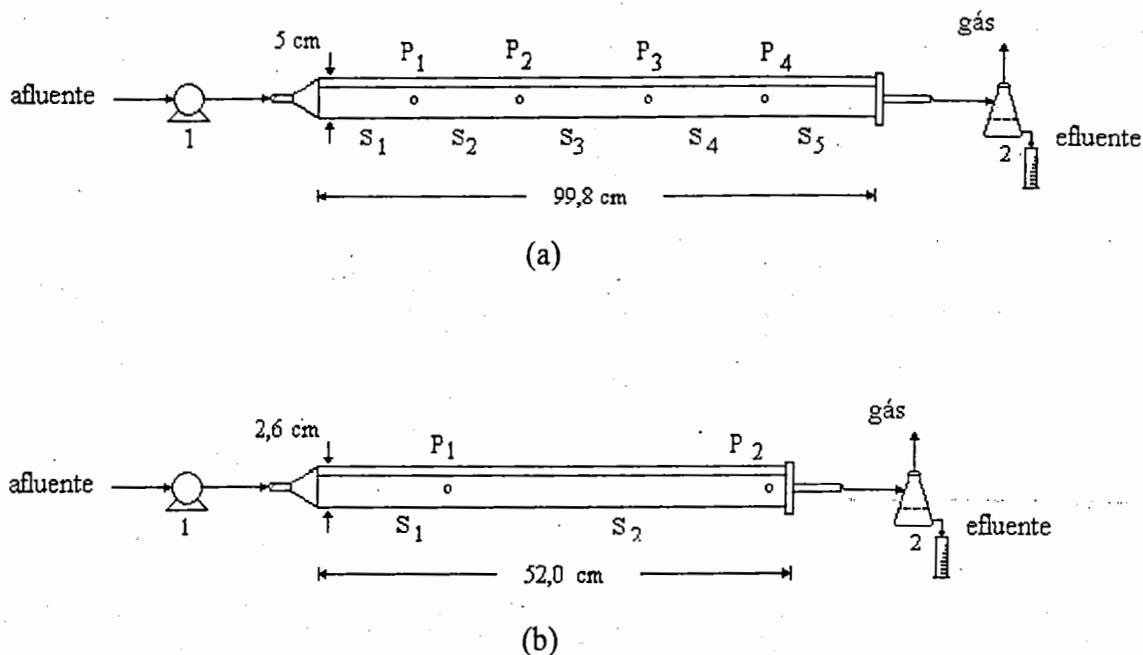


Figura 4.2 - Esquema dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF):

(a) RAHLF₁; (b) RAHLF₂. P: ponto de amostragem; S: seção do reator; 1: bomba peristáltica; 2: separador externo de gás/líquido.

4.3.2. INÓCULO

De acordo com a literatura consultada, observa-se grande variação na escolha dos inóculos para os testes de degradação de compostos orgânicos halogenados, exigindo estudos comparativos.

Para este estudo, optou-se pela utilização de composição de inóculos de diversas fontes, visando maior diversidade de microrganismos, aumentando as chances de degradação de clorofenóis. As fontes escolhidas foram:

- 1-Lodo de reator anaeróbio de fluxo ascendente, em escala de laboratório, alimentado com resíduo de suinocultura, escolhido em função da elevada eficiência de remoção de DQO, presente no substrato em estudo;
- 2-Lodo de Estação de Tratamento de Efluentes, que recebe efluentes sanitários e industriais da cidade de São Paulo, pela diversidade de efluentes que recebe;

3-Lodo de sistema aeróbio (lodos ativados) de indústria de papel e celulose, pelo recebimento de efluentes de branqueamento de papel, contendo compostos haloaromáticos;

4-Sedimento de rio, em local contaminado com resíduos de indústria de papel e celulose, pela possibilidade de desenvolvimento de biomassa anaeróbia adaptados aos compostos haloaromáticos;

5-Lodo de reator UASB de indústria de reciclagem de papel, pela presença de bactérias redutoras de sulfato, possivelmente envolvidas na degradação de haloaromático, bem como pela sua formação granulada;

6-Lodo de reator de manta de lodo (UASB) em escala piloto, tratando efluentes sanitários, devido sua capacidade de degradação de matéria orgânica;

7-Lodo de reator alimentado semi-continuamente, que recebeu adições de PCP até 10 mg/L, por apresentar capacidade de degradar PCP, de acordo com Bolaños(1996).

As percentagens na mistura inicial foram de 20%, em massa, para mistura dos lodos 1 ao 5. Esta mistura foi mantida em três reatores de 4,0L cada um, contendo 1.000mL da mistura de lodos, com concentração de final de 25g/L de SV, e 2,5L de substrato, repostos quinzenalmente, com auxílio de bomba peristáltica, após sifonamento do sobrenadante. Dois dos reatores receberam durante 6 meses, adições quinzenais de 0,2mg/L de PCP, correspondendo a 2,0 $\mu\text{gPCP/gSSV}$. Um terceiro reator, utilizado como controle, não recebeu PCP. Avaliação quinzenal do desempenho dos reatores foi baseada nas determinações de DQO e ácidos voláteis no sobrenadante e de gases no biogás.

Após esse período, nova mistura de lodos foi efetuada, tendo em vista o aspecto deteriorado do lodo, e a diminuição de eficiência de degradação de matéria orgânica, observados nos reatores que receberam PCP e no reator de controle.

A nova mistura foi composta, em massa, por: 35% da mistura de lodos citada (1 a 5); 30% do lodo citado no item 6 e 35% do lodo citado no item 7.

A nova mistura recebeu 0,2mg/L de PCP por 2 meses, mantendo-se a taxa de aplicação em 2,0 $\mu\text{gPCP/gSSV}$, até a inoculação dos reatores RAHLF, realizada após cerca de 60 dias. A alimentação dos reatores passou a ser semanal e as análises para avaliação do desempenho dos reatores continuaram a ser quinzenais.

4.3.3. IMOBILIZAÇÃO DOS LODOS UTILIZADOS NOS REATORES

A imobilização das células foi realizada segundo metodologia descrita por ZAIAT et al. (1994). O meio suporte utilizado foi espuma de poliuretano, com densidade de 20 Kg/m^3 , cortada em cubos de aproximadamente 3mm de lado. A mistura de lodos, citada no item anterior, foi peneirada para adequação das dimensões das partículas.

Para inoculação do reator de maior volume, foi utilizado um recipiente de 5.000mL, com 20,8g de espuma e 500 mL de lodo, com SSV próximo a 25 g/L .

O reator menor foi inoculado com 180mL (3,6g) de espuma e 90 mL de lodo, com SSV aproximadamente de 25 g/L , mantidos em recipiente de 1.000 mL.

Os conteúdos dos recipientes foram mantidos em repouso, com temperatura controlada de 30°C , por 12 horas.

Após drenagem do excesso de líquido, a espuma impregnada de lodo foi disposta nos reatores.

4.3.4. SUBSTRATO

O substrato eleito para os testes de degradação de PCP foi baseado no meio de cultura descrito por ANGELIDAKI (1990), modificado pela adição de fontes de carbono: ácidos fórmico e acético e sacarose; solução redutora de sulfeto de sódio e complementação com extrato de levedura.

Esta formulação proposta visou favorecer todas as populações presentes, que pudessem estar envolvidas na degradação do PCP.

Na Tabela 4.1 é apresentada a composição do substrato utilizado durante a fase de manutenção dos microrganismos, em reatores alimentados semi-continuamente e na alimentação dos reatores RAHLF.

O substrato foi preparado como descrito a seguir: ao meio basal foram adicionadas as soluções tampão e redutora, a solução de fontes de carbono, a de extrato de levedura e a de vitaminas. A adição de PCP foi efetuada no final da formulação.

O substrato para reposição nos reatores alimentados semi-continuamente foi utilizado imediatamente após sua preparação. A concentração de matéria orgânica no substrato foi mantida em 1.000 mg/L, quantificada como DQO.

Para alimentação dos reatores RAHLF, o substrato foi preparado a cada dois dias, e a reposição nos reatores, diariamente. A parcela a ser utilizada no segundo dia foi mantida sob refrigeração, até sua utilização. A concentração de matéria orgânica, quantificada como DQO aumentou gradativamente, de 500 em 500 mg/L, iniciando com 1.000 e atingindo 3.000 mg/L, durante a partida dos sistemas, com duração de 1 mês. Neste período, omitiu-se a solução de vitaminas do meio. A partir desse período, iniciou-se a adição gradual de PCP, com relação DQO/PCP, nos reatores, variando, ao longo do experimento de 14.000/L a 350/L, para máxima concentração de PCP utilizada.

to
ou
armado(?)

Tabela 4.1.- Composição do substrato

Constituintes	Concentração das soluções estoques (g/L)	Concentração no substrato (mg/L)
Meio basal (A+B+C)*		
Solução macro (A)		
NaCl	2,300	100,0
MgCl ₂ . 6H ₂ O	2,300	100,0
CaCl ₂ . 6H ₂ O	1,500	50,0
(B) fonte de nitrogênio e potássio		
NH ₄ Cl	0,45	400,0
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0,45	400,0
Solução de metais e selenito (C)		
FeCl ₂ . 4H ₂ O	* 2,000	1,70
H ₃ BO ₃	0,050	0,044
ZnCl ₂	0,050	0,044
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,038	0,033
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,050	0,044
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O	0,050	0,044
AlCl ₃	0,050	0,044
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,050	0,044
NiCl ₂ . 6 H ₂ O	0,092	0,080
Etilenodiaminatetracetato	0,500	0,44
HCl concentrado	1,00 mL	
Na ₂ SeO ₃ . 5 H ₂ O	0,100	0,090
Solução de vitaminas. (MADSEN & AAMAND, 1991)		
D-biotina	2 x 10 ⁻³	9 x 10 ⁻³
Ácido Fólico	2 x 10 ⁻³	9 x 10 ⁻³
Riboflavina	5 x 10 ⁻³	22 x 10 ⁻³
Hidrocloreto de tiamina	5 x 10 ⁻³	22 x 10 ⁻³
Cinocobalamina	5 x 10 ⁻³	22 x 10 ⁻³
Nicotinamida	5 x 10 ⁻³	22 x 10 ⁻³
Ácido p-aminobenzóico	5 x 10 ⁻³	22 x 10 ⁻³
Ácido Tiócico anidro .	5 x 10 ⁻³	22 x 10 ⁻³
Hidrocloreto de piridoxina	10 x 10 ⁻³	44 x 10 ⁻³
Extrato de levedura	3,0	0,5
Fonte de carbono		
Glicose	27	1.000
Ácido acético	27	1.000
Ácido fórmico	150	5.500
Solução tampão		
NaHCO ₃	80	5.200
Solução redutora		
Na ₂ S.9H ₂ O	10	218 (30 S)
PCP em etanol	10	0,02 - 8,00

*(A + B + C): meio basal composto pela solução macro, sais de amônio e fosfato e solução de metais e selenito

Fonte: (ANGELIDAKI et al., 1990, modificado)

As concentrações e respectivos períodos de aplicação de PCP, as taxas de PCP, bem como as taxas de carregamento orgânico e hidráulico aplicadas aos reatores são apresentadas nas Tabelas 4.2A, 4.2B.

LL
C₁V₁ = C₂V₂

Jad C₁V₁ = 120 mg/L
3,3 V₁ = 120 mg/L
V₁ = 36 mL

44 mL/L

0,85 mL/L

4,5 mL/L

1090 = 3.000 mL
37 mL/L

65 mL/L

22 mL/L

$$C = C_{in} \times \theta$$

$$0,2 \text{ mg/L} \times 650 \text{ mL} \times \frac{1}{L} \times 1 \text{ dia} = 130 \text{ mg}$$

Tabela 4.2A : Concentração de PCP aplicada ao RAHLF₁; Taxa diária de aplicação de PCP; massa de PCP aplicada ao reator no período

Período de operação (dias)	Concentração teórica de PCP (mg/L)	T.PCP teórica (mg/ L _r dia)*	Massa teórica de PCP (mg/período)
0-9	0,2	0,07	1,30
10-17	0,4	0,13	2,08
18-26	1,0	0,33	5,85
27-33	2,0	0,65	9,10
34-42	4,0	1,30	23,40
43-50	6,0	1,96	31,20
51-76	8,0	2,61	135,20
78-90	4,0	1,30	34,00
91-104	8,0	2,61	5,24
			total = 247,0

*Considerando vazão de 650 mL/dia e volume de 1.991 mL; L_r : volume do reator (L)

Tabela 4.2B : Concentração de PCP aplicada ao RAHLF₂; Taxa diária de aplicação de PCP; massa de PCP aplicada ao reator no período

Período de operação (dias)	Concentração teórica de PCP (mg/L)	T.PCP teórica (mg/ L _r dia)*	Massa teórica de PCP (mg/período)
0-9	0,2	0,10	0,31
10-17	0,4	0,21	0,50
18-26	1,0	0,52	1,40
27-33	2,0	1,05	2,17
34-42	4,0	2,09	4,96
43-50	6,0	3,14	7,44
51-104	8,0	4,19	66,96
			total = 83,80

*Considerando vazão de 155 mL/dia e volume de 296 mL; L_r : volume do reator (L)

4.3.5. CUIDADOS COM A MANIPULAÇÃO DE PCP

A preparação de solução estoque de PCP, do agente derivatizante, bem como a evaporação das amostras foram realizadas em capela.

Todo material utilizado na manipulação de PCP foi separado, tendo em vista risco de contaminação de outras amostras.

A manipulação foi realizada cuidadosamente, evitando assim riscos de acidentes.

4.3.6. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E EXAMES REALIZADOS DURANTE OPERAÇÃO DOS REATORES RAHLF

Na Tabela 4.3 são apresentadas as análises e exames realizados durante o período de operação dos reatores, as frequências de amostragem e os métodos utilizados.

Tabela 4.3 - Frequência e métodos das determinações analíticas e exames realizados nos reatores RAHLF

Parâmetro	Local de coleta	Frequência	Método
[PCP] e metabolitos	afluente e efluente	variável*	C.G./ECD
Ácidos voláteis	efluente do reator	variável*	Potenciométrico
DQO	afluente e efluente	variável*	colorimétrico
Alcalinidade	efluente	variável*	Potenciométrico
pH	afluente e efluente	variável*	Potenciométrico
Temperatura	ambiente	diária	Direta
Composição do Biogás	saída de gás	variável*	C.G./TCD
Adsorção de PCP	meio suporte	**	Metodologia descrita (4.3.6.1)
Exame microbiológico	lodo	variável	metodologia descrita (4.3.7.)
Adsorção de PCP	lodo imobilizado	***	Metodologia descrita (4.3.6.2)

* durante partida dos reatores semanal e durante adição de PCP de 2 a 3 vezes por semana

** realizada uma vez

*** realizada uma vez após 96 dias de adição de PCP

4.3.6.1. AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DO PCP NO MEIO SUPORTE

Este teste foi proposto visando a comparação da capacidade adsorptiva do meio suporte e a adsorção de PCP observada após período de adição de PCP aos reatores RAHLF.

O teste foi realizado em reator de 1.000 mL, mantido sob agitação e temperatura de 30°C com alimentação em batelada. A concentração teórica de PCP no substrato foi mantida em 4,0 mg/L, com pH 8,0, próximo ao pH obtido nos reatores RAHLF. 1.362 mg de espuma de poliuretano em cubos (meio suporte) foram colocados nos reatores com 500 mL da solução citada. Aliquotas de 30 mL, foram extraídas após períodos de 0, 6, 18, e 36 horas para determinações cromatográficas.

Drenagem e reposição da solução foram efetuadas até que se observou saturação da massa de espuma com PCP, determinada pela estabilização de sua concentração no substrato.

O período de permanência da solução no reator, bem como as demais condições do teste visaram simular as condições existentes nos reatores RAHLFs.

4.3.6.2. AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DE PCP NO LODO IMOBILIZADO APÓS PERÍODO DE OPERAÇÃO DOS REATORES

A determinação de clorofenóis no inóculo imobilizado teve como objetivo avaliar sua capacidade de acúmulo de PCP e de metabólitos.

Amostras do lodo imobilizado foram retiradas dos quatro pontos de amostragem do reator RAHLF₁ e dos dois do RAHLF₂. Em média, 15 cubos de cada ponto foram retirados, realizando-se testes em triplicata.

A cada amostra contida em tubo de ensaio adicionou-se 6,0 mL de solução alcalina de NaOH-0,1M. As amostras foram agitadas vigorosamente e os cubos de espuma comprimidos contra as paredes dos tubos, com auxílio de bastão de vidro, para desprendimento do material visivelmente adsorvido. A espuma permaneceu em contato com a solução de NaOH por 30 minutos à temperatura de 40°C. O conteúdo do frasco foi posteriormene centrifugado por 3 minutos a 16.000 rpm, para separação da

parcela de sólidos. A solução foi transferida para outro tubo, recebendo então o tratamento descrito no item 4.2.1.3.

As massas de clorofenol adsorvidas foram determinadas considerando a massa de lodo imobilizado, concentrações obtidas e o volume do extrator.

4.3.6.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos tótais, sólidos voláteis (S.V.) foram realizadas de acordo com métodos descritos pela APHA (1995). Ácidos voláteis totais (AVT) foram analisados de acordo com metodologia descrita por DILALLO & ALBERTSON (1961). As determinações de alcalinidade a bicarbonato foram feitas segundo método descrito por RIPLEY et al. (1986).

4.3.6.4. COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS POR CROMATOGRAFIA

A composição do biogás foi monitorada por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo Gow Mac equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna Porapak Q (2m x 1/4" - 80 a 100 mesh). A vazão de hidrogênio, utilizado como gás de arraste foi de 1 mL/s.

4.3.7 EXAMES MICROBIOLÓGICOS DO LODO

Os exames das morfologias das bactérias e sua relação com os gêneros metanogênicos basearam-se nas informações contidas em BERGEY'S (1989) Além disso foi considerada a revisão sobre bactérias anaeróbias contidas em ZEHNDER (1988), particularmente nos capítulos destinados às bactérias metanogênicas e redutoras do íon sulfato. Foram examinados vários campos para cada amostra, visando tornar o exame mais representativo.

Utilizou-se microscopia ótica comum (MOC), em microscópio Olympus modelo BH2, para exame das amostras de lodo disperso (lodo de inóculo) e do lodo retirado por compressão do meio suporte. Microscopia eletrônica de varredura (MEV),

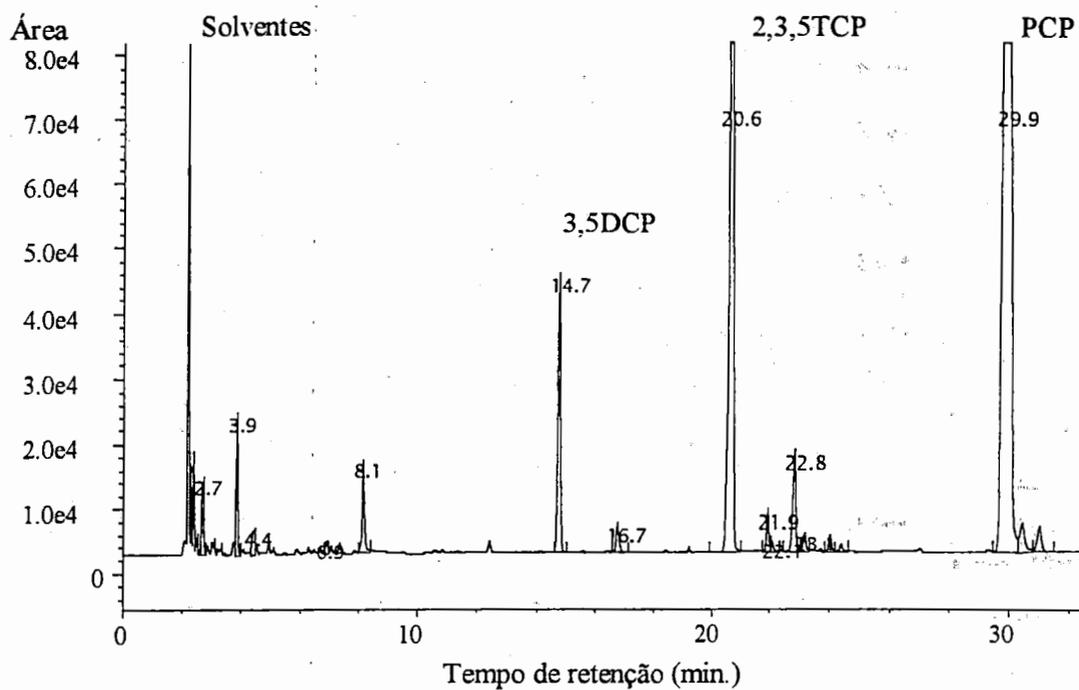
utilizando microscópio de varredura digital Zeiss DSM-960, foi utilizada para exame direto do lodo aderido ao meio suporte, de acordo com metodologia adaptada por ARAÚJO (1994).

Vários campos de cada amostra foram observados e fotografados, representando o lodo estudado, nas diversas fases do experimento.

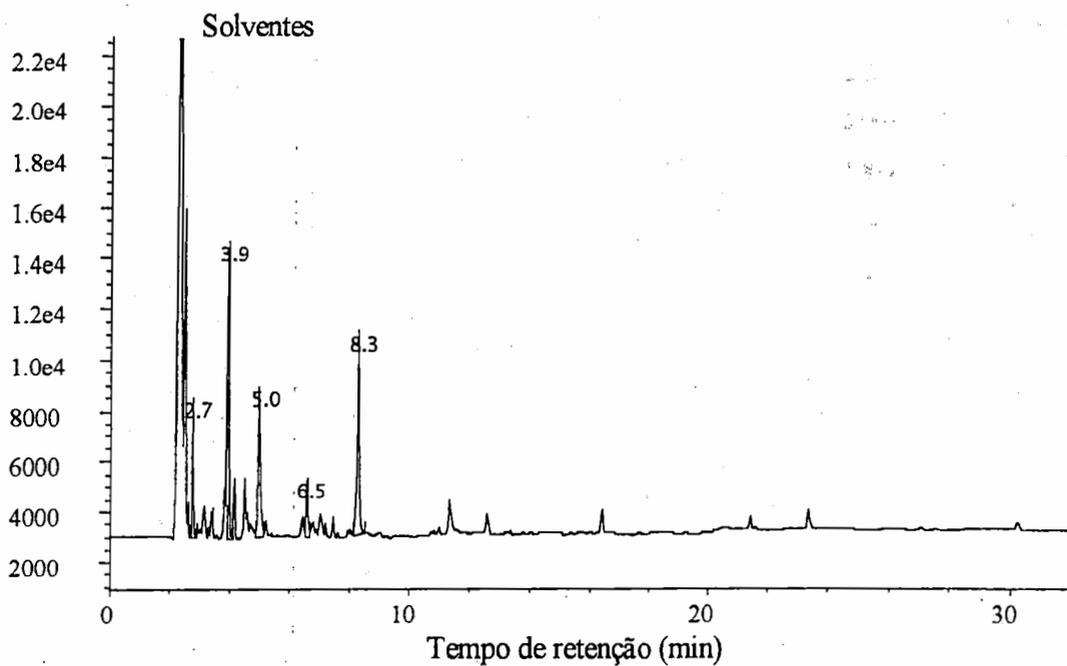
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DOS TESTES CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROFENÓIS

Após várias tentativas para otimização do trabalho de separação de clorofenóis através de cromatografia gasosa, elegeram-se condições cromatográficas que permitiram excelente separação dos picos, com ótimas resoluções, como mostrado na Figura 5.1.



(a)



(b)

Figura 5.1.: Cromatograma de solução em substrato extraída em hexano (a) 6,0 mg/L de PCP; 2,3,5,TCP; 3,5DCP (b) amostra em branco

Como pode ser observado, a condição cromatográfica escolhida permitiu a separação de clorofenóis, uma vez que os tempos de retenção dos padrões usados são bem distanciados, de acordo com características das formas mais halogenadas, bem como por isômeros das formas menos halogenadas de clorofenóis. Observa-se também que o substrato utilizado parece não ter influenciado nas determinações analíticas. Na escolha da condição cromatográfica adequada foi considerada esta possibilidade, tendo-se privilegiado a separação de outras formas de clorofenóis, como pode ser observado na Figura 5.2.

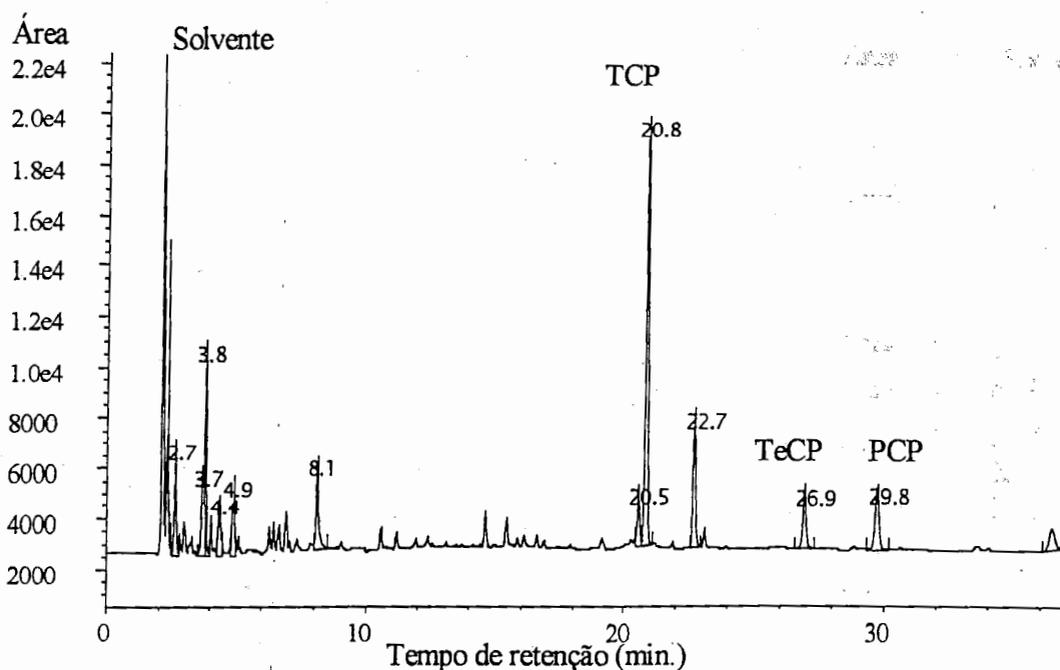


Figura 5.2.: Cromatograma de amostra de efluente do reator RAHLF₂ durante adição de concentração teórica de 8,0 mg/L de PCP ao substrato

Pode-se observar que a condição cromatográfica proposta produz a separação adequada dos picos, apresentando boa resolução..

5.1.1. TESTE PARA COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DO PCP EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE EXTRAÇÕES

Definidas as condições cromatográficas para separação dos clorofenóis (PCP, TCP e DCP), foram realizados testes para adequação da metodologia de extração destas substâncias do substrato, por hexano. Para tanto, foram feitas soluções de concentrações conhecidas de PCP, TCP e DCP.

Como citado na metodologia, 6,0 mL de amostra foram extraídos com 2,0 mL de hexano. Nesse teste, realizaram-se extrações com uma única alíquota de 2,0 mL e com duas extrações consecutivas, cada uma de 1,0 mL do extrator, posteriormente combinadas. Na Tabela 5.1 são apresentados os resultados das áreas dos cromatogramas obtidos, quando foram efetuadas uma e duas extrações consecutivas.

Tabela 5.1: Comparação da capacidade de extração de PCP - uma única vez e duas extrações consecutivas

[PCP] _t [*] (mg/L)	1 extração		2 extrações seguidas		Diferença percentual
	Área de PCP determinada	Área média (1)	Área de PCP determinada	Área média (2)	
0,40	373.559		518.481		31,8 %
	415.366	399.056	508.252	526.079	
	408.243		551.503		
4,00	3.192228		3.681.803		10,3 %
	3.040.458	3.051.947	2.922.503	3.366.548	
	2.923.155		3.495.334		
10,00	6.512.442		7.352.000		10,5 %
	7.047.846	6.820.511	7.642.358	7.542.292	
	6.901.244		7.632.519		

* - Concentração teórica de PCP.

Os resultados indicaram que, para todas as concentrações estudadas, a capacidade de recuperação foi maior quando foram efetuadas duas extrações consecutivas. Para concentrações mais baixas, ou seja, da ordem de 0,4 mg/L, o aumento de recuperação com duas extrações foi significativo, sendo de 31,8%,

enquanto para concentrações mais elevadas, a diferença caiu para valores próximos a 10,5%. No entanto, deve-se considerar que o aumento na manipulação das amostras pode levar ao aumento da concentração das mesmas, em função do caráter altamente volátil do extrator. Além disto, há aumento significativo no tempo de manipulação das amostras, inviabilizando o processo, devido ao número de amostras manipuladas. Por estes motivos, optou-se por realizar a extração com um único volume de hexano. Os padrões para construção de curvas de calibração e amostras foram extraídos com uma alíquota de 2,0 mL de hexano.

5.1.2. TESTE PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE EXTRAÇÃO DE CLOROFENÓIS

Para se avaliar a capacidade de extração de clorofenóis do substrato, compararam-se as áreas obtidas com padrões (mistura de PCP, TCP e DCP) feitos diretamente em hexano, e padrões feitos em substrato, extraídos em hexano, de acordo com descrito no item 4.2.1.3. Como o método de extração adotado concentrava as amostras em três vezes, as áreas obtidas foram divididas por três, para que as comparações pudessem ser feitas.

Nas Tabelas 5.2A, 5.2B e 5.2C são apresentados os resultados obtidos para soluções de PCP, 2,3,5TCP e 3,5DCP, respectivamente. As determinações foram efetuadas em triplicata, sendo apresentados apenas os valores médios das áreas obtidas. Os resultados obtidos mostraram-se lineares para as concentrações estudadas, para solubilizações diretas e indiretas em hexano.

Comparando-se as áreas obtidas em solução de hexano e em extração do meio de cultura, observou-se excelente capacidade de recuperação para PCP e TCP, e recuperação de cerca de 55% para DCP, um pouco reduzida em relação às demais, possivelmente devido à menor afinidade do extrator pelo clorofenol utilizado, sendo contudo aceitável.

A partir dos resultados obtidos, observou-se a dificuldade na correção das áreas obtidas a partir de padrões em hexano, durante as determinações de clorofenóis nos efluentes dos reatores. Optou-se pela elaboração de equações a partir

de soluções padrões preparadas na solução de substrato, às quais foi dado tratamento semelhante ao das amostras. Desta forma, a capacidade de extração dos clorofenóis como também as interferências do meio foram idênticas para brancos, padrões e amostras.

Tabela 5.2A: Comparação das áreas de picos de PCP em hexano por solubilização direta e após extração do substrato

[PCP] _T * (mg/L)	Área dos picos de PCP em hexano**		Áreas dos picos de PCP com extração (área/3)**	
0,20	117.532		131.478	
0,40	265.416	[PCP] = 1,64 x 10 ⁻⁶ A + 0,27	285.412	[PCP] = 1,36 x 10 ⁻⁶ A + 0,35
1,00	542.711	r = 0,990	597.749	r = 0,990
2,00	1.009.201		1.109.796	
4,00	1.758.382		2.067.269	
6,00	3.398.420		3.934.717	
8,00	4.975.000		5.991.450	

*concentração teórica de PCP

** média de valores de área obtidas em triplicata

Tabela 5.2B: Comparação das áreas de picos de TCP em hexano por solubilização direta e após extração do substrato

[TCP] _T [*] (mg/L)	Área dos picos de TCP em hexano ^{**}		Áreas dos picos de TCP com extração (área/3) ^{**}	
0,20	55.695		41.077	
0,40	95.202		82.015	
1,00	235.161	[TCP] = 6,36 x 10 ⁻⁶ A - 0,23	180.273	[TCP] = 4,33 x 10 ⁻⁶ A + 0,33
2,00	363.104	r = 0,998	352.295	r = 0,991
4,00	614.518		697.441	
6,00	974.111		1.221.969	
8,00	1.312.752		1.885.461	

*concentração teórica de TCP

** média de valores de área obtidas em triplicata

Tabela 5.2C: Comparação das áreas de picos de DCP em hexano por solubilização direta e após extração do substrato

[DCP] _T (mg/L)	Área dos picos de DCP em hexano**		Áreas dos picos de DCP com extração (área/3)**	
0,20	8.956		4.001	
0,40	19.198		7.762	
1,00	47.214	[DCP] = $3,12 \times 10^{-5}A - 0,16$	20.218	[DCP] = $5,19 \times 10^{-3}A + 0,27$
2,00	74.705	r = 0,994	31.235	r = 0,978
4,00	125.052		65.778	
6,00	178.468		87.177	
8,00	274.156		162.721	

*concentração teórica de DCP

** média de valores de área obtidas em triplicata

5.1.3. ELABORAÇÃO DE EQUAÇÕES DE RETA RELACIONANDO CONCENTRAÇÃO DE CLOROFENÓIS E ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS

5.1.3.1. EQUAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PCP EM SOLUÇÃO DE SUBSTRATO

Foram realizados testes para avaliação da reprodutibilidade de extração de PCP, do decaimento de sua concentração durante armazenamento das amostras em "freezer" e durante armazenamento do substrato à temperatura ambiente entre preparo e consumo nos reatores RAHLF.

Na tabela 5.3 são apresentados os valores médios das áreas obtidas para soluções de PCP preparadas em substrato e determinadas segundo a mesma condição de injeção: $T_i = 210^{\circ}\text{C}$; $T_f = 220^{\circ}\text{C}$; taxa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mantida por 10 minutos. O método de extração utilizado foi o descrito no item 4.2.1.3.

Tabela 5.3. Valores de áreas dos picos cromatográficos correlacionados a concentrações de PCP presentes em meio de cultura extraídos em hexano

Concentração (mg/L)	Área*	
0,2	191.419	
0,4	427.259	
1,0	837.340	$[\text{PCP}] = 1,286 \times 10^{-6}A + 0,025$
2,0	1.490.821	$r = 0,999$
4,0	2.762.359	$A = \text{área obtida no cromatograma}$
6,0	4.635.513	
8,0	6.208.548	
10,0	7.857.217	

* valores médios de triplicatas

5.1.3.2.EQUAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROFENÓIS EM AFLUENTE E EFLUENTE DOS REATORES

Foram preparadas soluções padrões de clorofenóis em solução de substrato, extraídas de acordo com metodologia citada no item 4.2.1.3. e determinadas segundo a condição de temperatura: $T_i = 90^{\circ}\text{C}$; $T_f = 200^{\circ}\text{C}$; taxa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mantida por 15 minutos.

Nas tabelas 5.4A, 5.4B, 5.4C são apresentados os valores médios de áreas dos picos obtidos para soluções de PCP, TCP e DCP, respectivamente.

Tabela 5.4a. Valores de áreas dos picos cromatográficos correlacionados a concentrações de PCP presentes em meio de cultura extraídos em hexano

Concentração (mg/L)	Área*	
0,20	394.434	
0,40	856.237	[PCP] = $6,23 \times 10^{-7} A - 0,09$
1,00	1.793.246	$r = 0,990$
2,00	3.329.389	
4,00	6.201.807	[PCP] = $4,14 \times 10^{-7} A - 1,00$
6,00	11.804.150	$r = 0,990$
8,00	17.974.350	

* Área média de triplicatas

Tabela 5.4b. Valores de áreas dos picos cromatográficos correlacionados a concentrações de TCP presentes em meio de cultura extraídos em hexano

Concentração (mg/L)	Área*	
0,20	123.230	[TCP] = $1,94 \times 10^{-6} A - 0,05$
0,40	246.045	$r = 0,999$
1,00	540.820	
2,00	1.056.885	
4,00	2.038.322	[TCP] = $1,36 \times 10^{-6} A + 0,68$
6,00	3.665.908	$r = 0,990$
8,00	5.656.384	

* Área média de triplicatas

Tabela 5.4c. Valores de áreas dos picos cromatográficos correlacionados a concentrações de DCP presentes em meio de cultura extraídos em hexano

Concentração (mg/L)	Área*	
0,20	12.004	
0,40	23.285	
1,00	60.655	[DCP] = $2,08 \times 10^{-5}A - 0,09$
2,00	93.704	$r = 0,997$
4,00	197.334	
6,00	261.530	
8,00	488.163	

* Área média de triplicatas

A relação entre concentração e área de PCP mostrou-se linear no intervalo de concentração estudado. Contudo, optou-se pela utilização de duas retas no intervalo, permitindo obter coeficientes de correlação mais próximos a um. O mesmo comportamento foi observado para as asoluções de TCP.

5.1.4. TESTE DE REPRODUTIBILIDADE DE EXTRAÇÃO DE PCP

A avaliação da reprodutibilidade de extração e injeção de PCP foi feita através de análise descritiva dos dados, avaliando-se o desvio padrão em relação à média, bem como o coeficiente de variação. A metodologia de extração utilizada foi aquela descrita no item 4.2.1.3, utilizando-se uma única extração. De acordo com citado anteriormente, foi utilizado somente PCP como clorofenol, e a análise cromatográfica ocorreu na seguinte condição: $T_i = 210^{\circ}\text{C}$; $T_f = 220^{\circ}\text{C}$; taxa de $5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, mantida por 10 minutos.

Na tabela 5.5. são apresentados os resultados obtidos durante o teste.



Tabela 5.5: Teste de reprodutibilidade de extração de PCP

Concentração teórica (mg/L)	Concentração (mg/L)	Análise descritiva das determinações cromatográficas
0,2	0,269	n = 5
	0,287	$\bar{c} = 0,274 \text{ mg/L}$
	0,271	$s_{n-1} = 0,0074 \text{ mg/L}$
	0,274	cv = 2,7 %
	0,270	
0,4	0,589	n = 6
	0,580	$\bar{c} = 0,575 \text{ mg/L}$
	0,588	$s_{n-1} = 0,0142 \text{ mg/L}$
	0,555	cv = 2,5 %
	0,575	
1,0	0,560	
	1,077	n = 6
	1,022	$\bar{c} = 1,102 \text{ mg/L}$
	1,127	$s_{n-1} = 0,051 \text{ mg/L}$
	1,085	cv = 4,6 %
2,0	1,139	
	1,161	
	1,852	n = 6
	1,934	$\bar{c} = 1,942 \text{ mg/L}$
	1,946	$s_{n-1} = 0,064 \text{ mg/L}$
4,0	1,904	cv = 3,3 %
	1,975	
	2,042	
	3,984	n = 6
	3,605	$\bar{c} = 3,577 \text{ mg/L}$
6,0	3,522	$s_{n-1} = 0,272 \text{ mg/L}$
	3,151	cv = 7,6 %
	3,506	
	3,696	
	5,792	n = 5
8,0	6,058	$\bar{c} = 5,987 \text{ mg/L}$
	5,772	$s_{n-1} = 0,239 \text{ mg/L}$
	6,358	cv = 4,0 %
	5,956	
	7,389	
10,0	8,046	n = 6
	8,669	$\bar{c} = 8,01 \text{ mg/L}$
	8,053	$s_{n-1} = 0,629 \text{ mg/L}$
	7,192	cv = 7,9 %
	8,707	
10,0	10,205	n = 6
	9,955	$\bar{c} = 9,85 \text{ mg/L}$
	10,340	$s_{n-1} = 0,643 \text{ mg/L}$
	9,207	cv = 6,5 %
	8,952	
	10,138	

Os resultados apresentaram coeficiente de variação entre 2,5% e 7,9%, sendo em média de 2,6%, para concentrações teóricas de PCP até 0,5 mg/L e de 4,0% entre concentrações de 1 e 2 mg/L e para 6 mg/L e 7% para demais concentrações de PCP.

Os resultados indicaram que o método apresenta reprodutibilidade satisfatória para o intervalo de concentrações estudado.

5.1.5. TESTE DE DECAIMENTO DO PCP NO SUBSTRATO

Para realização deste teste foram realizadas determinações analíticas em triplicata. Os resultados obtidos estiveram no mesmo intervalo determinado no teste de reprodutibilidade. Na Tabela 5.6. são apresentados os valores médios obtidos para cada concentração.

A partir destes resultados foram determinadas as percentagens de decaimento de PCP após 12 e 48 horas, intervalos mínimo e máximo entre preparação e consumo do substrato nos reatores.

As percentagens de decaimento de PCP em soluções que permaneceram em repouso por 12 horas, para as concentrações estudadas foram, exceto para as concentrações de 4,0 e 10,0 mg/L, inferiores aos coeficientes de variação obtidos nos testes do item anterior, não permitindo afirmar que houve decaimento na concentração de PCP neste intervalo de tempo. Nas soluções de 4,0 e 10,0 mg/L de PCP, as concentrações remanescentes determinadas foram maiores após 48h, que após 12 horas, com diferença na faixa determinada no testes de reprodutibilidade.

Nas concentrações de 0,2; 1,0 e 2,0 mg/L de PCP foram observados, após 48 horas, decaimentos de 8,8%, em média, superiores aos coeficientes de variação determinados nos itens anteriores, para as respectivas concentrações. Esses resultados permitem supor que houve decaimento entre 5 e 13% nestas concentrações, enquanto para as demais, as variações encontraram-se na faixa de variação determinada no item anterior, não permitindo afirmar que houve decaimento da concentração de PCP no substrato.

Tabela 5.6: Concentração de PCP no substrato ao longo do tempo

[PCP] _T [*] (mg/L)	t ₀ (0 h)	t ₁ (12 h)	t ₂ (36 h)	t ₃ (48 h)	decaimento após 12h (%)	decaimento após 48h(%)
	[PCP] _{média} ^{**} (mg/L)					
0,2	0,35	0,33	0,34	0,32	5,7	8,6
0,4	0,58	0,57	0,56	0,57	1,7	1,7
1,0	1,29	1,23	-	1,18	4,7	8,5
2,0	2,64	2,59	-	2,40	1,9	9,0
4,0	4,32	3,88	3,93	4,04	10,0	7,4
6,0	5,60	5,60	-	5,61	0,0	0,0
8,0	8,39	8,05	-	8,05	4,1	4,1
10,0	9,93	9,11	9,09	9,30	8,3	6,3

* concentração teórica de PCP

**concentração média de triplicata

5.1.6. TESTE PARA AVALIAÇÃO DO DECAIMENTO DE PCP DURANTE ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS EM “FREEZER”

As soluções de PCP no substrato foram analisadas imediatamente após preparo e após terem sido congeladas por 36 horas. O descongelamento das amostras ocorreu à temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas, e extraídas em triplicata, de acordo com citado no item 4.3.2.1, para posterior determinação analítica.

Na Tabela 5.7. são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 5.7: Avaliação da concentração de PCP após armazenamento das amostras

Concentração teórica (mg/L)	Amostra inicial		Amostra após 36h de congelamento	
	[PCP] (mg/L)	[PCP] _{média} (mg/L)	[PCP] (mg/L)	[PCP] _{média} (mg/L)
0,5	0,51		0,56	
	0,56	0,55	0,55	0,55
	0,58		0,54	
4,0	4,13		3,95	
	3,94	3,95	4,04	4,08
	3,78		4,24	
10,0	9,49		10,14	
	9,10	9,54	9,33	9,44
	10,03		8,89	

As pequenas variações obtidas encontram-se no intervalo do coeficiente de variação, podendo considerar-se que o congelamento das amostras não alterou suas propriedades para determinação de PCP.

5.1.7. TESTE DE ADSORÇÃO DE PCP NO MEIO SUPORTE

Na Tabela 5.8 são apresentados os resultados do teste de adsorção de PCP no meio suporte. Como citado no item 4.3.6.1, para realização deste teste foi utilizada solução de substrato contendo 4,0 mg/L de PCP, com correção de pH para

8,0. Cada reposição foi efetuada com 500 mL de solução. A massa de espuma de 0,2912 g foi constante durante o experimento.

Tabela 5.8 : Teste de adsorção de PCP no meio suporte

Adição de substrato	Instante da amostragem (h)	Concentração (mg/L)	Massa de PCP retida no intervalo
1 ^a	0	3,51	
	6	3,03	0,24
	18	2,63	0,20
2 ^a	0	3,46	
	6	3,19	0,14
	18	2,96	0,12
3 ^a	0	3,25	
	6	2,78	0,24
	18	2,78	0,0
	36	2,76	0,0

massa total = 0,90 mg

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.8, o decaimento de PCP no meio de cultura, nas primeiras 18 horas, relacionado à adsorção no meio suporte foi de 0,44 mg, 0,25mg na segunda alimentação e 0,24 mg na terceira. Durante a terceira fase de alimentação, a concentração de PCP em solução manteve-se constante após 6 horas, indicando saturação da espuma.

A massa de PCP adsorvida foi de 3,10 mgPCP por grama de espuma.

5.2. DESEMPENHO DOS REATORES DURANTE ADIÇÃO DE PCP

O inóculo utilizado nos reatores RAHLF₁ e RAHLF₂ apresentou características importantes de atividade metanogênica, indicando boas condições do lodo. A Figura 5.3 mostra a fluorescência típica de bactérias metanogênicas, destacando-se as formas de bacilos que pertencem, em sua grande maioria, ao grupo das metanobactérias hidrogenotróficas. Na ocasião da imobilização, o lodo encontrava-se sob baixa concentração de PCP e matéria orgânica, quando adicionava-se 1.000 mg/L de DQO, com contribuição de 300 mg/L de ácido acético.

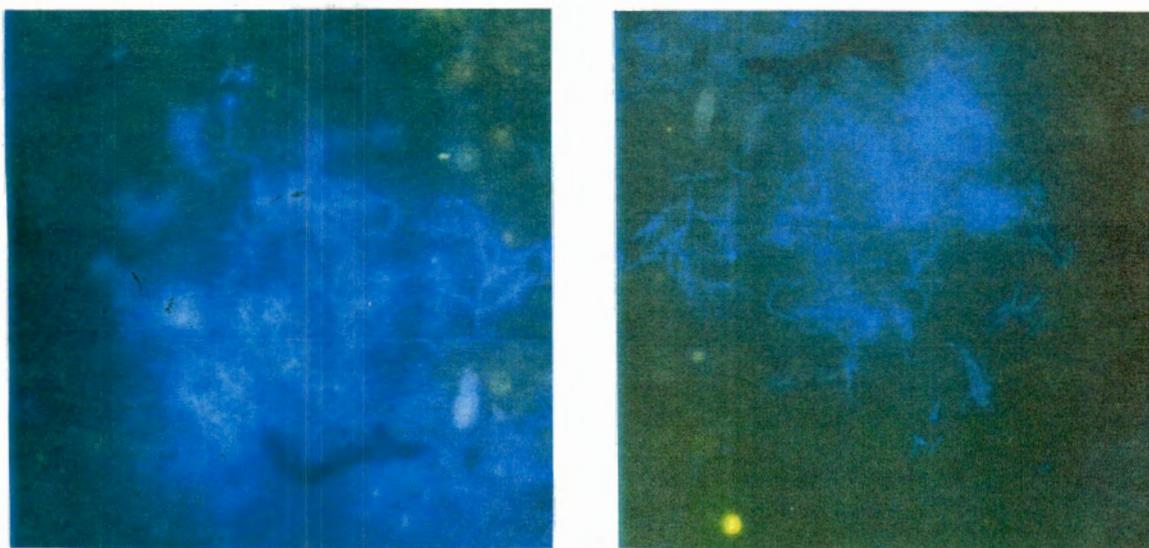


Figura 5.3: Fotos do lodo utilizado como inóculo - microscopia ótica de fluorescência (objetiva 100, ocular 10, zoom 1,25 + aumento da revelação. 1cm = 8 μ m)

Após seis meses de operação do RAHLF₁, anteriormente à adição de PCP, exames microbiológicos no lodo imobilizado indicaram presença de flocos biológicos aos quais estavam aderidos filamentos longos semelhantes a *Methanothrix* sp (Figura 5.4A) e morfologias bacterianas em formato de víbrios (Figura 5.4B), além da presença de cocobacilos e bacilos fluorescentes.

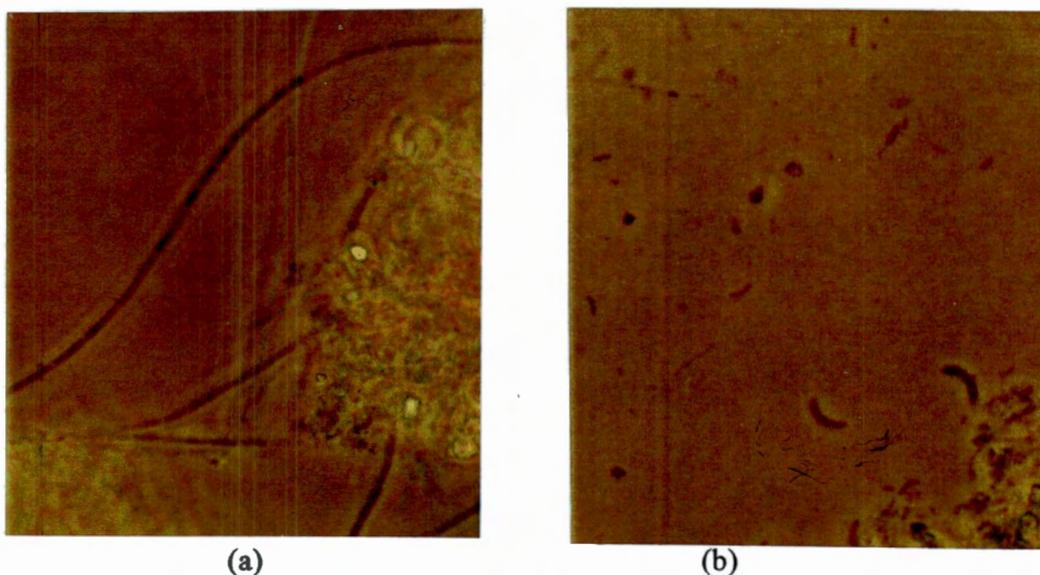


Figura 5.4 : Fotos de flocos biológicos aderidos ao meio suporte RAHLF₁ (a) filamentos longos semelhantes a *Methanothrix* sp e (b) morfologias bacterianas em formato de víbrios

Os vibrios poderiam ser relacionados à presença de bactérias redutoras do íon sulfato. Porém, não é possível afirmar que essa morfologia pertença a um determinado gênero bacteriano, como é realizado para metanobactérias, cujas características são facilmente identificáveis (ROBINSON et al., 1984; GROTENHUIS et al., 1991).

O lodo apresentou, nessa ocasião, a presença de metanobactérias fluorescentes. Os cocobacilos e bacilos fluorescentes poderiam ser relacionados aos gêneros *Methanobrevibacter* sp e *Methanobacterium* sp, respectivamente.

Em alguns campos analisados foi observada morfologia de bactéria formadora de filamentos semelhantes à *Methanothrix* sp. As células apresentaram fluorescência, característica pouco comum às metanobactérias pertencentes a este gênero de acetotróficas obrigatórias. Contudo, segundo VAZOLLER (1995), o gênero termofílico isolado apresentou crescimento em hidrogênio e dióxido de carbono, sendo provável que essa característica ocorresse em alguns mesófilos.

Sob microscopia de varredura, as amostras revelaram a morfologia de bactérias do gênero *Methanothrix* sp (Figura 5.5) e a distribuição uniforme das células ao longo do meio suporte (Figura 5.6)

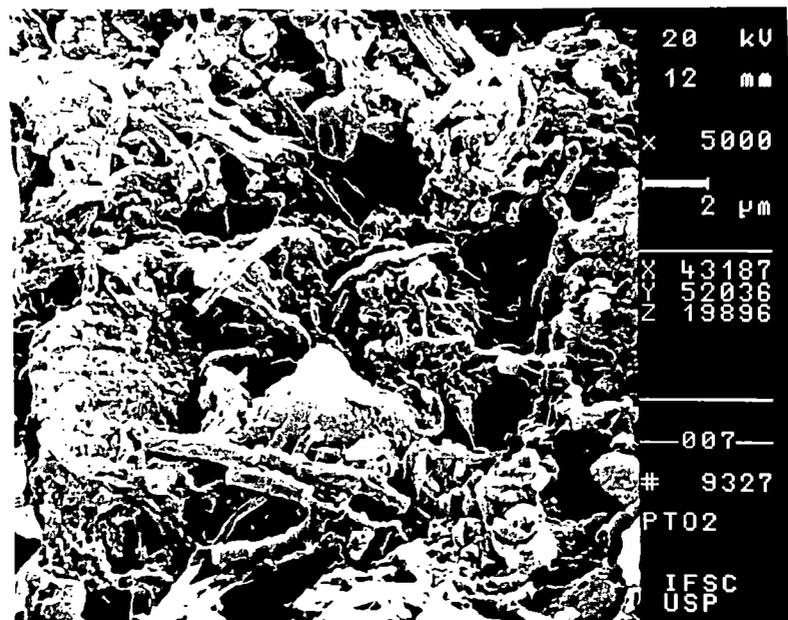


Figura 5.5: Foto:morfologia de bactérias do gênero *Methanothrix* sp - RAHLF₁ microscopia de varredura

Cocobacilos e bacilos foram também observados no conjunto de bactéria presentes no biofilme, conforme mostrado na Figura 5.5.

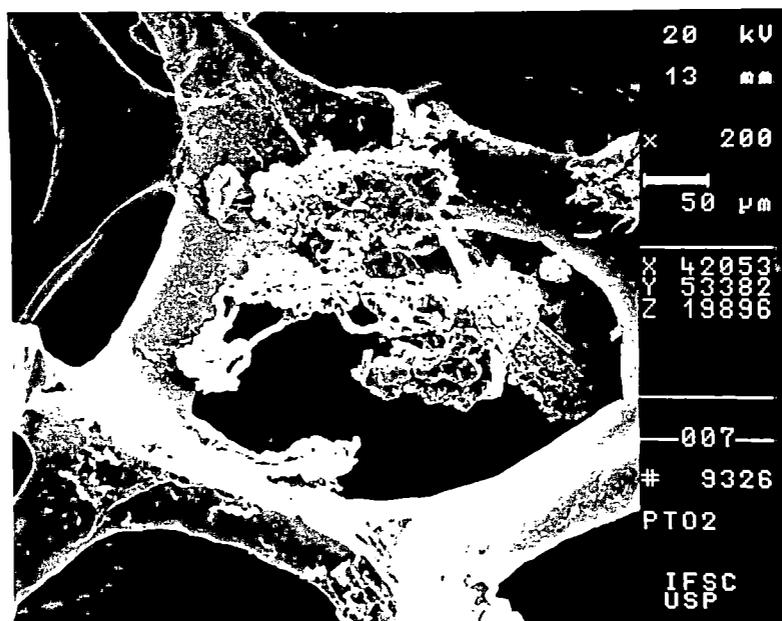


Figura 5.6. Foto: distribuição das células ao longo do meio suporte - RAHLF₁ microscopia de varredura

Na Figura 5.6 é possível observar vazios correspondentes às características da espuma de poliuretano, anteriormente estudadas por VARESCHE et al (1997). A massa de filamentos pareceu envolver o suporte organizadamente.

Os tipos bacterianos observados são típicos de lodos anaeróbios de sistemas com formação de biofilme (ROBINSON et al., 1994; GROTENHUIS et al., 1991). A presença de acetotróficos como o gênero *Methanothrix* sp e hidrogenotróficos metanogênicos revelou, indiretamente, baixas concentrações de acetato, como pode ser observado nos resultados, quando a concentração de ácidos voláteis esteve abaixo do limite de detecção do método utilizado.

Como citado anteriormente, os dois reatores utilizados foram operados por seis meses antes do início da adição de PCP.

Optou-se por apresentar, na Tabela 5.9, apenas os resultados das análises dos parâmetros físico-químicos no período em que o reator foi operado com carga próxima à de projeto. Não foram incluídos os valores obtidos durante a partida dos reatores, nem aqueles coletados durante período de instabilidade, especialmente no RAHLF₁, quando alterou-se a fonte de carbono de ácidos para sais, tornando o pH do meio mais elevado. Este período coincidiu com oscilações de temperatura, ocasionado por problemas no controlador, provocando sua elevação para até 40°C.

Os valores apresentados na Tabela 5.9 foram utilizados para comparação do desempenho dos reatores, de acordo com os parâmetros estudados, antes e após adição de PCP.

Nas Tabelas 5.10 e 5.11 são apresentados os resultados máximos e mínimos dos parâmetros físico químicos, obtidos durante operação dos reatores RAHLF₁ e RAHLF₂. Os resultados foram agrupados em função da concentração de PCP no substrato. Os valores utilizados para composição destas tabelas encontram-se no Anexo 1.

Para facilidade no tratamento dos resultados, apresentam-se separadamente as comparações para cada reator.

Tabela 5.9: Análise descritiva dos parâmetros físico-químicos dos reatores RAHLF e RAHLF_p, anteriormente a adição de PCP.

Reator	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg /L)	% de metano	T.O.C (KgDQO /m ³ dia)	T.C.H (m ³ /m ³ dia)	θ _h (h)
RAHLF ₁	n=15	n=15	n=15	n=13	n=17	n=12	0,57	0,26	32,7
	\bar{x} =2.153	\bar{x} =54	\bar{x} =97		\bar{x} =1.687	\bar{x} =95%			
	s _{n-1} =295	s _{n-1} =16	s _{n-1} =0,5		s _{n-1} =650	s _{n-1} =			
	C.V.=14	C.V.=30	C.V.=0,5		C.V.=39	C.V.=			
	max=2.770	max=80	max=-	max=8,6	max=2.304	max=96%			
	min=1.818	min=36	min=-	min=8,2	min=1.116	min=92%			
RAHLF ₂	n=15	n=15	n=15	n=13	n=17	n=12	0,68	0,30	32,0
	\bar{x} =2.153	\bar{x} =55	\bar{x} =97		\bar{x} =1.832	\bar{x} =96%			
	s _{n-1} =295	s _{n-1} =15	s _{n-1} =0,7		s _{n-1} =812	s _{n-1} =			
	C.V.=14	C.V.=28	C.V.=0,7		C.V.=44	C.V.=			
	max=2.770	max=79	max=-	max=9,3	max=2.502	max=96%			
	min=1.818	min=35	min=-	min=8,6	min=1.116	min=93%			

\bar{x} : média; s_{n-1} : desvio padrão; C.V. : coeficiente de variação (s_{n-1} / \bar{x})

T.C.O. : taxa de carregamento orgânico considerando vazão de 510 mL/dia e volume de 2.991 mL para o RAHLF₁ e vazão de 90 mL/dia e volume de 296 mL para RAHLF₂

T.C.H. : taxa de carregamento hidráulico considerando vazão de 510 mL/dia para o RAHLF₁ e de 90 mL/dia para RAHLF₂

θ_h: tempo de retenção hidráulico

Tabela 5.10: Valores extremos dos parâmetros físico-químicos do RAHLF₁ em função da concentração de PCP

[PCP] _i (mg/L)	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinida de (mg /L)	Ácidos voláteis (mg/L)	% de metano	Vazão (mL/dia)	T.C. O. (KgDQO /m ³ dia)	T.C.H (m ³ /m ³ dia)	θ _h (h)	T.PCP* (mg/L)
0,2	n=4 max=2.927 min=2.089	n=4 max=402 min=324	n=4 max=88 min=81	n=3 max=8,9 min=8,5	n=3 max=1.152 min=756	n=3 max=285 min=230	n=3 98	n=3 650	0,8	0,33	25,6	0,05
0,4	n=2 max=2.511 min=2.403	n=2 max=167 min=-150	n=2 max=94 min=93	n=2 max=9,0 min=8,4	n=2 max=1,188 min=694	n=2 max=140 min=133	n=2 98	n=2 max=675 min=480	0,71	0,29	28,8	0,09
1,0	n=3 max=2.644 min=2.487	n=3 max=138 min=82	n=3 max=97 min=95	n=2 8,8	n=2 max=1.240 min=1.100	n=2 max=82 min=60	n=2 93	n=3 max=675 min=645	0,85	0,33	25,2	0,34
2,0	n=2 max=2.957 min=2.704	n=2 max=66 min=35	n=2 98	- - -	- - -	- - -	n=2 93	n=2 max=680 min=675	0,88	0,34	24,6	0,74

T.C.O. : taxa de carregamento orgânico considerando vazão média no período

T.C.H. : taxa de carregamento hidráulico considerando vazão média no período

θ_h: tempo de retenção hidráulico, baseado no volume de vazios de 694 mL

*: Taxa de aplicação de PCP, considerando vazão média no período e volume do reator de 694 mL

máx. min. :valores máximo e mínimo no período

...continuação da tabela 5.10

[PCP] _t (mg/L)	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinida de (mg /L)	Ácidos voláteis (mg/L)	%de metano	Vazão (mL/dia)	T.C.O. (KgDQO /m ³ dia)	T.C.H (m ³ /m ³ dia)	θ _h (h)	T.PCP* (mg/L)*
4,0	n=2 max=2.957 min=2.837	n=2 max=55 min=35	n=2 max=99 min=95	- - -	- - -	- - -	n=2 93	n=2 max=680 min=675	0,99	0,34	24,6	1,10
6,0	n=4 max=3.163 min=3.080	n=4 max=167 min=38	n=4 max=99 min=95	n=4 max=9,3 min=8,1	n=4 max=1.188 min=1.152	n=4 max=100 min=76	n=3 max= 95 min= 93	n=4 max=680 min=650	1,05	0,34	24,8	1,85
8,0	n=10 max=3.346 min=3.012	n=10 max=248 min=110	n=10 max=95 min=92	n=8 max=8,8 min=8,3	n=8 max=1.240 min=1.116	n=8 max=145 min=83	n=4 max=96 min=93	n=10 max=680 min=645	1,08	0,33	25,2	2,55
8,0**	n=3 max=3.163 min=3.012	n=3 max=555 min=274	n=3 max= 91 min= 82	n=3 max=8,6 min=8,2	n=3 max=1.260 min=1008	n=3 max=300 min=93	n=2 max= 93 min= 91	n=3 max=680 min=650	1,04	0,34	25,0	2,59

T.C.O. : taxa de carregamento orgânico considerando vazão média no período

T.C.H. : taxa de carregamento hidráulico considerando vazão média no período

θ_h: tempo de retenção hidráulico, baseado no volume de vazios de 694 mL

máx. min.: valores máximo e mínimo no período

*: Taxa de aplicação de PCP, considerando vazão média no período e volume do reator de 694 mL.

** período em que observou-se queda na eficiência do reator

...continuação da tabela 5.10

[PCP] _t (mg/L)	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg /L)	Ácidos voláteis (mg/L)	%de metano	Vazão (mL/dia)	T.C.O. (KgDQO /m ³ dia)	T.C.H (m ³ /m ³ dia)	θ _h (h)	T.PCP* (mg/L)
4,0	n=7 max=2.870 min=2.487	n=7 max=658 min=133	n=7 max=95 min=74	n=6 max=9,1 min=8,4	n=6 max=1.296 min=1.116	n=6 max=450 min=55	n=5 max=92 min=80	n=8 max=670 min=650	0,87	0,33	25,3	1,34
8,0	n=2 max=3.367 min=3.290	n=2 max=20 min=11	n=2 99	n=2 max=8,9 min=8,8	n=2 max=1.224 min=1.224	n=2 max=- min=-	n=2 97	660	1,17	0,33	25,2	2,57

T.C.O. : taxa de carregamento orgânico considerando vazão média no período

T.C.H. : taxa de carregamento hidráulico considerando vazão média no período

θ_h: tempo de retenção hidráulico, baseado no volume de vazios de 694 mL

*: Taxa de aplicação de PCP, considerando vazão média no período e volume do reator de 694 mL.

máx. min.: valores máximo e mínimo no período

Tabela 5.11: Valores extremos dos parâmetros físico-químicos em função da concentração de PCP - RAHLF₂ e análise descritiva para concentração de 8,0mg/L

[PCP] _t (mg/L)	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinida de (mg /L)	% de metano	Vazão (mL/dia)	T.O.C (KgDQO/ m ³ dia)	T.C.H (m ³ /m ³ dia)	θ _h (h)	T. PCP (mg/L)*
0,2	n=4 max=2.927 min=2.089	n=4 max=58 min=44	n=4 max=98 min=97	n=3 max=9,6 min=8,4	n=3 max=1.152 min=756	n=3 max=93 min=91	120	0,99	0,41	24,0	0,06
0,4	n=2 max=2.511 min=2.403-	n=2 max=46 min=14	n=2 max=99 min=98	n=2 max=9,2 min=8,6	n=2 max=1.188 min=720	n=2 93	n=2 max=152 min=150	1,15	0,47	20,5	0,15
1,0	n=3 max=2.644 min=2.487	n=3 max=69 min=44	n=3 max=98 min=97	n=2 max=9,4 min=9,1	n=2 max=1.240 min=1.188	n=2 max=98	n=2 max=675 min=645	1,5	0,69	16,6	0,60
2,0	n=2 max=2.957 min=2.451	n=2 max=51 min=48	n=2 98	- - -	- - -	n=2 98	n=2 max=160 min=158	n 1,38	0,54	18,1	1,17

T.C.O. : taxa de carregamento orgânico considerando vazão de de 90 mL/dia e volume de 296 mL para RAHLF₂

T.C.H. : taxa de carregamento hidráulico considerando vazão de de 90 mL/dia para RAHLF₂

θ_h: tempo de retenção hidráulico, baseado no vlume de vazios de 120 mL

*: Taxa de aplicação de PCP, considerando vazão média no período e volume do reator de 296 mL.

máx., min.: valores máximos e mínimos no período

... Continuação da tabela 5.11

[PCP] _t	DQO afluente (mg/L)	DQO efluente (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg /L)	% de metano	Vazão (mL/dia)	T.O.C (KgDQO /m ³ dia)	T.C.H (m ³ /m ³ dia)	θ _h (h)	T. PCP (mg/L)*
4,0	n=2	n=2	n=2	-	-	n=2	n=2	1,56	0,54	18,1	1,77
	max=2.957	max=70	max=99	-	-	98	max=160				
	min=2.837-	min=39	min=98	-	-		min=158				
6,0	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=3	n=4	1,64	0,53	18,1	2,86
	max=3.163	max=63	max=99	max=9,3	max=1.260	max=98	max=160				
	min= 3.080	min=36	min=98	min=9,0	min=1.152	min=97	min=156				
8,0	n=21	n=21	n=21	n=18	n=18	n=13	n=22	1,71	0,54	18,1	4,15
	\bar{x} =3.189	\bar{x} =62	\bar{x} =98		\bar{x} =1.230	\bar{x} =96,5	\bar{x} =159				
	s _{n-1} =149	s _{n-1} =28	s _{n-1} =1,0		s _{n-1} =78	s _{n-1} =0,78	s _{n-1} =10,9				
	C.V.=4,7	C.V.=45	C.V.=1,0		C.V.=6,3	C.V.=1,0	C.V.=6,8				
	max= -	max=120	max= -	max=9,4	max=1.404	max= -	max=694				
	min= -	min=25	min= -	min=8,7	min=1.100	min= -	min=-645				

\bar{x} : média; s_{n-1}: desvio padrão; C.V. : coeficiente de variação (s_{n-1} / \bar{x})

T.C.O. : taxa de carregamento orgânico considerando vazão de de 90 mL/dia e volume de 296 mL para RAHLF₂

T.C.H. : taxa de carregamento hidráulico considerando vazão de de 90 mL/dia para RAHLF₂

θ_h: tempo de retenção hidráulico, baseado no vlume de vazios de 120 mL

*: Taxa de aplicação de PCP, considerando vazão média no período e volume do reator de 296 mL.

máx., min.: valores máximo e mínimo no período

Reator RAHLF₁

Na Figura 5.7 são apresentados os resultados médios, por período de aplicação de PCP, de: DQO no afluente e efluente dos reatores, eficiência de remoção de DQO e Taxa de aplicação de PCP.

De acordo com os resultados de T.C.O., T.C.H. e θ_h , apresentado nas tabelas 5.9 e 5.10 e da Figura 5.8, observa-se que houve aumento da ordem de 27% as taxas de carregamento orgânico e hidráulico, causado principalmente pela redução do tempo de detenção hidráulica, da ordem de 20% e acréscimo na concentração de DQO no substrato, da ordem de 8%.

O aumento na concentração de DQO foi causado, possivelmente, pela introdução de solução de vitaminas, omitida no período anterior.

A diminuição no tempo de detenção hidráulica ocorreu devido a problemas no sistema de alimentação, impossibilitando o trabalho a vazões mais baixas.

No período em que foi adicionado 0,2 mg/L de PCP ao substrato, houve aumento na concentração média de DQO no efluente de 54 para 369 mg/L, com decréscimo em sua eficiência média de remoção de 97 para 85%, possivelmente causado pelo aumento de carga citado.

O pH nesse período, que variou entre 8,5 a 8,9, foi superior ao observado no período anterior que variou de 8,2 a 8,6. Houve queda na alcalinidade média de 1.687 no período anterior para 960 mg/L, com variação de 756 a 1.152 mg/L.

A percentagem de metano no biogás, aumentou de 95 para 98%, indicando que não houve interferência negativa do PCP na metanogênese.

A queda no desempenho do reator nesse período esteve relacionada mais aos parâmetros operacionais que à adição de PCP, hipótese esta confirmada posteriormente pelos resultados obtidos, quando a concentração de PCP no substrato passou a ser de 0,4 mg/L.

Quando a concentração de PCP no substrato aumentou para 0,4 mg/L, a DQO média no efluente foi da ordem de 159 mg/L, com eficiência de remoção próxima a 94%, próxima àquela observada anteriormente à adição de PCP.

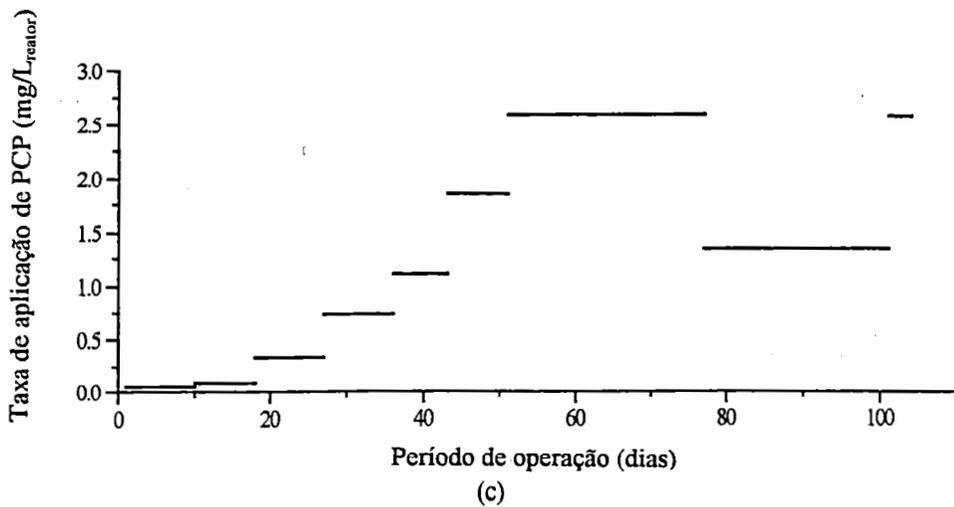
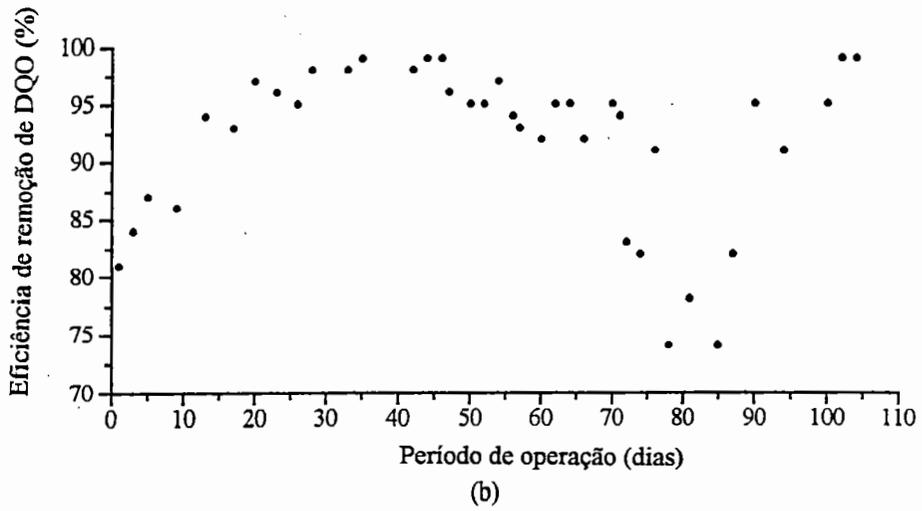
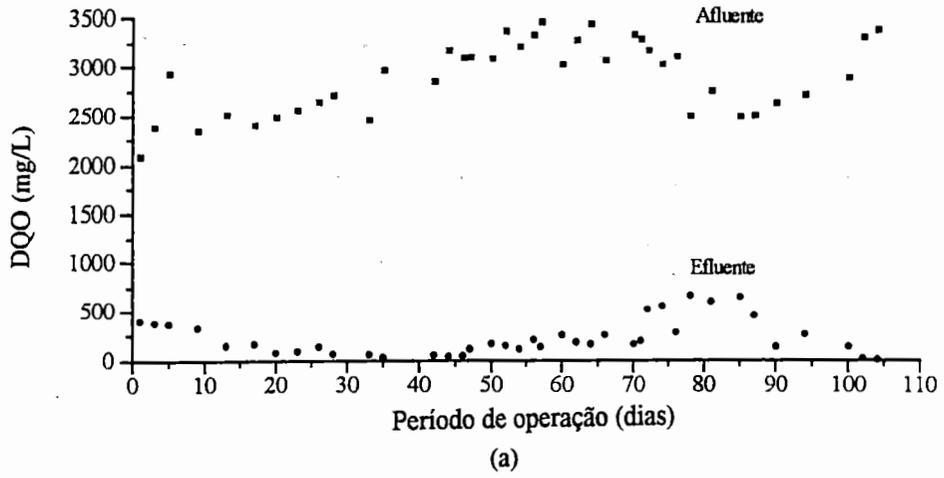


Figura 5.7: Parâmetros estudados no RAHLF: (a) DQO; (b) Eficiência de remoção de DQO; (c) Taxa de aplicação de PCP.

A alcalinidade média foi de 936 mg/L, semelhante ao período anterior. Contudo, a variação foi superior, ficando entre 684 e 1.188 mg/L

A concentração média de ácidos voláteis caiu para 137 mg/L, enquanto a concentração média, observada no período anterior, havia sido de 265 mg/L. Os resultados indicaram que houve aumento na capacidade de conversão pelos microrganismos participantes. A percentagem de metano no biogás foi semelhante à do período anterior.

Quando a concentração de PCP no substrato atingiu 1,0 mg/L, a eficiência de remoção de DQO foi próxima a 96%, semelhante ao período anterior à adição de PCP, correspondendo à DQO média no efluente de 103 mg/L. Contudo, a DQO no efluente foi superior, apresentando valores mínimo de 82 e máximo de 138 mg/L.

O pH no efluente foi de 8,8, enquanto variou de 8,2 a 8,6 no período anterior à adição de PCP. A alcalinidade variou de 1.100 a 1.240 mg/L, e a concentração de ácidos voláteis foi próxima a 70 mg/L, inferior à determinada no período anterior.

Houve decréscimo na percentagem de metano, para 93%, enquanto no período anterior foi de 98%. Possivelmente, essa queda deva-se ao aumento na taxa de carregamento orgânico, causado pelo aumento de vazão, provocando diminuição do tempo de detenção hidráulica.

Durante o período em que a concentração de PCP no substrato foi próxima a 2,0 mg/L, houve aumento na eficiência de remoção de DQO, que atingiu 98%, com concentração no efluente variando entre 35 e 66 mg/L. Não foram efetuadas determinações potenciométricas de pH nesse período, devido a problemas com o equipamento.

A análise de biogás realizada no período indicou percentagem de metano semelhante à do período anterior. A taxa de carregamento orgânico permaneceu constante.

Quando a concentração de PCP no substrato atingiu 4,0 mg/L, ocorreu aumento de 13% na taxa de carregamento orgânico, devido ao aumento de DQO no substrato, causado pelo aumento do volume de solução etanólica de PCP adicionado. A

eficiência de remoção de DQO foi próxima a 99%, com concentração no efluente variando de 35 a 55 mg/L, tendo o reator apresentado desempenho superior ao período anterior à adição de PCP, quanto a este parâmetro. A percentagem de metano no biogás foi semelhante às obtidas nos períodos anteriores.

Com concentração de 6,0 mg/L de PCP no substrato e taxa de carregamento orgânico de 1,05 Kg DQO/m³ dia, em função do aumento de 6% na concentração do substrato, a eficiência média de remoção de DQO variou de 95 a 99%, com DQO no efluente variando de 38 a 167 mg/L. O pH apresentou grande variação, obtendo-se 9,3 como valor máximo e 8,1 como valor mínimo, no período em que ocorreu a menor eficiência de remoção de DQO que foi de 95%, indicando talvez início no processo de inibição de remoção de matéria orgânica, quantificada como DQO. A alcalinidade no período manteve-se próxima a 1.161 mg/L e a concentração de ácidos voláteis, variou entre 76 e 100 mg/L, com valor médio de 82 mg/L, cerca de 15% superior à média quando a concentração de PCP foi de 1,0 mg/L. A percentagem de metano no biogás teve pequeno acréscimo, atingindo 95%.

Entre os dias 51^o e 71^o, quando a concentração de PCP no substrato foi próxima a 8,0 mg/L, a eficiência média de remoção de DQO foi de 94%, com DQO no efluente variando de 110 a 248 mg/L e valor médio de 177 mg/L.

O pH do efluente permaneceu próximo a 8,6. A alcalinidade média no período foi de 1.182 mg/L, com coeficiente de variação de 4,3%. A concentração de ácidos voláteis no efluente variou de 83 a 145 mg/L, com valor médio de 104 mg/L. Observou-se que houve acréscimo de cerca de 27% na concentração de ácidos voláteis, em relação ao período anterior. A percentagem média de metano variou de 93 a 96%.

Entre os dias 72^o e 76^o, observou-se queda na eficiência de remoção de DQO, que atingiu o valor mínimo de 82% no período, correspondendo à DQO no efluente de 555 mg/L. Ocorreu queda na alcalinidade para 1.088 mg/L e a concentração de ácidos voláteis no efluente atingiu 300 mg/L. A percentagem de metano presente no biogás caiu para 91%, indicando que parte da matéria orgânica não foi convertida a metano.

A partir do desequilíbrio observado, optou-se pela redução da concentração de PCP no substrato para 4,0 mg/L, com conseqüente redução de T.C.O.

de cerca de 15%, permanecendo, em média, 0,87 Kg DQO/m³ dia. Este período teve duração de 22 dias, tendo terminado no 100^o dia de operação.

A eficiência de remoção de DQO variou de 74% , no início do período a 95%, no final, com DQO no efluente, respectivamente, de 658 e 133 mg/L. A alcalinidade média permaneceu próxima a 1.188 mg/L. A concentração de ácidos voláteis atingiu o valor máximo de 450 mg/L, apesar da redução na concentração de PCP.

No 87^o dia de operação, foi efetuado um perfil de DQO ao longo do reator, cujo resultado é apresentado na tabela 5.12.

Tabela 5.12: perfil de DQO - [PCP] = 4,0 mg/L 87^o dia de operação

Ponto de amostragem	DQO (mg/L)
entrada	2.550
01	179
02	184
03	302
04	423
saída	450

De acordo com os dados da tabela anterior constata-se a ocorrência de curto-circuito no reator. De fato, observa-se que o valor de DQO em pontos intermediários aumentou na direção do escoamento, o que só pode ser explicado pela presença de canais preferenciais. A ocorrência de caminhos preferenciais foi causada possivelmente pela dificuldade de separação do biogás. A retirada das amostras ao longo do reator deve ter provocado um rearranjo no leito do reator e a consequente redução do curto-circuito, caracterizado pelo aumento da eficiência de remoção de DQO, verificado nas análises do 90^o dia.

No 100^o dia de operação, a concentração de PCP foi elevada para 8,0 mg/L e a T.O.C. para 1,12 KgDQO/m³ dia. Após quatro dias de operação nesta nova situação, determinações analíticas indicaram eficiência de remoção de DQO de 99%, com concentração de DQO no efluente de 11 mg/L. O pH foi mantido em 8,8 e a

alcalinidade em 1.224 mg/L. A percentagem de metano foi de 97%, superior ao período anterior, em que atingiu 80%.

Os resultados obtidos indicam que o desempenho do RAHLF₁ não foi alterado pela presença de PCP no substrato, em concentrações que variaram de 0,2 a 8,0 mg/L.

As quedas de eficiência na remoção de DQO, ocorridas principalmente entre os dias 72 a 90 estiveram associadas a problemas operacionais e às características do reator que, após longo período de operação contínua, possibilitou a formação de canais preferenciais ou curtos circuitos. Esse escoamento preferencial ocorreu, possivelmente, ao longo do tubo horizontal interno do reator, destinado à separação de gás.

Reator RAHLF₂

Como citado anteriormente, na Tabela 5.9 encontram-se os resultados da análise descritiva dos parâmetros físico-químicos do RAHLF₂, sem adição de PCP. Na Tabela 5.11, encontram-se os resultados obtidos durante o período em que foi adicionado PCP ao substrato.

Na Figura 5.8 são apresentados os resultados médios, por período de aplicação de PCP, de: DQO no afluente e efluente dos reatores, eficiência de remoção de DQO e Taxa de aplicação de PCP.

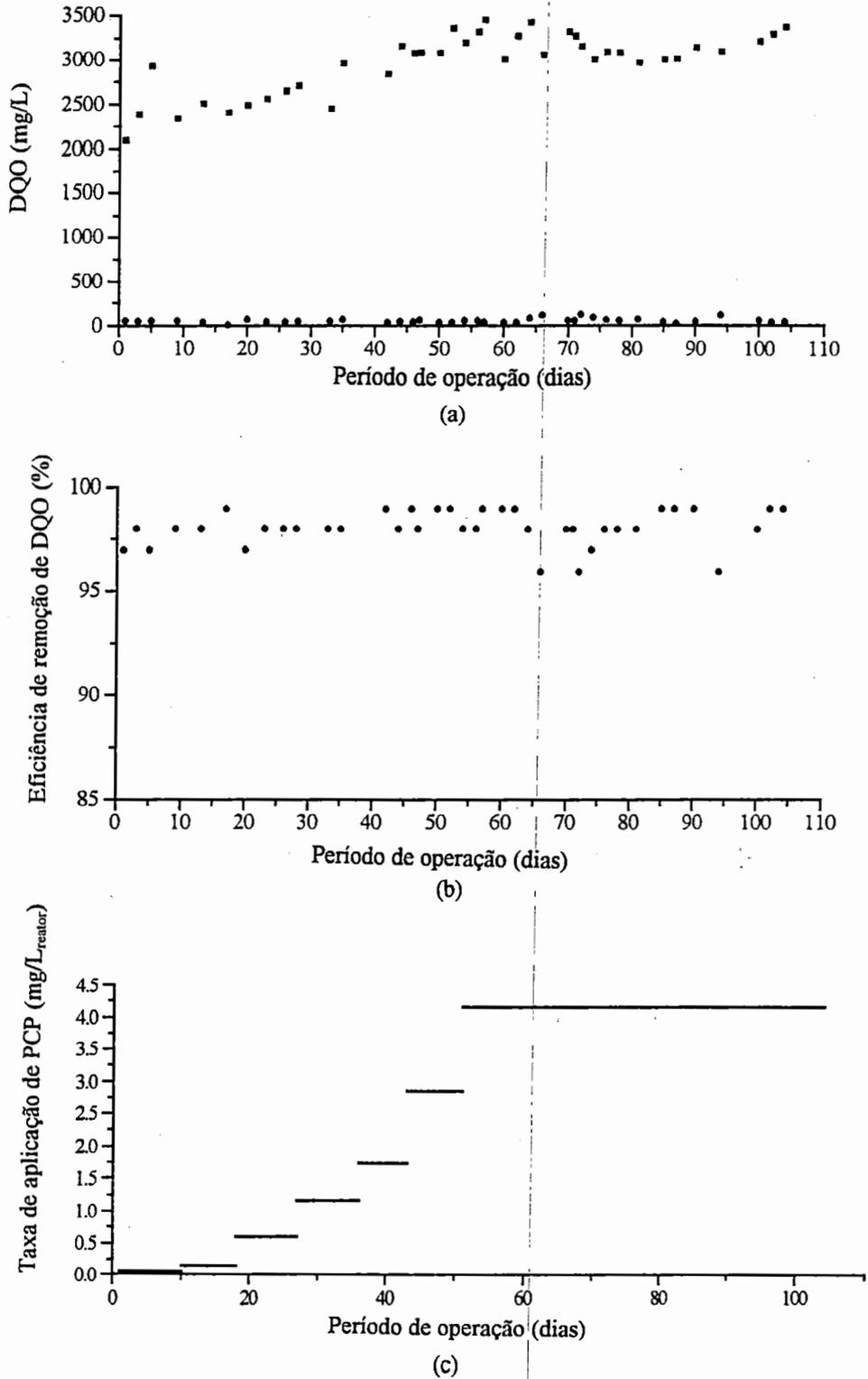


Figura 5.8: Parâmetros estudados no RAHLF₂: (a) DQO; (b) Eficiência de remoção de DQO; (c) Taxa de aplicação de PCP.

Com o início da adição de PCP houve aumento na T.C.O. de 0,68 para 1,23 KgDQO/m³ dia e o tempo de detenção hidráulica foi reduzido para cerca de 19 horas. O aumento da carga aplicada deveu-se ao aumento de DQO no substrato, citada no item anterior, e o aumento de vazão foi realizado para que o tempo de retenção hidráulica fosse 25% inferior ao reator maior.

Durante a adição de 0,2 mg/L de PCP ao substrato, a eficiência de remoção de DQO manteve-se próxima a 97%, com DQO no efluente variando de 44 a 58 mg/L. Neste período, a eficiência de remoção de DQO manteve-se praticamente igual à do período sem adição de PCP, não indicando interferência do PCP no desempenho do reator.

O pH neste período variou de 8,4 a 9,6 e de 8,6 a 9,3, no período anterior. A alcalinidade variou de 756 a 1.152 mg/L, com média de 972 mg/L, enquanto no período anterior variou de 1.116 a 2.505 mg/L, com média de 1.832 mg/L. Os resultados das determinações citadas indicam que o aumento de carga levou à maior flutuação no pH do efluente, que manteve-se elevado, e maior consumo de alcalinidade, devido ao aumento de carga. O método analítico utilizado não permitiu a determinação das concentrações de ácidos voláteis, por estarem abaixo da sensibilidade do método.

A percentagem de metano no biogás, diminuiu para 93%, possivelmente devido ao aumento na taxa de carregamento orgânico no reator.

Quando a concentração de PCP no substrato aumentou para 0,4 mg/L, a T.C.O. foi elevada para 1,15 KgDQO/m³ dia, devido ao aumento de vazão de 120 para 140 mL/dia, com tempo de retenção de 20,5 horas, cerca de 15% inferior ao período anterior. A diminuição gradativa no tempo de retenção visou manter no reator RAHLF₂, T.C.H. 25% maior que no RAHLF₁. Neste período, a eficiência de remoção de DQO foi de 98%, com variação de DQO no efluente de 14 a 46 mg/L. O pH variou de 8,2 a 9,2 entre o início e fim do período, respectivamente. A alcalinidade variou de 720 a 1.188 mg/L., semelhante à variação apresentada no período anterior. Não houve alteração na percentagem de metano presente no biogás.

Quando a concentração de PCP aumentou para 1,0 mg/L, a eficiência de remoção de DQO manteve-se em 98%, com concentração no efluente variando de 69 a 44 mg/L. Aparentemente, houve pequeno aumento da DQO no efluente no início do

período, retornando aos padrões anteriores durante o restante do período. O pH no efluente variou de 9,1 a 9,4 e a alcalinidade esteve entre 1.108 e 1.240 mg/L. A T.C.O. média foi de 1,50 KgDQO/ m³ dia e o tempo de retenção hidráulica foi de 16,6 horas, inferior ao desejado, devido à dificuldade no ajuste de vazão.

Houve aumento na percentagem de metano para 98%, embora tenha ocorrido aumento de carga, causado possivelmente pelo aumento do volume de solução etanólica de PCP, pelo consequente aumento de DQO no substrato e pelo aumento de vazão.

Durante o período em que a concentração de PCP foi próxima a 2,0 mg/L, a eficiência de remoção de DQO foi de 98%, com concentração no efluente próxima a 50 mg/L. O tempo de retenção hidráulica foi ajustado para 18 horas e a T.C.O. média foi de 1,38KgDQO/m³ dia. A percentagem de metano no biogás foi semelhante ao período anterior.

Com concentração de 4,0 mg/L de PCP no substrato, a eficiência de remoção de DQO foi de 99%, com concentração no efluente variando de 39 a 70 mg/L. A T.C.O. no período foi de 1,56KgDQO/ m³ dia, causada pelo aumento na concentração de etanol no substrato. A percentagem de metano no biogás permaneceu constante em 98%.

No período em que a concentração de PCP no substrato foi de 6,0 mg/L, a eficiência média de remoção de DQO manteve-se próxima a 99%, com concentração no efluente variando de 36 a 63 mg/L. O pH no efluente variou de 9,0 a 9,2, e a alcalinidade média foi de 1.233 mg/L. Não houve alteração na percentagem de metano.

A adição de 8,0 mg/L de PCP ao substrato foi mantida entre os 51^o e 104^o dias de operação. Sob T.C.O média de 1,71 Kg DQO/m³ dia e tempo de detenção hidráulica de 18,1 horas, a eficiência média de remoção de DQO foi de 98%, com coeficiente de variação de 1%. A DQO no efluente variou de 25 a 120 mg/L sendo, em média, de 62 mg/L. O pH apresentou valor mínimo de 8,7 e máximo de 9,2. A alcalinidade variou de 1.100 a 1.404 mg/L, com valor médio de 1.230 mg/L. A percentagem média de metano no biogás foi de 97%, semelhante às situações com concentrações menores de PCP.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos permitiram afirmar que o PCP, nas concentrações testadas, não causou qualquer efeito deletério ao desempenho deste reator.

5.3. DEGRADAÇÃO DE PCP NOS REATORES RAHLF₁ E RAHLF₂

Conforme citações da literatura, a degradação de PCP por processo anaeróbio ocorre através de reações de desalogenação sucessivas, representada na Figura 3.1.

Os resultados obtidos nas determinações cromatográficas, em que foram detectados TeCP, TCP e DCP, no efluente dos reatores, confirmam que a degradação de PCP ocorre através de desalogações sucessivas, situação evidenciada nos perfis de concentração de clorofenóis efetuados ao longo dos reatores.

Conforme citado anteriormente, as determinações cromatográficas de clorofenóis, foram baseadas nos tempos de retenção.

Os cromatogramas obtidos das análises dos efluentes dos reatores foram comparados aos do afluente e da amostra em branco, feita somente com hexano. Desta forma, a presença de picos nos cromatogramas dos efluentes dos reatores, nos intervalos de tempo determinados, foram utilizados no cálculo das concentrações.

Determinações quantitativas de PCP, TCP e DCP, foram realizadas utilizando-se as equações de reta descritas no item 5.1.3.2. As concentrações de TeCP foram calculadas considerando-se que a recuperação de TeCP é próxima a 55% da recuperação de PCP, de acordo com KRIGSMAN & WANDERKAMP (1977). Desta forma, os picos obtidos nos cromatogramas, entre os tempos de retenção de PCP e TCP, foram considerados como correspondentes ao TeCP, tendo em vista que a ordem de eluição dos clorofenóis inicia-se pelos compostos menos clorados, ocorrendo sucessivamente, de acordo com o número de átomos de cloro na molécula. As áreas obtidas foram multiplicadas pelo inverso de 0,55 e calculadas pelas equações definidas para o PCP.

Na Tabela 5.13 são apresentadas as concentrações teóricas e determinadas de PCP no substrato, bem como as concentrações determinadas de PCP,



TeCP, TCP e DCP nos efluentes dos reatores. As diferenças observadas entre as concentrações teóricas e obtidas experimentalmente, possivelmente são devidas a erros de manipulação durante preparação do substrato.

Tabela 5.13: Concentrações de clorofenóis no afluente e efluente dos reatores

Dia de operação	Amostra	Concentrações determinadas (mg/L)					
		PCP _T *	PCP	TeCP**	TCP	DCP	E (%)***
5 ^o	substrato	0,2	0,26	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	•	0,58	~100%
	RAHLF ₂	-	-	-	-	0,31	~100%
9 ^o	substrato	0,2	0,19	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	0,24	~100%
	RAHLF ₂	-	-	-	-	-	~100%
13 ^o	substrato	0,4	0,30	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	-	~100%
	RAHLF ₂	-	•	-	-	-	~100%
15 ^o	substrato	0,4	0,32	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	-	~100%
	RAHLF ₂	-	-	-	-	-	~100%
17 ^o	substrato	0,4	0,32	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	-	~100%
	RAHLF ₂	-	•	-	-	-	~100%
20 ^o	substrato	1,0	1,0	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	•	0,02	0,75	~100%
	RAHLF ₂	-	•	•	•	0,22	~100%

* Concentração teórica de PCP

** Baseado no padrão de PCP

*** Eficiência de transformação de PCP

• abaixo do limite da curva

... continuação da Tabela 5.13

Dia de operação	Amostra	Concentrações determinadas (mg/L)					
		PCP _T *	PCP	TeCP**	TCP	DCP	E (%)***
23 ^o	substrato	1,0	0,92	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	•	0,05	0,52	~100%
	RAHLF ₂	-	•	•	-	0,25	~100%
26 ^o	substrato	1,0	1,18	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	•	•	2,15	~100%
	RAHLF ₂	-	•	-	-	-	~100%
28 ^o	substrato	2,0	2,26	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	0,03	~100%
	RAHLF ₂	-	0,10	•	0,07	-	96
35 ^o	substrato	2,0	1,88	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	0,80	~100%
	RAHLF ₂	-	•	-	-	-	~100%
37 ^o	substrato	4,0	3,19	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	-	~100%
	RAHLF ₂	-	•	-	-	-	~100%
42 ^o	substrato	4,0	3,26	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	0,19	-	~100%
	RAHLF ₂	-	•	-	-	-	~100%
44 ^o	substrato	6,0	5,2	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	-	~100%
	RAHLF ₂	-	•	-	-	-	~100%
46 ^o	substrato	6,0	5,21	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	-	~100%
	RAHLF ₂	-	•	-	-	-	~100%
48 ^o	substrato	6,0	5,22	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	-	-	-	~100%
	RAHLF ₂	-	•	•	0,02	-	~100%
50 ^o	substrato	6,0	6,1	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	0,14	-	-	-	98
	RAHLF ₂	-	•	-	•	0,75	~100%

* Concentração teórica de PCP

** Baseado no padrão de PCP

*** Eficiência de transformação de PCP

• abaixo do limite da curva

... continuação da tabela 5.13

Dia de operação	Amostra	Concentrações determinadas (mg/L)					E (%)***
		PCP _T *	PCP	TeCP**	TCP	DCP	
52 ^o	substrato	8,0	8,2	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	0,41	-	-	0,76	95
	RAHLF ₂	-	•	•	•	-	~100%
54 ^o	substrato	8,0	7,83	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	0,39	-	•	-	95
	RAHLF ₂	-	•	-	0,05	-	~100
56 ^o	substrato	8,0	8,10	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	0,51	-	•	-	95
	RAHLF ₂	-	•	•	•	-	~100
58 ^o	substrato	8,0	8,33	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	1,1	•	-	-	87
	RAHLF ₂	-	•	•	0,36	0,79	~100
60 ^o	substrato	8,0	8,4	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	3,8	0,10	-	1,22	55
	RAHLF ₂	-	0,36	-	0,13	3,30	96
62 ^o	substrato	8,0	8,38	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	3,78	-	-	-	54
	RAHLF ₂	-	•	0,23	0,57	1,20	~100
64 ^o	substrato	8,0	7,98	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	2,88	0,03	-	0,19	64
	RAHLF ₂	-	0,15	0,13	0,45	0,60	98
66 ^o	substrato	8,0	7,15	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	2,75	0,02	-	-	62
	RAHLF ₂	-	•	0,10	0,37	0,46	~100
70 ^o	substrato	8,0	6,83	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	3,79	0,10	-	0,61	44
	RAHLF ₂	-	0,18	0,10	0,38	1,49	97

* Concentração teórica de PCP

** Baseado no padrão de PCP

*** Eficiência de transformação de PCP

• abaixo do limite da curva

... continuação da tabela 5.13

Dia de operação	Amostra	Concentrações determinadas (mg/L)					
		PCP _T *	PCP	TcCP**	TCP	DCP	E (%)***
72 ^o	substrato	8,0	7,8	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	2,79	0,53	•	-	64
	RAHLF ₂	-	•	•	0,37	0,82	~100
74 ^o	substrato	8,0	7,79	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	2,49	0,75	0,28	-	68
	RAHLF ₂	-	•	0,10	0,79	3,6	~100
76 ^o	substrato	8,0	7,14	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	2,81	0,64	-	0,21	61
	RAHLF ₂	-	•	0,05	0,62	0,45	~100
78 ^o	substrato	4,0	4,53	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	2,6	1,56	-	-	43
	substrato	8,0	7,57	-	-	-	-
	RAHLF ₂	-	•	0,05	0,33	0,46	~100
81 ^o	substrato	4,0	4,54	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	1,4	1,14	-	-	69
	substrato	8,0	7,58	-	-	-	-
	RAHLF ₂	-	•	0,02	0,28	0,47	~100
85 ^o	substrato	4,0	3,81	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	1,0	0,87	•	0,59	74
	substrato	8,0	7,94	-	-	-	-
	RAHLF ₂	-	•	•	0,06	0,20	~100
87 ^o	substrato	4,0	3,75	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	0,92	0,93	•	-	76
	substrato	8,0	7,83	-	-	-	-
	RAHLF ₂	-	0,03	•	0,26	1,0	99,6

* Concentração teórica de PCP

** Baseado no padrão de PCP

*** Eficiência de transformação de PCP

• abaixo do limite da curva

... continuação da Tabela 513

Dia de operação	Amostra	Concentrações determinadas (mg/L)					E (%)***
		PCP _T *	PCP	TeCP**	TCP	DCP	
90 ^o	substrato	4,0	4,04	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	1,06	0,58	-	-	74
	substrato	8,0	6,81	-	-	-	-
	RAHLF ₂	-	•	•	0,20	0,32	~100
92 ^o	substrato	4,0	3,83	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	0,63	0,64	-	0,2	92
	substrato	8,0	7,63	-	-	-	-
	RAHLF ₂	-	•	•	0,10	0,30	~100
100 ^o	substrato	4,0	4,94	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	•	•	0,1	0,5	~100
	substrato	8,0	7,94	-	-	-	-
	RAHLF ₂	-	•	•	•	1,02	~100
104 ^o	substrato	8,0	7,74	-	-	-	-
	RAHLF ₁	-	0,11	0,51	0,07	-	98
	RAHLF ₂	-	•	-	•	0,23	~100

* Concentração teórica de PCP

** Baseado no padrão de PCP

*** Eficiência de transformação de PCP

• abaixo do limite da curva

Reator RAHLF₁

Na Figura 5.9 apresentam-se as concentrações de clorofenóis no efluente, durante período de adição de PCP ao substrato.

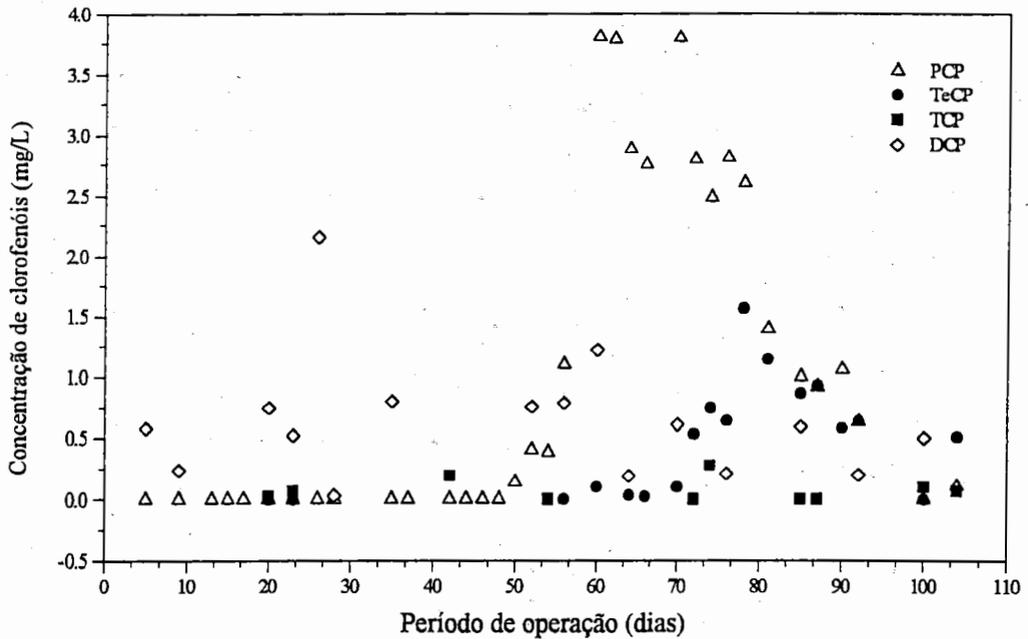


Figura 5.9: Concentração de clorofenóis no efluente do reator RAHLF₁.

No 5^o dia de operação, após início da adição de 0,20 mg/L (0,76 μM) de PCP ao substrato, foram determinados traços de PCP e TCP no efluente do reator, bem como 0,58 mg/L (3,56 μM) de DCP, indicando que a maior parte do PCP adicionado estava sendo metabolizada. Os resultados indicam que houve, possivelmente, adsorção temporária de PCP, devido à maior concentração no afluente que no efluente. Contudo, o PCP adsorvido foi desalogenado, e liberado no efluente do reator como clorofenol menos clorado. Segundo KENNEDY et al. (1992), a adsorção de 3,4DCP e 2,3,4TCP em lodo granulado de UASB foi quase completamente reversível. Contudo, os autores não puderam explicar as relações entre adsorção e número de substituintes.

No 9^o dia de operação com adição da concentração teórica de 0,2 mg/L (0,76 μM) de PCP e determinada de 0,19 mg/L, observou-se traço de PCP no efluente, abaixo do limite de determinação pela equação e 0,24 mg/L (1,48 μM) de DCP, indicando conversão do composto original, e possivelmente, adsorção parcial e momentânea, conforme citado anteriormente.

No período de adição de 0,4 mg/L de PCP ao substrato, com valor médio determinado de 0,32 mg/L, foram detectados apenas traços de PCP no efluente do reator.

Entre os 20^o e o 26^o dias a concentração de PCP adicionada ao substrato foi 1,0 mg/L (3,8 μ M), tendo sido determinados traços de PCP, TeCP e TCP no efluente, durante todo o período. A concentração de DCP no efluente foi de 0,60 mg/L (3,7 μ M), em média, até o 23^o dia, aumentando para 2,5 mg/L (15 μ M) no final do período. Ao que parece, o composto original ficou retido por determinado intervalo de tempo, até sua transformação em DCP, que não foi metabolizado totalmente e que possivelmente, foi dessorvido do lodo imobilizado.

Entre os dias 27^o e 35^o, quando foram adicionados 2,0 mg/L (7,5 μ M) de PCP como concentração teórica, os valores determinados foram, respectivamente, 2,26 e 1,88 mg/L. No 28^o dia foram determinados traços de PCP e DCP no efluente, enquanto que no 35^o, além de traços de PCP, determinou-se 0,80 mg/L (4,9 μ M) de DCP, indicando transformação do composto original. O DCP produzido não foi totalmente metabolizado no reator, possivelmente pelo tempo de residência insuficiente ou devido à inabilidade ou inibição dos microrganismos presentes na seção do reator em que foram acumulados temporariamente.

Durante adição de concentração teórica de 4,0 mg/L (15 μ M) de PCP e concentração média determinada de 3,22 mg/L de PCP no substrato, foram determinados apenas traços de PCP no 37^o dia e traços de PCP e 0,19 mg/L (1 μ M) de TCP no 42^o dia.

Quando a concentração teórica aumentou para 6,0 mg/L de PCP, a concentração determinada no substrato foi, em média, 5,21 mg/L nos dias 44^o, 46^o e 48^o e apenas traços de PCP foram determinados no efluente do reator, enquanto no 50^o dia, a concentração determinada de PCP foi 6,1 mg/L no substrato e 0,14 mg/L no efluente, com eficiência de remoção de 98%. Não foram encontrados metabólitos neste período.

Entre os 51^o e 76^o dias, a concentração teórica de PCP adicionada ao reator foi 8,0 mg/L, e a concentração média determinada de 7,8 mg/L, com coeficiente de variação de 7%. Entre os 52^o e 56^o dias de operação, a concentração de PCP no

efluente foi em média 0,44 mg/L, e a partir do 54^o dia traços de TCP e 0,88 mg/L (5,4 μ M) de DCP, em média, também foram determinados.

Entre os 60^o e 76^o dias de operação, a concentração de PCP no efluente foi em média 3,14 mg/L (11,8 μ M), variando de 2,49 a 3,80 mg/L. Neste período, a eficiência média de remoção de DQO foi de 59%, variando de 44 a 68%. A queda de eficiência iniciou-se no 58^o dia, quando 1,10 mg/L de PCP foi determinado no efluente, com redução da eficiência para 87%.

TeCP foi o metabólito predominante no efluente contudo, no 60^o dia determinou-se 1,22 mg/L (7,5 μ M) de DCP, situação esta que se repetiu nos dias 64^o e 70^o e 76^o, com concentrações de 0,19; 0,61 e 0,21 mg/L, respectivamente. TCP foi determinado apenas nos dias 72^o e 74^o, em que 0,28 mg/L (1,43 μ M) da substância foram desalogenados para 0,21 mg/L (1,30 μ M) de DCP, no 76^o dia.

Os resultados mostrando ocorrência e aumento na concentração de TeCP, em relação ao período anterior, sugerem inibição parcial da atividade de desalogenação de metabólitos mais clorados. Contudo, a presença de DCP e o desaparecimento de TCP indicaram que esta atividade não estava totalmente inibida.

No 74^o dia foi realizado perfil de concentração de clorofenóis ao longo do reator, com resultados apresentados na Tabela 5.14, ilustrados na Figura 5.10.

Tabela 5.14: Perfil de concentrações de clorofenóis no RAHLF₁

74^o dia $[PCP]_{Teórica} = 8,0$ mg/L

Ponto de amostragem	Concentrações determinadas (mg/L)			
	PCP	TeCP*	TCP	DCP
entrada	6,95	-	-	-
01	1,40	3,00	0,10	0,40
02	1,71	1,34	0,12	0,46
03	2,42	0,59	-	-
04	2,52	0,64	-	-
saída	2,49	0,75	-	0,53

* Concentração estimada, considerando 55% de recuperação em relação ao PCP.

Os resultados indicaram que entre a entrada, com 6,75 mg/L e o 1º ponto de amostragem, com 1,40 mg/L de PCP, houve redução de 80% do PCP, que se transformou em 3,0 mg/L (13 µM) de TeCP, 0,10 mg/L de TCP e 0,40 mg/L de DCP. No 2º ponto, a concentração de PCP permaneceu praticamente constante, em relação ao ponto anterior, tendo havido redução na concentração de TeCP para 1,34 mg/L, indicando capacidade dos microrganismos nessa secção do reator em desalogenar a substância. A partir desse ponto, a concentração de PCP aumentou, em média, para 2,48 mg/L, possivelmente devido a caminhos preferenciais e à inabilidade dos microrganismos presentes nas secções, após o segundo ponto do reator, em desalogenar PCP.

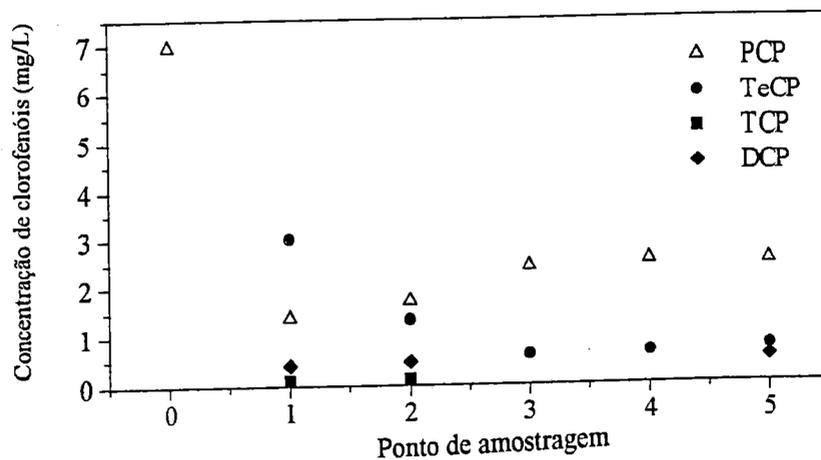


Figura 5.10: Perfil de concentração de clorofenóis no RAHLF₁ - 74º dia de operação
 $[PCP]_{teórico} = 8,0 \text{ mg/L}$.

Entre o 2º e 3º pontos, houve redução de 60% da concentração de TeCP, permanecendo, em média, até a saída do reator em 0,66 mg/L (3 µM), demonstrando habilidade dos microrganismos, presentes nesse intervalo, em desalogenar TeCP.

A partir do ponto 2, não foi determinado TCP, possivelmente devido à sua degradação, entre os pontos 2 e 3, o mesmo ocorrendo com DCP. Contudo, na saída do reator foi detectado DCP na concentração de 0,53 mg/L (3,3 µM), possivelmente devido a degradação de PCP, que atingiu este ponto, devido a caminhos preferenciais.

No 76^o dia de operação, após oito horas ^{de} alimentação, e interrupção na alimentação por 30 horas, o perfil de concentração de clorofenóis foi repetido e os resultados são apresentados na Tabela 5.15 e Figura 5.11.

Tabela 5.15: Perfil de concentrações de clorofenóis no RAHLF₁

76^o dia $[PCP]_{Teórica} = 8,0 \text{ mg/L}$

Concentrações determinadas (mg/L)				
Ponto de amostragem	PCP	TeCP*	TCP	DCP
entrada	6,92	-	-	-
01	1,40	3,18	0,04	-
02	1,84	1,93	•	-
03	1,86	0,75	-	-
04	2,66	0,35	-	0,80
saída	2,81	0,64	0,10	0,21

* Concentração estimada, considerando 55% de recuperação em relação ao PCP.

• abaixo do limite da curva

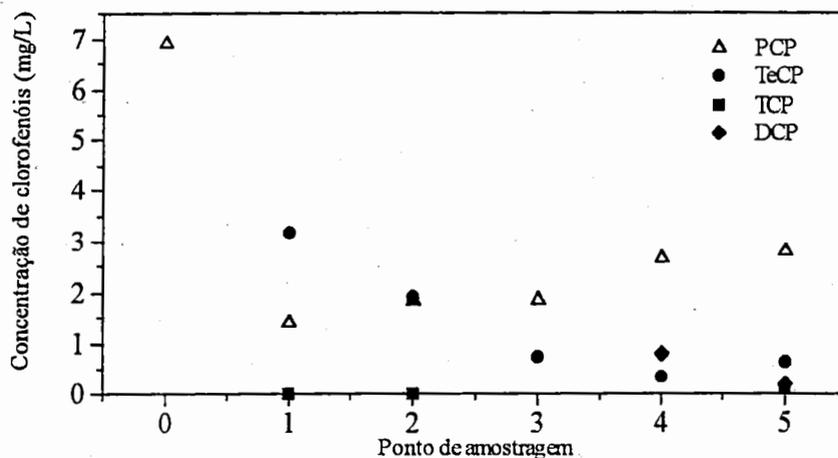


Figura 5.11: Perfil de concentração de clorofenóis no RAHLF₁ - 76^o dia de operação
 $[PCP]_{teórico} = 8,0 \text{ mg/L}$.

Os resultados, semelhantes ao do 74^o dia, mostraram que entre a entrada e o primeiro ponto houve redução de 83% da concentração de PCP, permanecendo 1,40 mg/L. A degradação de TeCP ocorreu ao longo do reator, até o quarto ponto, sendo a percentagem de degradação, da ordem de 50%, semelhante nos três segmentos. A presença de 0,64 mg/L de TeCP no reator, superior aos 0,35 mg/L determinados no

mg/L. A degradação de TeCP ocorreu ao longo do reator, até o quarto ponto, sendo a percentagem de degradação, da ordem de 50%, semelhante nos três segmentos. A presença de 0,64 mg/L de TeCP no reator, superior aos 0,35 mg/L determinados no quarto ponto, indica a ocorrência de curto-circuito, fato confirmado pela concentração de 2,81 mg/L ($11\mu\text{M}$) de PCP na saída do reator.

O TCP presente nos pontos 1 e 2, segundo perfil do dia 74^o foi desalogenado, o mesmo ocorrendo com DCP presente nestes pontos. Nos pontos 3 e 4 parece ter havido desalogenação de TeCP, com respectivo aumento na concentração de DCP no quarto ponto e TCP e DCP na saída. A presença de fenóis menos clorados no efluente do reator pode ter sido ocasionada pela inibição parcial pelo PCP dos microrganismos participantes pelo PCP, devido à ocorrência de curto-circuito, indicando porém que a rota de desalogenação não foi totalmente inibida.

Provavelmente, apenas os microrganismos situados na primeira seção do reator estavam aptos a degradar PCP. A partir da seção dois, ocorreu acúmulo de PCP, sem contudo inibir a desalogenação do metabólitos menos clorados, que normalmente ocorriam nestas seções.

Além disto, o aumento de carga orgânica e de PCP ao longo do período de adição de PCP ao substrato, pode ter ocasionado alteração da comunidade biológica na seção inicial do reator, diminuindo sua capacidade de desalogenação de PCP, conforme pode ser observado nos perfis dos dias 74^o e 76^o. Este foi transferido para outros setores ao longo do reator, nos quais possivelmente não havia comunidade de microrganismos aptos a promoverem sua descloração. Pode ter ocorrido, também, que as condições ideais para a descloração de PCP situavam-se na primeira seção do reator.

Conforme citado anteriormente, entre os dias 77^o e 100^o a concentração de PCP no substrato foi reduzida para 4,0 mg/L, tendo sido determinada, em média, 4,1 mg/L ($16\mu\text{M}$), com coeficiente de variação de 8%.

No 78^o dia, a concentração de PCP no efluente foi 2,6 mg/L ($10\mu\text{M}$) e a de TeCP 1,56 mg/L ($7\mu\text{M}$). Nenhum outro metabólito foi determinado. A somatória do número de moles dos clorofenóis determinados no efluente aproximaram-se do número de moles de PCP adicionado, indicando inibição da desalogenação de TeCP e PCP.

A partir do 81^o dia, ainda com concentração de PCP no substrato de 4,0 mg/L, a concentração de PCP no efluente foi em média 1,10 mg/L, com coeficiente de variação de 15% até o 92^o dia, tendo sido detectado apenas traço de PCP no 100^o dia de operação.

A concentração de TeCP apresentou declínio gradativo, diminuindo de 1,56 mg/L para traços da substância no 100^o dia de operação. Traços de TCP foram determinados no período, sendo no 100^o dia de 0,10 mg/L.

No 85^o dia foram detectados, além de PCP e TeCP, traço de TCP e 0,59 mg/L de DCP no efluente. Somente no 92^o dia observou-se novamente 0,20 mg/L de DCP no efluente, as concentrações de 0,63 mg/L de PCP e de TeCP.

Na Tabela 5.16 e Figura 5.12 são apresentados os resultados do perfil de concentração de clorofenóis efetuado no 85^o dia de operação.

Tabela 5.16: Perfil de concentrações de clorofenóis no RAHLF₁

85^o dia $[PCP]_{Teórica} = 4,0$ mg/L

Concentrações determinadas (mg/L)				
Ponto de amostragem	PCP	TeCP*	TCP	DCP
entrada	5,36	-	-	-
01	0,07	1,65	0,17	0,36
02	0,59	1,23	♦	0,47
03	0,63	1,04	♦	-
04	0,89	0,75	-	-
saída	0,92	0,96	♦	0,38

* Concentração estimada, considerando 55% de recuperação em relação ao PCP.

♦ abaixo do limite da curva

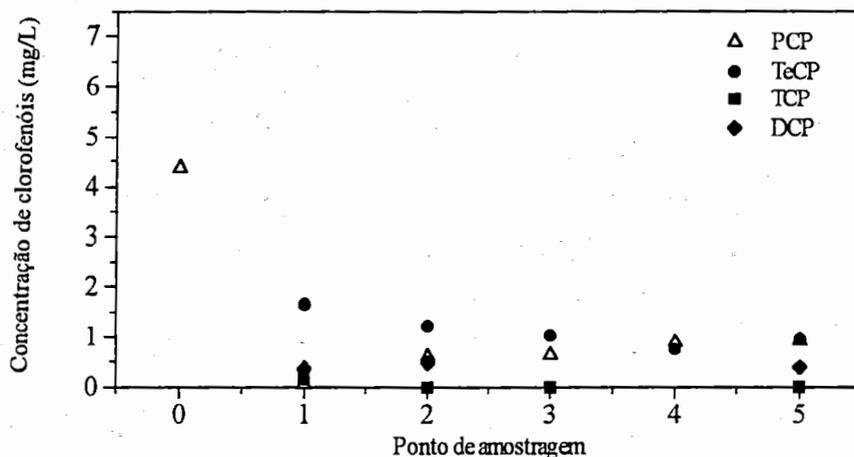


Figura 5.12: Perfil de concentração de clorofenóis no RAHLF₁ - 85^o dia de operação
 $[PCP]_{teórico} = 4,0$ mg/L.

Neste teste, a concentração afluente determinada de PCP foi 5,36 mg/L (20 μ M). Determinou-se no primeiro ponto apenas traço de PCP e 1,65 mg/L (7 μ M) de TeCP, 0,17 mg/L (1 μ M) de TCP e 0,36 mg/L (2 μ M) de DCP, indicando boa capacidade de desalogenação de clorofenóis. A partir do segundo ponto, a concentração de PCP aumentou para 0,61 mg/L em média, até o terceiro ponto e para 0,91 mg/L (4 μ M) em média, no quarto ponto e efluente do reator, indicando curto-circuito. A concentração de TeCP, entre o segundo e quarto pontos, caiu de 1,65 para 0,75 mg/L, sendo a percentagem de transformação próxima de 20% em cada segmento, indicando capacidade dos microrganismos na desalogenação da substância nesses segmentos do reator. O aumento na concentração de TeCP no efluente para 0,96 mg/L (4,2 μ M) indicou a presença de curto-circuito. TCP e DCP foram detectados, nas concentrações de 0,17 e 0,36 mg/L no primeiro ponto, sendo no segundo detectado 0,47 mg/L de DCP. Traços de TCP foram determinados no segundo e terceiro pontos e no efluente do reator, que apresentou também 0,38 mg/L (2,3 μ M) de DCP. Apesar do curto-circuito ter sido reduzido nesta ocasião, a concentração praticamente constante de PCP, a partir do segundo ponto e a presença de metabólito menos clorado no efluente podem ser explicadas de maneira idêntica aos resultados dos perfis anteriores.

No 100^o dia, foram detectados traços de PCP e TeCP, além de 0,1 mg/L de TCP e 0,5 mg/L de DCP.

Após o 100^o dia a concentração teórica de PCP foi elevada para 8,0 mg/L, tendo sido determinada no 104^o dia 7,74 mg/L. No efluente do reator foram detectados: 0,11 mg/L de PCP, 0,51 mg/L de TeCP e traço de TCP, indicando que o aumento de concentração não causou efeito deletério nas reações de desalogenação que ocorreram no reator. Ao que parece, a redução da concentração de PCP no efluente, possivelmente devido à redução do curto-circuito, eliminou a causa de inibição nas seções subsequentes para as bactérias que participaram da desalogenação de fenóis menos clorados.

Reator RAHLF₂

Na Figura 5.13 apresentam-se as concentrações de clorofenóis no efluente, durante período de adição de PCP ao substrato.

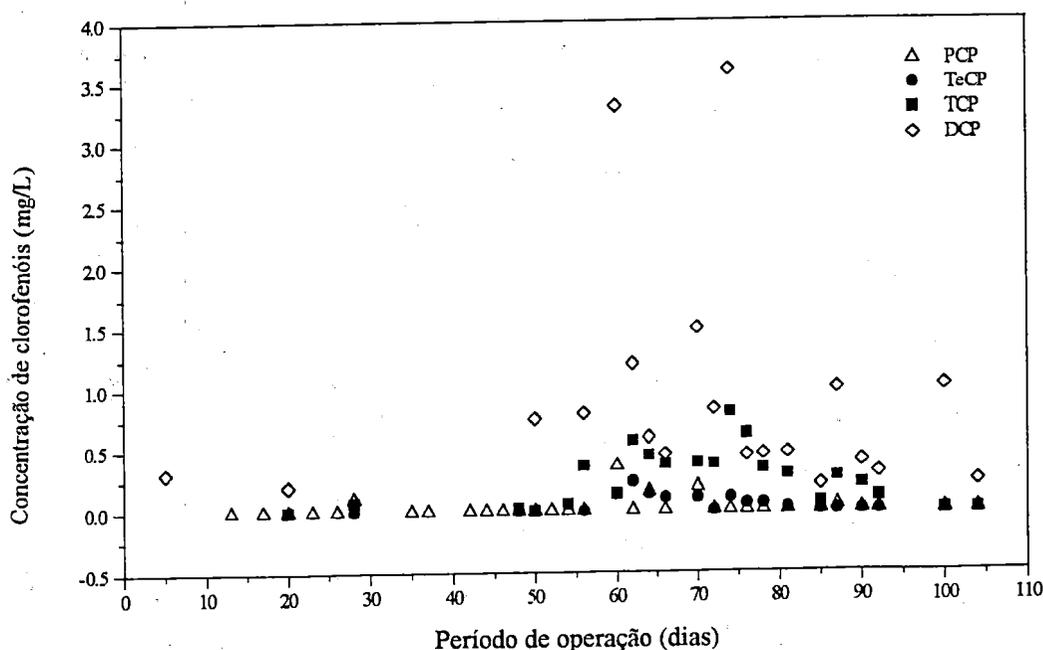


Figura 5.13: Concentração de clorofenóis no efluente do reator RAHLF₂.

Após cinco dias sob concentração de PCP de 0,20 mg/L (0,75 μ M), no efluente do reator foi determinado apenas DCP na concentração de 0,31 mg/L (1,89 μ M). Como citado anteriormente, o número de moles de clorofenóis no efluente,

superior ao do substrato, pode ter sido causado pelo acúmulo temporário de PCP por adsorção, até sua desalogenação. O clorofenol menos clorado foi então liberado no efluente do reator.

No 9^o dia de operação nenhum clorofenol foi detectado no efluente, o mesmo ocorrendo no 15^o dia, sob concentração de 0,32 mg/L de PCP. Nos demais dias deste período, foi detectado apenas traço de PCP no efluente.

Logo após alteração da concentração de PCP para 1,0 mg/L (3,79 μ M), foram detectados traços de PCP, TeCP e TCP e 0,22 mg/L (1,34 μ M) de DCP, situação mantida até o 23^o dia, cinco dias após início da adição de 1,0 mg/L de PCP. A partir deste dia, sob a mesma concentração de PCP, apenas traços de PCP foram determinados no efluente do reator, indicando que com o aumento de carga de PCP aplicada, o reator apresentou período de transição para adaptação à nova carga, indicada pela presença temporária do composto original e pequeno acúmulo de metabólitos.

Quando a concentração teórica de PCP foi elevada para 2,0 mg/L (7,58 μ M), com valor determinada de 2,56 mg/L (9,70 μ M), foram determinados no efluente 0,10 mg/L (0,38 μ M) de PCP e traços de TeCP e PCP e após sete dias, no 35^o dia de operação, não foram detectados metabólitos, mas apenas traços de PCP.

Durante adição de 4,0 mg/L (15,15 μ M) de PCP, e concentração média determinada de 3,23 mg/L (12,2 μ M), apenas traços de PCP foram encontrados no efluente. Estes resultados persistiram por quatro dias, após início de adição de 6,0 mg/L (22,73 μ M) de PCP, indicando habilidade dos microrganismos em degradar a substância adicionada e os metabólitos produzidos, inclusive DCP. Após este período, com concentração determinada de 5,20 mg/L (9,70 μ M), foram encontrados além de traços de PCP, traços de TeCP e TCP, e no final do período, cinco dias depois, além de traços destes metabólitos, foi determinado 0,69 mg/L (4,21 mM) de DCP, sinalizando pequeno acúmulo de metabólito.

Durante período de adição de 8,0 mg/L (30,3 μ M) de PCP, que foi do 51^o ao 104^o dia, traços de PCP e TeCP foram detectados no efluente, exceto em três situações nas quais a concentração de PCP atingiu 0,36 mg/L (1,36 μ M) e a de TeCP

0,23 mg/L (1,0 μ M), indicando que os microrganismos presentes no reator apresentavam habilidade na descloração desse clorofenóis.

A partir do 58^o dia, 6 dias após início do aumento da concentração para 8,0 mg/L, foram detectados TCP e DCP no efluente. A partir de então, a concentração média de TCP foi de 0,39 mg/L (2,0 μ M), com valor máximo de 0,79 mg/L (4,0 μ M), exceto para os dias 85^o, 92^o e 100^o, em que foi da ordem de traços. A concentração média de DCP foi de 0,98 mg/L (6,0 μ M), atingindo 3,30 mg/L (20,1 μ M) no 60^o dia e 3,60 mg/L (22,0 μ M) no 74^o. Nessas duas ocasiões pode ser constatado que a rota de degradação de PCP foi praticamente interrompida no DCP, sendo dois terços do PCP adicionado detectado como diclorofenol.

Os resultados sugeriram que os microrganismos participantes do processo de descloração de fenóis menos clorados não estavam capacitados a suportar aumento de carga, e que parte do PCP possa ter sido desalogenada em seções posteriores à primeira parte do reator, causando inibição da desalogenação dos compostos menos clorados ou mesmo diminuindo o tempo de contato com estas substâncias, pelo retardamento na degradação do PCP.

Contudo, os resultados do perfil de concentração de clorofenóis efetuado no 75^o dia e apresentado na Tabela 5.17, contestam essas hipóteses.

Tabela 5.17: Perfil de concentrações de clorofenóis no RAHLF₂

75^o dia [PCP]_{Teórica} = 8,0 mg/L

Concentrações determinadas (mg/L)				
Ponto de amostragem	PCP	TeCP*	TCP	DCP
entrada	6,92	-	-	-
01	0,13	♦	0,10	-
saída	♦	0,10	0,39	0,44

* Concentração estimada, considerando 55% de recuperação em relação ao PCP.

♦ abaixo do limite da curva

Os resultados mostram que a concentração de PCP foi reduzida em 98% até o primeiro ponto, onde foram determinados apenas traços de TeCP e 0,10 mg/L de TCP, sugerindo que até esta seção do reator houve desalogenação de todos os metabólitos detectados pelo procedimento analítico utilizado. No efluente do reator

determinou-se apenas traço de PCP, indicando que existem microrganismos aptos à desalogenação de PCP ao longo do reator, e que o PCP remanescente no ponto um, transformou-se em TeCP. A presença de 0,44 mg/L (2,7 μ M) de DCP no efluente, comparando-se aos 3,6 mg/L do dia anterior, sugere que a diminuição da capacidade de degradação de diclorofenol, observada entre os dias 60^o e 74^o foi revertida.

Comparação da degradação de PCP nos reatores RAHLF₁ e RAHLF₂

A comparação do desempenho dos reatores RAHLF na degradação de PCP foi realizada considerando-se as cargas de PCP aplicadas ao reator, de acordo com apresentado nas Tabelas 5.10 e 5.11.

Os resultados mostram que a taxa de PCP aplicada foi entre 50 e 70% superior no reator RAHLF₂, a partir do período inicial de adição, quando os valores foram semelhantes.

Tendo em vista que o inóculo e substrato utilizados foram os mesmos para os dois reatores, e o reator menor esteve sujeito a maiores taxas de carregamento orgânico, hidráulico e de PCP, é possível afirmar que a falha na degradação do PCP, apresentada no reator RAHLF₁ foi ocasionada por problemas hidrodinâmicos no reator.

A eficiência de remoção de PCP foi superior a 99% para taxa máxima de PCP de 4,15 mgPCP/L dia, mantida por 54 dias no RAHLF₂. No final do período, foram detectados 0,23 mg/L (1,40 μ M) de DCP no efluente.

Após 100 dias do início da adição de PCP, exames microbiológicos do lodo do RAHLF₁, retirados dos pontos 1 e 2, indicaram, através de microscopia de contraste de fase e de fluorescência, a presença marcante do gênero *Methanosarcina* sp, como pode ser verificado respectivamente, nas figuras 5.14a e 5.14b.

Esta bactéria é o gênero mais versátil do grupo metanogênico, podendo utilizar diferentes substratos, como acetato e hidrogênio e dióxido de carbono. Segundo FORESTI (1994), para baixos valores de concentração de substrato, deverá ocorrer predominância de *Methanothrix* sp., enquanto para valores elevados deverá prevalecer a espécie *Methanosarcina* sp. Os resultados observados evidenciam a ocorrência de

curto-circuito, citada anteriormente, quando seções anteriormente expostas a baixas concentrações de matéria orgânica foram submetidas a aumentos de carga.

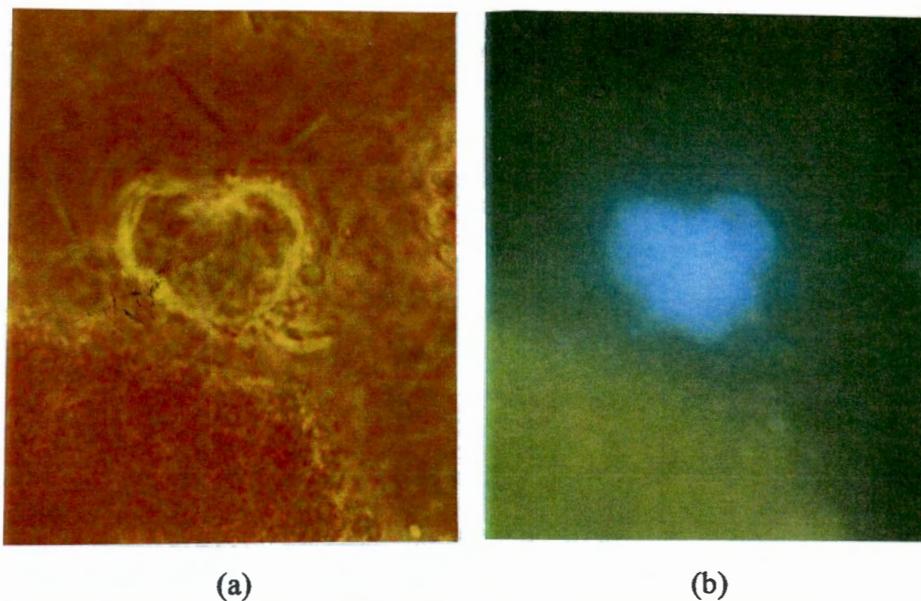


Figura 5.14. Fotos de bactérias do gênero *Methanosarcina* sp (a) microscopia de contraste de fase (b) fluorescência (RAHLF₁ - pontos 1 e 2) (objetiva 100, ocular 10, zoom 1,25 + aumento da revelação)

Nas amostras também foram observados cocobacilos e bacilos fluorescentes (Figura 5.15) relacionados aos gêneros hidrogenotróficos, anteriormente citados.



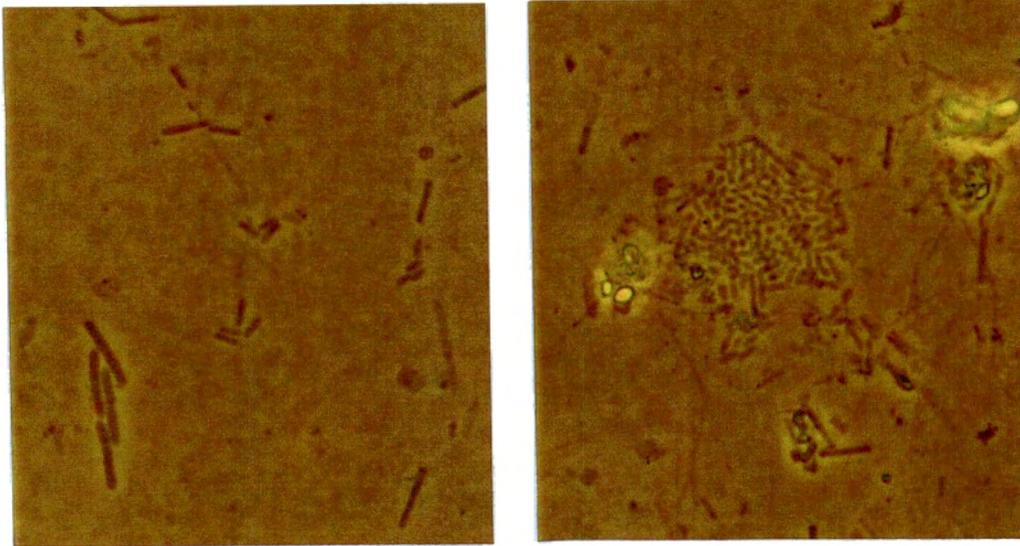
Figura 5.15 : Fotos de cocobacilos e bacilos fluorescentes - Microscopia de fluorescência RAHLF₁

Na figura 5.16, de amostra retirada do ponto 1 do RAHLF₁, mostra a variedade de formas de bactérias presentes no sistema. Destacam-se filamento longo e os bacilos de pontas retas, em sua maioria livres. Estes foram relacionados ao gênero *Methanothrix* sp, pois o formato das células crescidas livres, ou seja, sem formar filamentos, é bastante semelhante ao que se encontra para esse gênero metanogênico.



Figura 5.16. Fotos de filamento longo e bacilos de pontas retas - Microscopia comum por contraste de fase RAHLF₁ (ponto 1):

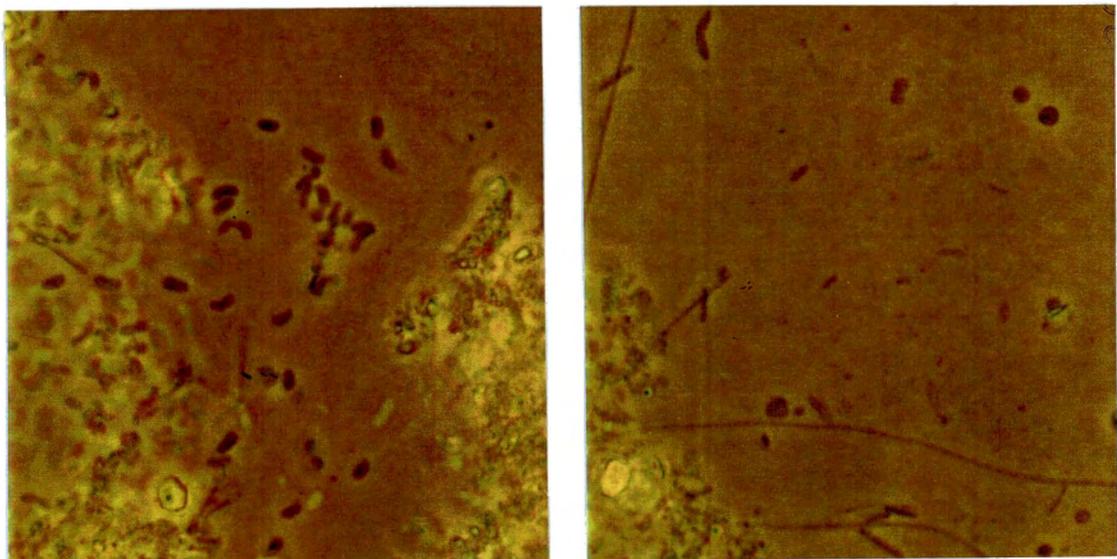
As amostras retiradas do RAHLF₂ apresentaram-se mais limpas, ou seja, houve menor variedade de morfologias que nas amostras do RAHLF₁. A Figura 5.17a revela a presença de bacilos de diferentes tamanhos alguns retos, mais espessos ou mais delgados. Na Figura 5.17b observam-se bacilos pequenos, formando aglomerados muito bem arranjados. Essas morfologias não foram relacionadas às metanogênicas, que estiveram destacadamente presentes. No RAHLF₂ observou-se também bactérias do gênero *Methanosarcina* sp em abundância. Além disso, nas amostras do ponto 2 verificaram-se morfologias diferentes, como víbrios (cocos em pares), como mostrado nas Figuras 5.18a e 5.18b. Bacilos com pontas retas, em sua maioria livres, relacionados ao gênero *Methanothrix* sp, também estiveram presentes.



(a)

(b)

Figura 5.17: Fotos de (a) Bacilos de diferentes tamanhos alguns retos, mais espessos ou mais delgados. (b) bacilos pequenos, formando aglomerados muito bem arranjados - RAHLF₂ (Microscopia por contraste de fase)



(a)

(b)

Figura 5.18: Fotos de: (a) víbrios (cocos em pares) (b) Bacilos com pontas retas, relacionados ao gênero *Methanothrix* sp - Microscopia por contraste de fase - RAHLF₂

O exame por microscopia de varredura, após cem dias de adição de PCP aos reatores revelou pontos importantes: O RAHLF₁ apresentou nesse período predominantemente bactérias metanogênicas relacionadas ao gênero *Methanothrix* sp aderidas ao meio suporte no ponto 1 (Figura 5.19), enquanto no ponto 4 essas bactérias foram encontradas em conjunto com outras estruturas celulares, como bacilos pequenos (Figura 5.20). No reator RAHLF₂ destacou-se a presença de aglomerados de bacilos em forma de víbrios, formando pacotes muito homogêneos aderidos ao meio suporte (Figura 5.21), bacilos em formato de víbrios e outras morfologias celulares (Figura 5.22).

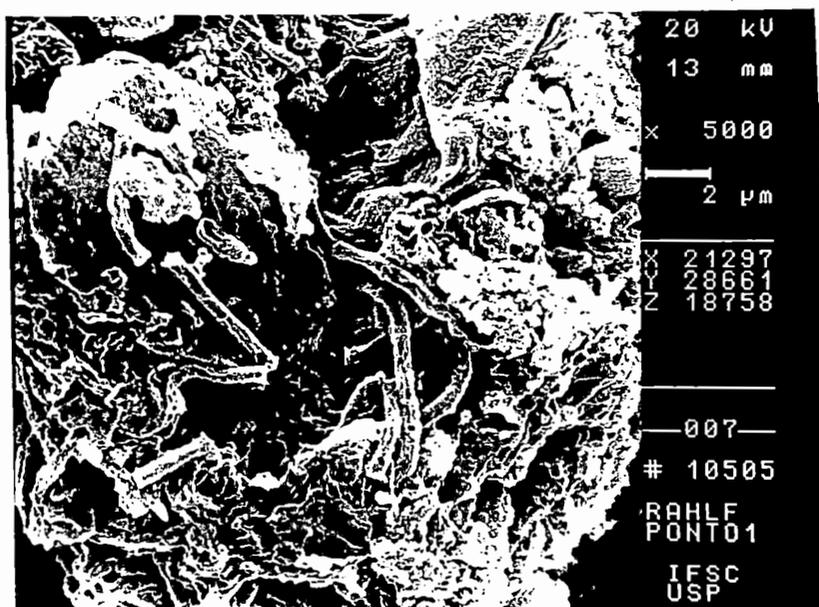


Figura 5.19 Fotos: Predominância de bactérias metanogênicas relacionadas ao gênero *Methanothrix* sp Microscopia de varredura (RAHLF₁ - ponto 1)

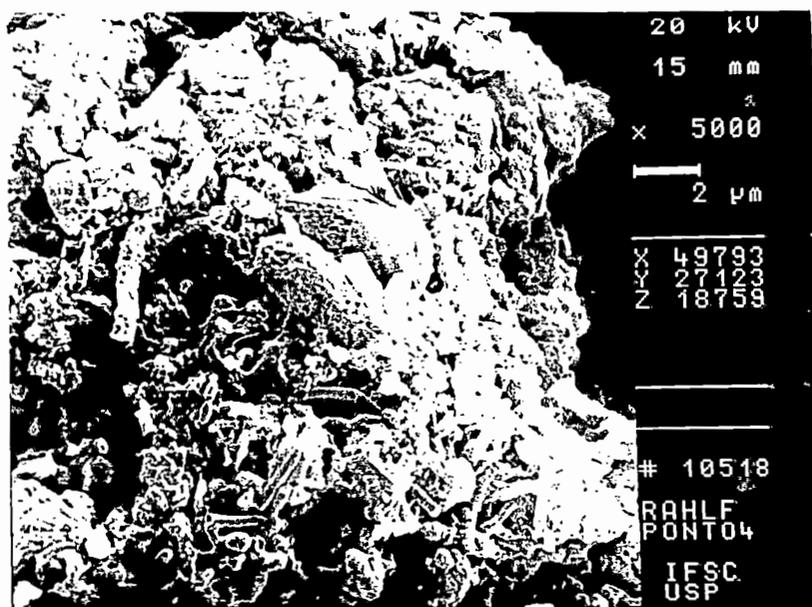


Figura 5.20: Fotos de bactérias do gênero *Methanotrix* sp em conjunto com outras estruturas celulares, como bacilos pequenos - Microscopia de varredura (RAHLF₁ - ponto 4)



Figura 5.21: Fotos de: aglomerados de bacilos em forma de víbrios - Microscopia de varredura (RAHLF₂)

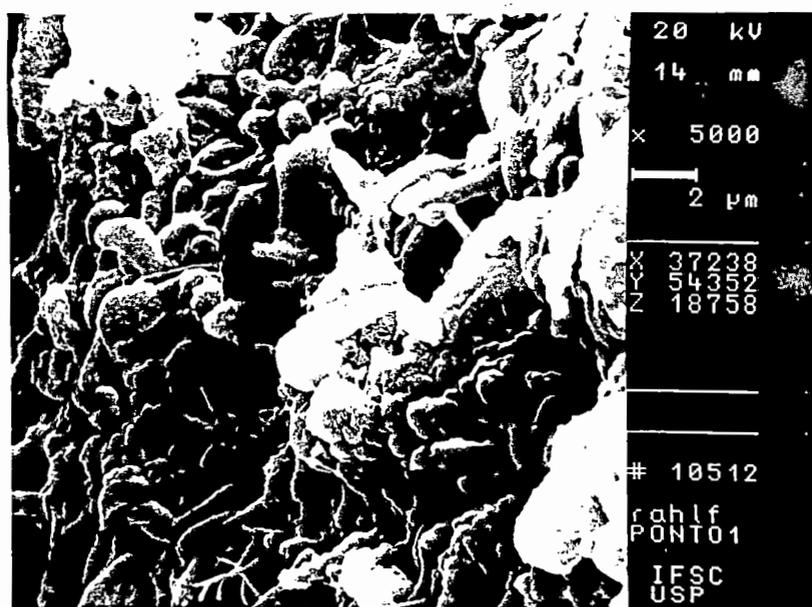


Figura 5.22:Foto de bacilos em formato de vibrios e outras morfologias celulares - Microscopia de varredura (RAHLF₂)

As morfologias não metanogênicas, particularmente vibrios, poderiam ser relacionadas à degradação de PCP. Gêneros de redutoras de sulfato, *Desulfomonile tiedjei* e *Desulfobacterium dehalogenans* têm sido relacionados com as reações de desalogenação redutiva de organoclorados (MOHN & TIEDJEI, 1992; UTKIN et al. , 1995).

Comparação com resultados citados na literatura

DUFF et al. (1995) e HENDRIKSEN et al. (1992) estudando remoção de PCP em reatores UASB e HENDRIKSEN et al. (1991) em reator de leito fixo, com cerâmica como meio suporte, obtiveram eficiências de remoção de PCP de 99%. As taxas de aplicação de PCP foram de 0,33 mgPCP/L dia, com concentração de PCP no substrato de 1,0 mg/L para o primeiro e 2,2 mgPCP/L dia, com 3,0 mg/L de PCP no substrato e 0,70 mgPCP/L dia, com 2,0 mg/L, respectivamente para os dois últimos. Os tempos de retenção variaram de dois a três dias e as taxas de carregamento orgânico

foram próximas a 0,4 gDQO/L dia. As eficiências de remoção de DQO nos reatores foram próximas a 100%, sendo fenol a fonte de carbono utilizada por DUFF et al. (1995) e glicose para os demais. Os autores citados aumentaram gradualmente a taxa de aplicação de PCP, permitindo a adaptação dos microrganismos. Segundo HENDRIKSEN et al. (1991) TCP foi o metabólito predominante no efluente, enquanto no estudo de HENDRIKSEN et al. (1992), os autores observaram após dez meses de operação 0,20 mg/L de DCP e traços dos demais metabólitos e PCP.

Diferentemente dos resultados citados, WU et al. (1993) obtiveram eficiência de remoção de remoção de PCP de 99% em reator UASB, sob 97 mgPCP/L dia, mantidos pela adição de solução de 60 mg/L de PCP, que eram diluídos através de recirculação do efluente para 1,0 mg/L. A T.C.O foi mantida em 16,2 gDQO/L dia, sendo metanol e ácidos acético, butírico e propiônico utilizados como fontes de carbono e a eficiência de remoção de DQO próxima a 100%. Segundo os autores não foram detectados clorofenóis no efluente.

Comparado aos resultados apresentados, os reatores RAHLF utilizados neste trabalho suportaram, com estabilidade e eficiência de remoção próxima a 99%, até 4,15 mgPCP/L dia, com 8,0 mg/L de PCP no substrato, superiores aos obtidos por DUFF et al. (1995), HENDRIKSEN et al. (1992), HENDRIKSEN et al. (1991). Contudo, os resultados obtidos por WU et al (1993) foram surpreendentemente superiores aos obtidos. A T.C.O. nessa ocasião foi de 1,70 gDQO/L dia, com eficiência de remoção de 99%. A relação DQO/PCP foi semelhante aos trabalhos utilizados na comparação.

Na Tabela 5.18 é apresentado um resumo das comparações dos resultados obtidos nesta tese com resultados apresentados na literatura.

Tabela 5.18. Comparação com resultados citados na literatura

Autor	Reator	T.PCP (mg/Ldia)	[PCP] (mg/L)	θ_h (dias)	T.C.O (g DQO/Ldia)	Substrato	Metabólito
DUFF et al. (1995)	UASB	0,33	1,0	2 - 3	0,4	fenol	DCP
HENDRIKSEN et al. (1992)	UASB	2,2	3,0	2 - 3	0,4	glicose	DCP
HENDRIKSEN et al. (1991)	LEITO FIXO	0,70	2,0	2 - 3	0,4	glicose	TCP
WU et al. (1993)	UASB	97	60,0		16,2	metanol, HAc, HBu, HPr	não detectado
Este trabalho	RAHLF	4,15	8,0	0,75	1,7	glicose, HAc, HFo	DCP

- Eficiência de remoção de DQO ~ 100%

- Eficiência de remoção de PCP ~ 99%



5.3.1. ADSORÇÃO DE CLOROFENÓIS NO LODO IMOBILIZADO

Conforme citação anterior, efetuou-se estudo de adsorção de clorofenóis ao lodo imobilizado, visando avaliar a parcela de PCP adsorvida na biomassa imobilizada, tendo em vista a impossibilidade de efetuar-se balanço de massa, uma vez que a metodologia analítica não permite a determinação de monoclorofenóis, e nem de fenol. Além disso, pretendeu-se formular hipótese sobre a presença, em algumas situações, de concentrações de clorofenóis efluentes, superiores às afluentes.

Os testes foram realizados apenas no 93^o dia de operação para o reator RAHLF₁ e no 96^o dia no RAHLF₂, devido à possibilidade de ocorrência de problemas ocasionados pela retirada de material dos reatores ao longo do experimento.

Nas Tabelas 5.19 e 5.20 são apresentados os resultados obtidos para as massas de clorofenóis adsorvidas na biomassa imobilizada, respectivamente, para RAHLF₁ e RAHLF₂.

Para análise dos resultados serão utilizados os valores médios obtidos em cada ponto de amostragem, tendo em vista que as amostras foram retiradas aleatoriamente do reator, podendo estar sujeitas a situações diferenciadas. Para auxiliar a discussão dos resultados, apresenta-se nas Tabelas 5.21, 5.22 e 5.23, a avaliação da quantidade de biomassa imobilizada presente nos reatores, por ocasião da inoculação e após 100 dias de operação.

Tabela 5.19: Perfil de adsorção de clorofenóis no lodo imobilizado - RAHLF₁ (93º dia de operação - [PCP]_{Teórica} = 8,0 mg/L)

Ponto de amostragem	amostra	massa de lodo imobilizado (g) A	massa de espuma seca (mg) - B	massa de PCP (µg) - C	C/A (µg/g)	massa de TeCP* (µg) - D	D/A (µg/g)	massa de TCP (µg) - E	E/A (µg/g)	massa de DCP (µg) - F	F/A (µg/g)
01	1.1	0,1277	54	1,2	7,2	21,6	169,1	6,2	48,6	-	0
	1.2	0,1623	26	0,8	14,4	12,5	77,0	4,6	28,3	-	0
	1.3	0,2454	47	0,8	7,3	15,9	64,8	4,3	17,5	-	0
	média			0,9	9,6	16,7	103,6	5,0	31,5		
02	2.1	0,0971	39	2,0	16,6	9,5	97,8	3,5	36,0	-	0
	2.2	0,1520	44	2,1	13,2	13,3	87,5	3,5	23,0	7,2	47,4
	2.3	0,1304	44	3,1	23,9	11,0	84,4	3,4	26,1	-	0
	média			2,4	17,9	11,3	89,9	3,5	28,4	2,5	15,8
03	3.1	0,1234	54	1,4	14,4	12,9	104,5	3,8	30,8	-	0
	3.2	0,1558	68	1,4	9,0	11,2	71,9	3,3	21,2	2,8	17,9
	3.3	0,1276	47	1,2	9,2	9,0	70,5	3,2	25,1	4,6	36,1
	média			1,3	10,9	11,0	82,3	3,4	25,7	2,5	17,9
04	4.1	0,1652	45	2,0	15,5	12,1	73,2	3,2	19,4	-	0
	4.2	0,0548	51	2,4	14,9	4,9	89,4	-	0	-	0
	4.3	0,1126	66	1,6	6,3	6,3	55,9	-	0	4,6	40,9
	média			2,0	12,2	7,8	72,8	1,1	6,5	1,1	13,6

* TeCP: Concentração estimada, considerando 55% de recuperação em relação ao PCP

Tabela 5.20: Perfil de adsorção de clorofenóis no lodo imobilizado - RAHLF₂ (96º dia de operação - [PCP]_{Teórica} = 8,0 mg/L)

Ponto de amostragem	amostra	massa de lodo imobilizado (g) - A	massa de espuma seca (mg) - B	massa de PCP (µg) - C	C / A (µg / g)	massa de TeCP* (µg) - D	D / A (µg / g)	massa de TCP (µg) - E	E / A (µg / g)	massa de DCP (µg) - F	F / A (µg / g)
01	1.1	0,1508	21,0	0,3	2,1	0,7	4,6	2,7	17,9	0	0
	1.2	0,1618	16,0	0	0	0,5	3,1	1,8	11,1	0	0
	1.3	0,2192	18,0	0,3	1,3	0,7	3,2	2,5	11,4	1,6	7,3
	média			0,2	1,1	0,6	3,6	2,3	13,5	0,5	2,4
02	2.1	0,2564	18,0	0,2	0,7	0,7	2,7	1,7	6,6	1,5	5,9
	2.2	0,2009	12,0	0,3	1,4	0,7	3,5	1,5	7,5	1,6	8,0
	2.3	0,2094	12,0	0,3	1,3	1,0	4,8	1,4	6,7	6,6	31,5
	média			0,3	1,1	0,8	3,7	1,5	6,9	3,2	15,1

TeCP* - Concentração estimada, considerando 55% de recuperação em relação ao PCP.

Tabela 5.21: Concentração de sólidos aderidos à espuma anteriormente à adição de PCP (RAHLF₁ e RAHF₂)

Ponto de amostragem	Amostra	Massa seca de espuma (g)	Sólidos Totais (g)	Sólidos Totais Voláteis (g)	Sólidos Totais/ massa de espuma (g/g)	Sólidos Voláteis/ massa de espuma (g/g)
01	1	0,0560	0,0669	0,0353	1,19	0,63
	2	0,0678	0,0793	0,0399	1,17	0,59
valor médio					1,18	0,61

Tabela 5.22: Concentração de sólidos aderidos à espuma após 100 dias de operação com PCP (RAHLF₁)

Ponto de amostragem	Amostra	Massa seca de espuma (g)	Sólidos Totais (g)	Sólidos Totais Voláteis (g)	Sólidos Totais/ massa de espuma (g/g)	Sólidos Voláteis/ massa de espuma (g/g)
01	1	0,0211	0,0222	0,0131	1,052	0,621
	2	0,0242	0,0188	0,0105	0,777	0,434
valor médio					0,915	0,53
02	1	0,0234	0,0206	0,0102	0,880	0,436
	2	0,0205	0,016	0,014	0,781	0,688
valor médio					0,83	0,56
03	1	0,0185	0,0109	0,0103	0,589	0,557
	2	0,0257	0,0177	0,0156	0,689	0,607
valor médio					0,64	0,58
04	1	0,0194	0,0150	0,0112	0,77	0,577
	2	0,0257	0,0150	0,0123	0,58	0,429
valor médio					0,68	0,50

Tabela 5.23: Concentração de sólidos aderidos à espuma após 100 dias de operação com PCP (RAHLF₂)

Ponto de amostragem	Amostra	Massa seca de espuma (g)	Sólidos Totais (g)	Sólidos Totais Voláteis (g)	Sólidos Totais/ massa de espuma (g/g)	Sólidos Voláteis/ massa de espuma (g/g)
01	1	0,0154	0,0143	0,0129	0,929	0,838
	2	0,0116	0,0072	0,0046	0,62	0,40
	valor médio				0,77	0,62
02	1	0,0122	0,0102	0,0098	0,84	0,803
	2	0,0122	0,0097	0,0088	0,87	0,779
	valor médio				0,85	0,79

Reator RAHLF₁

Comparando-se os resultados da Tabelas 5.19 e 5.21, constata-se que a biomassa, avaliada como sólidos voláteis, aderida ao meio suporte, foi reduzida, em média, de 0,61 mg/L para 0,54 mg/L, representando diminuição de cerca de 12%, possivelmente devido a pequenas perdas causadas, especialmente, no período anterior à adição de PCP, como citado no item 5.2.

Na Figura 5.23 apresenta-se o perfil de concentrações de clorofenóis aderidos ao lodo imobilizado ao longo do reator.

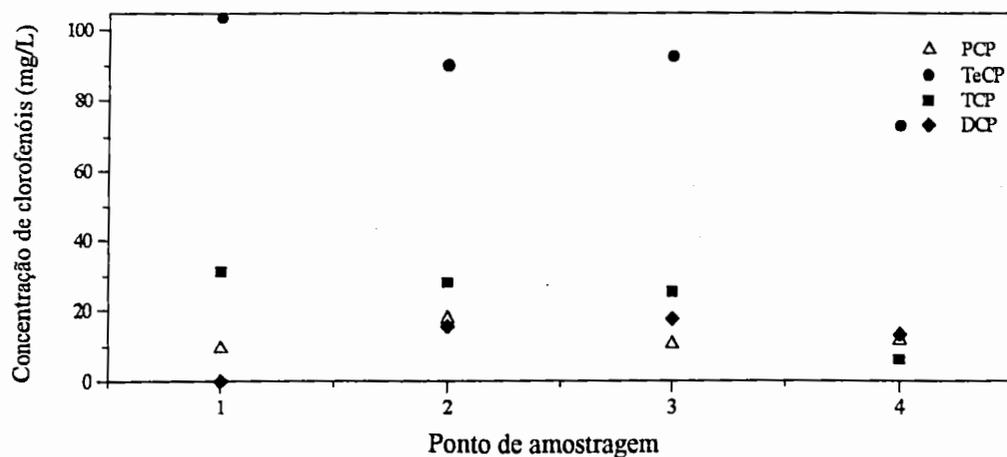


Figura 5.23: Perfil de concentração de clorofenóis no lodo imobilizado RAHLF₁.

De acordo com resultados apresentados na Tabela 5.22 e Figura 5.25, observa-se que a massa de PCP adsorvida no lodo imobilizado foi, em média, 10,9 $\mu\text{g/g}$, variando de 9,6 $\mu\text{g/g}$ no primeiro ponto e 12,2 $\mu\text{g/g}$ no quarto ponto, exceto no segundo ponto onde foi de 17,9 $\mu\text{g/g}$, comportamento semelhante ao observado nos perfis de DQO e de concentração de clorofenóis no meio líquido, reforçando a hipótese de caminho preferencial no reator.

A massa de TeCP adsorvida na biomassa imobilizada foi, em média, de 103,6 $\mu\text{g/g}$, decrescendo até 72,8 $\mu\text{g/g}$ no quarto ponto, indicando a habilidade dos organismos presentes em todos os segmentos na degradação de TeCP, sendo contudo, a maior taxa de redução observada no primeiro segmento.

A massa de TCP adsorvida na biomassa imobilizada foi, em média, de 31,5 $\mu\text{g/g}$ no primeiro ponto, permanecendo em 25,7 $\mu\text{g/g}$ no terceiro ponto e atingindo o mínimo de 6,5 $\mu\text{g/g}$ no quarto ponto. Os resultados sugerem que a biomassa presente entre o terceiro e quarto pontos apresenta maior habilidade na descloração de triclorofenol.

No primeiro ponto de amostragem não foi detectado DCP adsorvido, presente porém, conforme observado nos perfis do 74^o e 85^o dias. Nos demais pontos, a concentração média de DCP adsorvida foi de 15,8 $\mu\text{g/g}$.

Como ilustração, apresenta-se uma estimativa da massa de PCP adsorvida ao longo do reator, para comparação com a massa de PCP total introduzida durante o período de adição da substância ao substrato do reator.

Considerando-se que foi feita distribuição homogênea de 20,8 g de espuma, impregnada com lodo, ao longo do reator, e com os dados da Tabela 5.22, pode-se estimar a massa imobilizada em cada uma das seções do reator, de acordo com apresentado na Tabela 5.24. Cabe ressaltar, que será considerada a massa total adsorvida, tendo em vista que a parcela fixa também participa do processo de adsorção.

Tabela 5.24 - Avaliação da massa de lodo immobilizado presente no RAHLF₁ e da massa total de PCP adsorvida

Ponto do perfil	Massa média de PCP/lodo immobilizado (µg/g) *	Massa de espuma (g) **	Média de sólidos totais/massa de espuma (g/g) ***	Massa sólidos totais em 5,2g de espuma (g) (D)	Massa de sólidos totais + massa de espuma (g) (E)	Massa de PCP adsorvida por secção do reator (µg) (F)
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)
01	9,6	5,2	0,92	4,8	10,0	96
02	17,9	5,2	0,83	4,3	9,5	179
03	10,9	5,2	0,64	3,3	8,5	93
04	12,2	5,2	0,68	3,5	8,7	106

* Dados da Tabela 5.19

** Considerando distribuição homogênea de 20,8g de espuma nas quatro secções do reator

*** Dados da Tabela 5.22

(D) = (B) x (C); (E) = (D) +(B); (F) = (E) +(A)

A somatória das linhas da última coluna da Tabela 5.24, que representa a soma das massas de PCP adsorvidas em cada secção, indica que 474 µg (0,47 mg) de PCP assim permaneceram no reator. Este valor representa 0,2% das 239 mg adicionadas durante todo experimento, de acordo com dados da Tabela 5, sendo portanto desprezível.

Comparado com a capacidade adsorptiva do meio suporte, que de acordo com item 5.6 foi de 3,10mgPCP/gSSV e a presença de metabólitos adsorvidos, conclui-se que houve degradação do material adsorvido.

Observa-se que o TeCP foi o clorofenol adsorvido determinado em maior concentração. O conhecimento disponível sobre o que ocorre no processo não permite inferir sobre as causas. É provável que a reação de desalogenação de PCP para TeCP seja mais rápida que as desalogações subsequentes.

Reator RAHLF₂

Comparando-se os resultados da Tabelas 5.20 e 5.21, constata-se que a biomassa, avaliada como sólidos voláteis, aderida ao meio suporte, aumentou, em média, de 0,61 mg/L para 0,71 mg/L, representando crescimento de cerca de 16%.

De acordo com resultados apresentados na Tabela 5.20, observa-se que a massa de PCP adsorvida no lodo imobilizado foi, em média, para cada ponto, de 1,1 $\mu\text{g/g}$, e a massa de TeCP adsorvida na biomassa imobilizada foi, em média, para cada ponto, de 3,6 $\mu\text{g/g}$, indicando capacidade de degradação de fenóis mais clorados pelos microorganismos presentes nas duas seções do reator. A massa de TCP adsorvida na biomassa imobilizada foi, em média, de 13,5 $\mu\text{g/g}$ no primeiro ponto, e 6,9 $\mu\text{g/g}$ no segundo. Os resultados sugerem que a biomassa presente entre o primeiro e segundo ponto apresenta maior habilidade na descloração de triclorofenol.

No primeiro ponto de amostragem, foi detectado DCP adsorvido em apenas uma das amostras analisadas. O valor médio determinado, considerando-se as três amostras foi de 2,4 $\mu\text{g/g}$, enquanto no segundo ponto foi de 15,1 $\mu\text{g/g}$, semelhante ao observado na fase líquida.

Para ilustrar, apresenta-se a estimativa da massa de PCP adsorvida ao longo do reator, comparando-se com a massa de PCP utilizada durante o período de adição da substância ao substrato do reator.

Considerando-se que foi feita distribuição homogênea de 3,6 g de espuma, impregnada com lodo, ao longo do reator, e com os dados da Tabela 5.23, pode-se estimar a massa imobilizada em cada uma das seções do reator, de acordo com apresentado na Tabela 5.25. Cabe ressaltar que será considerada a massa total adsorvida, tendo em vista que a parcela fixa também participa do processo de adsorção.

Tabela 5.25 - Avaliação da massa de lodo imobilizado presente no RAHLF₂ e da massa total de PCP adsorvida

Ponto do perfil	Massa média de PCP/lodo imobilizado (µg/g) *	Massa de espuma (g) **	Média de sólidos totais/massa de espuma (g/g) ***	Massa sólidos totais em 1,8 g de espuma (g) (D)	Massa de sólidos totais + massa de espuma (g) (E)	Massa de PCP adsorvida por secção do reator (µg) (F)
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)
01	1,1	1,8	0,77	1,39	3,19	3,51
02	1,1	1,8	0,85	1,53	3,33	3,66

* Dados da Tabela 5.20

** Considerando distribuição homogênea de 3,6g de espuma nas duas secções do reator

*** Dados da Tabela 5.23

(D) = (B) x (C); (E) = (D) +(B); (F) = (E) +(A)

A somatória das linhas da última coluna da Tabela 5.25, que representa a soma das massas de PCP adsorvida em cada secção, indica que 7,2 µg de PCP permaneceram adsorvidas no reator. Este valor representa 0,01% das 65 mg adicionadas durante todo experimento, de acordo com dados da Tabela 5, sendo portanto desprezível.

Comparado à capacidade adsorptiva do meio suporte, de acordo com item 5.6, e à presença de metabólitos adsorvidos, conclui-se que houve degradação do material adsorvido.

A comparação com testes de adsorção realizados em trabalhos citados na literatura é dificultada devido a diferenças na realização dos testes. Contudo, alguns dados serão mostrados.

KENNEDY et al. (1992) citaram que PCP foi mais fortemente adsorvido em lodo granulado de reator UASB que fenóis menos clorados.

WU et al. (1992) mostraram em isotermas de adsorção que, com concentração de 8,0 mg/L de PCP no substrato, lodo granulado não adaptado ao PCP adsorveu 5,0 mgPCP/g ST, enquanto KENNEDY & PAHN (1995) obtiveram o valor de 2,0 mgPCP/g SV, sem terem determinado metabólitos, indicando que somente o mecanismo de adsorção foi responsável pela remoção de PCP. Ambos os testes foram efetuados no período de anterior à saturação do lodo. KENNEDY & PAHN (1995)

citam que o mecanismo de adsorção foi significativo na remoção de PCP, anteriormente à saturação da manta e adaptação dos microrganismos.

Os valores citados pelos autores aproximam-se daquele obtido para a adsorção no meio suporte deste trabalho, que foi de 3,10 mgPCP/g espuma.

WU et al. (1992) citaram que a adsorção não foi representativa durante remoção de PCP, após saturação do leito, estando de acordo com resultados obtidos neste trabalho.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O desempenho dos reatores RAHLF, avaliados pela eficiência de remoção de matéria orgânica, concentração de ácidos voláteis, alcalinidade a bicarbonato no efluente e composição do biogás, não foi afetado pela presença de Pentaclorofenol (PCP) nas concentrações estudadas.

A eficiência de remoção de DQO esteve próxima a 98% no reator RAHLF₂, durante todo período de operação com PCP no substrato. No reator RAHLF₁, este parâmetro manteve-se próximo a 97%, exceto quando foram observados caminhos preferenciais no reator, não sendo relacionado à adição de PCP.

A percentagem de metano no biogás do reator RAHLF₁ esteve, durante adição de 0,4 mg/L de PCP, próximo a 98%, superior à observada no período anterior, quando foi 95%. No restante do período manteve-se próxima a 93%, apresentado valor mínimo de 80%, por acasão da presença de curto-circuito no reator. Para o reator RAHLF₂ a percentagem de metano no biogás foi de 96%, anteriormente à adição de PCP, permanecendo próxima a 93% até concentração de PCP no substrato de 0,4 mg/L. A partir desta concentração passou a 98%, até o final do experimento.

O método cromatográfico adaptado para determinação de clorofenóis foi adequado, demandando cerca de seis horas para cinco amostras, entre preparo e processamento, com técnicas de manipulação relativamente simples. Os resultados obtidos foram reprodutíveis, permitindo identificar os metabólitos: Tetraclorofenol (TeCP); Triclorofenol (TCP) e Diclorofenol (DCP) originados no processo de degradação de PCP.

Os resultados indicaram ser possível tratar substratos contendo PCP no intervalo de concentração de 0,2 a 8,0 mg/L de PCP, com concentração de matéria orgânica da ordem de 3.000 mg/L de DQO. As fontes de carbono: glicose e ácidos acético e fórmico, que atuaram como doadores de elétrons necessários para reações de

desalogenação redutiva, mostraram-se adequadas, tendo em vista que não houve acúmulo de clorofenóis passíveis de identificação no efluente dos reatores. A degradação de PCP foi observada pela transformação de PCP em metabólitos menos clorados, possivelmente segundo a rota TeCP, TCP e DCP. A remoção de PCP deveu-se à degradação biológica, tendo em vista que a parcela de PCP remanescente no lodo imobilizado foi desprezível, quando comparada à removida e à capacidade de adsorção de PCP pela espuma de poliuretano.

Os exames microbiológicos indicaram a presença de microrganismos com capacidade de degradação de clorofenóis e que houve seleção de microrganismos, possivelmente dos envolvidos no processo de degradação de clorofenóis.

Para melhor compreensão do processo de remoção de PCP em reatores RAHLF, sugere-se: -Estudar a relação mínima de DQO/PCP, que permita a remoção de 99% do PCP adicionado, mantendo-se a concentração de PCP no substrato de 8,0 mg/L; -Adaptar método de determinação de clorofenóis por cromatografia líquida, permitindo a determinação de monoclorofenóis e fenol, necessários para formulação de balanço de massa no sistema; -Estudar o limite máximo de T.C.O. imposta pela configuração desses reatores, e então aumentando-se gradativamente a concentração de PCP, para obter-se a taxa máxima de aplicação de PCP ao reator; Estudar os microrganismos envolvidos no processo de degradação, visando melhorar a compreensão do processo e conseqüentemente possibilitar a alteração das condições ambientais nos reatores para favorecer as populações de interesse.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAMSSON, K. & XIE, T.M. Directed determination of trace amounts of chlorophenols in fresh water, wastewater and sea water. Journal of Chromatography, v.279, p. 199-208, 1983.
- ADRIAN, N.R. & SUFLITA, J.M. Redutive dehalogenation of nitrogen heterocyclic herbicide in anoxic aquifer slurries. Applied and Environmental Microbiology, v.56, n.1, p.292-294, 1990.
- ALBERICI, R.M.; JARDIM, W.F. Photocatalytic degradation of phenol and chlorinated phenol using Ag-TiO₂ in a slurry reactor. Water Research, v.28, n.8, p.1845-1849, 1994.
- ALLARD, A.S.; HYNNING, P.A.; NEILSON, A.H. Role of sulfate concentration in dechlorination of 3,4,5 Trichlorocatechol by stable enrichment cultures grown with coumarin and flavone glycones and aglycones. Applied and Environmental Microbiology, v.58, n.3, p.961-968, 1992.
- ANGELIDAKI, S.P.; PETERSEN, S.P.; AHRING, B.K. Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of inhibition upon addition of bentonite. Applied Microbiology and Biotechnology, v.33, p.469-472, 1990.
- ANID, N.A.; NIES, L.; VOGEL, T.M. Redutive dechlorination of a polychlorinated biphenyl congener and hexachlorobenzene by vitamin B₁₂. Applied and Environmental Microbiology, n. 28, p. 1057-1060, 1992.
- APHA; AWWA; WPCF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th edition. American Public Health Association, Washington, 1995
- ARAÚJO, J.C. Acompanhamento da evolução do biofilme e caracterização química e biológica em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário. São Carlos: 1994, 158p. Dissertação (Mestrado Hidráulica e Saneamento) EESC-USP.

- BARBIERI, S.M. Estudos da biodegradação de compostos aromáticos por linhagens bacterianas. Tese de Doutorado (Centro de Ciências Biológicas e Saúde - UFSCar), 213p., 1994.
- BASU, S.K.; OLESZKIEWICZ, J.A.; SPARLING, R. Dehalogenation of 2-chlorophenol (2 CP) in anaerobic batch culture. Water Research, v.30, n.2, p.315-322, 1996.
- BERGEY'S, Manual of systematic bacteriology archeobacteria. 1ª ed. Editores J.T. Staley; M.P. Bryant; N. Psenning; J.G. Holt. Baltimore, p.2171-2214, v.3, 1989.
- BOLÁNOS, M.L.R. Estudo comparativo da capacidade de inóculos de diferentes fontes para degradar PCP sob condições anaeróbias. São Carlos: 1996, 139p. Dissertação (Mestrado Hidráulica e Saneamento) EESC-USP.
- BOYD, S.A. & SHELTON, D.R. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.47, n.2, p.272-277, 1984.
- BOYLE, A.W.; BLAKE, C.K.; PRICE II, A.; MAY, H.D. Effects of polychlorinated biphenyl congener concentration and sediment supplementation on rates methanogenesis and 2,3,6-trichlorobiphenyl dechlorination in an anaerobic enrichment. Applied and Environmental Microbiology, Washington v.59, n.9, p.3027-3031, 1990.
- BONTING, C.F.C.; SCHNEIDER, S.; SCHMIDTBERG, G.; FUCHS, G. Anaerobic degradation of m-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. Archives of Microbiology, n.164, p. 63-69, 1995.
- BOUWER, E.J. & ZHENDER, J.B. Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. Tibtech, n.11, p.36-367, 1993.
- BOUWER, E.J. & McCARTY, P.L. Utilization rates of trace halogenated organic compounds in acetate-grown biofilms. Biotechnology and Bioengineering, v.27, p.1564-1571, 1985.
- BROWN, J.F.; BEDARD, D.L.; BRENNAN, M.J.; CARNHAN, J.C.; FENG, H.; WAGNER, R.E. Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. Science, v.236, p.709-712, 1987.

- BRYANT, F. O.; HALE, D.; ROGERS, J.E. Regiospecific dechlorination of PCP by dichlorophenol- adapted microorganism in freshwater, anaerobic sediment slurries. Applied and Environmental Microbiology, n. 57, p. 2293-2301, 1991.
- CASEY, M. et al. Advanced Practical Chemistry. Ed. Blackie Brished & Chapmam Hall. New York, 1990.
- CHAU, A. & AFGHAN, B.K. Analysis of Pesticides in Water, CRC Press, Boca Raton, v.1, 392p., 1982.
- CHAUDHRY, G.R. & CHAPALAMADUGU, S. Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiological Reviews, v.55, n.1, 1991.
- COOKSON, J.T.Jr. Bioremediation Engineering-Design and Applications, McGraw Hill, N.Y., cap.1:p1-21, cap.2p.27-49, cap.3 p.51-92, 1995.
- CRAIK, S.A.; FEDORAK, P.M.; HRUDEY, S.E.; GRAY, M.R. Kinetics of methanogenic degradation of phenol by activated-carbon- supported and granular biomass. Biotechnology and Bioengineering, v.40, p.777-786, 1992.
- CRUZ, I. & WELLS, D. Determination of pentachlorophenol by exhaustive methylation and capillary gas chromatography in sewage sludge, contaminated water and suspended particulates. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, v.48, p.101-113, 1992.
- DEL NERY, V. Digestão anaeróbia em duas fases com culturas mistas acidogênicas e metanogênicas imobilizadas separadamente em gel agar. São Carlos: 1993, 320p. Tese (doutorado Hidráulica e Saneamento) EESC- USP.
- DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. São Carlos: 1987, 187p. Dissertação (Mestrado Hidráulica e Saneamento) EESC-USP.
- DeWEERD, K.A.; CONCANNON, F.; SUFLITA, J.M. Relationship between hydrogen consumption, dehalogenation, and the reduction of sulfur oxyanions by *Desulfomonile tiedjei*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.57, n.7, p.1929-1934, 1991.
- DeWEERD, K.A. & SUFLITA, J.M. Anaerobic aryl reductive dehalogenation of halobenzoates by cell extracts of "*Desulfomonile tiedjei*" Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.56, n.10, p.2999-3005, 1990.

- DeWEERD, K.A.; MANCELCO, L.; TANNER, R.S.; CARL, R.W.; SUFLITA, J.M.
Desulfomonile tidjei gen.nov. and sp nov., a novel anaerobic, dehalogenating,
sulfate-reducing bacterium. Archives of Microbiology, v.154, p.23-30, 1990.
- DIETRICH, G. & WINTER, J. Anaerobic degradation of chlorophenol by an
enrichment culture. Applied and Microbiology Biotechnology, v.34, p. 253-258,
1990.
- DILLALO, R. & ALBERTSON, O.E. Volatile acids by direct tritiation. Journal
W.P.C.F., v.33; p.356-365, 1961.
- DONNELLY, J.R.; ABDEL-HAMID, M.S.; JETER, J.L. Application of gas
chromatography retention properties to the identification of environmental
contaminants. Journal of Chromatography, v.642, p.409-415, 1993.
- DUFF, S.J.B.; KENNEDY, K.J.; BRADY, A.J. Treatment of dilute phenol/PCP
wastewaters using the Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor. Water
Research, v.29, n.2, p.645-651, 1995.
- DOLFING, J. & HARRISON, K. Gibbs Free Energy of formation of halogenates
aromatics compounds and their potential role as electron acceptor in anaerobic
environmentals. Environmental Science Technology, v.26, p.2213-2218, 1992.
- DOLFING, J. Reductive dechlorination of 3-chlorobenzoate is coupled to ATP
production and growth in an anaerobic bacterium, strain DCB-1. Archives of
Microbiology, v.153, p.264-266, 1990.
- DOLFING, J. & TIEDJE, J.M. Growth yield increase linked to reductive dechlorination
in a defined 3-chlorobenzoate degrading methanogenic coculture. Archives of
Microbiology, n.149, p. 102-105, 1987
- van DORT, H.M. & BEDARD, D.L. Reductive ortho and meta dechlorination of a
biphenyl congener by anaerobic microorganisms. Applied and Environmental
Microbiology, Washington, v.57, n.5, p.1576-1578, 1991.
- EVANS, W.C. & FUCHS, G. Anaerobic degradation of aromatic compounds.
Annuary. Review. Microbiology, v.42, p.289-317, 1988.
- FATHEPURE, B.Z. & VOGEL, T.M. Complete degradation of polychlorinated
hydrocarbons by a two-stage biofilm reactor. Applied and Environmental
Microbiology, Washington, v.57, n.12, p.3418-3422, 1991.

- FETZNER, S. & LINGENS, F. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics and biotechnological applications. Microbiological Reviews, v.58, p.641-685, 1994.
- FIELD, J.A.; STAMS, A.J.M.; KATO, M.; SCHRAA, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. Antonie van Leeuwenhoek, v.67; p.47-77, 1995.
- FLORA, J.R.V.; SUIDAN, M.T.; WURLLNER, A.M.; BOYER, T.K. Anaerobic treatment of a simulated high-strength industrial wastewater containing chlorophenols. Water Environmental Research, v.66, n.1, p. 21-31, 1994.
- FORESTI, E. Fundamentos dos processos de digestão anaeróbia. III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales". Montevideo, p.97-110, 1994.
- FREEDMAN, D.L. & GOSSET, J.M. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.55, n.9, p.2144-2151, 1989.
- FREI, R.W.; LAWRENCE, J.F. editores. Chemical derivatization in analytical chemistry. Chromatography. Plenum Press, New York, 344p, v.1, 1981.
- GALL, N.I.; NOVAK, J.T. Pentachlorophenol- induced release of soil organics and colloids. Water Research, v.29, n.6, p. 1533-1540, 1995.
- GENTHNER, B.S.; PRICE II, W.A.; PRITCHARD, P.H. Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.55, n.6, p.1466-1471, 1989a.
- GENTHNER, B.S.; PRICE II, W.A.; PRITCHARD, P.H. Characterization of anaerobic dechlorination consortia derived from aquatic sediments. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.55, n.6, p.1472-1476, 1989b.
- GIBSON, S.A. & SUFLITA, J.M. Anaerobic biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in samples from methanogenic aquifer: stimulation by short-chain organic acids and alcohols. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.56, n.6, p.1825-1832, 1990.

- GIBSON, S.A. & SUFLITA, J.M. Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.52, n.4, p.681-688, 1986.
- GRBIC-GALIC, D. & YOUNG, L.Y. Methane fermentation of ferulate and benzoate: anaerobic degradation pathways. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.50, n.2, p.292-297, 1985.
- GROTENHUIS, J.T.C.; SMIT, M.; PLUGGE, C.M.; YUANSHENG, X.Y.; van LAMMEREN, A.A.M.; STANS, A.J.M.; ZHENDER, A.J.B. Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.57, n.7, p.1942-1949, 1991.
- HAGGABLOM, M.M.; RIVER, M.D.; YOUNG, L.Y. Influence of alternative electron acceptors on anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.59, n.4, p.1162-1167, 1993.
- HAGGABLOM, M.M. & YOUNG, L.Y. Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.56, n.11, p.3255-3260, 1990.
- HALE, D.; ROGERS, J.E.; WIEGEL, J. Reductive dechlorination of dichlorophenols by nonadapted and adapted microbial communities in pond sediments. Microbiological Ecology, n.20, p. 185-196, 1990.
- HENDRIKSEN, H.V.; LARSEN, S.; AHRING, B.K. Influence of supplementation carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.58, n.1, p.365-370, 1992.
- HENDRIKSEN, H.V.; LARSEN, S.; AHRING, B.K. Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed film reactors: the influence of an additional substrate. Water Science Technology, n. 3/4, p. 431-436, 1991.
- HOLLIGER, C. & SCHUMACHER, W. Reductive dehalogenation as a respiratory process. Antonie van Leeuwenhoek, v.66, p.239-246, 1994.

- HOLLIGER,C.;SCHARAA, G.; STAMS, A.J.M.; ZHENDER, A.J.B. Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture redutively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.58, n.5, p.1636-1644, 1992.
- HOLLIGER,C; STAMS,J.M.; ZEHNDER,A.J.B. Anaerobic degradations of recalcitrant compounds. Trabalho datilografado, 1988.
- HOROWITZ,A.; SUFLITA,J.M.; TIEDJE,J.M. Redutive dehalogenations of halobenzoates by anaerobic lake sediment microorganism. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.45, n.5, p.1459-1456, 1983.
- JENKINS, E.H. & BAUGH, P.J. Analysis of pentachlorophenol using extraction methods, derivatization an gas chromatography - mass spectrometry. Analytical Proceeding, v.30, p.29-30, 1993.
- KENNEDY, K.J. & PHAM, A. Effect of anaerobic sludge source and condition on biosorption of PCP. Water Research, v.29, n.10, p. 2360-2366, 1995.
- KENNEDY,K.J.; LU, J.; MOHN, W.W. Biosorption of chlorophenols to anaerobic granular slugde. Water Research, v.26, n.8, p.1085-1092, 1992.
- KING, G.M. Dehalogenation in marine sediments containing natural sources of halophenols. Applied and Environmental Microbiology, v.54, n.12, p.3079-3085, 1988.
- KOHRING,G.W.; ROGERS,J.E.; WIEGEL,J. Anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater lake sediments at diferent temperature. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.55, n.2, p.348-353, 1989b.
- KOHRING,G.W.; ZHANG,X.; WIEGEL,J. Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.55, n.10, p.2735-2737, 1989a.
- KRIJGSMAN, W.& KAMP, C.G. van de . Determination of chlorophenols by capillary gas chromatography. Journal of Chromatography, v.131, p'412-416, 1977.
- KRUME,M.L. & BOYD,S.A. Redutive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. Water Research, v.22, p.171-177, 1988.

- KRYLOV, A.I. Chromatographic analysis in environmental expert examinations. Journal of Analytical Chemistry, v.50, n.3, p.210-219, 1995.
- KUHN, E.P.; TOWNSEND, G.T.; SUFLITA, J.M. Effect of sulfate and organic carbon supplements on reductive dehalogenation of chloroanilines in anaerobic aquifer slurries. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.56, n.9, p.2630-2637, 1990.
- LANÇAS, F. Cromatografia em fase gasosa Ed. Acta. São Carlos: 1993, 254p.
- LARSEN, S.; HENDRIKSEN, H.V.; AHRING, B.K. Potencial for thermophilic (50°C) anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.57, n.7, p.2085-2090, 1991.
- LEE, H.B.; WENG, LI-DA; CHAU, A.S.Y. Chemical derivatization analysis of pesticide residues. VIII. Analysis of 15 chlorophenols in natural water by in situ acetylation. J. Assoc. Off. Anal. Chem., v.67, n.4, p.789-794, 1984.
- LIU, S. & SUFLITA, J.M. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. Tibtech, v.11, p.344-352, 1993.
- MADSEN, T. & AAMAND, J. Effects of sulfoxo anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology, v.57, n.9, p.2453-2458, 1990.
- MADSEN, T. & LICHT, D. Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.58, n.9, p.2874-2878, 1992.
- MANILAL, V.B.; HARIDAS, A.; ALEXANDER, R.; SURENDER, G.D. Photocatalytic treatment of toxic organics in wastewaters: toxicity of photodegradation products. Water Research, v.26, n.8, p.1035-1038, 1992.
- MATOCLSY, G. et al. Pesticide Chemistry. Amsterdam, Elsevier, 4277p., 1988.
- MAY, H.D.; BOYLE, A.W.; PRICE II, W.A.; BLAKE, C.K. Subculturing of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating anaerobic enrichment on solid media. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.58, n.12, p.4051-4054, 1992.

- MIKESELL, M.D. & BOYD, S.A. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, v.52, n.4, p.861-865, 1990.
- MIURA, Y.; OKAZAKI, M.; HAMADA, S.I.; MURAKAWA, S.I.; TUGEN, R. Assimilation of hydrocarbon by microorganisms I. mechanism of hydrocarbon uptake. Biotechnology and Bioengineering, v.19, p.701-714, 1977.
- MOHN, W. & KENNEDY, K.J. Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludge granules. Applied and Environmental Microbiology, v.58, n.7, 1992.
- MOHN, W.W. & TIEDJE, J.M. Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. Archives of Microbiology, v.153, p.267-271, 1990.
- MOHN, W.W. & TIEDJE, J.M. Microbial reductive dehalogenation. Microbial Reviews, v.56, n.3, p.482-507, 1992.
- MOHN, W.W. & TIEDJE, J.M. Evidence for chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedjei*. Archives of Microbiology, n.154, p. 1-6, 1991.
- MOHN, W.W. & KENNEDY, K.J. Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.58, n.4, p.1367-1370, 1990.
- MORRIS, P.J.; MOHN, W.W.; QUENSEN III, J.F.; TIEDJE, J.M.; BOYD, S.A. Establishment of a polychlorinated biphenyl degrading enrichment culture with predominantly meta dechlorination. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.58, n.9, p.3088-3094, 1990.
- MOUNFORD, D.O.; BRYANT, M.P. Isolation and characterization of an syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge. Archives of Microbiology, v.133, p.249-256, 1982.
- NAKARA, T.; ERICKSON, L.E.; GUTIERREZ, J.R. Characteristics of hydrocarbon uptake in cultures with two liquid phases. Biotechnology and Bioengineering, 19, p.9-25, 1977.

- NICHOLSON, D.K.; WOODS, S.L.; PEEK, D.C. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol acclimated methanogenic consortium. Applied and Environmental Microbiology, v.58, p.2280-2286, 1992.
- NIES, L. & VOGEL, T.M. Effects of organic substrates on dechlorination of Aroclor 1242 in anaerobic sediments. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.56, n.9, p.2612-2617, 1990.
- O'REILLY, K.T. & CRAWFORD, R.L. Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium* cells. Applied and Environmental Microbiology, v.55, n.9, 1989.
- PARKER, W.J.; HALL, E.R.; FARQUHAR, G.J. Evaluation of dechlorination mechanisms during anaerobic fermentation of bleached kraft mill effluent. Water Research, v.27, n.8, p.1269-1273, 1993.
- PEREIRA, E.C. Aplicações da cromatografia gasosa de alta resolução em estudos preliminares sobre a degradação de poluentes orgânicos clorados por microrganismos anaeróbios de sedimentos lacustres brasileiros. São Carlos: 1993, 145p. Dissertação (Mestrado Química Analítica) IQSC - USP.
- PERRY, J.A. Introduction to analytical gas chromatography. History, Principles and Practice. New York, 429p., 1981.
- PIGNATELLO, J.J.; MARTINSON, M.M.; STEIERT, J.G.; CARLSON, R.E.; CRAWFORD, R.L. Biodegradation and photolysis of pentachlorophenol in artificial freshwater streams. Applied and Environmental Microbiology, n. 46, p.1034-1031, 1983.
- PLANT, A.L.; POWNALL, H.J.; SMITH, L.C. Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons between model membranes: relation to carcinogenicity. Chem. Biol. Interactions, n.44, p. 237-246, 1983.
- QUENSEN, III, J.F.; TIEDJE, J.M.; BOYD, S.A. Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. Science, v.242, 1988.
- REINEKE, W. & KNACKMUSS, H.J. Microbial degradation of haloaromatics. Annuary Reviews Microbiology, n.42, p. 263-287, 1988.

- RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. Journal W.P.C.F. v.58, p.406-411, 1986.
- ROBINSON, R.W.; AKIN, D.E.; NORDSTEIN, R.A.; THOMAS, M.V. ALDRICH, H.C. High and electron microscopic examination of methane producing biofilms in anaerobic fixed-bed reactors. Applied and Environmental Microbiology, p.127-136, v.48, n.1, 1994.
- ROELOF, J. van de MEER; de VOS, W.M.; HARAYAMA, S.; ZHENDER, A.J.B. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiological Reviews, v.56, n.4, p.677-694, 1992.
- RUWISCH, R.C.; SEITZ, H.J.; CONRAD, R. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depend on redox potential of terminal electron acceptor. Archives of Microbiology, n.149, p.350-357, 1988
- SABER, D.L. & CRAWFORD, R.L. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. Applied and Environmental Microbiology, v.50, n.6, 1985.
- SANDER, P.; WITTICH, R.M.; FORTNAGEL, P.; WILKES, H.; FRANCKE, W. Degradation of 1,2,4-trichloro and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.57, n.5, p.1430-1440, 1990.
- SCHENNEN, U.; BRAUN, K.; KNACKMUSS, H.J. Anaerobic degradation of 2-fluorbenzoate by benzoate-degrading, denitrifying bacteria. Journal of Bacteriology, v. 161, n.1, p.321-325, 1985.
- SHELTON, D.R. & TIDJEL, J.M. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.48, n.4, p.840-848, 1990.
- SHELTON, D.R. & TIDJE, J.M. General method for determining anaerobic biodegradation potential. Applied and Environmental Microbiology, v.47, n.4, p.850-857, 1984.

- SIAHPUSH, A.R.; LIN, J.E.; WANG, H.Y. Effect of adsorbents on degradation of toxic organic compounds by coimmobilized systems. Biotechnology and Bioengineering, v.39, p.619-628, 1992.
- STAPLETON, M.G.; SPARKS, D.L.; STEVEN, K.D. Sorption of pentachlorophenol to HDTMA-Clay as a function of ionic strength and pH. Environmental Science and Technology, v.28, p.2330-2335, 1994.
- STEIERT, J.G. & CRAWFORD, R.L. Catabolism of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* sp. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.141, p.825-830, 1986.
- STEVENS, T.O.; LINKFIELD, T.G.; TIDJE, J.M. Physiological characterization of strain DCB-1, a unique dehalogenating sulfidogenic bacterium. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.54, n.12, p.2938-2943, 1988.
- SUFLITA, J.M.; HOROWITZ, A.; SHELTON, D.R.; TIDJE, J.M. Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. Science, v.218, p.1115-1117, 1982.
- TAN, G.H. Comparison of solvent extraction and solid-phase extraction for the determination of organochlorine pesticide residues in water. Analyst, v.117, p.1129-1132, 1992.
- UTKIN, I.; DANTON, D.D.; WIGEL, J. Specificity of reductive dehalogenation of substituted ortho-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/TU-DC1. Applied and Environmental Microbiology, n.1, v.61, p.346-351, 1995.
- VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. aceito para publicação no periódico Applied Microbiology and Biotechnology em maio de 1997.
- VARGAS, C. & AHLERT, R.C. Anaerobic degradation of chlorinated solvents. Journal Water Pollution Control Federation, v.59, n.11, 1987.
- VAZOLLER, R.F. Avaliação do ecossistema microbiano de um reator de fluxo ascendente de manta de lodo operado em condições termófilas. São Carlos: 1995, 259p. Tese (Doutorado Hidráulica e Saneamento) EESC-USP.

- VIDAL, L.H.; TREVELIN, W.R.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O.
Determination of organochlorine pesticides dissolved in water: a comparison between solid phase and solvent extraction. Intern. J. Anal. Chem., v.96, p.23-31, 1994.
- VIDAL, L.H.; TREVELIN, W.R.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Gas chromatographic method for discriminating between chlorinated pesticides and polychlorobiphenyls in mixtures. Analytica Chimica Acta, v.269, p. 205-210, 1992.
- VILLOSLADA, F.N.; PÉREZ-ARRIBAS, M.E.; POLO-DÍEZ, L.M.
Preconcentrations and flow-injection multivariate determination of priority pollutant chlorophenols. Analytica Chimica Acta, v.308, p.238-245, 1995.
- WILD, S.R.; HARRAD, S.J.; JONES, K.C. Chlorophenols in digested U.K. sewage sludge. Water Research, v. 27, n.10, p.1527-1534, 1993.
- WOLFAARDT, G.M.; LAWRENCE, J.R.; ROBERTS, R.D.; CALDWELL, D.E.
Bioaccumulation of the herbicide Diclofop in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during starvation. Applied and Environmental Microbiology, v.61, n.1, p.152-158, 1995.
- WU, W.M.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, J.G. Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.59, n.2, p.389-397, 1993.
- WU, W.M.; NYE, R.F.H.; BHATNAGAR, L. Anaerobic granules developed for reductive dechlorination of chlorophenols and chlorinated ethylene. Trabalho datilografado 28p., 1992.
- ZAIAT, M. Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias. São Carlos: 1996, 156p. Tese (Doutorado Hidráulica e Saneamento) EESC-USP.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A.A.C.; FORESTI, E. Retor Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. Revista Brasileira de Engenharia- Caderno de Engenharia Química, v.11, n.2, p.33-42, 1994.

ZHANG, X. & WIEGEL, J. Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.56, n.4, p.1119-1127, 1990.

ANEXO

Tabela A1: Parâmetros Físico-Químicos dos reatores

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
1º	substrato	2.089	-	5,2	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	402	81%	8,8	1.044	230	295.975	-	480
	RAHLF ₂	58	97%	8,8	936	100*	280.790	-	152
3º	substrato	2.384	-	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	379	84%	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₂	58	98%	-	-	-	-	-	-
5º	substrato	2.927	-	4,8	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	369	87 %	8,9	1.080	285	305.562	56	-
	RAHLF ₂	58	97 %	9,0	1.152	60	307.067	14	-
9º	substrato	2.342	-	4,4	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	324	86 %	8,5	756	280	308.469	70	-
	RAHLF ₂	57	98 %	8,4	828	60	288.418	10	-
13º	substrato	2.511	-	4,4	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	150	94 %	8,4	684	133	296.699	48	480
	RAHLF ₂	46	98 %	8,6	720	117*	286.735	14	152

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes

...continuação da Tabela A1

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
17 ^o	substrato	2.403	-	5,0	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	167	93 %	9,0	1.188	140	293.526	47	675
	RAHLF ₂	14	99 %	9,2	1.188	-	279.843	14	150
20 ^o	substrato	2.487	-	4,9	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	82	97 %	8,8	1.100	60	-	-	645
	RAHLF ₂	69	97 %	9,1	1.188	60	-	-	195
23 ^o	substrato	2.559	-	5,0	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	90	96 %	8,8	1.240	82	275.500	14	-
	RAHLF ₂	44	98 %	9,4	1.240	60*	286.675	54	-
26 ^o	substrato	2.644	-	5,0	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	138	95 %	-	-	-	293.024	14	675
	RAHLF ₂	45	98 %	-	-	-	306.498	54	150
28 ^o	substrato	2.704	-	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₁	66	98 %	-	-	-	309.239	15	680
	RAHLF ₂	51	98 %	-	-	-	285.433	65	160

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes

...continuação da Tabela A1

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
	substrato	2.451	-	-	-	-	-	-	-
33 ^o	RAHLF ₁	58	98%	-	-	-	300.426	14	675
	RAHLF ₂	48	98%	-	-	-	298.311	64	158
	substrato	2.957	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o	RAHLF ₁	35	99 %	-	-	-	302.235	15	675
	RAHLF ₂	70	98 %	-	-	-	295.002	65	158
	substrato	2.837	-	-	-	-	-	-	-
42 ^o	RAHLF ₁	55	98 %	-	-	-	300.502	15	680
	RAHLF ₂	39	99 %	-	-	-	315.362	46	160
	substrato	3.163	-	5,0	-	-	-	-	-
44 ^o	RAHLF ₁	38	99 %	9,3	1.152	76	298.503	15	675
	RAHLF ₂	53	98 %	9,0	1.260	74*	308.296	45	150
	substrato	3.084	-	4,9	-	-	-	-	-
46 ^o	RAHLF ₁	46	99 %	9,0	1.188	76	-	-	680
	RAHLF ₂	46	99 %	9,2	1.260	73*	-	-	156

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes

...continuação da Tabela A1

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
	substrato	3.090	-	5,0	-	-	-	-	-
47 ^o	RAHLF ₁	111	96 %	8,6	1.152	76	296.936	18	680
	RAHLF ₂	63	98 %	9,1	1.260	58	313.740	35	160
	substrato	3.080	-	5,0	-	-	-	-	-
50 ^o	RAHLF ₁	167	95 %	8,1	1.152	100	321.063	16	650
	RAHLF ₂	36	99 %	9,2	1.152	104*	308.999	31	157
	substrato	3.356	-	4,8	-	-	-	-	-
52 ^o	RAHLF ₁	145	95 %	8,7	1.160	100	-	-	694
	RAHLF ₂	35	99 %	9,2	1.152	70*	-	-	148
	substrato	3.199	-	4,8	-	-	-	-	-
54 ^o	RAHLF ₁	110	97 %	8,6	1.242	93	-	-	646
	RAHLF ₂	58	98 %	9,4	1.250	70*	-	-	146

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes

...continuação da Tabela A1

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
	substrato	3.319	-	4,8	-	-	-	-	-
56 ^o	RAHLF ₁	205	94 %	8,5	1.152	145	287.103	13	680
	RAHLF ₂	58	98 %	8,7	1.224	73*	299.925	31	198
	substrato	3.446	-	4,8	-	-	-	-	-
57 ^o	RAHLF ₁	135	93 %	8,6	1.152	93	303.980	24	680
	RAHLF ₂	39	99 %	9,2	1.296	80*	307.700	25	160
	substrato	3.012	-	4,9	-	-	-	-	-
60 ^o	RAHLF ₁	246	92 %	8,3	1.116	125	-	-	645
	RAHLF ₂	37	99 %	9,2	1.242	62*	-	-	150
	substrato	3.270	-	4,9	-	-	-	-	-
62 ^o	RAHLF ₁	175	95 %	8,5	1.152	83	303.364	25	660
	RAHLF ₂	37	99 %	9,2	1.227	75*	300.045	40	150
	substrato	3.422	-	-	-	-	-	-	-
64 ^o	RAHLF ₁	160	95 %	-	-	-	-	-	650
	RAHLF ₂	85	98 %	-	-	-	-	-	150

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes

...continuação da Tabela A1

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
	substrato	3.060	-	-	-	-	-	-	-
66 ^o	RAHLF ₁	248	92 %	-	-	-	300.605	14	650
	RAHLF ₂	117	96 %	-	-	-	315.128	25	160
	substrato	3.319	-	4,9	-	-	-	-	-
70 ^o	RAHLF ₁	160	95 %	8,8	1.242	90	-	-	650
	RAHLF ₂	57	98 %	9,2	1.227	66*	-	-	155
	substrato	3.271	-	4,9	-	-	-	-	-
71 ^o	RAHLF ₁	189	94 %	8,8	1.240	90	-	-	650
	RAHLF ₂	59	98 %	9,2	1.200	60	-	-	150
	substrato	3.163	-	5,0	-	-	-	-	-
72 ^o	RAHLF ₁	524	83 %	8,2	1.008	300	-	-	650
	RAHLF ₂	120	96 %	9,2	1.100	69	-	-	158
	substrato	3.012	-	5,0	-	-	-	-	-
74 ^o	RAHLF ₁	555	82 %	8,2	1.008	300	302.354	14	670
	RAHLF ₂	90	97 %	9,2	1.152	69	291.634	27	160

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes

...continuação da Tabela A1

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
	substrato	3.096	-	4,9	-	-	-	-	-
76º	RAHLF ₁	274	91 %	8,6	1.260	93	309.858	10	680
	RAHLF ₂	63	98 %	9,1	1.260	69*	314.889	26	167
	substrato	2.495	-	-	-	-	-	-	-
78º	RAHLF ₁	658	74 %	9,1	1.116	177	-	-	680
	substrato	3.090	-	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₂	56	98 %	9,1	1.404	80*	-	-	165
	substrato	2.740	-	-	-	-	-	-	-
81º	RAHLF ₁	600	78 %	8,4	1.152	450	300.872	12	650
	substrato	2.970	-	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₂	68	98 %	9,2	1.350	78*	301.536	25	160
	substrato	2.487	-	-	-	-	-	-	-
85º	RAHLF ₁	648	74 %	-	-	-	294.853	11	670
	substrato	3.008	-	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₂	43	99 %	-	-	-	305.536	33	150

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes

...continuação da Tabela A!

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
	substrato	2.500	-	5,3	-	-	-	-	-
87º	RAHLF ₁	455	82 %	8,5	1.224	394	273.535	12	665
	substrato	3.018	-	4,9	-	-	-	-	-
	RAHLF ₂	25	99 %	8,8	1.310	89*	340.524	42	155
	substrato	2.620	-	-	-	-	-	-	-
90º	RAHLF ₁	133	95 %	-	-	-	258.814	5	650
	substrato	3.144	-	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₂	44	99 %	-	-	-	293.671	29	160
	substrato								
92º	RAHLF ₁			8,5	1.296	55	-		650
	substrato								
	RAHLF ₂			9,0	1.260	80	-		160

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes

...continuação da Tabela A1

Dia de operação	Amostra	DQO (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO	pH	Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	Ácidos voláteis (mg/L)	Área CH ₄	CH ₄ /CO ₂	vazão (mL/dia)
	substrato	2.703	-	-	-	-	-	-	-
94 ^o	RAHLF ₁	254	91 %	8,7	1.116	99	-	-	650
	substrato	3.102	-	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₂	116	96 %	9,0	1,116	66	-	-	160
	substrato	2.870	-	-	-	-	-	-	-
100 ^o	RAHLF ₁	135	95 %	8,8	1.224	68	260.370	6	660
	substrato	3.210	-	-	-	-	-	-	-
	RAHLF ₂	57	98 %	9,0	1.188	72*	290.012	23	170
	substrato	3.290	-	5,0	-	-	-	-	-
102 ^o	RAHLF ₁	20	99	8,0	1.224	*	352.530	24	660
	RAHLF ₂	40	99	9,0	1.188	*	310.625	24	160
	substrato	3.367	-	5,0	-	-	-	-	-
104 ^o	RAHLF ₁	11	99 %	8,8	1.224	66*	354.831	-	660
	RAHLF ₂	42	99 %	9,0	1.188	66*	311.934	-	160

* técnica analítica inadequada para as concentrações existentes