

USP

Campus de São Carlos

**AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DE UM
REATOR ANAERÓBIO HÍBRIDO (RAH) E DA
ATIVIDADE DAS POPULAÇÕES DE MICRORGANISMOS
ANAERÓBIOS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA
DE PENTACLOROFENOL (PCP)**

Martha de Almeida Prado Montenegro

Orientadora: Profa. Dra. Rosária Filomena Vazoller

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 13 / 06 / 01

Ass.: *Guilherme*

**AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DE UM
REATOR ANAERÓBIO HÍBRIDO (RAH) E DA
ATIVIDADE DAS POPULAÇÕES DE MICRORGANISMOS
ANAERÓBIOS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE
PENTACLOROFENOL (PCP)**

Martha de Almeida Prado Montenegro

DEDALUS - Acervo - EESC



31100017670



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

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

03/06/01
R. Vazoller

São Carlos
2001

Class.	TESE-EESC
Cutt.	3754
Tombo	T0126/01

st 1186256

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

M777a

Montenegro, Martha de Almeida Prado

Avaliação da performance de um reator anaeróbio híbrido (RAH) e da atividade das populações de microrganismos anaeróbios na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP) / Martha de Almeida Prado Montenegro. -- São Carlos, 2001.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2001.

Área: Ciências da Engenharia Ambiental.


Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosana Filomena Vazoller.

1. Archaea metanogênicas.
2. Compostos orgânicos clorados.
3. Grânulos anaeróbios.
4. Pentaclorofenol (PCP).
5. Reator anaeróbio híbrido (RAH). I. Título.

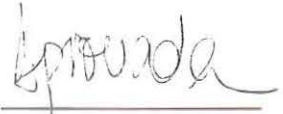
FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **MARTHA DE ALMEIDA PRADO MONTENEGRO**

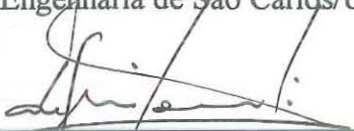

Tese defendida e julgada em 01-06-2001 perante a Comissão Julgadora:



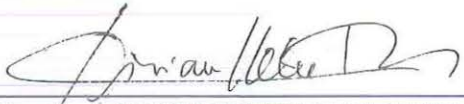
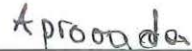
Profª. Doutora **ROSANA F. VAZOLLER (Orientador)**
(Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello")



Prof. Doutor **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)



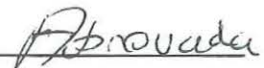
Prof. Titular **EUGENIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)



Profª. Doutora **VIVIAN HELENA PELLIZARI**
(Instituto de Ciências Biomédicas/USP)



Profª. Doutora **CHRISTINE CLAIRE GAYLARDE**
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS)



Prof. Doutor **IVALDO LUIZ GAETA ESPÍNDOLA**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Engenharia Ambiental



JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

Handwritten notes and stamps at the bottom of the page, including a date stamp '01/06/2001' and other illegible markings.



Eu sei de muito pouco. Mas tenho a meu favor tudo o que não sei (...) Tudo o que não sei é a minha parte maior e melhor: é a minha largueza. Tudo o que não sei é o que constitui a minha verdade.

Clarice Lispector

Aos meus pais, **Evandro e Dora**,
por me apontarem o caminho e
por me darem condições
de ser livre para escolher!

Aos meus filhos, **Thiago e Laura**,
por me terem feito mãe e
por me ensinarem, a todo momento,
que é impossível esperar...
mas, acreditar sempre!

Mas ela teve a decência de reconhecer que o cântaro já estava velho, e por isso achei que devia dar-lhe um novo, faz de conta que o outro tinha um defeito de fabrico, ou nem é preciso fazer de conta, dar é dar, dispensa explicações.

José Saramago

Mas aqui vai...

Ao pessoal de São Carlos:

À profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller, mais do que uma orientadora, grande incentivadora da minha carreira e trabalho, pessoa essencial para a realização desta pesquisa, que permaneceu sempre ao meu lado apoiando, dando sugestões, orientando e principalmente confiando nesta longa e difícil jornada de doutoranda.

À profa. Dra. Maria do Carmo Calijuri, minha orientadora inicial que com todo o empenho sempre me apoiou e acreditou neste trabalho.

Ao prof. Dr. Eugênio Foresti que desde o meu mestrado, não só como meu orientador, mas como grande incentivador, vem possibilitando a concretização da minha carreira.

À Ivana e à Ariuska, com quem tive o grande prazer de dividir residência, no início deste doutorado em São Carlos e que tornaram a minha estadia nesta cidade, longe das pessoas que eu amo, mais tranqüila.

À todos os colegas do CRHEA, que junto comigo ingressaram no início do ano de 1997 nesta vida de pós graduação. Em especial à Celina, amor à primeira vista, companheira sempre presente nos tempos de São Carlos, cuja amizade aumenta a cada dia; ao Victor, colega, grande amigo e companheiro das baladas de São Carlos; à Andréia e à Raquel que sempre me receberam de braços abertos nesta cidade maravilhosa; à Luciana pela ajuda na impressão desta tese; ao Daniel, à Paula, ao Aurélio, ao Mourão e ao Fernando, grandes amigos e a todos os colegas que conviveram comigo em São Carlos.

À todo o pessoal do CRHEA, professores e funcionários com os quais aprendi muito e sempre me apoiaram nestes anos de idas e vindas. Em especial, à Claudete pela dedicação em resolver todos as questões pertinentes a pós graduação.

Ao pessoal do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC - USP, São Carlos. Aos colegas Valéria, Ivana, Mércia, Nélia, Claudião, Valmir, Fernandão, Gunther, Márcio, Giovanna, Mic, Kênia, Selma, Roger, Sônia, Dra. Eloisa e a todos com quem pude contar durante o trabalho realizado no LPB; à Juliana, pela amizade e pela realização de parte desta tese através da verificação de tipos microbianos pelo método FISH; à Dra. Maria Bernadete pelos auxílios constantes com as técnicas de laboratório e de manipulação de anaeróbios estritos; ao prof. Dr. Marcelo Zaiat pelo apoio nos trabalhos realizados no LPB / USP e pelas sugestões nos ensaios; à Maria Angela (Janja), pelo auxílio com as análises cromatográficas; e em especial, à profa. Elizabeth M. Moraes pelo carinho, apoio e auxílio na realização das análises de ácidos voláteis no LIMA / UFSC e LPB / USP, e na realização das análises de organoclorados no LPB / USP.

Ao Sr. Dr. Nelson José H. Gallo do Departamento de Física da USP de São Carlos pela realização das imagens em microscopia eletrônica.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de pós graduação.

Ao pessoal de Florianópolis:

Ao prof. Dr. Hugo Moreira Soares que me acolheu em Florianópolis e possibilitou a realização deste trabalho no departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, contribuindo com ótimas sugestões, me orientando e me ensinando sempre...

Aos professores do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, que me receberam com todo o carinho possível, em especial à profa. Dra. Regina (LDPT) e à profa. Dra. Gláucia (EngeBio); ao prof. Dr. Adelamar pelo estímulo e apoio na carreira "Mac Gyver", dando um jeitinho em tudo! ao prof. Ricardo pelos importantes auxílios com o computador.

A todos os colegas do laboratório (LDPT) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, em especial à Gabriela e à Deisi com quem tive o prazer de trabalhar durante um ano montando e realizando experimentos; ao Rafael, à Vivian, à Ticiane, à Glória, ao Branco e à Mires, colegas sempre presentes e prontos para ajudar; à Ermínia, ótima colega e amiga, auxiliando e apoiando sempre; e a minha grande amiga Angelina, muito mais que colega, pessoa maravilhosa com quem eu pude contar em todos os momentos!

A todo o pessoal do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, incluindo funcionários e colegas de pós graduação dos outros laboratórios, em especial à Valdete, ao João e ao Sandro, excelentes instrutores e colegas dedicados e à Denise, colega sempre disponível e pessoa adorável.

Ao prof. Dr. Paulo Belli Filho que abriu o laboratório do LIMA do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC para a realização das análises cromatográficas de ácidos voláteis.

Aos professores Dr. Nelson H. Gabilan do Departamento de Bioquímica e Dra. Tereza Cristina Barbosa do Departamento de Ecologia e Zoologia, ambos da UFSC, pelo incentivo e apoio no início deste doutorado em Florianópolis.

Ao Rossano e à Katianne, meus grandes amigos e compadres; ao Matheus, meu afilhado, e ao Nicholas. Aos amigos Gisele e Naná, com muito carinho.

À Suzana, Jaqueline, Cathy, Max, Gastão, Beth, Simone, Elisa, colegas da Associação de Moradores (AMJA) e a todos os meus vizinhos queridos...

À Eliane, minha terapeuta, que muito contribuiu para que eu pudesse chegar até aqui...

À minha família:

À toda a minha família, porque não há família melhor neste mundo! À minha avó Henriqueta e à minha tia Elza pelo carinho e atenção, e à minha tia Eumar pela ajuda que pôde me proporcionar. E, em especial, aos meus queridos irmãos Hilde, Monica e Marisa sempre carinhosos e disponíveis e, principalmente, aos meus pais, Evandro e Dora que nunca mediram esforços para me verem realizada!

Ao meu ex-marido José Eduardo e aos seus pais Sr. Hênio e D. Cida pelo apoio e estímulo nesta longa jornada de doutorado.

Ao Thiago e Laura pela paciência que tiveram e continuam tendo comigo... filhos adoráveis que me proporcionam a maior felicidade que posso experimentar!

E, em especial e com muito carinho, ao Luciano, companheiro durante um período maravilhoso, amigo e o maior incentivador da minha carreira e independência.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	6
3- REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1- Compostos sintéticos: origem, destino e natureza poluente.....	7
3.2- Compostos orgânicos halogenados – ênfase aos organoclorados	11
3.3- Transformações microbianas dos compostos orgânicos halogenados – ênfase aos organoclorados.....	13
3.3.1- Tipos de metabolismo	13
3.3.2- Biodegradação de compostos halogenados sob condições aeróbias	17
3.3.3- Biodegradação de compostos halogenados sob condições anaeróbias.....	19
3.3.3.1- A desalogenação de organoclorados por culturas puras anaeróbias.....	22
3.3.3.2- A desalogenação de organoclorados por consórcios anaeróbios - a importância das interações microbianas	24
3.3.3.3- Efeitos inibitórios da desalogenação anaeróbia de compostos organoclorados	35
3.4- Tecnologias anaeróbias no tratamento de efluentes na presença de organoclorados.....	40
3.4.1- Sistema UASB utilizados para tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos clorados	41
3.4.2- Outros tipos de sistemas utilizados para o rtratamentop de efluentes contendo compostos fenólicos clorados	43
3.4.3- Reator Anaeróbio Híbrido.....	45
3.5- Métodos analíticos e ensaios de laboratório com organoclorados	49
3.5.1- Técnicas cromatográficas.....	49
3.5.1- Ensaios para avaliação do efeito tóxico do PCP sobre a comunidade microbiana anaeróbia	50
4- MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1- Protocolo 1: Ensaios preliminares com lodo – Caracterização e escolha do inóculo	53
4.2- Protocolo 2: Ensaios no Reator Anaeróbio Híbrido	54
4.2.1- Etapa 1 - Montagem do Sistema	54
4.2.2- Etapa 2 - Partida e operação do Reator Anaeróbio	58
4.2.3- Etapa 3 - Adição de PCP no Reator Anaeróbio Híbrido	59
4.2.4- Meio de cultura para alimentação do Reator Anaeróbio Híbrido	61
4.3- Protocolo 3: Ensaios em batelada – Toxicidade do PCP	64
4.3.1- Avaliação da inibição dos testes de toxicidade	70
4.4- Protocolo 4: Ensaios em batelada – Teste com grânulos após adição de PCP	70
4.5- Meios de cultivo e soluções utilizadas para os ensaios em batelada	72
4.5.1- Meio de cultura: procedimentos de preparação e distribuição	73
4.5.2- Solução resazurina	75
4.5.3- Solução traço de metais	75

4.5.4-	Solução estoque complementares ao meio de cultivo	76
4.5.5-	Solução estoque de substratos orgânicos e sulfato	77
4.5.6-	Solução de diluição	78
4.6-	Métodos Analíticos	78
4.6.1-	Determinação da Atividade Metanogênica Específica	78
4.6.2-	Determinação de Sólidos Voláteis (SV)	80
4.6.3-	Exames microscópicos	80
4.6.4-	Determinação da ordem de grandeza dos grupos microbianos	81
4.6.5-	Caracterização de grupos microbianos pertencentes ao Domínio <i>Archaea</i> através da técnica de hidridação <i>in situ</i> FISH	84
4.6.6-	Determinação dos ácidos voláteis	85
4.6.7-	Determinação de PCP e intermediários	87
4.6.8-	Determinação da DQO	89
4.6.9-	Determinação da produção de gases: metano e dióxido de carbono	90
4.6.10-	Determinação do volume de biogás produzidos no RAH	91
4.6.11-	Determinação do volume de biogás os ensaios em batelada	91
4.6.12-	Determinação de cloretos	92
4.6.13-	Determinação de sulfetos	93
4.6.14-	Determinação e manutenção da temperatura do RAH e reatores em Batelada	93
4.6.15-	Determinação do pH	94
4.6.16-	Alcalinidade	94
5-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5.1-	Protocolo 1: Ensaios preliminares com o lodo - Caracterização e escolha do inóculo	95
5.1.1-	Determinação de sólidos voláteis (SV).....	95
5.1.2-	Determinação da Atividade Metanogênica Específica	96
5.1.3-	Exames microscópicos	100
5.2-	Protocolo 2: Ensaios com o Reator Anaeróbio Híbrido – RAH	101
5.2.1-	Etapa 1 - Montagem do sistema.....	101
5.2.2-	Etapa 2 - Partida e operação do RAH.....	102
5.2.3-	Etapa 3 - Adição de PCP no Reator Anaeróbio Híbrido.....	107
5.2.4-	Resultados de determinações realizadas nas etapas 1 e 2 do protocolo 2, apresentados em conjunto	112
5.2.4.1-	Ácidos orgânicos e compostos orgânicos clorados	112
5.2.4.2-	Resultados de sólidos voláteis - SV.....	115
5.2.4.3-	Avaliação microscópica e quantitativa do lodo do RAH	116
5.2.5-	Discussão das etapas 2 e 3 do protocolo 2	123
5.3.-	Protocolo 3: Ensaio em batelada - Toxicidade ao PCP	128
5.3.1-	Ensaio de Toxicidade I	129
5.3.2-	Ensaio de Toxicidade II	135
5.3.3-	Ensaio de Toxicidade III	146
5.3.4-	Análise dos ensaios de Toxicidade	152
5.4.-	Protocolo 4: Ensaio em batelada - Teste com grânulos após a adição de PCP	154
6-	CONCLUSÕES	162
7-	ANEXOS	165
8-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	211

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Etapas de trabalho e protocolos experimentais da presente pesquisa	53
Figura 4.2. Desenho esquemático do sistema utilizado como reator anaeróbio híbrido, de acordo com SOARES (1998)	55
Figura 4.3. Fotografia do RAH antes da sua inoculação, com destaque para o filtro anaeróbio preenchido com esponja de poliuretano	56
Figura 4.4. Fotografia do RAH antes da inoculação e gasômetro teste	56
Figura 4.5. Fotografia do RAH em operação. Gasômetro de cúpula flutuante desconectado	57
Figura 4.6. Fotografia do RAH em operação. Gasômetro de cúpula flutuante conectado	57
Figura 4.7. Esquema da execução das diluições decimais seriadas	84
Figura 4.8. Sistema montado para medidas de produção de biogás nos testes em batelada	92
Figura 5.1. Valores da produção de metano expressos em DQO-CH ₄ (g/L) para o lodo loculento	97
Figura 5.2. Valores da produção de metano expressos em DQO-CH ₄ (g/L) para o lodo granulado	97
Figura 5.3. Trechos da reta de maior inclinação para o cálculo da AME, equações da reta e fatores de correlação - lodo flocculento	98
Figura 5.4. Trechos da reta de maior inclinação para o cálculo da AME, equações da reta e fatores de correlação - lodo granulado	98
Figura 5.5. Valores de pH do RAH ao longo do período de operação	102
Figura 5.6. Valores da temperatura do RAH ao longo do período de operação	102
Figura 5.7. Vazão do efluente no RAH ao longo do período de operação	103
Figura 5.8. Valores da DQO teórica (g/L) aplicada ao RAH ao longo do período de operação ..	103
Figura 5.9. Valores de DQO do RAH ao longo do período de operação	103
Figura 5.10. Eficiência de remoção de DQO do RAH ao longo do período de operação	104
Figura 5.11. Valores da composição dos gases metano e dióxido de carbono no RAH ao longo do período de operação	104
Figura 5.12. Volume do biogás no RAH ao longo do período de operação	104
Figura 5.13. Eficiência de conversão DQO/Biogás no RAH ao período do período de operação	105
Figura 5.14. Valores de cloretos no RAH no período de operação entre 400 e 650 dias	105
Figura 5.15. Valores de pH no RAH durante adição do composto PCP.....	107
Figura 5.16. Valores da temperatura do RAH durante adição do composto PCP	107
Figura 5.17. Valores da vazão efluente no RAH durante adição do composto PCP	108
Figura 5.18. Valores de DQO teórica (g/L) aplicada ao RAH após a adição do composto PCP .	108
Figura 5.19. Valores de DQO no RAH durante adição do composto PCP	108
Figura 5.20. Porcentagem de remoção de DQO do RAH durante adição do composto PCP	109
Figura 5.21. Valores do volume do biogás produzido no RAH durante adição do composto PCP	109
Figura 5.22. Valores de eficiência de conversão DQO/Biogás no RAH durante adição do composto PCP	109

Figura 5.23. Valores da composição de gases: metano e dióxido de carbono no RAH durante adição do composto PCP	110
Figura 5.24. Valores de cloretos no RAH durante adição do composto PCP.....	110
Figura 5.25. Valores do ácido acético no RAH antes e após a adição do composto PCP	113
Figura 5.26. Valores do ácido propiônico no RAH antes e após a adição do composto PCP	113
Figura 5.27. Valores do ácido butírico no RAH antes e após a adição do composto PCP	113
Figura 5.28. Porcentagem de remoção dos ácidos voláteis no RAH antes e após a adição do composto PCP	114
Figura 5.29. Valores de PCP no RAH.....	114
Figura 5.30. Valores de Ordem de Grandeza Microbiana, células anaeróbias por mL de lodo no RAH	116
Figura 5.31. Valores de Ordem de Grandeza Microbiana de células anaeróbias por mL de lodo em relação ao tempo de operação do RAH.	116
Figura 5.32. Fotografias das observações microscópicas do cultivo em lactato e sulfato para determinação da Ordem de Grandeza Microbiana ao final da operação do reator (752 dias), nas diluições (a) 10^{-2} e (b) 10^{-5} . (aumento 1000 x)	117
Figura 5.33. Fotografias das observações microscópicas do cultivo para determinação da Ordem de Grandeza Microbiana ao final da operação do reator (752 dias), em metanol nas diluições (a) 10^{-2} e (b) 10^{-3} . (aumento 1000 x)	117
Figura 5.34. Microscopia de luz comum (a) do lodo do RAH com 200 dias de operação. Microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. (aumento 1000 x). (b) O mesmo campo em microscopia de fluorescência.	119
Figura 5.35. Microscopia de Varredura do lodo com 571 dias de operação, antes da adição do PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. grânulo claro; (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. grânulo escuro. (Barra: 4 μ m)	119
Figura 5.36. Microscopia de Varredura do lodo com 571 dias de operação, antes da adição do PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. (Barra: 10 μ m); (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. (Barra: 20 μ m) Ambos grânulos escuros	119
Figura 5.37. Microscopia de Varredura do lodo com 585 dias de operação, antes da adição do PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp.; (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. Ambos grânulos branco. (Barra: 4 μ m)	120
Figura 5.38. Microscopia de Varredura do lodo com 585 dias de operação, antes da adição do PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp; (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. (Barra: 4 μ m)	120
Figura 5.39. Microscopia de Varredura do lodo com 646 dias de operação, com adição de 2 mg/L de PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. - grânulo escuro; (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. - grânulo claro. (Barra: 4 μ m)	120
Figura 5.40. Microscopia de Varredura do lodo com 714 dias de operação, com adição de 8 mg/L de PCP. (a) predomínio de microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. - grânulo claro; (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. e <i>Methanosaeta</i> sp. - grânulo escuro. (Barra: 4 μ m)	121
Figura 5.41. Microscopia de Varredura do lodo com 721 dias de operação, com adição de 10 mg/L de PCP. (a) predomínio de microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp.; (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. Ambos grânulos claros. (Barra: 4 μ m)	121

Figura 5.42. Microscopia de Varredura do lodo com 730 dias de operação, com adição de 12,8 mg/L de PCP. (a) feixe de microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. e presença de microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. - grânulo claro (Barra: 4µm); (b) mesmo feixe em outro aumento (Barra: 10µm)	121
Figura 5.43. Microscopia de Varredura do lodo com 730 dias de operação, com adição de 12,8 mg/L de PCP. (a) feixe de microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. e presença de microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. - grânulo claro (Barra: 40µm); (b) mesmo feixe em outro aumento (Barra: 100µm)	122
Figura 5.44. Microscopia de Varredura do lodo com 740 dias de operação, com adição de 15,6 mg/L de PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcinasp.</i> ; (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. (Barra: 4µm)	122
Figura 5.45. Microscopia de Varredura do lodo com 750 dias de operação, com adição de 21,0 mg/L de PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp. (Barra: 4µm) (b) microrganismos semelhantes ao gênero <i>Methanosarcina</i> sp. (Barra: 10µm)	122
Figura 5.46. Valores médios dos volumes produzidos de biogás nos testes de toxicidade I . Concentração de PCP (mg/L)	130
Figura 5.47. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade I	131
Figura 5.48. Valores de velocidades de produção de biogás nos testes de toxicidade I com as devidas equações e fator de correlação da regressão linear	132
Figura 5.49. Representação gráfica da reta que se refere a porcentagem de inibição em relação a concentração de PCP	133
Figura 5.50. Representação gráfica da reta que se refere a porcentagem inibição em relação a concentração de PCP, segundo OWEN <i>et al.</i> (1979) e inibição clássica no intervalo de tempo de 42,33 h	134
Figura 5.51. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade II para as concentrações de 1, 2, 3, 4 mg/L e sem PCP, além do controle sem ácidos orgânicos	136
Figura 5.52. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade II para as concentrações de 5, 6, 8, 10 mg/L de PCP	137
Figura 5.53. Valores médios dos volumes produzidos de biogás nos testes de toxicidade II . Concentração de PCP em mg/L	137
Figura 5.54. Valores das velocidades de produção de biogás nos testes de toxicidade II com as devidas equações e fatores de correlação da regressão linear para os ensaios com 1, 2, 3 mg/L de PCP e sem PCP	138
Figura 5.55. Valores de velocidades de produção de biogás nos testes de toxicidade II com as devidas equações e fatores de correlação da regressão linear para os ensaios com 4, 5, 6, 8 e 10 mg/L de PCP	139
Figura 5.56. Representação gráfica da reta que se refere a porcentagem de inibição em relação a concentração de PCP	140
Figura 5.57. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade II para as concentrações de 2, 5, 10 mg/L de PCP e sem PCP, na presença de sulfato	141
Figura 5.58. Valores médios dos volumes produzidos de biogás nos testes de toxicidade II , na presença de sulfato. Concentração de PCP em mg/L	141
Figura 5.59. Valores de velocidades de produção de biogás nos testes de toxicidade II com as devidas equações e fatores de correlação da regressão linear na presença de sulfato	142
Figura 5.60. Valores de concentração de ácidos voláteis e eficiência de remoção para os ácidos acético, propiônico e butírico nos ensaios sem sulfato do teste de toxicidade II	145

Figura 5.61. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade III com suas respectivas médias	147
Figura 5.62. Valores de composição de gases: metano e dióxido de carbono para o teste de toxicidade III , no decorrer do ensaio	148
Figura 5.63. Concentração de ácidos voláteis: acético, propiônico e butírico para o teste de toxicidade III , no decorrer do ensaio	149
Figura 5.64. Concentração de PCP para o teste de toxicidade III , no decorrer do ensaio	150
Figura 5.65. Microscopia de luz comum do grânulo claro quando cultivado em acetato	156
Figura 5.66. Microscopia de luz comum do grânulo claro quando cultivado em (a) propionato e (b) lactato	156
Figura 5.67. Microscopia de luz comum do grânulo escuro quando cultivado em butirato mais sulfato	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Programação da partida, estabilização e operação do RAH, durante a execução da etapa 2, sem adição de PCP	58
Tabela 4.2. Condições de operação do RAH durante a etapa 3, com adição progressiva de PCP	60
Tabela 4.3. Meio de cultura para operação do reator anaeróbio híbrido	61
Tabela 4.4. Soluções estoque para a preparação do meio de cultivo	62
Tabela 4.5. Soluções estoque de fontes orgânicas	63
Tabela 4.6. Meio de cultivo para alimentação do reator concentrado para estocagem a -10°C ..	63
Tabela 4.7. Esquema de montagem dos ensaios de Toxicidade I, II e III	66
Tabela 4.8. Condições nos frascos para os ensaios de Toxicidade I	67
Tabela 4.9. Condições nos frascos para os ensaios de Toxicidade II	67
Tabela 4.10. Preparação do meio de cultivo antes de sua distribuição nos frascos de antibiótico - teste de Toxicidade III	69
Tabela 4.11. Análises realizadas nos testes de Toxicidade e período de amostragens	70
Tabela 4.12. Esquema de cultivo para verificação dos tipos morfológicos predominantes nos grânulos aclimatados ao PCP	71
Tabela 4.13. Composição do meio Zinder	74
Tabela 4.14. Composição da solução traço de metais	75
Tabela 4.15. Composição da solução de vitaminas	76
Tabela 4.16. Composição da solução estoque de ácidos orgânicos para o Ensaio de Atividade Metanogênica (AME)	79
Tabela 4.17. Ensaios para determinação da ordem de grandeza microbiana durante as etapas 2 e 3 de operação do Reator Anaeróbio Híbrido	82
Tabela 4.18. Condições nos frascos para o cultivo e determinação da ordem de grandeza microbiana	83
Tabela 5.1. Valores de Sólidos Voláteis (SV) dos lodos floculento e granulado	96
Tabela 5.2. Valores calculados de AME para os lodos granulado e floculento	98
Tabela 5.3 Tipos morfológicos apresentados nos lodos granulado e floculento	100
Tabela 5.4. Valores de eficiência média de remoção de DQO, relação média de biogás produzido por DQO aplicada e composição média de metano no biogás para os períodos de execução da etapa 2.....	106
Tabela 5.5. Valores de eficiência média de remoção de DQO, relação média de biogás produzido por DQO aplicada e composição média de metano no biogás para os períodos de execução da etapa3	111
Tabela 5.6. Valores de SV durante o período de operação do RAH.....	115

Tabela 5.7. Caracterização de grupos microbianos pertencentes ao Domínio <i>Archaea</i> e presença de BRS através da técnica de hibridação <i>in situ</i> - FISH	118
Tabela 5.8. Valores de cálculo da Inibição Clássica para as diferentes concentrações de PCP ..	133
Tabela 5.9. Valores da composição de metano no biogás, DQO média e eficiência teórica de remoção de DQO para os testes de toxicidade I ao final do ensaio	135
Tabela 5.10. Valores de cálculo da Inibição Clássica para as diferentes concentrações de PCP	140
Tabela 5.11. Valores de cálculo da Inibição Clássica para as diferentes concentrações de PCP.	143
Tabela 5.12. Valores da composição de metano no biogás, DQO média e eficiência teórica de remoção de DQO para os testes de toxicidade II , sem PCP e concentrações de 1,0 a 4,0 mg/L de PCP, no decorrer do ensaio	143
Tabela 5.13. Valores da composição de metano no biogás, DQO média e eficiência teórica de remoção de DQO para os testes de toxicidade II , de 5,0 a 10 mg/L de PCP, no decorrer do ensaio	144
Tabela 5.14. Valores da composição de metano no biogás, DQO média e eficiência teórica de remoção de DQO para os testes de toxicidade II , com sulfato no decorrer do ensaio	144
Tabela 5.15. Valores da DQO média de início e final do ensaio e eficiência teórica de remoção para os testes de toxicidade III	151
Tabela 5.16. Resultados dos testes com os grânulos	155
Tabela 5.17. Caracterização de grupos microbianos pertencentes ao Domínio <i>Archaea</i> e presença de BRS através da técnica de hibridação <i>in situ</i> - FISH	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ^{14}C - carbono catorze marcado
- AME - atividade metanogênica específica
- AOV - ácidos orgânicos voláteis
- ARC915 - sonda específica para o Domínio *Archaea*
- ATP - adenosina trifosfato
- BESA - Ácido Bromoetanosulfônico (2-bromoethanosulfonic acid)
- BRS - bactéria redutora de sulfato
- C₁ - carbono 1
- CNTP - condições normais de temperatura e pressão
- CP - clorofenol
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DCA - dicloroanilina
- DCB - diclorobenzeno
- DCE - dicloroetileno
- DCP - diclorofenol
- DDT - 1,1,1-tricloro-2,2-bis (*p*-clorofenila) eteno
- DQO - demanda química de oxigênio
- E_{pt} - potencial redox
- EUB338 - sonda específica para o Domínio *Bacteria*
- FISH - Técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes
- GAC - carvão ativado granular
- H₆CDDs - hexaclorodibenzo-*p*-dioxina (dibenzodioxinas)
- HCB - hexaclorobenzeno
- IC₅₀ - concentração do composto que causa inibição em 50% nos organismos
- K_s - coeficiente de afinidade específica ao substrato
- MB1174 - sonda específica para a família *Methanobacteriaceae*
- MC1109 - sonda específica para a família *Methanococcaceae*
- MCP - monoclorofenol
- MEV - microscopia eletrônica de varredura
- MG1200 - sonda específica para a ordem *Methanomicrobiales*,
- MSMX860 - sonda específica para a família *Methanosarcinaceae*
- Na-PCP - pentaclorofenato de sódio
- NMP - Número Mais Provável
- PAH - hidrocarboneto aromático policíclico

PCBs - bifenilos policlorados
PCE - tetracloroetileno
PCP - pentaclorofenol
pH - potencial hidrogeniônico
pKa - log da constante de dissociação iônica
RAH - reator anaeróbio híbrido
SV - sólidos voláteis
TCA - tricloroanilina
TCB - triclorobenzeno
TCE - tricloroetileno
TCP - triclorofenol
TeCA - tetracloroanilina
TeCP - tetraclorofenol
TRC - tempo de retenção celular
TRH - tempo de retenção hidráulica
UASB - reator de fluxo ascendente e manta de lodo
USEPA - U.S. Environmental Protection Agency
VC - cloreto de vinila (monocloroetileno)

RESUMO

MONTENEGRO, M. A. P. (2001). *Avaliação da performance de um reator anaeróbio híbrido (RAH) e da atividade das populações de microrganismos anaeróbios na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP)*. São Carlos, 2001. 222 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a eficiência de um reator anaeróbio híbrido (RAH) alimentado com uma mistura de ácidos orgânicos acético, propiônico, butírico, e láctico, bem como do álcool metanol, perfazendo uma DQO de 6,88 g/L, e avaliar nessas condições, a degradação do pentaclorofenol (PCP) na faixa de 2,0 a 21,0 mg/L. O RAH apresentou adequada performance na ausência de PCP, tendo sido inoculado com um lodo com AME cerca de 0,057 g DQO-CH₄/g SV.d. Durante os 21 meses de operação do RAH na ausência de PCP verificou-se uma remoção média de DQO de 93% e produção média de metano de 84%. Através de testes de toxicidade realizados em batelada com o lodo granulado do RAH, antes da adição de PCP no reator, calculou-se o IC₅₀, cujos valores foram 10,12 e 13,69 mg/L. Na presença de PCP na faixa de 2,0 a 21,0 mg/L, o RAH apresentou remoção média de DQO de 96,7%, produção média de metano de 85,5% e remoção dos ácidos voláteis próxima a 74% do acético, 93% do butírico e 64% do propiônico. Individualmente, na presença da maior concentração de PCP adicionada, ocorreu decréscimo na remoção dos ácidos voláteis, principalmente do ácido propiônico e na taxa de conversão DQO/biogás. O PCP foi removido do sistema na ordem de 99% pela ação do lodo granulado com predominância do grupo das *Archaea* metanogênicas, verificada por exames microscópicos e hibridação *in situ*. Valores da ordem de grandeza microbiana para os microrganismos metanogênicos nos períodos anteriores e posteriores a adição de PCP permaneceram na faixa de 10⁵ e 10⁶ céls./mL, quando cultivados em metanol e lactato mais sulfato, respectivamente. Os resultados sugerem que as *Archaea* metanogênicas podem estar envolvidas na degradação do PCP. A velocidade de remoção do organoclorado foi igual a 1,07 mg PCP/g SV.d quando a maior concentração de PCP foi estudada (21,0 mg/L).

Palavras-chave: *Archaea* metanogênicas; compostos orgânicos clorados; grânulos anaeróbios; pentaclorofenol (PCP); reator anaeróbio híbrido (RAH).

ABSTRACT

The present research aimed to verify the efficiency of an Anaerobic Hybrid Reactor (AHR) supplied with a mixture of fatty acids, acetic, propionic, butyric and lactic and methanol as well. The total amount of COD was 6.88 g/L. The performance of the reactor was remarkably stable and efficient during PCP additions at range from 2.0 to 21.0 mg/L. The AHR showed a great performance in the PCP absence, inoculated with sludge with an specific methanogenic (SMA) activity of 0,057 g.COD-CH₄/g.VS.d. During the 21 months of operation without PCP, the reduction of COD was around 93% and methane was up to 84% in the biogas. Before PCP addition, two toxicity batch tests conducted with the granular sludge presented IC₅₀ values around 10.12 mg/L and 13.69 mg/L. In the presence of PCP, at the range of 2.0 to 21.0 mg/L, the efficiency of volatile fatty acids breakdown was 93%, 64% and 74% respectively for butyric, propionic and acetic acids. Individually, at the presence of the higher PCP concentration studied, a decrease in the conversion of COD to biogas and organic acids removal occurred, mainly with propionic acid. PCP total removal of more than 99% was reached by granular sludge activities formed by the total time of reactor operation with a prevalence of methanogenic *Archaea*, verified under direct microscopy exams and *in situ* hybridization. Methanogenic cells predominance was noticed with 10⁵ to 10⁶ cells/mL during enumeration on methanol and lactate plus sulfate culture media, respectively. The results suggest that methanogenic *Archaea* can be involved in PCP degradation. The organochlorine removal rate was 1.07 mg PCP · g⁻¹ VS · d⁻¹ during the highest PCP (21.0 mg/L) concentration addition.

Keywords: anaerobic granules; anaerobic hybrid reactor (AHR); methanogenic cells; chlorinated compounds; pentachlorophenol.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos organoclorados, utilizados como inseticidas, surgidos no início do século 20, passaram a ser intensamente comercializados na década de 40, durante a II Guerra Mundial. Os primeiros compostos utilizados foram DDT e BHC, sendo estes muito utilizados na agricultura e, no Brasil, no combate de alguns vetores, como por exemplo, o mosquito da malária (VICINO, 1993).

A partir da década de 50, com o uso em larga escala de pesticidas e detergentes recalcitrantes à degradação biológica, criou-se um grave problema de acúmulo de compostos tóxicos no ambiente. Foi a partir desta década que se intensificou a industrialização destes compostos no Brasil e mais especificamente no Estado de São Paulo. A instalação da Refinaria de Petróleo em Cubatão atraiu uma série de indústrias químicas para a região (MATHEUS, 1997). No período de 1955 a 1975, vinte e duas grandes indústrias se instalaram na região de Cubatão (TARGA & KLOCKOW¹ *apud* MATHEUS, 1997). Dentre elas, em 1962, a Clorogil S/A - Indústrias Químicas que começou a produzir o pentaclorofenato de sódio, interrompendo sua produção somente mais tarde, em 1978. Segundo MATHEUS (1997), de 1966 até o início da operação do incinerador de resíduos instalados em Cubatão, em maio de 1988, estima-se que 12 mil toneladas de produtos tóxicos foram dispostas no ambiente sem os cuidados necessários.

O pentaclorofenol (PCP) foi amplamente utilizado, no passado, nos Estados Unidos e em muitos outros países, principalmente na preservação de madeiras e seus produtos, assim como herbicidas, moluscocidas e uma variedade de outras aplicações pelo seu amplo espectro como biocida. Devido ao seu forte poder inibidor na fosforilação oxidativa, o PCP é tóxico a uma grande variedade de organismos.

A grande quantidade e diversidade de compostos orgânicos clorados, como por exemplo o PCP, exaustivamente utilizados durante décadas, possuem grande resistência à decomposição biótica e abiótica, e conseqüentemente os resultados da presença desses

¹ TARGA, H.J. and KLOCKOW, D. (1977) Historical development of the industrial complex in Cubatão and its environmental impact. In: KLOCKOW, D., TARGA, H.J and VAUTZ, W. (ed.). *Air pollution and vegetation damage in the tropics - the Serra do Mar as an example*. São Paulo: GKSS, p. 1- 4.

compostos ao meio ambiente, como toxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e tendência ao acúmulo em cadeias alimentares, caracterizam os organoclorados como os mais problemáticos contaminantes existentes na natureza.

O PCP, junto com outros dezesseis compostos aromáticos clorados, fazem parte da Lista dos Poluentes Prioritários da Agência de Proteção Ambiental Americana (U.S. Environmental Protection Agency) (KEITH & TELLIARD, 1979), que os identifica como poluentes quantitativamente significativos e potencialmente perigosos. No Brasil, segundo MATHEUS (1997), até 1997 não existia uma lista de poluentes prioritários para o monitoramento ambiental.

A estabilidade química dos organoclorados, no início observada como grande vantagem, passou a ser, praticamente, sua maior desvantagem para o ambiente. A grande produção, o consumo excessivo e a estabilidade química provocou a acumulação desses compostos em quase todo o planeta. Apesar da atual restrição ao uso do PCP em alguns países e mesmo a proibição deste como biocida no ambiente, pode-se encontrar outras fontes deste composto, que não a comercial. Segundo um levantamento realizado na literatura por HÄGGBLUM & YOUNG (1990), os compostos fenólicos clorados são também formados como subprodutos no processo de branqueamento da polpa de papel com cloro e pela desinfecção com cloro de água potável e esgotos que contenham fenóis.

Os fatores ambientais e as características químicas dos compostos são, sem dúvida, fatores relevantes no estudo da degradação de poluentes. Entretanto, os fatores biológicos têm despertado muito interesse, pois apesar da grande importância dos fatores ambientais e químicos na biodegradação destes compostos, a principal consideração a ser feita é a capacidade metabólica ligada às formas de mecanismos de ataques e os sistemas enzimáticos disponíveis nos microrganismos. Os princípios básicos de como os microrganismos degradam os contaminantes ainda permanecem obscuros. Muitos detalhes do metabolismo microbiano não foram ainda elucidados e o sucesso do uso dos microrganismos no ambiente, mesmo dos autóctones, não é um assunto simples.

Apesar de seu considerável potencial no processo de degradação aeróbia, o PCP também pode ser degradado sob condições anaeróbias. Compostos fenólicos altamente clorados como o PCP, podem sofrer reações de redução, já que são altamente oxidados e, portanto, mais facilmente degradados em ambientes reduzidos. Assim, a degradação anaeróbia dos compostos aromáticos clorados tem sido intensamente estudada na última década, segundo HENDRIKSEN *et al.* (1992), para avaliar o destino destes compostos no ambiente; destino este que pode ser entendido como as suas possíveis transformações e acúmulo em determinados locais.

Os microrganismos capazes de degradar compostos tóxicos, principalmente, os compostos orgânicos clorados têm sido verificados numa grande variedade de ambientes, tanto aeróbios, como anaeróbios. Apesar de culturas puras aeróbias capazes de metabolizar o PCP terem sido isoladas por um bom número de pesquisadores, conforme levantamento realizado por McALISTER *et al.* (1996), culturas puras anaeróbias também foram obtidas.

Sob condições anaeróbias, a descloração e a degradação do PCP por consórcios microbianos têm sido observadas. Em condições metanogênicas, é comum a descloração do PCP a fenóis menos clorados (MIKESELL & BOYD, 1986; HENDRIKSEN *et al.*, 1992; MOHN & KENNEDY, 1992), com produção de metano e dióxido de carbono (MIKESELL & BOYD, 1986).

A descloração do PCP também foi reportada sob condições anaeróbias sulfidogênicas. KENNES *et al.* (1996) sugeriram o envolvimento das bactérias redutoras de sulfato na descloração e mineralização do PCP. Porém, o efeito negativo da presença do sulfato durante a desalogenação redutiva, também foi reportado para compostos haloaromáticos, entre eles o PCP (MADSEN & AAMAND, 1991).

Se por um lado, alguns estudos têm focado a influência dos aceptores de elétrons e condições ambientais na degradação dos clorofenóis, por outro, tem-se verificado a influência de substratos suplementares como doadores de elétrons, ou fontes alternativas de carbono na degradação do PCP.

Muitos estudos, entre eles alguns apontados a seguir, vêm sendo realizados com o intuito de compreender a influência de fontes de carbono suplementares (co-substrato) na descloração do PCP, em sistemas anaeróbios, seu efeito estimulante ou mesmo inibitório. O trabalho realizado por HENDRIKSEN *et al.* (1992) mostrou que a adição de glicose estimulou a descloração do PCP. Da mesma forma, DUFF *et al.* (1995) verificaram que a adição do fenol em biodigestores anaeróbios aumentava a descloração do mesmo organoclorado. WU *et al.* (1993), trabalhando com reatores UASB, ao usarem uma mistura de acetato, propionato, butirato e etanol como fonte de carbono, obtiveram grânulos anaeróbios degradadores de PCP. Ácidos orgânicos de cadeia curta ou álcoois estimularam, segundo GIBSON & SUFLITA (1990), a taxa de desalogenação do triclorofenol.

Apesar da existência de um bom número de trabalhos, anteriormente mencionado, realizados no sentido de compreender a degradação anaeróbia do PCP, poucos são os tipos de sistemas anaeróbios estudados para remoção deste organoclorado. Reatores anaeróbios contínuos de fluxo ascendente - UASB (HENDRIKSEN *et al.*, 1992; WU *et al.*, 1993; CHRISTIANSEN & AHRING, 1996; KENNES *et al.*, 1996) vêm sendo bastante utilizados no processo de degradação do PCP. Porém, a remoção do PCP também foi descrita em

reatores operados em regime batelada, sendo o composto desclorado e completamente mineralizado por uma mistura de lodos previamente adaptados (MIKESELL & BOYD, 1986). O mesmo comportamento foi também constatado em reatores anaeróbios de filme fixo (HENDRIKSEN *et al.*, 1993; DAMIANOVIC, 1997). DAMIANOVIC (1997) mostrou a degradação do PCP, no intervalo de concentração de 0,2 a 8,0 mg/L, em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) com substrato orgânico da ordem de 3.000 mg/L de DQO.

A descloração de despejos contendo fenóis clorados tem sido apontada em vários estudos utilizando-se o reator de leito expandido com carvão ativado granulado (GAC) (TSUNO *et al.*, 1996; KHODADOUST *et al.*, 1997; SUIDAN *et al.*, 1996). Segundo SUIDAN *et al.* (1996), devido a capacidade do sistema anaeróbio de leito fluidificado contendo GAC em adsorver e degradar compostos orgânicos tem-se verificado sua boa eficiência em tratar uma ampla gama de despejos tóxicos e inibitórios.

Na tentativa de melhorar a performance de alguns sistemas anaeróbios de tratamento de despejos, diferentes configurações de reatores têm surgido. Uma destas tentativas é o uso do reator anaeróbio híbrido (RAH). Um reator híbrido é qualquer reator originário da mistura de duas ou mais concepções de reatores, todavia esta designação acabou ficando particularizada para o tipo de reator que combina características do reator do tipo UASB e do filtro anaeróbio. Atualmente, alguns trabalhos como o de HENRY *et al.* (1996) têm utilizado o termo Reator Anaeróbio Híbrido. Assim, ficou definido usar este termo neste trabalho, com a abreviação RAH.

Segundo CRAVEIRO (1994), os reatores anaeróbios híbridos procuram associar as vantagens do reator UASB ao filtro anaeróbio diminuindo suas deficiências. Uma vez que o RAH é uma combinação de dois tipos de sistemas, reconhecidamente capazes de realizar a remoção de compostos cloroaromáticos, em princípio, seria também capaz de tratar efluentes contendo PCP. De acordo com o trabalho realizado por TUR & HUANG (1997), a degradação de compostos aromáticos como o ácido fitálico foi verificada em reatores anaeróbios híbridos.

A parte experimental da presente Tese de Doutorado foi desenvolvida em dois laboratórios, a saber: Laboratório de Desenvolvimento de Processos Tecnológicos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, sob orientação do Dr. Hugo Moreira Soares, em acordo firmado com o CRHEA - Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC - USP e Laboratório de Processos Biológicos do mesmo Departamento da EESC-USP. Procurou-se estudar o papel desempenhado pelos microrganismos anaeróbios envolvidos na

degradação do PCP em Reator Anaeróbio Híbrido alimentado com uma fonte de carbono sintética composta de uma mistura de ácidos orgânicos voláteis de cadeias curtas e metanol, além da adição de ácido láctico para verificação de efeito estimulante ao processo de degradação do PCP. Foram também realizados ensaios de toxicidade e atividade celulares, bem como de avaliação quantitativa e qualitativa dos microrganismos presentes no lodo granulado anaeróbio formado no interior do reator anaeróbio híbrido.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Estudar o desempenho de um reator anaeróbio híbrido e a atividade das populações de microrganismos anaeróbios, na ausência e na presença do composto PCP.

Objetivos específicos:

- Avaliar o desempenho do reator anaeróbio híbrido alimentado com uma mistura de substratos orgânicos (ácidos acético, propiônico, butírico, láctico e o álcool metanol), na ausência e na presença do PCP adicionado em regime de aumento progressivo de 2,0 a 21,0 mg/L;
- Verificar a influência do PCP na comunidade microbiana do lodo granulado formado no reator anaeróbio híbrido, adaptado e não adaptado ao PCP, empregando-se testes de toxicidade em batelada;
- Avaliar numericamente a presença de grupos de microrganismos anaeróbios metanogênicos e redutores de sulfato durante a operação do reator anaeróbio híbrido;
- Verificar os tipos microbianos predominantes nos grânulos formados durante a operação do reator anaeróbio híbrido na ausência e na presença do PCP.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Compostos sintéticos: origem, destino e natureza poluente

O número, a diversidade e a complexidade dos compostos orgânicos sintéticos atualmente produzidos pelo homem são de difícil mensuração, principalmente levando-se em conta o grau de periculosidade dos mesmos ao ambiente, bem como o de seus resíduos, quer oriundos da produção industrial ou de sua utilização. ENGLANDE & GUARINO¹ *apud* SWOBODA-COLBERG (1995) relataram mais de 100.000 compostos químicos produzidos comercialmente até meados dos anos 90, salientando que informações a respeito do destino ambiental e impacto à saúde humana eram apenas reservadas a uma pequena fração desse total, cerca de 100 compostos.

Os impactos ocasionados pela forma de manipulação e disposição de compostos orgânicos sintéticos e outros tóxicos ambientais foram tão intensos nos últimos anos que pesquisadores como GRADY Jr. (1990) chegaram a postular que “os anos 80 seriam a Década dos Poluentes Tóxicos”. Por sua vez, SWOBODA-COLBERG (1995) caracterizou esses compostos como onipresentes, isto é, estão por toda parte e afetam todos os aspectos da vida moderna.

Dentre os compostos referidos, muitos são halogenados, tais como importantes pesticidas, solventes e estabilizantes químicos. Porém, nem todos os halogenados são sintéticos. Nos artigos de autores como NEIDLEMAN & GEIGERT² *apud* WACKETT (1995) constata-se informações sobre uma vasta literatura que descreve os produtos naturais halogenados, como por exemplo o clorometano, produzido em quantidades significativas por fungos do solo, verificado por WUOSMAA & HAGER³ *apud* WACKETT (1997), e alguns aromáticos descritos por GRIBBLE⁴ *apud* FIELD *et al.* (1995). WACKETT (1997) relacionou aproximadamente 700 produtos halogenados naturais já descobertos, destacando o primeiro detectado pela biossíntese de algas.

¹ENGLANDE, A. J. Jr.; GUARINO, C. F. (1992). Toxics management in the chemical and petrochemical industries. *Water Sci. Technol.*, v.26, p.263-74.

²NEIDLEMAN, S. L.; GEIGERT, J. (1986). *Biohalogenation: Principles, basic roles and applications*. Chichester, England: Ellis Horwood Ltd.

³WUOSMAA, A. M.; HAGER, L. P. (1990). Methyl chloride transferase: a carbonation route for the synthesis of halometabolites. *Science*, v.249, p.160-2.

A origem dos compostos sintéticos no meio ambiente é ocasionada pelas atividades industriais, seus produtos e comercialização dos mesmos nos diferentes mercados consumidores, bem como pelos resíduos gerados nessas unidades de produção (MATHEUS, 1997). Segundo WILD *et al.* (1992), o lançamento do PCP no ambiente pode ocorrer de forma direta, pelas indústrias têxteis e de madeira ou durante práticas agrícolas (de 300 a 400 toneladas de PCP ao ano na Inglaterra), e indireta, através da disposição de resíduos contendo PCP, como lodo de esgoto, cinzas de incinerador etc., ou mesmo durante a cloração de água potável contaminada por fenóis (mais de 100 toneladas de PCP ao ano na Inglaterra).

Nos efluentes da indústria de papel e celulose, por exemplo, são cerca de 200 compostos clorados encontrados, desde moléculas de baixo peso molecular como fenóis e ácidos carboxílicos, até uma classe indefinida de compostos conhecida como cloro-ligninas, cuja massa molecular é de no mínimo 1000 g/mol (HÄGGBLÖM & SALKINOJA-SALONEN⁵ *apud* SWOBODA-COLBERG, 1995).

O grande volume de substâncias químicas produzidas industrialmente na síntese de pesticidas é o maior responsável pelos rejeitos orgânicos perigosos liberados no ambiente, que incluem reagentes primários, intermediários, produtos finais e solventes. Como consequência, os pesticidas vêm sendo considerados prioridade ambiental por diversas razões além da quantidade produzida, dentre elas por serem introduzidos no ambiente na mesma proporção em que são produzidos e consistente com seu uso, devido a sua ampla propriedade biocida. (SWOBODA-COLBERG, 1995).

São diversos os caminhos para que um composto químico potencialmente poluente seja introduzido no ambiente, e uma vez no mesmo, seu destino será dependente das características físicas, químicas e biológicas locais.

Os compostos químicos que apresentam acumulação permanente ou transitória no ambiente são designados poluentes ou poluentes ambientais (MATHEUS, 1997). Pelo fato de muitos destes compostos serem conhecidos originalmente pela sua introdução antropogênica no ambiente, foram denominados xenobióticos. Segundo MATHEUS (1997), esta denominação tem sido utilizada por alguns pesquisadores a fim de explicar a resistência de certos compostos a biodegradação.

Em geral, a degradação de compostos químicos orgânicos em sistemas naturais se dá, fundamentalmente, pela ação dos microrganismos. Porém, qualquer que seja o composto,

⁴GRIBBLE, G. W. (1992). Naturally occurring organohalogen compounds - a survey. *J. Nat. Prod.* (Lloydia), v.55, p.1353-95.

este sofrerá algum grau de transformação ou biodegradação somente se existir uma enzima ou um sistema enzimático capaz de catalisar a conversão do composto. As características estruturais da molécula a ser degradada podem impedir ou retardar a ação dos microrganismos, o que confere um grau de persistência ou de recalcitrância ao composto (LEISINGER⁶ *apud* MATHEUS, 1997). Um composto orgânico pode ser considerado persistente, segundo GLAZER & NIKAIDO⁷ *apud* MATHEUS (1997), se este não sofrer biodegradação em determinados ambientes, enquanto que um composto será considerado recalcitrante se resistir à biodegradação numa grande variedade de ambientes.

ALEXANDER⁸ *apud* MATHEUS (1997) e SWOBODA-COLBERG (1995) indicaram que os microrganismos são de grande importância para a transformação da estrutura dos xenobióticos introduzidos no solo e na água, bem como a dependência dessa transformação está relacionada às características físicas e químicas do meio ou aos fatores ambientais, como temperatura, pH, disponibilidade de água, luz e oxigênio, e ainda, à resposta dos compostos com respeito às reações químicas ou à degradação microbiana.

Uma vez que tais compostos podem ser suscetíveis a transformações por microrganismos, faz-se necessário relacionar os tipos de processos biológicos envolvidos. WALTER & CRAWFORD (1997) definiram a biodegradação como um processo metabólico freqüente que envolve a quebra completa de um composto orgânico em seus componentes inorgânicos, referido comumente como mineralização. A biotransformação consiste na alteração química da estrutura molecular do composto orgânico ou inorgânico, resultando em uma molécula de complexidade diferente, na perda de alguma propriedade característica, sem a perda da complexidade molecular original (HOEPEL & HINCHEE⁹ *apud* WALTER & CRAWFORD, 1997).

A distribuição dos compostos orgânicos sintéticos através da Biosfera se dá pela volatilização e transporte atmosférico dos mesmos, pela solubilização ou adsorção em partículas veiculadas nos fluxos de águas subterrâneas e de superfície e por sua introdução em uma cadeia alimentar. Pode-se citar como depósitos preferenciais a atmosfera, os solos, os sedimentos, os oceanos e os membros do topo das cadeias alimentares (SWOBODA-COLBERG, 1995).

⁵HÄGGBLUM, M.; SALKINOJA-SALONEN, M. (1991). Biodegradability of chlorinated organic compounds in pulp bleaching effluents. *Water Sci. Technol.*, v.24, p.161-70.

⁶LEISINGER, T. (1983). Microorganisms and xenobiotics compounds. *Experientia*, v.39, p.1183-91.

⁷GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. (1995). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. 1. Ed. New York: W.H. Freeman and Company, 662 p.

⁸ALEXANDER, M. (1981) Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, v.211, p.132-8.

⁹HOEPEL, R. E.; HINCHEE, R. E. (1994). Enhanced biodegradation for on-site remediation of contaminated soils and ground water. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.*, v.6, p.311-431.

Os fatores responsáveis pelo acúmulo na natureza de determinados produtos não dizem respeito somente às características do ambiente de destino, mas também a fatores relacionados estreitamente com a biodegradação, tais como a biodisponibilidade dos compostos orgânicos, as limitações intrínsecas aos microrganismos envolvidos na degradação e as ligações irreversíveis dos poluentes ao húmus (FIELD *et al.*, 1995).

A biodisponibilidade pode ser definida como a forma com que este composto químico está disponível ao organismo. Segundo FIELD *et al.* (1995), existem duas formas nas quais os compostos químicos não se encontram disponíveis aos microrganismos. A primeira, refere-se ao caráter não hidrolisável de polímeros como plásticos e lignina, o que dificulta a ação microbiana ou possibilita que apenas pedaços das moléculas poliméricas sofram degradação. A segunda, diz respeito à baixa dissolução dos compostos altamente apolares em água, somada a uma forte tendência de manterem-se adsorvidos em outras moléculas, como é o caso dos compostos aromáticos policlorados e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH). Devido a tais fatores os microrganismos podem não ter acesso aos compostos químicos e, portanto, não serem capazes de degradá-los.

As limitações intrínsecas, conforme FIELD *et al.* (1995) definiram, referem-se às limitações da capacidade degradativa dos microrganismos envolvidos; portanto, são de origem biológica e variam conforme a comunidade microbiana. A maior consideração a ser feita nesse sentido refere-se à capacidade metabólica celular ligada às formas de mecanismos de ataque às moléculas e, por assim dizer, aos sistemas enzimáticos disponíveis nas células microbianas. Ainda, a estrutura química da molécula pode ser estranha à natureza dos microrganismos, refletindo na inabilidade dos microrganismos em metabolizar o composto desconhecido, uma vez que foram introduzidos no ambiente há um curto período de tempo frente a história evolutiva desses seres vivos (MATHEUS, 1997; WACKETT, 1997).

Um terceiro fator de recalcitrância foi reconhecido por FIELD *et al.* (1995) como a tendência de certos compostos suscetíveis a reações com radicais livres em submeterem-se a um acoplamento oxidativo. Este acoplamento pode resultar na formação de húmus recalcitrante e inacessível aos microrganismos a partir de uma ligação covalente irreversível do composto ao húmus do solo.

Recentemente, o uso de métodos da Biologia Molecular tem revelado os novos conhecimentos dos processos adaptativos dos microrganismos, os quais podem levar a uma melhor previsão da biodegradabilidade de compostos no ambiente (van der MEER *et al.*, 1994). Segundo os autores (opt. cit.), dois diferentes caminhos para a adaptação dos microrganismos aos poluentes podem ocorrer. Um em que o composto é, a princípio, reconhecido como fonte de alimento e os genes necessários são normalmente ativados,

denominado adaptação bioquímica; um outro caminho, chamado de adaptação genética, que acontece quando uma das duas possibilidades descritas no caminho acima não ocorre, então, mudanças ou adições à informação genética existente são necessárias para que enzimas ou proteínas alteradas possam ser sintetizadas de forma a se ajustarem ao novo substrato.

Pesquisas conduzidas com microrganismos que degradam clorobenzenos sugerem que algumas linhagens se adaptaram sob um *stress* seletivo a esses aromáticos clorados (van der MEER *et al.*, 1994). Entretanto, outras enzimas específicas da degradação de compostos halogenados parecem ser bem mais antigas que estas, considerando-se a escala de tempo evolutiva das células estudadas, hipótese postulada por van der MEER *et al.*, 1994, ao se estudar o papel destas enzimas nos microrganismos.

3.2 Compostos orgânicos halogenados - ênfase aos organoclorados

Os compostos orgânicos halogenados são aqueles que possuem átomo(s) de halogênio(s) em sua composição. Os halogênios são os elementos químicos que ocupam a penúltima coluna da Tabela Periódica, sendo eles o flúor, cloro, bromo, iodo e astato. Como classe, os halogênios são fortemente eletronegativos e existem, freqüentemente, como ânions em soluções aquosas. Todos os halogênios formam ligações estáveis com átomos de carbono, e são fortemente influenciados pelo tipo de átomo de carbono no qual estão ligados (WACKETT, 1995). Assim, estes compostos são bastante estáveis no ambiente e muito reativos nos sistemas biológicos, sendo muitos deles bacteriostáticos ou mesmo biocidas importantes.

Os compostos halogenados por átomos de cloro são os mais comuns poluentes no ambiente e a maioria destes compostos é muito tóxica, segundo revisão realizada por ADRIAENS & VOGEL (1995). Tais compostos podem ser alifáticos ou aromáticos. Os primeiros possuem cadeias abertas, como o tetracloroetileno (PCE), o tricloroetileno (TCE), o dicloroetileno (DCE) e o monocloroetileno conhecido como cloreto de vinila (VC), além dos clorometanos e do 1,1,1-tricloro-2,2-bis (*p*-clorofenila) eteno (DDT). Os aromáticos clorados formados por anéis benzênicos compreendem os clorobenzenos em geral, diclorobenzenos (DCB) e hexaclorobenzeno (HCB) entre outros, e são também os bifenilos policlorados (PCBs) e os clorofenóis, como o pentaclorofenol (PCP) e os diclorofenóis (DCP).

Em relação aos clorofenóis, objeto de estudo deste trabalho, o número de átomos de cloro na molécula, classifica-os como monoclorofenóis (CP), diclorofenóis (DCP),

triclorofenóis (TCP), tetraclorofenóis (TeCP) e pentaclorofenol (PCP) com um, dois, três, quatro e cinco átomos de cloro, respectivamente.

Segundo JIN & BHATTACHARYA (1997), os clorofenóis estão entre os compostos orgânicos industriais mais amplamente utilizados e estão listados como poluentes de prioridade pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Além disso, a USEPA, segundo o Manual Environmental Health Criteria (EHC) 71 - Pentachlorophenol (1987), propôs que os despejos provenientes da produção ou de indústrias utilizadoras de PCP, na época, deveriam ser classificados como agudos perigosos devido à presença de concentrações de substâncias como as dibenzodioxinas (H_6CDDs – hexaclorodibenzo-*p*-dioxina), um congênere carcinogênico e de potencial toxicidade crônica do PCP.

Segundo o Manual EHC 71- Pentachlorophenol (1987), a principal vantagem do PCP e seus derivados é a de serem biocidas efetivos e solúveis em solventes orgânicos (PCP) e em água (Na-PCP). Poucos pesticidas possuem um similar espectro de eficiência a baixo custo. Devido a estas características, o PCP e seus sais têm uma ampla variedade de aplicações nas indústrias têxteis e de papel e celulose, como pesticidas na agricultura, como intermediários na produção de herbicidas (CROSBY, 1981) e usos domésticos, atuando como algaecida, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas e moluscocidas. Apesar do PCP e seus derivados terem muitos usos, uma de suas maiores utilizações, 80 % deste (WILD *et al.*, 1992), é na proteção de toras recém cerradas contra fungos saprófitas, e também (em combinação com creosato) na proteção de longa duração de postes de madeiras, toras, vigas e dormentes de estrada de ferro (HÄGGBLÖM & VALO, 1995).

O PCP foi primeiramente sintetizado por MERZ e WEITH em 1872, segundo o Manual EHC 71 - Pentachlorophenol (1987), sendo que o seu uso mais importante, na preservação da madeira, começou somente no final da década de 30 (DOEDENS, 1964¹⁰ *apud* Manual EHC 71 - Pentachlorophenol, 1987). Desde sua primeira introdução nos anos 30, o emprego do pentaclorofenol expandiu-se dramaticamente, atingindo em 1985 um consumo mundial de 100.000 toneladas (BUTTE, 1985¹¹ *apud* WILD *et al.*, 1992).

Segundo WILD *et al.* (1992), o PCP pode ser formado tanto por cloração direta do fenol como por hidrólise do hexaclorobenzeno, sendo este um forte biocida amplamente utilizado. Um estudo realizado pelos autores (*opt. cit.*) mostrou uma estimativa na Inglaterra

¹⁰DOEDENS, J. D. (1964). Chlorophenols. In: KIRK, R. E. & OTHMER, D. F. Eds. *Encyclopedia of chemical technology*, 2nd. Ed., New York, John Wiley and Sons, v.5, p.336-7.

¹¹BUTTE, W.; DENKER, J.; KIRSCH, M.; HOPNER, T. (1985). Pentachlorophenol and tetrachlorophenol in Wadden sediment and clams *Mya arenaria* of the Jadebusen after a 14-year period of wastewater discharge containing PCP. *Environ. Pollut.* (Series B), v.9, p.29-39.

no qual cerca de 90 toneladas de PCP residem em ambientes expostos direta ou indiretamente a este composto, sendo uma parte considerável encontrada no solo.

O uso extensivo e a liberação do PCP no ambiente tem provocado grande preocupação, uma vez que este tem sido identificado como tóxico a muitas formas de vida. Segundo WILD *et al.* (1992), em seres humanos, a exposição ao PCP pode causar anestesia, hipertermia, sudorese, dispnéia e coma. Efeitos crônicos incluem irritação na pele, erupções cutâneas, sinusites e doenças oculares (IARC, 1979¹² *apud* WILD *et al.*, 1992). O PCP ainda pode ser mutagênico, embriotóxico e fetotóxico. Entretanto, há poucas evidências que implicam o PCP como um carcinogênico humano (IARC, 1979 *apud* WILD *et al.*, 1992).

Devido não só ao uso difundido do PCP, mas também às suas propriedades físicas e químicas, uma contaminação generalizada do ar, solo, água, sedimento e organismos foi provocada. O PCP é bastante persistente, muito móvel e, portanto, encontrado em todos os compartimentos ambientais. Segundo WILD *et al.* (1992), na água, o PCP é esperado ser encontrado na forma iônica devido ao fato de ser um ácido fraco (pKa 4,74) e também absorvido nas partículas do próprio solo, sendo sua adsorção maior em solos ricos em matéria orgânica.

3.3 Transformações microbianas dos compostos orgânicos halogenados - ênfase aos organoclorados

3.3.1 Tipos de metabolismos

Devido à estabilidade da ligação dos halogênios aos átomos de carbono, os mecanismos gerais de quebra desta ligação, catalisada por microrganismos, são de suma importância para a compreensão da biotransformação destes compostos. Tais mecanismos podem ser do tipo oxidação, redução, substituição ou eliminação do halogênio. Em alguns casos, para um composto orgânico halogenado entrar no metabolismo intermediário, os halogênios devem ser removidos para que o esqueleto de carbono seja transformado em um intermediário comum. Ainda assim, segundo WACKETT (1997), a biodegradabilidade dos compostos pode variar amplamente, mas a regra geral é que a degradabilidade biológica de um organo-halogenado diminua com o aumento da quantidade dos átomos de halogênio.

Além disso, segundo WACKETT (1995), a rota metabólica não deve gerar grupos químicos muito reativos, prejudiciais aos microrganismos. Portanto, existem repressões

¹²IARC (1979). Pentachlorophenol. *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. v.20, p.303-25.

catabólicas que podem limitar as possibilidades de assimilação microbiana dos compostos orgânicos halogenados.

VOGEL *et al.* (1987) dividiram em duas classes gerais as transformações bióticas dos compostos halogenados alifáticos: as que requerem e as que não requerem elétrons externos. Estas reações, de uma forma geral, ocorrem também entre os halogenados aromáticos (BOUWER & ZEHNDER, 1993), uma vez que envolvem o mesmo tipo de elemento, o halogênio.

As reações que não requerem transferência de elétrons ocorrem em água, na ausência de catalisadores inorgânicos ou bioquímicos (VOGEL *et al.*, 1987). Em geral, estas reações ocorrem lentamente, com meia vida de dias a séculos, mas podem ser aceleradas pelas atividades biológicas derivadas de enzimas. São exemplos destas reações, a substituição e a dehidroalogenação.

Por outro lado, os compostos halogenados podem ser oxidados ou reduzidos, dependendo da sua estrutura e condições ambientais, sendo que os aceptores e doadores de elétrons usados em muitas reações envolvendo compostos halogenados alifáticos têm sido derivados de sistemas biológicos (VOGEL *et al.*, 1987).

Como os compostos orgânicos geralmente correspondem às formas reduzidas do carbono, a oxidação torna a reação energeticamente favorável. Entretanto, os compostos halogenados podem sofrer reações de redução, uma vez que, segundo VOGEL *et al.* (1987), a presença dos substituintes halogenados torna-os relativamente oxidados. Portanto, com o aumento do número de halogênios, a redução torna-se mais propícia do que a oxidação, como é o caso do hexaclorobenzeno que é degradado em melhores condições sob anaerobiose, em que os ambientes são extremamente reduzidos (FIELD *et al.*, 1995).

De qualquer forma, compostos halogenados podem sofrer oxidações mediadas pelas monoxigenases, sendo definido por VOGEL *et al.* (1987) três mecanismos gerais: a) α -hidrolisação, que é a incorporação do oxigênio na ligação carbono-hidrogênio produzindo um álcool; b) halosil-oxidação, que é a oxidação de um halogênio substituinte, uma espécie de hidrólise rápida que produz um álcool e um íon hipoclorito; c) oxidação da ligação dupla do carbono, via epoxidação.

Em relação as reações de redução, há três mecanismos envolvendo os compostos alifáticos halogenados (VOGEL *et al.*, 1987) e os aromáticos halogenados (BOUWER & ZEHNDER, 1993): a) hidrogenólise, que é uma redução na qual a ligação carbono - halogênio é quebrada e um átomo de halogênio é substituído pelo hidrogênio; b) dialoelimação, que é uma redução na qual dois halogênios são removidos de átomos de

carbono adjacentes e, ao mesmo tempo, forma-se uma ligação dupla entre os átomos de carbono; c) reação de acoplamento, que é uma ligação entre dois radicais livres, eliminando-se um halogênio.

BOUWER & ZEHNDER (1993) verificaram que todos estes mecanismos de redução dos compostos halogenados podem estar envolvidos no processo da desalogenação redutiva, sendo este o termo genérico para designar a reação cujos compostos halogenados são submetidos e durante a qual o halogênio é retirado da molécula, tornando-os mais reduzido.

Ao contrário de aparentes limitações, os microrganismos têm obtido sucesso na transformação de compostos orgânicos halogenados, que inclui tanto a remoção do halogênio, como a quebra da estrutura de carbono, seja ele aromático ou não. Resumindo, segundo WACKETT (1995; 1997) e ADRIAENS & VOGEL (1995), estas transformações ocorrem de três formas :

1. Via o metabolismo bioquímico principal, em que o composto é a única fonte de carbono e energia;
2. Pelo uso de compostos orgânicos halogenados como aceptores finais de elétrons, gerando ATP através do transporte de elétrons;
3. Via co-metabolismo, pelo qual os microrganismos são capazes de catalisar reações oxidativas ou desalogenação redutiva sem um ganho aparente de energia.

Independente dos tipos de reações utilizadas pelos microrganismos, o metabolismo pela via principal normalmente envolve a sobrecarga de uma nova reação metabólica numa via já existente. Assim, a enzima envolvida neste processo gera um lucro através do metabolismo principal (WACKETT, 1995).

Um exemplo, é o caminho do carbono 1 (C₁) usado pelos organismos metanotróficos e metilotróficos. A geração de energia ocorre pois o carbono é assimilado ao nível da oxidação do formaldeído (ANTHONY¹³ *apud* WACKETT, 1995). Algumas células metilotróficas contém um gene adicional de codificação para a indução da enzima diclorometano desalogenase (LA ROCHE & LEISINGER, 1990). As células que contém a diclorometano desalogenase e a via básica do carbono 1 (C₁) são capazes de crescer em dialometano como uma única fonte de carbono e energia (KOHELER-STALUB & LEISINGER¹⁴ *apud* WACKETT, 1995).

¹³ANTHONY, C. (1982) *The Biochemistry of methylotrophs*. London: Academic Press.

¹⁴KOHELER-STALUB, D.; LEISINGER, T. (1985) Dichloromethane dehalogenase of *Hypomicrobium* sp. strain DM2. *J. Bacteriol.*, v.162, p.676-81.

A utilização de um composto orgânico halogenado como acceptor de elétrons tem sido verificada em muitos processos anaeróbios. Segundo WACKETT (1995), no esforço crescente em compreender os microrganismos anaeróbios, muitos exemplos de compostos orgânicos halogenados como aceptores finais de elétrons vêm sendo apresentados.

DOLFING & HARRISON (1992) estudaram a variação de energia livre de formação dos compostos halogenados aromáticos e o seu potencial como acceptor de elétrons em ambientes anaeróbios. Neste estudo, DOLFING & HARRISON (1992) sugeriram que os microrganismos poderiam conservar energia para seu crescimento via a disponibilidade de elétrons na forma de H_2 , tendo compostos aromáticos halogenados como aceptores finais desses elétrons. SHELTON & TIEDJE (1984), ao isolarem uma bactéria, posteriormente identificada e denominada por *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 (MOHN & KENNEDY, 1992), observaram que a espécie foi capaz de degradar o 3-clorobenzoato e obter energia para o crescimento através do processo de desalogenação redutiva, sem no entanto haver assimilação do carbono por parte do organismo.

HOLLIGER & SCHUMACHER (1994) propuseram um modelo de respiração, assumindo a desalogenação redutiva como um processo respiratório, baseado na descloração redutiva do tetracloroetileno pela *Desulfobacter restrictus*. No item 3.3.3.1 e 3.3.3.2 serão comentados alguns exemplos de como os compostos halogenados podem ser utilizados como aceptores de elétrons durante a desalogenação redutiva anaeróbia.

Por último, tem-se o processo co-metabólico, também chamado de reação “gratuita”, que ocorre quando um composto é transformado por um microrganismo, ainda que o organismo seja incapaz de crescer na presença desse composto (ATLAS & BARTHA, 1987). As reações referidas como co-metabolismo ocorrem em microrganismos que expressam ampla especificidade de enzimas catabólicas, podendo transformar compostos orgânicos halogenados sem uma ligação direta com o seu metabolismo energético ou biossintético. Estas reações são executadas de forma não específica, como definido por HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), numa reação de desvio por certos sistemas enzimáticos.

O co-metabolismo pode ser um importante fator para a destoxificação ambiental, uma vez que através deste, a ligação carbono-halogênio é quebrada. Os produtos provenientes do co-metabolismo podem ser tanto resistentes a futuras biotransformações, como utilizados por outro microrganismo para suas funções energéticas e/ou biossintetizantes, ou ainda, transformados por outras reações co-metabólicas.

Por ser muito importante a compreensão dos sistemas geradores de energia em paralelo às reações do co-metabolismo, essas reações constituem objeto de vários estudos

envolvendo a desalogenação redutiva. Muitos exemplos de ocorrência de desalogenação redutiva são enquadrados como reações co-metabólicas por não servirem como fonte de carbono e energia aos microrganismos envolvidos. Este fato é descrito freqüentemente em processos aeróbios, cujos compostos orgânicos halogenados não servem como aceptores finais de elétrons (HOLLIGER & SCHUMACHER, 1994).

3.3.2 Biodegradação de compostos halogenados sob condições aeróbias

Sob condições aeróbias, muitas reações são dependentes da presença de oxigênio molecular, tanto como acceptor final de elétrons, como reagente nos processos executados pelas oxigenases. Geralmente, a oxidação de compostos halogenados em ambientes aeróbios mediadas por microrganismos é realizada por enzimas que estão envolvidas no catabolismo de substâncias naturais, mas que exibem baixa especificidade ao substrato (van der MEER *et al.*¹⁵ *apud* ADRIAENS & VOGEL, 1995).

Vários exemplos sobre a biodegradação aeróbia vêm sendo dados, quase todos envolvendo reações de oxidação de moléculas sem a remoção do átomo de cloro durante a primeira etapa. Bactérias aeróbias empregam oxigenases, que contém um (monoxigenase) ou dois (dioxigenase) átomos de oxigênio e, através de um ataque eletrolítico ao átomo de carbono, ocorre a formação de uma ligação carbono do tipo hidroxila. Enquanto que compostos aromáticos e alifáticos podem servir como um substrato à monoxigenase, os substratos das dioxigenases são geralmente limitados aos compostos aromáticos (ADRIAENS & VOGEL, 1995).

A (per)oxidase, enzima responsável pela ação degradativa da lignina por fungos, tem sido estudada com especial atenção pelo seu papel na oxidação, desalogenação e quebra do anel de compostos aromáticos clorados. Elas ativam o núcleo aromático através da formação de radicais altamente reativos, pela extração única de elétrons, apesar de possuírem uma especificidade ao substrato muito baixa. Estas enzimas são capazes de mediar hidroxilações, hidratações e desalogenação de compostos aromáticos, como por exemplo, clorobenzenos, pentaclorofenol, bifênilos policlorados e DDT (ADRIAENS & VOGEL, 1995). Por outro lado, as monoxidases oxidam etilenos clorados e compostos aromáticos halogenados através da epoxidação da ligação dupla.

Outra reação pertinente à degradação dos compostos clorados, catalisada sob condições aeróbias e independente do oxigênio molecular, é a halogenação mediada por

indução altamente hidrolítica de desalogenases e haloidrolases. Quando um microrganismo possui estas enzimas, e se os compostos halogenados (alifáticos ou aromáticos) estiverem presentes em concentrações suficientes para sustentar a população microbiana, estes servirão como fonte de carbono e energia.

Muitos estudos envolvendo a degradação fúngica do PCP foram conduzidos utilizando fungos membros da família dos Basidiomicetos capazes de degradar a lignina, um polímero estrutural das plantas, composta por radicais fenólicos. Apesar da característica insolúvel da lignina, os fungos excretam enzimas extracelulares que catalisam a etapa inicial oxidativa de despolimerização da molécula (MILESKI *et al.* 1988). Entre os fungos estudados, estão: *Phanerochaete chrysosporium* e *Phanerochaete sordida*, membros da família dos Basidiomicetos. Porém, um número de espécies de outras famílias como leveduras, Zigomicetos, Deuteromicetos e Ascomicetos também já foi testado (SEIGLE-MURANDI *et al.*¹⁶ *apud* McALISTER *et al.*, 1996).

Segundo McALISTER *et al.* (1996), a biodegradação microbiana é uma área de grande potencial para estudos de remoção do PCP no ambiente. Em sistemas aeróbios, tanto bactérias como fungos são capazes de degradar o PCP e, inclusive, existe uma ampla relação de microrganismos isolados em culturas puras, como apresentado por McALISTER *et al.* (1996). Os gêneros de bactérias conhecidos em degradar o PCP incluem: *Flavobacterium* sp., *Rhodococcus chlorophenolicus*, outros *Rhodococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Mycobacterium* sp., *Sphingomonas* sp. e *Pseudomonas* sp.

O mecanismo de atuação biológica do PCP parece interferir nos tipos de microrganismos tolerantes ao composto. O PCP, por desacoplar a fosforilação oxidativa, torna a membrana celular permeável aos prótons, resultando na perda do potencial elétrico e alterando o gradiente de pH (STEIERT *et al.*, 1988). Assim, as características físico-químicas da membrana celular parecem ter grande interferência na capacidade dos microrganismos tolerarem o PCP. Este fato parece estar relacionado ao efeito protetor do lipopolisacarídeo (LPS) presente nas células Gram-negativas (McALISTER *et al.*, 1996). Parece haver uma forte correlação entre a presença de microrganismos tolerantes ao PCP e bactérias Gram-negativas. Assim, a bactéria Gram-positiva tende a ser mais sensível ao PCP do que a Gram-negativa.

Estudos conduzidos com microrganismos com a preocupação de melhorar a degradação de compostos orgânicos clorados como o PCP, levou à execução de trabalhos

¹⁵van der MEER, J. R.; de VOS, W. M.; HARAYAMA, S.; ZEHNDER, A. J. B. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev.*, v.56, p.677-694.

¹⁶SEIGLE-MURANDI, F.; STEIMAN, R.; BENOIT-GUYOD, J. L. (1991) Biodegradation potential of some micromycetes for pentachlorophenol. *Ecotox. Environ. Safety.*, v.21, p.290-300.

como o de MIETHLING & KARLSON (1996), cujo objetivo principal foi acelerar a mineralização do PCP em solos não estéreis, após a inoculação com duas linhagens de bactérias degradadoras de PCP. Uma destas linhagens era a espécie Gram-negativa aeróbia *Sphingomonas chlorophenolicum* linhagem RA2 (originalmente *Pseudomonas sp.* linhagem RA2) isolada do solo por RADEHAUS & SCHMIDT (1992). Esta bactéria foi capaz de mineralizar completamente o PCP quando usado como única fonte de carbono, em concentrações tão altas quanto 200 mg/L, sob cultivo em batelada.

Ainda, em relação a estudos envolvendo culturas puras de microrganismos, foi investigado o co-metabolismo do PCP na presença de dextrose, em cultura de *Pseudomonas cepacia* e em uma cultura mista aclimatada desenvolvida a partir de um sistema de lodos ativados. Neste estudo, realizado por BANERJI & BAJPAAI (1994), *Ps. cepacia* foi incapaz de usar o PCP como única fonte de carbono e energia. Porém, na presença de dextrose tanto *Ps. Cepacia* como a cultura mista foram capazes de co-metabolizar o PCP como substrato primário, até concentrações de 100 mg/L. Neste estudo, o PCP foi identificado como um inibidor não competitivo de crescimento de células de *Pseudomonas cepacia*.

O efeito de três compostos aromáticos, p-cresol, 2,4-Diclorofenol e 2,4,6-Triclorofenol, sob o crescimento celular e a degradação de PCP pela *Flavobacterium sp.* ATCC 39723, foram investigados por GU & KORUS (1995). Enquanto o p-cresol não foi degradado por esta bactéria, DCP e TCP foram degradados simultaneamente com PCP. As taxas de degradação do PCP foram modeladas através dos modelos de inibição convencional.

Estudos envolvendo sistemas aeróbios de tratamento foram investigados quanto a sua capacidade de degradação dos clorofenóis, incluindo o PCP. Um reator seqüencial em batelada foi operado com lodo proveniente de um sistema de lodos ativados aclimatado ao 4-CP. A taxa de degradação específica do substrato no sistema seqüencial atingiu 116 mg/g.h (BUITRÓN *et al.*, 1994).

KARAMANEV & SAMSON (1998) observaram em um reator de biofilme imobilizado uma alta taxa volumétrica de degradação do PCP, superior a 950 L/h.

3.3.3 Biodegradação de compostos halogenados sob condições anaeróbias

Segundo WALTER & CRAWFORD (1997), a biodegradação de alguns compostos como os hidrocarbonetos clorados pode ser mais rápida, ao menos se iniciada sob condições anaeróbias. De fato, compostos polihalogenados, em geral, possuem uma maior probabilidade

de serem metabolizados por uma reação inicial de desalogenação redutiva, por um microrganismo ou consórcio anaeróbio (WACKETT, 1997).

Deve-se enfatizar que a desalogenação redutiva ocorre mais freqüentemente e com amplo espectro de substratos, sob condições anaeróbias, apesar da desalogenação também ser verificada via degradação aeróbia (FETZNER & LINGENS, 1994).

MOHN & TIEDJE (1992) constataram, sob condições anaeróbias, que a desalogenação redutiva é o mecanismo dominante na remoção do halogênio. Evidências de estudos indicam que a atividade da desalogenação redutiva é difundida em muitos ambientes anaeróbios e, provavelmente, é uma transformação obrigatória para os poluentes aromáticos halogenados anterior à quebra do núcleo aromático.

Dentro de uma família de compostos clorados, a desalogenação redutiva é geralmente proporcional ao grau de cloração. Quanto mais clorado o composto, maior é a possibilidade de sofrer desalogenação. Diferentemente dos processos aeróbios, um aumento no grau de halogenação não impede sua transformação e, de fato, poluentes altamente halogenados parecem ser mais suscetíveis à desalogenação redutiva anaeróbia (FIELD *et al.*, 1995).

Alguns microrganismos, sob condições anaeróbias, são capazes de remover o halogênio do anel aromático e trocá-lo por um próton, tanto em compostos aromáticos homocíclicos como heterocíclicos (HOLLIGER *et al.*, 1988). Frequentemente, os mecanismos de desalogenação ocorrem numa seqüência, de modo a permitir que quase todos ou todos os halogênios sejam removidos da molécula halogenada. Exemplos de estudos com os PCBs (QUENSEN *et al.*, 1990; YE *et al.*, 1992), o PCP (MIKESELL & BOYD, 1986) e o HCB (FATHEPURE *et al.*, 1988), somados a alguns citados em recente revisão realizada por ADRIAENS & VOGEL (1995), mostraram que tanto os alifáticos como os aromáticos clorados são passíveis de transformação sob condições anaeróbias.

Evidências do envolvimento de microrganismos na desalogenação redutiva de compostos aromáticos ou alifáticos incluem, conforme SUSARLA *et al.* (1998): a) especificidade da reação redutiva; b) períodos característicos de fase de adaptação (lag); c) ausência de atividade em ensaios controles com amostra biológicas autoclavadas; d) isolamento de culturas microbianas desalogenadoras.

A reação de desalogenação redutiva tem sido observada em diversos ambientes anaeróbios incluindo sedimentos marinhos, de rios (QUENSEN *et al.*, 1988; BRUIN *et al.*, 1992), de lagos (HALE *et al.*, 1990), lodos de esgotos (FATHEPURE *et al.*, 1988), materiais de aquíferos (GIBSON & SUFLITA, 1986) e solos (MATUS *et al.*, 1996). A existência de

compostos halogenados naturais justificam essa atividade inerente às células microbianas no ambiente. Alguns halofenóis, provenientes da atividade das algas e vários animais marinhos, vêm sendo estudados quanto a sua disponibilidade à biodegradação por microrganismos. O 2,4-dibromofenol (DBP), por exemplo, composto naturalmente encontrado em sedimentos marinhos, sofre degradação biológica sob condições anaeróbias, como observado por KING (1988).

Para uma melhor compreensão sobre as reações que envolvem a desalogenação redutiva, SUFLITA & TOWNSEND (1995) questionaram sobre qual seria o benefício fisiológico aos microrganismos que catalisam esta reação, uma vez que a desalogenação redutiva de alguns compostos halogenados aromáticos levam a congêneres menos halogenados, porém com o anel aromático intacto, conforme constatado por FATHEPURE *et al.* (1988) e QUENSEN *et al.* (1988). Assim, os metabólitos desalogenados dos substratos iniciais são freqüentemente acumulados em proporções estequiométricas e o anel aromático permanece intacto.

Pela análise dos autores (SUFLITA & TOWNSEND, 1995), embora a desalogenação redutiva não forneça uma fonte de carbono para os microrganismos, ela pode suprir as células em energia, desde que envolvida em processos respiratórios. Desse modo, os microrganismos desalogenadores transferem elétrons ao composto aromático halogenado, provavelmente por uma série de transportadores intermediários. Este processo estaria ligado à conservação de energia, caso o composto halogenado fosse utilizado como acceptor final de elétrons.

Conforme WACKETT (1995), acredita-se que as reações redutivas possam ser vistas como um curto circuito pelas quais os elétrons são transferidos diretamente para o substrato orgânico ao invés de transferidos ao oxigênio molecular.

Cálculos termodinâmicos envolvendo a variação de energia livre padrão, sugerem que a oxidação do hidrogênio, usando o composto aromático halogenado como acceptor de elétrons, possa produzir mais energia do que os aceptores de elétrons comuns, disponíveis em ambientes anaeróbios (DOLFING & HARRISON 1992). Evidências suportam a hipótese que a desalogenação redutiva poderia ser uma forma de respiração anaeróbia resultando em benefício energético para os microrganismos desalogenadores, como verificado por MOHN & TIEDJE (1991) em estudos com suspensão de células de *Desulfomonile tiedjei*.

Entretanto, é importante salientar que a desalogenação redutiva é um processo bioquímico que pode ser empregado pelos microrganismos em metabolismos específicos, alguns bem estudados outros não. MOHN & TIEDJE (1992) salientaram que enquanto alguns microrganismos catalisam a desalogenação redutiva num processo de co-

metabolismo, outros catalisam num processo respiratório e conservam energia. Isto, porém, não significa que só existam estes dois processos envolvendo a desalogenação redutiva.

A biodegradação dos compostos orgânicos halogenados pode ocorrer na ausência de outros compostos orgânicos. Porém, a desalogenação redutiva ocorre não somente na presença de co-substratos orgânicos, como também parece ser dependente da presença destes, segundo alguns estudos realizados, como será verificado posteriormente nos itens 3.3.3.1 e 3.3.3.2.

Se a desalogenação redutiva estiver, efetivamente, envolvida numa nova forma de respiração anaeróbia em microrganismos hábeis em desalogenar, há uma óbvia necessidade de relacionar esta reação aos doadores de elétrons apropriados. Neste caso, a transformação anaeróbia dos aromáticos clorados ocorre via descloração, que envolve uma troca de cloretos com hidrogênio. Tanto os aromáticos como os alifáticos servem como aceptores de elétrons na descloração redutiva, sendo que cada etapa da descloração requer dois elétrons e, portanto, um doador de elétrons é necessário para completar a reação. Consequentemente, a falta destes doadores pode limitar a transformação de compostos orgânicos halogenados no ambiente em questão.

Os mecanismos pelos quais estes doadores atuam não é claro e nem doadores de elétrons únicos têm provado ser um sucesso total em promover a atividade da desalogenação redutiva. Eles podem servir como uma fonte de carbono para os microrganismos desalogenadores ou para outros microrganismos que possam viver em associação sinérgica, mutualística e até comensal com os desalogenadores (SUFLITA & TOWNSEND, 1995).

3.3.3.1 A desalogenação de organoclorados por culturas puras anaeróbias

Apesar de muitos poluentes halogenados aromáticos sofrerem a desalogenação redutiva em ambientes anóxicos, o conhecimento sobre os microrganismos que catalisam esta reação é limitado. São raras as culturas puras de bactérias anaeróbias que catalisam a desalogenação redutiva, e isto advém das complexas interações ecológicas entre as populações microbianas em sistemas anaeróbios e das dificuldades inerentes às técnicas para a obtenção de culturas anaeróbias puras em laboratório (WACKETT, 1995).

Os organismos anaeróbios conhecidos capazes de realizar a desalogenação redutiva incluem espécies ou tipos microbianos como *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 (MOHN & TIEDJE, 1990; MOHN & KENNEDY, 1992), uma bactéria anaeróbia estrita, Gram-negativa, redutora de sulfato capaz de desalogenar uma variedade de halobenzoatos

substituídos (LINKFIELD & TIEDJE, 1990) e clorofenóis (MOHN & KENNEDY, 1992); *Dehalobacter restrictus* (HOLLIGER & SCHUMACHER, 1994); um representante do gênero *Clostridium* sp. capaz de transformar fenóis clorados (MADSEN & LICHT, 1992); um microrganismo filogeneticamente relacionado a mixobactéria que pode crescer sob condições anaeróbias desalogenando 2-CP (COLE *et al.*, 1994); microrganismos anaeróbios isolados, Gram-positivos, pertencentes ao gênero *Desulfitobacterium*, capazes de realizar a desalogenação redutiva, sendo exemplos: *D. dehalogenans* (UTKIN *et al.*, 1995; UTKIN *et al.*, 1994), *D. chlororespirans* (SANFORD *et al.*, 1996), capaz de desalogenar redutivamente o 3-cloro-4-hidroxibenzoato, *D. hafniense* (CHRISTIANSEN & AHRING, 1996), *Desulfitobacterium* sp. linhagem PCE1 que desalogenam fenóis *ortho* policlorados como o PCE (GERRITSE *et al.*, 1996). *D. frappieri* PCP-1 (DENNIE *et al.*, 1998) mostrou uma ampla especificidade de substratos com os quais é capaz de desalogenar halogênios na posição *orto*, *para* e *meta* e também capacidade em desclorar o PCP a 3-CP. A *D. frappieri* PCP-1 foi estudada e aplicada tecnologicamente na recuperação de solos contaminados por PCP em estudos realizados por BEAUDET *et al.* (1998).

Os microrganismos capazes de degradar o PCP existem em ambientes não só aeróbios, mas também em ambientes anaeróbios, muitos sem prévia exposição ao PCP. Poucas são as pesquisas que isolaram com sucesso e identificaram bactérias anaeróbias degradadoras de PCP, porém pesquisas sobre a degradação anaeróbia do PCP são de grande importância, pois muitos locais contaminados com PCP são ambientes anaeróbios como solos, águas, sedimentos e despejos industriais.

A primeira bactéria capaz de desalogenar o PCP foi isolada e classificada como *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, em trabalho realizado por DeWEERD *et al.* (1990). Outra bactéria estritamente anaeróbia degradadora de PCP foi relacionada a *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, denominada como linhagem DCB-2 no artigo de CHRISTIANSEN & AHRING (1996).

Apesar de muitos compostos serem desalogenados redutivamente por comunidades anaeróbias, a dificuldade em se obter microrganismos isolados capazes de desclorar compostos específicos deixa uma questão em aberto quanto à responsabilidade dos microrganismos envolvidos. Por indicação de experimentos, KOHRING *et al.* (1989) sugeriram que um mesmo organismo pode catalisar a descloração do 2,4-DCP, sob condições metanogênicas e de redução do sulfato. Porém, esta hipótese não foi confirmada pelos autores.

HOLLIGER *et al.* (1992) constataram a existência de especificidade de degradação do 1,2,3-TCB na presença de lactato em uma coluna de percolação preenchida com

sedimento de rio que apresentou atividade de descloração de triclorobenzenos (TCBs) e diclorobenzenos (DCBs). A especificidade foi identificada pela produção padrão constante dos isômeros dos produtos de degradação do 1,2,3-TCB. As bactérias envolvidas não foram identificadas, apesar da inibição da metanogênese pelo BESA não ter influenciado a descloração e as acetogênicas isoladas não apresentarem atividade desclorante. A especificidade ao substrato foi também descrita para os clorobenzoatos e clorofenóis. *D. tiedjei*, por exemplo, foi somente capaz de desclorar *meta*-benzoatos halogenados (SUFLITA *et al.*¹⁷ *apud* SUFLITA *et al.* 1988).

De acordo com WIDDEL (1988), linhagens isoladas de bactérias redutoras de sulfato enriquecidas com compostos aromáticos são, freqüentemente, capazes de usar uma grande variedade destes. No entanto, poucas bactérias redutoras de sulfato que degradam compostos aromáticos clorados foram isoladas em culturas puras. Apesar disto, muitos trabalhos têm indicado o seu envolvimento na descloração redutiva destes compostos, como os de KOHRING *et al.*, (1989), MORT & DEAN-ROSS (1994), HÄGGBLOM & YOUNG (1990) e HÄGGBLOM & YOUNG (1995).

Em conclusão, foram vários os trabalhos realizados com o intuito de verificar quais os grupos microbianos envolvidos na reação de desalogenação redutiva e como obtê-los em culturas puras. Apesar de muitas indicações quanto aos grupos específicos destes microrganismos, ainda há muito a ser feito para conseguir identificá-los e muito a esclarecer quanto aos mecanismos de atuação destes grupos microbianos.

3.3.3.2 A desalogenação de organoclorados por consórcios anaeróbios - a importância das interações microbianas

Os microrganismos anaeróbios são capazes de realizar a desalogenação redutiva de compostos altamente clorados como percloroetileno (PCE), bifenilos policlorados (PCBs), hexaclorobenzenos (HCBs) e pentaclorofenol (PCP). Como demonstrado por VOGEL & McCarty . (1985), o PCE pode ser degradado sob condições metanogênicas e na presença de lactato como visto por BRUIN *et al.*, (1992); por sua vez, os PCBs (Aroclor 1242) também podem ser degradados sob anaerobiose, como observado por QUENSEN *et al.* (1988), QUENSEN *et al.*, (1990) e YE *et al.* (1992) durante estudos com microrganismos oriundos de sedimentos de rios; os HCBs, segundo FATHEPURE *et al.* (1988), podem sofrer degradação por culturas microbianas mistas provenientes de lodos de esgoto; o PCP é também passível de degradação por microrganismos anaeróbios em consórcios (MIKESELL

¹⁷SUFLITA, J. M.; HOROWITZ, A.; SHELTON, D. R.; TIEDJE, J. M. (1982). Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science*, v.218, p.1115-7.

& BOYD, 1986) e, como anteriormente pontuado, por culturas puras como a espécie *D. tiedjei* (MOHN & KENNEDY, 1992).

QUENSEN *et al.* (1990) verificaram a existência de diferentes padrões de descloração e, baseado nestes padrões, os autores sugeriram o envolvimento de diferentes microrganismos hábeis em desclorar PCBs nos diferentes locais estudados. Cada qual com características específicas de descloração dos PCBs. Da mesma forma, YE *et al.* (1992) sugeriram que os microrganismos responsáveis pela descloração do PCB, provenientes de sedimentos de rio, deveriam ser agrupados em duas populações de acordo com suas respostas metabólicas a tratamentos experimentais. Os resultados dos autores (opt. cit.), revelaram que os microrganismos sobreviventes a tratamentos para verificação de esporulação, preferencialmente removeram os átomos de cloro da posição *meta*, enquanto que os microrganismos eliminados no tratamento, contribuíram principalmente para a descloração *para*. Estes resultados indicaram que as bactérias anaeróbias formadoras de esporos são, no mínimo, um dos grupos fisiológicos responsáveis pela desalogenação redutiva dos PCBs.

Bactérias formadoras de esporos parecem estar também envolvidas na descloração do PCP (JUTEAU *et al.*, 1996), do 2,4,6-TCP (MADSEN & AAMAND, 1992) e do 2,4-DCP (ZHANG & WIEGEL, 1990).

JUTEAU *et al.* (1996) afirmaram que o tratamento a quente eliminou as metanogênicas de uma cultura estudada e supuseram que estas não eram essenciais para a descloração do PCP no consórcio estudado. Esta conclusão foi também sustentada pelo fato de que a inibição da metanogênese pelo BESA (inibidor específico da metanogênese - inibe a coenzima que atua na última etapa da formação de metano) não inibiu a descloração do PCP ao 3,5-DCP. Por sua vez, a descloração do 3-CP foi inibida por completo pelo tratamento a quente ou pela presença de BESA, sugerindo que a metanogênese é requerida para esta etapa do processo. Assim, este resultado infere que um microrganismo sintrófico estaria envolvido na completa descloração do PCP. Segundo os autores (opt. cit.), a íntima associação entre os grupos microbianos pareceu colaborar com a ótima eficiência na descloração do PCP.

A desalogenação redutiva do PCP também pareceu dependente da atividade metanogênica em estudos conduzidos por STUART & WOODS (1998), onde uma cultura mista alimentada por acetato mostrou que coincidentemente com a diminuição da degradação do acetato, a taxa de degradação do PCP e 2,3,4,5-TeCP também diminuiu. Este efeito pôde indicar, segundo os autores (opt. cit.), um efeito inibitório ou tóxico da presença

de subprodutos da degradação do PCP sob a desalogenação reductiva ou uma dependência dos microrganismos descloradores à atividade metanogênica.

Trabalhos com o PCE, como os de BRUIN *et al.* (1992), indicaram também que diferentes grupos bacterianos podem estar envolvidos em diferentes etapas da mineralização de organoclorados.

A biodegradação anaeróbia de 12 clorofenóis, com 1 a 5 átomos de cloro na molécula, foi verificada em estudo conduzido por WANG *et al.* (1998), utilizando lodo de digestor não aclimatado e com uma cultura mista produtora de metano e previamente enriquecida com fenol, 2- e 3-CP. A cultura enriquecida degradou todos os clorofenóis exceto o 4-CP, enquanto a cultura não aclimatada não degradou o PCP ou o 2,3,4,6-TeCP. Para o composto com o mais alto número de átomos de cloro (PCP), nenhuma redução significativa foi observada em 60 dias, mesmo a baixas concentrações 0,015 mM. A cultura aclimatada não degradou o PCP a 0,038 mM ou concentração maior, mas este desapareceu completamente a baixos níveis (0,015 mM) em 50 dias, com o 2,3,4,6-TeCP como o único produto da descloração detectável.

Diferentemente, a concentração de três clorofenóis (2-, 3-, e 4-CP) permaneceram constantes por 100 dias em todas as incubações estudadas por ENNIK-MAARSEN *et al.* (1998), utilizando um lodo granular não adaptado e alimentado com acetato, propionato e butirato.

A desalogenação de 2-CP ocorreu em culturas em batelada desenvolvida com diferentes inóculos: lodo de esgoto digerido, sedimento de lagoa aerada e biomassa de um reator anaeróbio, os dois últimos provenientes de uma indústria de branqueamento de papel (BASU *et al.*, 1996). O efeito de vários doadores de elétrons como hidrogênio, acetato, propionato, etanol e extrato de levedura foram estudados. A gradual perda da atividade desalogenadora nas culturas que receberam somente 2-CP, sugere que há um requerimento adicional de compostos pelo consórcio. Segundo BASU *et al.* (1996), isto indica que a presença de doadores de elétrons orgânicos estimulou a desalogenação do 2-CP. Neste estudo o extrato de levedura 0,1% (w/v) mostrou ser superior quando comparado ao 10 mM de acetato, propionato ou etanol em sustentar uma população degradadora de 2-CP ativa. O extrato de levedura sendo um substrato orgânico complexo também fornece fatores de crescimento essenciais, além de servir como doador de elétrons.

Estudos realizados em campo ou em laboratório demonstraram que comunidades anaeróbias podem mineralizar diferentes compostos. BOYD & SHELTON (1984) investigaram a biodegradação anaeróbia de isômeros de CP e DCP em lodo fresco e

aclimatado ao 2-CP, 3-CP e 4-CP, onde puderam demonstrar que fenóis clorados estão sujeitos a biodegradação em lodo de digestor anaeróbio.

Culturas enriquecidas capazes de desclorar 2- ou 3-clorobenzoato não o foram para desclorar 3- e 4-clorobenzoato ou 2- e 4-clorobenzoato, respectivamente (GENTHNER *et al.*, 1989). Consórcios metanogênicos degradadores enriquecidos a partir de lodo de esgoto ou sedimentos aclimatados a um isômero de monoclorofenol também mostraram uma certa especificidade quanto ao substrato (BOYD & SHELTON, 1984; GENTHNER *et al.*, 1989).

PERKINS *et al.* (1994), usando dois tipos de inibidores, um para as metanogênicas (BESA) e a vancomicina que impede a síntese da parede celular de eubactérias, indicaram uma ligação entre a acidogênese e a descloração. BESA inibiu a metanogênese, mas não a descloração do TCP em meio contendo hidrogênio e frutose. A vancomicina, de outra forma, inibiu a desalogenação, mas não afetou a metanogênese. Os autores encontraram que a desalogenação redutiva do TCP foi realizada por uma bactéria e não por organismos metanogênicos. Entretanto, quando a cultura foi alimentada com acetato, ambos inibidores pararam efetivamente a desalogenação, podendo indicar uma relação sintrófica, nestas condições, entre a metanogênica acetoclástica e a bactéria desalogenadora, esta uma possível eubactéria.

A descloração de 13 clorofenóis por sedimentos anaeróbios estuarinos foi estudada por MASUNAGA *et al.* (1996). Os resultados indicaram uma alta capacidade de descloração do sedimento, provavelmente, devido à pré exposição do sedimento aos CPs e compostos relacionados aos clorofenóis no ambiente. Adicionalmente, sedimentos anaeróbios frescos e adaptados a DCP de dois lagos estudados por HALE *et al.* (1990), exibiram diferentes atividades de descloração, enquanto os clorofenóis estudados por GIBSON & SUFLITA (1986) foram desalogenados redutivamente em duas amostras de sedimentos anóxicos de um aquífero.

Na presença de metais pesados, a degradação de clorofenóis como o 2-CP foi verificada por KUO & GENTHNER (1996), em um consórcio anaeróbio para o Cd(II), Cu(II), Cr(VI) e Hg(II). Três efeitos foram observados: período de adaptação, taxa de descloração redutiva ou biodegradação e falência da descloração ou biodegradação do composto alvo. A desalogenação e a metanogênese neste consórcio mostraram diferentes sensibilidades aos metais pesados adicionados. O zinco, também, teve seu efeito estudado na degradação do PCP em sistemas anaeróbios suplementados com propionato (JIN & BHATTACHARYA, 1996), sendo este inibitório.

Em muitos casos, a mineralização em ambientes anaeróbios não é evidente, entretanto, seguindo os produtos de transformação é possível determinar etapas limitantes.

Em geral, microrganismos aeróbios têm uma maior habilidade de mineralizar altas concentrações de PCP do que os anaeróbios (McALISTER *et al.*, 1996). Por outro lado, a mineralização do PCP ocorre de forma mais eficiente em culturas anóxicas de bactérias do que por fungos. E apesar dos microrganismos em ambientes anaeróbios não demonstrarem o potencial de degradação do PCP em altas concentrações (200 mg/l), segundo McALISTER *et al.* (1996), eles são importantes para estudos de degradação. Isto porque, muitos locais contaminados com PCP são limitados em oxigênio.

Estas observações, entre outras, acabam sendo de grande valia na obtenção e compreensão de sistemas biológicos eficientes em catalisar a descloração reductiva de diferentes compostos, notadamente os altamente clorados. ANNACHHATRE & GHEEWALA (1996) apresentaram uma recente revisão sobre o potencial de biodegradação de compostos fenólicos clorados. O autores pontuam que a remoção dos clorofenóis ocorre tanto em processos aeróbios como anaeróbios.

Estudos de descloração do PCP tem demonstrado que a relativa persistência tanto quanto a especificidade de descloração deste composto varia significativamente dentre os diferentes ambientes. Em alguns trabalhos, o PCP é totalmente resistente à degradação microbiana, enquanto outros estudos demonstraram extensiva transformação ou completa mineralização.

A degradação do PCP por microrganismos anaeróbios adaptados foi observada por MIKESELL & BOYD (1986), cujo trabalho mostrou que o PCP foi desclorado por completo quando adicionado a uma mistura de lodos aclimatados por 2 anos aos compostos 2-CP, 3-CP e 4-CP, em volumes iguais. No entanto, di, tri e tetraclorofenóis foram acumulados quando se utilizou os lodos individualmente. Isto mostra, claramente, que a descloração do PCP foi realizada por atividades combinadas de três populações degradadoras de clorofenóis. A mineralização do PCP também foi observada quando estes lodos adaptados foram adicionados a solos contaminados com PCP (MIKESELL & BOYD, 1988).

O destino do PCP foi estudado sob condições de estado estacionário usando dois métodos: ^{14}C PCP radiomarcado e estudando a conservação de massa do PCP. Neste estudo, CHEN *et al.* (2000) mostraram que uma pequena quantidade de dióxido de carbono e metano foi detectada e mais de 97% da radioatividade permaneceu no interior do reator. Entretanto, análises posteriores revelaram que os 97% remanescentes de radioatividade não foi do PCP mas dos seus subprodutos. Resultados encontrados pelos autores CHEN *et al.* (2000) indicaram que o PCP foi transformado em aproximadamente 95% em 3-MCP; 4,6% em 3,4-DCP e 0,5% em 3,5-DCP.

A biodegradação do PCP também foi investigada por LARSEN *et al.* (1991), em condições termofílicas (50⁰C) anaeróbias, usando inóculos de ecossistemas naturais e de digestores anaeróbios. Um padrão complexo de intermediários formados indicaram que a descloração do PCP processou-se por diferentes caminhos, envolvendo ao menos duas populações diferentes no processo de descloração.

Como mencionado no item anterior, a desalogenação reductiva é dependente de algumas condições, dentre elas a presença de doadores de elétrons. Em culturas mistas, o tipo e a concentração dos mesmos pode variar muito. A partir de revisões de literatura, PAK (1994) levantou que os substratos de crescimento são muito importantes para a população microbiana anaeróbia descloradora, especialmente para os fenóis altamente clorados. Uma vez que no processo de descloração, fenóis clorados parecem não sustentar o crescimento celular; as células necessitam de um outro substrato (co-substrato) como fonte de energia para crescimento e manutenção celular.

Em estudos conduzidos por VALLECILLO *et al.* (1998), sob diferentes condições como sistemas contínuos ou em batelada, suplementados ou não com fontes de carbono, a biodegradação anaeróbia de vários tipos de clorofenóis foi estudada. Em sistemas de batelada a descloração reductiva observada com fonte externa de carbono foi maior do que na ausência. Tais resultados levaram os autores VALLECILLO *et al.* (1998) a postularem que a adição de fonte de carbono externa estimulou a descloração, estabilizou o processo e garantiu a presença de uma quantidade suficiente de biomassa ativa. Nenhuma acumulação de baixos fenóis clorados foi observado em sistemas de batelada ou em processos contínuo, sugerindo completa descloração.

Se de um lado os doadores de elétrons estimulam a desalogenação reductiva, a falta de doadores de elétrons impõe um limite na biotransformação de contaminantes, considerados aceptores de elétrons. Portanto, a provisão de doadores de elétrons pode estimular a transformação reductiva dos contaminantes halogenados aromáticos, o que foi comprovado por GIBSON & SUFLITA (1990) com ácidos orgânicos e álcoois.

O destino dos doadores de elétrons e seus produtos de fermentação, segundo FENNEL *et al.* (1997), conduz a uma boa compreensão das comunidades de microrganismos hábeis em desclorar. Conforme GIBSON & SUFLITA (1990), a aparente reação da desalogenação anaeróbia de aromáticos depende das interações microbianas, como a competição por doadores de elétrons e pela disponibilidade de aceptores de elétrons.

De WEERD *et al.* (1991), trabalhando com *D. tiedjei*, mostraram que a adição de hidrogênio, formiato e piruvato para as células, levou a um aumento relativo de 500 a 600% na taxa de desalogenação com os doadores endógenos. O destino de quatro triclorofenóis,

seis diclorofenóis e três monoclorofenóis foi estudado em sistemas anaeróbios enriquecidos com propionato (JIN & BHATTACHARYA, 1997). A maioria dos clorofenóis testados foram desclorados redutivamente a compostos menos clorados e/ou fenol.

HOLLIGER *et al.* (1992) constatou que na presença de compostos orgânicos como lactato, glicose, etanol ou isopropanol, HCB, pentaclorobenzeno (QCB), três isômeros do tetraclorobenzeno (TeCB) e alguns triclorobenzeno (1,2,3-TCB e 1,2,4-TCB) foram redutivamente desclorados por um enriquecimento proveniente de uma coluna de percolação anaeróbia, preenchida com sedimento de rio. FENNEL *et al.* (1997) também observaram a descloração do tetracloroetano (TCE) na presença de lactato como doador de elétrons por culturas anaeróbias mistas.

A glicose também mostrou um efeito estimulante na taxa de descloração em reatores UASB para o PCP por grama de sólidos voláteis (HENDRIKSEN *et al.*, 1992). Além da glicose, NIES & VOGEL (1990) estudaram o efeito do acetato, acetona e metanol na descloração redutiva de PCBs em sedimentos anaeróbios. A descloração foi observada com relativas taxas e extensões, sendo maior para as culturas em bateladas alimentadas com metanol, glicose, acetona e menor para as com acetato. Usando até 50 mg/L de PCE, PRAKASH & GUPTA (2000) observaram que o metanol teve efeito estimulante na desalogenação do PCE em um reator de tipo UASB, com uma DQO inicial de 2000 mg/L. Além do metanol, acetato foi utilizado em conjunto, mas quando adicionado sozinho houve uma piora nos parâmetros analisados. O metanol também foi reportado em estimular a descloração do PCE em estudos conduzidos por FATHEPURE & BOYD¹⁸ *apud* PRAKASH & GUPTA (2000)

O efeito positivo de doadores de elétrons, também foi comprovado por PERKINS *et al.* (1994) durante a desalogenação redutiva do triclorofenol (TCP). Trabalhando com hidrogênio, acetato e frutose como doadores de elétrons, verificaram que estes foram convertidos a metano e sustentaram a desalogenação por um período de 2 a 4 semanas.

Da mesma forma, o TCP foi desclorado por um consórcio de microrganismos anaeróbios, cultivados em acetato, etanol, glicose ou metanol (PAK, 1994). Neste caso, a maior taxa de descloração foi observada na presença de etanol.

Este fato está de acordo com estudos realizados por STOVER¹⁹ *apud* FENNEL *et al.* (1997), que observaram que tanto o etanol como o lactato foram utilizados como estimulante da descloração em enriquecimentos de culturas mistas anaeróbias, e que ambas

¹⁸FATHEPURE, B. Z.; BOYD, S. A. (1998). Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.49, p.149-56.

¹⁹STOVER, M. A. M. (1993). Thesis, Cornell University, Ithaca, NY.

atividades, descloração e metanogênese, ocorreram em altos níveis de H₂. Entretanto, quando o nível de H₂ caiu, somente a descloração continuou.

Seguindo a mesma linha, FENNEL *et al.* (1997) observaram que a adição de doadores de elétrons durante a degradação do tetracloroetileno, que eram fermentados a baixa pressão parcial de H₂, como o ácido láctico e o etanol, resultaram em maior metanogênese do que os que foram suplementados com ácidos butírico e propiônico, pois geraram concentração de H₂ muito maior, quando administrados em culturas mistas anaeróbias. O lactato, etanol e hidrogênio, também, foram os melhores substratos na descloração de clorobenzenos, sendo que somente quando um dos doadores de elétrons foi adicionado, a descloração pode ser mantida (HOLLIGER *et al.*, 1992).

O lactato também foi utilizado por HÄGGBLUM & YOUNG (1990) como um substrato não seletivo na degradação de monoclorofenóis e 2,4- diclorofenol e, sob condições sulfidogênicas, os clorofenóis foram mineralizados.

GIBSON & SUFLITA (1990) verificaram que dentre os substratos utilizados (ácidos orgânicos de cadeias curtas: formiato, acetato, propionato, butirato e álcoois: metanol e etanol), os que mostraram as maiores estimulações de desalogenação para o 2,4,5-ácido triclorofenoxiacético eram bons doadores de elétrons. Presumivelmente, atuaram como redutores diretos na desalogenação e, indiretos, através da produção de hidrogênio durante o próprio metabolismo microbiano.

FENNEL *et al.* (1997) sugeriram que as bactérias descloradoras podem utilizar o hidrogênio a concentrações menores que as bactérias metanogênicas, também verificado por SMATLAK *et al.* (1996) em culturas mistas. As bactérias desalogenadoras também podem competir com sucesso com as redutoras de sulfato pelo hidrogênio (GIBSON & SUFLITA, 1986). Portanto, a adição de doadores de elétrons pode propiciar vantagens seletivas dos microrganismos hábeis em desalogenar. O hidrogênio molecular ou formiato apresentaram-se como bons doadores de elétrons para o enriquecimento com *Dehalobacter restrictus* em estudos conduzidos por HOLLIGER & SCHUMACHER (1994).

Portanto, o hidrogênio aparece como peça fundamental, uma vez que as populações anaeróbias necessitam de uma fonte de poder redutor tanto para seu metabolismo normal como para as reações de desalogenação. Esta condição é muito importante, uma vez que, segundo PAK (1994), a descloração redutiva ocorre preferencialmente sob condições anaeróbias na qual o potencial redox típico é de -300 mV.

Por ser um importante doador de elétrons na desalogenação redutiva, o hidrogênio é, atualmente, muito estudado em culturas mistas (SMATLAK *et al.*, 1996) e em reatores

(BALLAORAGADA *et al.*, 1997). Trabalhos como os de BALLAORAGADA *et al.* (1997) e SMATLAK *et al.* (1996), realizados com PCE, mostraram que o nível de H₂ interfere na relação existente entre a metanogênese e a desalogenação, e os dados sugerem a existência de uma competição entre as populações envolvidas nestes processos.

SMATLAK *et al.* (1996) acharam uma diferença 10 vezes menor entre o coeficiente de afinidade específica ao substrato - H₂ [K_S(H₂)] das bactérias hábeis em desclorar e das metanogênicas e, no mínimo, uma ordem de grandeza menor para os valores reportados por BALLAORAGADA *et al.* (1997) para a desalogenação dos cloroetanos. A afinidade de uma reação por um substrato é determinada quantitativamente pelo valor do parâmetro K_S, que é um coeficiente de saturação com unidade em mg/L, definido como valor da concentração do substrato limitante de crescimento, que resulta na taxa de crescimento correspondente a metade do valor máximo. Quanto menor este valor, maior é a afinidade específica pelo substrato envolvido. Como este coeficiente é menor para as bactérias hábeis em desalogenar quando comparado às metanogênicas, estas conseguem competir pelo substrato - o hidrogênio - com vantagens, quando em situação limitante.

SMATLAK *et al.* (1996) indicaram que a escolha deliberada de um doador de elétrons, cuja fermentação resulta na liberação de H₂ de forma lenta, constante e em baixos níveis durante todo o período da reação, maximiza o potencial de descloração, enquanto minimiza a competição metanogênica por H₂. O lactato propiciou uma fonte instantânea de H₂ devido à sua alta velocidade de fermentação e foi consumido, predominantemente, pela metanogênese no reator anaeróbio, segundo BALLAORAGADA *et al.* (1997).

O fenômeno da competição por hidrogênio tem sido investigado com relação à competição análoga por H₂ entre as bactérias redutoras de sulfato e as metanogênicas. A redução hidrogenotrófica do sulfato libera mais energia do que a metanogênese hidrogenotrófica. Como resultado, as redutoras de sulfato podem competir com as metanogênicas a baixos níveis de H₂ e, eventualmente, reduzir a concentração de H₂ a níveis suficientes para paralisar a atividade metanogênica (LOVLEY *et al.* 1982).

FENNEL *et al.* (1997) afirmaram que o destino dos doadores de elétrons e seus produtos de fermentação, incluindo não somente o H₂ mas também outros intermediários, é de importância crucial para o entendimento das comunidades de microrganismos hábeis em desclorar, havendo ainda muitas dúvidas a serem elucidadas.

Quanto ao PCP, objeto de estudo desta pesquisa, ainda não foram realizadas investigações completas sobre o efeito de fontes de carbono, do nitrogênio e outros nutrientes, na degradação deste composto por microrganismos anaeróbios. No entanto, muitos trabalhos envolvendo doadores de elétrons e aceptores vêm sendo realizados. Como

exemplo, a descloração do PCP a 3-CP foi observada por JUTEAU *et al.* (1996), por um consórcio metanogênico cultivado em meio mineral com diversas fontes secundárias de carbono (co-substrato), como glicose, formiato, lactato ou extrato de levedura.

Utilizando o acetato como doador de elétrons, um consórcio metanogênico, proveniente de lodo de digestor anaeróbio, removeu o cloro de todas as posições do PCP e de seus produtos de descloração (NICHOLSON *et al.*, 1992). Porém, dos três diclorofenóis produzidos (2,4- 3,4- e 3,5-DCP), somente o 2,4-DCP foi degradado significativamente em 3 semanas e produziu o 4-C, que não sofreu degradação posterior.

Na presença de fonte adicional de carbono (acetato), a taxa de eliminação do PCP foi quase 5 vezes maior do que sem a fonte adicional (VALLECILLO *et al.*, 1998). Nos ensaios em batelada, a aclimação foi observada na segunda alimentação, cuja taxa de eliminação do substrato e do composto tóxico foi significativamente maior do que na primeira alimentação, mesmo para os compostos verificados mais tóxicos: PCP e 2,4-DCP. Segundo os autores, a fonte adicional de carbono externa foi necessária para estimular o processo de descloração e garantir suficiente quantidade de biomassa ativa.

HENDRIKSEN *et al.* (1992) também mostraram que a glicose teve um efeito estimulante na degradação do PCP em um reator anaeróbio. O sistema com glicose desclorou por completo 94% do PCP, quando comparado ao controle que teve no máximo 20% de descloração. Porém, os autores sugeriram que a baixa transformação do PCP no reator controle foi parcialmente causada mais pela quantidade limitante de biomassa do que pela ação direta da glicose.

Enquanto a adição de doadores de elétrons mostrou estimular a desalogenação redutiva, o estudo de aceptores de elétrons alternativos leva a algumas discordâncias entre os pesquisadores quanto aos mecanismos envolvidos. Isto porque, tanto podem estimular como inibir o processo de desalogenação redutiva, dependendo da condução dos experimentos ou da forma com que os microrganismos envolvidos utilizam tais substratos.

Segundo alguns autores, a habilidade da bactéria desalogenadora em buscar nutrientes em ambientes anaeróbios é dependente da sua capacidade em obter aceptores de elétrons em um ambiente em particular. Assim sendo, a regulação da desalogenação em ambientes anaeróbios pode estar intimamente relacionada com a disponibilidade de aceptores de elétrons alternativos e da habilidade das células desalogenadoras em habitar cada ambiente e competir por doadores de elétrons com outro grupo de bactérias.

O efeito inibitório do sulfato como aceptor de elétrons sob a degradação de compostos aromáticos será discutida no item 3.3.3.3. Ainda assim, é possível verificar uma

série de trabalhos conduzidos com o intuito de verificar a estimulação da desalogenação redutiva na presença de aceptores de elétrons e o envolvimento das bactérias redutoras de sulfato neste mecanismo.

O trabalho de HÄGGBLOM *et al.* (1993) mostrou que a biodegradação anaeróbia de clorofenóis e clorobenzoatos dependeu da disponibilidade de aceptores de elétrons e da posição do cloro na molécula. Nitrato, sulfato e carbonato foram usados como aceptores de elétrons em sedimentos de água doce e estuários. Sob condições de desnitrificação, a degradação do 3- e 4-CB foi acompanhada pela diminuição do nitrato, correspondentes aos valores estequiométricos esperados para a completa oxidação do clorobenzoato a dióxido de carbono. Sob condições sulfidogênicas, o 3- e 4-CB, mas não o 2-CB, e todos os três isômeros do CP foram utilizados, enquanto que em condições metanogênicas todos os compostos exceto o 4-CB foram metabolizados. Os autores (HÄGGBLOM *et al.*, 1993), sugeriram assim que a biodegradabilidade destes compostos cloroaromáticos parece estar mais relacionada à presença de populações microbianas competentes do que à própria estrutura molecular inerente ao composto.

O envolvimento das BRS, tanto na descloração como na mineralização do PCP, foi sugerido por KENNES *et al.* (1996), em trabalho onde os autores apresentaram resultados indicando que a adição de molibdato (inibidor de algumas bactérias como as redutoras de sulfato) inibiu a taxa de liberação do cloro e inibiu severamente a mineralização do PCP. HÄGGBLOM & YOUNG (1990) também verificaram que o molibdato, além de inibir a redução de sulfato, também inibiu por completo a degradação de CP e 2,4-DCP. Neste estudo, HÄGGBLOM & YOUNG (1990) verificaram que o consumo de sulfato pelas culturas provenientes de sedimento de estuário corresponderam aos valores estequiométricos esperados pela completa oxidação do clorofenol a dióxido de carbono. Estes resultados indicaram que os clorofenóis foram mineralizados sob condições sulfidogênicas e que a oxidação do substrato foi ligada à redução de sulfato.

Após 5 anos, a mesma cultura mantida com monoclorofenóis como única fonte de carbono e energia, utilizou o clorofenol na presença de sulfato, sulfito ou tiosulfato como acceptor de elétrons, enquanto carbonato, nitrato e fumarato não foram utilizados (HÄGGBLOM & YOUNG, 1995). A completa degradação dos CPs, neste experimento, foram dependentes da presença de sulfato ou outros ânions sulfurosos.

Estudos como os de HÄGGBLOM & YOUNG (1990), demonstrando que o molibdato inibiu por completo o metabolismo do CP e a redução de sulfato, fortalece a idéia de que as bactérias redutoras de sulfato estão envolvidas na desalogenação redutiva dos clorofenóis, em ambientes anaeróbios. Por outro lado, HÄGGBLOM & YOUNG (1995)

sugerem que apesar das BRS poderem ser diretamente responsáveis pela degradação do CP, não pode ser descartada a possibilidade de uma associação sintrófica envolvendo as BRS.

SUSARLA *et al.* (1998) também verificaram a transformação de diferentes classes de compostos aromáticos halogenados em sedimentos sulfidogênicos estuarinos. Os resultados levaram os autores do trabalho (opt. cit.) a indicarem que a redução de sulfato poderia estar ligada a descloração reductiva.

Segundo KING (1988), as BRS não estão diretamente envolvidas na desalogenação, mas parecem oxidar tanto o fenol como outros produtos finais provenientes dos microrganismos desalogenadores. Desta forma, o autor sugeriu que a degradação de compostos como dibromofenol (DBP) e outros halofenóis pode ser um metabolismo dependente da redução de sulfato.

Por outro lado, GIBSON & SUFLITA (1986) observaram que na presença de sulfato, a microbiota proveniente de um aquífero sob condições metanogênicas foi incapaz de significante degradação de aromáticos, tais como clorobenzoatos, clorofenóis e clorofenoxiacetatos.

Uma composição de diferentes lodos aclimatados a 2-CP, 3-CP e 4-CP foi capaz de desclorar por completo o PCP, enquanto nos testes com lodos individualmente cultivados verificou-se o acúmulo dos compostos DCP, TCP e TeCP (MIKESELL & BOYD, 1986). As bactérias redutoras sulfato isoladas desta cultura não mostraram atividade desclorante. Os resultados possibilitaram a formulação de hipótese de que diferentes microrganismos estão envolvidos em diferentes padrões de descloração.

3.3.3.3 Efeitos inibitórios na desalogenação anaeróbia de compostos organoclorados

Muitos trabalhos, como os apresentados a seguir, realizados na presença de aceptores de elétrons, principalmente na presença de sulfato, têm mostrado que estes podem provocar efeito negativo na desalogenação de compostos halogenados aromáticos.

O efeito inibitório do sulfato na desalogenação dos aromáticos é consistente com o estudo realizado por MADSEN & AAMAND (1991) para o PCP em culturas mistas de lodo de esgoto. A descloração do PCP e seus intermediários foi inibida pela presença de sulfato, tiosulfato e sulfeto. Neste estudo, o molibdato inibiu a redução de sulfato e aumentou a degradação do PCP.

A descloração do TCP e DCP foi inibida pela adição de aceptores de elétrons (enxofre elementar, sulfato, nitrato e íon férrico), conforme encontrado por MOHN & KENNEDY (1992) em lodos granulados de reatores UASB.

A atividade desclorante do PCP por um consórcio metanogênico, estudado por JUTEAU *et al.* (1996), foi reduzida significativamente pela presença de hidrogênio, BESA ou sulfato, mas não pelo nitrato. HENDRIKSEN *et al.* (1992), trabalhando com lodo granular anaeróbico, mostraram que a descloração do PCP foi levemente inibida pela presença de sulfato e glicose, e fortemente inibida pela presença do nitrato.

KUHN *et al.* (1990), trabalhando com outros compostos clorados, como di- tri- e tetracloroanilina (DCA, TCA e TeCA), verificaram que a lama proveniente de aquíferos metanogênicos quando inoculados com sulfato, mostraram um padrão decrescente na taxa de desalogenação redutiva da tetracloroanilina. Neste estudo, os dados indicaram que a presença de sulfato não obstruiu por completo a conversão do 2,3,4,5-TeCA a 2,3,5-TCA, mas efetivamente bloqueou as reações subseqüentes de desalogenação. Resultados experimentais do mesmo estudo indicaram claramente que a atividade microbiana é responsável pela desalogenação redutiva das cloroanilinas e que o sulfato inibiu a reação, particularmente das anilinas menos halogenadas.

Todos estes resultados implicam o sulfato como um inibidor da biodegradação anaeróbia dos cloroaromáticos. Tal fato pode ser explicado pela dependência da reação de desalogenação de aromáticos a baixos potenciais redox, como os que mantêm os ambientes metanogênicos (KUHN *et al.*, 1990). STUART *et al.* (1999) trabalhando com PCP e 2,3,4,5-TeCP mostraram que a mais alta taxa de descloração foi obtida durante experimentos nos quais foram mantidos baixos valores de potencial redox ($E_{pt} = -0,25$ a $-0,26$ V). Sob as mesmas condições, foi verificado por STUART & WOODS (1998) que a atividade metanogênica ocorreu a partir do acetato. Seguiria, então, que o potencial de desalogenação pode decrescer em ambientes com potenciais redox mais altos, como aqueles que estão associados, predominantemente, à redução de sulfato e nitrato. O mesmo ocorre aos compostos alifáticos (VOGEL *et al.*, 1987).

Além da dependência da reação de desalogenação de aromáticos a baixos potenciais redox, os efeitos negativos da adição de sulfato na desalogenação dos compostos haloaromáticos podem ser explicados pela ação direta das bactérias redutoras de sulfato. Segundo GIBSON & SUFLITA (1990), em trabalho com a adição de ácidos orgânicos de cadeias curtas ou álcoois na desalogenação do 2,4,5-T (ácido triclorofenoxiacético), o efeito inibitório do sulfato foi aliviado com molibdato, o que implica claramente as BRS como um dos fatores determinantes desta inibição, também verificado por GIBSON & SUFLITA

(1986). Este tipo de inibição foi explicado por MADSEN & AAMAND (1991) pela competição pelo H_2 entre a redução de sulfato e a descloração, uma vez que a adição de H_2 reduziu a inibição observada pelo sulfato e outros ânions sulfurosos para o PCP, em culturas mistas de lodo de esgoto.

Outro trabalho que reafirma o efeito inibitório do sulfato na desalogenação de compostos haloaromáticos foi executado por KOHRING *et al.* (1989), demonstrando, neste estudo, que altas concentrações de sulfato quando adicionadas nas incubações anaeróbias provenientes de sedimentos de lagos inibiram a desalogenação do 2,3-DCP. Porém, o mesmo trabalho mostra que a desalogenação completa do 2,4-DCP e do 4-CP em 4-CP e fenol, respectivamente, na presença de sulfato em sedimento anaeróbio de lagos, ocorreu com concomitante redução de sulfato e depressão da formação do metano (KOHRING *et al.*, 1989).

Além do trabalho de KOHRING *et al.* (1989), a decomposição anaeróbia de halofenóis foi relatado na presença de sulfato por GENTHNER *et al.* (1989). GENTHNER *et al.* (1989) observaram que sulfato estimulou a degradação do 4-CP em enriquecimentos provenientes de sedimentos de estuários. Similarmente, GIBSON & SUFLITA (1990) notaram o desaparecimento do mesmo substrato em lodos obtidos de aquíferos sulfidogênicos. Entretanto, nenhum intermediário foi identificado em ambos os estudos.

Isso resulta em hipóteses de como o sulfato, um acceptor de elétrons, pode ora inibir, ora estimular a desalogenação redutiva dos compostos aromáticos halogenados, uma vez que todos eles implicam as bactérias redutoras de sulfato na desalogenação direta ou indireta destes compostos. O estímulo ou inibição da desalogenação, baseado nos estudos citados acima e no item 3.3.3.2, tem como um dos fatores as características químicas dos compostos aromáticos, pois a inibição da desalogenação na presença de sulfato parece ser mais evidente entre os compostos menos halogenados. Além disto, a concentração de sulfato e a competição por hidrogênio também parecem determinantes. MADSEN & AAMAND (1991) reportaram que a competição por H_2 entre a redução de sulfato e a descloração pode ser uma explicação para a inibição relacionada ao sulfato na degradação do PCP em culturas mistas.

Desde que o hidrogênio possa ser usado como um doador de elétrons para sustentar tanto a redução de sulfato como a desalogenação, KUHN *et al.* (1990) sugeriram que o efeito inibitório do sulfato possa ser, ao menos, devido à competição por doadores de elétrons.

Se por um lado acredita-se que as BRS possam ser responsáveis por uma competição por equivalentes redutores com a desalogenação de aromáticos clorados na presença de ânions sulfurosos, por outro, sabe-se que várias bactérias redutoras de sulfato

podem, efetivamente, degradar compostos aromáticos, incluindo fenóis, benzoatos, catecóis e anilinas utilizando-os como única fonte de carbono e energia (revisão realizada por HÄGGBLÖM & YOUNG, 1995). MORT & DEAN-ROSS (1994) estudaram a biodegradação de compostos fenólicos como o fenol, *p*-cresol e 4-CP em cultura adaptada, provenientes de sedimentos de rios. A adição de molibdato e a inativação celular inibiram a redução de sulfato e a utilização do substrato, confirmando assim a participação das redutoras na mineralização destes compostos fenólicos.

GIBSON & SUFLITA (1990) sugeriram que o organismo desalogenador encontrado em aquífero estudado poderia ser similar ao da cultura pura da bactéria anaeróbia desalogenadora de compostos aromáticos, referida como a bactéria sulfidogênica *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 (SHELTON & TIEDJE, 1984). Este organismo é uma redutora de sulfato, cuja atividade desalogenante é inibida por vários compostos sulfurosos oxidados, além do oxigênio (LINKFIELD & TIEDJE, 1990). Sendo o sulfato o aceptor de elétrons preferencial para o microrganismo desalogenador do aquífero, a desalogenação redutiva segundo GIBSON & SUFLITA (1990) poderia, efetivamente, ser retardada enquanto as condições ambientais favorecessem a redução de sulfato, o que explicaria o efeito inibitório do sulfato sob a desalogenação redutiva.

Em relação ao efeito dos clorofenóis sob os microrganismos anaeróbios, COLLERAN *et al.*²⁰ *apud* ENNIK-MAARSEN *et al.* (1998) reportaram que algumas importantes populações em lodos metanogênicos i.e. metanogênicas acetoclásticas, oxidadores de butirato e oxidadores de etanol são similarmente sensíveis aos aromáticos halogenados, enquanto as hidrogenotróficas são menos sensíveis (GOLDEN *et al.*²¹ *apud* ENNIK-MAARSEN *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1996). Estudos realizados por KIM *et al.* (1996) confirmaram a metanogênese hidrogenotrófica menos sensível, não sendo esta inibida pelo 3-CP, enquanto a acetogênese e a metanogênese acetoclástica foram inibidas. Por outro lado, estudos realizados por JOHNSON & YOUNG²² *apud* ENNIK-MARSEN *et al.* (1998) e WU *et al.* (1993) mostraram que as degradadoras de propionato como mais sensíveis aos aromáticos halogenados, enquanto KIM *et al.*²³ *apud* ENNIK-MARSEN *et al.* (1998)

²⁰COLERAN, E.; CONCANNON, F.; GOLDEN, T.; GEOGHEGAN, F.; CRUMLISH, B.; HENRY, M.; COATES, J. (1992). Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. *Wat. Sci. Technol.*, v.25, p.31-40.

²¹GOLDEN, T.; MOLYNEAUX, E.; COLLERAN, E. (1994). Toxicity of aromatic chemicals to the bacterial populations involved in anaerobic digestion. In: *Poster Paper Preprint of the Seventh International Symposium on the Anaerobic Digestion, Cape Town, South Africa*. RSA Litho (Pty) Ltd., Goodwood, South Africa, p.19-22.

²²JOHNSON, L. D.; YOUNG, J. C. (1983). Inhibition of anaerobic digestion by organic priority pollutants. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, v.55, p.1441-9.

²³KIM, I. S.; YOUNG, J. C.; TABAK, H. H. (1994). Kinetics of acetogenesis and methanogenesis in anaerobic reactor under toxic conditions. *Wat. Environ. Res.*, v.66, p.119-32.

descreveram as degradadoras de etanol não tão sensíveis quanto as metanogênicas acetoclásticas às cloroanilinas.

Em estudos realizados por ENNIK-MAARSEN *et al.* (1998), as metanogênicas acetoclásticas foram inibidas mais fortemente do que as oxidadoras de propionato e do butirato para um determinado lodo, ao efeito de três monoclorofenóis (2-, 3-, 4-CP). Segundo os autores, tal resultado pode ser discutido como a consequência das características dos grânulos. Os grânulos de menor tamanho podem explicar a grande sensibilidade deste lodo em comparação aos outros lodos estudados. Da mesma forma, HWU *et al.* (1996) indicaram que lodos floculentos ou suspensos, com maiores áreas de superfície sofreram maior inibição do que lodos granulados, a um composto mais simples como o oleato, na presença de ácidos graxos de cadeia longa.

Sobre as características do lodo granulado, THAVEESRI *et al.* (1995) estudaram a influência de substratos na produção de lodo granulado e no desenvolvimento de diferentes tipos em reator UASB. Foram observados em reator alimentado somente com ácidos voláteis, grânulos pretos e brancos; em reator com mistura de 90% de ácidos voláteis e 10% de sacarose, três tipos de grânulos puderam ser vistos, brancos, pretos e cinzas; em reator alimentado com 70% de ácidos voláteis e 30% de sacarose somente grânulos brancos e cinzas foram encontrados. Os testes de atividade metanogênica específica (AME) e acidogênica específica (AAE) revelaram que os grânulos pretos apresentaram elevada AME e baixa AAE, da mesma forma os grânulos brancos. Por sua vez, os grânulos cinzas apresentaram elevada AAE e boa AME. A avaliação dos tamanhos dos grânulos mostrou que o diâmetro relaciona-se com a cor da seguinte forma: os grânulos pretos < brancos < cinzas.

Os grânulos pretos quando pressionados com uma agulha de metal eram aparentemente resistentes e firmes, com superfície lisa e brilhante. O formato dos grânulos pretos era geralmente esférico ou levemente oval. Os grânulos brancos tiveram o formato mais irregular, freqüentemente contendo um pequeno núcleo preto (duro) recoberto por uma camada branca e fofa. Os grânulos cinzas eram menos resistentes quando comparados aos grânulos pretos e mais irregulares. Uma camada translúcida foi encontrada cobrindo estes grânulos, podendo ter sido polímeros extracelulares excretados pelas células associadas no grânulo cinza.

No estudo de THAVEESRI *et al.* (1995) os grânulos brancos foram encontrados em todo os casos, mas foram mais abundantes com a alimentação de ácidos voláteis. Apesar de exibirem moderada AAE, os grânulos eram constituídos principalmente de metanogênicas. Eram os que possuíam a maior quantidade do fator F_{420} . Os autores

comentaram a presença de grânulos brancos anteriormente por KOSARIC *et al.*²⁴, TILCHE & YANG²⁵ *apud* THAVEESRI *et al.* (1995) e DUBOURGUIER *et al.* (1988) em reatores alimentados com mistura de ácidos voláteis. Já, os grânulos pretos prevaleceram no reator alimentado somente com mistura de ácidos. Este tipo de grânulo era muito rico em com AME elevada. Assim, os grânulos que apresentaram a maior AME (0,53 LCH₄/gSV.d) eram constituídos de metanogênicas acetoclásticas. Os grânulos cinzas se desenvolveram somente quando sacarose esteve presente no meio, apresentando maior tamanho. Estes grânulos exibiram alta AAE e considerável AME (0,29 LCH₄/gSV.d).

3.4 Tecnologias anaeróbias no tratamento de efluentes na presença de organoclorados

Segundo GRADY Jr. (1990), os sistemas de tratamento biológico são ecossistemas extremamente complexos com uma interação microbiana tão importante que acabam por determinar a concentração dos poluentes após o tratamento. Segundo o autor (opt. cit.), muitos estudos tem sido realizado em sistemas biológicos no sentido de compreender melhor não só o papel dos microrganismos nas transformações dos fenóis clorados, como também os sistemas de tratamento aplicáveis a estes compostos tóxicos.

Segundo FANG *et al.* (1996), tratamentos anaeróbios de despejos industriais têm se tornado uma tecnologia viável nos últimos anos devido ao rápido desenvolvimento de reatores de altas taxas como os filtros anaeróbios (YOUNG & McCARTY²⁶ *apud* FANG *et al.*, 1996) e reatores do tipo UASB. Desde sua introdução em 1980 (LETTINGA *et al.*, 1980), os reatores UASB tem se tornado popular na Europa ocidental e mais recentemente no leste da Ásia. Este tem sido mais comumente utilizado para despejos de indústrias de alimento, bebida e agricultura, nas quais o poluente é na maior parte carboidratos.

²⁴KOSARIC, N.; BLASZCZYK, R.; ORPHAN, L.; VALLADARES, J. (1990). The charactrization of granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Wat. Res.*, v.24, p.1473-7.

²⁵TILCHE, A.; YANG, X. (1987). Light and scanning electron microscope observation on the granular biomass of experimental SBAF and HABR reactors. In: LETTINGA, G.; ZEHNDER, A. J. B. GROTENHUIS, J. T. C.; HULSHOFF POL, L. W. (Eds) *Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology*, p.170-8. Pudoc, Wageningen, The Neterlands.

²⁶YOUNG, J. C.; McCARTY, P. L. (1969). The anaerobic filter for waste treatment. *J. Wat Poll. Cont. Fed.*, v.41, p.R160-173.

3.4.1 Sistema UASB utilizados para tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos clorados

Estudos recentes têm demonstrado que a tecnologia UASB é aplicável também aos tratamentos de despejos contendo compostos aromáticos clorados. Clorofenóis, cloroguaicóis, cloroveratroles e clorocatecóis foram continuamente degradados em reator do tipo UASB, na presença de altas concentrações de compostos orgânicos biodegradáveis (WOODS *et al.*, 1989). Segundo os autores, os compostos clorados não foram mineralizados por completo, mas foram convertidos a compostos menos clorados, mediados biologicamente pela reação de descloração redutiva.

Também, utilizando-se de reatores do tipo UASB, MOHN & KENNEDY (1992) examinaram a habilidade de lodos granulados, provenientes destes reatores, em degradar TCP e DCP em batelada, sob condições controladas. Os monoclorofenóis como o 3- e 4-CP foram encontrados como produtos de degradação persistentes, também verificado por WOODS *et al.* (1989), enquanto o 2-CP foi degradado.

Reatores do tipo UASB, usando sacarose e ácido acético como doadores de elétrons, foram capazes de tratar cinco isômeros do triclorofenol (TCP) e um diclorofenol através da descloração redutiva (DROSTE *et al.*, 1998).

Os efeitos de monoclorofenóis na degradação de ácidos voláteis foram estudados usando lodo granular metanogênico proveniente de um reator do tipo UASB de indústria de processamento de batatas (ENNIK-MAARSEN *et al.*, 1998). Cinquenta por cento de inibição de metano foi observado a aproximadamente 0,6 a 1,0 mM de MCP.

A descloração anaeróbia do PCP tem sido extensivamente estudada em reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) (WOODS *et al.*, 1989; HENDRIKSEN *et al.*, 1992; MOHN & KENNEDY, 1992; CHEN, *et al.* 2000). Em alguns casos (WOODS *et al.*, 1989 e MOHN & KENNEDY, 1992), a descloração do PCP não ocorreu por completo, resultando no aparecimento de fenóis menos clorados.

ZHAO *et al.*²⁷ *apud* RIFFAT *et al.* (1999) observou que o PCP foi tóxico para os microrganismos do reator do tipo UASB, operado em períodos curtos de tempo com um lodo granular ativo contendo predominantemente bactérias do tipo bastão. Por outro lado, CHRISTIANSEN & AHRING (1996) utilizaram uma das bactérias, DCB-2, conhecida pela habilidade em degradar o pentaclorofenol, imobilizada nos grânulos de um reator do tipo UASB. Nestas condições, a remoção de Pentaclorofenol ocorreu até 120 µmol/L dia.

²⁷ZHAO, Y.; XU, J.; CHEN, M.; and XU, X. (1998). Population and Distribution of Microorganisms in Upflow Anaerobic Sludge Bed (in Chinese). *J. Zhejiang Agric. Univ.* (China) v. 24, n.1, p.11.

A mais alta concentração de PCP degradada em sistemas anaeróbios foi reportada em reatores do tipo UASB com grânulos degradadores de PCP (WU *et al.*, 1993). Com base nos resultados obtidos, seria possível tratar despejos contendo PCP com uma concentração de 1,2 g/L ou mais. Este estudo demonstrou que grânulos anaeróbios estáveis, se desenvolveram na presença do composto tóxico PCP, tendo ácidos voláteis e metanol como co-substratos. A taxa de remoção do PCP encontrada foi de 99%. Testes com radiotraçadores demonstraram que os grânulos degradadores de PCP mineralizaram este a metano e dióxido de carbono.

Os mesmos grânulos anaeróbios, desenvolvidos no reator UASB por WU *et al.* (1993), alimentados com PCP, metanol, acetato, propionato e butirato, foram utilizados em outro trabalho por KENNES *et al.* (1996). Os autores (opt. cit.) encontraram a mineralização completa do ^{14}C -PCP a $^{14}\text{CH}_4$ e $^{14}\text{CO}_2$. Os resultados dos testes de liberação de íons cloro do PCP indicaram que as condições anaeróbias (ou baixo potencial redox) foram essenciais para a descloração de PCP por microrganismos degradadores/desalogenadores de PCP. Devido à estrutura dos grânulos, mesmo na presença de oxigênio dissolvido, a descloração pode ser observada. Isto porque, a estrutura dos grânulos protege os organismos anaeróbios internos da exposição ao oxigênio e promove um micro ambiente interno de baixo potencial redox.

A eficiência do lodo granulado também foi verificada por HENDRIKSEN & AHRING (1993) durante a degradação do PCP. Entretanto, o reator de leito fixo inoculado com lodo anaeróbio digerido foi menos estável do que o UASB inoculado com lodo granulado, mesmo quando suplementado com glicose.

Uma vez que os grânulos são freqüentemente utilizados em estudos envolvendo a biotransformação de compostos orgânicos clorados, outros trabalhos têm sido realizados a fim de constatar a possível transformação abiótica. Como exemplo, têm sido conduzidos testes para verificar o fenômeno da adsorção de compostos orgânicos tóxicos pelos grânulos anaeróbios. Segundo NING *et al.* (1996), a biosorção é considerada um importante mecanismo de remoção para o tratamento de compostos orgânicos tóxicos hidrófobos em reatores biológicos.

NING *et al.* (1996), com o propósito de entender melhor o papel da biosorção de clorofenóis, estudou grânulos anaeróbios provenientes de um reator do tipo UASB, ativos e inativos quimicamente, e sugeriram que os grânulos podem atuar tanto na degradação como na adsorção dos compostos tóxicos, verificada pela alta correlação entre as duas funções.

3.4.2 Outros tipos de sistemas utilizados para o tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos clorados

A descloração de despejos contendo fenóis clorados tem sido reportada em vários estudos utilizando o reator de leito expandido com Carvão Ativado Granular (GAC) como verificado por TSUNO *et al.* (1996), MILLER *et al.*²⁸ *apud* RIFFAT *et al.* (1999), KHODADOUST *et al.* (1997) e SUIDAN *et al.* (1996).

No estudo realizado por TSUNO *et al.* (1996), a degradação anaeróbia do PCP foi discutida na presença de acetato em reatores de leito expandido GAC. Neste estudo, o pentaclorofenol foi desclorado e aproximadamente 60 % deste composto foi transformado em CH₄ e CO₂ no reator. Foi demonstrado pelos autores (opt. cit.) que o PCP foi transformado biologicamente através de experimentos em batelada. Os microrganismos coletados no reator foram capazes de degradar o PCP e 2-CP em anaerobiose e, na presença de acetato, a degradação anaeróbia do PCP foi acelerada.

A descloração do PCP também foi investigada em reator de leito expandido GAC o qual procedeu 99,9 % de remoção de PCP a uma taxa de carregamento orgânico de 4 g/Kg de GAC por dia e 1333 mg/L de PCP. Etanol foi usado como fonte adicional de carbono (KHODADOUST *et al.*, 1997). Completa mineralização do PCP não foi observada, mas o PCP foi convertido estequiometricamente a concentrações equimolar de 3-CP e 4-CP, após exaustão da capacidade adsorptiva do GAC. 4-CP inibiu a metanogênese à concentração de 116 mg/L. A eficiência do mesmo tipo de reator foi estudado por MILLER *et al.*²⁴ *apud* RIFFAT *et al.* (1999), para um despejo sintético contendo PCP e quatro PAHs. O reator alcançou uma eficiência de remoção de PCP maior que 99,8%, com conversão de intermediários desclorados entre 47% e 77%.

Segundo SUIDAN *et al.* (1996), devido a sua capacidade de adsorver e degradar compostos orgânicos, o reator anaeróbio de leito fluidizado GAC tem sido efetivo em tratar uma ampla gama de despejos tóxicos e inibitórios. SUIDAN *et al.*²⁹ *apud* SUIDAN (1996) mostrou que o mecanismo inicial de remoção para este tipo de reator é a adsorção. Após esta etapa, o mecanismo primário de remoção torna-se a degradação biológica, através de microrganismos aclimatados ao despejo. Além do pentaclorofenol, o reator anaeróbio de leito fluidizado GAC foi estudado na presença de fenol e ortoclorofenol (2-CP). SUIDAN *et*

²⁸MILLER, K. M.; SUIDAN, M. T.; SORIAL, G. A.; KHODADOUST, A. P.; BRENNER, R. C.; ACHESON, C. M. (1998). Anaerobic treatment of wood preserving contaminants from a soil wash process. *Proc. Water Environ. Fed. 71st Annu. Conf. Exposition*, Orlando, Fla.

²⁹SUIDAN, M. T.; SIEKERKA, G. L.; KAO, S. W.; PFEFFER, J. T. (1983). Anaerobic filters for the treatment of coal gasification wastewater. *Biotechnol. Bioengng.*, v. 55, p.1581-96.

al. (1996) utilizaram tal reator para tratar efluente industrial contendo, além dos fenóis, acetato.

VALLECILLO *et al.* (1998) demonstraram que o uso do reator anaeróbio de leito fluidificado com biolita, material usado como suporte para imobilizar células é uma tecnologia efetiva para a biodegradação do 2,4,6 TCP. No estudo, o reator de leito fluidizado usado como processo contínuo em estudos conduzidos por VALLECILLO *et al.* (1998), foi alimentado com efluente sintético contendo 2,4,6-triclorofenol e ácido acético como substrato primário. O reator apresentou eficiência de 80 % quando da adição de 25 mg/L de TCP. Nenhuma acumulação de baixos fenóis clorados foi observado no processo contínuo, sugerindo completa descloração.

Uma coluna anaeróbia de fluxo ascendente também foi utilizada para tratamento de efluentes contendo PCP, na concentração de 15 mg/L. O sistema alcançou 93 % de remoção de PCP. Quando um sistema de lodos ativados foi utilizado após a coluna anaeróbia, até 97 % de remoção foi alcançada (BHATTACHARYA *et al.*, 1996).

Reatores de filme-fixo inoculado com lodo de esgoto digerido por processo anaeróbio foram estudados por HENDRIKSEN & AHRING (1993), concomitantemente com reatores do tipo UASB, tratando efluente sintético contendo PCP e fenol. Um reator em cada série recebeu glicose em adição aos fenóis. O processo geral de estabilidade em ambos os sistemas foi claramente acentuado pela adição de glicose, entretanto foi superior no sistema de lodo granular UASB. Em reatores de filme fixo, a adição de extrato de levedura aumentou a descloração do PCP no reator controle a níveis similares ao reator melhorado com glicose, mostrando que o extrato de levedura pode substituir a glicose como fonte adicional de carbono e/ou de elétrons.

DAMIONOVIC (1997) relatou a degradação de PCP em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) alimentados continuamente com substrato sintético, utilizando glicose, ácido fórmico e acético como fontes de carbono. Os resultados obtidos 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.

Segundo GRADY Jr. (1990), o conhecimento das diferenças de biodegradabilidade de um determinado composto em vários tipos de ambiente deve ser determinante para a seleção de um processo de tratamento. Assim, o uso de múltiplos ambientes pode ser a chave do sucesso para a destruição de alguns compostos.

Para os compostos altamente clorados, a taxa de descloração sob condições anaeróbias é realmente maior, mas progressivamente diminui à medida em que as moléculas

de clorofenóis tonam-se menos cloradas (ARMENANTE *et al.*, 1999). Segundo os autores (opt. cit.), vários estudos mostram que culturas anaeróbias capazes de desclorar os compostos altamente clorados tem uma habilidade limitada para degradar os monoclorofenóis. ARMENANTE *et al.* (1999) verificaram que compostos aromáticos halogenados como o 2,4,6-TCP pôde ser degradado completamente e com sucesso em processo de dois estágios anaeróbio-aeróbio (frascos de soro como sistema em batelada e em biorreatores operando em sistemas contínuos), no qual microrganismos anaeróbios realizaram a etapa inicial de descloração e os organismos aeróbios produziram a completa degradação dos produtos obtidos na etapa anaeróbia. Encontraram ainda, resultados que indicam que a desalogenação reductiva e mineralização de 4-CP sob condições anaeróbias é possível, apesar de mais lentamente do que quando compostos mais halogenados são usados como moléculas alvo.

Processos seqüenciais anaeróbio-aeróbio têm sido usados para a completa degradação de clorofenóis (FIELD *et al.*, 1995; FLORA *et al.*, 1994; ZITOMER & SPEECE, 1993). Trabalho realizado por SHIN *et al.* (1999) mostrou ser possível utilizar um sistema de reatores seqüencial anaeróbio-aeróbio por biofilme para completa mineralização de compostos policlorados. Os autores utilizaram dois reatores de biofilme e fluxo descendente anaeróbio-aeróbio em escala de laboratório preenchido com tiras de pneus para remover 2,4-DCP e 4-CP. Os autores verificaram que mais de 98 % de DCP foi desalogenado em CP no reator anaeróbio e 70 a 98 % degradado subseqüentemente no reator aeróbio.

O PCP, o fenol mais fortemente clorado, também foi completamente mineralizado por um sistema de reatores integrados em seqüência anaeróbio-aeróbio composta por reatores de leito fluidizado GAC como suporte ao biofilme (WILSON *et al.*, 1997). Os autores verificaram que a adição do estágio aeróbio completou a mineralização dos produtos de biotransformação anaeróbio, ou seja, o monoclorofenol e fenol.

3.4.3 Reator Anaeróbio Híbrido

Segundo CRAVEIRO (1994), a disponibilidade de tecnologias eficientes para o tratamento de resíduos é um advento do início deste século, sendo o reator UASB um advento dos anos 80, com o trabalho de LETTINGA *et al.* (1980) na Holanda.

A pesquisa básica em digestão anaeróbia serviu como base às posteriores necessidades de otimização para o uso mais intensivo do processo. Segundo CRAVEIRO (1994), considerando as baixas velocidades específicas de crescimento de bactérias metanogênicas, a única maneira de operar biodigestores com reduzidos TRHs consistia em

desvincular o TRH do tempo de retenção celular (TRC). Assim, foi com o desenvolvimento do biodigestor tipo filtro anaeróbio que retém o lodo nos elementos de enchimento (pedras, anéis cerâmicos ou plásticos, etc.), especialmente do reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), que retém o lodo devido a sua granulação e pela existência de um decantador interno, que passou-se a dispor de reatores de elevada eficiência.

Segundo TUR & HUANG (1997), apesar da maioria destes sistemas envolvendo reatores UASB e filtro anaeróbio estarem sendo usados para tratar despejos de alimentos e bebidas, processos anaeróbios também têm sido usados no tratamento de despejos químicos, incluindo compostos aromáticos.

Diferentes esforços em melhorar a separação gás-sólido-líquido têm sido feitos dentro do reator para evitar a perda da biomassa em finas partículas. Uma destas tentativas é o uso do então chamado reator anaeróbio híbrido. Um reator híbrido é qualquer reator originário da mistura de duas ou mais concepções de reatores, todavia esta designação acabou ficando particularizada para o tipo de reator que combina o tipo UASB e o filtro anaeróbio, até um tempo atrás. Entretanto, com o advento de vários tipos de configurações para reatores que têm surgido, alguns autores como HENRY *et al.* (1996) passaram a usar o termo reator anaeróbio híbrido (RAH), ao invés de usar somente o termo reator híbrido. Segundo CRAVEIRO (1994), os reatores anaeróbios híbridos procuram associar as vantagens do reator UASB ao filtro anaeróbio, diminuindo suas deficiências.

Portanto, o reator anaeróbio híbrido segundo TUR & HUANG (1997) é, na realidade, uma combinação de uma unidade UASB na parte de baixo e um reator anaeróbio de leito fixo na parte de cima, cuja camada filtrante é preenchida por 20 a 30 % com material compartimentado ou flutuante como a espuma de poliuretano, bolas de polímeros, ou anéis de plástico empacotados aleatoriamente para reter algum escape de biomassa fina.

Segundo CRAVEIRO (1994), este conceito pode permitir uma remoção de matéria orgânica maior que a obtida nos filtros anaeróbios, a um custo menor, pois só uma parte do reator é preenchida. Em relação ao reator UASB, uma zona empacotada oferece uma barreira física à perda de lodo, problema eventualmente presente durante a operação de reatores UASB; além disso, não há a obrigatoriedade do lodo ser ou permanecer granulado, como deve ocorrer no UASB. Enquanto o reator UASB depende da disponibilidade (ou cultivo) e manutenção de lodo granulado no reator e permite trabalhar-se com elevadas cargas orgânicas, o filtro anaeróbio opera com cargas menores, tendo como ônus o custo do enchimento; todavia é mais seguro operacionalmente, pois não depende de grânulos e da sedimentabilidade do lodo. Este tipo de reator tem um valor particular quando a taxa de

granulação é baixa e há a necessidade de acelerar a partida deste (LEE Jr. *et al.*³⁰ *apud* TUR & HUANG (1996).

CRAVEIRO (1994) estudou o desempenho de reatores anaeróbios híbridos com diferentes porcentagens de preenchimento. Foram utilizados 4 reatores de 25 litros sendo um UASB para comparação e outros três híbridos com diferentes porcentagens de enchimento: 30, 10 e 3 %, composto por anéis de polipropileno tipo pall de 5/8". Os resultados indicam que quanto maior a porcentagem de enchimento num reator anaeróbio híbrido, maior a concentração total de lodo no reator e maior a porcentagem de lodo na sessão de enchimento.

Estudos realizados com reatores anaeróbios híbridos mostraram que estes podem remover altas porcentagens de matéria orgânica a altas concentrações. SAMSON & GUIOT (1985) verificaram a redução de DQO na ordem de 95 % com cargas de até 25 kg DQO / m³.d em reatores de 4,35 L contendo 33 % de enchimento com anéis plásticos. FIEBIG & DELLWEG (1985) investigaram a performance de reatores híbridos de 1 L, inoculados com cultura enriquecida em ácido acético. Cargas de até 167 kg DQO/m³ · d foram tratadas com redução de DQO superior a 90 %. TILCHE & XIUSHAN³¹ *apud* CRAVEIRO (1994) constataram que a carga máxima alcançada durante o estudo para o reator anaeróbio híbrido foi de 10,5 kg DQO/m³ · d, quase duas vezes maior que para o chicanado. Foi verificada a existência de metanogênicas em ambos reatores com predominância de *Methanothrix* sp.

Diferentes tipos e porcentagens de material de enchimento para os reatores anaeróbios híbridos foram estudados em relação a influência da porcentagem de enchimento. OLESZKIEWICZ *et al.*³² *apud* CRAVEIRO (1994) ensaiaram 4 reatores com volumes variando de 8,5 a 16,1 L e preenchido com 50, 40, 25, e 5 % de enchimento com anéis cerâmicos. Os autores concluem que para a partida seria melhor trabalhar com elevada porcentagem de enchimento. Por outro lado, KENNEDY *et al.* (1989) concluem que a porcentagem e o tipo de enchimento não foram parâmetros relevantes na definição da eficiência do processo, mas sim o TRH e a carga orgânica aplicada. Os resultados indicam que pode-se projetar reatores anaeróbios híbridos com apenas 10 % de material de enchimento. Ainda assim, KENNEDY & GUIOT³³ *apud* CRAVEIRO (1994) verificaram que à porcentagens de enchimento maiores é possível operar reatores anaeróbios híbridos

³⁰LEE Jr., J. W.; PETERSON, D. L.; STICKNEY, A. R. (1989). Anaerobic treatment of pulp and paper mill wastewater. *Enviro. Progress*, v.8, n.2, p.73-87.

³¹TILCHE, A.; XIUSHAN, Y. (1988). Light and scanning electron microscope observation on the granular biomass of experimental SBAF and HABR reactors. In: INTERNATIONAL WORKSHOP GRANULAR ANAEROBIC SLUDGE: MICROBIOLOGY AND TECHNOLOGY, 1987, Lunteren. *Proceedings*. Wageningen: Puduc Wageningen, 1988, p.170-8.

³²OLESZKIEWICZ, J. A.; HALL, E. R.; OZIEMBLO, J. Z. (1986). Performance of laboratory anaerobic hybrid reactors with varying depths of media. *Environmental Technology Letters*, v.7, p.445-52.

³³KENNEDY, K. J.; GUIOT, S. R. (1986). Anaerobic upflow bed filter, development and application. *Water Science Technology*, v.18, n.12, p.71-86.

com maiores taxas de diluição. Apesar do trabalho de CRAVEIRO (1994) ter mostrado com maior evidência uma vantagem em se trabalhar com 30 % de enchimento, também foi indicado que a mesma carga orgânica pode ser alcançadas com 10 % ou até mesmo 3 % de enchimento, após um tempo adicional de operação.

Reatores anaeróbios híbridos foram superiores na redução da DQO de soro de queijo em estudos conduzidos por REYNOLDS & COLLERAN³⁴ *apud* CRAVEIRO (1994) quando comparado a filtros anaeróbios. DROSTE *et al.*³⁵ *apud* CRAVEIRO (1994) realizando experimentos com meio sintético simulando esgoto doméstico observaram eficiência de redução de DQO de 84 a 95%, mesmo operando com TRH na faixa de 3 a 12 horas. REIS & VIEIRA³⁶ *apud* CRAVEIRO (1994) estudaram o tratamento de esgoto sanitário em reatores anaeróbios híbridos de 106 L, com enchimento de 28 %. Os autores obtiveram redução de DQO, DBO e sólidos em suspensão totais de respectivamente 51 %, 55 % e 51 %.

Para tratamento de efluentes contendo sacarose e glicose, CRAVEIRO (1994) verificou cargas orgânicas de até 15 kg DQO/m³ . d ou 8 kg DQO/m³ . d, respectivamente.

Reatores anaeróbios híbridos têm sido utilizados para uma série de resíduos. Para o tratamento de chorume, IZA *et al.*³⁷ *apud* CRAVEIRO (1994) observaram redução da DQO de 90% quando cargas orgânicas na faixa de até 7 - 9 kg DQO/m³ . d eram aplicadas em reator de 30 L. Para o chorume pré-tratado, reatores anaeróbios híbridos com cargas de até 14,7 kg DQO/m³ . d, foram utilizados por KENNEDY *et al.* (1988) verificando uma eficiência de 97 % na remoção de DQO. AGOUSTINOS *et al.* (1989) trataram um efluente petroquímico em reator híbrido de 1,9 L com DQO entre 9,5 a 14,7 g/L. Cargas orgânicas de até 20 kg DQO/m³ . d foram processadas com remoção de DQO em 84 %. A biodegradação, a toxicidade e a tratabilidade de solventes alifáticos comuns em despejos de indústrias farmacêuticas (*tert*-butanol, isopropanol, isobutanol, *sec*-butanol e etilacetato) foram examinados por HENRY *et al.* (1996) usando dois reatores anaeróbios híbridos. Para TRH de dois dias e carregamento orgânico de 3,5 a 4,5 kg DQO/m³ . d, a remoção de DQO foi de 97 a 99 %, mas o *tert*-butanol foi pobremente degradado. TUR & HUANG (1997)

³⁴REYNOLDS, P. J.; COLLERAN, E. (1986). Comparison of start-up and operation of anaerobic fixed-bed and hybrid sludge-bed/fixed-bed reactors treating whey wastewater. In: EWPCA CONFERENCE ON ANAEROBIC TREATMENT, A GROW UP TECHNOLOGY-AQUATEC' 86, 1986, Amsterdã. *Proceedings*. Amsterdã, p.515-31.

³⁵DROSTE, R. L.; GUIOT, S. R.; GORUR, S. S. *et al.* (1987). Anaerobic hybrid reactors. *Water Poll. Res. J. Canada*, v.22, n.3, p.474-90.

³⁶REIS, M. H. W.; VIEIRA, S. M. M. (1991). Tratamento de esgoto doméstico por reator anaeróbio híbrido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 16, 1991, Goiânia. *Proceedings*. Rio de Janeiro: ABES, v.2, tomo 1, p.193-201.

³⁷IZA, J.; KEENAN, P. J.; SWITZENBAUM, M. S. (1992). Anaerobic treatment of municipal solid waste landfill leachate: Operation of a pilot scale hybrid UASB/AF reactor. *Wat. Sci. Tech.*, v.25, n.7, p.225-64.

trabalhando com ácido fitálico a concentrações de 4000 mg/L e glicose como fonte suplementar de carbono, verificaram a degradação deste composto aromático em um reator anaeróbio híbrido.

3.5 Métodos analíticos e ensaios de laboratório com organoclorados

3.5.1 Técnicas cromatográficas

Estudos envolvendo compostos clorados requerem uma manipulação adequada, assim como métodos analíticos qualitativas e quantitativas confiáveis para detecção destes compostos. As técnicas analíticas e métodos de investigação devem ser selecionados dependendo dos objetivos a serem alcançados.

Segundo DAMIANOVIC (1997), um procedimento analítico para determinação de substâncias na concentração traços inclui os seguintes estágios: a) coleta de amostra representativa; b) preparação das amostras; c) pré-concentração; d) "clean up" para separação das substâncias interferentes (solventes orgânicos são freqüentemente utilizados neste processo); e) extração; f) análise instrumental, incluindo separação, identificação e determinação quantitativa dos componentes.

A cromatografia gasosa tem sido utilizada, segundo DAMIANOVIC (1997), na determinação de clorofenóis há algumas décadas. Entretanto, alguns problemas como as altas polaridades e baixa pressão de vapor dos compostos desestimularam o uso desta técnica (KRIJGSMAN & KAMP³⁸ *apud* DAMIANOVIC, 1997).

Segundo NAKAYAMA (1999), para que se possa analisar uma determinada substância por cromatografia gasosa é necessário que ela apresente, pelo menos, alguns milímetros de pressão de vapor na temperatura máxima em que é estável. Quando isto não ocorre, o composto deve ser convertido a outros derivados detectáveis pelo método. Esta conversão recebe o nome de derivatização (MANAHAN³⁹ *apud* NAKAYAMA, 1999).

A utilização de métodos de derivatização dos compostos, transformando-os em ésteres ou éteres, têm favorecido a utilização da cromatografia gasosa (LANÇAS⁴⁰ *apud* DAMIANOVIC, 1997).

Métodos envolvendo a derivatização são mais demorados, contudo os compostos formados são usualmente mais facilmente analisados por cromatografia gasosa, mais

³⁸KRIJGSMAN, W.; KAMP, C. G. van de (1977). Determination of chlorophenols by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, v.131, p.412-6.

³⁹MANAHAN, S. E. (1994). *Environmental Chemistry*. 6th Ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994, 811p.

sensíveis aos detectores de captura de elétrons e permitem a limpeza mais fácil da coluna que seus precursores (LEE *et al.*⁴¹ *apud* DAMIANOVIC, 1997).

Para WACKETT (1997), a cromatografia gasosa deve ser o método escolhido para determinação quantitativa dos solventes clorados. Segundo o autor (opt. cit.), podem ser encontrados variados tipos de colunas cromatográficas, tanto empacotadas como capilares, apropriadas para estudos destes compostos. Segundo VICINO (1993), existe também a possibilidade de acoplamento da cromatografia gasosa à espectrometria de massa.

Detectores de captura de elétrons são muito sensíveis à resposta aos compostos halogenados, sendo estes superiores para os compostos policlorados (WACKETT, 1997). Este tipo de detector baseia-se na reação de espécies eletronegativas com elétrons térmicos. Essa perda de elétrons na célula de detecção, segundo VICINO (1993), é que produz o sinal característico deste tipo de detector. Assim sendo, este tipo de detector se ajusta às análises de compostos clorados, uma vez que o cloro é extremamente eletronegativo.

3.5.2 Ensaio para avaliação do efeito tóxico do PCP sobre a comunidade microbiana anaeróbia

YOUNG & TABAK (1993) propuseram protocolo experimental no qual se pretendeu a padronização de procedimentos a fim de avaliar o efeito do composto tóxico sob a comunidade microbiana anaeróbia. Este protocolo foi dividido em três níveis sendo que o primeiro nível foi subdividido em três etapas.

Nesse trabalho, o Nível I corresponde à identificação das concentrações tóxicas limitantes dos compostos testados, causadoras da inibição nas reações acetogênicas e metanogênicas.

Etapa I - Estabelece a concentração tóxica usada para os testes das etapas subsequentes. Esta etapa é a modificação do ensaio anaeróbio de toxicidade (ATA), em que cerca de 8 concentrações são testadas, além do controle, com o objetivo de identificar as concentrações tóxicas limitantes causadoras da inibição nas reações anaeróbias, a partir de medidas de produção do biogás.

A produção de gases, segundo YOUNG & TABAK (1993), deveria ser medida de forma manual por monômetros calibrados ou respirômetros automáticos, durante um período

⁴⁰LANÇAS, F. (1993). *Cromatografia em fase gasosa*. Ed. Acta. São Carlos: 1993, 254p.

⁴¹LEE, H. B.; WENG, LI-DA; CHAU, A. S. Y. (1984). 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.789-94.

de 5 dias. Nesta etapa, esta seria a única forma de avaliação do impacto do composto tóxico ao lodo anaeróbio.

Etapa II - Seleciona a concentração do composto tóxico. Esta etapa é uma repetição da anterior, porém com medidas do substrato inicial e seus intermediários específicos como ácidos acético, propiônico e butírico e o hidrogênio, durante um determinado período de operação.

Etapa III - Identifica a concentração tóxica específica na qual a reação anaeróbia individual é inibida. Esta etapa é realizada em reatores semi-contínuos.

O Nível II do protocolo proposto por YOUNG & TABAK (1993) tem como objetivo revelar o efeito do composto tóxico na cinética de degradação dos co-substratos orgânicos, onde a concentração do composto tóxico permaneça constante. O procedimento envolve medidas de substrato residual em culturas em batelada.

O Nível III do protocolo proposto por YOUNG & TABAK (1993), tem como objetivo avaliar a própria cinética de degradação do composto tóxico. Nesta etapa a cultura já deve estar aclimatada ao composto tóxico em questão. A cinética de degradação do composto tóxico é determinada por medidas do composto residual, bem como a produção de metano, por um período de tempo sob condições cuidadosamente controladas.

Para cálculos de inibição, SIERRA-ALVAREZ & LETTINGA (1991) utilizaram o IC_{50} que representa 50% de inibição do processo, com a seguinte equação: $\%I = 100 - \%ACT$; onde, a atividade microbiana inibida, verificada pela produção de biogás, foi expressa em porcentagem da atividade controle (%ACT).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de avaliar a degradação do PCP sob condições anaeróbias, os experimentos foram realizados em um sistema de reação contínuo do tipo reator anaeróbio híbrido (RAH), baseado em SPEECE (1995) e CRAVEIRO (1994). O modelo do RAH compreendeu um sistema de fluxo ascendente e manta de lodo, que em sua parte superior possuía um módulo como filtro anaeróbio, com o objetivo de maior retenção celular no sistema, cujo material de preenchimento foi espuma de poliuretano de tamanho igual a 1 cm³. Os detalhes do reator estão definidos no item 4.2.1 e Figura 4.2.

O inóculo empregado no sistema de reação foi previamente exposto a compostos fenólicos, uma vez que oriundo de uma estação de tratamento anaeróbio de resíduos de indústria de papel e celulose (Indústria de papel “semi-kraft” São Carlos S. A.- Indústria de Papel e Embalagens). Compostos fenólicos estão, em geral, presentes nas águas residuárias desse tipo de indústria, pois podem ser produzidos durante o processamento da matéria-prima. Uma vez que o PCP é também um composto presente em águas residuárias de origem semelhante, principalmente nas indústrias de papel em que ocorre branqueamento da fibra de celulose, o critério de escolha do inóculo baseou-se nesse fato.

Os métodos empregados nesse trabalho foram adotados, considerando-se as orientações descritas para o cultivo e avaliação de anaeróbios estritos (MILLER & WOLIN, 1974; DUBOURGUIER, 1987; VAZOLLER, 1995), operação e monitoramento de reatores anaeróbios (SPEECE, 1995; CRAVEIRO, 1994), testes de toxicidade (YOUNG & TABAK, 1993) e atividade de microrganismos produtores de metano (SOARES & HIRATA, 1997; ARAUJO, 1995). Estes foram organizados em protocolos experimentais e seguiram as etapas apresentadas na Figura 4.1. Os ensaios denominados primários corresponderam aos ensaios que envolveram o reator anaeróbio híbrido, ou seja a sua montagem e operação em duas etapas distintas: sem e com a adição do PCP. Os ensaios denominados derivados compreenderam aos ensaios realizados em batelada com o lodo proveniente do RAH, a fim de avaliar o efeito tóxico do PCP, a atividade metanogênica e de composição dos grânulos formados no período de operação do reator. A atividade metanogênica de dois diferentes tipos de lodo foi realizada somente para a caracterização do inóculo antes do início da operação do reator (protocolo 1). As determinações de ordem de grandeza microbiana,

sólidos voláteis e verificação microscópica do lodo foram realizadas para acompanhamento dos ensaios descritos nos protocolos 2, 3 e 4. Para verificação dos tipos microbianos pertencentes ao Domínio *Archaea* empregou-se o método FISH (ARAUJO *et al.* 2000).

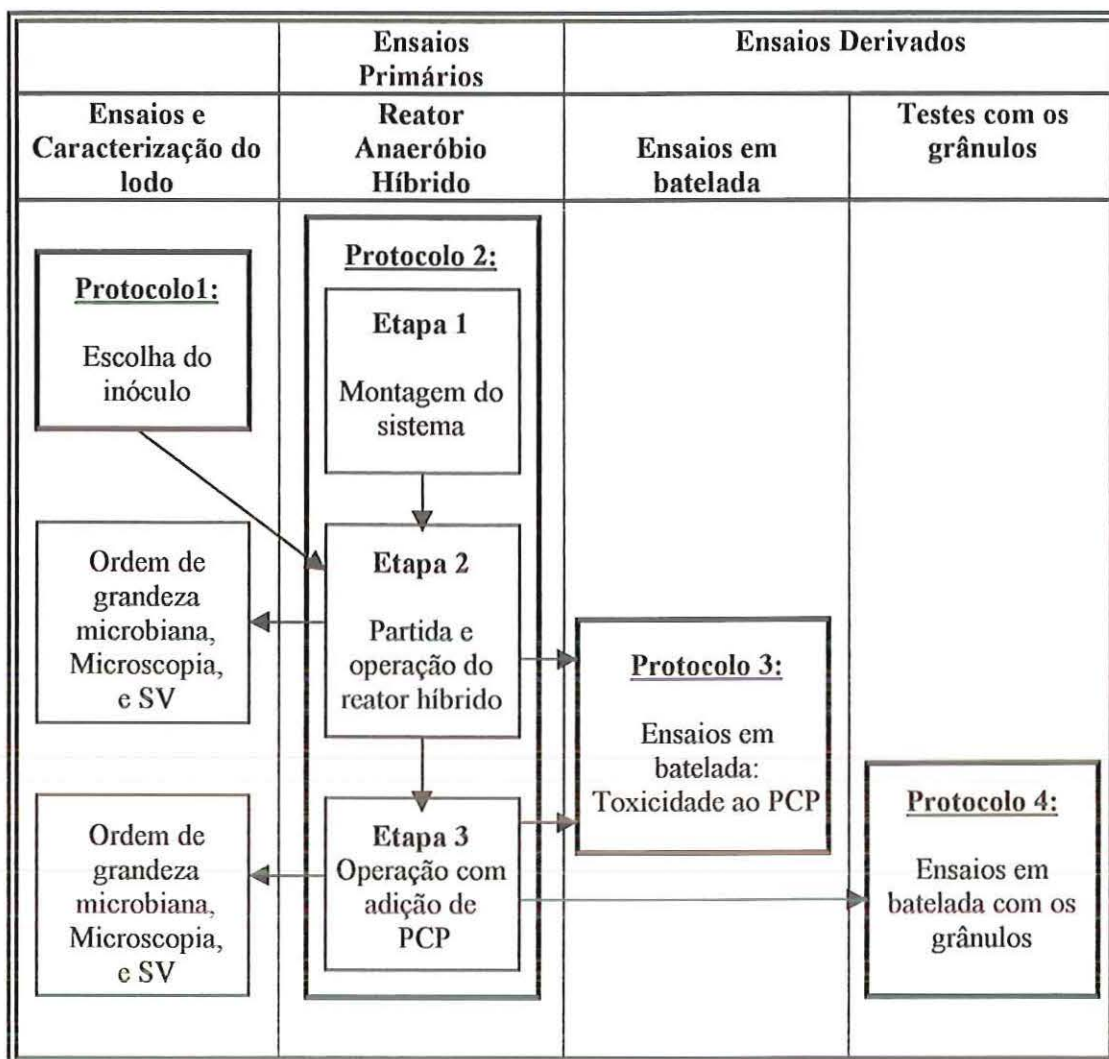


Figura 4.1. Etapas de trabalho e protocolos experimentais da presente pesquisa

4.1 Protocolo 1: Ensaio preliminares com o lodo - Caracterização e escolha do inóculo

Dois tipos de lodo foram coletados em épocas distintas do sistema de tratamento de águas residuárias da indústria de papel “semi-kraft” São Carlos S. A.- Indústria de Papel e Embalagens. O sistema de tratamento era constituído por um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) com volume de 600 m³. As águas residuárias da referida indústria eram provenientes do processo de produção do papel, feita a partir de material reciclado de aparas de papelão. Os dois tipos de lodo foram transportados para Florianópolis,

no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em frascos plásticos vedados e à temperatura ambiente. O material foi analisado após preservação sob refrigeração por dois meses, para um dos tipos de lodo, e cinco meses para o outro.

Para escolha como inóculo do reator anaeróbio híbrido de uma das duas amostras de lodo coletadas, foram realizadas as seguintes análises: - determinação do conteúdo de sólidos voláteis (SV); - exame microscópico sob luz comum para verificação das morfologias microbianas predominantes e características do lodo; - atividade metanogênica específica (AME). Os métodos empregados para tais análises encontram-se descritos no item 4.6. deste capítulo.

Após inoculação, o lodo foi monitorado rotineiramente durante o período de estabilização do reator, isto é, durante a etapa 2, antes do início da adição do PCP e ao final da etapa 3, após a adição do PCP (Figura 4.1). O monitoramento compreendeu exames microscópicos, medidas do conteúdo de SV e determinação de ordem de grandeza microbiana através do Número Mais Provável (NMP), descritos no item 4.6 deste capítulo.

4.2 Protocolo 2: Ensaios no Reator Anaeróbio Híbrido

O sistema de reação observado na Figura 4.2 foi composto por um reator anaeróbio híbrido e um gasômetro de cúpula flutuante projetado por SOARES (1998)¹. Os procedimentos para os ensaios no reator foram realizados em três etapas (Figura 4.1) como a seguir.

4.2.1 Etapa 1 - Montagem do sistema

O reator foi construído em tubo de acrílico transparente com diâmetro de 7,3 cm, altura de 32 cm e os pontos de entrada, saída e amostragens foram feitos em vidro. O reator foi montado nas dependências do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Tecnológicos (LDPT) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, de acordo com as orientações do Prof. Dr. Hugo Moreira Soares.

O volume útil do reator anaeróbio híbrido variou aproximadamente de 1,0 a 1,3 L, em função do gasômetro conectado provocar uma pequena pressão interna, a qual influenciava na altura do meio líquido, variando entre 25 e 30 cm. Para cálculos do volume útil do reator, com o gasômetro conectado, foi considerada a altura média do meio líquido

¹ SOARES, H. M. (1998). (UFSC. Depto. Eng. Química e Eng. Alimentos da UFSC). *Comunicação pessoal*.

igual a 27,5 cm e com o gasômetro desconectado o volume útil foi calculado a partir da altura máxima do meio líquido, igual a 30 cm.

O volume reservado para o filtro anaeróbio foi de 350 mL e representou um pouco mais de 30 % do volume total do reator (Figura 4.2, número 4). Este volume correspondeu a altura de 8 cm do reator e foi preenchido com esponja de poliuretano comercial com orifícios largos e cortadas no tamanho de 1 cm³.

A alimentação do sistema de reação (Figura 4.2, número 1) foi realizada através de uma bomba peristáltica Masterflex®, Coler-Parmer Instrumental Company modelo 7550-62 e cabeçote modelo 7519-10 (Figura 4.2, número 2). O reator possuiu três pontos de amostragem (Figura 4.2, número 3) em alturas diferentes e uma saída localizada após o filtro anaeróbio (Figura 4.2, número 5).

A parte superior do reator foi fechada por flanges, com saídas para o efluente e para o biogás produzido, coletado por um gasômetro de cúpula flutuante (Figura 4.2, número 9). O reator foi envolvido por uma serpentina de mangueira plástica para manter a temperatura constante na faixa de 32 a 37°C, através do bombeamento de água aquecida em banho termostatizado (Figura 4.2, número 7).

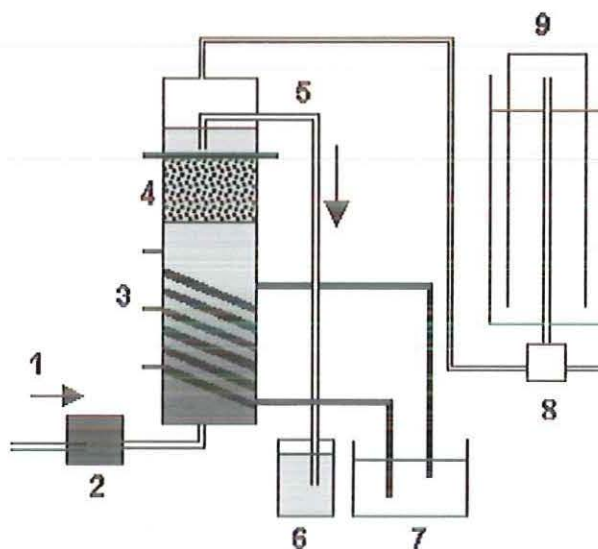


Figura 4.2. Desenho esquemático do sistema utilizado como reator híbrido, de acordo com SOARES (1998)¹. A parte escura no fundo do reator representa o lodo; 1. afluente; 2. bomba de alimentação; 3. pontos de amostragem; 4. filtro anaeróbio; 5. saída do efluente; 6. frasco de coleta do efluente; 7. banho termostatizado; 8. válvula solenóide; 9. gasômetro.



Figura 4.3. Fotografia do RAH antes da sua inoculação, com destaque para o filtro anaeróbio preenchido com esponja de poliuretano.



Figura 4.4. Fotografia do RAH antes da inoculação e gasômetro teste.

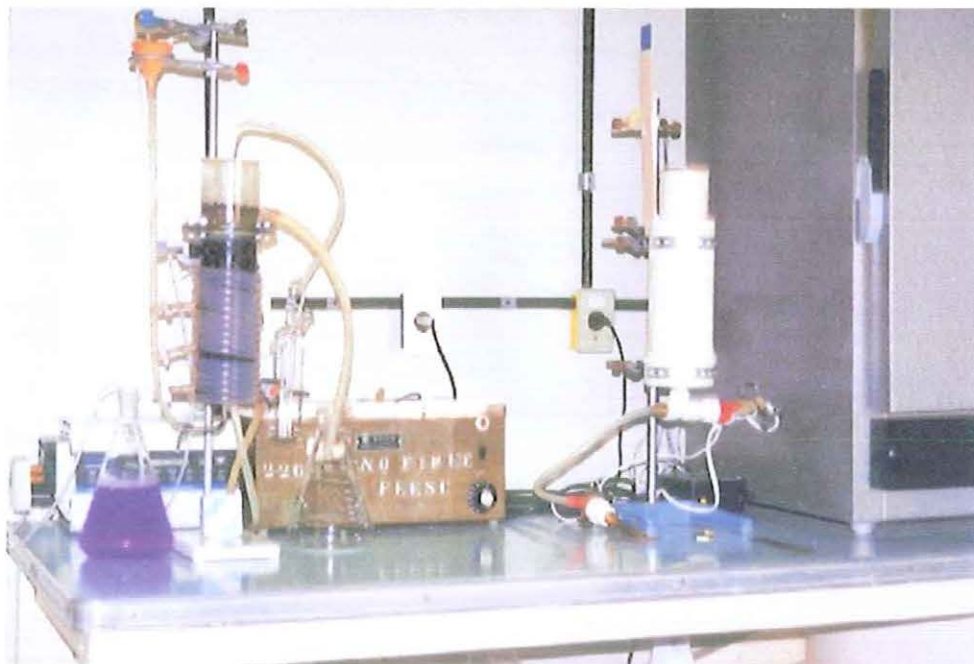


Figura 4.5. Fotografia do RAH em operação. Gasômetro de cúpula flutuante desconectado.

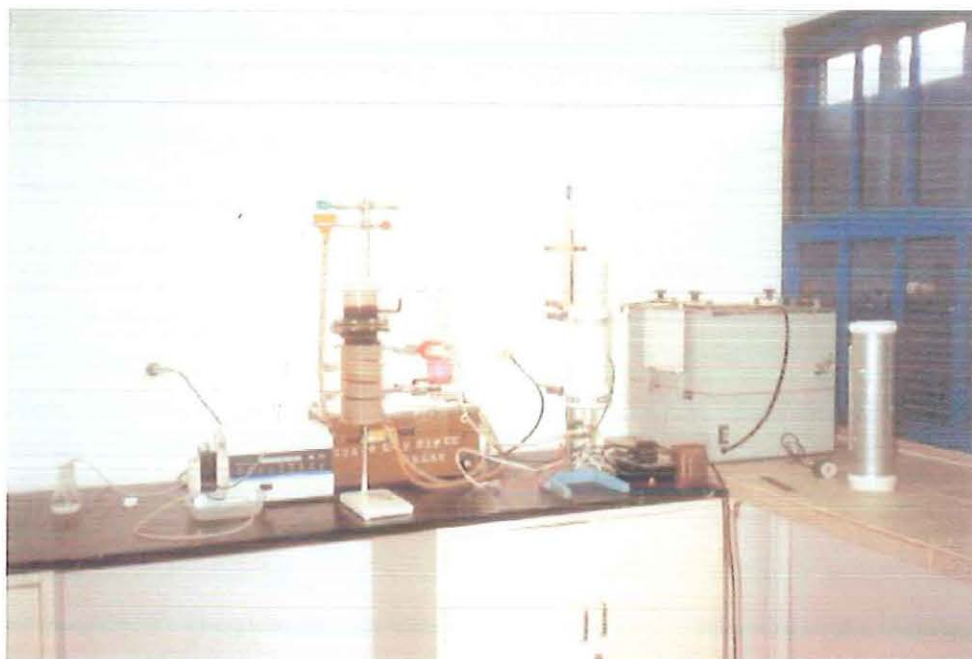


Figura 4.6. Fotografia do RAH em operação. Gasômetro de cúpula flutuante conectado.

4.2.2 Etapa 2 - Partida e operação do Reator Anaeróbio Híbrido

O programa de partida e estabilização do reator através do aumento da vazão de alimentação durante a execução da etapa 2, sem adição de PCP, encontra-se na Tabela 4.1, e foi realizada de acordo com a programação orientada por SOARES (1998)¹. Detalhes de operação do reator estão apresentados na Tabela diária do Anexo A. O meio de cultura para alimentação do reator encontra-se descrito no item 4.2.4 e Tabelas 4.3 e 4.6.

Tabela 4.1. Programação da partida, estabilização e operação do RAH, durante a execução da etapa 2, sem adição de PCP.

Períodos de execução da etapa 2	Tempo de operação (d)	DQO (g/L)	Carga orgânica média (g/L.d)	Vazão média (mL/d)	TRH médio (d)	Tipo de Alimentação (meio de cultivo) e observações
Partida	16	4,96	0,74	187,89	6,71	Alimentação: Meio 1 ^a
	9	4,96	1,58	399,50	3,15	Alimentação: Meio 1 ^a
	5	6,88	2,21	402,60	3,13	Alimentação: Meio 2 ^b
	24	6,88	2,19	398,77	3,16	Alimentação: Meio 3 ^c
	38	6,88	3,45	630,23	2,00	Alimentação: Meio 3 ^c
Estabilização	36	6,88	3,97	725,06	1,74	Alimentação: Meio 3 ^c Início da recirculação
	16	6,88	4,64	776,23	1,48	Alimentação: Meio 3 ^c Gasômetro conectado Adição de lodo: 80 mL ^d
	69	6,88	4,61	777,47	1,48	Alimentação: Meio 3 ^c Gasômetro conectado
	55	6,88	4,31	785,93	1,60	Alimentação: Meio 3 ^c Sem gasômetro
	57	6,88	4,74	792,83	1,45	Alimentação: Meio 3 ^c Gasômetro conectado
	16	6,88	4,37	796,67	1,58	Alimentação: Meio 3 ^c Sem gasômetro
Operação	304	6,88	4,78	800,00	1,44	Alimentação: Meio 3 ^c Gasômetro conectado

^a - Meio 1 = acético (20 mM), propiônico (10 mM), butírico (10 mM) e metanol (20 mM).

^b - Meio 2 = Meio 1 + ácido láctico (20 mM)

^c - Meio 3 = Meio 2 + extrato de levedura (0,2 g/L).

^d - Adição de 10 mL de lodo por dia - ver Tabela em Anexo A.

A vazão mínima da bomba foi de 0,54 mL/min, perfazendo total máximo de aproximadamente 800 mL/dia, resultando em tempo de retenção hidráulica (TRH) mínimo de 1,44 dias em média para esta vazão (Tabela 4.1). No período inicial, considerado os primeiros 16 dias, a DQO teórica adicionada foi aproximadamente 5 g/L e a carga orgânica aplicada foi de 0,74 g/d, após o que, durante os 9 dias posteriores, a carga foi aumentada para 1,58 g/d, mantendo-se o valor de DQO (Tabela 4.1). A DQO teórica, neste período inicial de operação do reator, foi constituída pelos seguintes substratos orgânicos: ácidos propiônico, butírico e acético, todos neutralizados e do álcool metanol, nas concentrações respectivas de 10 mM, 10 mM, 20 mM e 20 mM. Após o período inicial de 25 dias, aumentou-se a concentração de DQO teórica de 4,96 g/L para 6,88 g/L, pela a adição de 20 mM de ácido láctico (como lactato de sódio). Em seguida, o reator passou a receber também extrato de levedura como suplementação vitamínica. A DQO do reator foi alterada nos primeiros 30 dias de operação, mantendo-se constante durante todos os outros períodos de operação, conforme indicado na Tabela 4.1. Entretanto, a carga orgânica variou de forma crescente durante todo o período de partida do reator, justamente para se alcançar a carga orgânica desejada aplicada ao reator. Nos períodos de estabilização e operação do reator a carga orgânica manteve-se praticamente constante em 4,6 g/d em média. No início do período de estabilização o reator passou a receber recirculação na proporção 1:1. O tempo total de operação do reator, durante a etapa 2, incluindo partida, estabilização e operação sem adição de PCP foi de 645 dias.

A concentração inicial do lodo, expressa em g SV/L, no RAH foi determinada a partir das análises realizadas durante a etapa de avaliação do inóculo e definida pelo conteúdo de sólidos voláteis e pelos valores de atividade metanogênica específica. A carga orgânica específica (q_{esp}) no início de operação foi determinada a partir da concentração de sólidos, em torno de 0,18 g DQO/g SV·d.

O monitoramento do reator foi realizado através das determinações indicadas a seguir, cujos detalhamentos estão mostrados no item 4.6 desse capítulo: DQO, pH, temperatura, ácidos voláteis, alcalinidade, volume de biogás, composição do biogás (metano e dióxido de carbono), ordem de grandeza microbiana, exames microscópicos do lodo e conteúdo de SV. As frequências das determinações estão em anexo (Anexo A).

4.2.3 Etapa 3 - Adição de PCP no Reator Anaeróbio Híbrido

Após 645 dias ou cerca de 21 meses de operação do RAH, iniciou-se a adição do composto PCP na alimentação do reator, em concentrações crescentes e progressivas, quais sejam (em mg/L): 2, 4, 6, 8, 10, 12,8, 15,6 e 21, durante períodos de 4, 11, 35, 19, 7, 10, 10,

10 dias para cada concentração, respectivamente. A Tabela 4.2 mostra as condições de operação do RAH durante a etapa 3, com adição progressiva de PCP.

Tabela 4.2. Condições de operação do RAH durante a etapa 3, com adição progressiva de PCP.

Período de execução da etapa 3	Tempo de operação (d)	PCP teórico (mg/L)	Carga orgânica média (g /L.d)	Vazão média (mL/d)	TRH médio (d)	Tipo de Alimentação (meio de cultivo) e observações
Adição de PCP	4	2,0	4,76	796,50	1,44	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	11	4,0	4,71	788,25	1,46	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	10	6,0	4,74	792,50	1,45	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	10	-	-	-	-	Sem alimentação
	3	6,0	2,39	400,00	2,88	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	12	6,0	4,40	735,83	1,56	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	19	8,0	4,77	797,32	1,44	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	7	10,0	4,78	799,61	1,44	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	10	12,8	4,74	792,80	1,45	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	10	15,6	4,52	756,60	1,52	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b
	10	21,0	4,65	778,35	1,48	Alimentação: Meio 1 ^a + PCP ^b

^a - Meio constituído por uma mistura de ácidos acético (20 mM), propiônico (10 mM), butírico (10 mM), láctico (20 mM) e metanol (20 mM), mais extrato de levedura. Igual ao Meio 3 da etapa 2.

^b - O PCP dissolvido junto ao metanol

Durante o período de adição do PCP, cerca de 106 dias, as seguintes análises foram rotineiramente realizadas para verificação da performance do reator anaeróbio híbrido: volume do biogás, composição do biogás (metano e dióxido de carbono), ácidos voláteis, PCP, cloretos, alcalinidade, DQO, pH, temperatura, ordem de grandeza microbiana, exames

microscópicos do lodo e conteúdo de SV. As frequências destas determinações estão no Anexo A. Tais determinações foram realizadas conforme descrito no item 4.6.

A quantidade de PCP na ordem de 21 mg/L, (78 μ M) o máximo de PCP adicionado, contribuiu com um aumento não significativo da DQO ao meio de cultivo, em torno de 0,01765 g/L (0,26 % da DQO adicionada). A DQO do PCP foi calculada considerando o equivalente molar de PCP como fenol, uma vez que os átomos de cloro do PCP não foram considerados para os cálculos da DQO. Entretanto, parte da DQO calculada como fenol já estava considerada nos cálculos de DQO dos ácidos e metanol, considerando que para o PCP se transformar em fenol, este deve ter sido reduzido pelos átomos de hidrogênio do meio, ou seja, dos hidrogênios provenientes dos substratos orgânicos, ácidos orgânicos e metanol. Portanto, a adição do PCP foi desprezada para os cálculos de DQO. O PCP foi adicionado ao meio de cultivo a partir de uma solução estoque em metanol, sendo este metanol contabilizado como fonte de DQO.

4.2.4 Meio de cultura para alimentação do Reator Anaeróbio Híbrido

A composição do meio de cultivo (Tabela 4.3) empregada na operação do RAH foi baseada em SOARES & HIRATA (1997), os quais utilizaram esse meio em testes para a determinação da atividade metanogênica específica.

Tabela 4.3. Meio de cultura para operação do reator híbrido.

Soluções e Fontes Orgânicas	Para 1000 mL (q.s.p.) de meio (mL)
Solução macromineral	13,30
Solução micromineral	1,67
Solução redutora	1,00
Acetato de sódio (2 Molar)	10,00
Propionato de sódio (2 Molar)	5,00
Butirato de sódio (2 Molar)	5,00
Metanol puro	0,81
Lactato de sódio (2 Molar)	10,00
Extrato de levedura 2%	10,00
Bicarbonato de sódio 10%	10,00

Fonte: Adaptado de SOARES & HIRATA (1997)

O meio de cultivo era preparado a partir de soluções estoque estéreis de macronutrientes e micronutrientes descritas na Tabela 4.4, além de solução redutora

preparada com 100 mg de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ por litro. As soluções com fontes de carbono para a alimentação do reator foram preparadas em separado. As quantidades destas soluções no meio de cultura foram calculadas para que a concentração final do meio possuísse uma DQO igual a 4,96 g/L, pela adição dos ácidos propiônico, butírico e acético, todos neutralizados e do álcool metanol. A DQO foi aumentada posteriormente para 6,88 g/L pela adição de lactato de sódio. Para as fontes orgânicas foram preparadas soluções estoque nas concentrações indicadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.4. Soluções estoque para a preparação do meio de cultivo.

Solução macronutrientes	g/L
NH_4Cl	170,0
KH_2PO_4	37,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,0
Solução micronutrientes	mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2000
CoCl_2	1088
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	38
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	106
H_3BO_3	50
$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	90
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50
EDTA	1000
HCl 36%	1 mL/L
Resazurina	500

Fonte: SOARES & HIRATA (1997)

Como o meio de cultura utilizado não continha vitaminas, optou-se por acrescentar 10 mL/L de uma solução a 2% de extrato de levedura ao final do primeiro mês de operação do reator, considerado o Meio 3 na Tabela 4.1.

As fontes e soluções estoque que compõem o meio de cultura eram esterilizadas por autoclavação a 120°C, por 20 minutos, e estocadas sob refrigeração. Para a preparação do meio de cultivo e soluções utilizadas no preparo do meio para alimentação do reator e sua

esterilização foram utilizados balança eletrônica de precisão Gehaka BG200 e BG400, destilador Quimis 341.22, pHmetro Quimis 400 A e autoclave vertical FABBE 103.

Para o preparo do meio foram utilizadas soluções e fontes orgânicas nas quantidades indicadas na Tabela 4.5. O meio de cultura foi tamponado com bicarbonato, pH na faixa de 6,8 - 6,9.

Tabela 4.5. Soluções estoque de fontes orgânicas.

Fontes orgânicas	g/L
Acetato de sódio (2 M)	272,16
Propionato de sódio (1M)	148,16
Butirato de sódio (1 M)	176,22
Ácido láctico (2 M) ^a	180,16

^a - ácido láctico neutralizado com 80 g/L de NaOH

O meio de cultivo, preparado como descrito na Tabela 4.3, era estocado sob refrigeração em volumes iguais a 1 L ou 5 L e utilizado em alíquotas variáveis de acordo com a programação de alimentação do reator (Tabela 4.1). Por sua vez, o meio de cultivo concentrado, preparado de acordo com o descrito na Tabela 4.6, era distribuído em alíquotas de 57 mL em pequenos frascos e congeladas imediatamente.

Tabela 4.6. Meio de cultivo para alimentação do reator concentrado para estocagem a -10°C

Soluções e Fontes Orgânicas	Para 1000 mL (q.s.p.) de água destilada (mL)
Solução macromineral	186,2
Solução micromineral	23,4
Solução redutora	14,0
Acetato de sódio (2 Molar)	140,0
Propionato de sódio (2 Molar)	70,0
Butirato de sódio (2 Molar)	70,0
Metanol puro	11,4
Lactato de sódio (2 Molar)	140,0
Extrato de levedura 2%	140,0
Bicarbonato de sódio 10%	140,0

Este último método foi adotado após a estabilização do RAH, cujos volumes para alimentação eram iguais a 800 mL. Neste período, cada frasco era descongelado diariamente

e volumes de água destilada eram utilizados para completar o volume de 800 mL de meio de alimentação. Somente o metanol era colocado posteriormente, durante o período de adição do PCP, no momento da diluição.

4.3 Protocolo 3: Ensaio em batelada - Toxicidade ao PCP

O protocolo 3 teve o objetivo de avaliar a toxicidade ao PCP para o lodo estabilizado do reator híbrido, antes (lodo este denominado não adaptado) e após a adição de PCP. Para isso, foram empregados frascos de antibiótico de 30 mL, operados em regimes de batelada. Dois testes de toxicidade foram realizados antes da adição do PCP com o lodo não adaptado e um imediatamente após o término da operação com o PCP.

Os testes de toxicidade foram baseados em protocolo experimental para avaliação da resposta do metabolismo anaeróbio frente a compostos tóxicos, proposto por YOUNG & TABAK (1993). Assim, baseado na experiência desses autores, o presente protocolo teve como objetivo adaptar procedimentos padrões a fim de estimar o efeito tóxico do composto químico PCP.

O protocolo proposto por YOUNG & TABAK (1993) apresenta divisões e subdivisões quanto aos procedimentos utilizados, como descrito no capítulo Revisão da Literatura, em que se observam os três níveis desenhados pelos autores. Do protocolo original, buscou-se manter a idéia da padronização dos procedimentos, estimar e avaliar o efeito do composto tóxico na transformação dos co-substratos orgânicos, na cinética de degradação destes co-substratos e na cinética da degradação do próprio composto tóxico e utilizar um inóculo cuja origem fosse bem estabelecida. O protocolo foi adaptado, uma vez que o objetivo foi identificar a toxicidade ao PCP no lodo do reator híbrido desenvolvido nas condições determinadas na presente pesquisa. Particularmente, alteraram-se: os volumes de lodo e dos frascos de reação utilizados para os testes de toxicidade, sendo menores, e de 1,0 a 2,5 mL de lodo e de 10 a 15 mL de meio de cultivo por frasco de antibiótico de 30 mL (Tabela 4.7); as fontes orgânicas, pois foram mantidas aquelas empregadas na operação do reator contínuo, ao invés do etanol, proposto por YOUNG & TABAK (1993); as soluções e meio de cultivo, uma vez que empregou-se aquelas propostas por ZINDER *et al.* (1984). A manipulação de todo o conjunto de procedimentos foi rigorosamente sob anaerobiose, como descrito no item 4.5.

Do Nível I do protocolo proposto por YOUNG & TABAK (1993) foi realizado somente a etapa I, como descrito a seguir. As etapas II e III, descritas no item 3.5.2 da Revisão de Literatura, não foram realizadas.

Etapa I - é a etapa do **Nível I** do protocolo que buscou identificar as concentrações tóxicas limitantes causadoras da inibição nas reações acetogênicas e metanogênicas. Esta etapa estabelece a concentração tóxica usada para outros testes e é a modificação do ensaio anaeróbico de toxicidade (ATA), em que cerca de 8 concentrações são testadas, além do controle. No presente trabalho, o ensaio de **toxicidade I** foi realizado em frascos de no máximo 30 mL, testando-se as concentrações de 2, 4, 6, 8, 10 mg/L de PCP (ver tabela 4.7 e 4.8). O volume de lodo utilizado para os ensaios do teste de **toxicidade I** foi de 1,0 mL por frasco. Assim, o teste de **toxicidade I** foi adaptado da Etapa I, Nível I do protocolo proposto por YOUNG & TABAK (1993), com o objetivo de identificar as concentrações tóxicas limitantes causadoras da inibição nas reações anaeróbicas a partir de medidas de produção do biogás. No presente estudo, não somente para o teste de **toxicidade I** como para os testes **II** e **III**, a produção de biogás foi medida com o auxílio de um gasômetro montado a partir de uma bureta e um erlenmeyer conectados entre si. Tal sistema encontra-se descrito no item 4.6.11 e Figura 4.8.

Todos os testes de toxicidade executados na presente pesquisa foram realizados com as seguintes fontes orgânicas: ácidos (neutralizados) acético, propiônico, butírico, láctico e o álcool metanol. As concentrações utilizadas variaram para cada teste, porém a proporção utilizada de cada uma das fontes foi mantida (Tabela 4.8, 4.9 e 4.10). Entretanto, as determinações das fontes orgânicas foram realizadas somente para os ácidos orgânicos acético, propiônico e butírico e determinados nos testes de **toxicidade II** e **III** (Tabela 4.11). No teste de **toxicidade II**, os compostos foram medidos somente ao final do experimento, enquanto no teste de **toxicidade III** as determinações foram em intervalos programados ao longo do ensaio, descritas adiante, e os intervalos reais mostrados no Anexo L. O teste **II** foi bastante semelhante ao primeiro, apenas foram monitoradas outras condições de resposta do processo, como medidas de produção e composição do biogás e ácidos voláteis, e da DQO ao final dos ensaios. Tanto o teste **I** como o **II** foram realizados antes da adição do PCP ao reator, com o lodo não adaptado.

Para a realização do ensaio de **toxicidade I** e **II**, foi utilizada uma solução estoque de PCP em metanol. A partir desta solução estoque foi preparada uma solução de PCP em meio de cultura Zinder, denominada solução 1, conforme Tabela 4.8 e 4.9, a qual foi diluída até concentração final igual a 12,5 mg/L para o teste de **toxicidade I** e 12,8 mg/L para o teste **II** (Tabela 4.8 e 4.9). Esta solução 1 foi adicionada ao meio de cultivo em diferentes alíquotas para perfazer uma concentração de PCP determinada em cada frasco de cultivo. Como a solução estoque de PCP continha metanol, os volumes de metanol por frascos variaram com a variação da concentração de PCP nos frascos, motivo este pelo qual uma

solução em metanol, solução 2 (Tabela 4.8 e 4.9), foi adicionada em diferentes alíquotas para que todos os frascos tivessem a mesma concentração final de metanol.

Tabela 4.7. Esquema de montagem dos ensaios de Toxicidade I, II e III.

Análises realizadas	Ensaio de toxicidade I	Ensaio de toxicidade II	Ensaio de toxicidade III
Etapa de operação do reator	Etapa 2	Etapa 2	Etapa 3 - final
Situação do sistema	sem agitação (estufa)	com agitação (shaker)	com agitação (shaker)
Temperatura do sistema	35°C	35°C	35°C
g SV/g de lodo	0,03186	0,02801	0,03388
Densidade (g/mL)	1,005	1,0135	1,0302
Volume de lodo no frasco (mL)	1,0	2,5	1,94
Como foi medido o lodo	seringa sem agulha	pipeta invertida	Pesado
Situação do lodo	sem macerar	sem macerar	sem macerar
Volumes das soluções utilizadas no meio de cultivo	Tabela 4.8	Tabela 4.9	Tabela 4.11
Volume total do meio no frasco	10	15	15
Nº de frascos por concentração	triplicata	duplicata	30 frascos ^a três frascos a cada leitura
g de lodo por frasco	1,005	2,534	2,0
g de SV por frasco	0,03202	0,07098	0,06776
SV g/L	3,202	4,732	4,517
DQO (g/L)	6,88	5,32	6,88
Relação DQO/SV	2,15	1,12	1,5
Concentrações de PCP (mg/L)	0, 2, 4, 6, 8, 10	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 0, 2, 5, 10 com sulfato	0, 5, 10, 15, 20 e 10 com sulfato

^a - Foram analisados 9 tempos, incluindo o zero. Três frascos foram usados como controles autoclavados.

Tabela 4.8. Condições nos frascos para os ensaios de Toxicidade I.

PCP por frasco (mg/L)	Solução 1 ^a Meio de cultivo com PCP (mL)	Solução 2 ^b Metanol em água destilada (mL)	Meio de cultivo (mL)	Soluções de ácidos voláteis ^c (mL)	Soluções ^d (mL)	Volume do lodo (mL)	Volume final do meio (mL)
10	8,0	0,15	0,15	0,4	0,3	1,0	10,0
8	6,4	0,20	1,70	0,4	0,3	1,0	10,0
6	4,8	0,25	3,25	0,4	0,3	1,0	10,0
4	3,2	0,30	4,80	0,4	0,3	1,0	10,0
2	1,6	0,35	6,35	0,4	0,3	1,0	10,0
0	0	0,40	7,90	0,4	0,3	1,0	10,0

^a - solução de PCP em meio basal Zinder igual a 12,5, mg/L

^b - solução de metanol em água destilada igual a 20 mL/L

^c - solução de acetato 2M (0,1 mL), lactato 2M (0,1 mL), propionato 1M (0,1 mL) e butirato 1M (0,1 mL)

^d - soluções de vitaminas (0,1 mL), redutora (0,1 mL) e de bicarbonato a 10% (0,1 mL)

Tabela 4.9. Condições nos frascos para os ensaios de Toxicidade II.

PCP por frasco (mg/L)	Solução 1 ^a Meio de cultivo com PCP (mL)	Solução 2 ^b Metanol em meio de cultivo (mL)	Meio de cultivo (mL)	Solução ^c (mL)	Soluções ^d (mL)	Volume do lodo (mL)	Volume final do meio (mL)
10	11,7	0	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0
8	9,5	2,2	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0
6	7,0	4,7	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0
5	5,9	5,8	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0
4	4,7	7,0	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0
3	3,6	8,1	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0
2	2,4	9,3	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0
1	1,2	10,5	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0
0	0	11,7	0,2	0,15	0,45	2,5	15,0

^a - solução de PCP em meio basal Zinder igual a 12,8, mg/L

^b - solução de metanol em meio basal Zinder igual a 0,8 mL/L

^c - solução de mistura de ácidos voláteis: acetato 1,55M, lactato 1,55M, propionato 0,77M e butirato 0,77M

^d - soluções de vitaminas (0,15 mL), redutora (0,15 mL) e de bicarbonato a 10% (0,15 mL)

Nos ensaios com sulfato, para o teste de toxicidade II, foi utilizado 0,2 mL de solução redutora de citrato de titânio, ao invés de 0,15 mL de redutora de sulfeto, e 0,15 mL de solução de sulfato de sódio 1 M. Nestes ensaios não foi adicionado o volume de 0,2 mL de meio de cultivo, como mostrado no Tabela 4.9, a fim de manter o volume total dos frascos em 15 mL.

O teste de **toxicidade III** foi realizado imediatamente após o final da operação com o reator híbrido com o lodo adaptado ao PCP. A determinação dos ácidos voláteis (relatados no item 4.6.5), assim como as medidas do PCP e alguns de seus intermediários (item 4.6.6) foram feitas durante todo o intervalo de realização do teste, nos mesmos intervalos programados para a realização das outras determinações. Considerando a diferença na manutenção do composto tóxico no ensaio proposto por YOUNG & TABAK (1993), o teste de **toxicidade III** se aproxima ao Nível II do protocolo proposto pelos autores, uma vez que este teste se propôs a avaliar a cinética de degradação dos co-substratos utilizados. O teste pretendeu também avaliar a cinética de degradação do PCP durante o ensaio. Assim, pode-se entender que o teste **III** procurou reunir os Níveis II (revelar o efeito do composto tóxico na cinética de degradação dos co-substratos orgânicos) e III (avaliar a própria cinética de degradação do composto tóxico) do protocolo sugerido por YOUNG & TABAK (1993), salvo as modificações comentadas anteriormente.

O teste de **toxicidade III** se diferenciou dos anteriores pela metodologia empregada nas análises dos frascos amostrados. Nos testes anteriores o mesmo frasco era analisado rotineiramente a cada intervalo de tempo, sendo este e a sua duplicata ou triplicata os frascos considerados para a mesma concentração durante todo o tempo amostrado. Desta forma, para cada concentração de PCP somente dois frascos eram montados, pois cada concentração analisada foi feita em duplicata. Para o teste de **toxicidade III**, 30 frascos foram montados para cada concentração testada, sendo que estes 30 frascos representavam 9 pontos de amostragem em triplicata, (27 frascos) e uma série de três frascos autoclavados usados como controle. Tal metodologia foi baseada em VIEIRA (1996), que utilizou 10 frascos representando cinco tempos distintos de um mesmo ensaio cinético. A cada 3 horas, 2 frascos eram retirados para monitoramento dos parâmetros. Estes frascos eram então sacrificados. Este procedimento foi realizado cinco vezes, no trabalho de VIEIRA (1996), para monitoramento do mesmo ensaio, a cada intervalo de tempo.

Os ensaios de **toxicidade III** foram conduzidos de forma a se analisar três frascos em intervalos de tempo determinados, sendo que a cada análise os frascos foram inutilizados. Assim, para cada concentração de PCP (2, 5, 10, 15, 20 e 10 com sulfato), além do branco (sem PCP) do teste de **toxicidade III**, empregaram-se 30 frascos de antibiótico com volume igual a 30 mL. O primeira série de três frascos foi analisada nos primeiros 30 minutos, sendo este tempo considerado o tempo zero. As oito análises seguintes foram realizadas em tempos diferentes, sendo as três primeiras realizadas nas primeiras 12 h, as demais em intervalos respectivos de 24, 36, 48, 120 e 240 h, em média (Anexo L). Os frascos eram submetidos a determinação do volume de biogás, avaliação da composição do gás e, em seguida, eram abertos para as demais análises discriminadas na tabela 4.11.

Tabela 4.10. Preparação do meio de cultivo antes de sua distribuição nos frascos de antibiótico - teste de Toxicidade III.

PCP por frasco (mg/L)	Solução 1 ^a PCP (mL)	Metanol puro (mL)	Meio de cultivo (mL)	Solução ^b (mL)	Solução redutora ^c (mL)	Solução de sulfato	Volume final do meio (mL)
20	0,40	0,02	413,2	5,2 (x 6)	5,2	-	450,0
15	0,30	0,12	413,2	5,2 (x 6)	5,2	-	450,0
10	0,20	0,22	413,2	5,2 (x 6)	5,2	-	450,0
10 + sulfato	0,20	0,22	402,8	5,2 (x 6)	10,4	5,2	450,0
5	0,10	0,32	413,2	5,2 (x 6)	5,2	-	450,0
0	0,0	0,42	413,2	5,2 (x 6)	5,2	-	450,0

^a - solução de PCP em metanol igual a 26400mg/L

^b - 5,2 mL de soluções de vitaminas, de bicarbonato a 10% e de ácidos voláteis: acetato 2M, lactato 2M, propionato 1M e butirato 1M para cada uma das fontes orgânicas em separado.

^c - Para o ensaio com sulfato foi utilizado solução de citrato de tianio.

Para o ensaio de toxicidade III, o meio de cultivo para cada concentração de PCP foi preparado em frasco único de Duran de 500 mL com volume total de meio de cultivo igual a 450 mL (Tabela 4.10) sob anaeróbios e assepsia. O meio de cultivo foi posteriormente distribuído sob anaerobiose e assepsia aos frascos de antibiótico de 30 mL e com volume final de 15 mL, anteriormente lacrados e com o lodo. Devido ao fato deste meio de cultivo ter sido diluído após a sua preparação, uma vez que 13 mL foram colocados em contato com 2 mL de lodo, perfazendo um total de 15 mL, as concentrações do frasco de 450 mL tiveram que ser calculadas considerando-se este fator de diluição.

Para este procedimento, os frascos foram esterilizados com a boca coberta com papel alumínio e receberam o lodo sob condições de assepsia e com um fluxo de gás de 100% nitrogênio, durante a pesagem do lodo. Em seguida, os frascos foram lacrados e colocados em geladeira até o momento de receber o meio de cultivo.

Tabela 4.11. Análises realizadas nos testes de Toxicidade e período de amostragens

Ensaio realizado	Toxicidade I	Toxicidade II	Toxicidade III
DQO	Final	Final	Final
Produção de biogás	Durante o ensaio	Durante o ensaio	Durante o ensaio
Composição do biogás	Final do ensaio	Durante o ensaio	Durante o ensaio
Sulfeto	ND	Final do ensaio	Final do ensaio
Ácidos voláteis	ND	Final do ensaio	Durante o ensaio
PCP e intermediários	ND	ND	Durante o ensaio

ND- não determinado

4.3.1 Avaliação da inibição dos testes de Toxicidade

Para o teste de toxicidade I e II, a inibição ao PCP foi calculada baseado em SIERRA-ALVAREZ & LETTINGA (1991) e a porcentagem de inibição (%I) definida como:

$$\% I = 100 - \% ACT \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde: % ACT é a porcentagem da atividade verificada pela produção de biogás em relação ao controle.

Foi calculada a velocidade para os ensaios contendo PCP pela produção de biogás no trecho de maior inclinação da reta e comparado com a velocidade do ensaio sem PCP. O valor no qual a inibição foi encontrada ser 50% foi considerado o valor de IC₅₀.

Para o teste de toxicidade I, foi considerado, além deste cálculo, um outro, utilizado por OWEN *et al.* (1979), no qual a porcentagem de inibição calculada conforme equação apresentada (Eq. 4.1), é verificada para vários intervalos de tempo. Assim, obtém-se valores de inibição para cada intervalo de tempo.

4.4 Protocolo 4: Ensaio em batelada - Teste com os grânulos após a adição de PCP

Estes ensaios em batelada foram realizados com o lodo anaeróbio granulado do reator anaeróbio híbrido, após a adição do PCP. Desta forma, o lodo foi retirado do reator no final da etapa 3, quando do encerramento de sua operação (ver esquema de protocolos na Figura 4.1). Estes ensaios tiveram como objetivo verificar os tipos microbianos desenvolvidos nos diferentes grânulos formados durante todo o processo de operação do

reator, na presença dos ácidos voláteis e metanol utilizados como co-substrato durante a utilização do PCP.

Os testes foram acompanhados pela avaliação da composição de metano no biogás, a fim de constatar a presença da população metanogênica, e pela determinação de sulfeto, para identificar o grupo de bactérias redutoras de sulfato presentes. Os métodos usados estão descritos no item 4.6 deste capítulo. Os ensaios foram conduzidos em frascos de antibiótico de 30 mL, contendo meio de cultivo e soluções descritos no item 4.5, bem como sob anaerobiose estrita. Os substratos utilizados para testar os tipos de grânulos foram os mesmos empregados na alimentação do RAH, conforme descritos na Tabela 4.12, acrescidos de testes com sulfato.

Tabela 4.12. Esquema de cultivo para verificação dos tipos morfológicos predominantes nos grânulos aclimatados ao PCP.

Grânulos	Fontes orgânicas	Soluções orgânicas ^a (mL)	Soluções ^b (mL)	Meio de cultivo sem sulfato ^c (mL)	Meio de cultivo com sulfato ^c (mL)	Solução de sulfato (1M) (mL)
Tipo 1	Acetato	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
	Metanol	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
	Lactato	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
	Propionato	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
	Butirato	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
Tipo 2	Acetato	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
	Metanol	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
	Lactato	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
	Propionato	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1
	Butirato	0,1	0,3	9,6	9,5	0,1

^a - concentração estoque: acetato 2M, metanol 2M, lactato 2M, propionato 1M e butirato 1M

^b - soluções de vitaminas (0,1 mL), redutora (0,1 mL) e de bicarbonato a 10% (0,1 mL)

^c - volume total do meio 10 mL.

Os ensaios foram conduzidos de forma a utilizar dois grânulos para cada frasco nas diferentes fontes orgânicas, separados do lodo do RAH. Este ensaio não foi realizado com réplicas. Os exames microscópicos foram feitos sob contraste de fase e fluorescência (item 4.6.3), assim como a confirmação da presença da atividade metabólica feita pela leitura dos produtos celulares formados, metano e sulfeto, como anteriormente indicado.

Para caracterização dos tipos microbianos morfológicamente relacionados aos grupos estudados, optou-se por utilizar o BERGEY'S MANUAL nas seções referentes as Archaeobacteria (KÖRING & STETTER, 1989), atualmente denominadas *Archea* e a das bactérias redutoras de sulfato ou enxofre (WIDDEL & PNENNIG, 1989).

4.5 Meio de cultivo e soluções utilizadas para os ensaios em batelada

Devido a complexidade do sistema anaeróbio, houve a necessidade de se utilizar técnicas específicas de manipulação de anaeróbios nos sistemas batelada, que permitiram testar e verificar organismos de interesse no lodo utilizado. Para que o sucesso nos ensaios em bateladas fossem alcançados, os meios de cultura e as condições de incubação foram muito importantes, sobretudo na manutenção da anaerobiose.

Técnicas de manipulação de anaeróbios estritos em meio líquido, descritas por MILLER & WOLIN (1974), foram utilizadas, bem como as técnicas utilizadas no Laboratório de Processos Biológicos - Área de Microbiologia do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP (VAZOLLER, 1995), nas quais frascos de antibióticos (30 mL) contendo meio de cultura são mantidos estéreis sob atmosfera anaeróbia. As técnicas foram adaptadas a partir de VAZOLLER (1995) e executadas no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Tecnológicos (LDPT), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, com o apoio do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP. Para tanto, foi montado um sistema de distribuição simultânea de gases para que o meio de cultivo e soluções anaeróbias utilizadas nos testes em batelada pudessem receber um determinado fluxo de gás, compatível com a sua preparação (ver os itens a seguir), mantendo-se assim a atmosfera anaeróbia necessária no interior de cada frasco. Entretanto, os gases foram empregados diretamente no meio de cultura e soluções sem a passagem por uma coluna redutora de cobre aquecida, indicada em MILLER & WOLIN (1974), que retém traços de oxigênio presentes em gases comerciais. Apesar disto, os meios foram reduzidos quimicamente e adequados para o fim a que se destinaram.

Os gases utilizados foram 100% nitrogênio e 70% nitrogênio + 30% dióxido de carbono ambos da White Martins. Todas as soluções executadas neste item (4.5), assim como o meio de cultivo, foram preparadas com água destilada em destilador Quimis 341.22.

Para os ensaios em batelada, o lodo retirado do reator híbrido foi utilizado na sua forma original ou com os grânulos rompidos por homogeneização em tubos estéreis de 15 mL, contendo 10 pérolas de vidro, sob atmosfera de 100% nitrogênio. O lodo intacto foi

utilizado para os testes de toxicidade e os testes com os grânulos. Por sua vez, o lodo homogeneizado foi utilizado como inóculo nos ensaios para determinação de ordem de grandeza microbiana. Neste caso, o lodo era manipulado com o auxílio de uma seringa estéril de 5 mL e agulha 40 x 12 - 18G1½ sob assepsia e introduzidos nos frascos estéreis e lacrados. Os cultivos foram preparados com réplicas ou não, conforme o tipo de ensaio, descrito nos respectivos itens.

Os equipamentos utilizados para o preparo do meio de cultivo e das soluções utilizados nos ensaios em batelada foram os mesmos descritos no item 4.2.4.

4.5.1 Meio de cultura: procedimentos de preparação e distribuição

O meio de cultura empregado para os testes em batelada, isto é, para verificação da toxicidade ao PCP, para os testes com os grânulos e para determinação de ordem de grandeza microbiana, foi o meio descrito por ZINDER *et al.* (1984) e ZINDER & KOCH (1984). A característica deste meio é possuir uma composição basal (Tabela 4.13) que deve ser acrescida de substratos orgânicos, de acordo com as necessidades nutricionais dos grupos microbianos a serem estudados.

O meio Zinder foi preparado em erlenmeyer de volume igual a 2000 mL. Um volume maior que 1000 mL de água destilada foi colocado para ferver para auxiliar a expulsão do oxigênio do meio líquido e, após 10 minutos nessas condições, submeteu-se a fluxo de 100% nitrogênio foi introduzido com o auxílio de uma pipeta, de forma a borbulhar diretamente na água fervida. Com o meio líquido a temperatura de 40°C, os reagentes foram dissolvidos em 500 mL de água destilada, de acordo com a ordem apresentada na Tabela 4.13. Após homogeneização dos componentes, o volume era acertado a 1000 mL, mantendo-se o fluxo de 100% nitrogênio por mais 30 minutos diretamente no meio de cultura. Após este período, volumes do meio eram distribuídos, conforme seu uso, em frascos de antibiótico de 30 mL, mantendo-se o fluxo no meio de cultivo e nos frascos a serem lacrados, através de um sistema de distribuição simultânea de gases (VAZOLLER, 1995). Somente para o ensaio de **toxicidade III** foram utilizados frascos de Duran com volume igual a 500 mL e meio de cultivo com volumes variados conforme descritos na tabela 4.10 e posteriormente distribuídos em frascos de antibiótico de 30 mL, estéreis. Este procedimento foi realizado com o objetivo de garantir uma padronização do ensaio, uma vez que todos os frascos com a mesma concentração de PCP deveriam representar o mesmo ensaio. A metodologia empregada para este fim encontra-se descrita no item 4.3.

Os volumes de meio de cultivo nos frascos de antibiótico de 30 mL variaram conforme os ensaios e podem ser verificados nas seguintes tabelas:

- Tabela 4.8 e 4.9 - Ensaio de **toxicidade I e II**;
- Tabela 4.10 - Ensaio de **toxicidade III** (volumes iguais a 450 mL antes da distribuição nos frascos de 30 mL);
- Tabela 4.12 - Ensaios com os grânulos para verificação das morfologias predominantes;
- Tabela 4.17 - Determinação de ordem de grandeza Microbiana.

Tabela 4.13. Composição do meio Zinder

Componentes	Quantidades para 1000 mL de meio
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,05 g
Sol. Resazurina 0,1%	1,0 mL
Sol. traço de metais	10,0 mL

Fonte: Adaptado de ZINDER et al. (1984) por VAZOLLER (1995)

Após o fechamento dos frascos com rolhas de borracha de butila e lacres de alumínio, estes eram então esterilizados por autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Os frascos lacrados e esterilizados eram mantidos estocados até o momento de sua utilização, sob atmosfera de 100% nitrogênio, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

A troca da atmosfera dos frascos para a mistura de gases de composição de 70% de nitrogênio e 30% de dióxido de carbono era necessária para manutenção do equilíbrio do pH, no momento da utilização do meio de cultivo. Para isto, seringas, agulhas e mangueiras foram esterilizados para se proceder a troca da atmosfera dos frascos. Com auxílio do filtro "Sterile Acrodisc" com poros 22 µm, foi realizado a troca da atmosfera gasosa dos frascos, a fim de esterilizar o gás utilizado nas troca. Esse procedimento encontra-se descrito em SAKAMOTO (1996).

Os meios de cultivo foram suplementados após a troca da atmosfera gasosa, com as soluções de bicarbonato, vitaminas, fontes orgânicas e redutora, empregando-se seringas hipodérmicas estéreis. A manipulação dos frascos sempre foi realizada sob condições de assepsia, em que as tampas dos frascos lacrados e estéreis eram flambados com uma gota de

álcool. Após a adição da solução redutora, esperava-se a mudança da coloração do meio indicada pela resazurina e, então, procedia-se à inoculação.

4.5.2 Solução de resazurina

A solução de resazurina 0,1% foi preparada em água destilada, dissolvendo-se 0,1 g de resazurina em 100 mL de água destilada. A solução foi mantida sob refrigeração em frasco âmbar, depois de pronta. Não foi necessário autoclavar a solução, uma vez que esta era adicionada ao meio de cultivo antes da sua autoclavação. Esta solução foi utilizada para indicação do potencial de oxi-redução do meio de cultivo, ou seja, era utilizada como solução indicadora de anaerobiose.

4.5.3 Solução traço de metais

A solução traço de metais foi preparada adicionando-se os componentes em água destilada, pela ordem que aparecem na Tabela 4.14. Após a adição de NTA e antes da adição dos outros componentes, o pH foi ajustado a 7,0 com uma solução KOH 10 Molar. Em seguida, os demais componentes foram adicionados à solução e o volume total de 1000 mL foi acertado. Por fim, a solução recebeu um fluxo de 100% nitrogênio e foi distribuída em frascos de soro. Os frascos foram imediatamente fechados com rolhas de borracha e tampas de rosca para, então, serem autoclavados. Depois de pronta, a solução foi mantidas sob refrigeração. A retirada de alíquotas da solução estoque de traço de metais, para a preparação do meio de cultivo, foi realizada sob condições de assepsia.

Tabela 4.14. Composição da solução traço de metais

Componentes	Quantidades para 1000 mL de solução
NTA	4,5 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,556 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,086 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,21 g
H ₃ BO ₃	0,19 g
NiCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g

Fonte: Adaptado de ZINDER *et al.* (1984) por VAZOLLER (1995)

4.5.4 Solução estoques complementares ao meio de cultivo

No momento da sua utilização, o meio basal foi acrescido das seguintes soluções estoques: solução tampão de bicarbonato de sódio a 10%, para manutenção do pH; solução de vitaminas e solução redutora, todas em alíquotas de 1 mL de solução por 10 mL de meio de cultivo. A solução redutora de citrato de titânio foi utilizada nos ensaios para verificação da presença das bactérias redutoras de sulfato. Neste caso, foi utilizado 2 mL da solução redutora por 10 mL de meio.

A solução de bicarbonato de sódio foi preparada dissolvendo-se 10 g do sal em 100 mL de água destilada, com introdução de um fluxo de 100% nitrogênio direto no meio. A concentração final no meio foi de 1g/L. Alíquotas de 10 mL foram distribuídas sob fluxo de nitrogênio em frascos de antibiótico de 30 mL, lacrados e autoclavados a 120°C por 20 min.

A solução de vitaminas (Tabela 4.15), segundo LARIZZATTI (1997), e as soluções redutoras, segundo VAZOLLER (1995), foram preparadas em água destilada e então esterilizadas por filtração rápida em membrana 0,22 µm, pelo sistema Millipore de membrana, sob condições de assepsia, uma vez que as soluções redutoras e de vitaminas não podiam ser submetidas à altas temperaturas.

Tabela 4.15. Composição da solução de vitaminas

Componentes	Quantidades (q.s.p.) para 1000 mL de solução
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina HCl	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantotenato de cálcio	0,005 g
Piridoxina HCl	0,010 g
Vitamina B ₁₂	0,0001 g
Ácido lipóico	0,005 g

Fonte: adaptado de TOUZEL & ALBAGNAC² apud VAZOLLER (1995)

²TOUZEL, J. P.; ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*. v.16, p.241-245.

A solução redutora de sulfeto de sódio foi composta por sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) a 5%, ou seja, 5 g do sal em 100 mL de água destilada. A solução redutora de citrato de titânio foi realizada segundo SAKAMOTO (1997). Esta solução era preparada adicionando-se 10 mL de uma solução de cloreto de titânio III a 15% em 10 mL de uma solução de citrato de sódio tribásico 0,2 M. O pH era acertado a 7 utilizando-se uma solução de carbonato de sódio 2M. Tanto a solução de vitaminas como as soluções redutoras foram distribuídos sob fluxo de 100% nitrogênio sob condições de assepsia como descrito em LARIZZATTI (1997). Foram distribuídos o volume de 10 mL de solução redutora para cada frascos de 30 mL. Já para a solução de vitaminas, o volume distribuído foi de 100 mL, em frasco de soro de 250 mL. As soluções foram estocada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os frascos com a solução de vitaminas foram envolvidos com papel alumínio.

4.5.5 Solução estoques de substratos orgânicos e sulfato

As soluções de carbono e sulfato empregadas nos trabalhos experimentais foram preparadas sob fluxo de 100% de nitrogênio, diferentemente da forma de manutenção daquelas usadas para a alimentação do reator, mantidas na ausência de nitrogênio. As fontes de carbono utilizadas foram os ácidos acético, propiônico, butírico e láctico, além do álcool metanol. A solução de sulfato de sódio foi utilizada somente para os ensaios em que se pretendia verificar a presença de bactérias redutoras de sulfato. Nestes ensaios, a solução redutora de sulfeto de sódio foi substituída pela de citrato de titânio.

As soluções dos ácidos acético, propiônico, butírico e láctico foram preparadas utilizando-se o sal de sódio de cada ácido, nas concentrações de 1 Molar para os ácidos propiônico e butírico e 2 Molar para os ácidos acético e láctico. Na ausência do sal dos referidos ácidos, estes eram neutralizados com solução de soda nos seguintes pH: 9,44 para o ácido propiônico, 9,41 para o ácido butírico e 8,93 para o ácido láctico. O sulfato de sódio foi preparado na concentração de 1 Molar. As soluções foram distribuídas sob fluxo de 100% nitrogênio e autoclavadas a 120°C por 20 minutos.

A solução de metanol 2 Molar foi preparada após autoclavação (120°C por 20 minutos) em separado da água destilada e o álcool puro. Para preparação de 100 mL, 8 mL de metanol foram adicionados a 92 mL de água sob condições de assepsia e anaerobiose, ou seja, através de seringas estéreis e frascos lacrados.

Todas as soluções foram estocadas sob o abrigo da luz.

4.5.6 Solução de diluição

Esta solução foi utilizada somente para os ensaios de determinação da ordem de grandeza microbiana do lodo do reator. Era preparada em 1000 mL de água destilada previamente fervida e resfriada com fluxo de nitrogênio/dióxido de carbono (70:30). À temperatura de 40°C, eram dissolvidos 2,0 mL de solução de resazurina 0,1%, 3,98 g de KHCO_3 e 6,6 g de Tris (Hidroximetilaminometano). Após acertar o pH 7 utilizando KOH ou HCl (3N), foi fluxionado a mesma mistura de gás por 30 min, para proceder a distribuição da solução. Foram distribuídas alíquotas de 8,8 mL ou 13,2 mL em frascos de 30 mL. Os frascos foram esterilizados por autoclavação a 120°C por 20 minutos e armazenados na ausência de luz e a temperatura ambiente.

4.6 Métodos Analíticos

O presente trabalho de pesquisa foi realizado utilizando-se as dependências de dois laboratórios³, sendo a operação do reator híbrido e ensaios em batelada conduzidos no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Tecnológicos (LDPT), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Parte das determinações de ácidos voláteis foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC - USP, além das determinações de clorofenóis, dos exames microscópicos sob luz comum, contraste de fase e fluorescência. No Departamento de Física e Ciências dos Materiais do Instituto de Física da USP - São Carlos foram realizadas as análises microscópicas sob microscopia eletrônica de varredura. Parte das análises de ácidos voláteis, assim como, a implantação desta metodologia, foram realizadas no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) da Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC.

Os métodos analíticos estão descritos a seguir.

4.6.1 Determinação da Atividade Metanogênica Específica

O objetivo do teste foi avaliar a atividade metanogênica específica (AME) do lodo, em termos da quantidade de metano produzida por dia, por grama de SV, verificando assim as condições reais da atividade microbiana do referido lodo.

³Ofício de intenções de pesquisas entre o Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada - Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da USP e o Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, em 13 de fevereiro de 1998.

O teste foi baseado em SOARES & HIRATA (1997), mantendo-se a proporção de células em relação ao substrato empregado igual a 5,0 g de SV/L para 5,0 g de DQO/L em ácidos orgânicos, ou seja, 1:1 em regime de agitação. Para tanto, foi colocado uma quantidade conhecida de lodo (SV), após análise de SV do mesmo, em um frasco tipo Kolbe (frasco de vidro com duas bocas na parte superior e fundo redondo com capacidade de 250 mL). O meio de cultura basal dos testes foi preparado com os mesmos componentes e da mesma forma ao descrito para a operação do reator contínuo - reator anaeróbio híbrido, exceto pela composição da fonte de substratos orgânicos. A fim de facilitar a condução dos ensaios de AME, foi preparada uma solução estoque da mistura de ácidos (Tabela 4.16) com 122,14 g DQO/L, e alíquotas de 6,2 mL em 150 mL foram utilizadas para obter a concentração final de DQO de 5,0 g/L dos ácidos acético, propiônico e butírico, proporcionalmente utilizadas no meio de cultura.

Tabela 4.16. Composição da solução estoque de ácidos orgânicos para o teste de Atividade Metanogênica (AME).

Ácidos orgânicos	g/L	DQO em g/L
Acético	28	29,78
Propiônico	28	41,96
Butírico	28	50,40

Fonte: SOARES & HIRATA (1997)

O teste de Atividade Metanogênica Específica (AME) foi realizado conforme as seguintes etapas:

- a) Foram pesadas 0,75 g de SV de cada tipo de lodo em becker de tamanho apropriado ao volume do lodo;
- b) ao lodo, foram acrescentadas 2,0 mL da solução macronutrientes, 0,25 mL da solução micronutrientes, 0,1 mL da solução redutora de sulfeto de sódio a 10% e água destilada até completar o volume de 144 mL;
- c) um fluxo de 100% Nitrogênio foi então introduzido no frasco por, aproximadamente, 10 minutos;
- d) 6,2 mL da mistura de ácidos foi adicionada completando um volume total de meio e lodo no frasco de 150 mL;
- e) os frascos foram fechados com rolhas de borracha de butila e lacres de alumínio;
- f) os frascos foram então conectados a gasômetros (frascos de Duran invertidos contendo uma solução de NaOH a 5%, para reter o CO₂ produzido no sistema)

por um sistema de mangueiras e agulhas inseridas através da rolha de borracha de butila. O biogás formado no ensaio borbulhava na solução de NaOH, retirando o CO₂, e a medida que o metano era acumulado no topo do gasômetro, o volume equivalente à esta produção era deslocado para a proveta;

g) a incubação dos frascos foi feita em banho termostatizado (Ética Equipamentos Científicos 501), com agitação e temperatura controlada a 35°C.

As determinações do volume de gás iniciaram-se após 10 minutos de incubação dos sistemas de reação. O volume da solução de NaOH deslocado inicialmente foi considerado como o volume inicial, em tempo igual a zero. As medidas subsequentes foram realizadas em intervalos de 2 horas, nas primeiras 8 horas, e de 3 a 4 horas nos 3 primeiros dias de incubação. Após este período, as medidas eram realizadas uma vez por dia, até que a produção do gás cessasse. Os ensaios foram realizados em duplicata e frasco controle com água destilada no lugar da solução de ácidos.

A atividade metanogênica específica foi calculada conforme equação descrita em SOARES & HIRATA (1997), após correção do volume de gás nas CNTP. A equação utilizada (Eq. 4.2), considerando que à 35°C, 395 mL de gás metano corresponde a 1 g de DQO (SPEECE, 1996), foi a seguinte:

$$AME = r \cdot 24/V \cdot SV \cdot (\text{g DQO-CH}_4/\text{gSV} \cdot \text{dia}) \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Onde:

r = velocidade de produção de metano em g DQO-CH₄/hora

24 = 24 h/dia

V = volume do meio de reação em litros

SV = concentração de lodo em g/L de SV

4.6.2 Determinação de sólidos voláteis (SV)

As análises de sólidos voláteis foram realizadas de acordo com metodologia descrita no STANDARD METHODS (1995), com o auxílio de uma estufa Biomatic 305 a 105°C e uma mufla Quimis 318.21 / M25032 a 600°C.

4.6.3 Exames microscópicos

Amostras do lodo originalmente coletado, de algumas diluições das análises de ordem de grandeza microbiana e das culturas desenvolvidas a partir do teste com os grânulos foram submetidas a exames microscópicos sob luz comum, contraste de fase e fluorescência,

a fim de examinar os tipos morfológicos predominantes nos meios estudados. A metodologia utilizada para o preparo da amostra para análise microscópicas seguiram orientação do Laboratório de Processos Biológicos - EESC - USP. O aparelho microscópico utilizado foi o microscópio de epifluorescência e contraste de fase Olympus BH2-RFCA, acoplado a uma câmara digital colorida (Olympus U-PMTUC), conectada a um computador. Os tempos de exposição usados para a aquisição das imagens foi de 0.08 segundos para o contraste de fase e de 0,5 a 4 segundos para a fluorescência. O software usado para aquisição das imagens foi o Image pro-plus versão 3.0.1. A objetiva utilizada foi de 100x (portanto o aumento das células observadas foi de 1000x ou 1250x utilizando-se o "zoom" 1,25), com filtros BP490, para visualização de autofluorescência das *Archaea* metanogênicas (fluorescem a 420 nm devido a presença do co-fator F₄₂₀) (CHEESEMAN *et al.*, 1972; EDWARDS & McBRIDE, 1975; MINK *et al.*, 1977).

Os exames sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizados somente com os grânulos provenientes do reator híbrido, em fases distintas de operação do mesmo, na presença de diferentes concentrações de PCP e analisados morfolologicamente com o auxílio de uma lupa ou microscópio. A metodologia de preparo da amostra utilizada para o MEV foi executada segundo ARAUJO (1995), descrita a seguir: fixação dos grânulos com 2,5 % de glutaraldeído a 0,1 M em tampão fosfato (pH 7,3) por 6 a 12 horas a temperatura 4°C; lavagem dos grânulos três vezes em tampão fosfato gelado (pH 7,3) por dez minutos cada; os grânulos eram então desidratados em uma série de álcool a porcentagem de 50%, 70%, 80%, 90% e 95%, por dez minutos cada; a desidratação no álcool 95% foi realizada três vezes; as amostras foram cobertas duas vezes com HMDS (Hexamethyldisilane SIGMA) puro durante 30 segundos, prosseguindo-se 10 minutos de secagem ao ar. As amostras assim preparadas eram guardadas em frascos ependorf e cobertas por ouro (SDC 050; Balzers Union, Walluf, Germany) somente no momento da realização da microscopia eletrônica de varredura, segundo metodologia do Departamento de Física e Ciências dos Materiais do Instituto de Física da USP - São Carlos e examinadas em microscópio ZEISS DSM-960 Scanning Electron Microscope a 20 KV de voltagem.

4.6.4 Determinação da ordem de grandeza dos grupos microbianos

A determinação da ordem de grandeza microbiana para as amostras coletadas em fases distintas do reator híbrido (Tabela 4.1 e Tabela 4.17) foram realizadas baseadas na metodologia do Número Mais Provável (NMP) e executadas através de diluições decimais seriadas nas faixas de diluições determinadas (de 10⁻² até no máximo 10⁻¹³), variando conforme descrito na Tabela 4.15 para cada ensaio, em triplicatas ou quintuplicatas.

Os ensaios foram realizados com o objetivo de estimar a ordem de grandeza microbiana de metanogênicas utilizadoras de metanol, metanogênicas utilizadoras de acetato, metanogênicas sintróficas em lactato e sulfato e bactérias redutoras de sulfato em meio com lactato mais sulfato e acetato mais sulfato. Para tanto, foram montados experimentos conforme esquematizado na Tabela 4.18, o que permitiu realizar uma estimativa da densidade original dos grupos de microrganismos pesquisados no RAH. Este ensaio determinou somente a ordem de grandeza dos grupos microbianos estudados.

Tabela 4.17. Ensaio para determinação da ordem de grandeza microbiana durante as etapas 2 e 3 de operação do Reator Anaeróbio Híbrido.

Ordem de Grandeza Microbiana	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
Tempo de operação do reator híbrido	321 dias (11 meses)	394 dias (13 meses)	466 dias (16 meses)	638 dias (21 meses)	752 dias (25 meses)
Etapas de operação do reator híbrido	Etapas 2	Etapas 2	Etapas 2	Final da etapa 2	Final da etapa 3
Tempo de incubação do ensaio	14 dias	38 dias	44 dias	50 dias	52 dias
Metanogênicas utilizadoras de acetato ^a	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-9}$	$10^{-2} - 10^{-9}$	-	-
Metanogênicas utilizadoras de metanol ^a	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-9}$	$10^{-2} - 10^{-9}$	$10^{-2} - 10^{-11}$	$10^{-2} - 10^{-10}$
BRS em lactato e sulfato ^a	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-3} - 10^{-13}$	$10^{-4} - 10^{-11}$	$10^{-2} - 10^{-11}$	$10^{-3} - 10^{-11}$
BRS em acetato e sulfato ^a	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	-	-
Réplicas	Três	Três	Três	cinco	cinco

^a - faixa de diluição testada.

O meio basal utilizado foi o descrito por ZINDER *et al.* (1984), relatado no item 4.5. Para cada grupo microbiano, fontes específicas de carbono foram acrescidas ao meio de cultura basal (Tabela 4.18), como forma de selecionar cada grupo microbiano a ser identificado, conforme acima mencionado. Da mesma forma, o sulfato foi utilizado. Os frascos foram incubados à temperatura de 35°C por um determinado tempo, como indicado na Tabela 4.18. Foram considerados resultados positivos a presença de metano nos frascos de antibiótico, verificada por cromatografia gasosa (item 4.6.9), a fim de constatar a

presença e o número das *Archaea* metanogênicas. A fim de verificar a presença de BRS pela redução do sulfato, a produção de sulfeto foi atestada, como descrito no item 4.6.13. O crescimento microbiano também foi atestado pelo grau de turbidez e substâncias precipitadas no fundo do frasco.

Tabela 4.18. Condições nos frascos para o cultivo e determinação da ordem de grandeza microbiana.

Grupos Microbianos	Meio de cultivo (mL)	Soluções ^a (mL)	Fonte de Carbono (2Molar) ^b (mL)	Fonte de Enxofre (1Molar) ^b (mL)	Volume de Inóculo ^c (mL)	Volume Total (mL)
BRS	8,5	0,3	Acetato 0,1	Sulfato 0,1	1,0	10
BRS	8,5	0,3	Lactato 0,1	Sulfato 0,1	1,0	10
Metanogênicas	8,6	0,3	Acetato 0,1	-	1,0	10
Metanogênicas	8,6	0,3	Metanol 0,1	-	1,0	10

^a - as soluções adicionais são: vitaminas (0,1 mL), solução redutora (0,1 mL) e bicarbonato a 10% (0,1 mL);

^b - concentração estoque;

^c - inóculo proveniente de uma diluição anterior, em solução de diluição

As diluições decimais eram realizadas com 1 mL de lodo previamente homogeneizado (de acordo com item 4.5) em 9,0 mL de solução de diluição, perfazendo um total de 10 mL, e assim sucessivamente, como indicado na Figura 4.7. Quando não foi possível utilizar a solução de diluição, esta foi substituída pelo meio de cultivo basal Zinder sem fonte de carbono. As soluções de diluição eram reduzidas com a solução de citrato de titânio, assim como o meio de cultivo basal Zinder quando utilizado para este fim.

A partir da primeira série de diluições, uma alíquota de 1 mL de cada diluição era transferido para três ou cinco frascos, dependendo do número de réplicas do ensaio (Tabela 4.18), com 9,0 mL de meio de cultivo já reduzido (Figura 4.7) e com todas as soluções necessárias como descritas na tabela 4.18. Os frascos com meio de cultivo que receberam 1 mL da solução de diluição misturada com o lodo, foram considerados uma diluição abaixo daquele da solução de diluição, uma vez que a cada diluição, a amostra de microrganismos do lodo era diluída 10 vezes. Este procedimento era realizado para cada diluição da primeira série, até que se completassem todas as diluições, conforme esquematizado na Figura 4.7, adaptado de MONTENEGRO (1994).

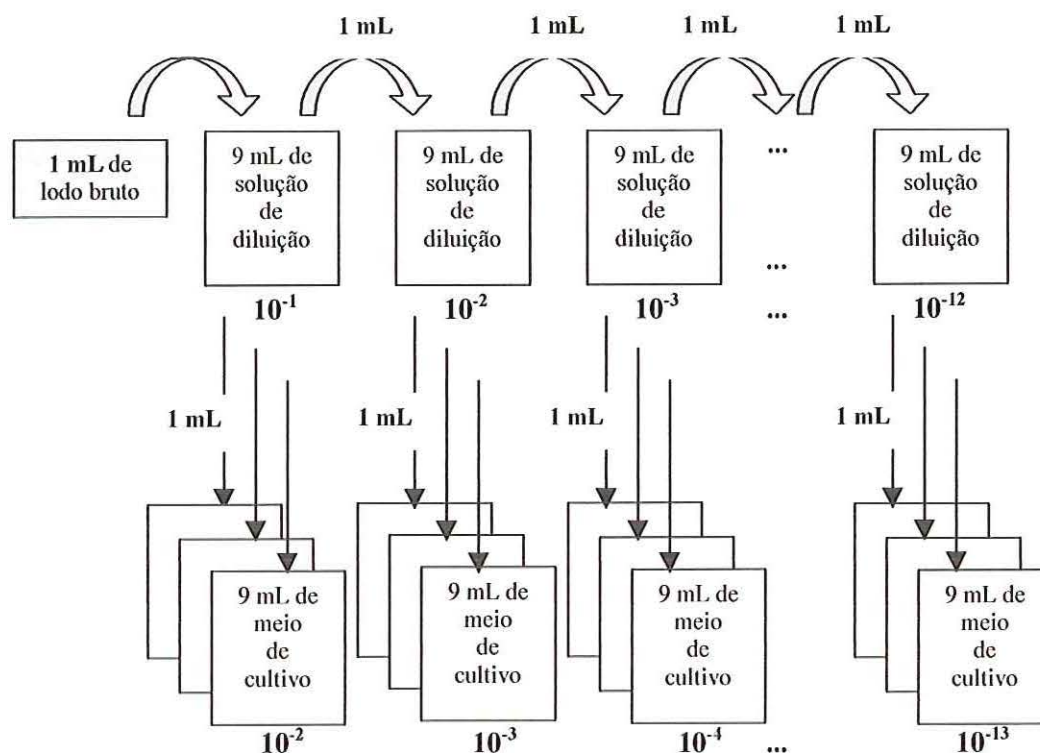


Figura 4.7. Esquema da execução das diluições decimais seriadas.

4.6.5 Caracterização de grupos microbianos pertencentes ao Domínio *Archaea* através da técnica de hibridação *in situ* - FISH.

Amostras coletadas do lodo do reator híbrido foram submetidas à técnica molecular de hibridação *in situ*, conforme descrito por ARAUJO *et al.* (2000). Quatro amostras de lodo granulado representando tempos diferentes da operação do reator, amostra de lodo antes (0 mg/L) e após a adição do PCP, com 12,8 mg/L, 15,6 mg/L e 21,0 mg/L, foram coletadas e estocadas na geladeira por até 7 meses até serem processadas (fixadas e hibridadas) seguindo a técnica de FISH. Essas amostras (4,0 mL de lodo granulado), foram previamente maceradas com 2,0 g de pérolas de vidro (agitação manual por 20 minutos). Posteriormente, 0,5 mL do lodo macerado foi fixado com 1,0 mL da solução de paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato salino (PBS, 0,13 M NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄; pH 7,2) por 12h a 4°C (HAHN *et al.*, 1992). As amostras foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS (e/ou em BS com 0,1% de Nonidet P-40, Sigma) e estocadas em 1,0 mL de 50% etanol / PBS a -20°C, até serem utilizadas na hibridação. Alíquotas de 1,0 µL das amostras (que estavam estocadas) foram colocado sobre um "poçinho" da lâmina de vidro coberta com

teflon (H.T.C. red, Dynatec, com 30 "poçinhos"; ou a Paul Marienfelder KG, Bad Mergentheim, Alemanha). Depois, a lâmina foi levada a estufa por 20 minutos a 45°C, permitindo assim que as células se fixassem na lâmina. Após essa etapa, a lâmina foi imersa para desidratação em uma série gradativa de etanol, 50%, 80% e 100%, por 3 minutos cada. Posteriormente seguiu-se a etapa de hibridação usando as sondas: MSMX860 (específica para a família *Methanosarcinaceae*), MB1174 (específica para a família *Methanobacteriaceae*), MG1200 (específica para a ordem *Methanomicrobiales*), MC1109 (específica para a família *Methanococcaceae*), ARC915 (específica para o Domínio *Archaea*) e a EUB338 (específica para o Domínio *Bacteria*). Os protocolos e condições de hibridação usados para cada sonda, bem como a seqüência de cada uma, encontram-se descritos em ARAUJO *et al.* (2000). Após a hibridação, as células foram coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma), um corante de DNA, aplicando-se 10 µL de uma solução 10 µg / mL, em seguidas lavadas com água deionizada, secas ao ar e montadas com uma solução de glicerol e PBS (20:80) em pH igual a 8,5. Posteriormente, foram observadas sob microscopia de fluorescência (Olympus BH2-RFCA) e o número total de células coradas com o DAPI e hibridadas com cada uma das sondas foi estimado a partir da contagem de 10 a 20 campos microscópicos perfazendo um total de 1000 células, conforme descrito em ARAUJO (2001).

Ensaio realizados com dois tipos de grânulos formados durante a operação do reator híbrido também foram feitos utilizando-se a técnica molecular de hibridização *in situ*. Foram feitas hibridações com 2,0 mL dos grânulos previamente separados, antes da adição do PCP (com 0 mg/L) e após (com 21 mg/L). O procedimento de maceração e fixação foi o mesmo descrito anteriormente. As sondas usadas também foram as mesmas.

O objetivo deste ensaio foi caracterizar, principalmente, os tipos metanogênicos presentes no lodo granulado antes e após adição de PCP.

4.6.6 Determinação dos ácidos voláteis

A metodologia adotada para determinação dos ácidos voláteis neste trabalho constituiu na adaptação da metodologia utilizada no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC- USP, proposta por MORAES *et al.* (2000) e implantada e realizada no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) da Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFSC. Parte das análises de ácidos voláteis foram realizadas no LPB - EESC / USP.

A amostra aquosa para extração dos ácidos voláteis foi preparada como segue, ainda que com algumas variações, pontuadas posteriormente:

- a) filtração em papel filtro ultra rápido para as amostras da saída do reator e sem filtração para as amostras da entrada;
- b) 5 mL de amostra foi colocada em frasco de vidro com rosca e tampa, junto com 1,0 mL de ácido sulfúrico 2%. Quando a amostra não era processada de imediato, esta era congelada com o ácido até o momento da análise. Os frascos eram selados com fita de teflon e fechados com tampa de rosca. Durante todo o processo de realização da determinação de ácidos voláteis os frascos eram fechados desta maneira;

As amostras, assim preparadas, permaneceram congeladas por um período máximo de 10 meses. No momento da leitura por cromatografia, as amostras eram processadas como segue:

- c) as amostras eram descongeladas e uma medida de cloreto de sódio era colocado no tubo de ensaio onde as amostras foram congeladas;
- d) adição de 150 μ L de uma solução de ácido capróico (4 g/L) foi utilizada como padrão interno;
- e) 2 mL de éter etílico purificado (com permanganato de potássio e destilação) foi adicionado a amostra para extração dos ácidos voláteis da fase aquosa;
- f) depois de agitação em "vortex" potência máxima por 1 minuto, as amostras eram centrifugadas por 5 minutos, a 700 rpm. As amostras eram guardadas sob refrigeração até o momento da análise cromatográfica, evitando-se a perda do éter e facilitando-se a amostragem da fase orgânica da amostra;
- g) numa capela química, alíquotas de 1 μ L da fase orgânica da amostra eram retiradas do frasco com o auxílio de uma seringa cromatográfica de volume igual a 10 μ L e injetado em cromatógrafo HP 6890 com detector de ionização de chama e coluna capilar NukolTM (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), equipado com software HP ChemStation (HP 3365 series II versão A.03.34), no LIMA.

As temperaturas do injetor e detector adotadas foram de 220°C e 250°C, respectivamente. A rampa de temperatura do forno empregada para montagem da primeira e segunda curva de calibração foi de 90°C por 1 minuto; 90°C a 100°C com um incremento de 30°C/min.; 100°C a 120°C a 3°C/min.; 120°C a 150°C a 70°C/min. e 150°C por 3 minutos. O fluxo do gás de arraste nitrogênio foi de 5 mL/min. e os gases usados na queima do detector foram o hidrogênio, o ar sintético e o nitrogênio a um fluxo de 35 mL/min., 400 mL/min. e 5 mL/min., respectivamente. A cada injeção de amostra, o cromatógrafo realizava uma

limpeza da coluna, ao final da corrida. Para tanto, o cromatógrafo estava programado para elevar a temperatura do forno à 180°C por 3 minutos, com um fluxo de nitrogênio igual a 2 mL/min.

Curvas de calibração foram montadas, sendo apresentadas no Anexo B. A metodologia adotada foi modificada em alguns pontos para as diferentes curvas de calibração utilizadas em diferentes períodos de execução da metodologia. A primeira curva de calibração foi construída pelos padrões de ácidos voláteis: acético, propiônico, butírico, isobutírico, utilizando-se a metodologia descrita acima, com exceção do ácido utilizado que não foi o sulfúrico e sim 1,2 mL de ácido fosfórico (2,5%) e amostras iguais a 6,0 mL. A segunda curva de calibração foi construída pelos mesmos padrões e seguiu exatamente a metodologia descrita acima. A terceira curva seguiu basicamente a metodologia descrita neste item, porém substituindo-se o padrão interno por ácido crotônico na concentração de 700 mg/L (200 µL). Esta curva de calibração foi construída por uma mistura de padrões de ácidos voláteis, tais quais acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e capróico. A rampa de temperatura para o forno também foi modificada ficando assim constituída: 80°C a 135°C com incremento de 4°C/min e 2 minutos na temperatura de 135°C.

Uma parte das análises de ácidos voláteis foi realizada no LPB com algumas variações nos volumes, mas basicamente seguindo a metodologia descrita acima, com rampa de temperatura igual a descrita para a terceira curva, descrita também em MORAES *et al.* (2000). Assim, fez-se necessário a construção de uma outra curva de calibração, considerada neste trabalho como a quarta curva. Para as determinações realizadas no LPB, as seguintes especificações foram seguidas: amostras com alíquota de 2,0 mL, 170 µL de ácido sulfúrico 1 M, 70 µL de uma solução de ácido crotônico a 700 mg/L, como padrão interno e 0,60 mL de éter etílico gelado.

Apesar dos diferentes passos técnicos para elaboração das curvas, não houve comprometimento dos resultados, uma vez que tomou-se o devido cuidado de utilizar as mesmas soluções padrões e equipamentos similares. A metodologia de extração de ácidos e procedimentos na manipulação das amostras foram os mesmos e baseados em MORAES *et al.* (2000).

4.6.7 Determinação de PCP e intermediários

As análises do PCP e seus intermediários foram processadas no LPB - EESC / USP, segundo metodologia adaptada a partir de DAMIONOVIC (1997). Foram montadas curvas de calibração para os seguintes clorofenóis: 2,4-DCP (Diclorofenol), 2,6-DCP, 2,3-

DCP, 2,3,4-TCP (Triclorofenol), 2,3,6-TCP, 2,4,6-TCP e PCP (Pentaclorofenol). As curvas de calibração e outros detalhes da montagem das mesmas, encontram-se no Anexo C.

As amostras foram coletadas regularmente, conforme Tabela no Anexo A, em fases distintas de operação do reator. O teste de toxicidade III para avaliação do efeito do PCP, após a utilização deste composto no reator, foi também acompanhado pela determinação cromatográfica do PCP e intermediários da degradação do composto orgânico clorado. Tanto as amostras provenientes do RAH como as do teste de toxicidade III ao PCP foram cuidadosamente manipuladas a fim de preservar suas características originais. As amostras passaram pelas seguintes etapas de preparação:

- h) filtração em papel filtro ultra rápido para as amostras da saída do reator e sem filtração para as amostras da entrada. As amostras do teste de toxicidade III foram filtradas em papel filtro ou centrifugadas;
- i) 4 mL de amostra foi colocada em frascos de vidro do tipo ampola, com duas gotas de solução de NaOH (1M);
- j) as ampolas foram lacradas a fogo e congeladas.

As amostras, assim preparadas, permaneceram congeladas por um período de 7 meses.

Para a análise do PCP e seus intermediários, segundo DAMIANOVIC (1997), vários métodos foram testados para extração de clorofenóis da fração orgânica e soluções para derivatização do PCP em éster. Porém, a metodologia utilizada neste estudo baseou-se na definida por DAMIANOVIC (1997), implantada no LPB - EESC / USP, sendo definida como segue:

- a) as ampolas eram abertas numa capela química apropriada e uma alíquota do meio retirada com o auxílio de uma micropipeta; o volume da amostra utilizada foi de 4 mL. Entretanto, algumas vezes a amostra precisou ser diluída, uma vez que as concentrações de clorofenóis da amostra deveriam estar dentro do intervalo de concentração utilizado na construção das curvas de calibração, ou seja entre 0,2 a 8,0 mg/L. A amostra era então transferida para um tubo de ensaio com tampa de rosca, contendo uma quantidade aproximadamente de 1 g de NaCl;
- b) 200 µL de ácido sulfúrico 1M eram adicionados para neutralizar a solução de soda usada, a fim de preservar a amostra durante a estocagem, e abaixar o pH da amostra até valores menores que 2;
- c) 10 µL de 2,4 dibromofenol (0,1316 g/100 mL de metanol) eram adicionados à amostra como padrão interno;

- k) finalmente, eram adicionados 2,0 mL de éter etílico grau HPLC, para extração dos clorofenóis;
- l) depois de agitação em "vortex" potência 10 por 1 minuto, as amostras eram centrifugadas por 5 minutos, a 2.000 rpm;
- m) alíquotas de 1,0 mL da fração orgânica eram colocadas em balões volumétricos de 2 mL, adicionando-se 1,0 mL de solução etérea de diazometano, mantida sob -10°C , e preparada de acordo com CASEY *et al.*⁴ (*apud* DAMIANOVIC, 1997) para a derivatização dos clorofenóis;
- n) após 30 minutos de reação, a solução de diazometano era evaporada em capela química sob fluxo de 100% nitrogênio até que o volume original de amostra retornasse a 1 mL;
- o) 10 μL da amostra foram em seguida injetados no cromatógrafo a gás HP5890 série II, equipado com detector de captura de elétrons (ECD) e coluna Supelco SBPTM-5 com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm em filme de sílica fundida. Como gás de arraste utilizou-se o hidrogênio a vazão de 8 mL/min e nitrogênio a 60 mL/min. A temperatura utilizada para o detector foi de 300°C , para o injetor de 280°C e para o forno foi empregado um esquema de temperatura variável, cuja temperatura inicial foi de 70°C , com taxa de incremento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 110°C ; de 110°C a 130°C ($2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.), de 130°C a 180°C ($3^{\circ}\text{C}/\text{min}$.) e temperatura final de 180°C , mantidas por 5 minutos, com tempo total de corrida de 30 minutos.
- p) Os valores das concentrações dos clorofenóis foram obtidos a partir da comparação dos padrões utilizados para a montagem das curvas de calibração, realizados por um programa específico para este fim, fornecido pela HP Equipamentos.

4.6.8 Determinação da DQO

As análises de DQO - Demanda Química de Oxigênio foram realizadas segundo os procedimentos no LDPT do Departamento da Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, baseados no STANDARD METHODS (1995). O procedimento utilizado foi o do refluxo fechado por digestão ácida na presença de dicromato de potássio com pequenas quantidades da amostra e realizada em Estufa Biomatic 305 a 150°C por duas horas; a identificação foi realizada por método colorimétrico com auxílio de um Espectrofotômetro UV Visível Digital 724 Shangai Optical Instrument Factory a 600 nm; a

⁴ CASEY, M. et al. (1990). *Advanced Practical Chemistry*. Ed. Blackie Brished & Chapmam Hall. New York.

leitura era feita em função do dicromato consumido pela matéria, o que produzia uma cor esverdeada; para os cálculos, uma curva de calibração era preparada periodicamente com padrões de biftalato de potássio.

4.6.9 Determinação de quantidade dos gases: metano e dióxido de carbono

As medidas de quantidade dos gases metano e dióxido de carbono eram realizadas por cromatografia gasosa, aparelho da Instrumentos Científicos CG - modelo 35, com coluna Porapak-N, de 3/16" de diâmetro e 6 pés de comprimento, equipado com detector de condutividade térmica. O gás de arraste utilizado foi o Hélio 4,5 - White Martins, a uma vazão 0,1 mL /s. As temperaturas da coluna, do vaporizador e do detector foram em torno de 55°C, 60°C e 100°C, respectivamente.

A determinação da porcentagem de metano no biogás foi realizada a partir de amostras gasosas que variaram de 0,5 mL a 1,0 mL. As amostras provenientes do reator híbrido foram retiradas de um dispositivo em vidro lacrado com rolhas de butila, acoplado ao reator híbrido, por onde era possível coletar a amostra gasosa com o auxílio de uma seringa de vidro com válvula de trava. As análises da composição do biogás para os ensaios em batelada foram realizadas, também, com o auxílio da mesma seringa, porém coletando-se o biogás diretamente da atmosfera dos frascos.

A fim de quantificar as leituras das amostras de biogás, curvas de calibração foram construídas utilizando-se para isso gases padrão: 100% metano; 100% dióxido de carbono, ambos qualidade ultra pura (White-Martins), gases estes normalmente encontrados na atmosfera de sistemas anaeróbios. Para tal, foram conectadas mangueiras de silicone aos cilindros de gases, forçando a passagem destes pelas mangueiras e fazendo-os borbulhar num erlenmeyer contendo água destilada. Desta forma, a pressão do gás ao passar pela mangueira se equivaleria a atmosférica. Com o auxílio de uma seringa, amostras com diferentes volumes (0,1 a 1,0 mL) foram coletadas e injetadas, em seguida, ao cromatógrafo. Foi estabelecida uma relação entre o número de moles e as áreas dos picos para os diferentes gases, através da lei dos gases ideais. A curva de calibração foi construída e através de regressão linear uma equação foi determinada. Os valores encontrados para ambos os gases e as curvas com suas respectivas equações, encontram-se no Anexo D. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem molar, tomando-se como base a mistura de 100% de metano e dióxido de carbono, e o ar, incluindo o nitrogênio, era desprezado.

4.6.10 Determinação do volume do biogás produzido no RAH

O biogás produzido pelo reator anaeróbio híbrido foi determinado através de verificação volumétrica, utilizando-se para isto um gasômetro de cúpula flutuante de volume igual a 600 mL (altura 25 cm e diâmetro 7,2 cm) e preenchido com solução de Na_2SO_4 para evitar a adsorção do dióxido de carbono no meio líquido. O gasômetro funcionava com duas chaves de fim de curso e um contador de ciclos. Inicialmente, a primeira chave de fim de curso estando acionada, abria a válvula solenóide para que o biogás pudesse entrar para o interior do gasômetro (Figura 4.2, números 8 e 9). Com esta operação, o gasômetro era preenchido gradativamente pelo biogás até que a cúpula flutuante atingisse a altura máxima. Nestas condições, a segunda chave de fim de curso era acionada e então a válvula solenóide mudava sua posição, permitindo que todo o biogás do interior do gasômetro fosse liberado. Ao acionar a segunda chave de fim de curso, era acionado também o contador de ciclos. Assim, era possível obter, a cada dia, o volume de biogás produzido, através do número de ciclos realizados e a altura do gasômetro no momento da contagem. O volume de biogás não foi corrigido para as condições de CNTP, pois a variação de volume do biogás em relação a pressão interna do gasômetro era pequena.

4.6.11 Determinação do volume do biogás nos ensaios em batelada

No presente estudo, a produção de gases foi medida com o auxílio de um gasômetro montado a partir de uma bureta e um erlenmeyer conectados entre si (Figura 4.8). Ao erlenmeyer havia uma outra saída com uma agulha hipodérmica na ponta. Ao se medir a produção de biogás dos frascos lacrados, estes eram conectados ao sistema através desta agulha, que permitia que a atmosfera interna dos frascos entrassem em contato com o sistema de medidas, aberto para a atmosfera. Através da deslocação do líquido na bureta era possível verificar a produção do biogás. O líquido do sistema era composto por uma solução de Na_2SO_4 para evitar a adsorção do dióxido de carbono pelo meio líquido. Assim, todo o biogás era medido.

Entretanto, o volume do biogás medido através deste sistema precisou de ajustes. Uma vez que a pressão exercida sobre o sistema de medidas do biogás diminuía o volume de líquido deslocado na bureta, o volume medido necessitava ser corrigido. Assim, foi montado uma curva de calibração (Anexo E). O fator de correção entre o biogás medido no sistema para o biogás real foi determinado por meio de teste experimental.

Nos ensaios para a verificação da toxicidade ao PCP, o biogás produzido foi medido durante todo o ensaio. Para os testes de toxicidade I e II, as medidas de produção de

biogás eram realizadas sempre no mesmo o frasco. Medindo-se desta forma, o biogás produzido num determinado espaço de tempo não representava a produção total de biogás do início do experimento até o tempo de execução da medida. Neste caso, foi necessário somar os valores mensurados a cada intervalo de tempo para se obter o valor de biogás acumulado do início do experimento até o tempo determinado, cuja avaliação da produção de biogás era realizada.

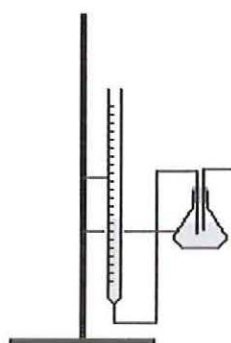


Figura 4.8. Sistema montado para medidas de produção de biogás, nos testes em batelada.

O teste de toxicidade III foi realizado de forma diferente. As medidas de produção de biogás eram realizadas em frascos individuais que em seguida eram descartados para a realização de outras análises do meio de cultivo. Assim, os volumes de biogás medidos representavam os valores exatos de produção de biogás do início do experimento até o momento da realização da medida. Para este teste, três frascos eram medidos a cada intervalo de tempo e depois a média era obtida.

4.6.12 Determinação de cloretos

Segundo o STANDARDS METHODS (1995), existem alguns métodos para medidas de cloretos, porém dois métodos parecem ser os mais indicados no presente estudo, devido a capacidade de se detectar baixas concentrações de cloretos.

No presente trabalho decidiu-se pela utilização do método argentométrico, uma vez que este é apropriado para amostras que contenham entre 0,15 a 10 mg de Cl⁻ e devido a facilidade de sua realização no LDPT do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Tal determinação foi realizada segundo STANDARDS METHODS (1995).

4.6.13 Determinação de sulfetos

A determinação de sulfeto de hidrogênio foi realizada conforme descrito em SAKAMOTO (1996) para determinação da presença das bactérias redutoras de sulfato, nos ensaios de ordem de grandeza microbiana e teste com os grânulos. Este método está baseado no metabolismo destas bactérias que, na presença de sulfato e doadores de elétrons, forma sulfeto de hidrogênio. O método consiste em preparar uma solução de acetato de chumbo com ácido acético e embeber tiras de papel filtro, no caso papel filtro Whatman. Para o preparo de 1000 mL de solução foram utilizados 20 g de acetato de zinco em água destilada e fervida a temperatura de 30°C, sob fluxo de 100% nitrogênio e 0,2 mL de ácido acético. Com a solução pronta, 30 minutos de fluxo de gás eram necessário antes da distribuição da mesma em frascos.

As tiras de papel filtro, depois de embebidas nesta solução e secas em placas de petri por um curto período de tempo em estufa, eram utilizadas como indicadores da presença de sulfeto. Uma amostra do meio líquido em que as bactérias eram cultivadas era testado nesta tira de papel. Os resultados foram considerados positivos sempre que era detectado uma coloração marrom no papel, resultado da reação do sulfeto com o acetato de chumbo.

Para a certificação da avaliação do sulfeto pelas tiras de papel filtro, testou-as frente ao sulfeto de sódio em diferentes concentrações; encontrando-se o mínimo detectável a olho nu igual a 1,0 mM de sulfeto.

4.6.14 Determinação e manutenção da temperatura do RAH e reatores em batelada

A temperatura do reator híbrido era medida diretamente por um termômetro de mercúrio com temperatura entre -10 e 60°C. Um banho termostaticado marca Ética de 30 a 110°C foi utilizado a 39°C, para controle da temperatura interna do reator. Um sistema de serpentina ao redor do reator promoveu o contato da água aquecida com a parede do reator, através de uma bomba submersa usada em aquários. Desta forma, o reator era aquecido e sua temperatura mantida a 35°C. Para o melhor controle, a medida da temperatura foi feita diretamente no banho termostaticado, e a temperatura interna do reator através de amostra, obtida da parte superior do reator híbrido, no ponto de amostragem, imediatamente, anterior ao filtro anaeróbio (Figura 4.2, número 3 - último ponto de amostragem).

Os ensaios em batelada foram realizados em estufa de cultura ou banho termostaticado, com agitação à temperatura controlada a 35°C, na faixa mesofílica.

4.6.15 Determinação do pH

As medidas de pH foram realizadas com um potenciômetro da marca Quimis 400 A, calibrado uma vez por semana. Os valores de pH de entrada do reator foram, na realidade, as do meio de cultivo, obtidas no momento do preparo deste. As medidas do pH do meio no reator foram consideradas as da saída, realizadas diariamente a partir de amostras para medidas da temperatura.

As medidas de pH para os ensaios em batelada foram realizadas após adição das soluções estoques ao meio de cultivo já autoclavado e ao final dos ensaios, quando os frascos eram abertos.

4.6.16 Alcalinidade

As determinações da alcalinidade realizadas neste trabalho para o reator híbrido foram executadas segundo o STANDARDS METHODS (1995). Uma vez que o meio de cultivo do reator era tamponado com bicarbonato de sódio, a alcalinidade manteve-se constante, sendo estas análises realizadas, portanto, por um curto período de tempo (4 meses). Os valores foram calculados segundo SPEECE (1996), em que 80% da alcalinidade a bicarbonato é titulada a pH 5.8.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O capítulo 5 organiza os resultados obtidos durante a execução dos ensaios e testes experimentais da presente tese, bem como sua interpretação e discussão, mantendo-se a divisão proposta no capítulo Material e Métodos, como indicado na Figura 4.1 que reúne: - ensaios preliminares com o lodo, denominados protocolo 1; - ensaios no sistema contínuo - reator anaeróbio híbrido, denominados protocolo 2; - testes de toxicidade com o lodo proveniente do reator, denominados protocolo 3; - testes com os diferentes tipos de grânulos, denominados protocolo 4.

5.1 Protocolo 1: Ensaios preliminares com o lodo - Caracterização e escolha do inóculo

Os dados apresentados neste item correspondem aos resultados obtidos durante a primeira fase de trabalho denominado de protocolo 1 e são referentes às análises realizadas com o lodo utilizado como inóculo, antes da inoculação e partida do sistema contínuo “reator anaeróbio híbrido” – RAH. O lodo anaeróbio, coletado em dois diferentes períodos de um reator UASB com volume de 600 m³ operado com água residuária de uma indústria de papelão, foi caracterizado macroscopicamente como lodos floculento e granulado, respectivamente às épocas de amostragem. As amostras foram analisadas após um período de preservação sob refrigeração, cerca de cinco e dois meses, respectivamente para os lodos granulado e floculento. Os resultados das análises de sólidos voláteis (SV), determinação da atividade metanogênica específica (AME) e microscopia ótica comum estão apresentadas nos itens que se seguem.

5.1.1 Determinação de sólidos voláteis (SV)

Os valores de sólidos voláteis (SV) calculados tanto para a caracterização dos lodos como para a realização dos testes de atividade metanogênica específica (AME) se encontram na Tabela 5.1.

Como se pode observar na Tabela 5.1, o lodo granulado apresentou composição de SV/lodo (g/g) aproximadamente dez vezes maior daquela encontrada para o lodo floculento.

Tabela 5.1. Valores de Sólidos Voláteis (SV) dos lodos floculento e granulado.

Objetivos	Tipos de lodo	Lodo (g)	SV (g)	SV/lodo (g/g) ²	Média SV/lodo (g/g) ²	Desvio Padrão
Teste de AME ¹	floculento	25,780	0,2100	0,00815	0,00849	±0,000483
		22,085	0,1950	0,00883		
	granulado	4,919	0,4470	0,09087	0,08995	±0,001310
		4,763	0,4240	0,08902		
Caracterização	floculento	8,353	0,1050	0,01257	0,01442	±0,001653
		6,980	0,1100	0,01576		
		8,511	0,1270	0,01492		
	granulado	3,4902	0,3042	0,08716	0,08697	±0,000592
4,6394		0,4004	0,08630			
4,9428		0,4322	0,08744			
Caracterização	floculento	27,6129	0,2847	0,01031	0,01028	±0,000041
		27,3969	0,2809	0,01025		
Partida do reator	floculento	15,8406	0,1773	0,01119	0,01110	±0,000250
		21,6083	0,2338	0,01082		
		21,0980	0,2383	0,01129		

¹ - Determinação realizada para execução do teste de Atividade Metanogênica Específica

² - Os valores de SV foram determinados em relação ao peso úmido do lodo

5.1.2 Determinação da Atividade Metanogênica Específica

A determinação da atividade metanogênica específica foi feita com o objetivo de escolha do inoculo mais adequado à partida do RAH. Os resultados da produção de biogás medidos em volume e expressos em g/L DQO-CH₄ estão representados nas Figuras 5.1 e 5.2. Os valores de AME calculados estão apresentados na Tabela 5.2 e Figuras 5.3 e 5.4. As tabelas com os valores apresentados das Figuras 5.1 a 5.4 estão no Anexo F.

Os valores de densidade dos lodos floculento e granulado foram 1,005 e 1,032 g/mL, respectivamente. Em geral, os valores de densidade dos lodos anaeróbios são próximos a 1,0 (SPEECE, 1996). Estes valores foram obtidos, uma vez que o ensaio de AME foi realizado utilizando-se volume definido de lodo. Assim, para se calcular os valores de SV em peso (g) foram necessários os valores de densidade.

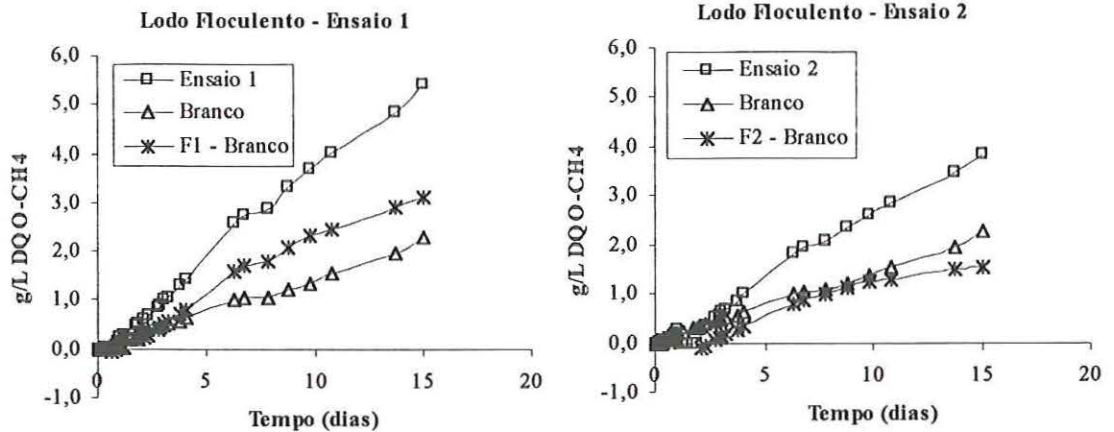


Figura 5.1. Valores da produção de metano expressos em DQO-CH₄ (g/L) para o lodo floculento.

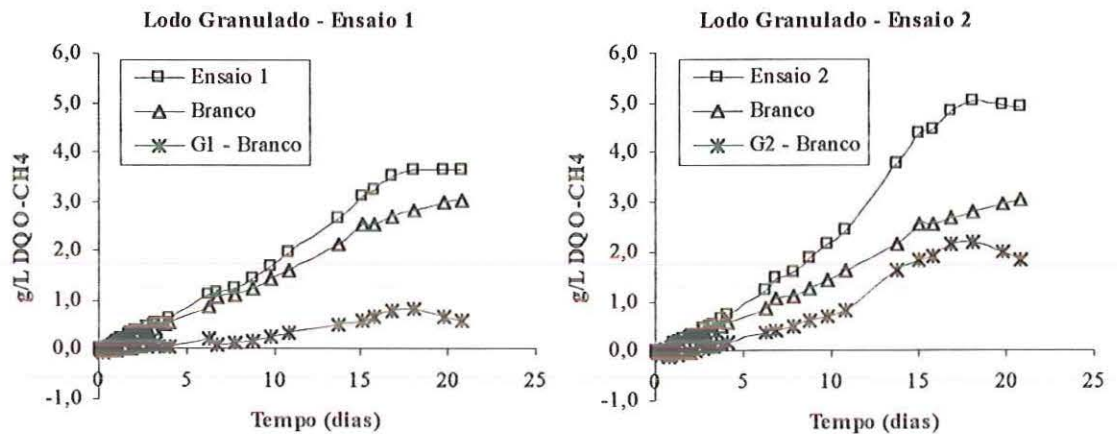


Figura 5.2. Valores da produção de metano expressos em DQO-CH₄ (g/L) para o lodo granulado.

Para o cálculo dos valores de atividade metanogênica das amostras estudadas, considerou-se a velocidade de produção de metano calculada através da regressão linear dos valores do trecho de maior inclinação das curvas de produção de metano, expressos em DQO-CH₄ (g/L). Os gráficos com as retas, equação e fator de correlação encontram-se nas Figuras 5.3 e 5.4. Os cálculos realizados para a obtenção dos valores da AME das amostras e os valores médios calculados estão na Tabela 5.2.

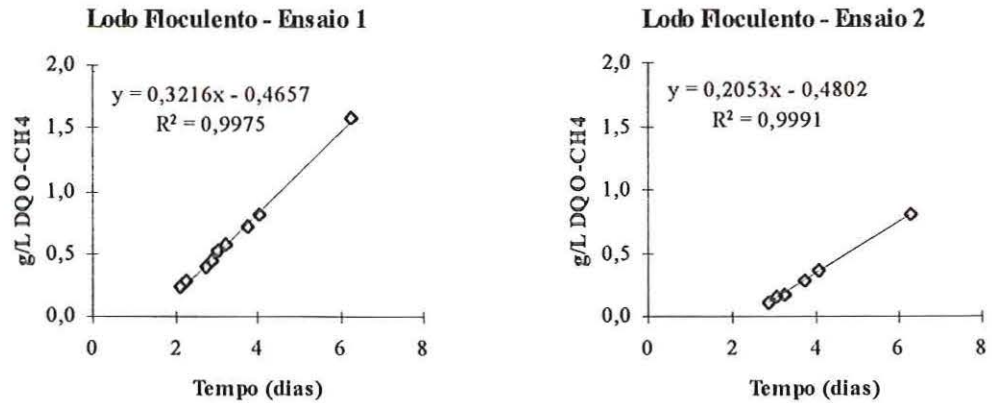


Figura 5.3. Trechos da reta de maior inclinação para o cálculo da AME, equações da reta e fatores de correlação - lodo floculento.

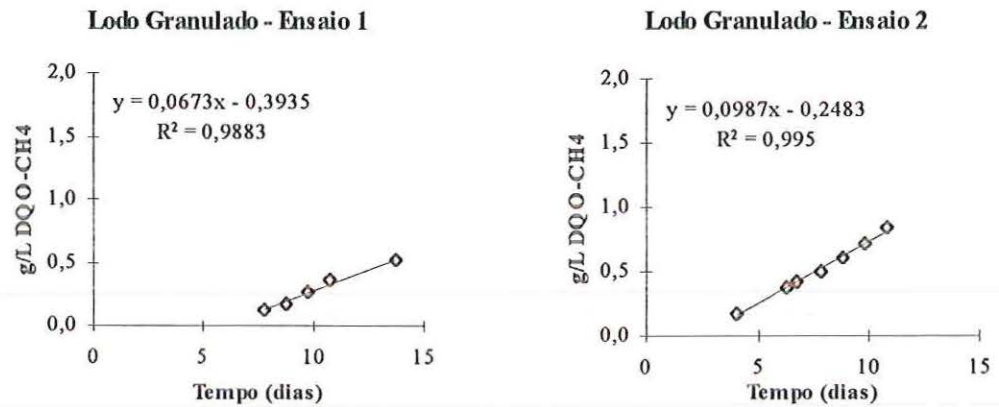


Figura 5.4. Trechos da reta de maior inclinação para o cálculo da AME, equações da reta e fatores de correlação - lodo granulado.

Tabela 5.2. Valores calculados de AME para os lodos granulado e floculento.

Tipos do Lodo	Atividade Metanogênica (g DQO-CH ₄ /L.d)	SV (g/L)	Atividade Metanogênica Específica	Atividade Metanogênica Específica Média
			(g DQO-CH ₄ /g SV.d)	(g DQO-CH ₄ /g SV.d)
Floculento 1	0,3216	5,00	0,06432	0,0527
Floculento 2	0,2053	5,00	0,04106	(±0,016)
Granulado 1	0,0673	5,00	0,01346	0,0166
Granulado 2	0,0987	5,00	0,01974	(±0,004)

Os maiores valores de AME foram determinados para o lodo floculento, como observado na Tabela 5.2. A concentração de DQO nos frascos foi de 5,0 g/L. Os valores de

DQO transformada em volume de CH_4 teoricamente produzido (g/L) foram próximos aos teoricamente calculados, de acordo com SPEECE (1996), quando considerada a AME aparente. Os valores foram 5,41 e 3,84 g/L DQO para os ensaios com o lodo floculento e 3,63 e 4,89 g/L DQO para o lodo granulado. Entretanto, quando calculada a AME real (Ensaio menos Branco) verifica-se valores abaixo dos esperados. Assim, os valores de AME real obtidos foram iguais a 3,12 e 1,55 g/L de DQO real para o lodo floculento e iguais a 0,58 e 1,84 g/L de DQO real para o lodo granulado.

Através destes valores verificou-se que apesar da AME ter sido maior para o lodo floculento, valores similares de DQO- CH_4 foram atingidos ao final dos ensaios em ambos os lodos testados. Os ensaios com o lodo granulado tiveram duração maior uma vez que os valores de DQO- CH_4 esperados demoram mais a serem atingidos.

Alguns fatores podem justificar a diferença dos valores teóricos de metano e os determinados nos ensaios, tais como: - tempo de incubação insuficiente dos ensaios; concentrações iniciais de ácidos elevadas para a quantidade de células adicionada, medida em conteúdo de SV. Mesmo levando-se em conta as indicações do teste (SOARES & HIRATA, 1997), 5 g DQO:5 g SV (1:1) que foi utilizada, pode-se discutir as condições nutricionais iniciais que as células foram submetidas. Entretanto, deve-se salientar que a técnica de avaliação da AME baseada em SOARES & HIRATA (1997) determina a medida de volume do gás metano e não do biogás total. Assim, os valores do gás produzido, expressos em volume, foram convertidos diretamente para DQO- CH_4 (g/L), após correção do volume nas CNTP.

Os resultados mostram que a AME no lodo floculento foi maior do que a verificada para o lodo granulado, apesar de maior quantidade de SV/lodo (quase 10 vezes mais), provavelmente pela menor difusão de nutrientes no grânulo. Apesar do lodo floculento possuir menor quantidade de SV/lodo sua característica proporciona contato maior entre as células e os nutrientes.

ARAUJO (1995) comentou que a AME de lodos granulados estudados ao longo do período de operação de um reator UASB, aumentou de 0,031 para 0,12 g CH_4 -DQO / g SSV. d. Pode-se verificar que a AME da amostra de lodo floculento estudada no presente trabalho foram próximas às calculadas para lodos granulados, considerando-se as diferenças entre as técnicas adotadas para a medição de AME de lodos anaeróbios. Assim, o lodo floculento utilizado na partida do sistema apresentou valor de AME considerado adequado.

5.1.3 Exames microscópicos

Foram realizados exames microscópicos dos lodos a fim de caracterizar as morfologias predominantes. Assim, predominaram em ambos os lodos, morfologias semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. Células semelhantes a sarcinas metanogênicas foram também constatadas, além de outras morfologias não fluorescentes. Foi também verificada uma grande quantidade de bacilos livres.

A Tabela 5.3 apresenta a descrição dos tipos morfológicos observados sob microscopia comum em conjunto com a análise macroscópica dos lodos. Foi assim verificada diferença na coloração dos dois tipos de lodo. O lodo floculento apresentou-se um pouco mais claro que o granuloso, caracterizado como cinza, enquanto o lodo granuloso foi bem escuro ou preto. Grânulos foram também observados no lodo floculento, porém não ultrapassaram o tamanho de 1 mm. Já, o lodo totalmente granuloso as unidades eram cerca de 3 mm em diâmetro. Apesar da análise microscópica não ter revelado uma grande diferença entre os lodos, quanto a morfologia das células presentes, escolheu-se o lodo floculento para a inoculação do reator em função dos valores de AME obtidos e por apresentar células cuja morfologia era típica de lodos anaeróbios ativos na produção de metano (SPEECE, 1996), tais como os filamentos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (antigo *Methanothrix* sp.).

Tabela 5.3 Tipos morfológicos apresentados nos lodos granuloso e floculento.

Tipo de Lodo	Características físicas	Microscopia comum
Floculento	<ul style="list-style-type: none"> - Cor cinza escuro - Poucos grânulos com no máximo 1 mm de diâmetro 	<ul style="list-style-type: none"> - Muitas fibras - Bacilos livres com movimento e sem movimento - Filamentos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp.
Granular	<ul style="list-style-type: none"> - Grânulo prende-se a agulha - Grânulos com 3 mm de diâmetro, em média 	<ul style="list-style-type: none"> - Muitas fibras - Bacilos livres com movimento e sem movimento - Filamentos semelhantes ao gênero <i>Methanosaeta</i> sp.

O reator foi inoculado com o lodo floculento numa quantidade igual a 600 mL de lodo, sendo o volume total do reator igual a 1 L. Conforme a Tabela 5.1, o valor de SV do lodo no momento da inoculação foi de 0,01110 g SV/g de lodo adicionado ao sistema. A densidade do lodo sendo aproximadamente igual a 1 g/mL, tem-se que a concentração de SV no momento da inoculação do RAH foi de 6,66 g SV/L.



5.2 Protocolo 2: Ensaios com o Reator Anaeróbio Híbrido - RAH

5.2.1 Etapa 1 - Montagem do sistema

Como já comentado no capítulo Revisão de Literatura, o Reator Anaeróbio Híbrido - RAH foi escolhido pelas vantagens adicionais ao reator do tipo UASB, baseado em CRAVEIRO (1994) e SPEECE (1996). Segundo SOARES (1998)¹, esta é uma configuração de fácil montagem e manipulação. O sistema experimental estudado foi construído de acordo com SOARES (1998)¹, junto ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como previamente indicado no capítulo Material e Métodos.

Apesar dos poucos trabalhos citados pela literatura, no que se refere ao uso do RAH para o tratamento de compostos tóxicos, procurou-se adotá-lo como forma de também contribuir com essa lacuna da engenharia dos reatores anaeróbios, em escala piloto. Como os reatores anaeróbios híbridos possuem parte de sua configuração similar ao de um reator UASB (quanto a manta de lodo e fluxo ascendente), destaca-se o fato de na terça parte superior ter-se instalado um filtro biológico preenchido com espuma de poliuretano comercial, cuja atividade microbiana ficou retida e/ou imobilizada nesse compartimento do reator.

O volume útil do RAH foi entre 1 a 1,3 L, tendo sido operado durante 753 dias, dos quais 645 dias não sofreu nenhuma adição do composto tóxico e nos 106 dias restantes operou com a adição de concentrações progressivas de PCP. O sistema foi também mantido por cerca de dois dias de operação, sem o composto tóxico, para a realização do teste de toxicidade III.

As análises realizadas com o lodo do RAH foram feitas com amostras da manta de lodo localizada na parte inferior do RAH. O filtro localizado no topo da unidade UASB foi preenchido por espuma de poliuretano de tamanho igual a 1 cm³. Para o filtro foi reservado um volume de 350 mL, perfazendo um total de 30 % do volume útil do reator, indicado por CRAVEIRO (1994) como volume apropriado. Apesar da espuma ser um material compressível, o poliuretano é indicado por ZAIAT *et al.* (1996) como suporte para formação de biofilmes em sistemas anaeróbios. A utilização do poliuretano comercial nas dimensões utilizadas no sistema RAH piloto não causou problemas de colmatação ou entupimento.

¹ SOARES, H. M. (1998). (UFSC. Depto. de Eng. Química e Eng. de Alimentos). *Comunicação pessoal*.

5.2.2 Etapa 2 - Partida e operação do RAH

Os resultados apresentados a seguir são relativos ao período de 21 meses de operação do RAH na ausência de PCP. As Figuras 5.5 a 5.14 contêm os valores organizados em gráficos dos diferentes parâmetros medidos ao longo do tempo. As tabelas com os valores referentes às figuras estão no Anexo A.

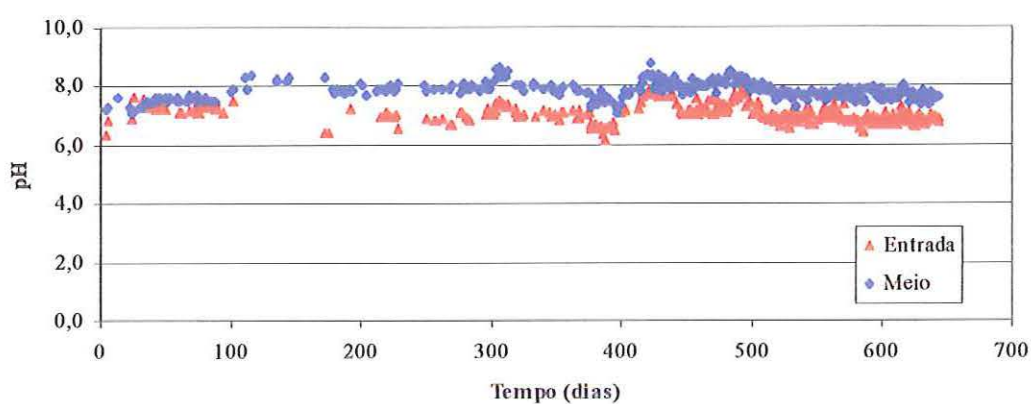


Figura 5.5. Valores de pH do RAH ao longo do período de operação.

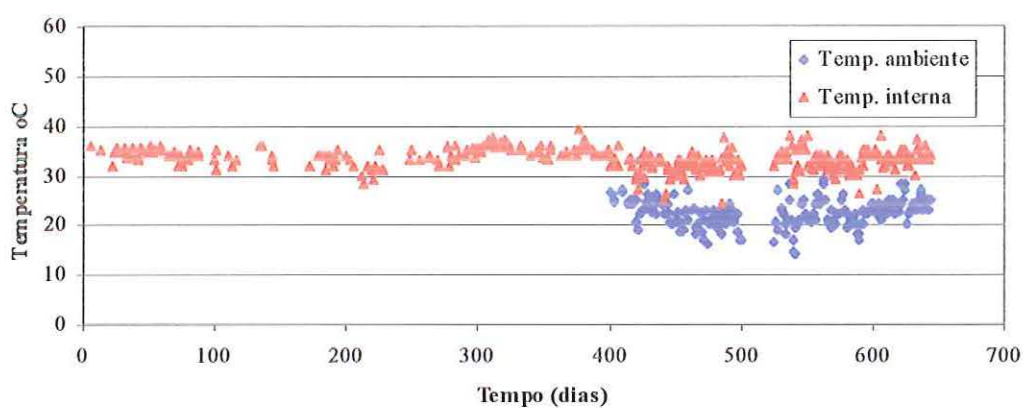


Figura 5.6. Valores da temperatura do RAH ao longo do período de operação.

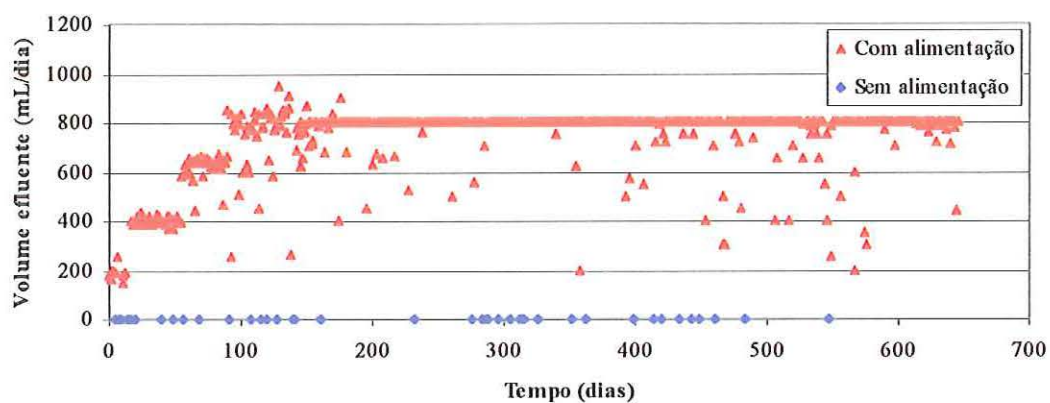


Figura 5.7. Vazão do efluente no RAH ao longo do período de operação.

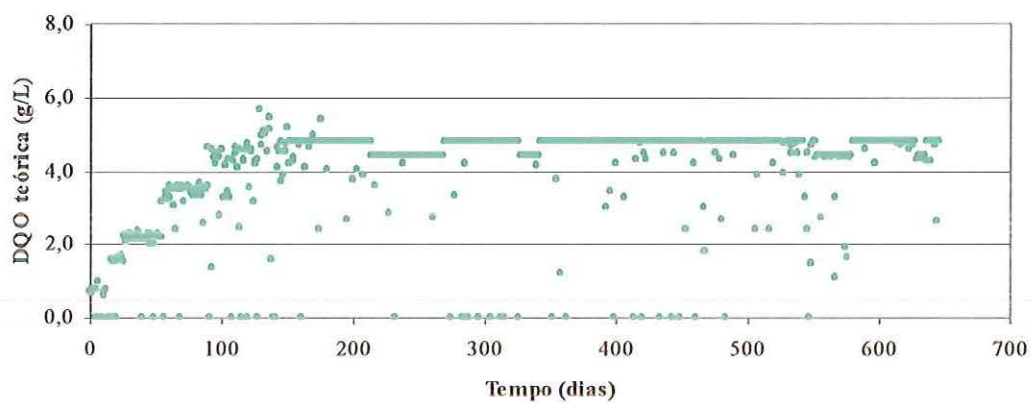


Figura 5.8. Valores de DQO teórica (g/L) adicionada ao RAH ao longo do período de operação.

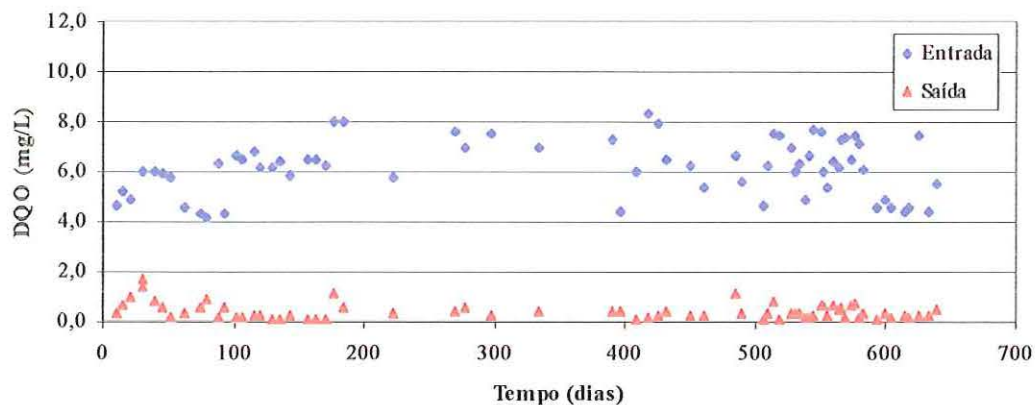


Figura 5.9. Valores de DQO do RAH ao longo do período de operação.

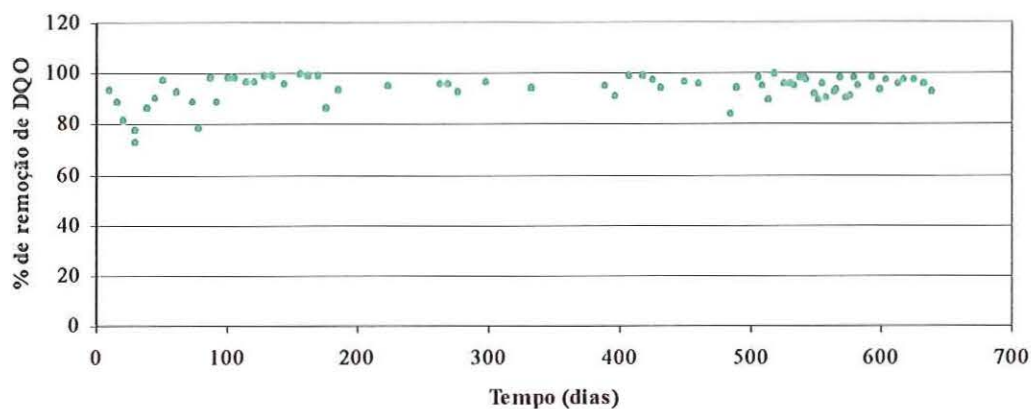


Figura 5.10. Eficiência de remoção de DQO do RAH ao longo do período de operação.

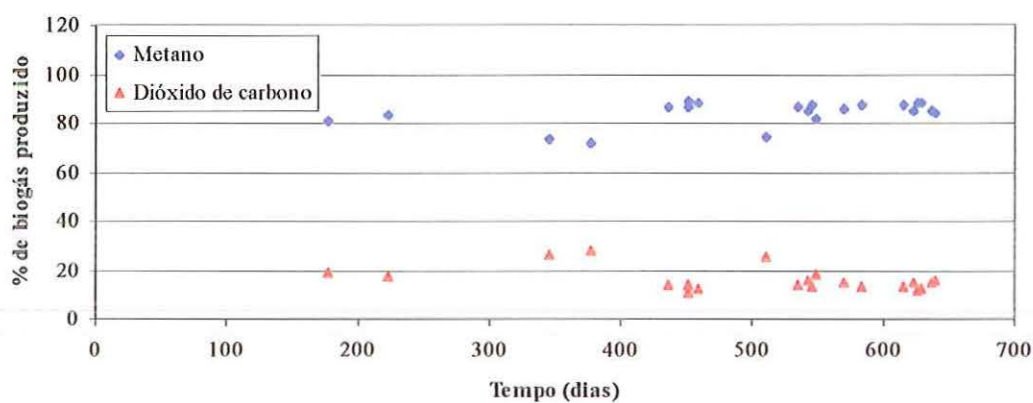


Figura 5.11. Valores da composição dos gases metano e dióxido de carbono no RAH ao longo do período de operação.

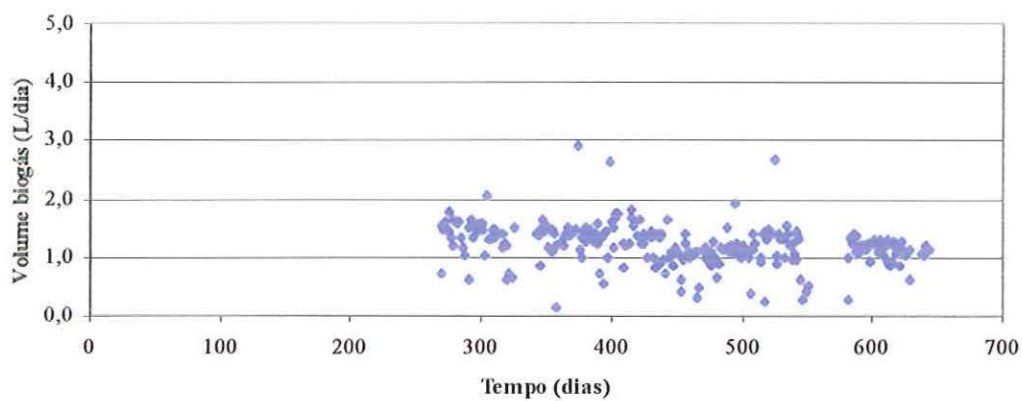


Figura 5.12. Volume do biogás no RAH ao longo do período de operação.

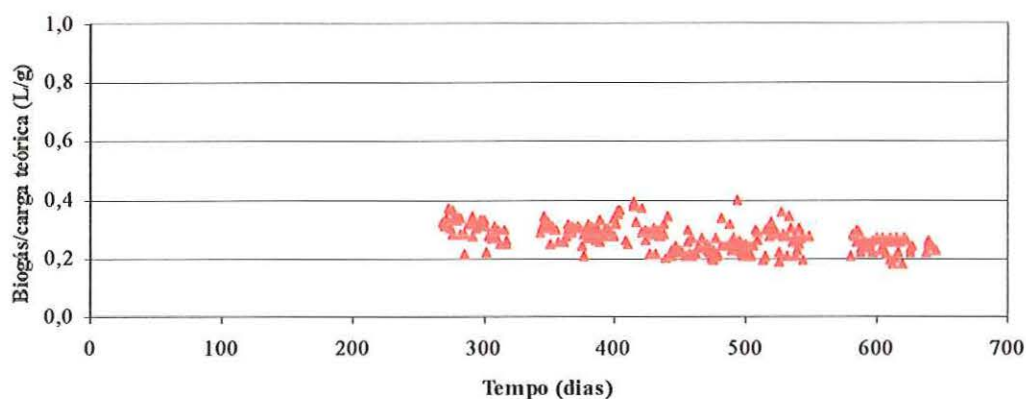


Figura 5.13. Eficiência de conversão DQO/Biogás no RAH ao longo do período de operação.

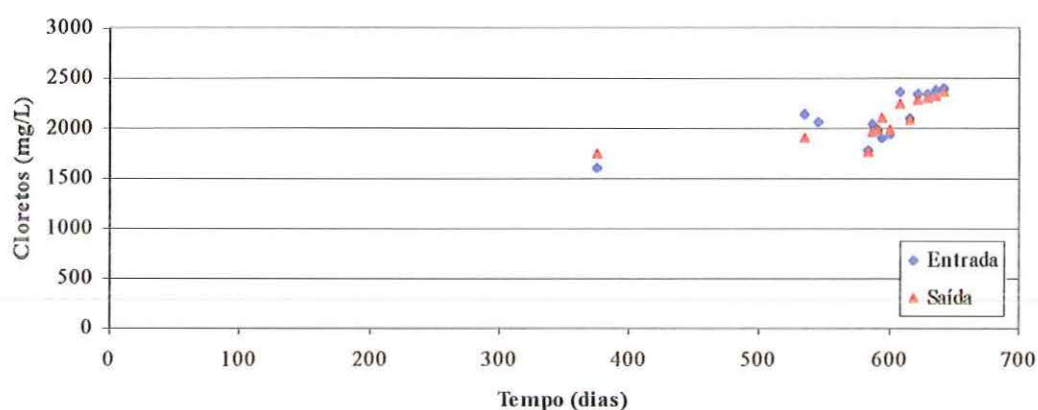


Figura 5.14. Valores de cloretos no RAH no período de operação entre 400 e 650 dias.

Conforme resultados apresentados, o reator anaeróbio híbrido foi mantido em operação estável durante 645 dias. O período de operação do RAH sem a adição do composto tóxico foi assim dividido: a) partida, no qual o reator recebeu cargas e vazão crescentes, com duração de 92 dias (Figuras 5.7 e 5.8); b) estabilização, no qual o reator recebeu a mesma carga e vazão com duração de 249 dias, sendo a principal variação nesse período a adequação do gasômetro; c) operação, no qual o reator recebeu carga e vazão constantes, com duração de 304 dias.

As Figuras 5.7 e 5.8 apresentam, respectivamente, os dados de vazão efluente e a DQO teórica durante estes períodos. O RAH atingiu valor acima de 80% de remoção de DQO ainda no início da estabilização, em torno de 100 dias de operação (Figura 5.9 e 5.10), e apresentou 90% de remoção ou mais durante a operação estável (Tabela 5.4).

Os valores de pH e temperatura mantiveram-se constantes entre 6,8 e 7,5 para o pH de saída e em torno de 7 para a entrada, e temperatura interna do RAH em torno de 35 °C (Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente). A alcalinidade do RAH foi determinada durante um curto período de operação, por 115 dias, com valores em média de 2320 mg CaCO₃ ($\pm 441,78$), na saída do efluente. Como a alimentação do RAH era preparada de forma tamponada com bicarbonato, as medidas de alcalinidade não variaram durante o período analisado e, portanto, deixaram de ser feitas. Durante o período de adição do PCP este parâmetro não foi determinado.

Tabela 5.4. Valores de eficiência média de remoção de DQO, relação média de biogás produzido por DQO adicionada e composição média de metano no biogás para os períodos de execução da etapa 2.

Períodos de execução	Tempo de duração (d)	Eficiência de remoção DQO (%)	Composição de Metano no biogás (%)	Biogás produzido por DQO adicionada (L/g)
Partida	92	86,76	-	-
Estabilização	249	95,37	82,18	0,302
Operação	304	94,49	84,26	0,264

Em relação ao biogás produzido, observaram-se pequenas variações no decorrer dos 645 dias de operação sem o PCP, como atestado na Figura 5.12, cuja média na produção de biogás foi da ordem de 1,22 L/dia. Entretanto, quando calculada a eficiência de conversão DQO/biogás, os valores encontrados foram mais constantes, em torno de 0,27 L/g DQO adicionada, como verificado na Figura 5.13 e Tabela 5.4.

A composição de metano no biogás na etapa 2 de operação do reator não sofreu grandes variações, ver Figura 5.11, mantendo-se em níveis superiores a 70%, com 84% em média de metano. Os valores médios dos períodos de estabilização e operação propriamente dita da etapa 2, encontram-se na Tabela 5.4. Estes valores são típicos de processos anaeróbios estáveis.

O reator foi inoculado com lodo cuja AME média foi de 0,0527 g DQO-CH₄/g SV.d, apresentando morfologias típicas de lodos anaeróbios, como anteriormente comentado no item 5.1. Os grânulos do lodo floculento possuíram um tamanho máximo de 1 mm de diâmetro e o total de SV na partida do reator foi de 6,7 g SV/L. Durante os 21 meses de operação na ausência de PCP constataram-se algumas modificações no lodo, destacando-se o tamanho dos grânulos, a coloração do mesmo, o conteúdo de SV e a população microbiana.

Durante a etapa 2 de operação do RAH, grânulos foram sendo formados com maior intensidade, bem como seu tamanho aumentou e sua coloração alterou-se. A característica mais visível foi à mudança de cor; grânulos claros e escuros com tamanhos e textura diferentes foram observados. Os grânulos claros eram normalmente maiores e rugosos, chegando a 4 mm de diâmetro. Os grânulos escuros eram menores, de 2,5 a 3 mm de diâmetro, e aparentemente lisos. Os grânulos escuros eram facilmente macerados, enquanto os claros eram mais duros.

5.2.3 Etapa 3 - Adição de PCP no Reator Anaeróbio Híbrido

Os resultados apresentados a seguir são relativos ao período de operação do RAH na presença de PCP. As Figuras 5.15 a 5.24 contém os valores organizados em gráficos dos diferentes parâmetros medidos ao longo do tempo. As tabelas com os valores referentes às figuras estão no Anexo A.

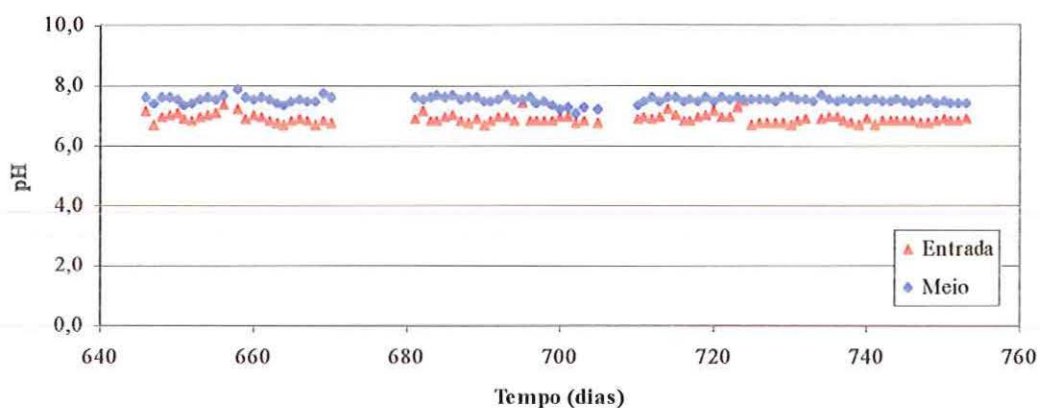


Figura 5.15. Valores de pH no RAH durante adição do composto PCP.

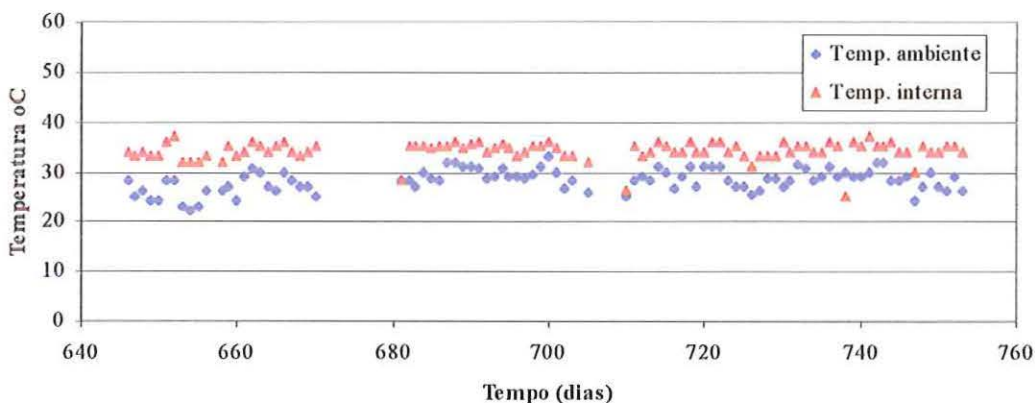


Figura 5.16. Valores da temperatura do RAH durante adição do composto PCP.

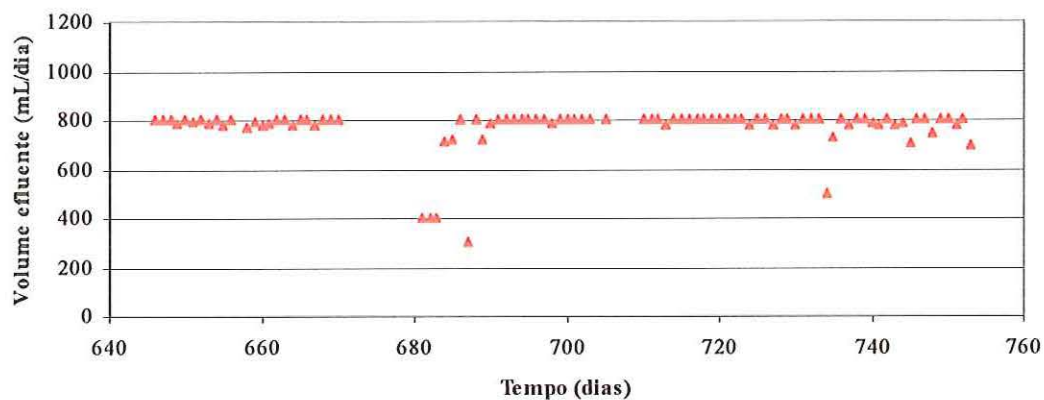


Figura 5.17. Valores da vazão efluente no RAH durante adição do composto PCP.

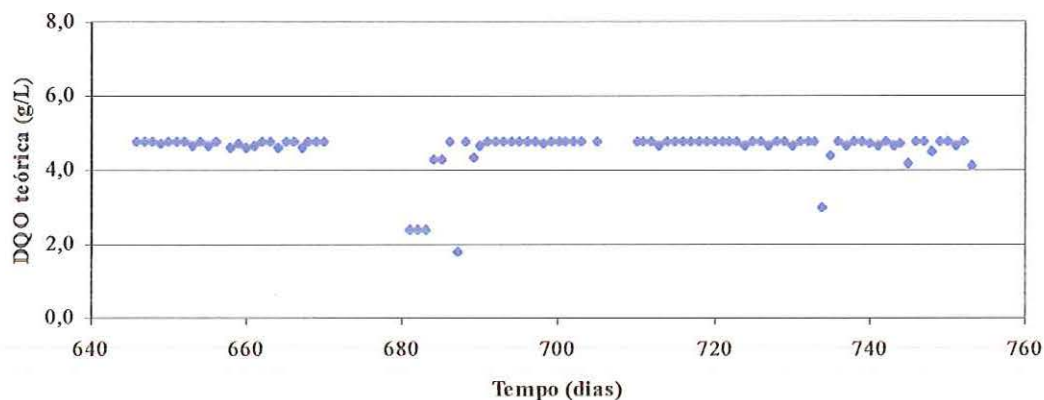


Figura 5.18. Valores de DQO teórica (g/L) adicionada ao RAH durante adição do composto PCP.

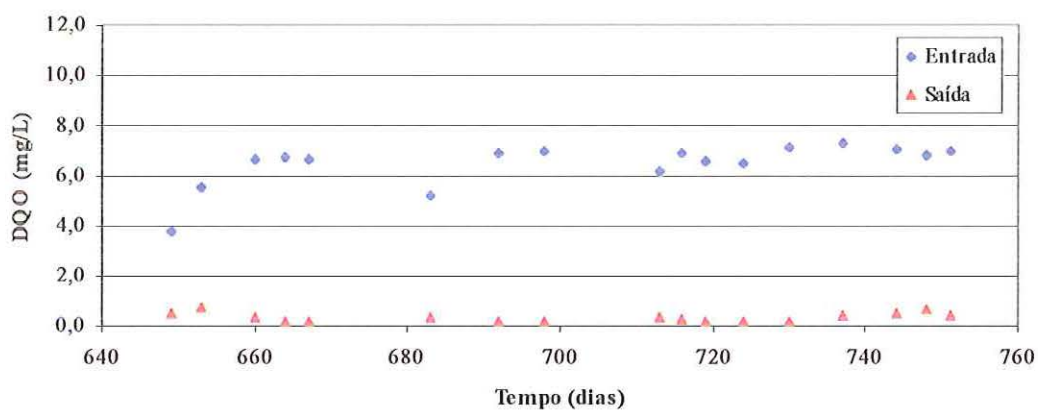


Figura 5.19. Valores de DQO no RAH durante adição do composto PCP.

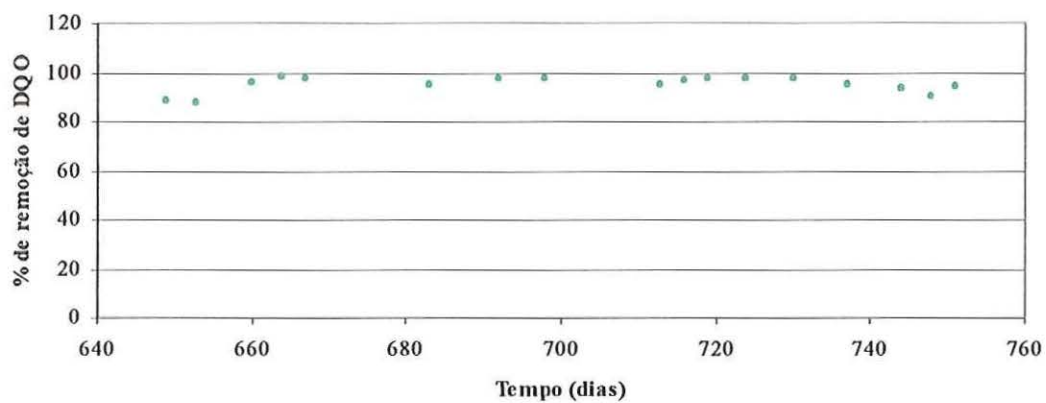


Figura 5.20. Porcentagem de remoção de DQO do RAH durante adição do composto PCP.

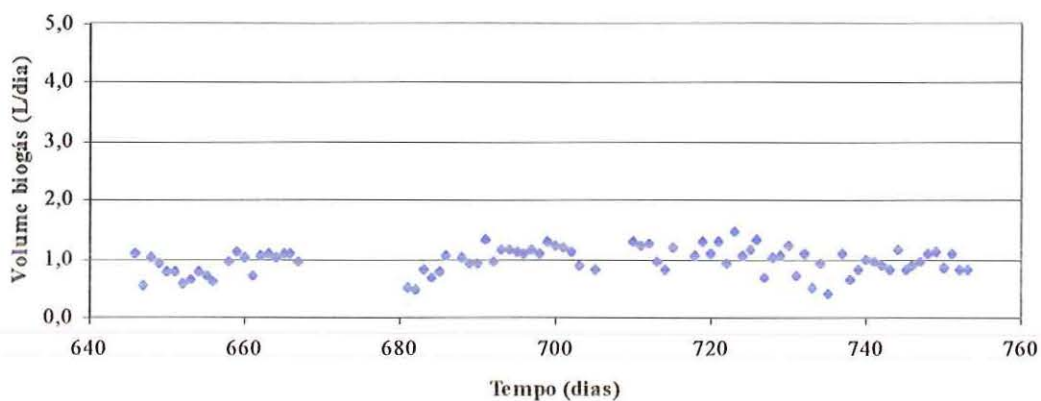


Figura 5.21. Valores do volume do biogás produzido no RAH durante adição do composto PCP.

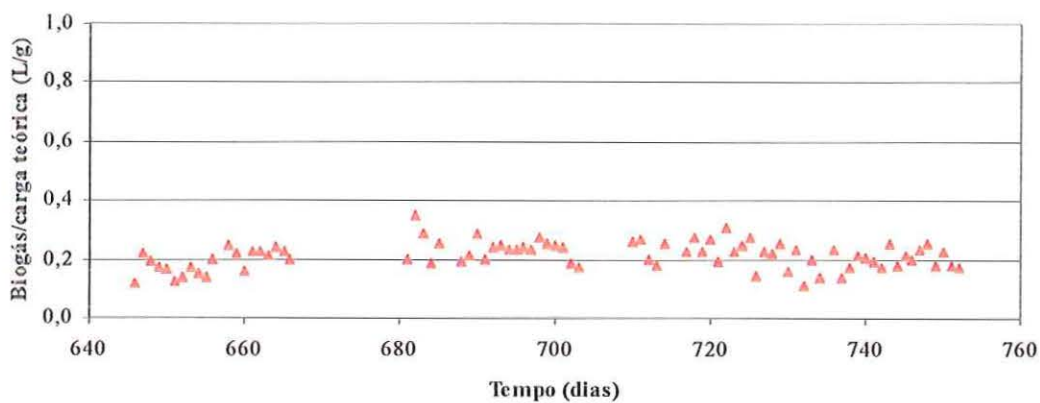


Figura 5.22. Valores de eficiência de conversão DQO/Biogás no RAH durante adição do composto PCP.

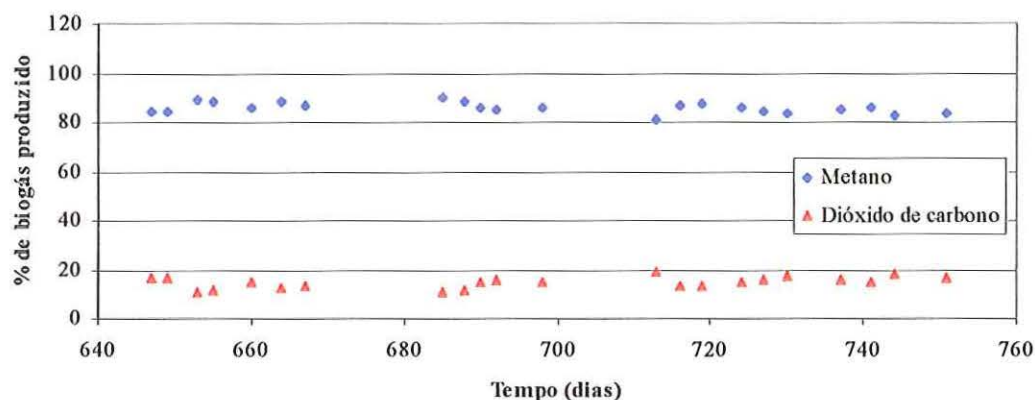


Figura 5.23. Valores da composição de gases: metano e dióxido de carbono no RAH durante adição do composto PCP.

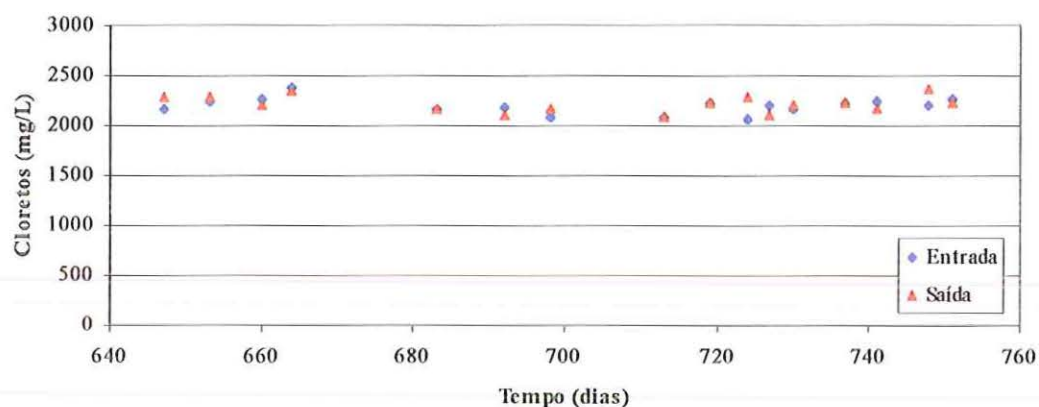


Figura 5.24. Valores de cloretos no RAH durante adição do composto PCP.

Após 21 meses de operação sob condições estáveis de remoção da matéria orgânica, como comentado anteriormente, o RAH passou a receber o PCP em concentrações progressivas de 2, 4, 6, 8, 10, 12,8, 15,6 e 21 mg/L, por 106 dias com durações distintas por fase, apresentadas na Tabela 5.5. Os testes de toxicidade realizados antes da adição de PCP ao RAH tiveram como objetivo determinar a concentração inicial de PCP a ser aplicada no RAH, bem como o potencial de inibição do lodo, a este composto tóxico. Foram encontrados valores de IC_{50} na ordem de 10,12 mg/L e 13,69 mg/L de PCP nos testes de **toxicidade I e II**, respectivamente. Foi verificado também, a partir destes testes, que os valores de concentração de PCP não inibitórios ao processo anaeróbico deveriam estar na faixa de 2 a 4 mg/L de PCP. A discussão dos testes de toxicidade será feita em detalhes no item 5.3 deste capítulo. Um terceiro teste foi também realizado ao final da operação do reator, também discutido à frente.

Tabela 5.5. Valores de eficiência média de remoção de DQO, relação média de biogás produzido por DQO adicionada e composição média de metano no biogás para os períodos de execução da etapa3.

Concentração PCP (mg/L)	Períodos de execução de cada etapa (d)	Eficiência de remoção DQO (%)	Composição de Metano no biogás (%)	Biogás produzido por DQO adicionada (L/g)
2,0	4	88,1	84,0	0,172
4,0	11	91,6	87,6	0,169
6,0	35	96,7	87,2	0,249
8,0	19	96,1	83,4	0,229
10,0	7	96,8	87,1	0,236
12,8	10	97,4	84,2	0,227
15,6	10	94,3	85,0	0,176
21,0	10	92,4	82,8	0,207

Conforme os resultados obtidos, as adições progressivas de PCP entre 2,0 e 21,0 mg/L não afetaram drasticamente a performance total do reator, como verificado nas Figuras 5.15 a 5.24 e Tabela 5.5., considerando-se inclusive que a concentração real do PCP no sistema era a metade do valor adicionado, uma vez que o sistema era operado com recirculação na proporção de 1:1. O pH e a temperatura avaliados durante o período de adição de PCP foram estáveis, como atestado pelos resultados apresentados nas Figuras 5.15 e 5.16, respectivamente.

A vazão efluente e a DQO teórica mantiveram-se constantes mesmo com a adição do PCP que, como já apresentado no capítulo Material e Métodos, não aumentou o valor da DQO adicionada ao RAH. Somente por um curto período de tempo (5 dias) ocorreu uma modificação da vazão e, portanto, da carga aplicada, em função do sistema ter permanecido inoperante. Tais dados podem ser observados nas Figuras 5.17 e 5.18. Entretanto, este período não afetou a performance do reator segundo os parâmetros analisados, como a remoção de DQO (Figura 5.20) e de ácidos voláteis (Figura 5.28 adiante).

Por outro lado, a performance do RAH foi levemente afetada principalmente no início da adição de PCP entre 2 e 4 mg/L, provável período de adaptação, e após a adição de 15,6 mg/L de PCP.

A Tabela 5.5 mostra que a eficiência da remoção de DQO e a composição média de metano (%) no biogás foram bastante semelhantes. O sistema após a primeira adição de PCP

igual a 2,0 mg/L sofreu ligeira queda na eficiência de remoção de DQO, considerando o intervalo de tempo igual a 8 dias, e recuperou-se até atingir eficiência igual ou um pouco superior à da etapa anterior a adição do PCP na concentração de 4 mg/L de PCP (Figuras 5.19 e 5.20). Entretanto, à concentração igual ou superior a 15,6 mg/L de PCP a remoção de DQO novamente diminuiu, porém sem alterações significativas. Não foram observadas reduções acentuadas na composição do metano (Figura 5.23 e Tabela 5.5).

Os valores obtidos do volume de biogás variaram de acordo com a DQO aplicada e com os períodos de adaptação e resposta do sistema. Entretanto, o fator de conversão DQO/biogás pode ser um parâmetro mais adequado para a avaliação da presença do PCP no RAH. Os valores de produção de biogás encontram-se na Figura 5.21. O fator de conversão de biogás no reator anterior a adição do PCP, na faixa de 0,27 L de biogás /g de DQO adicionada, apresentou uma queda atingindo 0,17 L/g quando da alimentação de 2 e 4 mg/L de PCP (Figura 5.22 e Tabela 5.5). No entanto, após 12 dias, o fator de conversão aumentou a um valor médio de 0,23 L/g, ainda na presença de 4 mg/L de PCP. Apesar deste valor ter sido mantido durante as outras fases de adição do PCP, não chegou ao patamar de 0,27 L de biogás /g de DQO adicionada verificado na fase anterior à aplicação de PCP. Foi observada outra redução no fator de conversão quando a concentração de 15,6 mg/L de PCP foi aplicada ao sistema (Figura 5.21 e 5.22 e Tabela 5.5).

A concentração de cloretos na saída do RAH não variou durante o período de adição de PCP, como pode ser verificado na Figura 5.24. Isso indica que mesmo com a remoção de PCP apresentada (Figura 5.29), a concentração de cloretos não aumentou, e também não houve variações dos valores encontrados entre a entrada e saída do RAH, uma vez que a concentração de cloretos na quantidade de PCP adicionada ao sistema era muito pequena, quando comparado as valores de cloretos no efluente.

5.2.4 Resultados de determinações realizadas nas etapas 1 e 2 do protocolo 2, apresentados em conjunto

5.2.4.1 Ácidos orgânicos e compostos orgânicos clorados

Os resultados apresentados a seguir são relativos ao período total de operação do RAH. A Figura 5.25 a 5.28 contém os valores organizados em gráficos dos ácidos orgânicos voláteis ao longo do tempo. A Figura 5.29 mostra a evolução do composto PCP ao longo do tempo no reator, nas diferentes concentrações adicionadas. As tabelas com os valores referentes às figuras 5.25 a 5.28 estão no Anexo G e os referentes à Figura 5.29, em Anexo H.

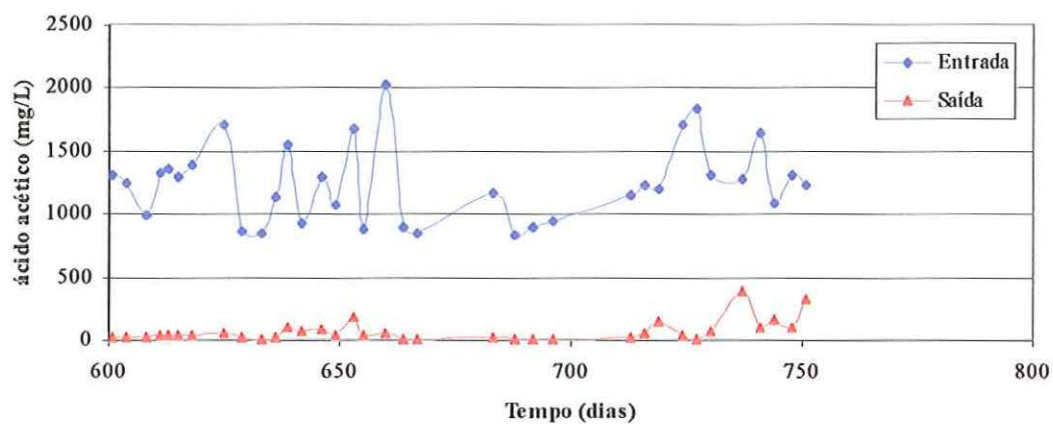


Figura 5.25. Valores do ácido acético no RAH antes e após a adição do composto PCP.

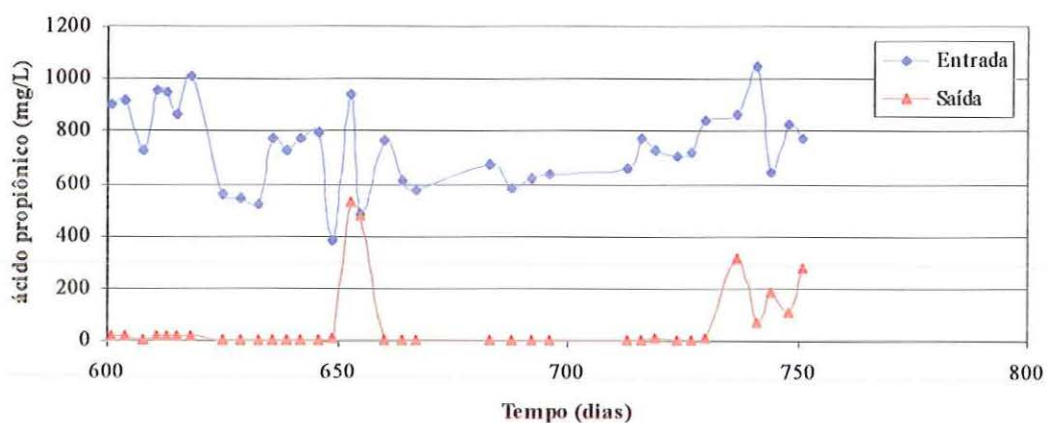


Figura 5.26. Valores do ácido propiônico no RAH antes e após a adição do composto PCP.

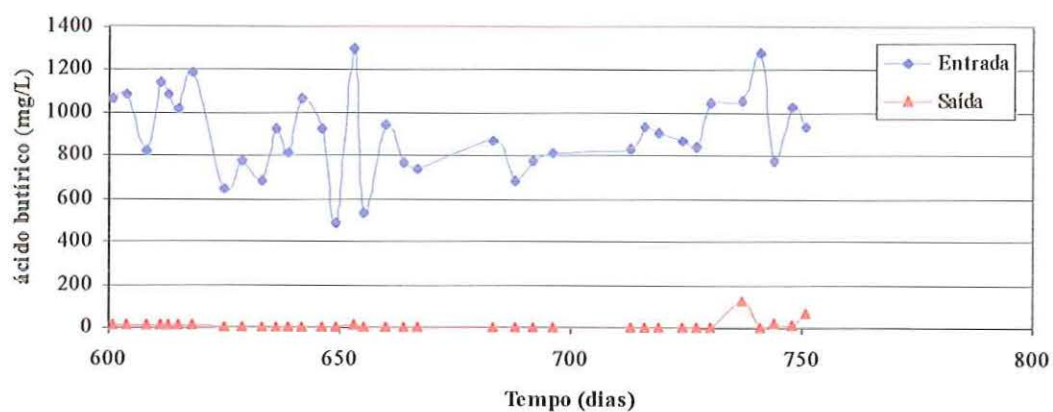


Figura 5.27. Valores do ácido butírico no RAH antes e após a adição do composto PCP

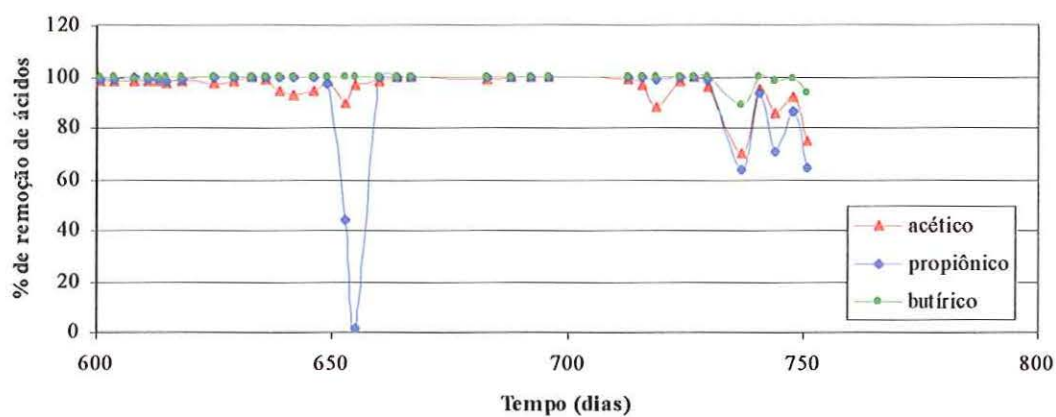


Figura 5.28. Porcentagem de remoção dos ácidos voláteis no RAH antes e após a adição do composto PCP.

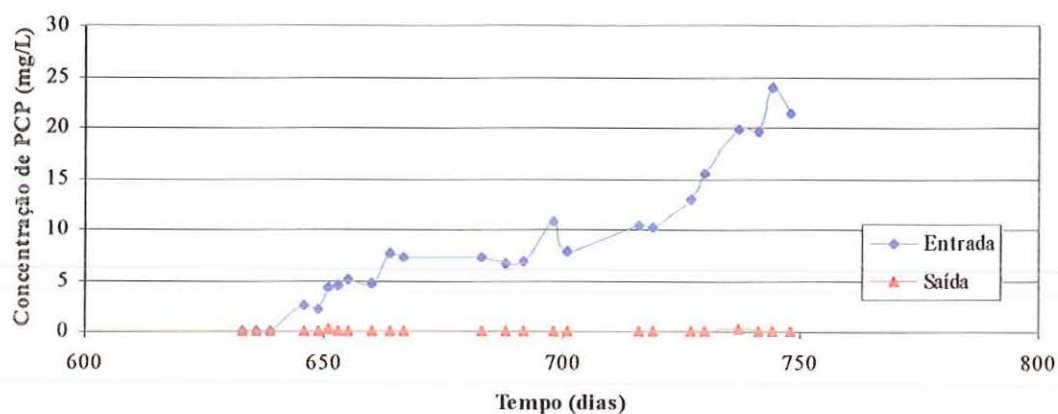


Figura 5.29. Valores de PCP no RAH.

5.2.4.2 Resultados de sólidos voláteis - SV

A Tabela 5.6 apresenta os valores de SV determinados ao longo do período de operação do RAH. O conteúdo de SV no reator variou entre 0,025 e 0,034 g SV/g lodo, nas etapas 2 e 3. O valor de SV na inoculação do RAH era de 0,011 g SV/g lodo, e após 277 dias, no período de estabilização, o valor atingiu 0,032 g SV/g lodo (Tabela 5.6). O reator sofreu aumento do conteúdo de SV em relação ao inicial, que também foi devido a adição de 80 mL de lodo antes de 150 dias de operação (Anexo A).

Tabela 5.6. Valores de SV durante o período de operação do RAH

Dias de operação	Lodo (g)	SV (g)	SV/lodo (g/g) ²	Média SV/lodo (g/g) ²	Desvio Padrão
277 ¹	5,7359 13,367	0,1925 0,4032	0,03356 0,03016	0,03186	±0,0024
353	8,0198 13,8539	0,1652 0,3956	0,02060 0,02856	0,02458	±0,0056
450 ¹	5,0151 5,1217	0,1505 0,1332	0,03001 0,02601	0,02801	±0,0028
527	9,2965 7,2617 4,9036	0,2913 0,2045 0,1416	0,03133 0,02816 0,02888	0,02946	±0,0017
541	1,53073 2,7416 3,6338	0,0348 0,0824 0,1034	0,02273 0,03006 0,02846	0,02708	±0,0039
569	11,8177 10,8720	0,3360 0,3456	0,02843 0,03179	0,03011	±0,0024
625	6,6277 8,5169 7,6003	0,1401 0,2690 0,2156	0,02114 0,03158 0,02837	0,02703	±0,0054
753 ¹ (21,0 mg/L de PCP)	12,1864 4,5079 3,0819 5,6862	0,3996 0,1528 0,1081 0,1920	0,03279 0,03390 0,03508 0,03377	0,03388	±0,0009

¹ - Valores de SV dos lodos empregados nos Ensaios de Toxicidade apresentados no item 5.3.

² - Os valores de SV foram determinados em relação ao peso úmido do lodo

5.2.4.3 Avaliação microscópica e quantitativa do lodo do RAH

As Figuras 5.30 e 5.31 organizam os valores do número de células anaeróbias avaliadas quantitativamente de acordo com a fonte orgânica introduzida no meio de cultivo. As *Archaea* metanogênicas foram avaliados pela presença de metano no meio de cultivo e as bactérias redutoras de sulfato na presença de sulfeto, para cada fonte orgânica testada. Para a quinta contagem celular (752 dias), ao final da operação do RAH, foram realizadas observações microscópicas, indicadas nas Figuras 5.32 e 5.33, das amostras cultivadas em metanol e lactato mais sulfato. Os resultados obtidos serão discutidos no item 5.2.5.

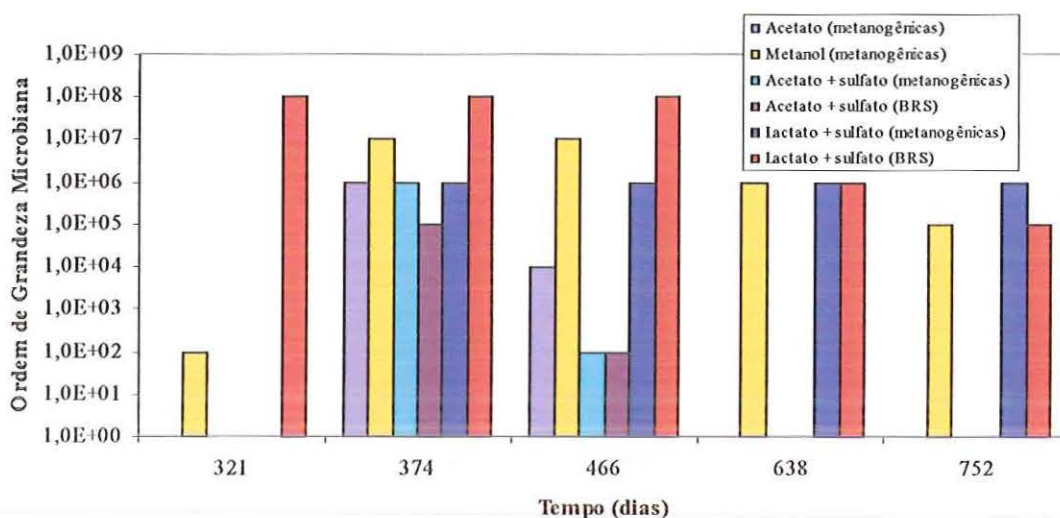


Figura 5.30. Valores de Ordem de Grandeza Microbiana, células anaeróbias por mL de lodo no RAH.

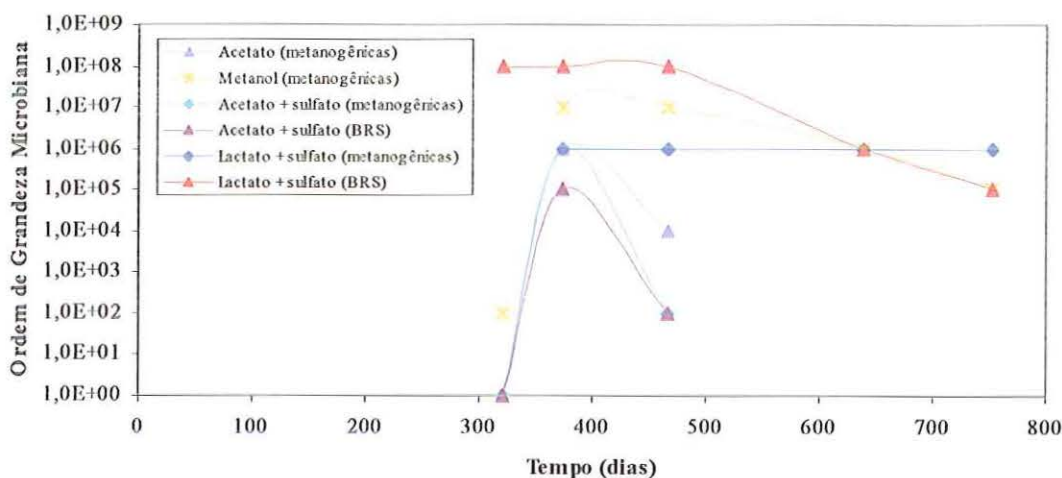
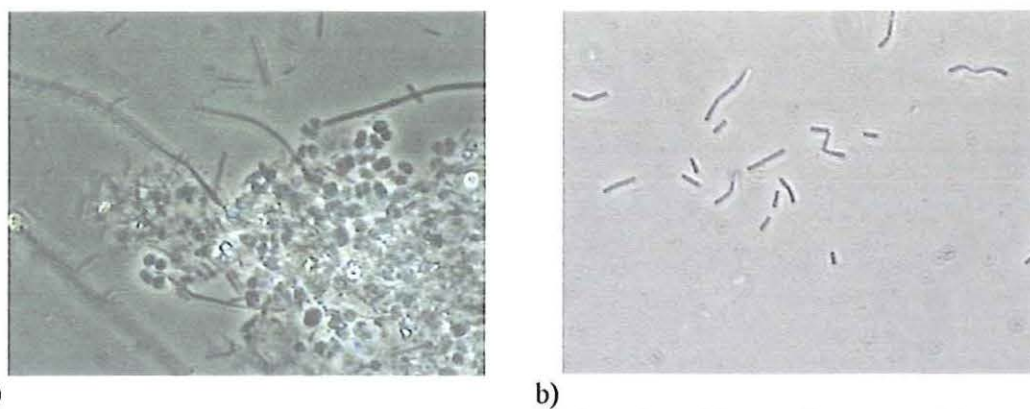
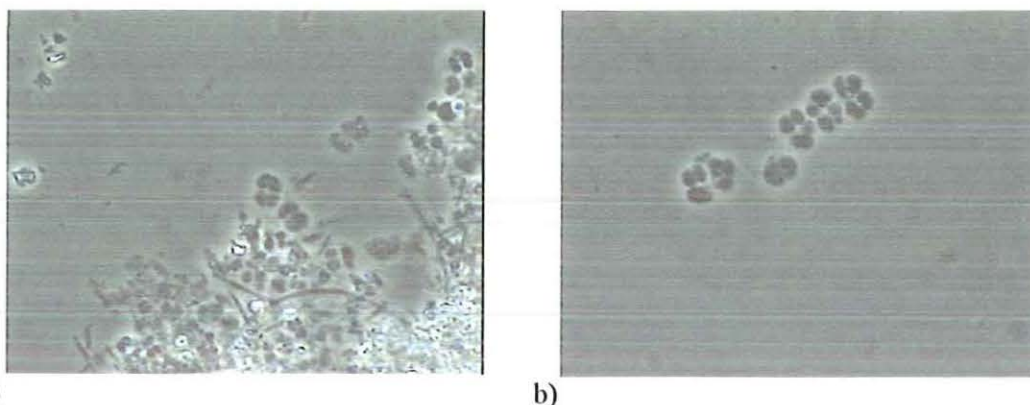


Figura 5.31. Valores de Ordem de Grandeza Microbiana de células anaeróbias por mL de lodo em relação ao tempo de operação do RAH.



a) b)
Figura 5.32. Fotografias das observações microscópicas do cultivo em lactato e sulfato para determinação da Ordem de Grandeza Microbiana ao final da operação do reator (752 dias), nas diluições (a) 10^{-2} e (b) 10^{-5} . (aumento 1000 x)



a) b)
Figura 5.33. Fotografias das observações microscópicas do cultivo para determinação da Ordem de Grandeza Microbiana ao final da operação do reator (752 dias), em metanol nas diluições (a) 10^{-2} e (b) 10^{-3} . (aumento 1000 x)

A Tabela 5.7 apresenta os resultados obtidos com a aplicação da técnica molecular FISH para avaliação dos grupos microbianos predominantes no lodo do RAH. Os exames microscópicos dos lodos no sistema são apresentados nas Figuras 5.34 a 5.45. Os resultados serão discutidos em conjunto no item 5.2.5.

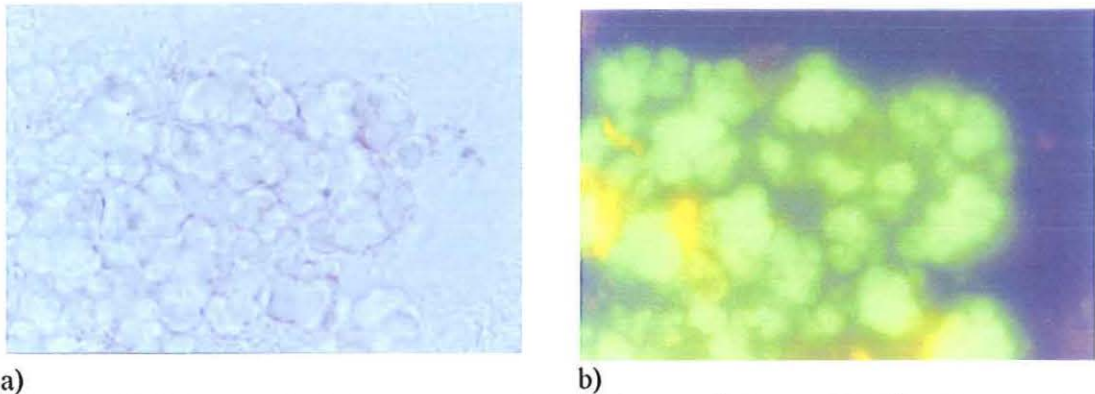
Tabela 5.7. Caracterização de grupos microbianos pertencentes ao Domínio *Archaea* e presença de BRS através da técnica de hibridação *in situ* - FISH.

Conc. de PCP no lodo do RAH (mg/L)	Sonda ARC915 (%)	Sonda EUB338 (%)	Sonda MSMX860 (%)	Sonda MSMX860 ¹ (%)	Sonda MSMX860 ² (%)	SRB385 (%)
0,0	86,7 (±6,4)	0,3 (±0,1)	61,8 (±6,4)	31,7 (±3,0)	16,6 (±4,8)	ND
12,8	91,6 (±4,5)	0,6 (±0,2)	93,0 (±3,9)	79,7 (±8,9)	8,6 (±3,3)	ND
15,6	86,7 (±2,8)	0,4 (±0,2)	89,8 (±7,5)	61,3 (±8,8)	18,4 (±5,3)	ND
21,0	89,9 (±8,2)	0,1 (±0)	86,1 (±2,5)	78,6 (±6,1)	2,1 (±1,4)	ND

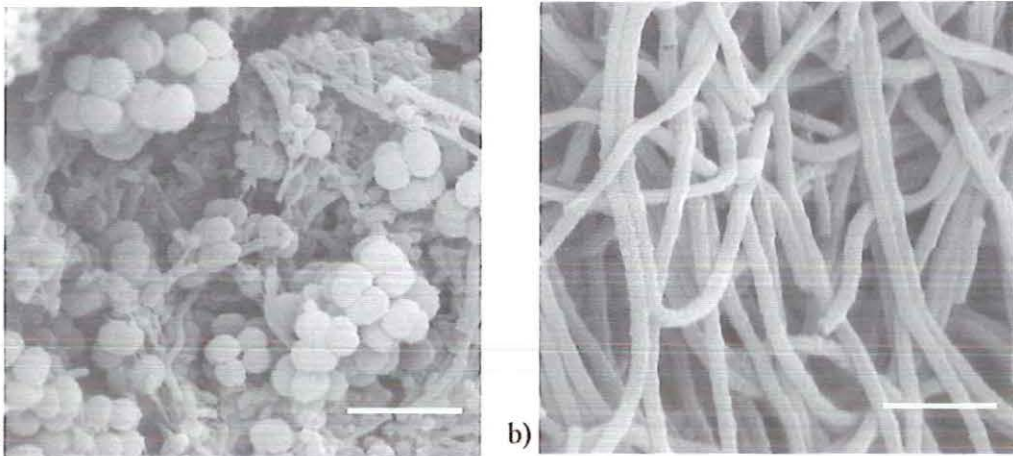
ND: não detectado; ¹Células detectadas com MSMX860 e com morfologia de *Methanosaeta* sp.; ²Células detectadas com MSMX860 e com morfologia de *Methanosarcina* sp.; ³Células de Bactérias Redutoras de Sulfato.

As sondas ARC915 e EUB338 indicam a presença de, respectivamente, *Archaea* metanogênicas e bactérias em geral. A sonda MSMX860 indica a Família *Methanosarcinaceae*, importante grupo nos biorreatores anaeróbios, que reúne os gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. A sonda SRB385 é utilizada para identificar as bactérias redutoras do íon sulfato e específica para as células gram-negativas pertencentes ao grupo delta Proteobacteria. Essa última sonda tem sido bastante discutida quanto a sua qualidade para identificar com certeza as BRS em lodos anaeróbios, principalmente porque esta sonda não é específica (seqüência de nucleotídeos não complementar) para o gênero *Desulfotomaculum*, que inclui organismos redutores de sulfato gram-positivos (ARAUJO *et al.*, 2000).

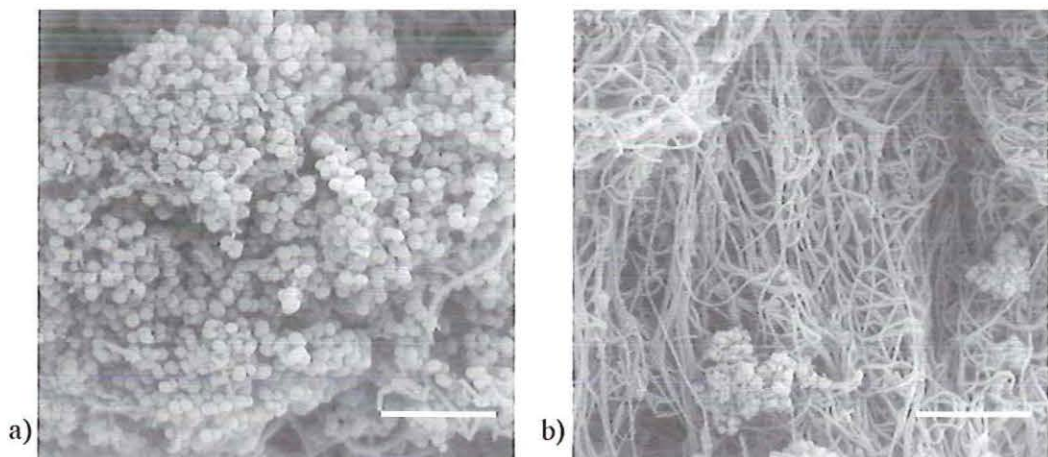
No presente estudo, por exemplo, a sonda SRB385 hibridou com todas as células presentes, inclusive com aquelas cuja morfologia era caracteristicamente pertencente ao Domínio *Archaea*, dificultando a avaliação do grupo BRS pela ocorrência de hibridação inespecífica. Porém, ao considerar-se as morfologias observadas sob microscopia, como células em forma de víbrios, e que hibridaram com a sonda SRB385, pode-se assumir que células pertencentes ao Domínio *Bacteria* e redutoras de sulfato estavam presentes no lodo. De qualquer forma, os microrganismos que hibridaram com a sonda EUB338 foram muito poucos, porém podem ter sido organismos tanto acidogênicos como BRS gram-positivos, ambos considerados neste trabalho.



a)
 b)
 Figura 5.34. Microscopia de luz comum (a) do lodo do RAH com 200 dias de operação. Microorganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp. (aumento 1000 x). (b) O mesmo campo em microscopia de fluorescência.



a) b)
 Figura 5.35. Microscopia de Varredura do lodo com 571 dias de operação, antes da adição do PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp. grânulo claro; (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. grânulo escuro. (Barra: 4µm)



a) b)
 Figura 5.36. Microscopia de Varredura do lodo com 571 dias de operação, antes da adição do PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp. (Barra: 10µm); (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (Barra: 20µm). Grânulos escuros.

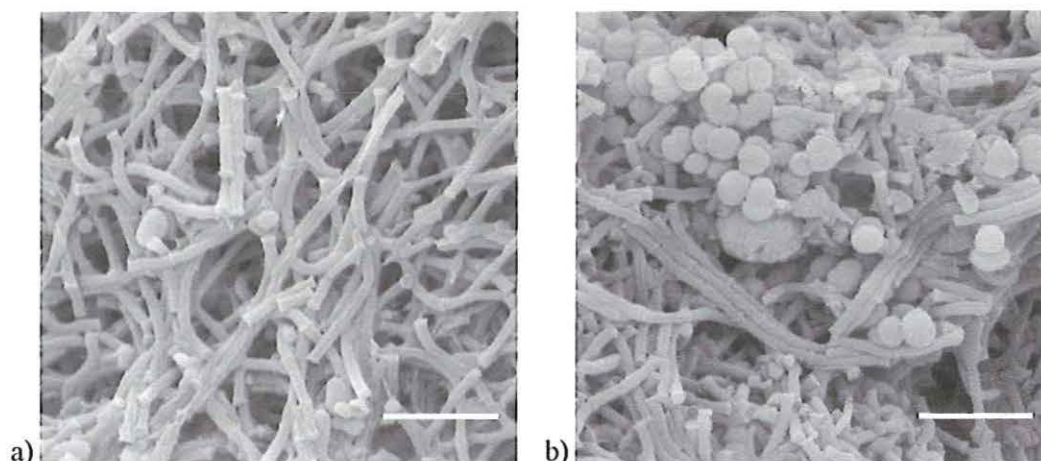


Figura 5.37. Microscopia de Varredura do lodo com 585 dias de operação, antes da adição do PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp.; (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp. Ambos grânulos branco. (Barra: 4 μ m)

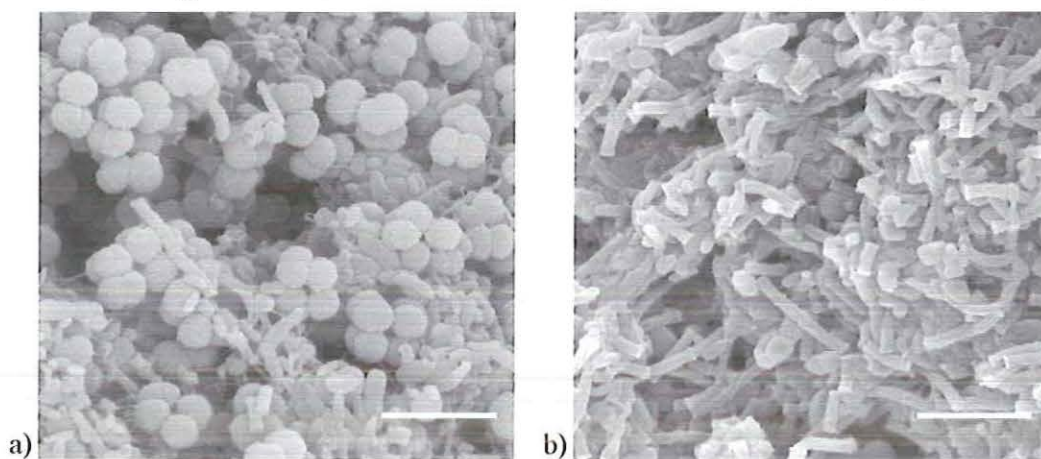


Figura 5.38. Microscopia de Varredura do lodo com 585 dias de operação, antes da adição do PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp.; (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (Barra: 4 μ m)

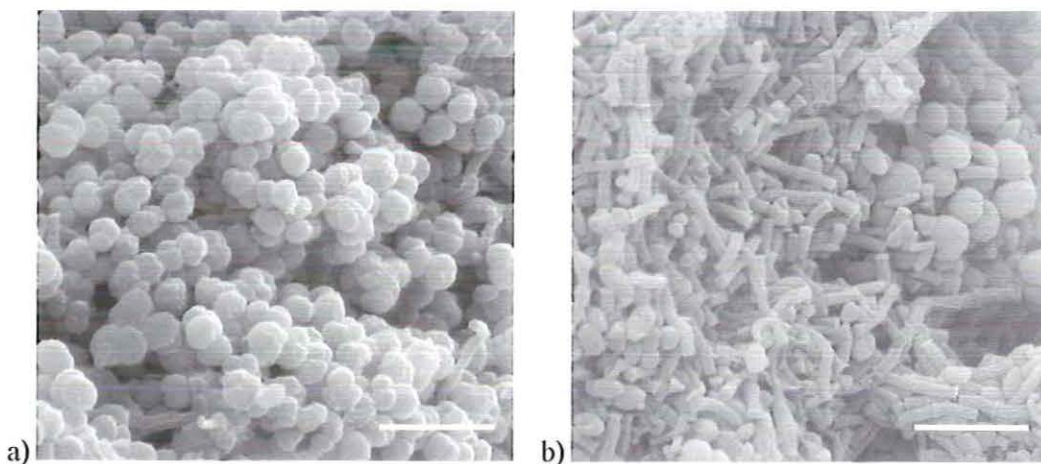


Figura 5.39. Microscopia de Varredura do lodo com 646 dias de operação, com adição de 2 mg/L de PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp., grânulo escuro; (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp., grânulo claro. (Barra: 4 μ m)

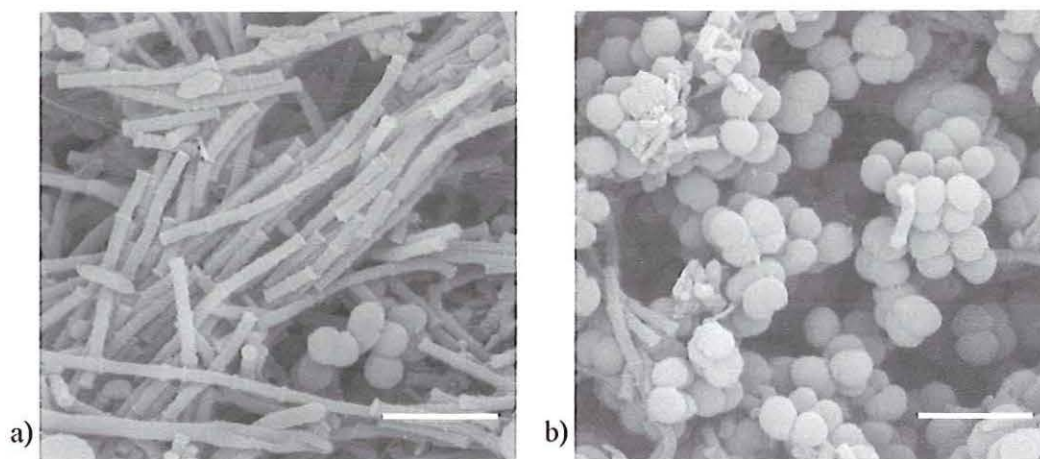


Figura 5.40. Microscopia de Varredura do lodo com 714 dias de operação, com adição de **8 mg/L de PCP**. (a) predominio de microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp., grânulo claro; (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., grânulo escuro. (Barra: 4µm)

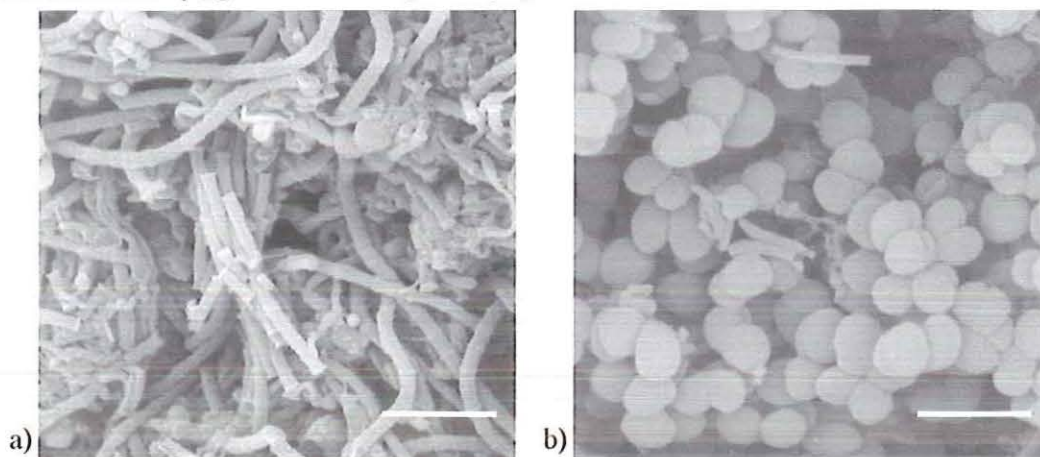


Figura 5.41. Microscopia de Varredura do lodo com 721 dias de operação, com adição de **10 mg/L de PCP**. (a) predominio de microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp. Grânulos claros. (Barra: 4µm)

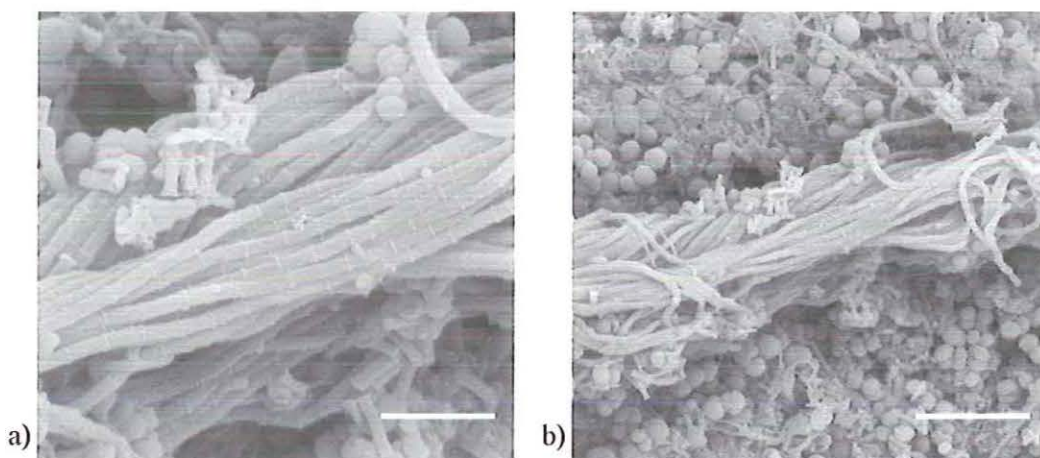


Figura 5.42. Microscopia de Varredura do lodo com 730 dias de operação, com adição de **12,8 mg/L de PCP**. (a) feixe de microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. e presença de microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp., grânulo claro (Barra: 4µm); (b) mesmo feixe em outro aumento (Barra: 10µm).

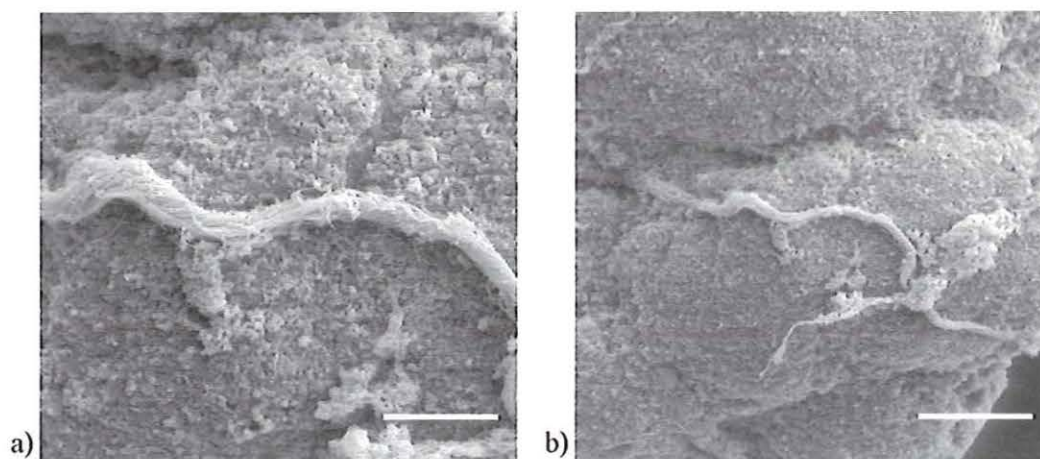


Figura 5.43. Microscopia de Varredura do lodo com 730 dias de operação, com adição de 12,8 mg/L de PCP. (a) feixe de microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. e presença de microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp., grânulo claro (Barra: 40µm); (b) mesmo feixe em outro aumento (Barra: 100µm)

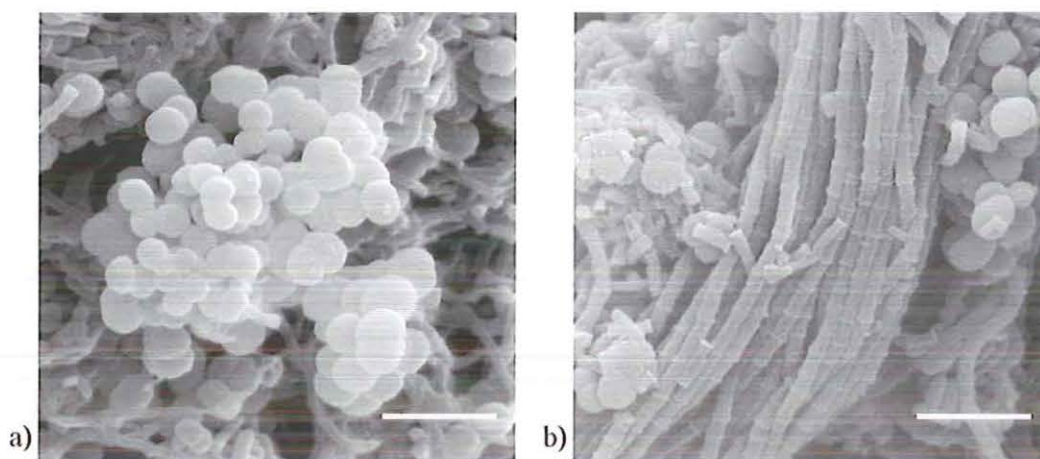


Figura 5.44. Microscopia de Varredura do lodo com 740 dias de operação, com adição de 15,6 mg/L de PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp.; (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (Barra: 4µm)

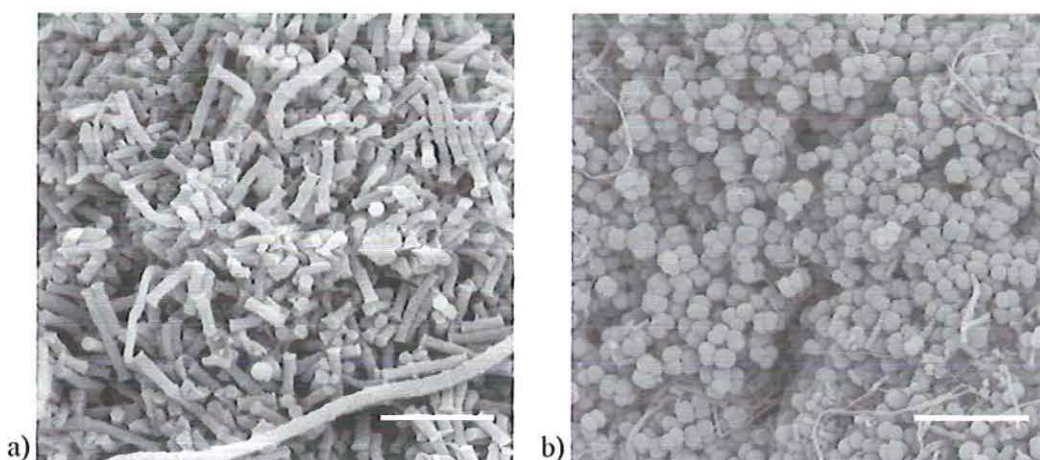


Figura 5.45. Microscopia de Varredura do lodo com 750 dias de operação, com adição de 21,0 mg/L de PCP. (a) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (Barra: 4µm) (b) microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp. (Barra: 10µm).

5.2.5 Discussão das etapas 2 e 3 do protocolo 2

A remoção de ácidos orgânicos no sistema antes da adição de PCP foi em torno de 99%, e foi o parâmetro mais evidentemente afetado durante a adição do PCP. Entre eles, a remoção do ácido propiônico foi a mais afetada, como ilustra a Figura 5.26 e 5.28. Quando da aplicação de 4 mg/L de PCP não se pode afirmar, pelos valores determinados, que tenha ocorrido remoção do ácido propiônico. Entretanto, devido às oscilações no valor da concentração deste mesmo ácido no afluente do RAH, os cálculos de porcentagem de remoção podem ter sido prejudicados, atestando um valor que na realidade poderia não ter sido tão baixo. Após este período, o RAH recuperou sua taxa anterior de remoção em torno de 99 %, em menos de 10 dias, ainda na concentração de 4 mg/L de PCP. A partir de 15,6 mg/L de PCP, a remoção do propiônico mostrou nova queda, porém, acima de 60%, mantendo-se nesta faixa para a concentração de 21 mg/L de PCP.

O ácido acético também apresentou uma ligeira queda de remoção sob a concentração de 4 mg/L de PCP. Sua remoção pelo lodo no sistema, nesta condição, caiu para 90%, e ainda sob concentração de 4 mg/L de PCP o reator recuperou sua condição inicial de 98% de remoção, em menos de 3 dias. Seguindo o mesmo comportamento de remoção para o ácido propiônico, o acético teve nova queda a partir da adição de 15,6 mg/L de PCP. No entanto, esta remoção ficou em patamares maiores, quando comparado ao propiônico (Figura 5.25 e 5.28), variando de 70 a 85%. Nas condições de ensaio, o ácido butírico mostrou ter sido o ácido orgânico menos afetado, sob adição do PCP, frente a porcentagem de remoção deste pelo lodo do RAH (Figura 5.27 e 5.28). Somente após a adição de 15,6 mg/L de PCP foi verificada uma queda perto de 88% de remoção no reator, porém o sistema recuperou-se em quatro dias e manteve-se em um patamar de remoção de 99%.

Apesar da remoção de PCP pelo sistema ter se apresentado acima de 96 % durante todas as etapas de adição deste composto, verificou-se a presença deste no efluente em concentrações muito baixas, somente no período de adição de 4,0 e 15,6 mg/L de PCP. Fora estes dois períodos, como apresentado na Figura 5.29, o reator manteve uma taxa de remoção de PCP superior a 99%.

O conteúdo de lodo no sistema medido um dia antes da adição de PCP foi igual a 0,027 g SV/g lodo, com 10,75 g SV/L. Ao final do período de operação do RAH, após a adição do PCP, o conteúdo de lodo no reator foi igual a 0,034 g SV/g lodo e 15,71 g de SV/L, mostrando um aumento no conteúdo de SV do sistema pelo crescimento do lodo, mesmo após adições crescentes de PCP.

As Figuras 5.30 e 5.31 mostram os valores de ordem de grandeza dos organismos metanogênicos cultivados em diferentes fontes e diluições decimais seriadas das amostras coletadas no reator sem e com PCP. Com 320 dias de operação as contagens apresentaram 10^2 e 10^8 NMP céls./mL para as amostras cultivadas em metanol e lactato e sulfato. O primeiro valor corresponde aos tubos positivos que apresentaram metano e turbidez e foi considerado baixo, pois o tempo de incubação foi de apenas 15 dias. Em geral, contagens de organismos metanogênicos em meios de cultivo contendo as fontes energéticas utilizáveis necessitam de maiores tempos de incubação (30 dias). O valor de 10^8 céls./mL para as amostras em lactato e sulfato foi considerado como quantidade de BRS, uma vez que constatou-se sulfeto no meio líquido dos frascos através da técnica descrita por SAKAMOTO (1996). Posteriormente, amostras coletadas com 370 dias de operação do RAH, cultivadas na presença de acetato e acetato mais sulfato apresentaram o valor de 10^6 céls./mL para os organismos metanogênicos e 10^5 céls./mL para as BRS. Em metanol, o valor encontrado foi de 10^7 céls./mL para metanogênicas. Para a fonte lactato e sulfato os valores foram de 10^6 e 10^8 céls./mL, significando respectivamente para organismos metanogênicos e redutores de sulfato. Após 466 dias de operação do RAH os valores de organismos metanogênicos cultivados em acetato e em acetato e sulfato decresceram para 10^4 e 10^2 céls./mL, respectivamente, e para 10^2 céls./mL de BRS em acetato e sulfato. Os demais valores nos meios correspondentes foram semelhantes ao período anterior.

Com cerca de 500 dias de operação, o lodo biológico no RAH mostrou que as metanogênicas cultivadas em apenas acetato diminuíram, assim como as BRS na presença de sulfato no meio de contagem. Entretanto, as metanogênicas e as BRS em lactato e sulfato permaneceram constantes. No metanol, fonte direta para os organismos produtores de metano, também não ocorreu variação nos valores entre as duas contagens realizadas. A resposta sugere que o número de metanogênicas no sistema correspondeu àqueles encontrados em metanol e em lactato e sulfato, valores atingidos no meio de contagem provavelmente em função das condições semelhantes no RAH. No sistema contínuo estabeleceu-se um consórcio microbiano na presença da fonte mais “complexa”, lactato, que entre os outros (propiónico e butírico), pode gerar hidrogênio, fonte importante para o metabolismo produtor de metano. Por outro lado, nos meios de contagens contendo apenas acetato, as utilizadoras desse composto e também do hidrogênio, provavelmente favorecidas devido às relações sintróficas entre espécies microbianas pela presença no RAH desse gás, não cresceram no tempo de incubação considerado e, portanto, um menor número foi obtido. As BRS que se desenvolveram no meio de contagem contendo lactato, podem não ser oxidadoras completas do substrato orgânico e, assim, não se desenvolveram no meio de

contagem contendo acetato e sulfato. As respostas indicam que as BRS no RAH tenham sido predominantemente oxidadoras incompletas.

No mesmo período de operação do RAH, 500 dias, o sistema se encontrava estável, com pH do efluente entre 7,0 e 8,0, remoção de DQO próxima a 90% a carga orgânica aplicada de 7,0 g DQO/L. A composição de metano no biogás era superior a 80%. O consórcio microbiano, considerando-se os valores de contagens em NMP céls./mL, mostra que organização entre espécies utilizadoras de lactato e metanogênicas foi preponderante, em que intermediários metabólicos como o hidrogênio no reator foram muito importantes. Assim, optou-se por monitorar os organismos metanogênicos e redutores de sulfato apenas na presença de lactato e sulfato e metanol na quarta e quinta avaliação quantitativa.

No período próximo a 638 dias, anterior a adição do PCP, a contagem de organismos metanogênicos e BRS mostrou valores de 10^6 NMP céls./mL em lactato e sulfato e em metanol. Os valores foram inferiores ao período anteriormente analisado, porém o valor de metanogênicas em lactato e sulfato foi o mesmo. Nenhuma alteração na estabilidade do RAH foi verificada nesse período em relação ao período anterior, e a porcentagem de remoção dos ácidos orgânicos (acético, propiônico e butírico) foi próxima a 100% (Figura 5.28).

A contagem realizada após a adição de PCP, realizada nas mesmas fontes orgânicas, mostrou que ocorreu declínio nos valores de metanogênicas em metanol e de BRS em lactato mais sulfato nas amostras coletadas em 21 mg/L de PCP. A ordem de grandeza para ambos os grupos microbianos foi de 10^5 céls./mL. No entanto, em lactato e sulfato, os valores de metanogênicas permaneceram iguais aos períodos anteriores. Na presença de PCP, na maior concentração estudada, apesar do RAH não ter sofrido variações significativas, ou seja, em média aos parâmetros considerados, o sistema operou de forma semelhante ao período sem PCP, os ácidos orgânicos sofreram variações de remoção no meio, como observado nas Figuras 5.25 a 5.28, principalmente do ácido propiônico, o que pode ter afetado as relações sintróficas microbianas, destacando-se o desvio metabólico do hidrogênio. Ao observar-se a Figura 5.29, verifica-se que o composto organoclorado desaparece no efluente do sistema ao longo do período de adição, como anteriormente mencionado. Assim, pode-se supor que o PCP tenha interferido na atividade de culturas responsáveis pela degradação do ácido propiônico ou pela ação de culturas que realizam a desalogenação reductiva, desviando hidrogênio para a redução da molécula aromática.

Estes dados estão de acordo com WU *et al.* (1993), cujo estudo envolvendo grânulos anaeróbios alimentados com acetato, propionato, butirato e metanol mostrou que os organismos degradadores de propionato foram os mais sensíveis à adição de PCP, tanto para

os grânulos adaptados quanto para os não adaptados, quando comparados aos organismos degradadores de butirato e as metanogênicas utilizadoras de acetato.

Outra forma de avaliar a composição microbiana do lodo do RAH no presente estudo foi a utilização da técnica molecular FISH. Esta técnica foi empregada com o objetivo de certificar a presença de grupos microbianos pertencentes aos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, destacando-se alguns grupos importantes, tais como a Família *Methanosarcinaceae* e as bactérias redutoras de sulfato (BRS) - ver Tabela 5.7.

Ainda, levando-se em consideração os exames microscópicos em conjunto com a aplicação da técnica FISH pode-se observar, como relacionado na Tabela 5.7, que ao empregar-se a sonda MSMX860 o predomínio de *Archaea* pertencente ao gênero *Methanosaeta* sp. pode ser afirmado nos lodos sem e com PCP em todas as concentrações estudadas.

Testes foram realizados com amostras do lodo sem adição de PCP, em que as sondas empregadas para avaliar as *Archaea* metanogênicas foram específicas para a Ordem *Methanobacteriales* e *Methanomicrobiales*, respectivamente, MB1174 e MG1200. Nessas condições, não ocorreu hibridação, podendo-se afirmar que células pertencentes a essas ordens não estavam presentes no lodo do RAH, ou em quantidades muito pequenas. Assim, optou-se por não utilizá-las nas demais amostras oriundas do reator com PCP.

Pelas observações dos dados da Tabela 5.7 constata-se que entre as metanogênicas houve um predomínio de metanogênicas cuja morfologia se relaciona ao gênero *Methanosaeta* sp., e que a porcentagem desta no lodo do RAH aumentou no período de adição de PCP. Este grupo é conhecido por utilizar o acetato como substrato, assim como o gênero *Methanosarcina* sp. também verificado nos grânulos pela técnica FISH. Esse último, revelou-se mais sensível a adição do PCP, segundo os resultados da Tabela 5.7.

Não foram comparados os resultados dos ensaios de contagem com os obtidos com as análises FISH, pois muito embora as amostras tenham a mesma origem, as amostras (Tabela 5.7) foram coletadas em períodos diferentes. Além disso, foram estocadas sob refrigeração por cerca 7 meses, o que pôde afetar as análises. No entanto, os valores de contagens em lactato e sulfato se agregados às análises FISH podem indicar que no RAH o predomínio foi de *Methanosaeta* sp., provavelmente devido a relações sintróficas desses microrganismos com acidogênicos. No caso, lactato e sulfato podem favorecer o aparecimento de um sintrofismo em que uma BRS, tal como o gênero *Desulfovibrio* sp., que produz acetato e hidrogênio para organismos metanogênicos, ou mesmo, o crescimento de uma *Propionibacterium* sp., fermentadora de lactato para propionato, acetato e dióxido de carbono (EMDE & SCHINK, 1990). Segundo WIDDEL (1988), bactérias redutoras de

sulfato do gênero *Desulfotomaculum* sp. podem utilizar hidrogênio, lactato e até mesmo o metanol (*D. orientis*) e podem crescer em sintrofia com metanogênicas, portanto, terem estado presentes no lodo do RAH, sem ter sido identificada pela análise FISH. Uma outra abordagem, quanto aos grupos microbianos presente no lodo do RAH, após a adição do PCP, será realizada no protocolo 4, quando da realização dos testes com os grânulos cultivados com as mesmas fontes orgânicas da alimentação do RAH na presença e ausência de sulfato.

Provavelmente devido às características de grande estabilidade do RAH antes da adição do PCP, como verificada pelos valores já comentados, a presença deste clorofenol da forma como foi introduzida no sistema, resultou em uma adequada remoção do composto, não afetando sua performance drasticamente. Os grânulos formados no período anterior a adição selecionaram claramente dois grupos metanogênicos, um semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp. e outro semelhante ao gênero *Methanosarcina* sp. (Figuras 5.34 a 5.45), e duas cores distintas para os grânulos foram salientadas. A presença marcante das metanogênicas durante todos os períodos de operação do reator pôde ser verificada a partir das avaliações de ordem de grandeza microbiana para cultivos em metanol e lactato mais sulfato.

A performance do RAH pode ter sido devida, entre outros fatores, pela presença de microrganismos da etapa final da digestão anaeróbia nos grânulos formados a partir do lodo inicial, de forma selecionada, uma vez que tal sistema foi alimentado com uma mistura de fontes orgânicas específicas à uma determinada comunidade metanogênica.

A seleção de microrganismos na presença de substratos específicos tem sido observada por outros pesquisadores. FLORENCIO (1994), trabalhando com reatores do tipo UASB alimentado com metanol verificou a presença de um microrganismo semelhante à *Methanosarcina* sp. como principal metanogênica responsável pela conversão do metanol a metano.

A eficiência destes grânulos na remoção do PCP e a presença das metanogênicas neste, adicionado à porcentagem de metano obtida na análise do biogás evidencia a hipótese de que estes microrganismos estão envolvidos direta ou indiretamente na remoção do PCP. Esta hipótese é reforçada por trabalhos como o de TSUNO *et al.* (1996), cujos autores concluíram que 60% das concentrações de PCP adicionadas ao reator anaeróbio de leito expandido alimentado com acetato foi transformado em metano e dióxido de carbono. Na mesma linha, KENNES *et al.* (1996) demonstraram o papel essencial que as metanogênicas possuem na mineralização do PCP, pois na presença de um inibidor, gás metano não foi formado a partir do PCP. Por outro lado, não foi observada nenhuma descloração de

clorofenóis por culturas puras metanogênicas, sendo sugerido por KENNES *et al.* (1996) uma relação sintrófica importante envolvendo metanogênicas na degradação do PCP.

Relações sintróficas entre microrganismos anaeróbios também foram sugeridas por WU *et al.* (1993), ressaltando que os degradadores sintróficos de propionato constituíram-se no grupo mais sensível entre os anaeróbios, à presença do PCP. Essa resposta foi também evidenciada no presente trabalho, uma vez que o ácido propiônico foi aquele que possuiu sua taxa de remoção mais fortemente afetada pela adição do PCP.

A eficiência do sistema estudado também pode ser devida à baixa relação existente entre PCP/SV, relação pouco comentada pelos trabalhos realizados com organoclorados. WU *et al.* (1995) conseguiram alcançar uma atividade de remoção específica de 14,6 mg PCP/g SSV.d. No presente estudo foi obtida à concentração de 21,0 mg/L de PCP uma taxa específica de remoção igual a 1,07 mg PCP/g SV.d, considerando o valor de 0,034 g SV/g lodo e de 15,71 g de SV/L no RAH ao final do ensaio, comprovando que a concentração de SV no sistema foi suficiente para não ser afetada pela concentração de PCP estudada.

DAMIANOVIC (1995), operando um sistema contínuo com uma taxa específica de aplicação de PCP de 0,002 mg PCP/g SV obteve uma taxa de remoção de DQO próxima a 98%. Os valores encontrados neste trabalho atestam que o RAH foi capaz de operar com uma taxa específica de aplicação de PCP igual a 1,34 mg PCP/g SV a uma taxa de remoção de DQO em torno de 92%.

Quanto à relação da DQO/PCP no presente estudo, esta foi alta o bastante para que a remoção do PCP, nas condições trabalhadas, ocorresse. Esta relação, na concentração mais alta de PCP foi de 0,33 g DQO/ mg PCP (327,6 g/g). WU *et al.* (1995) indicaram ser possível tratar efluentes contendo PCP à concentrações de DQO maiores que 1,2 g/L, sugerindo a necessidade de estudos para estabelecer o limite inferior da taxa de carregamento orgânico para manter a descloração ativa.

5.3 Protocolo 3: Ensaio em batelada - Toxicidade ao PCP

Neste item serão apresentados os resultados dos testes de toxicidade individualmente realizados. No item 5.3.4 serão discutidos os testes de toxicidade em relação a performance do RAH.

É importante salientar que os três testes de toxicidade foram baseados no protocolo proposto por YOUNG & TABAK (1993), resumidamente apresentado no capítulo Revisão da Literatura. Como anteriormente pontuado no capítulo Material e Métodos, os três ensaios foram realizados adaptando-os em relação às recomendações dos autores (YOUNG

& TABAK, 1993). Assim, diferenças ocorreram quanto as concentrações de lodo biológico, DQO do meio de cultura e composto tóxico alvo; bem como no método de amostragem. No último teste, **toxicidade III**, as determinações foram realizadas em desprezando-se os frascos de reação a cada amostragem, configurando-se, portanto, uma situação bem diferente na forma de condução das amostragens nos dois primeiros testes, **toxicidade I e II**. Assim, os frascos do teste de **toxicidade III** permaneceram pressurizados ao longo do ensaio. Esta metodologia foi adotada para que amostras do conteúdo líquido, como ácidos voláteis e organoclorados pudessem ser realizadas, em função dos volumes a serem amostrados (capítulo Material e Métodos, item 4.3).

Os testes de **toxicidade I e II** possibilitaram o cálculo do IC_{50} de acordo com SIERRA-ALVAREZ & LETTINGA (1991).

Evitaram-se, portanto, que os testes de **toxicidade I e II** fossem comparados com o teste **III**. O teste de **toxicidade III** analisado em separado forneceu importantes informações a respeito do metabolismo dos microrganismos frente às concentrações de PCP testadas no sistema contínuo, notadamente em relação à degradação dos ácidos voláteis e dos organoclorados.

5.3.1 Ensaio de Toxicidade I

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao teste de **toxicidade I** realizados com o lodo do RAH durante a etapa 2, no período de estabilização do reator, com 277 dias de operação e com um conteúdo aproximadamente de 0,032 g SV/g lodo. Para este teste foram avaliadas as seguintes concentrações de PCP: 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/L. Os resultados dos testes realizados em triplicata encontram-se nas Figuras 5.46 e 5.47 (valores no Anexo I).

Os valores de velocidades de produção de biogás nos testes de **toxicidade I** e as devidas equações e fator de correlação da regressão linear encontram-se nas Figuras 5.48.

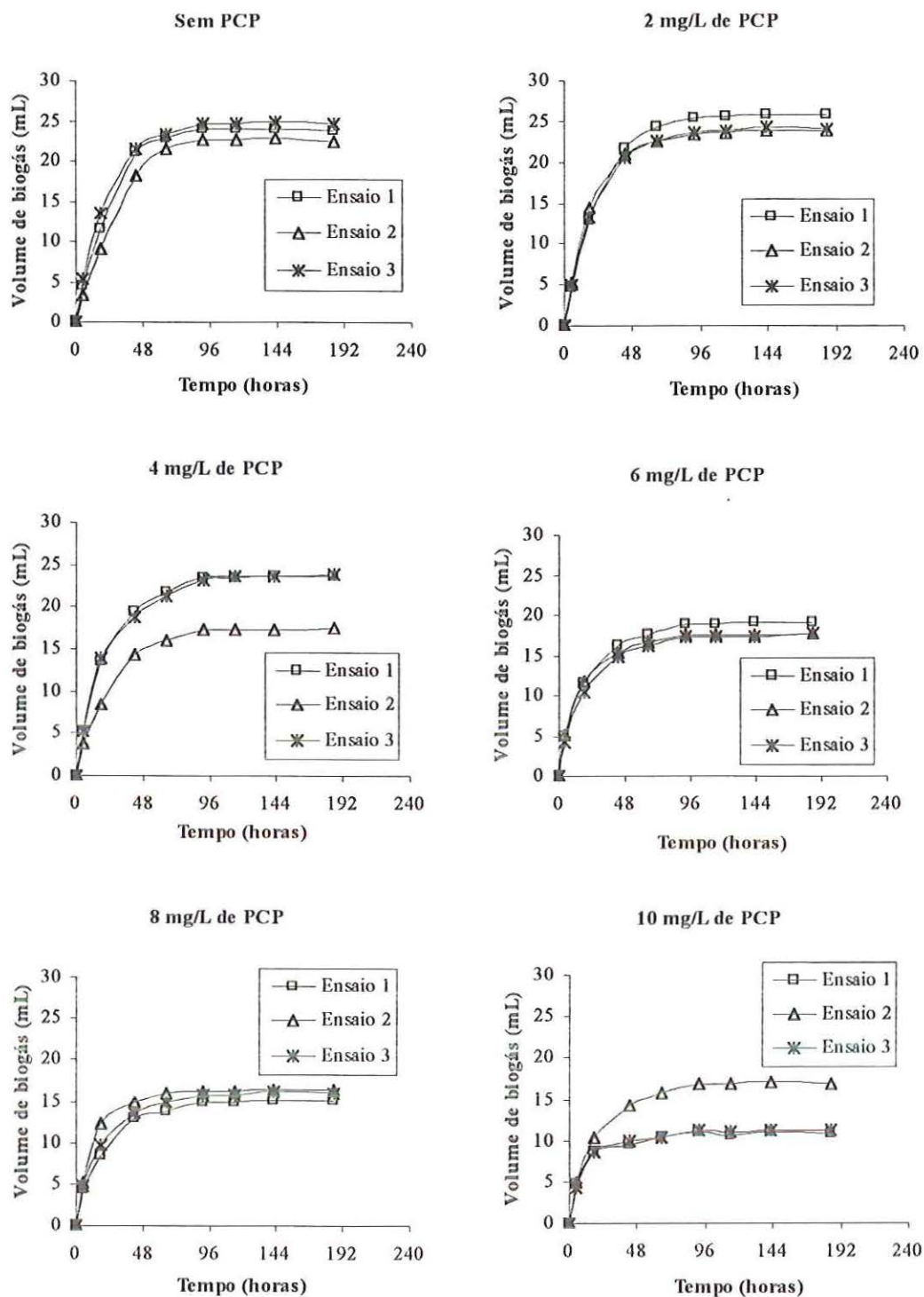


Figura 5.46. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade I

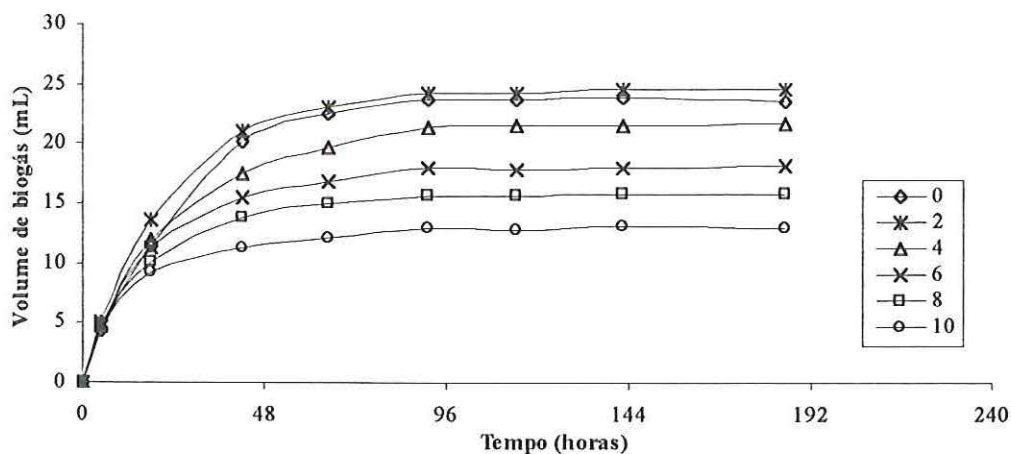


Figura 5.47. Valores médios dos volumes produzidos de biogás nos testes de **toxicidade I**. Concentração de PCP (mg/L).

Pelos cálculos de conteúdo de DQO nos frascos foi possível quantificar o volume de metano produzido nos ensaios sem o PCP. Para o ensaio de **toxicidade I** este volume foi igual a 26,86 mL. Verificou-se que os dados de produção de biogás ao final do teste para o ensaio sem PCP foram muito próximos a este valor em torno de 24 mL.

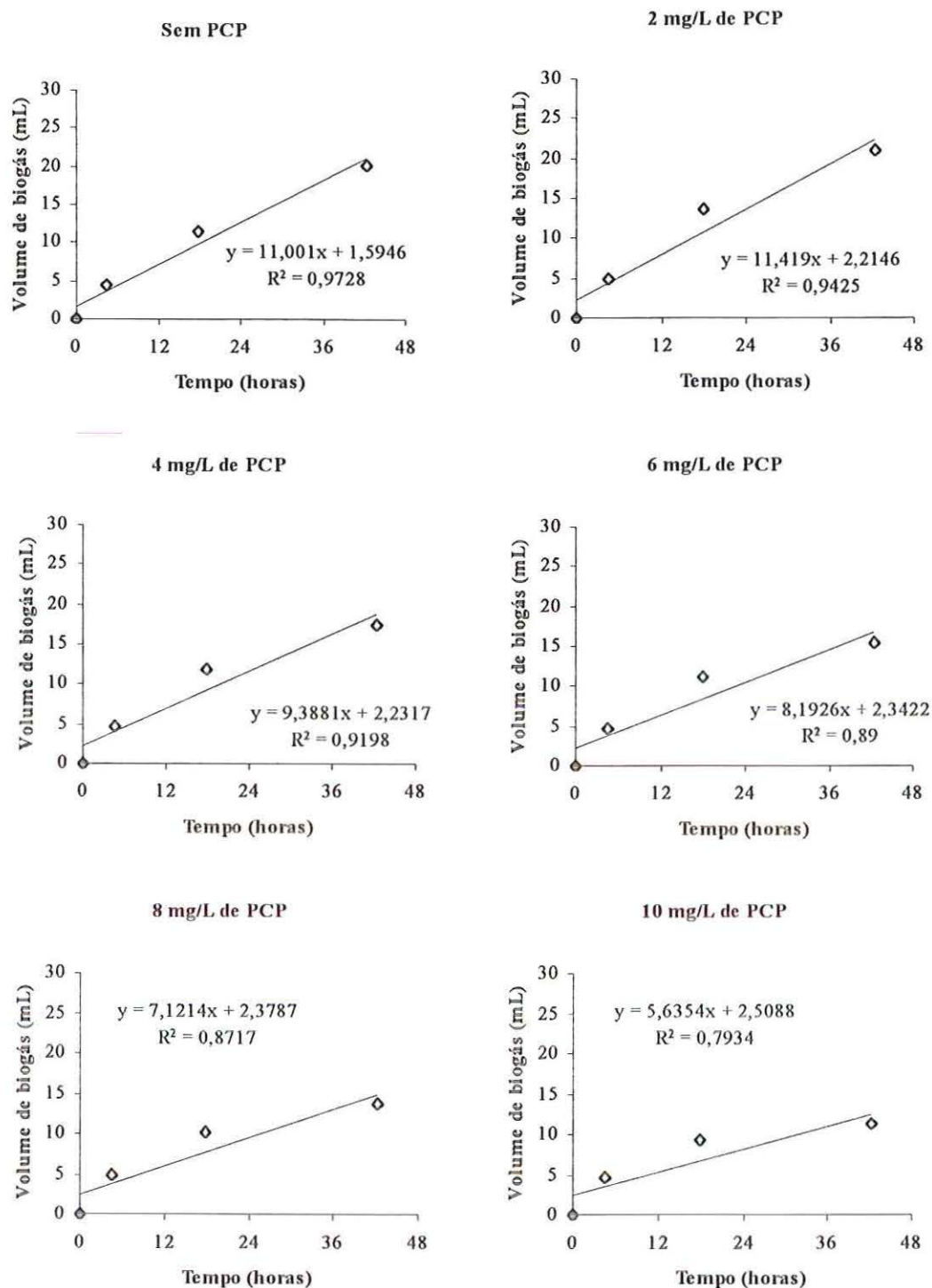


Figura 5.48. Valores de velocidades de produção de biogás nos testes de toxicidade I com as devidas equações e fator de correlação da regressão linear.

A inibição foi calculada a partir do IC_{50} como descrito em SIERRA-ALVAREZ & LETTINGA (1991). Os valores de inibição obtidos a partir das Equações 5.1 e 5.2, que se seguem, encontram-se na Tabela 5.8.

$$\text{Inibição} = 1 - (\text{Velocidade com PCP} / \text{Velocidade sem PCP}) \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$\text{Inibição (\%)} = \text{Inibição} * 100 \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Tabela 5.8. Valores de cálculo da Inibição Clássica para as diferentes concentrações de PCP

Concentração de PCP (mg/L)	Velocidade de produção de biogás (mL/d)	Vn/V0	1-Vn/V0	% de inibição
0	11,001	1,00000	0,00000	0,00
2	11,419	1,03800	-0,03800	-3,80
4	9,3881	0,85339	0,14661	14,66
6	8,1926	0,74471	0,25529	25,53
8	7,1214	0,64734	0,35266	35,27
10	5,6354	0,51226	0,48774	48,77

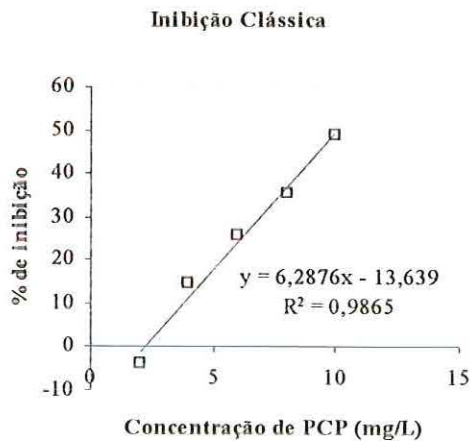


Figura 5.49. Representação gráfica da reta que se refere a porcentagem de inibição em relação a concentração de PCP.

Assim, através da equação da Figura 5.49 obtém-se o valor de IC_{50} de 10,12 mg/L de PCP.

Outro método foi utilizado para o cálculo da inibição para o teste de toxicidade I. Neste caso, o método permitiu que fosse possível verificar a % de inibição não somente no trecho de maior inclinação da curva mas também a cada espaço de tempo. Entretanto, ao final do ensaio, quando a produção de biogás se estabilizou, ou seja, em torno de 43 horas de

ensaio, o valor da inibição calculada pelo método da Inibição Clássica mostrou-se praticamente igual.

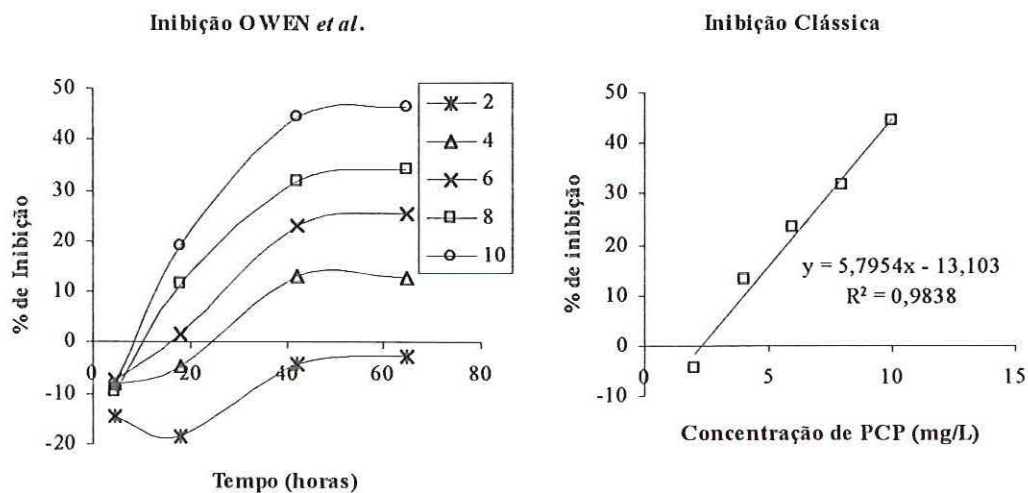


Figura 5.50. Representação gráfica da reta que se refere a percentagem inibição em relação a concentração de PCP, segundo OWEN *et al.* (1979) e inibição clássica no intervalo de tempo de 42,33 h.

Assim, através da equação da Figura 5.50 obteve-se o valor de IC_{50} de 10,89 mg/L de PCP a 42,33 h. A diferença entre os dois métodos é que no primeiro utilizou-se o intervalo de maior inclinação da reta e no segundo os valores foram obtidos a cada intervalo possibilitando a verificação da inibição nesses períodos de tempo. Comparando-se os dois métodos, observa-se que os valores obtidos do IC_{50} foram bastante semelhantes entre si, no período de maior inibição.

Para os testes de **toxicidade I** foi também avaliada a composição de metano e dióxido de carbono ao final do teste. Foi verificado que apesar de a produção de biogás ter-se reduzido proporcionalmente à concentração de PCP, as porcentagens de metano e dióxido de carbono não diminuíram com o aumento da concentração de PCP (Tabela 5.9). Estes resultados indicam que a inibição afetou as populações anaeróbias presentes no lodo como um todo e não as metanogênicas em particular. Pela mesma tabela é possível avaliar a eficiência de remoção de DQO nos testes ao final do ensaio. Este parâmetro foi afetado somente à concentrações acima de 4 mg/L de PCP.

Tabela 5.9. Valores da composição de metano no biogás, DQO média e eficiência teórica de remoção de DQO para os testes de toxicidade I ao final do ensaio.

Concentração de PCP (mg/L)	% de metano no biogás	DQO (mg O ₂ /L)	Eficiência teórica de remoção (%)
0,0	59,69 (±0,3371)	280,56 (±173,98)	95,9
2,0	60,44 (±0,332)	730,53 (±709,54)	89,4
4,0	57,62 (±2,4385)	504,71 (±238,48)	92,7
6,0	57,91 (±0,5786)	1640,53 (±490,21)	76,2
8,0	55,55 (±1,7642)	1701,09 (±543,52)	75,3
10,0	55,64 (±2,6787)	1715,00 (±224,66)	75,1

5.3.2 Ensaio de Toxicidade II

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao teste de **toxicidade II** realizados com o lodo do RAH durante a etapa 2, no período de operação propriamente dito com 450 dias de operação e com um conteúdo aproximadamente de 0,028 g SV/g lodo. Para este teste foram avaliadas as seguintes concentrações de PCP: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 mg/L e 0, 2, 5, 10 mg/L com sulfato. Além dos testes com diferentes concentrações de PCP foi realizado um teste sem PCP e fontes orgânicas como controle. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados do volume produzido de biogás nos testes sem sulfato encontram-se na Figuras 5.51 e 5.52 e as médias na Figura 5.53. Os valores tabelados encontram-se em Anexo J.

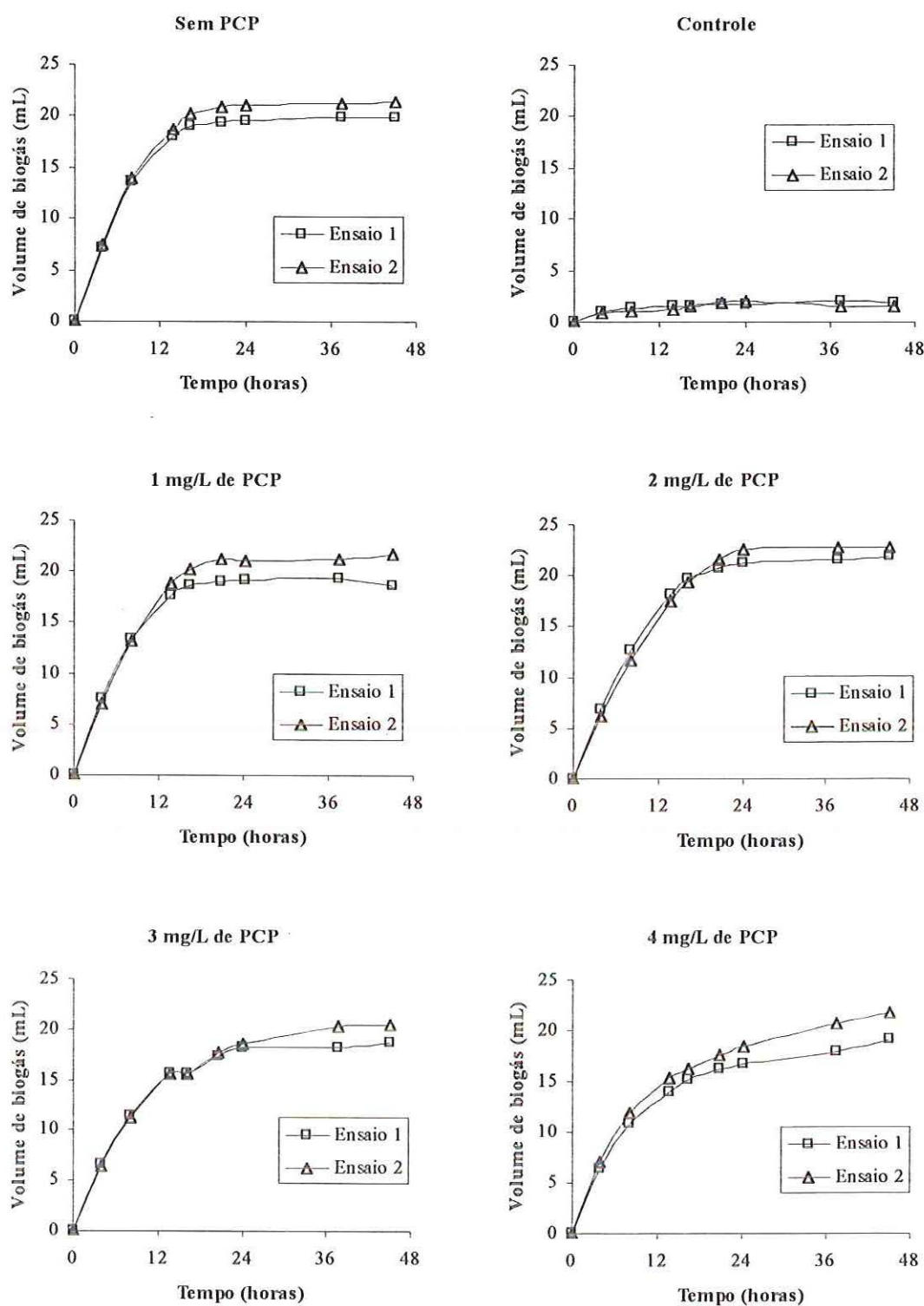


Figura 5.51. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade II para as concentrações de 1, 2, 3, 4 mg/L e sem PCP, além do controle sem ácidos orgânicos.

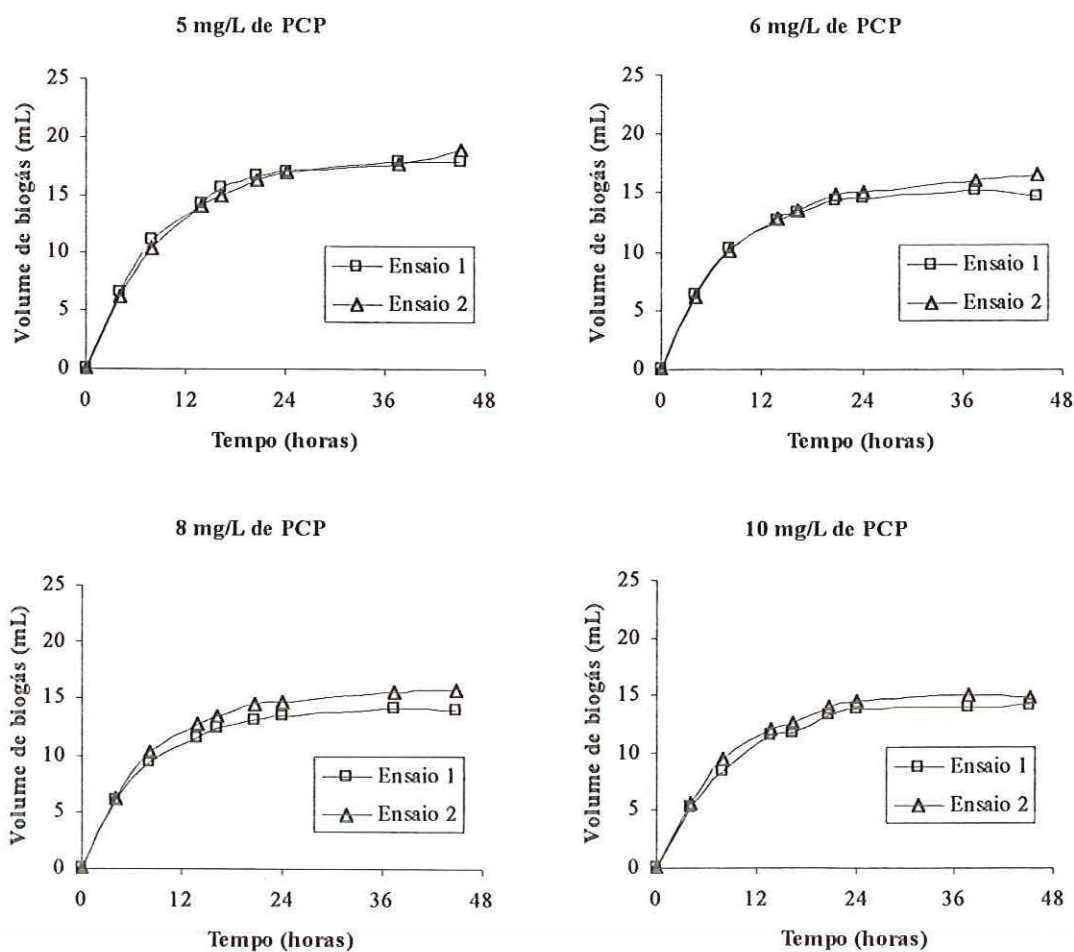


Figura 5.52. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade II para as concentrações de 5, 6, 8, 10 mg/L de PCP.

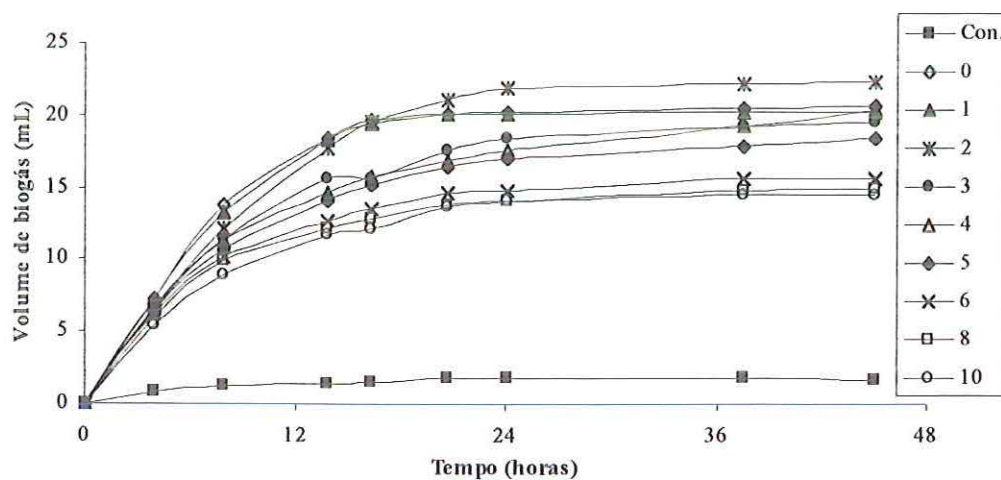


Figura 5.53. Valores médios dos volumes produzidos de biogás nos testes de toxicidade II. Concentração de PCP em mg/L.

Da mesma forma como calculado para o teste de **toxicidade I**, foram realizados os cálculos do conteúdo de DQO nos frascos. Foi possível quantificar um volume igual a 31 mL de metano nos ensaios sem o PCP do teste de **toxicidade II**. Os dados de produção de biogás ao final do teste para o ensaio sem PCP ficaram em torno de 23 mL.

A inibição para o teste de **toxicidade II** foi calculada a partir do IC_{50} como anteriormente descrito para o teste I. Neste teste, a inibição não foi calculada pelo método de OWEN *et al.* (1979), somente calculada pelo método da Inibição Clássica. Os valores de velocidades de produção de biogás nos testes de **toxicidade II** com as devidas equações e fator de correlação da regressão linear encontram-se na Figura 5.54 e 4.55 e os valores de inibição obtidos a partir da Equação 5.1 e 5.2 encontram-se na Tabela 5.10.

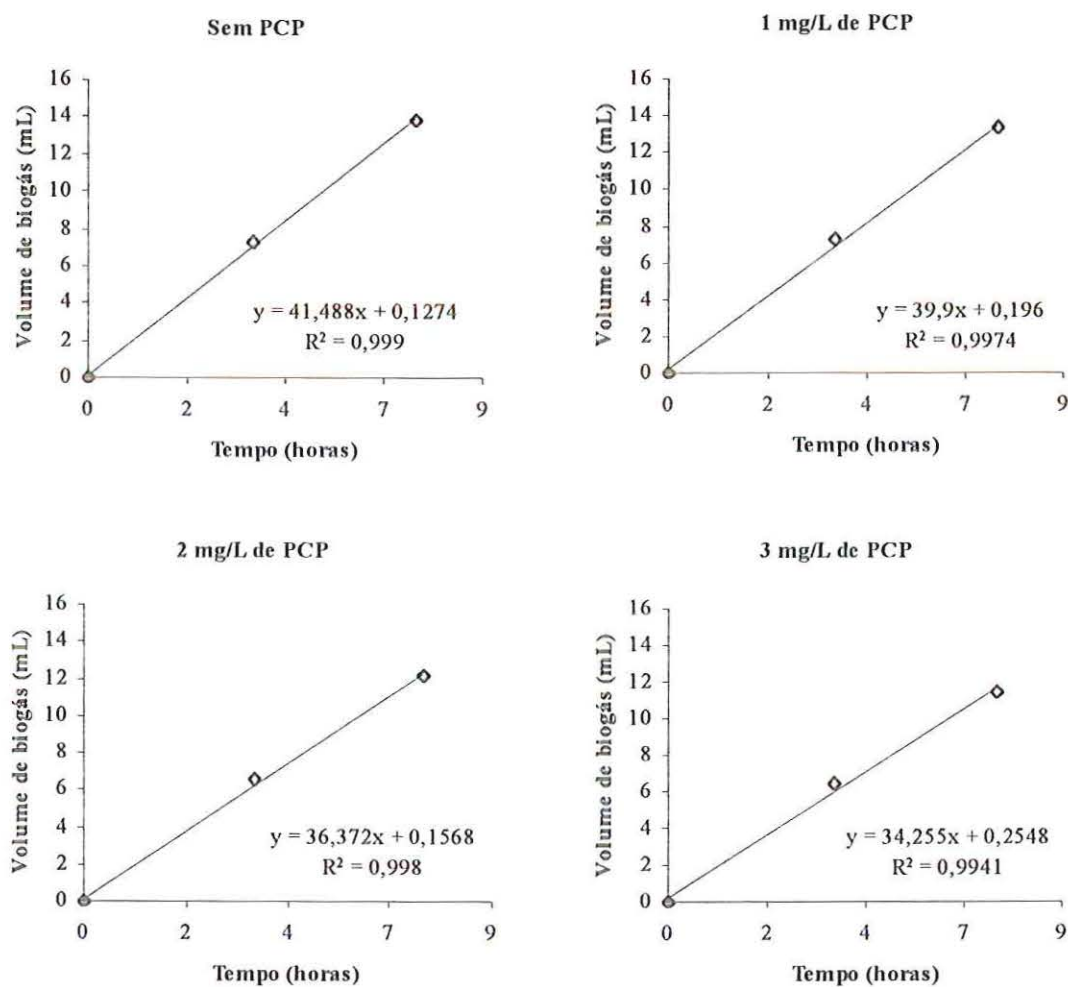


Figura 5.54. Valores das velocidades de produção de biogás nos testes de **toxicidade II** com as devidas equações e fatores de correlação da regressão linear para os ensaios com 1, 2, 3 mg/L de PCP e sem PCP.

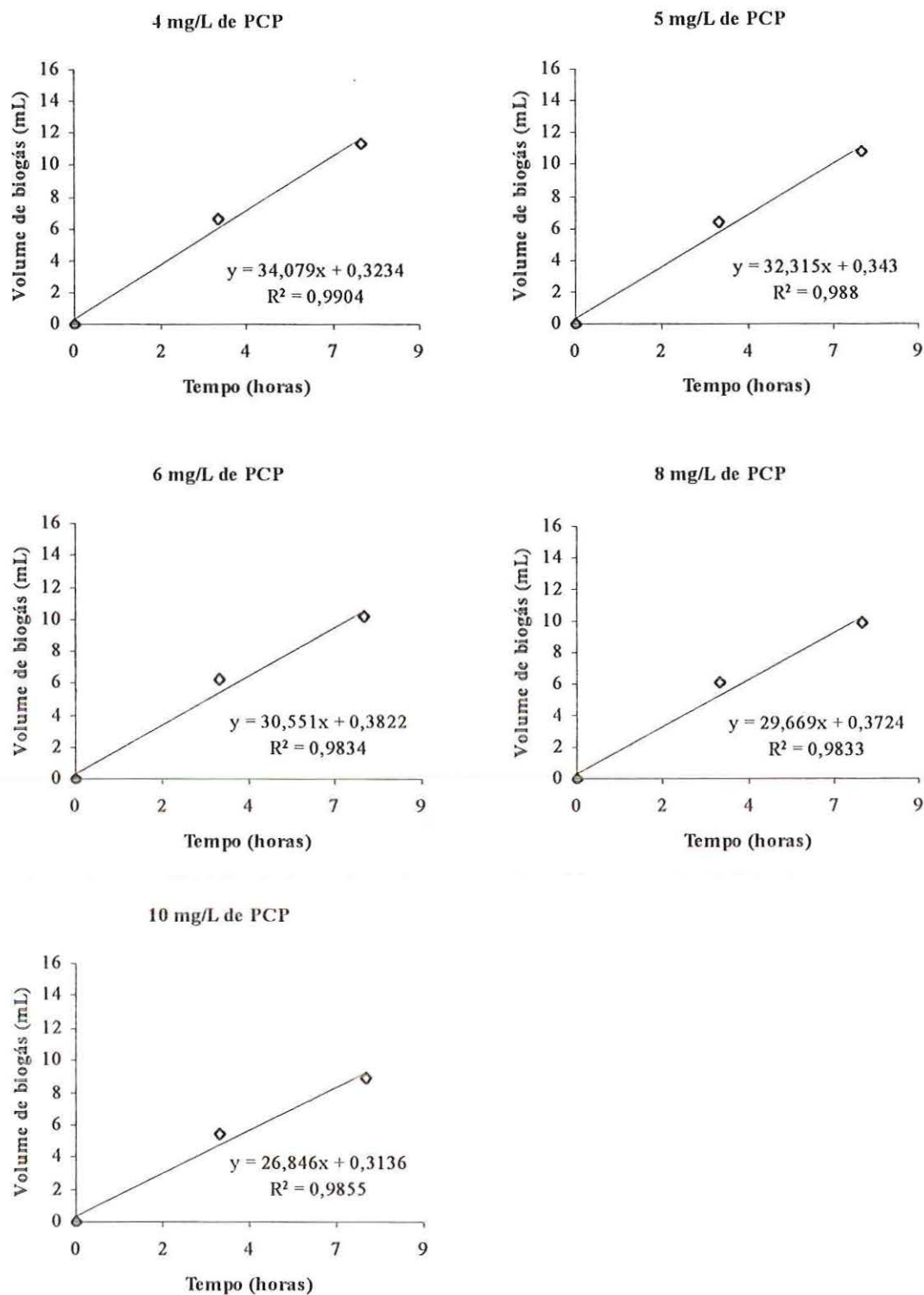


Figura 5.55. Valores de velocidades de produção de biogás nos testes de toxicidade II com as devidas equações e fatores de correlação da regressão linear para os ensaios com 4, 5, 6, 8 e 10 mg/L de PCP.

Tabela 5.10. Valores de cálculo da Inibição Clássica para as diferentes concentrações de PCP

Concentração de PCP (mg/L)	Velocidade de produção de biogás (mL/d)	Vn/V0	1-Vn/V0	% de inibição
0	41,488	1,00000	0,00000	0,00
1	39,900	0,96172	0,03828	3,83
2	36,372	0,87669	0,12331	12,33
3	34,255	0,82566	0,17434	17,43
4	34,079	0,82142	0,17858	17,86
5	32,315	0,77890	0,22110	22,11
6	30,551	0,73638	0,26362	26,36
8	29,669	0,71512	0,28488	28,49
10	26,846	0,64708	0,35292	35,29

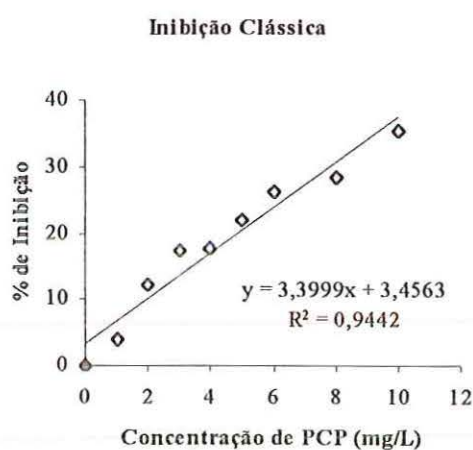


Figura 5.56. Representação gráfica da reta que se refere a porcentagem de inibição em relação a concentração de PCP.

Assim, através da equação da Figura 5.56 obtém-se o valor de IC_{50} de 13,69 mg/L de PCP. Comparando-se os valores do IC_{50} obtido nos dois testes de toxicidade realizados, verifica-se valores semelhantes, porém maior para o teste II. Estes resultados podem ser explicados pelos valores de SV nos ensaios. No teste de toxicidade II, cuja relação PCP/SV foi menor, os resultados mostraram que uma concentração maior de PCP foi requerida para provocar a mesma porcentagem de inibição.

O teste de toxicidade II foi realizado também na presença de sulfato. Todas as condições pontuadas para a realização do teste sem sulfato foram utilizadas no teste com sulfato. Foram utilizados 20 mM de sulfato nos ensaios e foram testadas as seguintes concentrações de PCP: 0, 2, 5, 10 mg/L. Os resultados do volume de biogás produzido nestes

testes encontram-se na Figura 5.57 com médias na Figura 5.58. Os valores encontram-se no Anexo J.

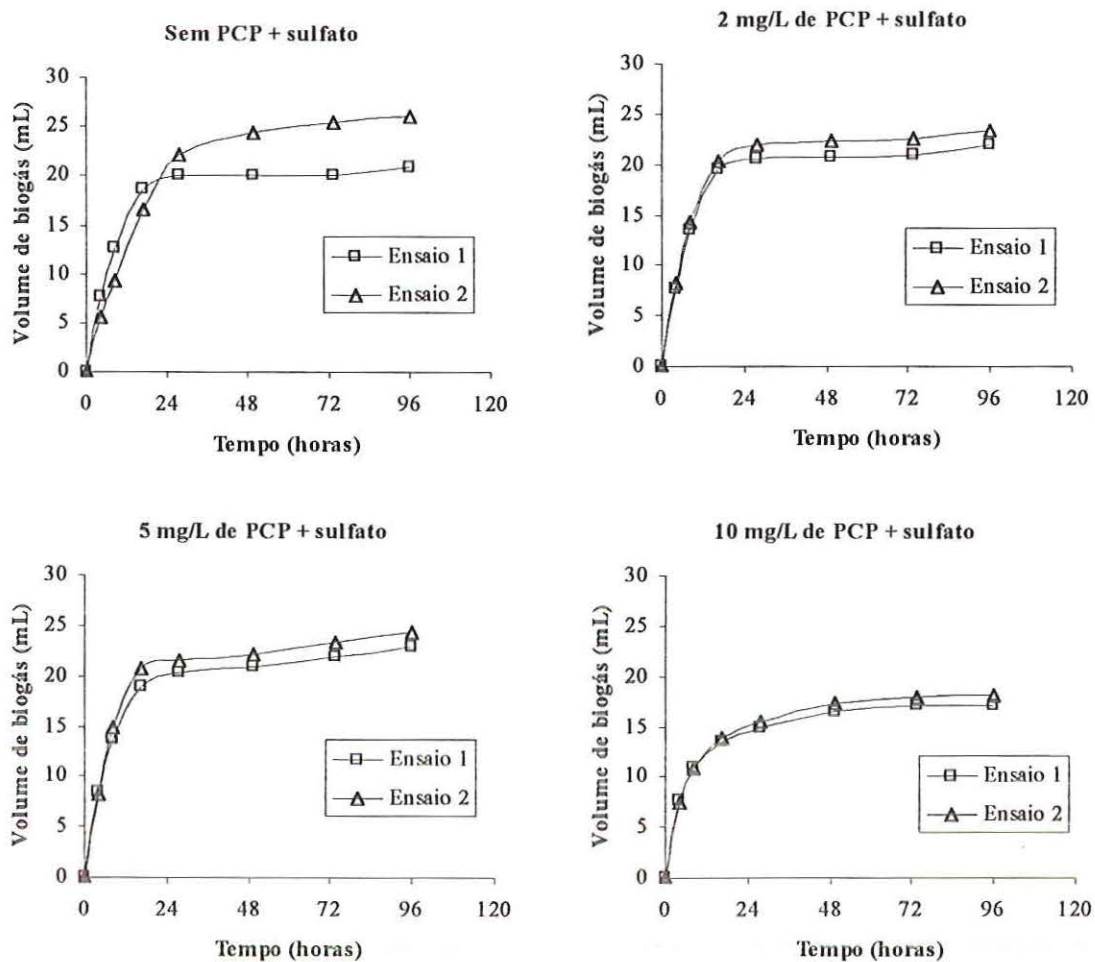


Figura 5.57. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade II para as concentrações de 2, 5, 10 mg/L de PCP e sem PCP, na presença de sulfato.

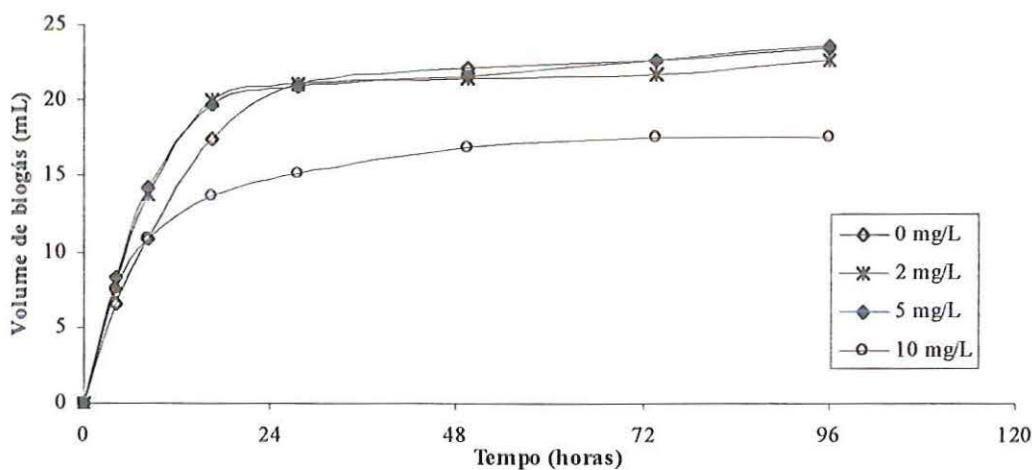


Figura 5.58. Valores médios dos volumes produzidos de biogás nos testes de toxicidade II, na presença de sulfato. Concentração de PCP em mg/L.

Os valores de velocidades de produção de biogás nos testes de **toxicidade II**, na presença de sulfato, com as devidas equações e fator de correlação da regressão linear encontram-se na Figura 5.59.

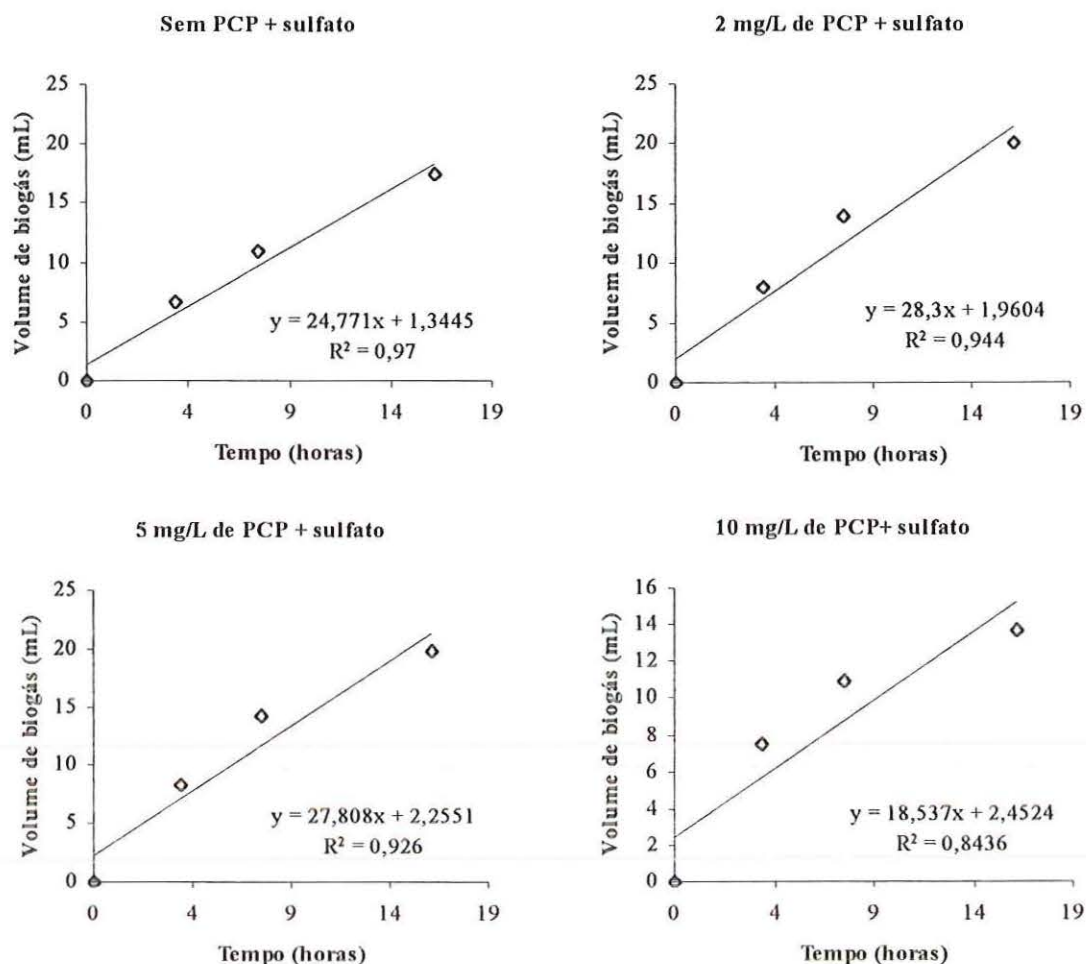


Figura 5.59. Valores de velocidades de produção de biogás nos testes de **toxicidade II** com as devidas equações e fatores de correlação da regressão linear na presença de sulfato.

A inibição para o teste de **toxicidade II** na presença de sulfato também foi calculada a partir do IC_{50} . Entretanto, não foi possível encontrar uma correlação dos valores. Conforme demonstrado pelos valores expressos na Tabela 5.11, na presença de sulfato, não houve inibição para os ensaios com 2 e 5 mg/L de PCP, ao contrário, foi verificado um estímulo, constatados pelos valores negativos à inibição. Mesmo para o valor encontrado no ensaio com 10 mg/L de PCP igual a 25,17%, a inibição pareceu não ter sido tão severa quando comparada ao valor encontrado ao ensaio com a mesma concentração de PCP no mesmo teste sem o sulfato, com o valor igual a 35,29%. Com base nestes dados, pôde ser

verificado que o sulfato, nas condições trabalhadas, pareceu estimular o processo no que se refere a produção de biogás, mesmo em concentrações de PCP que se mostraram inibitórias.

Tabela 5.11. Valores de cálculo da Inibição Clássica para as diferentes concentrações de PCP

Concentração de PCP (mg/L)	Velocidade de produção de biogás (mL/d)	Vn/V0	1-Vn/V0	% de inibição
0 + sulfato	24,771	1,00000	0,00000	0,00
2 + sulfato	28,300	1,14246	-0,14246	-14,25
5 + sulfato	27,808	1,12260	-0,12260	-12,26
10 + sulfato	18,537	0,74833	0,25167	25,17

Tabela 5.12. Valores da composição de metano no biogás, DQO média e eficiência teórica de remoção de DQO para os testes de toxicidade II, sem PCP e concentrações de 1,0 a 4,0 mg/L de PCP, no decorrer do ensaio.

Concentração de PCP (mg/L)	Dias de ensaio	% de metano no biogás	DQO (mg O ₂ /L)	Eficiência teórica de remoção (%)
Controle	1	58,41 (± 1,851)	-	-
	2	69,05 (±0,867)	-	-
	9	71,46 (±0,246)	-	-
0,0	1	74,59 (±7,071)	-	-
	2	76,55 (± 0,191)	-	-
	9	76,29 (±0,679)	1802,49 (±309,57)	66,11
1,0	1	78,78 (±0,106)	-	-
	2	78,07 (±0,177)	-	-
	9	76,89 (±0,237)	1653,58 (±81,61)	68,91
2,0	1	78,84 (±3,155)	-	-
	2	75,20 (±0,368)	-	-
	9	76,91 (±0,101)	1511,63 (±130,02)	71,58
3,0	1	62,27*	-	-
	2	79,47 (±1,419)	-	-
	9	76,11 (±1,673)	1609,05 (±100,75)	69,75
4,0	1	73,80 (±3,509)	-	-
	2	77,54 (±1,669)	-	-
	9	72,59 (±3,552)	1492,15 (±135,85)	71,95

* - Valores correspondentes a 1 amostra.

Tabela 5.13. Valores da composição de metano no biogás, DQO média e eficiência teórica de remoção de DQO para os testes de toxicidade II, de 5,0 a 10 mg/L de PCP, no decorrer do ensaio.

Concentração de PCP (mg/L)	Dias de ensaio	% de metano no biogás	DQO (mg O ₂ /L)	Eficiência teórica de remoção (%)
5,0	1	78,44 (±4,229)	-	-
	2	72,12 (±7,379)	-	-
	9	74,83 (± 0,410)	1629,92 (±62,49)	69,36
6,0	1	77,58 (±2,3448)	-	-
	2	74,46 (±0,6151)	-	-
	9	74,94 (±0,6693)	2552,50 (±257,26)	52,01
8,0	1	78,24 (± 0,3003)	-	-
	2	76,31 (±0,8453)	-	-
	9	75,83 (±0,5843)	2783,75 (±487,26)	47,67
10,0	1	73,93*	-	-
	2	75,75 (±1,9621)	-	-
	9	72,60 (±1,1789)	2456,67 (±117,85)	53,82

- Valores correspondentes a 1 amostra.

Tabela 5.14. Valores da composição de metano no biogás, DQO média e eficiência teórica de remoção de DQO para os testes de toxicidade II, com sulfato no decorrer do ensaio.

Concentração de PCP (mg/L)	Dias de ensaio	% de metano no biogás	DQO (mg O ₂ /L)	Eficiência teórica de remoção (%)
0,0 + sulfato	1	79,26 (±2,164)		
	4	75,12 (±0,5541)	1860,94 (±273,41)	65,01
2,0 + sulfato	1	78,46 (±1,086)		
	4		2056,70 (±35,35)	61,33
5,0 + sulfato	1	78,53 (±0,8021)		
	4	68,11*	1973,66 (±76,92)	62,90
10,0 + sulfato	1	70,91 (±7,0977)		
	4		3050,42 (±101,69)	42,65

- Valores correspondentes a 1 amostra.

As determinações de ácidos voláteis para os ensaios de toxicidade II foram realizadas no início do teste e comparadas com os resultados finais para os ensaios com diferentes concentrações de PCP para determinação da eficiência de remoção. A medida

inicial foi realizada em triplicata e considerada a mesma para todos os ensaios com diferentes concentrações de PCP. A tabela com os valores obtidos para os ácidos voláteis encontra-se no Anexo K, e apenas para os ensaios sem sulfato. Pela Figura 5.60 é possível verificar que o ácido propiônico foi o mais afetado pela presença do PCP. É possível verificar também que sob concentrações superiores a 6 mg/L de PCP, a eficiência de remoção do ácido propiônico não foi superior a 20%.

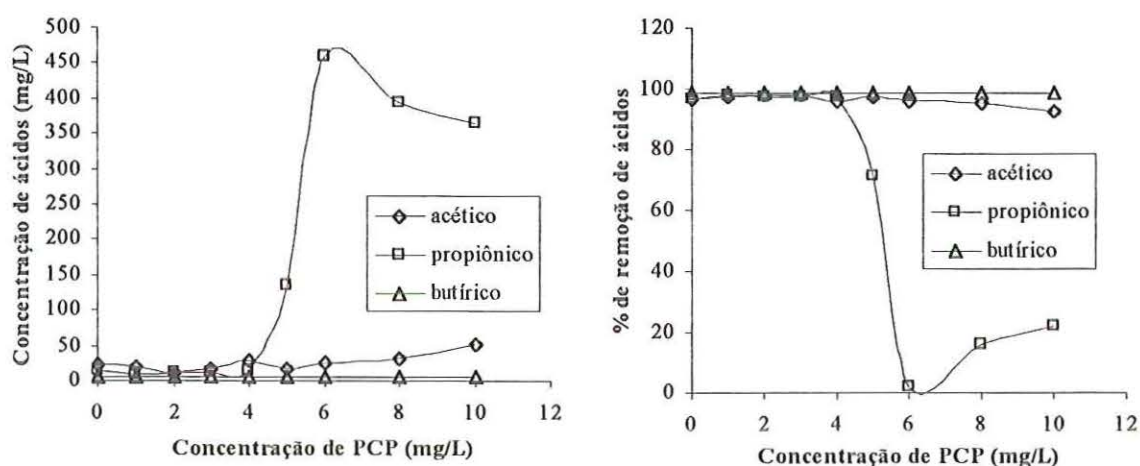


Figura 5.60. Valores de concentração de ácidos voláteis e eficiência de remoção para os ácidos acético, propiônico e butírico nos ensaios sem sulfato do teste de toxicidade II.

Quanto ao potencial de inibição do lodo do RHA pelo PCP, verificado através dos testes de toxicidade I e II, nas condições estudadas, foi encontrado um valor de inibição para o teste de toxicidade II, ainda na concentração de 1 mg/L de PCP, enquanto que os valores encontrados para 2 mg/L de PCP no teste de toxicidade I mostraram estímulo no processo. Porém, a 4 mg/L de PCP, os dois testes revelaram inibição do processo na ordem de 17,8 e 14,6 %, para os testes de toxicidade II e I, respectivamente. A partir destes resultados, a concentração de 4 mg/L de PCP foi considerada limite sob condições descontínuas, considerando que até esta concentração foram verificadas, para o teste II, altas taxas de remoção de ácidos do sistema, ainda que apresentando uma pequena inibição frente ao PCP. À concentração de 2 mg/L para o teste de toxicidade II, ocorreu estímulo no processo quando avaliada a produção de biogás. Assim, estabeleceu-se que o início da adição do PCP no RAH se daria com concentrações da ordem de 2 mg/L.

5.3.3 Ensaio de Toxicidade III

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao teste de toxicidade III realizados com o lodo do RAH ao final da etapa 3 após 753 dias de operação e com um conteúdo aproximadamente de 0,034 g SV/g lodo. Para este teste foram avaliadas as seguintes concentrações de PCP: 0, 5, 10, 15 e 20 mg/L e 10 mg/L com sulfato. Os ensaios deste teste foram constituídos por 30 frascos para cada concentração com medidas a intervalos determinados, em triplicata. Esta diferença na metodologia deveu-se à necessidade de amostrar a fase líquida para determinação de ácidos voláteis e organoclorados e, portanto, os frascos deveriam ser sacrificados a cada análise.

Foram realizadas medidas de volume de biogás, conteúdo de metano, ácidos voláteis e organoclorados durante o período de realização do teste e medidas de DQO ao final do teste. Os resultados do volume de biogás produzido nos testes encontram-se na Figura 5.61, com as respectivas médias. Os resultados do conteúdo de metano encontra-se na Figura 5.62, valores da concentração de ácidos voláteis na Figura 5.63 e os do pentaclorofenol, na Figura 5.64. Todos os valores encontram-se no Anexo L.

Neste teste não foi calculado o IC_{50} como realizado para os testes anteriores. Isto deveu-se ao fato de os dados obtidos não mostrarem uma correlação linear. Porém, foi observado através dos dados obtido para volume de biogás, que ocorreu inibição do processo na presença do PCP, a partir da concentração de 5 mg/L. Quando comparado ao valor de biogás produzido no ensaio sem PCP, verificou-se que o valor da inibição era maior do que foi obtido nos ensaios antes da adição do composto tóxico. Estes resultados serão discutidos no item 5.3.3 deste capítulo.

Os valores de volume máximo de metano para este teste foram calculados a partir da DQO teórica, sendo este igual a 40,76 mL por frasco. Este valor está próximo ao encontrado para o biogás no ensaio sem PCP.

Entretanto, pode se notar que os volumes de biogás produzidos nos demais ensaios, para as mesmas concentrações de PCP, ou seja, com 5 e 10 mg/L foram muito próximas mesmo com diferentes concentrações de DQO (Testes de toxicidade I e II). Isto pode indicar que mesmo que haja suficiente fonte orgânica para que o processo anaeróbio ocorra, este poderá ser inibido a proporções semelhantes na presença de mesmas concentrações de PCP. Pelos gráficos de composição de metano, Figura 5.62 nota-se o mesmo comportamento para este parâmetro. A porcentagem de metano no biogás também pareceu ter sido afetada.

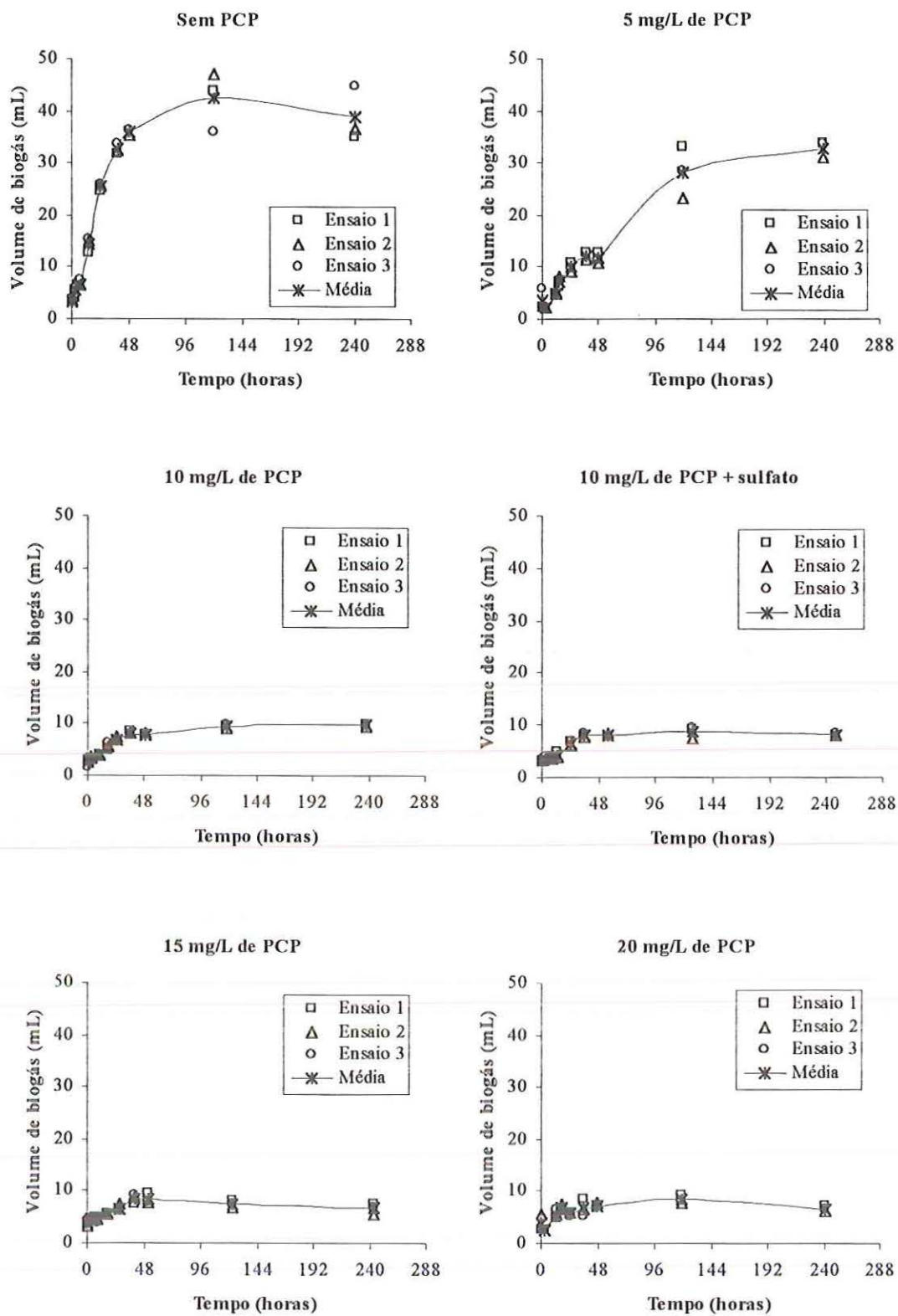


Figura 5.61. Valores de volume de biogás produzido nos testes de toxicidade III com suas respectivas médias.

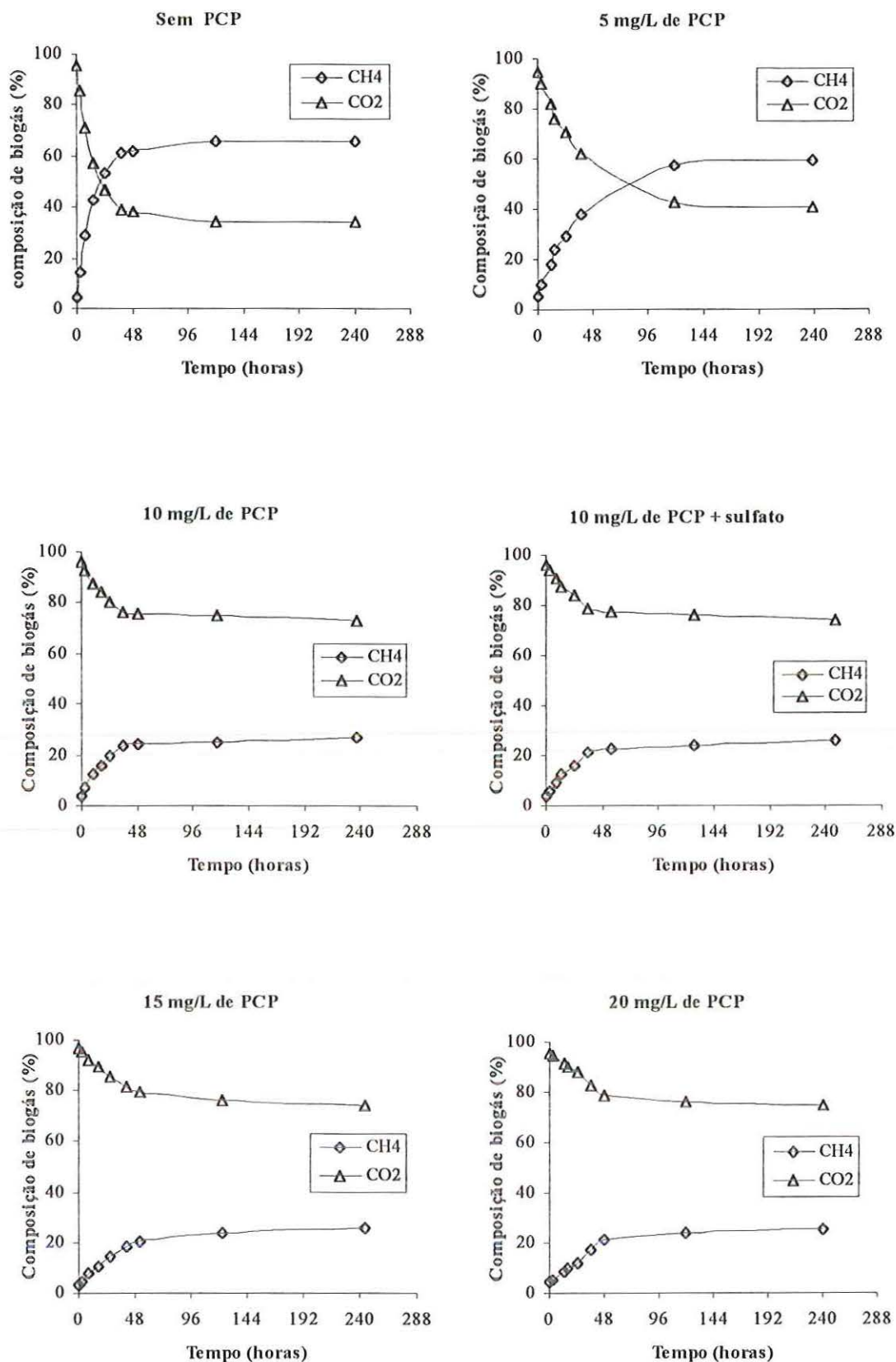


Figura 5.62. Valores de composição de gases: metano e dióxido de carbono para o teste de toxicidade III, no decorrer do ensaio.

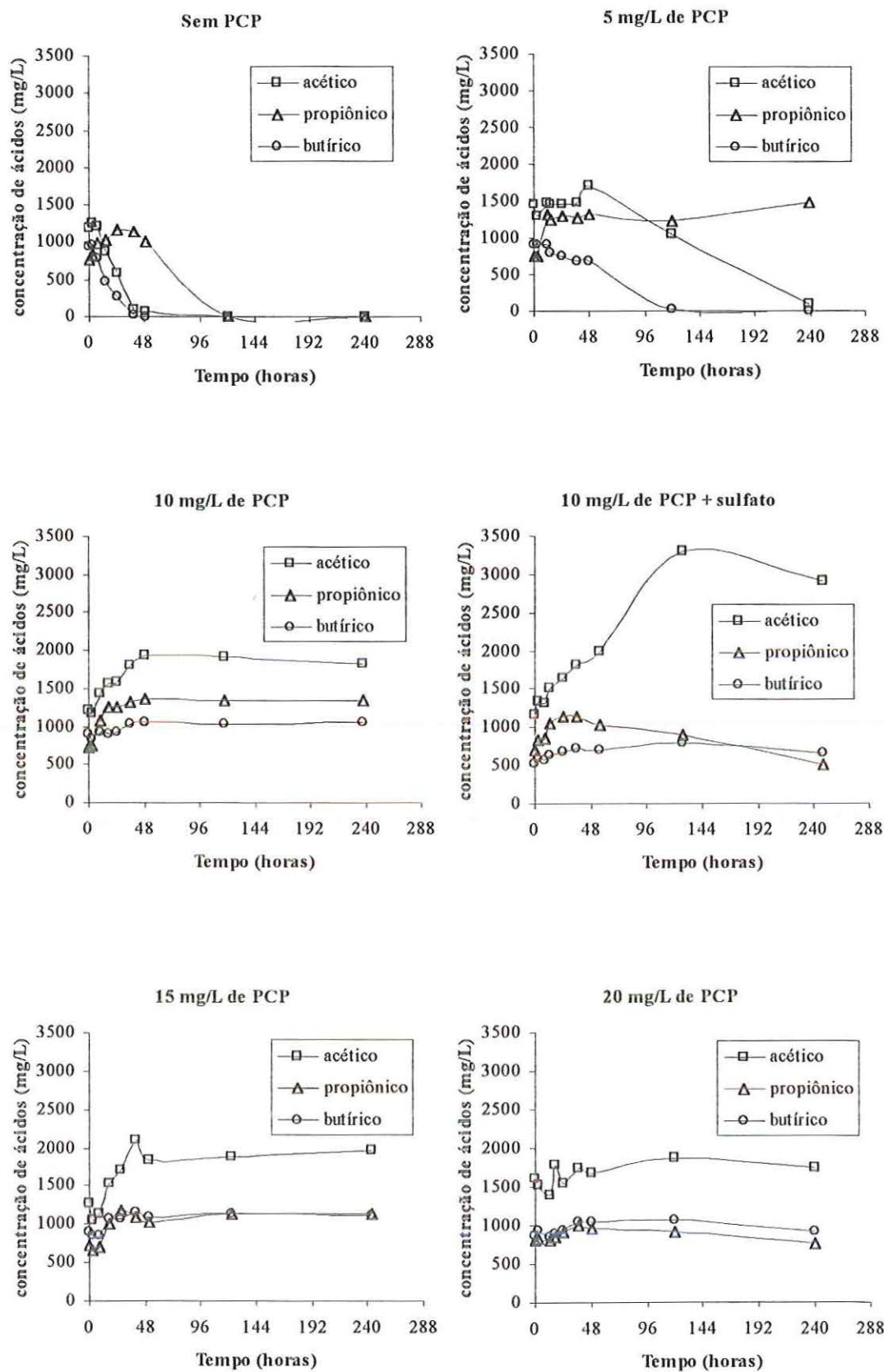


Figura 5.63. Concentração de ácidos voláteis: acético, propiônico e butírico para o teste de toxicidade III, no decorrer do ensaio.

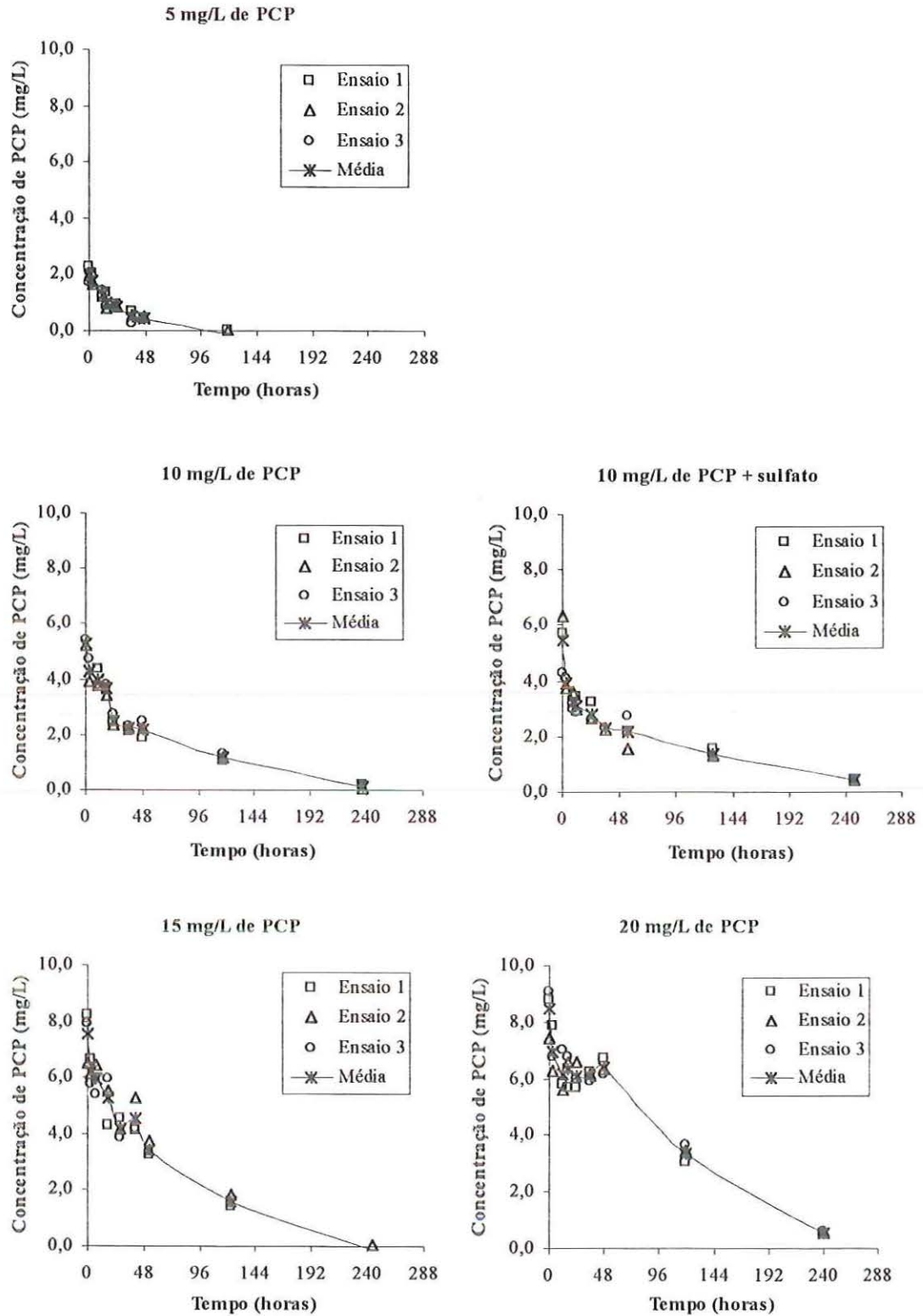


Figura 5.64. Concentração de PCP para o teste de toxicidade III, no decorrer do ensaio.

Os valores encontrados em concentração para o PCP nas determinações realizadas, não corresponderam aos valores iniciais adicionados ao meio de cultura. Este fato pode estar relacionado a um processo de biossorção ou adsorção do PCP pelo grânulo do lodo, comentado na literatura. KENNEDY *et al.* (1992) mostraram que um lodo granuloso anaeróbico apresentou maior capacidade em adsorver o PCP do que outros clorofenóis estudados. NING *et al.* (1999) estudando a adsorção em lodo anaeróbico verificou grande correlação entre a sorção do PCP e sua degradação, sugerindo a biossorção do organoclorado pelo lodo biológico como a primeira etapa de degradação deste. Isto pode explicar o baixo valor de PCP encontrado nas amostras analisadas, principalmente nas amostras no tempo zero, uma vez que estas foram coletadas aproximadamente 40 minutos após o início do processo. Sem dúvida, o passo inicial de degradação de um composto é a biossorção do mesmo pela célula. Porém, o fato de ocorrer adsorção do composto pelo meio ou pela célula não pode ser justificativa para que degradação ocorra.

Os resultados obtidos com as análises de organoclorados revelaram também que apesar não ter sido encontrado nenhum intermediário segundo os padrões considerados nas análises, 2,4-DCP, 2,6-DCP, 2,3-DCP, 2,3,4-TCP, 2,3,6-TCP, 2,4,6-TCP, além do PCP, verificou-se a existência de uma área no cromatograma não relacionada a nenhum dos padrões utilizados. A presença dessa área sugere a existência de um intermediário nas amostras analisadas, porém não pôde ser identificado pela ausência de um padrão específico.

O PCP foi removido do sistema quase totalmente, mesmo à maior concentração de PCP de 21 mg/L (Figura 5.64), após 10 dias de incubação.

Tabela 5.15. Valores da DQO média de início e final do ensaio e eficiência teórica de remoção para os testes de toxicidade III.

Concentração de PCP (mg/L)	DQO _{inicial} (mg O ₂ /L)	DQO _{final} (mg O ₂ /L)	Eficiência teórica de remoção (%)
0,0	7430,86 (±200,46)	646,30 (±87,90)	91,30
5,0	7824,07 (±442,60)	1551,85 (±247,04)	80,17
10,0	-	-	-
10,0 + sulfato	7013,58 (±983,61)	5288,89 (±1018,35)	24,59
15,0	7366,67 (±127,39)	7333,33 (±352,77)	0,45
20,0	7479,01 (±436,89)	7644,44 (±895,25)	-2,21

O valor teórico de DQO adicionada ao ensaio de **toxicidade III** foi de 6,88 mg/L como adicionado no RAH. Porém, valores maiores foram determinados, como mostra a Tabela 5.15, entretanto não variando significativamente. Devido a problemas com as amostras, o valor de DQO para o ensaio com 10 mg/L de PCP não foi apresentado. Os resultados são coerentes com os verificados pelos resultados obtidos da produção de biogás, assim como pela eficiência de remoção de ácidos voláteis, Figuras 5.61 e 5.63, respectivamente.

5.3.4 Análise dos ensaios de Toxicidade

Apesar dos testes de **toxicidade I e II** não terem sido comparados com o teste **III**, estes serão considerados aqui para avaliação dos mesmos, devido alguns fatores não comentados anteriormente, porém de suma importância para a compreensão do sistema contínuo. Os fatores considerados dizem respeito às condições do RAH na hora da coleta do lodo para os testes, a relação PCP/SV nos testes, o número de microrganismos determinado pelas contagens celulares, e as condições dos ensaios durante a execução dos testes.

Quanto as condições do RAH no momento da coleta do lodo para os testes de toxicidade, o NMP realizado com o lodo do reator apresentou, em períodos próximos a realização dos testes de **toxicidade I e II**, um número de redutoras de sulfato equivalentes, e o de metanogênicas não pode ser comparado em função da leitura com tempos de incubação diferentes. Para os testes **I e II**, o reator encontrava-se em regime estacionário de operação. Por outro lado, no teste de **toxicidade III**, o lodo utilizado apresentou um número inferior de metanogênicas e BRS, e o reator anaeróbico híbrido apresentou leve decréscimo na remoção de DQO e AOV, mesmo na presença de maior quantidade de SV (g/L). Atestando assim, um desequilíbrio do lodo quando da realização do teste de **toxicidade III**, pela presença de 21 mg/L de PCP no RAH.

Quanto à relação de PCP/SV nos testes, cabe comentar que apesar da inibição no sistema em batelada ter sido maior do que no sistema contínuo que atingiu valores iguais a 21 mg/L de PCP, este foi um valor aparente se consideradas as condições do sistema contínuo e em batelada, e somado a isto, o fato do RAH ter sido operado com recirculação de 1:1, diluindo a concentração de PCP em 50% na entrada do sistema. Para uma melhor comparação, foram realizados cálculos para determinação da relação PCP/SV nos sistemas em batelada e contínuo.

Os valores encontrados foram para o RAH igual a 1,34 mg PCP/g SV na concentração mais alta de PCP (21 mg/L ou 78 µM). Valores próximos a este foram

encontrados nos testes de **toxicidade I, II e III**, respectivamente 1,25 mg PCP/g SV (4 mg/L de PCP), 1,27 mg PCP/g SV (6 mg/L de PCP) e 1,11 mg PCP/g SV (5 mg/L de PCP). Tais valores foram aproximadamente iguais à metade do IC_{50} para os testes I e II. Considerando-se as mesmas condições em termos da relação PCP/SV, o RAH apresentou condição melhor do que os testes de toxicidade, pois além de ser um sistema mais estável, operou com recirculação, diluindo a concentração de PCP na ordem de 50%.

Quanto às condições dos ensaios durante a execução dos testes, o teste **III** apresentou um intermediário da degradação do PCP. O fato de esse teste ter sido conduzido diferentemente dos demais, levou a uma situação provável de maior desequilíbrio do lodo do que o observado nos outros testes, por exemplo, devido a não despressurização dos frascos ao longo do ensaio.

Os valores de ácidos voláteis do teste de **toxicidade II**, medidos ao final do ensaio, revelaram que o ácido propiônico foi o que sofreu menor remoção a 10 mg/L de PCP. Concentrações de até 4 mg/L não afetaram a remoção desse ácido. Para o teste de **toxicidade III**, foi verificado o mesmo comportamento para a remoção dos ácidos quando considerada a concentração de 5 mg/L de PCP, ou seja, o ácido propiônico foi o mais afetado. Entretanto, comparando-se os valores de remoção dos ácidos na condição de ensaio com mais de 10 mg/L de PCP, não houve remoção de nenhum dos ácidos analisados no teste **III**. Este fato pode estar correlacionado à situação do lodo no momento do teste, assim como as condições do sistema em batelada durante a execução do teste **III**.

Durante a execução do teste **III**, a concentração de ácido acético no ensaio cultivado na presença de sulfato a 10 mg/L de PCP, aumentou indicando que este não estava sendo consumido. Devido à presença de metanogênicas e acidogênicas no lodo do RAH, como atestado em todos os ensaios de NMP e observações microscópicas do lodo, sugere-se que estas devam ter sido inibidas na presença do PCP. Este fato está de acordo com os valores encontrados para a porcentagem de metano no biogás, no teste de **toxicidade III**, que diminuiu com o aumento do PCP.

Conforme os resultados obtidos, os testes de toxicidade baseados no protocolo experimental de YOUNG & TABAK (1993), mostraram-se efetivos em avaliar a condição do lodo anaeróbio frente ao composto tóxico PCP.

5.4 Protocolo 4: Ensaio em batelada - Teste com os grânulos após a adição de PCP

Serão apresentados neste item os resultados e a discussão dos testes realizados com o intuito de verificar os grupos microbianos presentes nos diferentes tipos de grânulos formados no lodo do RAH, ao final do experimento, a saber: grânulo claro e escuro. Os testes foram realizados com o lodo preservado sob refrigeração, após um mês do término do experimento.

Os testes foram realizados conforme descrito em Material e Métodos e foram testados os seguintes substratos orgânicos, ácidos láctico, acético, propiônico e butírico e metanol, na presença e na ausência de sulfato. Para análise dos testes foram realizadas determinações da composição de metano, da presença de sulfeto para os testes com sulfato, observação visual do crescimento pela turbidez da amostra e análise microscópica. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.16.

Conforme verificado pelos dados apresentados na Tabela 5.16, os testes realizados forneceram informações que reforçam a hipótese de relação sintrófica existente entre os microrganismos do lodo estudado, quanto aos grupos nutricionais microbianos, cultivados em substratos distintos.

Para o grânulo claro, a produção de metano foi elevada somente para os cultivos em acetato e metanol, com valores iguais a 38,4% e 23,9%, respectivamente, evidenciando-se a existência de metanogênicas acetoclásticas (Tabela 5.16). Pela Figura 5.65 pode se observar que o grânulo claro quando alimentado com acetato somente apresentou microrganismos com morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp., com crescimento em abundância. Para o grânulo claro o cultivo em acetato foi o que apresentou maior porcentagem de metano. Porém, na presença de sulfato a mais baixa porcentagem de metano foi observada (18,33%). Essa condição foi menos favorável ao crescimento de metanogênicas.

Ainda em relação aos grânulos claros cultivados em metanol, verificou-se valor de metano praticamente igual ao cultivo na presença e ausência de sulfato. Foi observado crescimento celular intenso na presença de sulfato, o que não se observou em sua ausência.

Tabela 5.16. Resultados dos testes com os grânulos.

Grânulo	Substrato	Observação Visual	Presença metano (%)	Presença sulfeto	Microscopia	Observações
Claro sem sulfato	Acetato	Pouquíssimo turvo com grânulos definidos escuros	38,41		Figura 5.65	
	Metanol	Pouquíssimo turvo com grânulos grandes, definidos escuros	23,90			
	Lactato	Pouco turvo com grânulos pequenos	14,61		Figura 5.66	
	Propionato	Pouquíssimo turvo com grânulos em posinho	5,40		Figura 5.66	
	Butirato	Pouquíssimo turvo com grânulos em posinho	8,17			
Claro com sulfato	Acetato	Bastante turvo flocos brancos	18,33	-		
	Metanol	Bastante turvo grânulos brancos	29,37	-		
	Lactato	Bastante turvo grânulos brancos	38,71	±		Presença de gás
	Propionato	Turvo com flocos brancos e pequenos grânulos pretos superfície	28,54	+		Odor de sulfeto
	Butirato	Turvo com flocos brancos	44,00	-		
Escuro sem sulfato	Acetato	Pouco turvo com grânulos em posinho	6,54			
	Metanol	Pouco turvo com grânulos em posinho	-			
	Lactato	Turvo e com grânulos escuros no fundo	16,81			Presença de gás
	Propionato	Turvo com grânulos em posinho	3,93			Presença de gás
	Butirato	Pouco turvo com grânulos em posinho	34,50			Presença de gás
Escuro com sulfato	Acetato	Bastante turvo com flocos claros e grânulos claros e escuros	34,26	-		
	Metanol	Bastante turvo com flocos claros	17,91	-		
	Lactato	Bastante turvo com grânulos pequenos e escuros	49,32	+		Odor de sulfeto
	Propionato	Turvo com grânulos pequenos e escuros	27,66	±		
	Butirato	Turvo com flocos brancos e grânulos pequenos escuros	34,90	-	Figura 5.67	

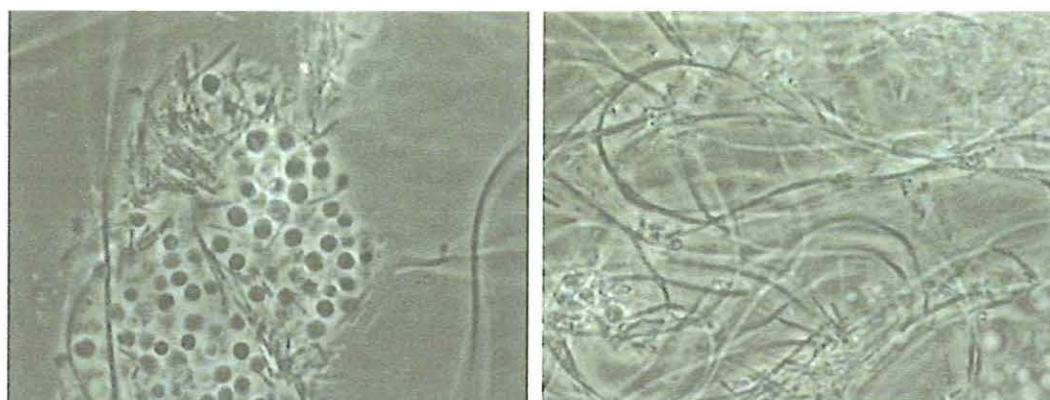


Figura 5.65. Microscopia de luz comum do grânulo claro quando cultivado em acetato.

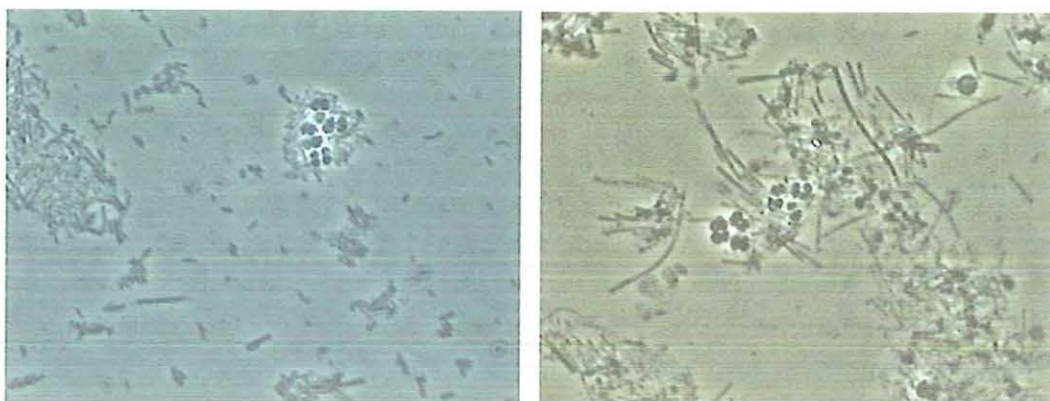


Figura 5.66. Microscopia de luz comum do grânulo claro quando cultivado em (a) propionato e (b) lactato.

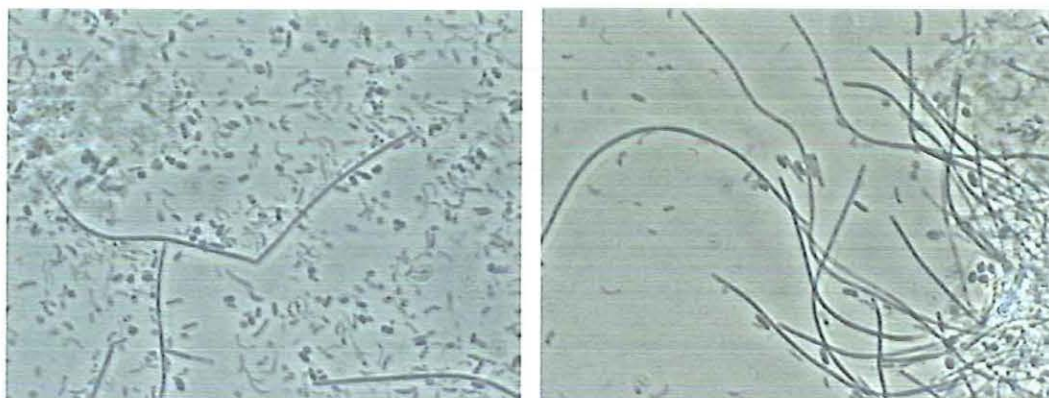


Figura 5.67. Microscopia de luz comum do grânulo escuro quando cultivado em butirato mais sulfato.

No cultivo em propionato somente morfologias semelhantes a *Metanosarcina* sp. em baixa quantidade puderam ser atestadas (Figura 5.66). Já, na presença de butirato não foram verificadas morfologias semelhantes às metanogênicas, o que pode ser confirmado pela baixa produção de metano para estes dois últimos ensaios, com valores iguais a 5,4% e 8,17 % para o propionato e butirato, respectivamente (Tabela 5.16).

Assim, nos ensaios sem sulfato para os grânulos claros, lactato, propionato e butirato tiveram baixa produção de metano, principalmente se comparado com os resultados na presença de sulfato. Quando cultivado com sulfato, os grânulos claros apresentaram um comportamento praticamente inverso, onde foi verificada uma alta porcentagem de metano nos ensaios com propionato e lactato, mas principalmente em butirato. O ensaio em butirato apresentou alta porcentagem de metano (44,0%), porém sem produção de sulfeto, indicando que as metanogênicas cresceram bem nesta condição, provavelmente na presença de acidogênicas (Figura 5.66).

Na presença de sulfato, lactato e propionato também tiveram alta produção de metano, mesmo com produção de sulfeto, sendo esta produção maior para o propionato. No cultivo em lactato foi verificada a presença de morfologias metanogênicas concomitante com a presença de bacilos retos, provavelmente BRS em grande quantidade atestado pela presença de precipitados típicos de compostos de sulfeto no meio de cultivo. Para o cultivo em propionato foi verificada uma alta produção de sulfeto, além da produção de metano. Para estes dois cultivos observaram-se pequenos bacilos e pontos escuros, provavelmente precipitados de sulfeto. Em butirato, os pontos escuros também foram verificados.

Constatou-se para os grânulos escuros, o inverso ao observado para os grânulos claros. Foram atingidos baixos valores de metano nos ensaios com acetato e na ausência de sulfato. Porém, na presença de sulfato uma porcentagem igual a 34% de metano no biogás foi encontrada. Nestes ensaios, morfologias semelhantes foram verificadas tanto na presença como ausência de sulfato. No entanto, na presença do sulfato, a morfologia predominante foi abundante em relação às demais presentes.

Nos cultivos em metanol foi observada pouca ou nenhuma produção de metano no biogás. Sendo que não houve produção de metano na ausência de sulfato. Observou-se baixa quantidade de células, confirmada pela baixa turbidez do meio de cultivo através da observação visual dos frascos. Também foi possível afirmar a baixa presença de metanogênicas do gênero *Methanosarcina* sp. pelas análises de FISH (Tabela 5.17). Entretanto, este grupo permaneceu no lodo do reator até concentrações de 21 mg/L de PCP, como verificada pela microscopia de varredura.

Os resultados obtidos dos cultivos em acetato e metanol indicaram que as metanogênicas que compuseram os grânulos escuros pareceram depender dos teores de sulfato presentes no meio.

Na ausência do sulfato, o butirato foi a fonte orgânica que também apresentou boa porcentagem de metano no biogás, de 34,50%. Pelas análises microscópicas foi observada abundância de células em formato de bacilos retos e de cocos. Na presença do sulfato, a porcentagem de metano no biogás foi muito semelhante, 34,90%. Entretanto, as formas de células observadas atestaram a existência de diferentes populações para os dois cultivos. O cultivo em butirato e sulfato apresentou crescimento de morfotipos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e bacilos curvos. Neste ensaio não determinou-se produção de sulfeto, o que sugere um consumo de sulfato para síntese celular.

Os grânulos escuros quando cultivados em propionato produziram biogás, mas baixa porcentagem de metano foi encontrada (4%). Os exames microscópicos revelaram poucas células no meio, e predomínio de bacilos. Na presença do sulfato, observou-se crescimento intenso, com morfologias de bacilos curvos e retos, metano na ordem de 27,6% e formação de sulfeto.

O cultivo em lactato na presença do sulfato, apresentou o maior valor de metano em composição no biogás encontrado nos testes, 49,32%, além de boa produção de sulfeto. Portanto, houve crescimento de organismos metanogênicos e redutores de sulfato concomitantemente.

Quanto a degradação de compostos como o butirato sem a produção de sulfeto, mesmo na presença de sulfato e crescimento de organismos metanogênicos, verificados pela presença de morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. (Figura 5.67), explica-se pelo fato da existência de organismos acidogênicos em relação sintrófica com as metanogênicas, uma vez que metano foi verificado nos ensaios (35%), ou mesmo pelo uso do composto na síntese celular como anteriormente pontuado. O sulfato é um elemento importante no crescimento das metanogênicas, fato que explica seu melhor desenvolvimento na presença de sulfato, quando cultivados em substratos não utilizados diretamente por estes microrganismos, mas gerados pela relação sintrófica com outros microrganismos acidogênicos do meio. Nessas condições, o papel essencial na manutenção de baixos potenciais redox pela remoção do hidrogênio pelas metanogênicas é que mantém o papel das acidogênicas na produção de ácidos como o acético, além do hidrogênio e dióxido de carbono. Este fato sugere uma importante relação sintrófica particular envolvendo microrganismos metanogênicos e acidogênicos desenvolvidos nos grânulos do RAH.

O sulfato, em certas concentrações, estimula a metanogênese como verificado em trabalhos sobre a estimulação do metabolismo produtor do metano pela adição de sulfato ao meio, sobretudo por sua ação na coenzima M, importante fator enzimático na via final metabólica de produção do metano, e que contém sulfito em sua estrutura molecular (TAYLOR & WOLFE² *apud* PATEL *et al.* (1978).

Assim, o resultado apresentado neste trabalho envolvendo os microrganismos, sugere que as metanogênicas presentes no lodo cresceram melhor na presença de organismos acidogênicos utilizadores de lactato, cuja relação sintrófica favoreceu os dois grupos. Não se pode afirmar quais dos grupos sintróficos no consórcio metanogênico foram predominantes na degradação do lactato, se as BRS oxidadoras incompletas (*Desulfovibrio* sp.) ou as acidogênicas fermentativas anaeróbias típicas

Este fato foi bem comentado na citação de TOLKER-NIELSON & MOLIN (2000), cujo trabalho abordou a degradação de propionato e butirato sendo realizada por acidogênicas, e esta conversão ocorrendo se um consumo de hidrogênio no sistema fosse conduzido por outro organismo. Caso sulfato estivesse presente no meio, as BRS do gênero *Desulfobulbus* sp. converteriam propionato e sulfato a acetato e sulfeto de hidrogênio independentemente da concentração de hidrogênio ou formiato no sistema.

A presença de diferentes cores para os grânulos anaeróbios também foi observada por THAVEESRI *et al.* (1995), em reatores do tipo UASB quando alimentado com uma mistura de ácidos voláteis (acético, propiônico e butírico), denominados pelos autores de grânulos branco e preto. Quando o reator foi alimentado com 90% da mesma mistura de ácidos voláteis acrescida de 10% de sacarose apareceram também grânulos cinzas. No reator com 70% da mistura de ácidos e 30% de sacarose somente grânulos cinzas e brancos foram encontrados. Os grânulos pretos apresentaram a maior AME com baixa atividade acidogênica específica (AAE) e os grânulos brancos tiveram uma alta AME e baixa AAE. Já os grânulos cinzas tiveram a maior AAE e considerável AME. Estes resultados foram próximos aos encontrados neste trabalho de doutorado, cujos grânulos claros e escuros apresentaram, além de morfologias semelhantes a gêneros metanogênicos, metano nos ensaios com todos os tipos de grânulos.

Os grupos metanogênicos presentes nos grânulos foram verificados também pela técnica de hibridação *in situ*, aplicada nas amostras de lodos escuros e claros, antes e após a adição de PCP (Tabela 5.16). Foi possível observar que houve um predomínio do gênero *Methanosaeta* sp. nos dois tipos de grânulos. O mesmo foi verificado no lodo retirado

²TAYLOR, C. D.; WOLFE, R. S (1974). Structure and methylation of coenzyme M (HSCH₂CH₂SO₃). *Journal of Biological Chemistry*, v.249, p.4879-85.

diretamente do RAH, nos períodos com e sem PCP. Entretanto, não foi verificada a presença de morfologias semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp., nem de bactérias pela técnica FISH, mas verificadas pelos testes com os grânulos, assim como pelas contagens de ordem de grandeza microbiana e sob microscopia de varredura. Possíveis dificuldades em relação a metodologia FISH, já comentadas no item 5.2.5, podem justificar essa não leitura de grupos microbianos observadas por outras técnicas. Trabalho como o de LARIZZATTI (1997), mostrou a presença de *Methanosarcina* sp. em ensaios em batelada degradando PCP, na presença de meio de cultura e ácidos orgânicos bastante semelhantes aos adotados na presente pesquisa.

Tabela 5.17. Caracterização de grupos microbianos pertencentes ao Domínio *Archaea* e presença de BRS através da técnica de hibridação *in situ* - FISH.

Conc. de PCP no grânulo (mg/L)	Sonda ARC915 (%)	Sonda EUB338 (%)	Sonda MSMX860 (%)	Sonda MSMX860 ¹ (%)	Sonda MSMX860 ² (%)	SRB385 ³ (%)
0 Grânulo Claro	95,1 (±4,8)	0,1 (±0,1)	91,2 (±5,5)	85,6 (±7,2)	2,2 (±1,0)	ND
0 Grânulo Escuro	96,4 (±8,0)	0	97,6 (±5,1)	94,6 (±4,5)	0,8 (±0,4)	ND
21 Grânulo Claro	99,5 (±3,1)	0	96,2 (±4,1)	91,1 (±6,8)	1,6 (±1,3)	ND
21 Grânulo Escuro	93,5 (±7,8)	0	94,3 (±4,5)	94,3 (±4,5)	0	ND

ND: não detectado; ¹Células detectadas com MSMX860 e com morfologia de *Methanosaeta* sp.; ²Células detectadas com MSMX860 e com morfologia de *Methanosarcina* sp.; ³Células de Bactérias Redutoras de Sulfato.

Os resultados da presente tese de doutorado sugerem a existência de uma relação sintrófica entre organismos utilizadores de lactato, propionato e butirato com metanogênicas acetotróficas e hidrogenotróficas. Pela verificação do lodo do RAH, a diversidade microbiana foi baixa indicando grande especificidade às fontes orgânicas utilizadas. Além disto, os resultados dos ensaios após a adição de PCP sugerem que esta relação foi importante na remoção do PCP, nas condições experimentais.

Estudos envolvendo a degradação do PCP por consórcios metanogênicos, como o trabalho de STUART & WOODS (1998), indicaram que a desalogenação redutiva do PCP pode ser dependente da atividade metanogênica em cultura mista alimentada por acetato. A degradação do PCP foi verificada também em relação sintrófica de grupos microbianos,

alguns envolvendo organismos formadores de esporos, como comentado por JUTEAU *et al.* (1996). Nesse trabalho, foi verificada uma íntima associação entre organismos metanogênicos e bactérias formadoras de esporos, que pareceu colaborar com a ótima eficiência de descloração do PCP.

A biodegradação anaeróbia do PCP foi verificada no RAH como uma estreita associação com a presença de microrganismos metanogênicos, indicando que tanto as metanogênicas do gênero *Methanosaeta* sp. como as do gênero *Methanosarcina* sp. possam estar envolvidas no processo de degradação anaeróbia do PCP, em sistemas alimentados com uma mistura de ácidos orgânicos (acético, propiônico, butírico e láctico) e do metanol por lodo granulado.

6. CONCLUSÕES

Foi verificada AME média igual a 0,0527 g DQO-CH₄/g SV.d para o lodo inoculado no RAH com morfologias típicas de lodos anaeróbios, principalmente semelhantes a *Methanosaeta* sp. , e conteúdo de SV igual a 0,011 g SV/g lodo.

No período sem adição de PCP, o RAH manteve-se estável, com pH do efluente entre 7,0 e 8,0; um valor de remoção de DQO acima de 90%, a carga orgânica aplicada em torno de 6,88 g DQO/L; eficiência de conversão DQO/biogás em torno de 0,27 L/g DQO aplicada; composição de metano no biogás em média de 84% e remoção de ácidos orgânicos em torno de 99%.

No período com adição de concentrações progressivas do PCP, verificou-se que estas não afetaram drasticamente a performance total do reator. Os valores obtidos para a composição de metano e cloretos não apresentaram reduções acentuadas. O conteúdo de SV no reator não oscilou muito e manteve-se entre 0,025 e 0,034 g SV/g lodo nos períodos com e sem adição de PCP, respectivamente. Entretanto, valores para os parâmetros de DQO (em torno de 88%) e fator de conversão DQO/biogás (igual a 0,17 L/g) mostraram uma ligeira queda no início da adição de PCP (entre 2 e 4 mg/L). A remoção de ácidos voláteis foi um dos parâmetros analisados, em que o RAH apresentou maior variação, no início da adição de PCP. O ácido propiônico mostrou ser o ácido mais afetado e o butírico o menos. O ácido acético apresentou uma ligeira queda de remoção à concentração de 4 mg/L de PCP. No intervalo de adição de PCP, anterior a concentração de 15,6 mg/L de PCP, o sistema apresentou boa eficiência com valores de remoção de ácidos voláteis na ordem de 99%. À concentrações superiores a 15,6 mg/L de PCP os ácidos acético, propiônico e butírico mostraram uma remoção média de 74%, 64% e 93%, respectivamente.

A remoção de PCP pelo sistema foi acima de 96 % durante todas as etapas de adição deste composto. Não foi identificado nenhum intermediário metabólico clorado.

Os resultados dos testes de toxicidade I e II mostraram valor de IC₅₀ igual a 10,12 e 13,69 mg/L de PCP, respectivamente. Na presença de sulfato foi verificado que até 5 mg/L de PCP, o sulfato favoreceu o processo anaeróbio. A partir dos testes de toxicidade I e II, a concentração de 4 mg/L de PCP foi considerada o limite da inibição. Os resultados do teste

de toxicidade III mostraram que tanto a produção de biogás como a composição de metano foram afetadas pela presença do PCP; o PCP foi degradado em todas as concentrações estudadas, até 20 mg/L. Nos testes de toxicidade o ácido propiônico também pareceu ser o ácido mais afetado pela presença de PCP. Acima de 6 e 5 mg/L de PCP, respectivamente para o teste de toxicidade II e III, a remoção do ácido propiônico foi baixa. O valor encontrado para a relação de PCP/SV para o sistema contínuo na concentração mais alta de PCP (21 mg/L ou 78 μ M) foi igual a 1,34 mg PCP/g SV. Nestas condições, o RAH mostrou ser ligeiramente afetado pela diminuição da remoção de ácidos voláteis, porém removendo o PCP do sistema. Nos testes de toxicidade I, II e III, estas relações foram iguais a 1,25 mg PCP/g SV em 4 mg/L de PCP, 1,27 mg PCP/g SV em 6 mg/L de PCP e 1,11 mg PCP/g SV a 5 mg/L de PCP, respectivamente, mostrando que o potencial de inibição no sistema contínuo foi menor.

A metodologia para verificação do efeito tóxico de um composto ao sistema anaeróbio mostrou-se eficiente, uma vez que a partir dos resultados obtidos foi possível determinar uma concentração inicial de inibição do composto tóxico ao sistema.

Os valores de ordem de grandeza para os grupos microbianos presentes no lodo do RAH foram: de 10^8 céls./mL para as BRS nas amostras em lactato e sulfato antes da adição do PCP e 10^5 céls./mL após a adição de PCP; metanogênicas em lactato mais sulfato da ordem de 10^6 céls./mL, durante todos os períodos de operação do RAH; metanogênicas em metanol iguais a 10^6 e 10^5 céls./mL, respectivamente, antes e depois da adição de PCP.

Verificou-se através da técnica molecular FISH o predomínio de metanogênicas cuja morfologia se relaciona ao gênero *Methanosaeta* sp. e que sua porcentagem no lodo do RAH aumentou no período de adição de PCP. O gênero *Methanosarcina* sp. também foi verificado nos grânulos, porém revelou-se mais sensível a adição do PCP.

Quanto ao teste com os grânulos, foi verificado que tanto no grânulo claro como no escuro, metanogênicas estavam presentes e estas cresceram melhor na presença de sulfato para os cultivos em lactato, propionato e butirato. Em acetato, metanogênicas apresentaram bom crescimento somente na ausência de sulfato para os grânulos claros e na presença de sulfato para os grânulos escuro. Em metanol, foi verificado bom crescimento de metanogênicas independente da presença de sulfato para os grânulos claros e maior nos grânulos escuros.

Foi verificado um consórcio microbiano, considerando-se os valores de contagens, técnica FISH e exames de microscopia, mostrando uma organização entre espécies

utilizadoras de lactato e metanogênicas, em que intermediários metabólicos como o hidrogênio no reator foram muito importantes.

O RAH apresentou uma boa eficiência no período de adição de PCP, provavelmente devido a:

- a baixa relação existente entre PCP/SV com taxa específica de remoção de PCP igual a 1,07 mg PCP/g SV.d, à concentração de 21,0 mg/L de PCP;
- a relação da DQO/PCP no sistema alta o bastante para que a remoção do PCP, nas condições trabalhadas, ocorresse. Esta relação, na concentração mais alta de PCP foi de 0,33 g DQO/ mg PCP (327,6 g/g);
- presença de uma comunidade microbiana anaeróbia eficiente e estável, com morfologias típicas de sistemas anaeróbios, principalmente metanogênicas dos gêneros *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp.

7. ANEXOS

ANEXO A

Planilha com os dados de rotina determinados durante o tempo de funcionamento do
Reator Anaeróbio Híbrido

Rotina Reator Anaeróbio Híbrido

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. Int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluarnte (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/ carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações		
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		% CH4	% CO2	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída			
21/02/1998	0					0,72	182,0																
22/02/1998	1					0,66	166,0																
23/02/1998	2					0,76	192,0																
24/02/1998	3					0,76	192,0																
25/02/1998	4					0,00	0,0																
26/02/1998	5	6,30	7,20			0,75	190,0																
27/02/1998	6	6,80	7,30		36,0	0,99	250,0																
28/02/1998	7					0,00	0,0																
01/03/1998	8					0,00	0,0																
02/03/1998	9					0,00	0,0																
03/03/1998	10					0,58	148,0										4,63	0,339	92,68				
04/03/1998	11					0,72	183,0																
05/03/1998	12					0,74	188,0																
06/03/1998	13		7,60		35,0	0,00	0,0																
07/03/1998	14					0,00	0,0																
08/03/1998	15					0,00	0,0																
09/03/1998	16					0,00	0,0										5,19	0,632	87,83				
10/03/1998	17					1,57	397,0																
11/03/1998	18					1,52	386,0																
12/03/1998	19					0,00	0,0																
13/03/1998	20					1,50	380,0																
14/03/1998	21					1,64	415,0																
15/03/1998	22					1,56	396,0										4,90	0,923	81,16				
16/03/1998	23		7,26		32,0	1,59	402,0																
17/03/1998	24	6,90	7,24		34,5	1,70	430,0																
18/03/1998	25	6,90	7,10		35,5	1,54	390,0																meio de cultivo sem lactato (DQO = 4,96 g/L)
19/03/1998	26	7,60	7,15		35,5	2,25	410,0																meio de cultivo com lactato (DQO = 6,88 g/L)
20/03/1998	27					2,19	400,0																
21/03/1998	28					2,08	380,0																
22/03/1998	29					2,25	410,0																
23/03/1998	30					2,26	413,0										6,01	1,377	77,07				
24/03/1998	31	7,25	7,25		35,5	2,17	396,0										6,01	1,641	72,69				meio de cultivo com extrato de levedura
25/03/1998	32		7,25		34,5	2,12	387,0																
26/03/1998	33	7,55	7,35		33,5	2,11	385,0																
27/03/1998	34	7,35				2,19	400,0																
28/03/1998	35					2,14	390,0																
29/03/1998	36		7,45		33,5	2,33	425,0																
30/03/1998	37					2,25	410,0																
31/03/1998	38	7,30	7,40		35,5	2,30	420,0																
01/04/1998	39					0,00	0,0																
02/04/1998	40	7,40	7,46		33,5	2,14	390,0										6,01	0,837	86,06				
03/04/1998	41					2,14	390,0																
04/04/1998	42	7,20	7,60		33,5	2,11	385,0																
05/04/1998	43		7,60		33,0	2,19	400,0																
06/04/1998	44	7,40	7,50		35,5	2,27	415,0																
07/04/1998	45					2,27	415,0																
08/04/1998	46		7,60		35,0	2,00	365,0										5,93	0,593	90,01				
09/04/1998	47	7,25				2,25	410,0																
10/04/1998	48					2,03	370,0																

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluernte (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/ carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações	
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		% CH4	% CO2	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída		
11/04/1998	49					0,00	0,0															
12/04/1998	50		7,60		34,5	2,22	405,0															
13/04/1998	51	7,20	7,60		35,5	2,30	420,0															
14/04/1998	52		7,50		36,0	2,22	405,0										5,75	0,159	97,23			
15/04/1998	53		7,60		34,5	2,16	395,0															
16/04/1998	54		7,60		35,0	2,16	395,0															
17/04/1998	55					3,18	580,0															
18/04/1998	56					0,00	0,0															
19/04/1998	57					3,45	630,0															
20/04/1998	58					3,29	600,0															
21/04/1998	59		7,50		36,0	3,21	585,0															
22/04/1998	60		7,60		35,0	3,29	600,0															
23/04/1998	61	7,10	7,45		35,0	3,59	655,0															
24/04/1998	62	7,10				3,51	640,0										4,54	0,349	92,33			
25/04/1998	63					3,07	560,0															
26/04/1998	64					3,53	645,0															
27/04/1998	65		7,45		34,0	2,41	440,0															
28/04/1998	66					3,59	655,0															
29/04/1998	67		7,45		34,0	3,48	635,0															
30/04/1998	68					0,00	0,0															
01/05/1998	69	7,15	7,70		34,0	3,48	635,0															
02/05/1998	70		7,60		34,5	3,61	658,0															
03/05/1998	71					3,18	580,0															
04/05/1998	72		7,60		34,0	3,56	650,0															
05/05/1998	73	7,30	7,60		32,0	3,53	645,0															
06/05/1998	74	7,10	7,70		34,0	3,59	655,0															
07/05/1998	75	7,10	7,50		32,0	3,53	645,0															
08/05/1998	76	7,10				3,51	640,0										4,34	0,521	87,99			
09/05/1998	77	7,10				3,51	640,0															
10/05/1998	78	7,30				3,40	620,0															
11/05/1998	79	7,30	7,50		33,5	3,34	610,0															
12/05/1998	80	7,30	7,50		33,0	3,34	610,0										4,16	0,908	78,16			
13/05/1998	81	7,30	7,60		35,0	3,34	610,0															
14/05/1998	82					3,53	645,0															
15/05/1998	83				34,0	3,67	670,0															
16/05/1998	84					3,42	625,0															
17/05/1998	85	7,30	7,50		34,0	3,34	610,0															
18/05/1998	86	7,50				2,55	465,0															
19/05/1998	87	7,50			34,5	3,53	645,0															
20/05/1998	88	7,50	7,50		34,0	3,48	635,0															
21/05/1998	89	7,20				4,63	845,0															
22/05/1998	90	7,20				3,62	660,0															
23/05/1998	91					0,00	0,0															
24/05/1998	92					4,58	835,0															
25/05/1998	93					1,37	250,0															início da recirculação
26/05/1998	94					4,36	795,0															
27/05/1998	95	7,10				4,41	805,0															
28/05/1998	96					4,19	765,0															
29/05/1998	97					4,47	815,0															
30/05/1998	98					2,79	510,0															
31/05/1998	99					4,36	795,0															
01/06/1998	100		7,80		33,0	4,58	835,0															

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluarate (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações	
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída		
																						CH4
02/06/1998	101				31,0	3,26	595,0															
03/06/1998	102	7,46	7,86		35,0	3,29	600,0										6,61	0,132	98,00			
04/06/1998	103					4,12	752,0															
05/06/1998	104					3,45	630,0															
06/06/1998	105					4,30	785,0															
07/06/1998	106					3,26	595,0															
08/06/1998	107					0,00	0,0										6,52	0,124	98,10			
09/06/1998	108					4,27	780,0															
10/06/1998	109					4,22	770,0															
11/06/1998	110					4,44	810,0															
12/06/1998	111		8,30		34,0	4,60	840,0															
13/06/1998	112					4,08	745,0															
14/06/1998	113		7,90		32,0	4,58	835,0															
15/06/1998	114					2,47	450,0															
16/06/1998	115					0,00	0,0															
17/06/1998	116		8,38		33,0	4,30	785,0										6,77	0,248	96,34			
18/06/1998	117					4,25	775,0															
19/06/1998	118					4,55	830,0															
20/06/1998	119					0,00	0,0															
21/06/1998	120					4,71	860,0															
22/06/1998	121					3,53	645,0										6,16	0,229	96,29			
23/06/1998	122					4,55	830,0															
24/06/1998	123					4,49	820,0															
25/06/1998	124					3,18	580,0															
26/06/1998	125					4,25	775,0															
27/06/1998	126					4,19	765,0															
28/06/1998	127					0,00	0,0															
29/06/1998	128					4,27	780,0															
30/06/1998	129					5,65	945,0										6,13	0,077	98,75			ligação do gasômetro (teste)
01/07/1998	130					4,93	825,0															
02/07/1998	131					4,69	785,0															
03/07/1998	132					5,05	845,0															Adição de 10 mL de lodo no reator
04/07/1998	133					5,08	850,0															
05/07/1998	134					4,99	835,0															
06/07/1998	135		8,25		36,0	4,54	760,0															(+ 10 mL de lodo)
07/07/1998	136		8,13		36,0	5,44	910,0										6,40	0,113	98,23			(+ 10 mL de lodo)
08/07/1998	137					5,11	855,0															(+ 10 mL de lodo)
09/07/1998	138					1,58	265,0															(+ 10 mL de lodo) / alimentação individual
10/07/1998	139					0,00	0,0															A cúpula do reator se desprende
11/07/1998	140					0,00	0,0															
12/07/1998	141					0,00	0,0															
13/07/1998	142					4,09	685,0															(+ 10 mL de lodo) / reinício
14/07/1998	143		8,15		34,0	4,64	776,0															(+ 10 mL de lodo)
15/07/1998	144				33,0	4,51	755,0										5,81	0,265	95,43			(+ 10 mL de lodo)
16/07/1998	145		8,31		32,0	4,78	800,0															
17/07/1998	146					3,71	620,0															
18/07/1998	147					3,89	650,0															
19/07/1998	148					4,72	790,0															
20/07/1998	149					4,54	760,0															
21/07/1998	150					5,17	865,0															
22/07/1998	151					4,78	800,0															
23/07/1998	152					4,18	700,0															

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Melo	Temp. amb. C	Temp. Int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluente (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Camp.média		DQO média			Cloretos		Observações		
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída			
																						CH4	CO2
24/07/1998	153					4,78	800,0																
25/07/1998	154					4,24	710,0																
26/07/1998	155					4,33	725,0																
27/07/1998	156					4,78	800,0																
28/07/1998	157					4,78	800,0										6,51	0,043	99,34				
29/07/1998	158					4,78	800,0																
30/07/1998	159					4,69	785,0																
31/07/1998	160					4,78	800,0																
01/08/1998	161					0,00	0,0																
02/08/1998	162					4,78	800,0																
03/08/1998	163					4,06	680,0										6,51	0,096	98,53				
04/08/1998	164					4,78	800,0																
05/08/1998	165					4,78	800,0																
06/08/1998	166					4,78	800,0																
07/08/1998	167					4,63	775,0																
08/08/1998	168					4,78	800,0																
09/08/1998	169					4,78	800,0																
10/08/1998	170					4,96	830,0																
11/08/1998	171					4,78	800,0																
12/08/1998	172					4,78	800,0										6,28	0,082	98,69				
13/08/1998	173	6,40	8,28		32,0	4,78	800,0																
14/08/1998	174					2,39	400,0																
15/08/1998	175	6,40				4,78	800,0																
16/08/1998	176					5,38	900,0																
17/08/1998	177					4,78	800,0																
18/08/1998	178					4,78	800,0						81,18	18,82		8,00	1,139	85,75					
19/08/1998	179		7,90		34,0	4,78	800,0																
20/08/1998	180		7,76		34,0	4,03	675,0																
21/08/1998	181					4,78	800,0																
22/08/1998	182		7,90		34,0	4,78	800,0																
23/08/1998	183					4,78	800,0																
24/08/1998	184		7,85		34,0	4,78	800,0																
25/08/1998	185				31,0	4,78	800,0										8,00	0,569	92,88				
26/08/1998	186					4,78	800,0																
27/08/1998	187		7,75		34,0	4,78	800,0																
28/08/1998	188		7,85		33,0	4,78	800,0																
29/08/1998	189					4,78	800,0																
30/08/1998	190					4,78	800,0																
31/08/1998	191		7,79		32,0	4,78	800,0																
01/09/1998	192	7,20	7,90		33,0	4,78	800,0																
02/09/1998	193		7,83		35,0	4,78	800,0																
03/09/1998	194					4,78	800,0																
04/09/1998	195					2,69	450,0																
05/09/1998	196					4,78	800,0																
06/09/1998	197					4,78	800,0																
07/09/1998	198					4,78	800,0																
08/09/1998	199					4,78	800,0																
09/09/1998	200		8,09		34,0	3,74	625,0																
10/09/1998	201					4,78	800,0																
11/09/1998	202		8,00		33,0	4,78	800,0																
12/09/1998	203					4,00	670,0																
13/09/1998	204					4,78	800,0																

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluernte (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações		
								Inicial	Final		(cm ³)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída			
																						CH4	CO2
14/09/1998	205		7,70		32,0	4,78	800,0																
15/09/1998	206					4,78	800,0																
16/09/1998	207					3,89	650,0																
17/09/1998	208					4,78	800,0																
18/09/1998	209					4,78	800,0																
19/09/1998	210					4,78	800,0																
20/09/1998	211					4,78	800,0																
21/09/1998	212		7,85		30,0	4,78	800,0																
22/09/1998	213		7,89		28,0	4,78	800,0																gasômetro desconectado
23/09/1998	214					4,38	800,0																
24/09/1998	215	6,95				4,38	800,0																
25/09/1998	216	6,94	7,90		32,0	3,62	660,0																
26/09/1998	217					4,38	800,0																
27/09/1998	218					4,38	800,0																
28/09/1998	219		7,90		31,0	4,38	800,0																
29/09/1998	220	7,06	7,80		29,0	4,38	800,0																
30/09/1998	221	7,04				4,38	800,0																
01/10/1998	222					4,38	800,0																
02/10/1998	223	6,94	8,00		32,0	4,38	800,0					83,18	16,82	5,75	0,310	94,61							
03/10/1998	224					4,38	800,0																
04/10/1998	225					4,38	800,0																
05/10/1998	226	6,96	7,80		35,0	4,38	800,0																
06/10/1998	227	7,04	7,90		31,0	4,38	800,0																
07/10/1998	228	6,50	8,10		31,0	2,85	520,0																
08/10/1998	229		8,10		31,0	4,38	800,0																
09/10/1998	230					4,38	800,0																
10/10/1998	231					4,38	800,0																
11/10/1998	232					0,00	0,0																
12/10/1998	233					4,38	800,0																
13/10/1998	234					4,38	800,0																
14/10/1998	235					4,38	800,0																
15/10/1998	236					4,38	800,0																
16/10/1998	237					4,38	800,0																
17/10/1998	238					4,16	760,0																
18/10/1998	239					4,38	800,0																
19/10/1998	240					4,38	800,0																
20/10/1998	241					4,38	800,0																
21/10/1998	242					4,38	800,0																
22/10/1998	243					4,38	800,0																
23/10/1998	244					4,38	800,0																
24/10/1998	245					4,38	800,0																
25/10/1998	246					4,38	800,0																
26/10/1998	247					4,38	800,0																
27/10/1998	248		8,00		33,0	4,38	800,0																
28/10/1998	249					4,38	800,0																
29/10/1998	250	6,90	7,80		35,0	4,38	800,0																
30/10/1998	251					4,38	800,0																
31/10/1998	252					4,38	800,0																
01/11/1998	253					4,38	800,0																
02/11/1998	254					4,38	800,0																
03/11/1998	255					4,38	800,0																
04/11/1998	256	6,80	7,90		33,0	4,38	800,0																

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluarnte (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações		
								Inicial	Final		(cm ³)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída			
																						CH4	CO2
05/11/1998	257	6,80				4,38	800,0																
06/11/1998	258					4,38	800,0																
07/11/1998	259					4,38	800,0																
08/11/1998	260					4,38	800,0																
09/11/1998	261					2,74	500,0																
10/11/1998	262		7,89		33,5	4,38	800,0																
11/11/1998	263	6,90			34,0	4,38	800,0										6,75	0,313	95,37				
12/11/1998	264					4,38	800,0																
13/11/1998	265					4,38	800,0																
14/11/1998	266					4,38	800,0																
15/11/1998	267					4,38	800,0																
16/11/1998	268					4,38	800,0																
17/11/1998	269	6,70	7,88		33,0	4,78	800,0	1	2,9	708,44	0,708	0,320											sem gasômetro
18/11/1998	270	6,70	8,00		32,0	4,78	800,0	3	11,5	1530,89	1,531	0,306					7,59	0,379	95,01				com gasômetro
19/11/1998	271					4,78	800,0	6	3,9	1461,67	1,462	0,313											altura do meio líquido variável (27,5 cm)
20/11/1998	272					4,78	800,0	8	11,7	1498,32	1,498	0,334											
21/11/1998	273					4,78	800,0	11	7,4	1596,03	1,596	0,370											
22/11/1998	274					0,00	0,0																
23/11/1998	275					4,78	800,0	14	0,0	1771,11	1,771	0,298											
24/11/1998	276	7,07	7,78		35,5	4,78	800,0	16	6,0	1425,03	1,425	0,280											
25/11/1998	277	7,07	7,84		36,0	3,32	556,0	18	9,9	1339,53	1,340	0,360					6,99	0,535	92,35				
26/11/1998	278		8,04		32,0	4,78	800,0	20	10,3	1197,02	1,197	0,341											
27/11/1998	279		8,07		34,0	4,78	800,0	23	6,8	1628,61	1,629	0,336											
28/11/1998	280	6,94				4,78	800,0	26	2,8	1608,25	1,608	0,330											
29/11/1998	281					4,78	800,0	28	12,5	1575,68	1,576	0,335											
30/11/1998	282	6,84	7,87		33,0	4,78	800,0	31	8,3	1600,10	1,600	0,335											
01/12/1998	283	6,83	7,88		36,0	4,78	800,0	34	4,2	1604,18	1,604	0,279											
02/12/1998	284					0,00	0,0	36	8,0	1335,46	1,335												
03/12/1998	285		8,03		34,0	4,18	700,0					0,282											
04/12/1998	286		7,93		34,0	4,78	800,0	38	8,0	1180,74	1,181	0,215											
05/12/1998	287					0,00	0,0	40	4,2	1026,02	1,026												
06/12/1998	288					0,00	0,0																
07/12/1998	289				34,0	4,78	800,0					0,313											
08/12/1998	290					4,78	800,0	42	12,0	1498,32	1,498												
09/12/1998	291		7,80		34,0	4,78	800,0	43	13,0	631,08	0,631	0,343											
10/12/1998	292		7,92		35,0	4,78	800,0	46	9,8	1640,82	1,641	0,276											
11/12/1998	293					4,78	800,0	48	13,2	1319,17	1,319	0,330											
12/12/1998	294					4,78	800,0	51	8,5	1579,75	1,580	0,303											
13/12/1998	295					0,00	0,0																
14/12/1998	296	7,02	8,13		35,0	4,78	800,0	54	0,6	1449,46	1,449	0,307											
15/12/1998	297	7,24	7,86		35,5	4,78	800,0	56	7,7	1469,82	1,470	0,330											
16/12/1998	298	7,02	7,92		33,5	4,78	800,0	59	3,0	1579,75	1,580	0,318					7,56	0,265	96,49				
17/12/1998	299	6,99	7,92		35,0	4,78	800,0	61	11,4	1522,75	1,523	0,328											
18/12/1998	300	7,06	8,08		35,5	4,78	800,0	64	6,4	1567,53	1,568	0,305											
19/12/1998	301					4,78	800,0	66	13,2	1457,60	1,458	0,326											
20/12/1998	302	7,03	8,14		35,5	4,78	800,0	69	8,0	1559,39	1,559	0,216											
21/12/1998	303	7,15	8,23		34,5	4,78	800,0	71	4,4	1034,16	1,034												
22/12/1998	304	7,42	8,54		36,0	4,78	800,0	74	11,5	2060,19	2,060	0,273											
23/12/1998	305					0,00	0,0																
24/12/1998	306	7,44	8,61		36,0	4,78	800,0	77	0,1	1306,96	1,307	0,276											
25/12/1998	307	7,45	8,33		36,0	4,78	800,0	79	3,5	1319,17	1,319	0,269											
26/12/1998	308	7,43	8,31		37,0	4,78	800,0	81	6,1	1286,60	1,287	0,308											

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Melo	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluente (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações	
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		% CH4	% CO2	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída		
27/12/1998	309	7,33	8,39		36,0	4,78	800,0		83	13,3	1473,89	1,474	0,305									
28/12/1998	310	7,32	8,44		36,5	4,78	800,0		86	5,6	1457,60	1,458	0,276									
29/12/1998	311	7,26	8,33		37,5	4,78	800,0		88	9,0	1319,17	1,319	0,295									
30/12/1998	312					0,00	0,0															
31/12/1998	313	7,37	8,50		35,5	4,78	800,0		91	0,1	1408,74	1,409	0,246									
01/01/1999	314					0,00	0,0															
02/01/1999	315					0,00	0,0															
03/01/1999	316					4,78	800,0		93	0,0	1176,67	1,177	0,293									
04/01/1999	317					4,78	800,0		95	5,4	1400,60	1,401	0,261									
05/01/1999	318	7,24	8,03		36,5	4,78	800,0		97	7,1	1249,95	1,250	0,249									
06/01/1999	319	7,05	8,04		35,5	4,78	800,0		99	7,4	1192,95	1,193										Gasômetro com problemas - vazando gas
07/01/1999	320	6,95	8,00		37,0	4,78	800,0		100	7,8	606,66	0,607										
08/01/1999	321					4,78	800,0		101	11,0	720,66	0,721										
09/01/1999	322					4,78	800,0															
10/01/1999	323					4,78	800,0															
11/01/1999	324	6,92	8,00		36,0	4,78	800,0		102	12,7	659,59	0,660										
12/01/1999	325	7,01	7,80		35,0	4,78	800,0		105	6,6	1522,75	1,523										
13/01/1999	326					0,00	0,0															
14/01/1999	327					4,38	800,0															
15/01/1999	328					4,38	800,0															
16/01/1999	329					4,38	800,0															
17/01/1999	330					4,38	800,0															
18/01/1999	331					4,38	800,0															
19/01/1999	332		7,97		36,0	4,38	800,0															
20/01/1999	333		8,10		35,0	4,38	800,0															
21/01/1999	334	6,95	8,00		35,0	4,38	800,0							6,97	0,423	93,92						DQO de saída instantânea
22/01/1999	335					4,38	800,0															
23/01/1999	336					4,38	800,0															
24/01/1999	337					4,38	800,0															
25/01/1999	338					4,38	800,0															
26/01/1999	339					4,38	800,0															
27/01/1999	340	7,14	7,90		34,0	4,11	750,0															
28/01/1999	341					4,38	800,0															
29/01/1999	342					4,78	800,0		3	0,0												Reconexão do gasômetro
30/01/1999	343					4,78	800,0		5	5,6	1408,74	1,409	0,289									
31/01/1999	344					4,78	800,0		7	10,5	1380,24	1,380										
01/02/1999	345	7,10			34,5	4,78	800,0		9	2,9	871,30	0,871	0,305									
02/02/1999	346	6,92	8,02		35,0	4,78	800,0		11	9,7	1457,60	1,458	0,344	73,86	26,14							
03/02/1999	347	6,96	7,85		36,0	4,78	800,0		14	6,6	1644,89	1,645	0,301									
04/02/1999	348					4,78	800,0		16	12,9	1437,24	1,437	0,318									
05/02/1999	349	7,00	7,80		33,5	4,78	800,0		19	6,8	1522,75	1,523	0,320									
06/02/1999	350					4,78	800,0		22	0,9	1530,89	1,531	0,247									
07/02/1999	351					4,78	800,0															
08/02/1999	352					0,00	0,0		24	0,9	1180,74	1,181										
09/02/1999	353	6,80	7,70		33,0	4,78	800,0		24	0,0			0,311									
10/02/1999	354	7,08	7,89		33,0	3,73	624,0		26	7,5	1486,10	1,486	0,296									
11/02/1999	355	7,05	7,93		36,0	4,78	800,0		28	5,6	1103,38	1,103	0,292									
12/02/1999	356	7,10	7,94		35,0	4,78	800,0		30	10,9	1396,53	1,397										
13/02/1999	357					4,78	800,0		31	0,0	146,57	0,147	0,251									
14/02/1999	358					1,20	200,0		33	0,5	1201,10	1,201										
15/02/1999	359					4,78	800,0															
16/02/1999	360					4,78	800,0															

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluarate (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações	
								Inicial	Final		(cm ³)	(L)		% CH4	% CO2	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída		
17/02/1999	361					4,78	800,0	35	1,7	1229,60	1,230	0,253										
18/02/1999	362					0,00	0,0															
19/02/1999	363	7,16	8,04		34,0	4,78	800,0	37	2,4	1209,24	1,209	0,277										
20/02/1999	364					4,78	800,0	39	5,9	1323,24	1,323	0,291										
21/02/1999	365					4,78	800,0	41	11,1	1392,46	1,392	0,312										
22/02/1999	366	6,86	7,80		34,0	4,78	800,0	44	4,3	1494,25	1,494	0,301										
23/02/1999	367	6,90	7,80		34,0	4,78	800,0	46	10,6	1437,24	1,437	0,308										
24/02/1999	368	7,15	7,85		34,5	4,78	800,0	49	3,3	1473,89	1,474	0,289										
25/02/1999	369					4,78	800,0	51	8,3	1384,31	1,384	0,300										
26/02/1999	370					4,78	800,0	54	0,0	1433,17	1,433	0,302										
27/02/1999	371					4,78	800,0	56	6,5	1445,39	1,445	0,298										
28/02/1999	372					4,78	800,0	58	12,5	1425,03	1,425	0,306										
01/03/1999	373	6,98	7,76		35,0	4,78	800,0	61	4,9	1461,67	1,462	0,304										
02/03/1999	374					4,78	800,0					0,304										
03/03/1999	375	7,05	7,73		34,0	4,78	800,0	66	3,9	2911,13	2,911	0,238					1606,4	1734,4				
04/03/1999	376	6,65	7,37		39,0	4,78	800,0	68	2,8	1135,95	1,136	0,279										
05/03/1999	377	6,50	7,30		35,0	4,78	800,0	70	6,6	1335,46	1,335	0,206	71,89	28,11								
06/03/1999	378					4,78	800,0	72	1,8	985,31	0,985	0,303										
07/03/1999	379	6,60	7,51		35,0	4,78	800,0	74	8,4	1449,46	1,449	0,317										
08/03/1999	380	6,64	7,58		35,0	4,78	800,0	77	2,1	1514,60	1,515	0,266										
09/03/1999	381	6,57	7,34		37,0	4,78	800,0	79	4,3	1270,31	1,270	0,285										
10/03/1999	382	6,63	7,46		36,0	4,78	800,0	81	8,8	1363,96	1,364	0,307										
11/03/1999	383	6,54	7,60		36,0	4,78	800,0	84	1,3	1465,74	1,466	0,272										
12/03/1999	384	6,53	7,47		35,0	4,78	800,0	86	4,2	1298,81	1,299	0,290										
13/03/1999	385	6,57	7,83		35,0	4,78	800,0	88	9,3	1388,39	1,388	0,297										
14/03/1999	386	6,34	7,46		35,0	4,78	800,0	91	0,7	1420,96	1,421	0,263										
15/03/1999	387	6,55	7,43		35,0	4,78	800,0	93	2,6	1258,10	1,258	0,296										
16/03/1999	388	6,10	7,49		34,0	4,78	800,0	95	8,4	1416,89	1,417	0,256										
17/03/1999	389	6,54	7,63		34,0	4,78	800,0	97	9,5	1225,53	1,226	0,327										
18/03/1999	390	6,63	7,51		34,0	4,78	800,0	100	4,4	1563,46	1,563										DQO de saída instantânea	
19/03/1999	391				34,0	4,78	800,0	101	7,5	716,59	0,717	0,276										
20/03/1999	392	6,50				4,78	800,0	103	10,9	1319,17	1,319	0,289										
21/03/1999	393	6,72				2,99	500,0	106	1,4	1384,31	1,384											
22/03/1999	394	6,75	7,42		34,0	4,78	800,0	107	0,0	533,37	0,533	0,301										
23/03/1999	395	6,46	7,32		34,0	4,78	800,0	109	6,4	1441,32	1,441	0,300										
24/03/1999	396		7,10		34,0	3,41	570,0	111	12,6	1433,17	1,433	0,288										
25/03/1999	397		7,23		34,0	4,78	800,0	113	7,7	981,23	0,981											
26/03/1999	398					0,00	0,0															
27/03/1999	399	7,10	7,34		35,0	4,78	800,0	117	14,2	2626,13	2,626	0,337										
28/03/1999	400					4,18	700,0	120	10,3	1612,32	1,612	0,277										
29/03/1999	401	7,23	7,63	26,5	32,0	4,78	800,0	121	14,0	1160,38	1,160	0,313										altura gasômetro = 10 cm
30/03/1999	402	7,11		26,3		4,78	800,0	130	133	6,8	1498,32	1,498	0,366									
31/03/1999	403	7,19	7,80	24,5	33,5	4,78	800,0	134	138	3,0	1750,75	1,751	0,352									
01/04/1999	404		7,72	25,0	33,0	4,78	800,0	139	143	1,3	1681,54	1,682	0,362									
02/04/1999	405					4,78	800,0	144	148	2,5	1730,39	1,730										
03/04/1999	406		7,70		36,0	3,29	550,0	153														
04/04/1999	407		7,84		32,0	4,78	800,0															
05/04/1999	408					4,78	800,0															
06/04/1999	409			27,0		4,78	800,0	154	156	0,5	834,66	0,835	0,259									
07/04/1999	410			26,5		4,78	800,0	163	166	0,4	1237,74	1,238	0,249									
08/04/1999	411					4,78	800,0	167	169	9,3	1192,95	1,193										
09/04/1999	412					4,78	800,0															

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Melo	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluentes (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações	
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída		
																						CH4
10/04/1999	413					0,00	0,0															
11/04/1999	414	7,20	7,87	24,5	33,0	4,78	800,0	174	177	0,0	1221,45	1,221	0,376									
12/04/1999	415	7,39	7,85	24,0	33,0	4,30	720,0	178	182	4,2	1799,61	1,800	0,391									
13/04/1999	416	7,63	8,12	25,0	33,5	4,78	800,0	183	187	1,3	1681,54	1,682	0,319									
14/04/1999	417	7,74	8,32	25,0	32,0	4,78	800,0	188	191	7,5	1526,82	1,527										
15/04/1999	418			24,0	32,0	4,72	790,0	192									8,36	0,152	98,18			DQO de saída instantânea
16/04/1999	419					0,00	0,0		196	0,0												
17/04/1999	420	7,66	8,36	20,5	29,0	4,78	800,0	196	199	4,0	1384,31	1,384	0,289									
18/04/1999	421	7,79	8,36	25,0	30,0	4,48	750,0	200														Limite do contador = 200 ciclos
19/04/1999	422	7,74	8,80	19,0	27,0	4,30	720,0	0	4	0,4	1644,89	1,645	0,287									
20/04/1999	423		8,31	33,0	30,0	4,78	800,0	5	8	0,3	1233,67	1,234	0,258									
21/04/1999	424	7,80	8,34	22,0	33,0	4,78	800,0	9	12	0,3	1233,67	1,234	0,294									
22/04/1999	425	7,70	7,88	23,0	32,0	4,78	800,0	13	16	4,5	1404,67	1,405	0,286									
23/04/1999	426	7,73	8,25	23,0	29,5	4,78	800,0	17	20	3,6	1368,03	1,368	0,284				7,94	0,215	97,29			DQO de saída instantânea
24/04/1999	427	7,70	8,08	28,0	34,5	4,78	800,0	21	24	3,4	1359,89	1,360	0,211									
25/04/1999	428	7,62	7,89	24,5	32,5	4,78	800,0	25	27	4,8	1009,74	1,010	0,289									
26/04/1999	429		8,39	26,0	33,0	4,78	800,0	28	31	3,9	1380,24	1,380	0,278									
27/04/1999	430	7,87	8,10	24,0	33,0	4,78	800,0	32	35	2,6	1327,31	1,327	0,299									
28/04/1999	431	7,70	7,83	25,5	34,0	4,78	800,0	36	39	5,1	1429,10	1,429	0,211									
29/04/1999	432	7,94	8,06	22,5	32,0	4,78	800,0	40	42	4,8	1009,74	1,010				6,49	0,419	93,55				
30/04/1999	433	7,59	8,20	23,5	31,5	4,78	800,0	43	45	0,0	814,30	0,814	0,293									
01/05/1999	434					0,00	0,0															
02/05/1999	435			26,0		4,78	800,0	45	48	4,4	1400,60	1,401	0,276									
03/05/1999	436			22,0		4,78	800,0	49	52	2,4	1319,17	1,319										
04/05/1999	437	7,67	7,90	24,5	33,5	4,48	750,0	53	55	1,7	883,52	0,884	0,313	86,21	13,79							
05/05/1999	438	7,61	8,04	24,5	32,5	4,78	800,0	56	59	4,5	1404,67	1,405	0,284									
06/05/1999	439	7,70	8,03	25,0	33,5	4,78	800,0	60	63	3,3	1355,81	1,356	0,202									
07/05/1999	440	7,97	8,30	24,0	32,5	4,78	800,0	64	66	3,7	964,95	0,965										
08/05/1999	441	7,98	8,14	22,0	25,0	4,78	800,0	67	68	7,5	712,51	0,713	0,344									
09/05/1999	442					0,00	0,0															
10/05/1999	443	7,36	8,00	22,0	26,0	4,78	800,0	69	73	0,4	1644,89	1,645	0,208									
11/05/1999	444			24,0	31,0	4,47	748,0	74	76	4,4	993,45	0,993	0,226									
12/05/1999	445	7,10	7,90	22,5	32,0	4,78	800,0	77	79	4,8	1009,74	1,010	0,229									
13/05/1999	446	7,12	8,05	20,5	29,0	4,78	800,0	80	82	6,9	1095,24	1,095										
14/05/1999	447	7,02	7,70	20,0	30,0	4,78	800,0	83	85	0,7	842,80	0,843	0,243									
15/05/1999	448					0,00	0,0															
16/05/1999	449			26,0		4,78	800,0	86	88	8,5	1160,38	1,160	0,223									
17/05/1999	450	7,00	7,94	22,0	31,5	4,78	800,0	89	91	6,2	1066,74	1,067	0,221				6,21	0,261	95,79			DQO de saída instantânea (-75 mL de lodo)
18/05/1999	451	7,12	7,89	20,5	30,0	4,78	800,0	92	94	5,9	1054,52	1,055	0,219	89,13	10,87							
19/05/1999	452	6,99	7,88	22,5	33,0	4,78	800,0	95	97	5,7	1046,38	1,046		86,34	13,66							
20/05/1999	453	7,13	7,73	18,5	33,0	2,39	400,0	99	100	5,5	631,08	0,631										
21/05/1999	454	7,05	7,80	20,5	32,0	4,78	800,0	3	4	0,0	407,15	0,407	0,203									
22/05/1999	455	7,09	8,23	18,5	30,5	4,78	800,0	5	7	3,9	973,09	0,973	0,255									
23/05/1999	456	7,00	8,06	22,5	32,0	4,78	800,0	8	11	0,0	1221,45	1,221	0,295									
24/05/1999	457	7,55	8,00	19,0	29,0	4,78	800,0	12	15	4,6	1408,74	1,409	0,215									
25/05/1999	458	7,13	8,09	23,0	32,0	4,78	800,0	16	18	5,2	1026,02	1,026	0,205									
26/05/1999	459	7,00	8,08	27,0	32,0	4,18	700,0	19	21	4,1	981,23	0,981	0,265	88,16	11,84							
27/05/1999	460	7,29	7,98	21,0	33,0	4,78	800,0	22	24	7,2	1107,45	1,107	0,213									
28/05/1999	461					0,00	0,0										5,38	0,245	95,44			DQO de saída instantânea (-20 mL de lodo)
29/05/1999	462	7,22	8,05	23,0	34,5	4,78	800,0	25	27	5,0	1017,88	1,018	0,215									
30/05/1999	463	7,09	7,96	23,0	32,0	4,78	800,0	28	30	5,3	1030,09	1,030	0,232									
31/05/1999	464	7,12	7,99	23,5	33,0	4,78	800,0	31	33	7,3	1111,52	1,112	0,232									

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. Int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume eflurte (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/ carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações		
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		% CH4	% CO2	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída			
01/06/1999	465	7,19	7,93	19,5	31,5	4,78	800,0	34	36	7,2	1107,45	1,107											
02/06/1999	466	7,45	8,12	18,0	31,0	1,79	300,0	37	37	7,2	293,15	0,293	0,270										
03/06/1999	467	7,09	8,08	20,0	34,0	2,99	500,0	38	39	1,9	484,51	0,485											
04/06/1999	468					1,79	300,0	40															
05/06/1999	469	7,03	8,20	22,5	30,0	4,78	800,0															0,239	
06/06/1999	470	7,57	8,10	18,5	32,0	4,78	800,0	50	52	8,1	1144,10	1,144										0,244	
07/06/1999	471	7,04	8,02	17,0	31,5	4,78	800,0	53	55	8,7	1168,52	1,169										0,226	
08/06/1999	472	7,06	8,04	21,0	32,0	4,78	800,0	56	58	6,5	1078,95	1,079										0,216	
09/06/1999	473	7,10	7,74	23,0	33,0	4,78	800,0	59	61	5,4	1034,16	1,034										0,198	
10/06/1999	474	7,10	8,20		32,0	4,78	800,0	62	64	3,2	944,59	0,945										0,221	
11/06/1999	475	7,39	8,16	16,0	30,5	4,78	800,0	65	67	6,0	1058,59	1,059										0,226	
12/06/1999	476	7,36	8,09	20,0	32,0	4,48	750,0	68	70	6,6	1083,02	1,083										0,194	
13/06/1999	477	7,38	8,10	21,5	33,0	4,78	800,0	76	78	1,4	871,30	0,871										0,264	
14/06/1999	478	7,26	8,15	20,5	30,5	4,78	800,0	80	83	1,0	1262,17	1,262										0,209	
15/06/1999	479	7,37	8,13	21,0	31,5	4,30	720,0	84	86	4,5	997,52	0,998										0,215	
16/06/1999	480	7,08	8,24	23,0	31	4,78	800,0	87	89	2,7	924,23	0,924											
17/06/1999	481	7,13	8,00	22,0	30,5	2,69	450,0	90	91	5,9	647,37	0,647	0,336										
18/06/1999	482	7,24	8,40	19,5	30,5	4,78	800,0	92	94	2,2	903,88	0,904	0,240										
19/06/1999	483					0,00	0,0																
20/06/1999	484	7,39	8,51	20,5	31,0	4,78	800,0	95	97	8,2	1148,17	1,148	0,239										
21/06/1999	485	7,45	8,39	22,0	33,5	4,78	800,0	98	100	8,1	1144,10	1,144					6,63	1,095	83,47			DQO de saída instantânea	
22/06/1999	486	7,69	8,34	18,0	24,0	4,78	800,0	101															
23/06/1999	487	7,49	8,00	23,5	37,5	4,78	800,0	111					0,318										
24/06/1999	488	7,60	8,12	20,5	33,5	4,78	800,0	131	134	7,4	1522,75	1,523	0,245										
25/06/1999	489	7,58	8,10	20,0	32,5	4,78	800,0	135	137	8,8	1172,60	1,173	0,229										
26/06/1999	490	7,63	8,20	22,0	35,0	4,41	738,0	138	140	6,9	1095,24	1,095	0,270				5,61	0,339	93,96				
27/06/1999	491	7,69	8,30	24,0	34,0	4,78	800,0	141	143	9,2	1188,88	1,189	0,241										
28/06/1999	492	7,70	8,27	22,5	32,0	4,78	800,0	144	146	8,3	1152,24	1,152	0,227										
29/06/1999	493	8,00	8,30	23,0	35,5	4,78	800,0	147	149	6,7	1087,09	1,087	0,398									-50 mL lodo	
30/06/1999	494			20,5	30,0	4,78	800,0	148	152	6,8	1905,47	1,905	0,225										
01/07/1999	495	7,77	8,20	21,0	33,0	4,78	800,0	153	155	6,4	1074,88	1,075	0,259										
02/07/1999	496	7,28	8,06			4,78	800,0	156	159	0,4	1237,74	1,238	0,218									-40 mL lodo	
03/07/1999	497	7,41	8,07	22,0	33,0	4,78	800,0	160	162	5,6	1042,31	1,042	0,244										
04/07/1999	498	7,44	8,06	18,5	31,0	4,78	800,0	163	165	8,6	1164,45	1,164	0,207										
05/07/1999	499	7,40	7,80	17,0	30,0	4,78	800,0	166	168	4,3	989,38	0,989											
06/07/1999	500	7,04	8,02	17,0	32,0	4,78	800,0	169					0,249										
07/07/1999	501					4,78	800,0	171	173	9,2	1188,88	1,189	0,226										
08/07/1999	502	7,07	8,08			4,78	800,0	174	176	6,5	1078,95	1,079	0,219										
09/07/1999	503	7,12	7,92			4,78	800,0	177	179	5,7	1046,38	1,046	0,238										
10/07/1999	504	7,12	8,02			4,78	800,0	180	182	8,0	1140,02	1,140	0,209										
11/07/1999	505	7,39	7,86			4,78	800,0	183	185	4,5	997,52	0,998	0,237										
12/07/1999	506	7,15	7,85			2,39	400,0	186	188	7,8	1131,88	1,132											
13/07/1999	507	7,07	8,04			4,78	800,0	189	189	9,4	382,72	0,383	0,297				4,63	0,109	97,66				
14/07/1999	508	6,97	8,10			3,89	650,0	190	193	4,9	1420,96	1,421	0,289										
15/07/1999	509	6,84	7,88			4,78	800,0	194	196	7,6	1123,74	1,124	0,261										
16/07/1999	510	6,85	8,01			4,78	800,0	197	200	0,6	1245,88	1,246					74,51	25,49	6,26	0,322	94,86		
17/07/1999	511	6,87	7,81			4,78	800,0	200															
18/07/1999	512	6,81	7,79			4,78	800,0	200															
19/07/1999	513		7,84			4,78	800,0	0					0,190										
20/07/1999	514	6,96	7,99			4,78	800,0	1	3	2,3	907,95	0,908	0,207				7,49	0,796	89,37				
21/07/1999	515	6,90	7,82			4,78	800,0	4	6	4,3	989,38	0,989	0,291										
22/07/1999	516	7,04	7,87			4,78	800,0	7	10	4,2	1392,46	1,392	0,301										

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. Int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume eflurte (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/ carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações		
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída			
																						CH4	CO2
23/07/1999	517	6,76	7,7			2,39	400,0	11	14	5,4	1441,32	1,441											
24/07/1999	518	6,94	7,66			4,78	800,0	15	15	6,2	252,43	0,252	0,274										
25/07/1999	519	6,85	7,51			4,78	800,0	16	19	2,2	1311,03	1,311	0,310				7,45	0,077	98,97			DQO do meio do reator	
26/07/1999	520	6,80	7,63			4,18	700,0	20	23	6,4	1482,03	1,482	0,325										
27/07/1999	521	6,58	7,71			4,78	800,0	24	27	3,4	1359,89	1,360	0,291										
28/07/1999	522	6,78	7,64			4,78	800,0	28	31	4,2	1392,46	1,392	0,295										
29/07/1999	523	6,92	7,82			4,78	800,0	32	35	4,7	1412,82	1,413	0,279										
30/07/1999	524	6,99	7,83			4,78	800,0	36					0,279										
31/07/1999	525	6,97	7,82	16,5	32,0	4,78	800,0		42	5,6	2670,91	2,671	0,185										
01/08/1999	526	6,99	7,70	20,5	33,0	4,78	800,0	43	45	1,7	883,52	0,884	0,218										
02/08/1999	527	6,57	7,71	19,0	34,0	3,91	654,0	53	55	5,6	1042,31	1,042	0,356				6,98	0,313	95,51			(altura do lodo = 9,5 cm) / Amostra AOV	
03/08/1999	528	6,87	7,78	27,0		4,72	790,0	56	59	4,2	1392,46	1,392	0,273										
04/08/1999	529	6,56	7,73			4,72	790,0	60	63	1,7	1290,67	1,291	0,283									Amostra AOV	
05/08/1999	530	6,92	7,70	23,5	34,5	4,78	800,0	64	67	2,8	1335,46	1,335											
06/08/1999	531	7,00	7,58	23,0		4,72	790,0	68					0,277				6,04	0,295	95,12			Amostra AOV	
07/08/1999	532	7,20	7,70	22,0	34,0	4,78	800,0	68	71	2,1	1306,96	1,307	0,209										
08/08/1999	533	6,80	7,70	20,0	34,5	4,48	750,0	72	74	4,5	997,52	0,998	0,343										
09/08/1999	534	6,88	7,26	18,0	33,0	4,66	780,0	73	76	7,8	1539,03	1,539	0,303										
10/08/1999	535	7,03	7,76	21,0	33,0	4,78	800,0	78	81	4,7	1412,82	1,413					6,33	0,350	94,47			Amostra AOV	
11/08/1999	536	6,75	7,78			4,78	800,0	40	45	1,1			0,251										-120 mL lodo (altura de 8,0 cm após retirada da amostra)
12/08/1999	537			28,0	38,0	4,72	790,0	82	84	9,5	1201,10	1,201	0,204									Amostra AOV	
13/08/1999	538			21,0	36,0	4,48	750,0	86	88	3,7	964,95	0,965	0,277				4,87	0,124	97,45			Amostra AOV	
14/08/1999	539	6,96	7,62	14,5	29,0	4,78	800,0	89	92	0,5	1241,81	1,242	0,223										
15/08/1999	540		7,67	17,0	28,0	3,89	650,0	93	95	6,2	1066,74	1,067	0,244										
16/08/1999	541	7,16	7,55	14,0	30,5	4,78	800,0	96	98	3,3	948,66	0,949	0,301										
17/08/1999	542	6,89	7,64	19,5	35,0	4,78	800,0	0	3	5,4	1441,32	1,441	0,269				84,77	15,23					
18/08/1999	543	6,71	7,46	20,0	32,0	4,78	799,5	4	7	1,6	1286,60	1,287	0,276									Amostra AOV	
19/08/1999	544	7,12	7,78	21,0	36,0	3,29	550,0	8	11	2,4	1319,17	1,319	0,189										
20/08/1999	545	6,69	7,77	21,0	30,5	4,48	750,0	12	13	5,3	622,94	0,623					87,13	12,87				Amostra AOV	
21/08/1999	546	7,03	7,83	24,0	37,0	2,39	400,0	14	16														
22/08/1999	547	6,69	7,74	25,0	35,0	0,00	0,0	17	17	6,4	260,58	0,261											
23/08/1999	548					1,49	250,0						0,272										
24/08/1999	549			22,0	35,0	4,69	785,0	19	20	0,0	407,15	0,407					81,91	18,09					
25/08/1999	550	6,78	7,61	21,0	38,0	4,78	799,5	21														Amostra AOV	
26/08/1999	551	6,82	7,69	21,0	32,0	4,78	800,0	8	9	3,0	529,30	0,529										Quebrou o gasômetro	
27/08/1999	552	6,88	7,66	21,0	32,0	4,38	799,5															Amostra AOV	
28/08/1999	553	6,93	7,73	20,5	31,5	4,38	800,0																
29/08/1999	554	7,03	7,69	21,0	32,0	4,38	800,0																
30/08/1999	555	7,23	7,68	22,0	31,0	4,38	800,0																
31/08/1999	556	6,91	7,50	24,0	34,0	2,74	500,0																
01/09/1999	557	7,11	7,74	21,0	33,0	4,38	800,0																
02/09/1999	558	6,84	7,52	26,0	34,0	4,38	800,0																
03/09/1999	559	7,12	7,61	24,5	32,0	4,38	799,5																
04/09/1999	560	7,02	7,64	24,0	34,0	4,38	800,0															Amostra AOV	
05/09/1999	561	7,07	7,68	25,0	34,0	4,38	800,0																
06/09/1999	562	7,33	7,74	29,0	33,0	4,38	800,0																
07/09/1999	563	6,88	7,73	28,0	33,0	4,38	800,0																
08/09/1999	564	6,98	7,66	25,0	32,0	4,38	799,5															Amostra AOV	
09/09/1999	565	7,11	7,72	21,0	31,0	4,38	800,0																
10/09/1999	566	6,95	7,61	21,0	34,0	1,10	200,0															Amostra AOV	
11/09/1999	567		7,88	20,0	32,0	3,29	600,0																
12/09/1999	568	6,98	7,60	19,5	32,5	4,38	800,0																

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Melo	Temp. amb. C	Temp. Int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluentes (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações	
								Inicial	Final		(cm ³)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída		
																						CH ₄
04/11/1999	621	6,96	7,68	28,0	35,0	4,78	800,0	170	172	0,7	842,80	0,843										
05/11/1999	622	6,82	7,67	24,0	33,0	4,55	762,0	173	176	1,1	1266,24	1,266	0,257	85,29	14,71					2331,6	2284,2	
06/11/1999	623	6,80	7,74	25,0	35,0	4,78	800,0	177	179	8,8	1172,60	1,173										
07/11/1999	624	6,70	7,77	28,0	33,5	4,78	800,0															
08/11/1999	625	6,60	7,51	27,0	35,0	4,68	783,0						0,222			7,46	0,243	96,74				Amostra AOV
09/11/1999	626	7,70	7,59	20,0	32,0	4,78	800,0	0	2	5,5	1038,24	1,038	0,231	88,39	11,61							-50 mL lodo (altura de 10,0 cm após retirada da amostra)
10/11/1999	627	6,97	7,50	22,0	34,0	4,78	800,0	3	5	7,1	1103,38	1,103	0,237									
11/11/1999	628	6,88	7,66	22,0	32,0	4,78	800,0	7	9	7,8	1131,88	1,132										
12/11/1999	629	7,02	7,48	23,0	33,0	4,29	718,0	10	11	5,5	631,08	0,631		87,99	12,01					2350,0	2294,7	Gasômetro desconectado / Amostra AOV e clorofenóis
13/11/1999	630	6,76	7,36	24,0	33,0	4,38	800,0															
14/11/1999	631					4,38	800,0															
15/11/1999	632	6,86	7,80	23,0	30,0	4,38	800,0															
16/11/1999	633	6,65	7,52	23,0	37,0	4,29	783,0									4,37	0,211	95,17				Amostra AOV e clorofenóis
17/11/1999	634	6,73	7,58	23,0	35,0	4,36	795,0															
18/11/1999	635	6,75	7,46	25,0	35,0	4,38	800,0															
19/11/1999	636	6,80	7,35	27,0	34,0	4,22	771,0							85,29	14,71					2378,9	2310,5	Reconexão do gasômetro / Amostra AOV e clorofenóis
20/11/1999	637	6,80	7,75	26,0	33,0	4,78	800,0						0,219									
21/11/1999	638	6,98	7,62	23,0	33,0	4,78	800,0	13	15	5,7	1046,38	1,046	0,217									
22/11/1999	639	6,80	7,70	24,0	36,0	4,27	714,0	16	18	5,5	1038,24	1,038	0,260	84,18	15,82	5,53	0,450	91,87				Amostra AOV e clorofenóis
23/11/1999	640	6,91	7,54	24,0	33,0	4,78	800,0	19	21	7,3	1111,52	1,112	0,249									
24/11/1999	641	6,77	7,59	25,0	34,0	4,78	800,0	22	24	9,2	1188,88	1,189	0,238									
25/11/1999	642	6,81	7,65	25,0	34,0	4,66	779,0	25	27	7,9	1135,95	1,136	0,240							2405,3	2357,9	Amostra AOV e clorofenóis
26/11/1999	643	6,84	7,64	23,0	33,0	4,78	800,0	28	30	7,5	1119,67	1,120										
27/11/1999	644	6,76	7,62	25,0	34,0	2,63	440,0	31	32													
28/11/1999	645					4,78	800,0						0,226									-200 mL lodo (altura de 9,0 cm após retirada da amostra)
29/11/1999	646	7,12	7,62	28,0	34,0	4,78	800,0	33	35	6,6	1083,02	1,083	0,114									2,0 mg/L de PCP / Amostra AGV e clorofenóis
30/11/1999	647	6,66	7,43	25,0	33,0	4,78	800,0	36	37	3,4	545,58	0,546	0,215	83,99	16,01					2168,4	2286,1	
01/12/1999	648	6,96	7,61	26,0	34,0	4,78	800,0	38	40	5,2	1026,02	1,026	0,189									
02/12/1999	649	7,02	7,59	24,0	33,0	4,70	786,0	41	43	2,2	903,88	0,904	0,170	83,92	16,08	3,79	0,450	88,12				Amostra AOV e clorofenóis
03/12/1999	650	7,10	7,54	24,0	33,0	4,78	800,0	44	45	9,6	798,02	0,798	0,163									4,0 mg/L de PCP
04/12/1999	651	6,89	7,33	28,0	36,0	4,73	791,5	46	47	9,2	781,73	0,782	0,121									Amostra AOV e clorofenóis
05/12/1999	652	6,79	7,37	28,0	37,0	4,78	800,0	48	49	4,1	574,08	0,574	0,135									
06/12/1999	653	6,91	7,54	23,0	32,0	4,67	781,0	50	51	5,8	643,30	0,643	0,169	89,05	10,95	5,51	0,692	87,44	2242,1	2284,2		Amostra AOV e clorofenóis
07/12/1999	654	6,97	7,57	22,0	32,0	4,78	800,0	52	53	9,4	789,87	0,790	0,152									
08/12/1999	655	7,08	7,52	23,0	32,0	4,65	778,0	54	55	7,9	728,80	0,729	0,135	88,29	11,71							Amostra AOV e clorofenóis
09/12/1999	656	7,35	7,66	26,0	33,0	4,78	800,0	56	57	5,4	627,01	0,627	0,199									
10/12/1999	657					0,00	0,0															
11/12/1999	658	7,17	7,90	26,0	32,0	4,60	770,0	58	60	3,4	952,73	0,953	0,245									
12/12/1999	659	6,88	7,58	27,0	35,0	4,72	790,0	61	63	7,7	1127,81	1,128	0,215									
13/12/1999	660	6,97	7,55	24,0	33,0	4,61	772,0	64	66	4,9	1013,81	1,014	0,158	85,40	14,60	6,64	0,287	95,69	2263,2	2200,0		Amostra AOV e clorofenóis
14/12/1999	661	6,91	7,58	29,0	34,0	4,67	781,0	67	68	7,9	728,80	0,729	0,223									6,0 mg/L de PCP
15/12/1999	662	6,78	7,56	30,5	36,0	4,78	800,0	69	71	5,6	1042,31	1,042	0,225									
16/12/1999	663	6,75	7,38	30,0	35,0	4,78	800,0	72	74	6,4	1074,88	1,075	0,210									
17/12/1999	664	6,70	7,33	27,0	34,0	4,61	772,0	75	77	4,7	1005,66	1,006	0,237	87,92	12,08	6,73	0,123	98,17	2378,9	2331,6		DQO saída instantânea / Amostra AOV e clorofenóis
18/12/1999	665	6,78	7,46	26,0	35,0	4,78	800,0	78	80	6,9	1095,24	1,095	0,227									
19/12/1999	666	6,85	7,52	30,0	36,0	4,78	800,0	81	83	6,7	1087,09	1,087	0,198									
20/12/1999	667	6,79	7,44	28,0	34,0	4,61	772,0	84	86	3,2	944,59	0,945		86,89	13,11	6,64	0,195	97,06				Amostra AOV e clorofenóis
21/12/1999	668	6,70	7,46	27,0	33,0	4,78	800,0	87	89													
22/12/1999	669	6,78	7,74	27,0	34,0	4,78	800,0															
23/12/1999	670	6,73	7,63	25,0	35,0	4,78	800,0															
24/12/1999	671					0,00	0,0															reator foi desligado
25/12/1999	672					0,00	0,0															

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluarnte (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/ carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações		
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída			
																						CH4	CO2
26/12/1999	673					0,00	0,0																
27/12/1999	674					0,00	0,0																
28/12/1999	675					0,00	0,0																
29/12/1999	676					0,00	0,0																
30/12/1999	677					0,00	0,0																
31/12/1999	678					0,00	0,0																
01/01/2000	679					0,00	0,0																
02/01/2000	680					0,00	0,0																
03/01/2000	681	6,89	7,60	28,0	28,0	2,39	400,0	94	95	2,9	525,23	0,525	0,199										reincio da alimentação
04/01/2000	682	7,12	7,53	28,0	35,0	2,39	400,0	96	97	1,7	476,37	0,476	0,347										
05/01/2000	683	6,82	7,63	27,0	35,0	2,39	400,0	98	100	0,4	830,59	0,831	0,288				5,22	0,289	94,47	2163,2	2163,2		Amostra AOV e clorofenóis
06/01/2000	684	6,78	7,66	30,0	35,0	4,26	712,0	101	102	6,9	688,09	0,688	0,187										
07/01/2000	685	6,96	7,60	28,5	34,5	4,29	718,0	103	104	9,5	793,95	0,794	0,249	89,61	10,39								
08/01/2000	686	6,98	7,67	28,0	35,0	4,78	800,0	105	107	6,2	1066,74	1,067											
09/01/2000	687	6,79	7,53	32,0	35,0	1,79	300,0						0,565										
10/01/2000	688	6,73	7,62	32,0	36,0	4,78	800,0	109	111	4,9	1013,81	1,014	0,192	88,34	11,66								Amostra AOV e clorofenóis
11/01/2000	689	6,89	7,61	31,0	34,5	4,30	720,0	112	114	2,5	916,09	0,916	0,214										
12/01/2000	690	6,70	7,50	31,0	35,5	4,66	780,0	115	117	2,6	920,16	0,920	0,286	85,69	14,31								
13/01/2000	691	6,82	7,50	30,5	36,0	4,78	800,0	118	121	2,7	1331,38	1,331	0,198										
14/01/2000	692	6,95	7,55	28,5	34,0	4,78	800,0	122	124	3,2	944,59	0,945	0,238	84,84	15,16	6,86	0,188	97,25	2170,3	2106,3			DQO saída instantânea / Amostru AOV e clorofenóis
15/01/2000	693	6,91	7,69	29,0	34,5	4,78	800,0	125	127	8,0	1140,02	1,140	0,245										
16/01/2000	694	6,81	7,54	30,5	35,5	4,78	800,0	128	130	8,8	1172,60	1,173	0,232										
17/01/2000	695	7,40	7,55	29,0	34,5	4,78	800,0	131	133	7,2	1107,45	1,107	0,230										
18/01/2000	696	6,82	7,57	29,0	33,0	4,78	800,0	134	136	7,0	1099,31	1,099	0,239										8,0 mg/L de PCP
19/01/2000	697	6,82	7,43	28,5	34,0	4,78	800,0	137	139	8,1	1144,10	1,144	0,230										
20/01/2000	698	6,82	7,47	29,5	35,0	4,70	786,5	140	142	7,0	1099,31	1,099	0,272	85,58	14,42	7,00	0,196	97,21	2086,6	2165,4			DQO saída instantânea / Amostru AOV e clorofenóis
21/01/2000	699	6,77	7,35	31,0	35,0	4,78	800,0	143	146	1,4	1278,46	1,278	0,253										
22/01/2000	700	6,93	7,19	33,0	36,0	4,78	800,0	147	149	9,7	1209,24	1,209	0,246										
23/01/2000	701	6,92	7,29	30,0	34,5	4,78	800,0	150	152	8,9	1176,67	1,177	0,237										Amostru AGV
24/01/2000	702	6,72	7,10	26,5	33,0	4,78	800,0	153	155	7,8	1131,88	1,132	0,186										
25/01/2000	703	6,83	7,24	28,0	33,0	4,78	800,0	156	158	1,8	887,59	0,888	0,170										
26/01/2000	704					0,00	0,0																
27/01/2000	705	6,74	7,18	25,6	32,0	4,78	800,0	159	161	0,0	814,30	0,814											
28/01/2000	706					0,00	0,0																
29/01/2000	707					0,00	0,0																
30/01/2000	708					0,00	0,0																
31/01/2000	709					0,00	0,0																
01/02/2000	710	6,84	7,33	25,0	26,0	4,78	800,0	162	165	1,8	1294,74	1,295	0,257										
02/02/2000	711	6,95	7,48	28,0	35,0	4,78	800,0	167	170	0,2	1229,60	1,230	0,265										
03/02/2000	712	6,90	7,58	29,0	33,0	4,78	800,0	171	174	1,1	1266,24	1,266	0,198										
04/02/2000	713	6,95	7,47	28,0	34,0	4,64	776,0	175	177	3,2	944,59	0,945	0,175	81,21	18,79	6,14	0,306	95,02	2086,6	2076,8			DQO saída instantânea / Amostru AOV e clorofenóis
05/02/2000	714	7,20	7,58	31,0	36,0	4,78	800,0	178	179	9,9	810,23	0,810	0,250										
06/02/2000	715	6,97	7,57	30,0	35,0	4,78	800,0	180	182	9,4	1197,02	1,197											10,0 mg/L de PCP
07/02/2000	716	6,80	7,50	26,5	34,0	4,77	798,5	183	184				0,223	86,90	13,10	6,87	0,234	96,59					Amostru AOV e clorofenóis
08/02/2000	717	6,77	7,53	29,0	34,0	4,78	800,0	188															
09/02/2000	718	6,93	7,48	31,0	36,0	4,78	800,0	192	194	6,2	1066,74	1,067	0,272										
10/02/2000	719	7,02	7,58	27,0	34,0	4,77	798,8	195	198	1,9	1298,81	1,299	0,226	87,26	12,74	6,53	0,195	97,02	2224,4	2219,5			Amostra AOV e clorofenóis
11/02/2000	720	7,15	7,45	31,0	34,0	4,78	800,0	0	2	6,5	1078,95	1,079	0,268										
12/02/2000	721	6,95	7,60	31,0	36,0	4,78	800,0	3	6	1,5	1282,53	1,283	0,190										
13/02/2000	722	6,96	7,56	31,0	36,0	4,78	800,0	7	9	2,3	907,95	0,908	0,306										12,8 mg/L de PCP
14/02/2000	723	7,29	7,59	28,0	34,0	4,78	800,0	11	14	5,9	1461,67	1,462	0,221										
15/02/2000	724	7,45	7,53	27,0	35,0	4,66	779,0	15	17	6,0	1058,59	1,059	0,247	85,49	14,51	6,46	0,160	97,52	2052,2	2278,5			Amostra AOV e clorofenóis

Data	Tempo Acum. (dias)	pH Entr.	pH Meio	Temp. amb. C	Temp. int. C	Carga Teórica (g/dia)	Volume efluentes (mL)	Ciclo		altura (cm)	Volume gás		produção gás/carga teórica (L gás/g DQO)	Comp.média		DQO média			Cloretos		Observações	
								Inicial	Final		(cm3)	(L)		%	%	Entr.	Saída 24 h.	Efic. (%)	Entr.	Saída		
																						CH4
16/02/2000	725	6,67	7,56	27,0	33,0	4,78	800,0	18	20	8,3	1152,24	1,152	0,274									
17/02/2000	726	6,75	7,51	25,5	31,0	4,78	800,0	21	24	2,2	1311,03	1,311	0,140									
18/02/2000	727	6,73	7,55	26,0	33,0	4,63	774,5	25	26	6,5	671,80	0,672	0,223	84,12	15,98				2199,8	2106,3		Amostra AOV e clorofenóis
19/02/2000	728	6,75	7,48	28,5	33,0	4,78	800,0	28	30	5,4	1034,16	1,034	0,221									
20/02/2000	729	6,71	7,57	28,5	33,0	4,78	800,0	31	33	5,9	1054,52	1,055	0,253									
21/02/2000	730	6,65	7,57	27,0	36,0	4,63	774,5	34	36	9,7	1209,24	1,209	0,154	82,91	17,09	7,13	0,189	97,35	2160,4	2194,9		Amostra AOV e clorofenóis
22/02/2000	731	6,82	7,56	28,0	34,0	4,78	800,0	37	38	7,5	712,51	0,713	0,230									
23/02/2000	732	6,89	7,53	31,5	35,0	4,78	800,0	39	41	7,0	1099,31	1,099	0,110									15,6 mg/L de PCP
24/02/2000	733		7,50	30,5	35,0	4,78	800,0	42	43	2,9	525,23	0,525	0,195									
25/02/2000	734	6,84	7,64	28,0	34,0	2,99	500,0	44	46	2,9	932,38	0,932	0,135									
26/02/2000	735	6,92	7,53	29,0	34,0	4,36	730,0	47	47	9,9	403,08	0,403										
27/02/2000	736	6,92	7,49	31,0	36,0	4,78	800,0	48					0,231									
28/02/2000	737	6,82	7,52	29,0	35,0	4,64	776,5	57	59	7,1	1103,38	1,103	0,138	84,59	15,41	7,30	0,413	94,34	2229,3	2214,6		Amostra AOV e clorofenóis
29/02/2000	738	6,72	7,47	30,0	25,0	4,78	800,0	60	61	5,7	639,23	0,639	0,169									
01/03/2000	739	6,70	7,51	29,0	36,0	4,78	800,0	63	64	9,9	810,23	0,810	0,209									
02/03/2000	740	6,86	7,48	29,0	35,0	4,68	783,0	65	67	4,5	997,52	0,998	0,205									
03/03/2000	741	6,70	7,56	30,0	37,0	4,64	776,5	68	70	3,6	960,88	0,961	0,193	85,32	14,68				2234,3	2150,6		Amostra AOV e clorofenóis
04/03/2000	742	6,77	7,44	32,0	35,0	4,78	800,0	71	73	2,0	895,73	0,896	0,170									21,0 mg/L de PCP
05/03/2000	743	6,81	7,44	32,0	35,0	4,63	774,0	74	75	10,0	814,30	0,814	0,251									
06/03/2000	744	6,79	7,51	28,0	36,0	4,70	786,5	76	78	8,5	1160,38	1,160	0,175	82,23	17,77	7,04	0,464	93,41				Amostra AOV e clorofenóis
07/03/2000	745	6,79	7,45	28,0	34,0	4,18	700,0	80	82	0,2	822,45	0,822	0,213									
08/03/2000	746	6,77	7,43	29,0	34,0	4,78	800,0	82	84	1,9	891,66	0,892	0,200									
09/03/2000	747	6,76	7,44	24,0	30,0	4,78	800,0	89	91	3,5	956,81	0,957	0,231									
10/03/2000	748	6,76	7,52	27,0	35,0	4,46	746,5	92	94	7,1	1103,38	1,103	0,249			6,80	0,674	90,08	2194,0	2353,2		DQO saída instantânea / Amostra AOV e clorofenóis
11/03/2000	749	6,81	7,42	30,0	34,0	4,78	800,0	95	97	7,3	1111,52	1,112	0,175									
12/03/2000	750	6,86	7,49	27,0	34,0	4,78	800,0	99	101	0,5	834,66	0,835	0,226									
13/03/2000	751	6,80	7,39	26,0	35,0	4,64	776,5	102	104	6,6	1083,02	1,083	0,179	83,27	16,73	6,96	0,433	93,77	2253,7	2218,9		Amostra AOV e clorofenóis
14/03/2000	752	6,79	7,39	29,0	35,0	4,78	800,0	105	107	0,4	830,59	0,831	0,169									Sem PCP
15/03/2000	753	6,90	7,41	26,0	34,0	4,12	690,0	108	109	9,8	806,16	0,806										altura do lodo = 10,5 cm

ANEXO B

Primeira curva de calibração para determinação de ácidos voláteis usando 6,0 mL de amostra e 1,2 mL de ácido fosfórico (2,5%)

Valores calculados pela relação entre a área do pico do ácido e área do pico do padrão interno - ácido capróico.

Concentração de ácidos: 15 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	But.
RH000101	0,0098	0,0309	0,0782	0,0805
RH000102	0,0098	0,0296	0,0753	0,0774
RH000104	0,0064	0,0299	0,0727	0,0750
RH000105	0,0069	0,0307	0,0742	0,0768
Média	0,0082	0,0303	0,0751	0,0774
Desv. Pad	0,0018	0,0006	0,0023	0,0023

Concentração de ácidos: 30 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isobut.	But.
001F0296	0,0185	0,0783	0,1853	0,1877
001F0298	0,0170	0,0750	0,1839	0,1859
001F0299	0,0178	0,0799	0,1898	0,1878
001F0300	0,0160	0,0741	0,1834	0,1857
Média	0,0173	0,0768	0,1856	0,1868
Desv. Pad	0,0011	0,0027	0,0029	0,0011

Concentração de ácidos: 60 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	But.
001F0318	0,0317	0,1542	0,3614	0,3725
001F0319	0,0317	0,1584	0,3712	0,3806
001F0320	0,0356	0,1583	0,3707	0,3817
001F0321	0,0338	0,1610	0,3709	0,3830
Média	0,0332	0,1580	0,3686	0,3795
Desv. Pad	0,0019	0,0028	0,0048	0,0047

Concentração de ácidos: 120 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isobut.	But.
001F0344	0,0597	0,2961	0,6981	0,7107
001F0345	0,0579	0,2900	0,6782	0,6939
001F0346	0,0558	0,2845	0,6695	0,6867
001F0347	0,0564	0,2861	0,6727	0,6890
Média	0,0575	0,2892	0,6796	0,6951
Desv. Pad	0,0017	0,0052	0,0128	0,0108

Concentração de ácidos: 180 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	But.
001F0348	0,0898	0,4593	1,0429	1,0737
001F0349	0,0970	0,4845	1,0850	1,1110
001F0350	0,0860	0,4474	1,0232	1,0587
001F0353	0,0889	0,4595	1,0472	1,0817
Média	0,0904	0,4627	1,0496	1,0813
Desv. Pad	0,0047	0,0156	0,0258	0,0220

Concentração de ácidos: 240 mg/L

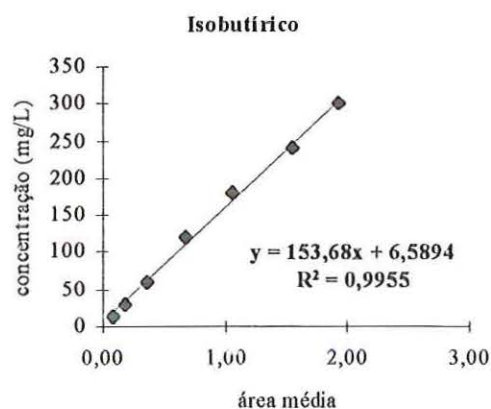
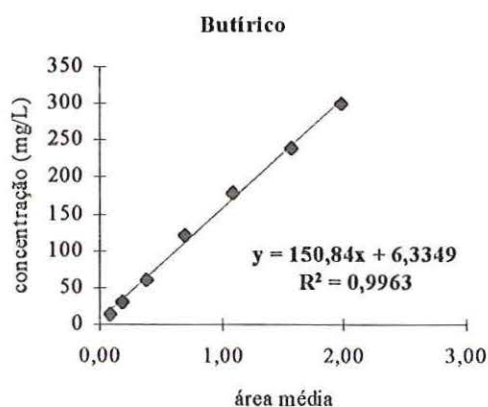
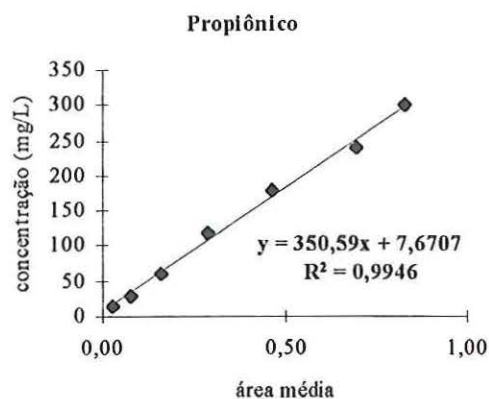
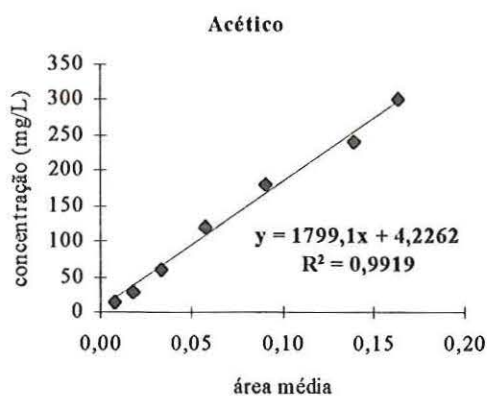
Amostra	Acético	Prop.	Isobut.	But.
001F0327	0,1380	0,6857	1,5351	1,5557
001F0328	0,1407	0,7004	1,5597	1,5668
001F0330	0,1401	0,6965	1,5682	1,5771
001F0331	0,1362	0,6933	1,5602	1,5810
Média	0,1388	0,6940	1,5558	1,5702
Desv. Pad	0,0021	0,0062	0,0143	0,0113

Concentração de ácidos: 300 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	But.
001F0362	0,1670	0,8410	1,9536	1,9942
001F0363	0,1630	0,8279	1,9270	1,9726
001F0364	0,1603	0,8254	1,9236	1,9757
Média	0,1634	0,8314	1,9347	1,9808
Desv. Pad	0,0034	0,0084	0,0164	0,0117

Tabela de ácidos - concentração (mg/L) por razão de área.

Conc.	Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico
15	0,0082	0,0303	0,0751	0,0774
30	0,0173	0,0768	0,1856	0,1868
60	0,0332	0,1580	0,3686	0,3795
120	0,0575	0,2892	0,6796	0,6951
180	0,0904	0,4627	1,0496	1,0813
240	0,1388	0,6940	1,5558	1,5702
300	0,1634	0,8314	1,9347	1,9808



Segunda curva de calibração para determinação de ácidos voláteis usando 5,0 mL de amostra e 1,0 mL de ácido sulfúrico 2%.

Valores calculados pela relação entre a área do pico do ácido e área do pico do padrão interno - ácido capróico.

Concentração de ácidos: 15 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	But.
001F0114	0,0123	0,0196	0,0502	0,0454
001F0115	0,0057	0,0228	0,0594	0,0670
001F0116	0,0064	0,0211	0,0532	0,0525
001F0117	0,0080	0,0245	0,0617	0,0607
001F0118	0,0085	0,0243	0,0573	0,0572
001F0119	0,0074	0,0248	0,0596	0,0607
001F0120	0,0113	0,0265	0,0585	0,0556
Média	0,0085	0,0234	0,0571	0,0570
Desv. Pad	0,0024	0,0024	0,0040	0,0069

Concentração de ácidos: 30 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isobut.	But.
001F0121	0,01023	0,04338	0,10741	0,10904
001F0122	0,01349	0,05192	0,12296	0,12240
001F0123	0,01471	0,05162	0,12219	0,12247
001F0124	0,01103	0,04890	0,11602	0,11872
001F0125	0,01035	0,04369	0,10770	0,11020
001F0126	0,01389	0,04506	0,10900	0,10810
Média	0,0123	0,0474	0,1142	0,1152
Desv. Pad	0,0018	0,0036	0,0067	0,0063

Concentração de ácidos: 60 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	But.
001F0128	0,0173	0,0783	0,2186	0,2165
001F0129	0,0205	0,0873	0,2174	0,2163
001F0130	0,0246	0,0995	0,2489	0,2422
001F0131	0,0159	0,0726	0,1897	0,1924
001F0132	0,0209	0,0853	0,2210	0,2220
001F0133	0,0202	0,0680	0,1901	0,1933
Média	0,0199	0,0818	0,2143	0,2138
Desv. Pad	0,0030	0,0113	0,0222	0,0188

Concentração de ácidos: 120 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isobut.	But.
001F0140	0,0306	0,1445	0,3865	0,3945
001F0141	0,0325	0,1556	0,4015	0,4092
001F0136	0,0326	0,1459	0,3793	0,3899
001F0137	0,0325	0,1485	0,3829	0,3925
001F0138	0,0329	0,1519	0,3858	0,3951
001F0139	0,0362	0,1631	0,4104	0,4155
Média	0,0329	0,1516	0,3911	0,3994
Desv. Pad	0,0018	0,0069	0,0121	0,0104

Concentração de ácidos: 180 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	But.
001F0142	0,0482	0,2471	0,6119	0,6322
001F0143	0,0644	0,2967	0,7006	0,7121
001F0144	0,0587	0,2860	0,6598	0,6798
001F0145	0,0664	0,2778	0,6357	0,6558
001F0146	0,0571	0,2712	0,6350	0,6570
001F0147	0,0584	0,2800	0,6551	0,6761
Média	0,0589	0,2765	0,6497	0,6688
Desv. Pad	0,0064	0,0168	0,0302	0,0272

Concentração de ácidos: 240 mg/L

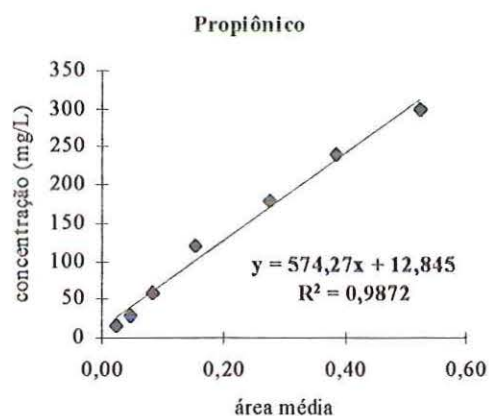
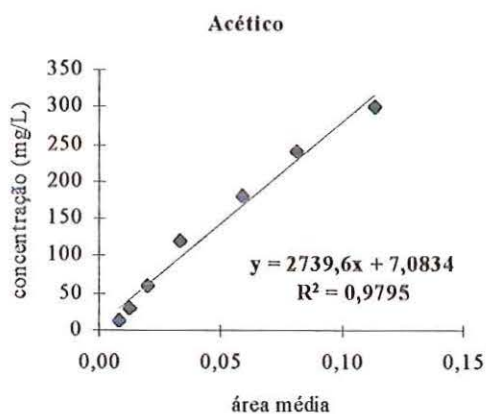
Amostra	Acético	Prop.	Isobut.	But.
001F0148	0,0860	0,4060	0,9190	0,9470
001F0149	0,0880	0,4153	0,9499	0,9757
001F0178	0,0746	0,3667	0,9304	0,9150
001F0179	0,0684	0,3454	0,8825	0,8929
001F0150	0,0864	0,3976	0,9311	0,9481
001F0153	0,0818	0,3806	0,8964	0,9202
Média	0,0809	0,3853	0,9182	0,9332
Desv. Pad	0,0078	0,0262	0,0248	0,0295

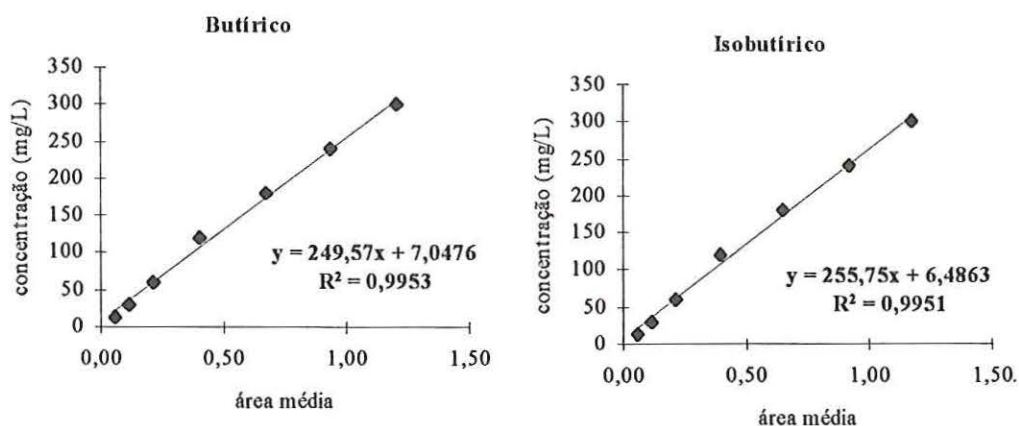
Concentração de ácidos: 300 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	But.
001F0154	0,1110	0,5225	1,1957	1,2192
001F0155	0,1073	0,5099	1,1589	1,1866
001F0156	0,1083	0,5124	1,1643	1,1950
001F0157	0,1005	0,4728	1,1006	1,1245
001F0158	0,1089	0,5133	1,1621	1,1962
001F0159	0,1452	0,6074	1,2559	1,2872
Média	0,1135	0,5231	1,1729	1,2014
Desv. Pad	0,0159	0,0448	0,0510	0,0527

Tabela de ácidos - concentração (mg/L) por razão de área.

Conc.	Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico
15	0,0085	0,0234	0,0571	0,0570
30	0,0123	0,0474	0,1142	0,1152
60	0,0199	0,0818	0,2143	0,2138
120	0,0329	0,1516	0,3911	0,3994
180	0,0589	0,2765	0,6497	0,6688
240	0,0809	0,3853	0,9182	0,9332
300	0,1135	0,5231	1,1729	1,2014





Terceira curva de calibração para determinação de ácidos voláteis usando 5,0 mL de amostra e 1,0 mL de ácido sulfúrico 2%.

Valores calculados pela relação entre a área do pico do ácido e área do pico do padrão interno - ácido crotonico.

Concentração de ácidos: 5 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	Butírico	Isoval.	Valérico	Capróico
001F0147	0,04987	0,25622	0,62092	0,66192	0,97352	1,36147	2,31281
001F0150	0,04931	0,20412	0,48481	0,47542	0,73687	0,93229	1,52916
001F0151	0,03771	0,17026	0,43715	0,43386	0,68705	0,81989	1,26707
001F0152	0,03453	0,13806	0,32291	0,30936	0,49563	0,55499	0,76935
Média	0,0429	0,1922	0,4664	0,4701	0,7233	0,9172	1,4696
Desv. Pad	0,0079	0,0505	0,1234	0,1460	0,1966	0,3358	0,6444

Concentração de ácidos: 15 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	Butírico	Isoval.	Valérico	Capróico
001F0156	0,07317	0,39123	1,18363	0,91716	1,71517	1,47421	1,74180
001F0157	0,06926	0,40624	1,08740	0,94760	1,60822	1,43903	1,52339
001F0158	0,06934	0,36448	0,92852	0,84493	1,38635	1,29161	1,34241
001F0159	0,06483	0,34426	0,88544	0,81368	1,34668	1,27710	1,35820
Média	0,0691	0,3766	1,0212	0,8808	1,5141	1,3705	1,4914
Desv. Pad	0,0034	0,0276	0,1388	0,0621	0,1767	0,1007	0,1859

Concentração de ácidos: 30 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	Butírico	Isoval.	Valérico	Capróico
001F0131	0,10306	0,53817	1,35932	1,27912	2,08417	2,08379	2,17489
001F0132	0,14761	0,68920	1,71460	1,58554	2,58162	2,53456	2,61522
001F0133	0,13771	0,68148	1,71191	1,56635	2,53479	2,39576	2,46943
001F0134	0,12748	0,66521	1,70521	1,54815	2,52612	2,36938	2,41280
Média	0,1290	0,6435	1,6228	1,4948	2,4317	2,3459	2,4181
Desv. Pad	0,0191	0,0709	0,1757	0,1446	0,2330	0,1891	0,1832

Concentração de ácidos: 60 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	Butírico	Isoval.	Valérico	Capróico
001F0162	0,19565	0,99780	2,45898	2,27925	3,66191	3,44716	3,45474
001F0163	0,19226	1,03376	2,58842	2,39559	3,82249	3,68185	3,81959
001F0164	0,19311	1,02216	2,56031	2,35723	3,74518	3,62078	3,81644
001F0165	0,19929	1,00236	2,44450	2,29165	3,68410	3,50645	3,49955
Média	0,1951	1,0140	2,5131	2,3309	3,7284	3,5641	3,6476
Desv. Pad	0,0032	0,0169	0,0720	0,0550	0,0719	0,1066	0,1977

Concentração de ácidos: 120 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	Butírico	Isoval.	Valérico	Capróico
001F0162	0,19565	0,99780	2,45898	2,27925	3,66191	3,44716	3,45474
001F0163	0,19226	1,03376	2,58842	2,39559	3,82249	3,68185	3,81959
001F0164	0,19311	1,02216	2,56031	2,35723	3,74518	3,62078	3,81644
001F0165	0,19929	1,00236	2,44450	2,29165	3,68410	3,50645	3,49955
Média	0,1951	1,0140	2,5131	2,3309	3,7284	3,5641	3,6476
Desv. Pad	0,0032	0,0169	0,0720	0,0550	0,0719	0,1066	0,1977

Concentração de ácidos: 180 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	Butírico	Isoval.	Valérico	Capróico
001F0179	0,51043	2,80215	7,04765	6,73488	10,88830	11,10407	11,89460
001F0180	0,59152	3,23698	8,32372	7,90311	12,92739	13,69893	16,35863
001F0181	0,53964	2,85608	7,14808	6,70481	10,75674	10,76380	12,17059
Média	0,5472	2,9651	7,5065	7,1143	11,5241	11,8556	13,4746
Desv. Pad	0,0411	0,2370	0,7095	0,6833	1,2170	1,6054	2,5014

Concentração de ácidos: 240 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	Isob.	Butírico	Isoval.	Valérico	Capróico
001F0143	0,83581	3,65913	8,43309	7,84822	12,35366	11,91989	11,58383
001F0144	0,90784	4,62385	11,44816	10,61759	17,04513	16,78723	16,85766
001F0145	0,89431	4,79282	12,20202	11,22759	18,16031	17,95902	18,65623
001F0146	0,94783	4,99071	12,61948	11,56019	18,61705	18,28999	19,02995
Média	0,8965	4,5166	11,1757	10,3134	16,5440	16,2390	16,5319
Desv. Pad	0,0464	0,5910	1,8916	1,6892	2,8705	2,9507	3,4323

Tabela de ácidos - concentração (mg/L) por razão de área.

Concentração	Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico	Capróico
5	0,0429	0,1922	0,4664	0,4701	0,7233	0,9172	1,4696
15	0,0691	0,3766	1,0212	0,8808	1,5141	1,3705	1,4914
30	0,1290	0,6435	1,6228	1,4948	2,4317	2,3459	2,4181
60	0,1951	1,0140	2,5131	2,3309	3,7284	3,5641	3,6476
120	0,4205	2,1139	5,0806	4,6441	7,3975	7,1193	7,2644
180	0,5472	2,9651	7,5065	7,1143	11,5241	11,8556	13,4746
240	0,8965	4,5166	11,1757	10,3134	16,5440	16,2390	16,5319

Quarta curva de calibração para determinação de ácidos voláteis usando 5,0 mL de amostra e 1,0 mL de ácido sulfúrico 2%. - Realizada em São Carlos (EESC -LPB).

Valores calculados pela relação entre a área do pico do ácido e área do pico do padrão interno - ácido crotonico.

Concentração de ácidos: 4,5 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	But.
		0,09380	0,15507
	0,03175	0,09090	0,17227
Média	0,03175	0,09235	0,16367
Desv. Pad		0,00206	0,01216

Concentração de ácidos: 9 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	But.
		0,17242	0,30287
	0,02814	0,15284	0,29186
Média	0,02814	0,16263	0,29736
Desv. Pad		0,01384	0,00779

Concentração de ácidos: 18 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	But.
	0,15244	0,32596	0,60041
	0,12998	0,32055	0,58514
Média	0,14121	0,32325	0,59278
Desv. Pad	0,01588	0,00382	0,01079

Concentração de ácidos: 72 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	But.
	0,33602	1,29802	2,28822
	0,20345	1,19510	2,18833
Média	0,26974	1,24656	2,23828
Desv. Pad	0,09374	0,07277	0,07063

Concentração de ácidos: 180 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	But.
	0,35543	2,00544	3,61406
	0,31379	1,78720	3,16153
Média	0,33461	1,89632	3,38779
Desv. Pad	0,02944	0,15432	0,31998

Concentração de ácidos: 1080 mg/L

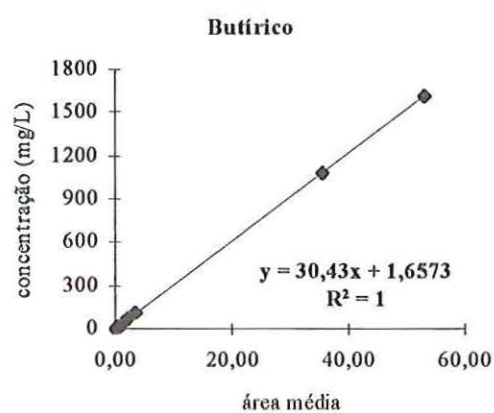
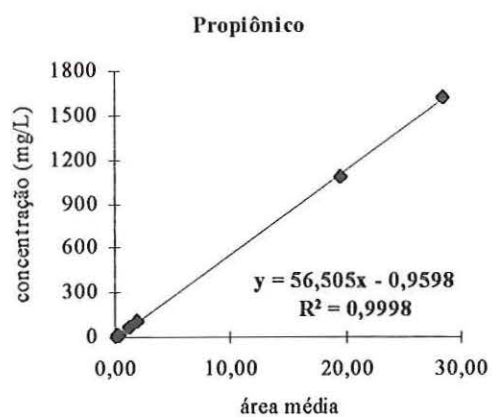
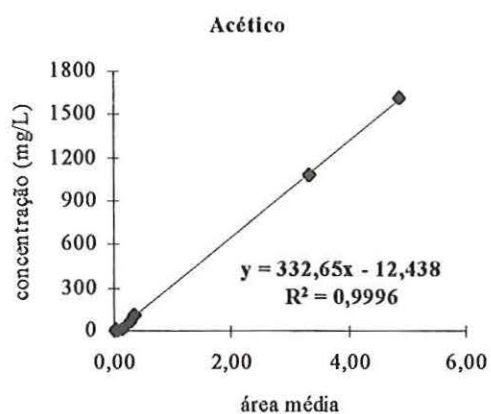
Amostra	Acético	Prop.	But.
	3,24807	19,11351	34,94953
	3,43068	19,79482	35,86198
Média	3,33938	19,45417	35,40576
Desv. Pad	0,12913	0,48176	0,64520

Concentração de ácidos: 1620 mg/L

Amostra	Acético	Prop.	But.
	4,89712	28,13998	51,88306
	4,84138	28,80034	54,54206
Média	4,86925	28,47016	53,21256
Desv. Pad	0,03941	0,46694	1,88019

Tabela de ácidos - concentração (mg/L) por razão de área.

Concentração	Acético	Propiônico	Butírico
4,5	0,0318	0,0924	0,1637
9,0	0,0281	0,1626	0,2974
18,0	0,1412	0,3233	0,5928
72,0	0,2697	1,2466	2,2383
108,0	0,3346	1,8963	3,3878
1080,0	3,3394	19,4542	35,4058
1620,0	4,8692	28,4702	53,2126



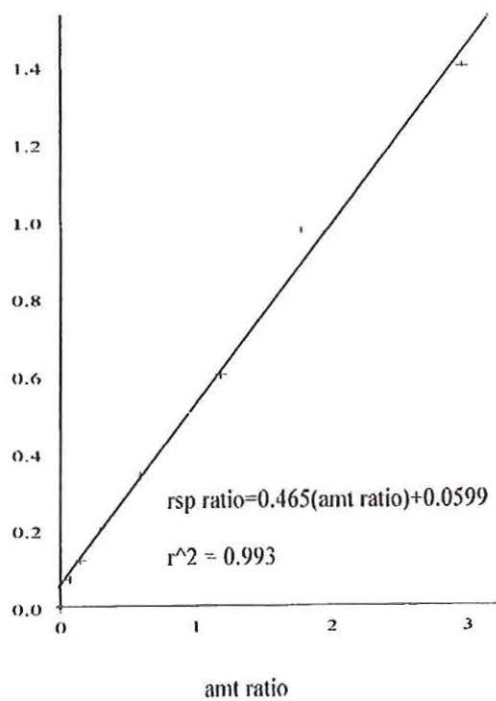
ANEXO C

Curva de calibração para determinação de clorofenóis, realizada em São Carlos (EESC - LPB).

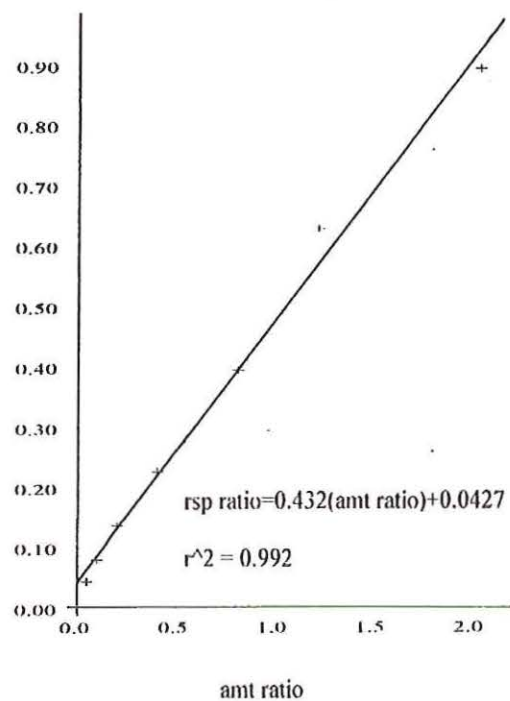
As curvas foram montadas pelo próprio equipamento e calculadas a partir da razão da área da amostra pela área do padrão interno - bromofenol (**rsp ratio**) e da razão da concentração da amostra pela concentração do padrão (**amt ratio**). Abaixo a tabela com os valores das curvas de calibração.

Pk#	RT	Lvl	mg/L	Amt/Area	Ref	Istd	I#	Name
1	7.935	1	0.236	3.8294e-006			1	2,6 diclorofenol
		2	0.472	4.4218e-006				
		3	0.944	4.7957e-006				
		4	1.888	5.351e-006				
		5	3.776	6.4004e-006				
		6	5.664	8.2228e-006				
		7	9.44	7.3068e-006				
2	10.409	1	0.160	7.7068e-006			1	2,4 diclorofenol
		2	0.336	8.5718e-006				
		3	0.672	8.6753e-006				
		4	1.344	1.0621e-005				
		5	2.688	1.2789e-005				
		6	4.032	1.5669e-005				
		7	6.72	1.5374e-005				
3	11.587	1	0.244	6.8679e-006			1	2,3 diclorofenol
		2	0.488	8.185e-006				
		3	0.976	8.4539e-006				
		4	1.952	1.0199e-005				
		5	3.904	1.2186e-005				
		6	5.856	1.4684e-005				
		7	9.76	1.4284e-005				
4	11.809	1	0.236	5.3978e-007			1	2,4,6 triclorofenol
		2	0.472	5.418e-007				
		3	0.944	5.4581e-007				
		4	1.888	6.0026e-007				
		5	3.776	6.7272e-007				
		6	5.664	9.011e-007				
		7	9.44	7.5669e-007				
5	13.394	1	0.176	4.1143e-007			1	2,3,6 triclorofenol
		2	0.352	4.3683e-007				
		3	0.704	4.4909e-007				
		4	1.408	5.0109e-007				
		5	2.816	5.4846e-007				
		6	4.224	7.0077e-007				
		7	7.04	6.048e-007				
6	17.383	1	3.29	6.5275e-006	ISTD		1	2,4 dibromofenol
		2	3.29	6.5803e-006				
		3	3.29	5.7291e-006				
		4	3.29	5.8407e-006				
		5	3.29	6.155e-006				
		6	3.29	8.0223e-006				
		7	3.29	6.7111e-006				
7	18.892	1	0.264	9.8261e-007			1	2,3,4 triclorofenol
		2	0.528	1.067e-006				
		3	1.056	9.5714e-007				
		4	2.112	1.1892e-006				
		5	4.224	1.371e-006				
		6	10.56	1.5275e-006				
		7	0.1	2.177e-006				
8	19.454	1	0.1	2.177e-006			1	
		2	0.1	2.2696e-006				
		3	0.1	2.2701e-006				
		4	0.1	1.6621e-006				
		5	0.1	1.8421e-006				
		6	0.1	2.2557e-007				
		7	0.1	3.5378e-006				
9	20.652	1	0.1	8.1846e-007			1	
		2	0.1	8.0208e-007				
		3	0.1	6.9425e-007				
		4	0.1	7.8685e-007				
		5	0.1	7.3282e-007				
		6	0.1	1.0516e-006				
		7	0.1	1.0796e-006				
10	23.057	1	0.1	3.3108e-006			1	
		2	0.1	3.414e-006				
		3	0.1	2.9611e-006				
		4	0.1	2.9697e-006				
		5	0.1	3.1075e-006				
		6	0.1	4.2736e-006				
		7	0.1	3.5879e-006				
11	27.244	1	0.24	3.9957e-007			1	pentaclorofenol
		2	0.48	5.0961e-007				
		3	0.96	4.2851e-007				
		4	1.92	5.2443e-007				
		5	3.84	5.8886e-007				
		6	7.68	6.4973e-007				
		7	9.6	6.4973e-007				

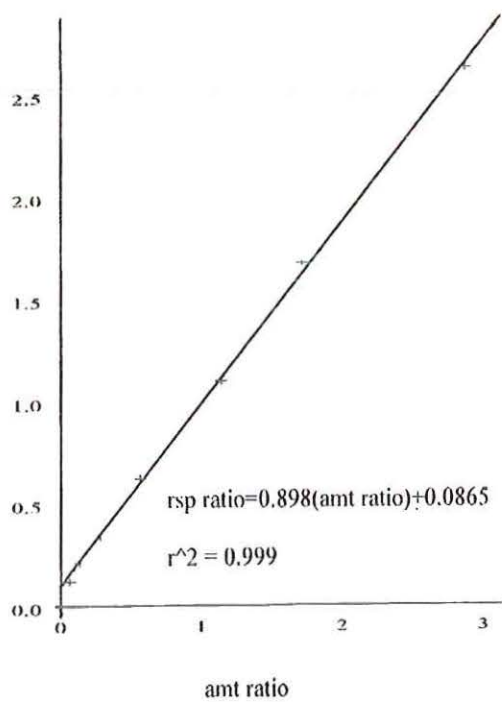
2,3 diclorofenol



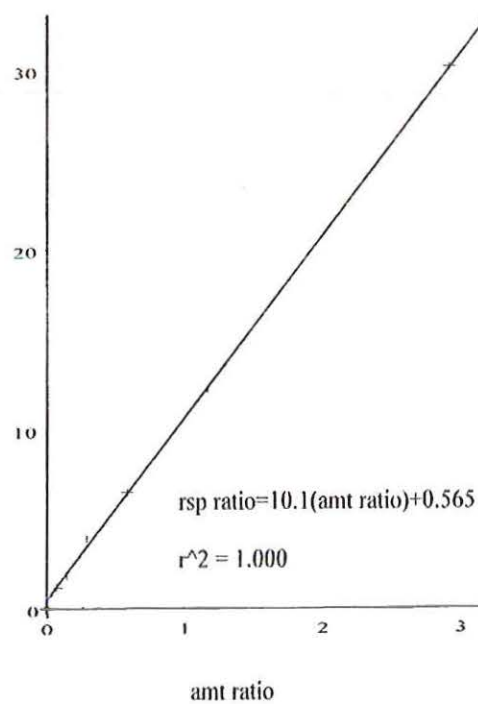
2,4 diclorofenol



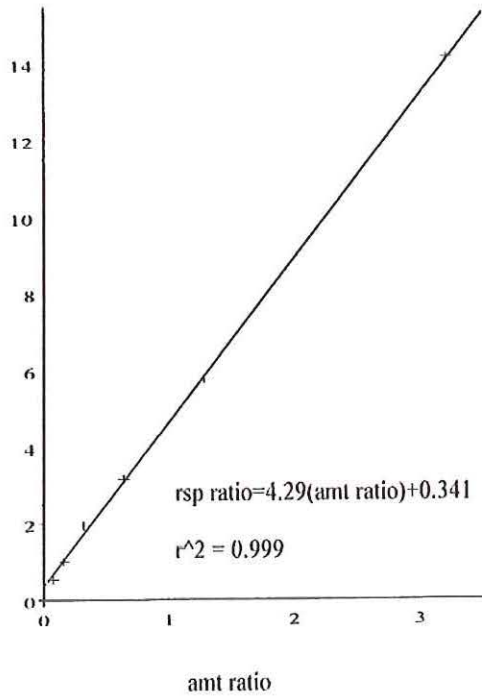
2,6 diclorofenol



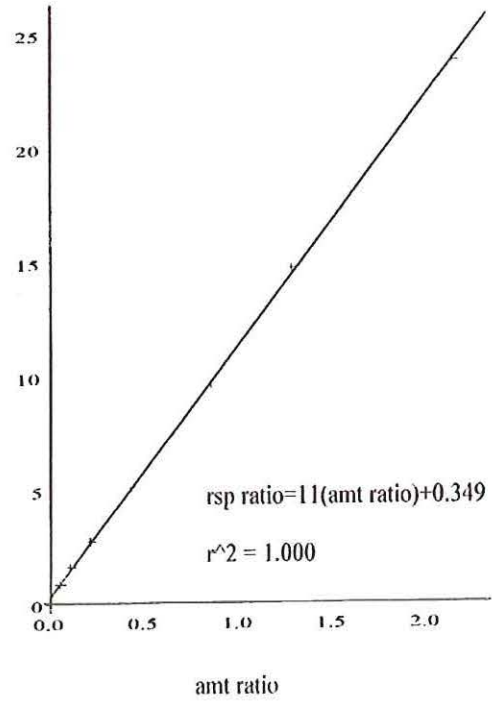
pentaclorofenol



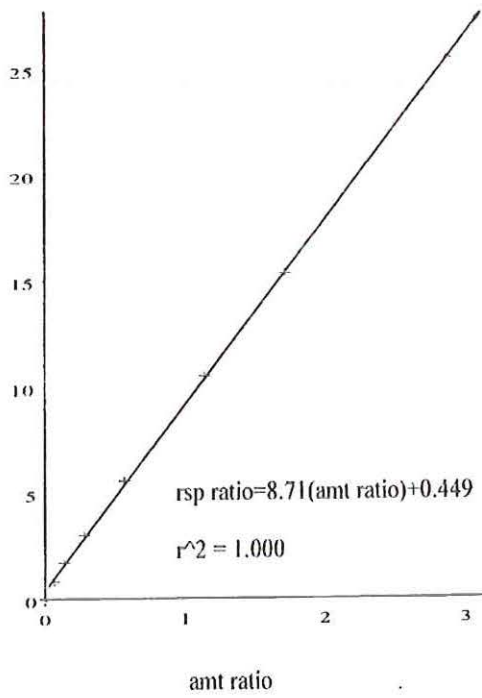
2,3,4 trichlorofenol



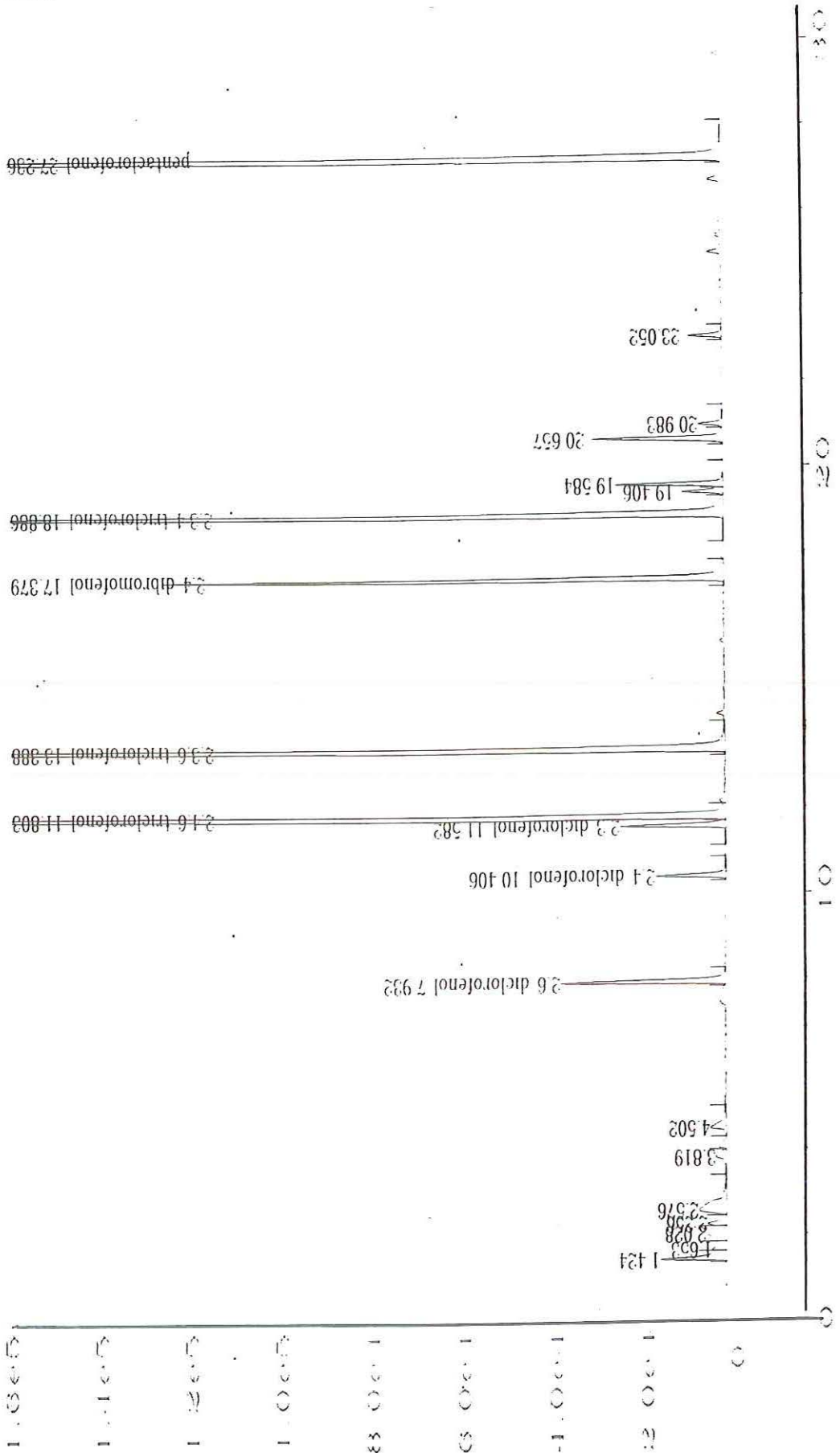
2,3,6 trichlorofenol



2,4,6 trichlorofenol



C:\HPCHEM\1 DATA\MARTHA\30000019.D



ANEXO D

Cálculo do número de moles:

$$n = 1 \cdot V / (0,082 \cdot (273 + 27))$$

Onde:

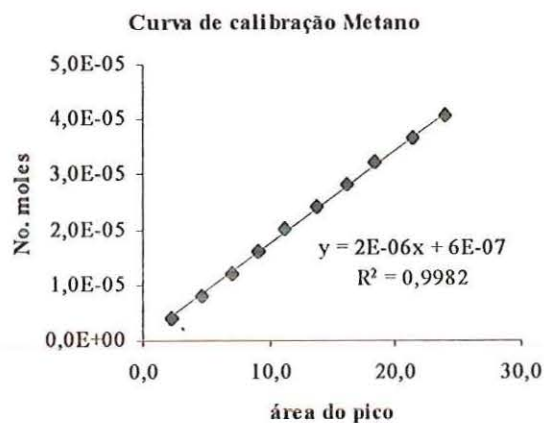
V = volume variável (L)

T = T ambiente = 27°C (K)

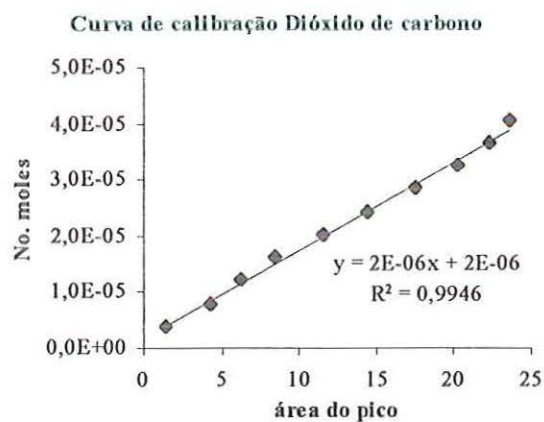
P = P atm. = 1 atm

R = 0,082 atm L/mol K

Vol. CH ₄ (mL)	Área média	Desvio padrão	Nº moles
1,0	23,879	0,65452	4,065E-05
0,9	21,424	0,58555	3,6585E-05
0,8	18,286	0,58473	3,252E-05
0,7	16,102	0,35446	2,8455E-05
0,6	13,781	0,17663	2,439E-05
0,5	11,149	0,39903	2,0325E-05
0,4	9,063	0,25931	1,626E-05
0,3	7,007	0,06126	1,2195E-05
0,2	4,586	0,08423	8,1301E-06
0,1	2,308	0,03183	4,065E-06



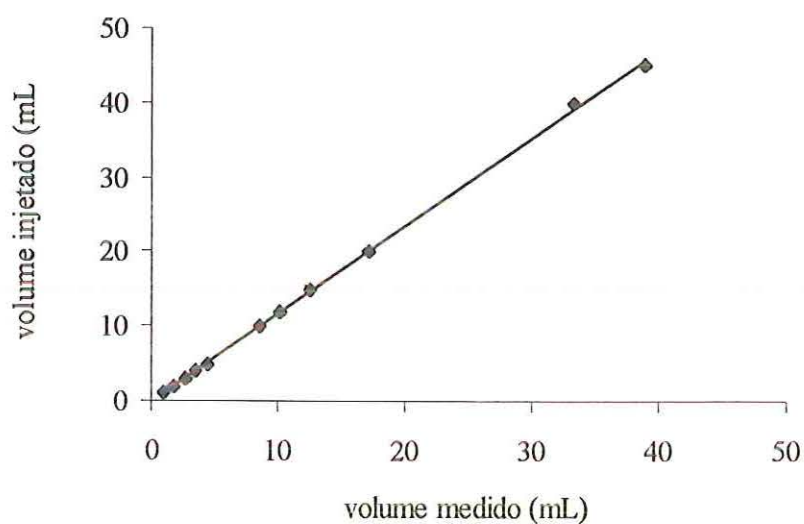
Vol CO ₂ (mL)	Área	Desvio padrão	Nº moles
1,0	23,513	1,51191	4,065E-05
0,9	22,27575	0,13573	3,6585E-05
0,8	20,1745	0,18232	3,252E-05
0,7	17,46775	0,33642	2,8455E-05
0,6	14,39175	2,05156	2,439E-05
0,5	11,52375	0,85887	2,0325E-05
0,4	8,426	0,24832	1,626E-05
0,3	6,166	0,36006	1,2195E-05
0,2	4,3255	0,13858	8,1301E-06
0,1	1,36975	0,21001	4,065E-06



ANEXO E

Curva experimental para correção do volume medido de biogás pelo sistema da bureta.

Volume medido (mL)	Volume injetado (mL)	Erro %
1	1	0
1,7	2	15,0
2,7	3	10,0
3,5	4	12,5
4,4	5	12,0
8,5	10	15,0
10,1	12	15,8
12,6	15	16,0
17,2	20	14,0
33,4	40	16,5
38,9	45	13,6



Equação para correção do biogás medido:

$$Y = 1,176 X - 0,0532 \quad (R^2 = 0,9995)$$

ANEXO F

Valores de volume de metano, medidos pelo deslocamento de líquido (NaOH 5%) para cálculos da AME com o lodo flocculento.

Hora Acumulada	Temperatura	Fator Correção	Ensaio 1				Ensaio 2			
			Diferença de Volume (mL)	Volume Corrigido (mL)	Volume Acumulado (mL)	DQO-CH ₄ (g/L)	Diferença de Volume (mL)	Volume Corrigido (mL)	Volume Acumulado (mL)	DQO-CH ₄ (g/L)
0:00	31,0	0,85411	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
1:20	30,5	0,85677	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
3:00	29,0	0,86443	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
4:40	28,5	0,86695	0	0,000	0,000	0,000	1	0,867	0,867	0,015
6:20	28,0	0,86948	0	0,000	0,000	0,000	1	0,869	1,736	0,029
8:20	27,0	0,87456	1	0,875	0,875	0,015	2	1,749	3,486	0,059
16:15	24,5	0,88738	2	1,775	2,649	0,045	3	2,662	6,148	0,104
19:00	25,0	0,88479	3	2,654	5,304	0,090	3	2,654	8,802	0,149
21:35	27,5	0,87201	5	4,360	9,664	0,163	4	3,488	12,290	0,207
24:50	28,5	0,86695	5	4,335	13,999	0,236	4	3,468	15,758	0,266
29:45	26,5	0,87710	3	2,631	16,630	0,281				
41:50	25,0	0,88479	13	11,502	28,132	0,475				
45:10	25,0	0,88479	3	2,654	30,787	0,520				
50:20	26,5	0,87710	6	5,263	36,049	0,608	0	0,000	15,758	0,266
54:35	25,0	0,88479	4	3,539	39,588	0,668	5	4,424	20,182	0,341
65:35	23,0	0,89518	12	10,742	50,331	0,849	11	9,847	30,029	0,507
69:30	23,5	0,89257	4	3,570	53,901	0,910	4	3,570	33,599	0,567
73:15	23,5	0,89257	6	5,355	59,256	1,000	4	3,570	37,169	0,627
77:55	23,0	0,89518	5	4,476	63,732	1,076	4	3,581	40,750	0,688
90:15	22,5	0,89780	14	12,569	76,301	1,288	11	9,876	50,626	0,854
97:10	23,0	0,89518	10	8,952	85,253	1,439	9	8,057	58,683	0,990
150:50	27,0	0,87456	78	68,215	153,469	2,590	56	48,975	107,658	1,817
162:25	25,0	0,88479	10	8,848	162,316	2,740	8	7,078	114,736	1,936
187:15	23,5	0,89257	8	7,141	169,457	2,860	10	8,926	123,662	2,087
210:35	24,5	0,88738	30	26,621	196,078	3,309	18	15,973	139,635	2,357
235:10	24,0	0,88997	25	22,249	218,328	3,685	16	14,240	153,874	2,597
259:00	24,5	0,88738	23	20,410	238,737	4,029	16	14,198	168,072	2,837
330:05	26,0	0,87965	56	49,261	287,998	4,861	42	36,945	205,018	3,460
361:05	30,0	0,85945	38	32,659	320,657	5,412	26	22,346	227,363	3,837

Hora Acumulada	Temperatura	Fator Correção	Branco			
			Diferença de Volume (mL)	Volume Corrigido (mL)	Volume Acumulado (mL)	DQO-CH ₄ (g/L)
0:00	31,0	0,85411	0	0,000	0,000	0,000
1:20	30,5	0,85677	0	0,000	0,000	0,000
3:00	29,0	0,86443	0	0,000	0,000	0,000
4:40	28,5	0,86695	0	0,000	0,000	0,000
6:20	28,0	0,86948	2	1,739	1,739	0,029
8:20	27,0	0,87456	1	0,875	2,614	0,044
16:15	24,5	0,88738	3	2,662	5,276	0,089
19:00	25,0	0,88479	0	0,000	5,276	0,089
21:35	27,5	0,87201	4	3,488	8,764	0,148
24:50	28,5	0,86695	4	3,468	12,232	0,206
29:45	26,5	0,87710	2	1,754	13,986	0,236
41:50	25,0	0,88479	4	3,539	17,525	0,296
45:10	25,0	0,88479	1	0,885	18,410	0,311
50:20	26,5	0,87710	4	3,508	21,918	0,370
54:35	25,0	0,88479	1	0,885	22,803	0,385
65:35	23,0	0,89518	4	3,581	26,384	0,445
69:30	23,5	0,89257	1	0,893	27,276	0,460
73:15	23,5	0,89257	1	0,893	28,169	0,475
77:55	23,0	0,89518	2	1,790	29,959	0,506
90:15	22,5	0,89780	4	3,591	33,550	0,566
97:10	23,0	0,89518	4	3,581	37,131	0,627
150:50	27,0	0,87456	26	22,738	59,870	1,010
162:25	25,0	0,88479	2	1,770	61,639	1,040
187:15	23,5	0,89257	2	1,785	63,424	1,070
210:35	24,5	0,88738	10	8,874	72,298	1,220
235:10	24,0	0,88997	9	8,010	80,308	1,355
259:00	24,5	0,88738	13	11,536	91,844	1,550
330:05	26,0	0,87965	28	24,630	116,474	1,966
361:05	30,0	0,85945	22	18,908	135,382	2,285

Valores de volume de metano, medidos pelo deslocamento de líquido (NaOH 5%) para cálculos da AME com o lodo granulado.

Hora Acumulada	Temperatura	Fator Correção	Ensaio 1				Ensaio 2			
			Diferença de Volume (mL)	Volume Corrigido (mL)	Volume Acumulado (mL)	DQO-CH ₄ (g/L)	Diferença de Volume (mL)	Volume Corrigido (mL)	Volume Acumulado (mL)	DQO-CH ₄ (g/L)
0:00	31,0	0,85411	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
1:20	30,5	0,85677	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
3:00	29,0	0,86443	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
4:40	28,5	0,86695	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
6:20	28,0	0,86948	0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
8:20	27,0	0,87456	2	1,749	1,749	0,005	0	0,000	0,000	0,000
16:15	24,5	0,88738	3	2,662	4,411	0,013	0	0,000	0,000	0,000
19:00	25,0	0,88479	1	0,885	5,296	0,015	0	0,000	0,000	0,000
21:35	27,5	0,87201	4	3,488	8,784	0,025	7	6,104	6,104	0,017
24:50	28,5	0,86695	3	2,601	11,385	0,033	5	4,335	10,439	0,030
29:45	26,5	0,87710	3	2,631	14,016	0,040	0	0,000	10,439	0,030
41:50	25,0	0,88479	4	3,539	17,555	0,050	6	5,309	15,748	0,045
45:10	25,0	0,88479	2	1,770	19,325	0,055	1	0,885	16,632	0,048
50:20	26,5	0,87710	4	3,508	22,833	0,065	3	2,631	19,264	0,055
54:35	25,0	0,88479	1	0,885	23,718	0,068	2	1,770	21,033	0,060
65:35	23,0	0,89518	4	3,581	27,299	0,078	6	5,371	26,404	0,075
69:30	23,5	0,89257	1	0,893	28,192	0,081	1	0,893	27,297	0,078
73:15	23,5	0,89257	2	1,785	29,977	0,086	3	2,678	29,975	0,086
77:55	23,0	0,89518	3	2,686	32,662	0,093	2	1,790	31,765	0,091
90:15	22,5	0,89780	0	0,000	32,662	0,093	7	6,285	38,050	0,109
97:10	23,0	0,89518	4	3,581	36,243	0,104	6	5,371	43,421	0,124
150:50	27,0	0,87456	33	28,860	65,103	0,186	34	29,735	73,156	0,209
162:25	25,0	0,88479	4	3,539	68,642	0,196	16	14,157	87,312	0,249
187:15	23,5	0,89257	6	5,355	73,998	0,211	9	8,033	95,346	0,272
210:35	24,5	0,88738	12	10,649	84,646	0,242	17	15,085	110,431	0,316
235:10	24,0	0,88997	18	16,019	100,666	0,288	19	16,909	127,340	0,364
259:00	24,5	0,88738	18	15,973	116,639	0,333	20	17,748	145,088	0,415
330:05	26,0	0,87965	47	41,344	157,982	0,451	90	79,169	224,257	0,641
361:05	30,0	0,85945	32	27,502	185,485	0,530	40	34,378	258,635	0,739
378:45	32,0	0,84916	7	0,000	185,485	0,530	8	0,000	258,635	0,739
403:05	26,0	0,87965	18	0,000	185,485	0,530	24	0,000	258,635	0,739
433:20	26,0	0,87965	9	0,000	185,485	0,530	12	0,000	258,635	0,739
475:10	24,0	0,88997	0	0,000	185,485	0,530	-4	0,000	258,635	0,739
498:20	22,5	0,89780	0	0,000	185,485	0,530	-4	0,000	258,635	0,739

Hora Acumulada	Temperatura	Fator Correção	Branco			
			Diferença de Volume (mL)	Volume Corrigido (mL)	Volume Acumulado (mL)	DQO-CH ₄ (g/L)
0:00	31,0	0,85411	0	0,000	0,000	0,000
1:20	30,5	0,85677	0	0,000	0,000	0,000
3:00	29,0	0,86443	2	1,729	1,729	0,005
4:40	28,5	0,86695	0	0,000	1,729	0,005
6:20	28,0	0,86948	1	0,869	2,598	0,007
8:20	27,0	0,87456	1	0,875	3,473	0,010
16:15	24,5	0,88738	2	1,775	5,248	0,015
19:00	25,0	0,88479	1	0,885	6,132	0,018
21:35	27,5	0,87201	3	2,616	8,749	0,025
24:50	28,5	0,86695	4	3,468	12,216	0,035
29:45	26,5	0,87710	2	1,754	13,971	0,040
41:50	25,0	0,88479	4	3,539	17,510	0,050
45:10	25,0	0,88479	0	0,000	17,510	0,050
50:20	26,5	0,87710	3	2,631	20,141	0,058
54:35	25,0	0,88479	1	0,885	21,026	0,060
65:35	23,0	0,89518	2	1,790	22,816	0,065
69:30	23,5	0,89257	0	0,000	22,816	0,065
73:15	23,5	0,89257	2	1,785	24,601	0,070
77:55	23,0	0,89518	1	0,895	25,496	0,073
90:15	22,5	0,89780	4	3,591	29,088	0,083
97:10	23,0	0,89518	5	4,476	33,564	0,096
150:50	27,0	0,87456	20	17,491	51,055	0,146
162:25	25,0	0,88479	13	11,502	62,557	0,179
187:15	23,5	0,89257	4	3,570	66,127	0,189
210:35	24,5	0,88738	9	7,986	74,114	0,212
235:10	24,0	0,88997	12	10,680	84,793	0,242
259:00	24,5	0,88738	12	10,649	95,442	0,273
330:05	26,0	0,87965	36	31,668	127,109	0,363
361:05	30,0	0,85945	28	24,064	151,174	0,432
378:45	32,0	0,84916	0	0,000	151,174	0,432
403:05	26,0	0,87965	10	0,000	151,174	0,432
433:20	26,0	0,87965	8	0,000	151,174	0,432
475:10	24,0	0,88997	10	0,000	151,174	0,432
498:20	22,5	0,89780	5	0,000	151,174	0,432

Fator de correção do gás metano para o ensaio de AME

$x = P_v/760 \text{ mmHg}$	Interpolação
Valores encontrados no Perry para solução de NaOH 5% 20° C = 16,9 40° C = 53,2	Ex. = 30° C 0,9539
	31° C y
	40° C 0,93000
	$(30-31)/(0,95389-y) = (31-40)/(y-0,93)$

T (°C)	Pv (mmHg)	x	x(%)	Fator (100-x)	Fator umidade (NaOH 5%)
10	10,650	0,01401	1,401	98,599	0,98599
11	11,275	0,01484	1,484	98,516	0,98516
12	11,900	0,01566	1,566	98,434	0,98434
13	12,525	0,01648	1,648	98,352	0,98352
14	13,150	0,01730	1,730	98,270	0,98270
15	13,775	0,01813	1,813	98,188	0,98188
16	14,400	0,01895	1,895	98,105	0,98105
17	15,025	0,01977	1,977	98,023	0,98023
18	15,650	0,02059	2,059	97,941	0,97941
19	16,275	0,02141	2,141	97,859	0,97859
20	16,900	0,02224	2,224	97,776	0,97776
21	18,715	0,02463	2,463	97,538	0,97538
22	20,530	0,02701	2,701	97,299	0,97299
23	22,345	0,02940	2,940	97,060	0,97060
24	24,160	0,03179	3,179	96,821	0,96821
25	25,980	0,03418	3,418	96,582	0,96582
26	27,790	0,03657	3,657	96,343	0,96343
27	29,600	0,03895	3,895	96,105	0,96105
28	31,420	0,04134	4,134	95,866	0,95866
29	33,240	0,04374	4,374	95,626	0,95626
30	35,050	0,04612	4,612	95,388	0,95388
31	36,865	0,04851	4,851	95,149	0,95149
32	38,680	0,05089	5,089	94,911	0,94911
33	40,495	0,05328	5,328	94,672	0,94672
34	42,310	0,05567	5,567	94,433	0,94433
35	44,125	0,05806	5,806	94,194	0,94194
36	45,940	0,06045	6,045	93,955	0,93955
37	47,755	0,06284	6,284	93,716	0,93716
38	49,570	0,06522	6,522	93,478	0,93478
39	51,385	0,06761	6,761	93,239	0,93239
40	53,200	0,07000	7,000	93,000	0,93000

$$\text{CNTP} = P_1 V_1 / T_1$$

$$\text{Medida} = P_2 V_2 / T_2$$

$$V_1 = (P_2 V_2 / T_2) (T_1 / P_1) f \text{ umidade}$$

$$V_1 = V_2 (P_2 / P_1) (T_1 / T_2) f \text{ umidade}$$

$$V_1 = V_2 (1) (T_1 / T_2) f \text{ umidade}$$

$$V_1 = V_2 (273 / (T_1 + 273)) f \text{ umidade}$$

$$V_1 = V_2 (\text{Fator Temperatura})$$

T (°C)	F umidade (NaOH - 5%)	Fator Temperatura
10	0,98599	0,95115
11	0,98517	0,94701
12	0,98434	0,94289
13	0,98352	0,93881
14	0,98270	0,93476
15	0,98188	0,93074
16	0,98105	0,92674
17	0,98023	0,92277
18	0,97941	0,91883
19	0,97859	0,91491
20	0,97777	0,91103
21	0,97538	0,90571
22	0,97299	0,90043
23	0,97060	0,89518
24	0,96821	0,88997
25	0,96582	0,88479
26	0,96343	0,87965
27	0,96105	0,87456
28	0,95866	0,86948
29	0,95626	0,86443
30	0,95389	0,85945
31	0,95149	0,85447
32	0,94911	0,84953

T (°C)	F umidade (NaOH - 5%)	Fator Temperatura
10,5	0,98558	0,94908
11,5	0,98476	0,94495
12,5	0,98393	0,94085
13,5	0,98311	0,93679
14,5	0,98229	0,93275
15,5	0,98147	0,92873
16,5	0,98064	0,92475
17,5	0,97982	0,92079
18,5	0,97900	0,91687
19,5	0,97818	0,91297
20,5	0,97658	0,90836
21,5	0,97419	0,90306
22,5	0,97180	0,89780
23,5	0,96941	0,89257
24,5	0,96702	0,88738
25,5	0,96463	0,88222
26,5	0,96224	0,87710
27,5	0,95986	0,87201
28,5	0,95746	0,86695
29,5	0,95508	0,86194
30,5	0,95269	0,85695
31,5	0,95030	0,85199

ANEXO G

Valores em mg/L dos ácidos acético, propiônico e butírico medidos na entrada e saída do RAH.

Dias operação	acético			propiônico			butírico		
	Entrada	Saída	Efic.	Entrada	Saída	Efic.	Entrada	Saída	Efic.
601	1307,69	20,57	98,43	903,45	13,01	98,56	1062,76	7,23	99,32
604	1239,07	20,04	98,38	917,44	13,14	98,57	1084,50	7,28	99,33
608	986,48	20,43	97,93	722,98	0,00	99,90	822,17	7,43	99,10
611	1319,59	24,07	98,18	952,56	13,30	98,60	1142,63	7,40	99,35
613	1353,41	29,40	97,83	946,16	13,15	98,61	1084,26	7,17	99,34
615	1285,24	36,08	97,19	866,32	15,21	98,24	1013,37	7,78	99,23
618	1391,33	25,90	98,14	1008,23	13,36	98,67	1188,17	7,45	99,37
625	1700,39	43,03	97,47	557,94	-0,63	99,90	646,81	2,31	99,64
629	853,04	14,84	98,26	540,69	-0,87	99,90	776,44	2,63	99,66
633	838,79	2,35	99,72	519,14	-1,03	99,90	679,42	2,31	99,66
636	1127,50	9,68	99,14	770,40	0,13	99,98	919,60	2,58	99,72
639	1547,63	91,30	94,10	728,63	0,98	99,87	811,93	2,69	99,67
642	926,37	71,59	92,27	774,22	-0,54	99,90	1068,50	3,14	99,71
646	1296,95	75,49	94,18	791,66	1,72	99,78	926,75	3,01	99,68
649	1065,50	24,22	97,73	383,51	10,57	97,24	484,07	3,12	99,36
653	1671,43	171,26	89,75	940,11	530,07	43,62	1298,08	6,72	99,48
655	880,35	33,67	96,18	483,62	477,49	1,27	535,63	3,26	99,39
660	2021,64	40,09	98,02	766,82	2,11	99,73	944,59	2,62	99,72
664	885,03	3,03	99,66	612,02	1,26	99,79	766,10	-1,76	99,90
667	843,35	5,37	99,36	573,35	0,14	99,98	737,61	-0,12	99,90
683	1167,43	10,06	99,14	674,57	1,08	99,84	868,81	0,31	99,96
688	835,85	3,16	99,62	577,60	1,13	99,80	677,14	-1,94	99,90
692	894,41	0,90	99,90	617,86	-0,83	99,90	774,78	-2,04	99,90
696	931,62	1,07	99,88	633,08	-1,34	99,90	814,52	-2,11	99,90
713	1152,26	16,16	98,60	658,08	-0,92	99,90	829,33	2,31	99,72
716	1226,39	46,81	96,18	768,16	-0,54	99,90	934,97	2,69	99,71
719	1199,28	148,73	87,60	727,83	8,77	98,79	907,90	3,82	99,58
724	1706,70	33,19	98,06	706,65	-1,00	99,90	864,23	2,65	99,69
727	1825,46	6,18	99,66	716,60	-0,22	99,90	837,96	2,76	99,67
730	1312,27	58,00	95,58	839,10	7,00	99,17	1041,66	3,56	99,66
737	1268,63	380,90	69,98	860,43	315,81	63,30	1058,63	123,69	88,32
741	1632,70	88,76	94,56	1047,03	66,63	93,64	1283,33	3,02	99,76
744	1083,38	157,08	85,50	640,47	185,86	70,98	778,02	14,14	98,18
748	1297,93	103,21	92,05	822,40	110,75	86,53	1022,99	9,84	99,04
751	1226,39	311,16	74,63	768,16	273,67	64,37	934,97	61,72	93,40

ANEXO H

Valores de concentração do pentaclorofenol (mg/L) medidos na entrada e saída do RAH.
Os valores com relação de área negativos foram considerados menores que 0,0001 mg/L de PCP calculado como o limite de detecção do aparelho.

Dias	PCP Entrada (mg/L)	Desvio padrão Entrada	PCP Saída (mg/L)	Desvio padrão Saída
633	0	-	-	-
636	0	-	-	-
639	0	-	-	-
646	2,4965	0,02051	0,00010	-
649	2,2155	0,03182	0,07175	0,00290
651	4,3670	0,28567	0,14750	0,00354
653	4,5370	0,00990	0,03055	0,00785
655	5,1505	0,05162	0,00010	-
660	4,7560	0,04101	-	-
664	7,7095	0,12940	-	-
667	7,2335	0,09970	-	-
683	7,3120	0,03111	0,00010	-
688	6,6390	0,34365	0,00010	-
692	6,9365	0,06152	-	-
698	10,8310	0,45182	-	-
701	7,7465	0,18455	0,00010	-
716	10,3298	-	-	-
719	10,1985	-	-	-
727	12,9112	-	-	-
730	15,4971	-	0,00010	-
737	19,8772	-	0,1350	-
741	19,6218	-	0,00010	-
744	23,8726	-	0,00010	-
748	21,2814	-	0,00010	-

ANEXO I

Valores de volume de biogás para os ensaios do teste de toxicidade I.

Valores corrigidos através da equação experimental para correção do volume de biogás medido, conforme Anexo E.

Amostra	0 mg/L de PCP								2 mg/L de PCP							
	A		B		C		Média	Desv.	A		B		C		Média	Desv.
	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)			Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)		
0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
4:30	4,5	4,5	3,4	3,4	5,2	5,2	4,4	0,95	4,7	4,7	5,2	5,2	5,1	5,1	5,0	0,31
17:55	7,0	11,5	5,8	9,2	8,4	13,7	11,5	2,24	8,3	12,9	9,1	14,4	8,3	13,4	13,6	0,72
42:20	9,5	21,0	9,0	18,2	7,8	21,5	20,2	1,78	8,8	21,7	6,7	21,0	7,1	20,5	21,1	0,59
65:00	1,9	23,0	3,4	21,5	1,8	23,3	22,6	0,93	2,7	24,4	1,5	22,5	2,1	22,6	23,2	1,05
91:30	1,0	24,0	1,1	22,7	1,4	24,7	23,8	1,01	1,1	25,5	1,0	23,5	1,0	23,6	24,2	1,12
114:20	-0,1	23,9	-0,1	22,6	-0,1	24,6	23,7	1,01	0,1	25,6	0,1	23,6	0,2	23,8	24,3	1,09
142:30	0,2	24,1	0,2	22,8	0,2	24,8	23,9	1,01	0,3	25,9	0,3	23,9	0,4	24,2	24,6	1,07
185:00	-0,3	23,8	-0,3	22,5	-0,2	24,6	23,6	1,07	-0,1	25,8	-0,1	23,8	-0,1	24,2	24,6	1,07

Amostra	4 mg/L de PCP								6 mg/L de PCP							
	A		B		C		Média	Desv.	A		B		C		Média	Desv.
	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)			Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)		
0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
4:30	5,2	5,2	3,7	3,7	5,2	5,2	4,7	0,88	4,9	4,9	5,0	5,0	4,2	4,2	4,7	0,45
22:25	8,2	13,4	4,8	8,5	8,8	14,0	12,0	3,04	6,8	11,7	6,8	11,8	6,2	10,4	11,3	0,78
35:30	6,1	19,5	5,8	14,3	4,9	18,9	17,6	2,83	4,7	16,3	3,6	15,4	4,5	14,9	15,5	0,72
48:10	2,3	21,8	1,7	16,0	2,4	21,3	19,7	3,20	1,4	17,7	1,4	16,7	1,4	16,3	16,9	0,72
62:10	1,7	23,5	1,2	17,3	1,9	23,3	21,3	3,53	1,2	18,9	0,9	17,6	1,1	17,4	18,0	0,82
73:40	0,1	23,6	0,1	17,3	0,4	23,7	21,5	3,63	-0,1	18,8	-0,1	17,6	-0,1	17,3	17,9	0,82
86:20	0,2	23,7	-0,1	17,3	-0,1	23,6	21,5	3,70	0,3	19,1	-0,1	17,5	-0,1	17,3	18,0	1,03
108:50	-0,1	23,7	0,2	17,4	0,3	23,9	21,7	3,67	-0,1	19,1	0,3	17,8	0,4	17,7	18,2	0,78

Amostra	8 mg/L de PCP								10 mg/L de PCP							
	A		B		C		Média	Desv.	A		B		C		Média	Desv.
	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)			Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)		
0:00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
4:30	4,4	4,4	5,2	5,2	4,8	4,8	4,8	0,41	4,8	4,8	5,0	5,0	4,4	4,4	4,7	0,30
22:25	4,1	8,5	7,0	12,2	4,9	9,7	10,1	1,93	3,9	8,7	5,4	10,4	4,3	8,7	9,3	0,95
35:30	4,4	12,9	2,7	14,9	3,9	13,6	13,8	1,01	0,9	9,6	3,9	14,3	1,1	9,8	11,2	2,65
48:10	1,0	13,9	1,1	16,0	1,2	14,8	14,9	1,06	0,7	10,3	1,5	15,8	0,4	10,3	12,1	3,19
62:10	0,9	14,8	0,2	16,2	1,0	15,8	15,6	0,73	0,7	10,9	1,1	16,9	0,9	11,1	13,0	3,40
73:40	0,1	14,9	0,1	16,3	-0,1	15,8	15,6	0,72	-0,3	10,6	-0,2	16,7	-0,1	11,1	12,8	3,40
86:20	0,3	15,2	0,2	16,4	0,3	16,1	15,9	0,67	0,3	10,9	0,3	17,0	0,2	11,3	13,1	3,43
108:50	-0,1	15,1	-0,1	16,4	-0,1	16,0	15,8	0,67	-0,1	10,9	-0,2	16,9	-0,1	11,2	13,0	3,37



ANEXO J

Valores de volume de biogás para os ensaios do teste de toxicidade II.

Valores corrigidos através da equação experimental para correção do volume de biogás medido, conforme Anexo E.

Amostra	Sem fontes orgânicas						Sem PCP					
	A		B		Média	Desv. Padrão	A		B		Média	Desv. Padrão
	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)			Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)		
0:00	5,83	0,00	5,59	0,00	0,00	0,00	13,71	0,00	14,06	0,00	0,00	0,00
4:00	1,01	1,01	0,77	0,77	0,89	0,17	7,12	7,12	7,47	7,47	7,30	0,25
8:00	0,42	1,42	0,30	1,07	1,25	0,25	6,53	13,65	6,53	14,01	13,83	0,25
13:50	0,06	1,49	0,18	1,25	1,37	0,17	4,42	18,07	4,77	18,77	18,42	0,50
16:20	0,06	1,55	0,30	1,55	1,55	0,00	1,01	19,07	1,48	20,25	19,66	0,83
Cromato.	0,60	2,15	0,40	1,95	2,05	0,14	0,40	19,47	0,40	20,65	20,06	0,83
20:45	-0,41	1,75	-0,05	1,90	1,82	0,11	-0,17	19,30	0,30	20,95	20,13	1,16
24:10	-0,05	1,69	0,06	1,96	1,83	0,19	0,18	19,48	0,18	21,13	20,31	1,16
37:35	0,42	2,11	-0,41	1,56	1,83	0,39	0,42	19,90	0,06	21,20	20,55	0,91
45:00	-0,17	1,94	-0,05	1,50	1,72	0,31	-0,05	19,85	0,30	21,50	20,67	1,16
Cromato.	0,40	2,34	0,60	2,10	2,22	0,17	0,40	20,25	0,40	21,90	21,07	1,16
214:00	0,42	2,76	0,42	2,52	2,64	0,17	0,30	20,55	0,42	22,31	21,43	1,25
Cromato.	0,40	3,16	0,40	2,92	3,04	0,17	0,40	20,95	0,40	22,71	21,83	1,25
358:30	1,12	4,28	1,12	4,04	4,16	0,17	1,36	22,31	0,89	23,60	22,95	0,91
761:52	2,06	6,34	2,18	6,22	6,28	0,08	2,65	24,96	2,77	26,37	25,66	1,00

Amostra	1 mg/L de PCP						2 mg/L de PCP					
	A		B		Média	Desv. Padrão	A		B		Média	Desv. Padrão
	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)			Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)		
0:00	15,94	0,00	15,71	0,00	0,00	0,00	17,47	0,00	17,18	0,00	0,00	0,00
4:00	7,47	7,47	7,00	7,00	7,24	0,33	6,89	6,89	6,18	6,18	6,53	0,50
8:00	5,94	13,42	6,18	13,18	13,30	0,17	5,71	12,59	5,47	11,65	12,12	0,67
13:50	4,30	17,72	5,71	18,89	18,30	0,83	5,47	18,07	5,83	17,48	17,77	0,42
16:20	0,89	18,60	1,36	20,25	19,43	1,16	1,59	19,66	1,83	19,31	19,49	0,25
Cromato.	0,40	19,00	0,40	20,65	19,83	1,16	0,40	20,06	0,40	19,71	19,89	0,25
20:45	-0,05	18,95	0,53	21,18	20,07	1,58	0,65	20,71	1,83	21,54	21,13	0,58
24:10	0,18	19,13	-0,05	21,13	20,13	1,41	0,53	21,25	1,12	22,66	21,95	1,00
37:35	0,30	19,43	0,06	21,20	20,31	1,25	0,30	21,55	0,18	22,84	22,20	0,91
45:00	-0,76	18,67	0,53	21,73	20,20	2,16	0,30	21,85	-0,05	22,79	22,32	0,67
Cromato.	0,40	19,07	0,40	22,13	20,60	2,16	0,40	22,25	0,40	23,19	22,72	0,67
214:00	0,30	19,37	0,42	22,55	20,96	2,25	0,30	22,55	0,42	23,61	23,08	0,75
Cromato.	0,40	19,77	0,40	22,95	21,36	2,25	0,40	22,95	0,40	24,01	23,48	0,75
358:30	1,59	21,37	1,12	24,07	22,72	1,91	1,12	24,07	0,53	24,54	24,31	0,33
761:52	2,89	24,25	2,65	26,72	25,49	1,75	2,18	26,25	1,83	26,37	26,31	0,08

Amostra	3 mg/L de PCP						4 mg/L de PCP					
	A		B		Média	Desv. Padrão	A		B		Média	Desv. Padrão
	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)			Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)		
0:00	13,71	0,00	17,70	0,00	0,00	0,00	13,94	0,00	18,29	0,00	0,00	0,00
4:00	6,53	6,53	6,41	6,41	6,47	0,08	6,30	6,30	7,00	7,00	6,65	0,50
8:00	5,00	11,54	4,89	11,30	11,42	0,17	4,53	10,83	4,89	11,89	11,36	0,75
13:50	4,06	15,60	4,30	15,60	15,60	0,00	3,12	13,95	3,47	15,36	14,66	1,00
16:20	0,06	15,66	0,06	15,66	15,66	0,00	1,24	15,19	0,89	16,25	15,72	0,75
Cromato.	0,40	16,06	0,40	16,06	16,06	0,00	0,40	15,59	0,40	16,65	16,12	0,75
20:45	1,36	17,42	1,59	17,66	17,54	0,17	0,65	16,25	1,01	17,66	16,95	1,00
24:10	0,77	18,19	0,89	18,54	18,37	0,25	0,42	16,66	0,77	18,43	17,54	1,25
37:35	0,06	18,26	1,71	20,25	19,26	1,41	1,24	17,90	2,18	20,61	19,26	1,91
45:00	0,53	18,79	0,18	20,44	19,61	1,16	1,24	19,14	1,12	21,73	20,44	1,83
Cromato.	0,40	19,19	0,40	20,84	20,01	1,16	0,40	19,54	0,40	22,13	20,84	1,83
214:00	0,30	19,49	0,42	21,25	20,37	1,25	0,30	19,84	0,42	22,55	21,20	1,91
Cromato.	0,40	19,89	0,40	21,65	20,77	1,25	0,40	20,24	0,40	22,95	21,60	1,91
358:30	1,36	21,25	1,12	22,78	22,01	1,08	1,01	21,25	0,89	23,84	22,54	1,83
761:52	1,95	23,19	1,83	24,61	23,90	1,00	6,65	27,90	3,00	26,84	27,37	0,75

Amostra	5 mg/L de PCP						6 mg/L de PCP					
	A	A	B	B	Média	Desv.	A	A	B	B	Média	Desv.
	Tempo (h)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Acum. (mL)	Padrão	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Acum. (mL)
0:00	19,00	0,00	15,35	0,00	0,00	0,00	18,88	0,00	19,35	0,00	0,00	0,00
4:00	6,65	6,65	6,18	6,18	6,41	0,33	6,30	6,30	6,18	6,18	6,24	0,08
8:00	4,42	11,07	4,30	10,48	10,77	0,42	3,95	10,24	3,95	10,12	10,18	0,08
13:50	3,12	14,19	3,59	14,07	14,13	0,08	2,42	12,66	2,65	12,78	12,72	0,08
16:20	1,36	15,55	0,89	14,96	15,25	0,42	0,77	13,43	0,77	13,55	13,49	0,08
Cromato.	0,40	15,95	0,40	15,36	15,65	0,42	0,40	13,83	0,40	13,95	13,89	0,08
20:45	0,65	16,60	0,89	16,25	16,42	0,25	0,53	14,36	0,89	14,83	14,60	0,33
24:10	0,42	17,02	0,77	17,02	17,02	0,00	0,18	14,55	0,30	15,13	14,84	0,42
37:35	0,89	17,90	0,77	17,79	17,84	0,08	0,65	15,20	1,01	16,14	15,67	0,67
45:00	-0,05	17,85	1,12	18,91	18,38	0,75	-0,52	14,67	0,53	16,67	15,67	1,41
Cromato.	0,40	18,25	0,40	19,31	18,78	0,75	0,40	15,07	0,40	17,07	16,07	1,41
214:00	0,30	18,55	0,30	19,61	19,08	0,75	0,30	15,37	0,42	17,49	16,43	1,50
Cromato.	0,40	18,95	0,40	20,01	19,48	0,75	0,40	15,77	0,40	17,89	16,83	1,50
358:30	0,18	19,13	-0,05	19,95	19,54	0,58	0,30	16,07	0,06	17,96	17,01	1,33
761:52	1,83	20,96	-0,05	19,90	20,43	0,75	1,01	17,08	1,59	19,55	18,31	1,75

Amostra	8 mg/L de PCP						10 mg/L de PCP					
	A	A	B	B	Média	Desv.	A	A	B	B	Média	Desv.
	Tempo (h)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Acum. (mL)	Padrão	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Acum. (mL)
0:00	19,47	0,00	20,29	0,00	0,00	0,00	6,89	0,00	18,41	0,00	0,00	0,00
4:00	5,94	5,94	6,18	6,18	6,06	0,17	5,24	5,24	5,59	5,59	5,42	0,25
8:00	3,47	9,42	4,18	10,36	9,89	0,67	3,24	8,48	3,83	9,42	8,95	0,67
13:50	2,18	11,60	2,42	12,78	12,19	0,83	3,00	11,48	2,65	12,07	11,78	0,42
16:20	0,77	12,37	0,65	13,43	12,90	0,75	0,30	11,78	0,53	12,61	12,19	0,58
Cromato.	0,40	12,77	0,40	13,83	13,30	0,75	0,40	12,18	0,40	13,01	12,59	0,58
20:45	0,42	13,19	0,77	14,60	13,89	1,00	1,12	13,31	1,01	14,01	13,66	0,50
24:10	0,30	13,49	0,18	14,78	14,13	0,91	0,53	13,84	0,42	14,43	14,13	0,42
37:35	0,65	14,14	0,77	15,55	14,85	1,00	0,18	14,02	0,53	14,96	14,49	0,67
45:00	-0,05	14,09	0,30	15,85	14,97	1,25	0,18	14,20	-0,17	14,79	14,50	0,42
Cromato.	0,40	14,49	0,40	16,25	15,37	1,25	0,40	14,60	0,40	15,19	14,90	0,42
214:00	0,18	14,67	0,18	16,43	15,55	1,25	0,30	14,90	0,18	15,37	15,14	0,33
Cromato.	0,40	15,07	0,40	16,83	15,95	1,25	0,40	15,30	0,40	15,77	15,54	0,33
358:30	0,06	15,13	0,53	17,37	16,25	1,58	0,18	15,49	0,18	15,96	15,72	0,33
761:52	0,65	15,79	1,71	19,08	17,43	2,33	1,36	16,84	1,12	17,08	16,96	0,17

Amostra	Sem PCP + sulfato						2,0 mg/L de PCP + sulfato					
	A	A	B	B	Média	Desv.	A	A	B	B	Média	Desv.
	Tempo (h)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Acum. (mL)	Padrão	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Acum. (mL)
0:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4:10	7,71	7,71	5,59	5,59	6,65	1,50	7,71	7,71	8,18	8,18	7,94	0,33
8:10	4,89	12,59	3,71	9,30	10,95	2,33	5,83	13,54	6,06	14,24	13,89	0,50
16:30	5,94	18,54	7,24	16,54	17,54	1,41	6,06	19,60	6,18	20,42	20,01	0,58
Cromato.	0,80	19,34	0,80	17,34	18,34	1,41	0,80	20,40	0,80	21,22	20,81	0,58
27:40	0,65	19,99	4,89	22,23	21,11	1,58	0,06	20,46	0,65	21,87	21,17	1,00
49:30	0,06	20,06	2,18	24,41	22,23	3,08	0,18	20,64	0,42	22,29	21,47	1,16
73:30	0,06	20,12	1,01	25,41	22,77	3,74	0,30	20,94	0,30	22,59	21,77	1,16
96:00	0,77	20,89	0,65	26,06	23,48	3,66	1,01	21,95	0,77	23,36	22,65	1,00
Cromato.	0,40	21,29	0,40	26,46	23,88	3,66	0,40	22,35	0,40	23,76	23,05	1,00
499:00	3,00	24,29	0,89	27,35	25,82	2,16	1,71	24,06	1,24	25,00	24,53	0,67

Amostra	5,0 mg/L de PCP + sulfato						10,0 mg/L de PCP + sulfato					
	A	A	B	B	Média	Desv.	A	A	B	B	Média	Desv.
	Tempo (h)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Acum. (mL)	Padrão	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Corrig. (mL)	Acum. (mL)	Acum. (mL)
0:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4:10	8,41	8,41	8,30	8,30	8,36	0,08	7,59	7,59	7,36	7,36	7,47	0,17
8:10	5,24	13,65	6,65	14,95	14,30	0,91	3,36	10,95	3,59	10,95	10,95	0,00
16:30	5,24	18,89	5,71	20,66	19,77	1,25	2,53	13,48	2,89	13,83	13,66	0,25
Cromato.	0,80	19,69	0,40	21,06	20,37	0,96	0,40	13,88	0,40	14,23	14,06	0,25
27:40	0,65	20,34	0,42	21,47	20,91	0,80	1,01	14,89	1,36	15,59	15,24	0,50
49:30	0,65	21,00	0,77	22,24	21,62	0,88	1,71	16,60	1,71	17,30	16,95	0,50
73:30	1,01	22,00	1,12	23,37	22,68	0,96	0,53	17,13	0,65	17,96	17,54	0,58
96:00	0,89	22,89	1,01	24,37	23,63	1,05	-0,05	17,08	0,06	18,02	17,55	0,67
Cromato.	0,40	23,29	0,40	24,77	24,03	1,05	0,40	17,48	0,40	18,42	17,95	0,67
499:00	-0,05	23,24	1,36	26,13	24,68	2,05	3,71	21,19	2,77	21,19	21,19	0,00

ANEXO K

Valores de ácidos voláteis para o teste de toxicidade II, no início e ao final do ensaio.

Somente uma amostra de ácidos voláteis foi analisada, a partir da solução estoque utilizada para a montagem de todos os ensaios.

Valores iniciais

Ácido	Média (mg/L)	Desv. Pad
Acético	678,592	93,150
Propiônico	467,811	52,838
Butírico	554,633	49,514

Valores finais para cada concentração de PCP

Conc. PCP (mg/L)	acético		propiónico		butírico	
	Média (mg/L)	Desv. Pad	Média (mg/L)	Desv. Pad	Média (mg/L)	Desv. Pad
0	23,591	6,865	15,774	6,842	6,185	0,000
1	19,004	1,443	8,312	0,656	6,225	0,037
2	12,042	0,537	11,392	4,322	6,228	0,013
3	15,815	0,293	11,943	4,871	6,325	0,120
4	29,036	16,908	13,777	6,651	6,216	0,044
5	17,791	0,386	134,902	7,513	6,268	0,117
6	25,137	5,282	459,218	8,330	6,248	0,088
8	32,229	0,978	393,480	284,781	6,321	0,192
10	51,139	40,797	365,225	92,447	7,010	1,166

ANEXO L

Sem PCP							
Amostra	Tempo (horas)	Produção		PCP (mg/L)	ácidos voláteis		
		biogás (mL)	metano (%)		acético (mg/L)	propiónico (mg/L)	butírico (mg/L)
Amostra A	0:00	3,47	4,62		1194,04	769,66	905,15
Amostra B		3,47	4,53		1164,88	753,47	959,85
Amostra C		3,24	4,87				
média		3,40	4,67		1179,46	761,57	932,50
Desv. Padrão		0,14	0,18		20,62	11,45	38,68
Amostra A	2:30	3,95	12,78		989,97	684,21	940,81
Amostra B		7,00	13,64		1208,36	891,29	1030,49
Amostra C		5,36	16,10		1592,34	893,98	911,89
média		5,43	14,17		1263,56	823,16	961,06
Desv. Padrão		1,53	1,72		304,96	120,34	61,84
Amostra A	7:30	6,06	29,01		1237,77	1023,43	808,20
Amostra B		6,41	30,40		1166,20	969,34	774,82
Amostra C		7,59	27,62				
média		6,69	29,01		1201,98	996,39	791,51
Desv. Padrão		0,80	1,39		50,61	38,25	23,60
Amostra A	14:30	12,65	40,00		903,75	1074,59	532,67
Amostra B		14,88	43,02		765,98	994,90	471,93
Amostra C		15,47	45,85		974,63	1051,08	412,63
média		14,33	42,96		881,45	1040,19	472,41
Amostra A	24:00	24,53	51,67		632,88	1202,22	323,11
Amostra B		25,82	55,27		533,30	1117,78	206,33
Amostra C		25,94	53,90				
média		25,43	53,61		583,09	1160,00	264,72
Desv. Padrão		0,78	1,81		70,41	59,70	82,58
Amostra A	38:30	31,70	62,24		104,66	1067,39	42,13
Amostra B		32,40	60,30		94,70	1215,86	21,66
Amostra C		33,82	60,82				
média		32,64	61,12		99,68	1141,62	31,89
Desv. Padrão		1,08	1,01		7,04	104,99	14,47
Amostra A	48:30	10,06	61,76		14,57	926,23	1,08
Amostra B		35,34	61,39		58,91	1040,71	3,13
Amostra C		36,29	62,09		129,98	1049,12	3,74
média		27,23	61,75		67,82	1005,35	2,65
Desv. Padrão		14,88	0,35		58,22	68,65	1,39
Amostra A	121:00	43,93	66,19		3,68		0,27
Amostra B		47,10	66,05		6,66	0,43	0,51
Amostra C		35,93	65,89		4,62	0,40	0,45
média		42,32	66,04		4,99	0,41	0,41
Desv. Padrão		5,76	0,15		1,52	0,02	0,12
Amostra A	240:45	35,11	66,21		7,70		0,55
Amostra B		36,52	64,18		12,29	0,51	0,47
Amostra C		44,63	67,62		47,66	0,95	0,58
média		38,75	66,00		22,55	0,73	0,53
Desv. Padrão		5,14	1,73		21,87	0,30	0,05

5 mg/L							
Amostra	Tempo (horas)	Produção			ácidos voláteis		
		biogás (mL)	metano (%)	PCP (mg/L)	acético (mg/L)	propiónico (mg/L)	butírico (mg/L)
Amostra A	0:00	2,18	4,10	2,279	1362,46	715,18	916,35
Amostra B		2,77	4,69	1,987	1527,33	780,89	904,38
Amostra C		5,94	6,55	1,704			
média		3,63	5,12	1,990	1444,90	748,04	910,36
Desv. Padrão		2,02	1,28	0,29	116,58	46,46	8,46
Amostra A	2:30	2,06	8,09	2,033	1289,21	758,48	949,08
Amostra B		2,18	10,99	1,637	1309,23	757,56	882,91
Amostra C		2,18	11,89	1,639			
média		2,14	10,32	1,770	1299,22	758,02	916,00
Desv. Padrão		0,07	1,99	0,23	14,15	0,65	46,79
Amostra A	11:30	4,53	18,71	1,172	1471,91	1299,64	910,17
Amostra B		5,12	17,95		1460,37	1336,49	886,82
Amostra C		4,77	17,13	1,415			
média		4,81	17,93	1,294	1466,14	1318,07	898,50
Desv. Padrão		0,30	0,79	0,17	8,16	26,06	16,51
Amostra A	15:00	6,18	23,52	1,357	1459,47	1266,59	822,80
Amostra B		8,06	24,75	0,774	1437,98	1244,14	749,53
Amostra C		7,36	23,04	0,869			
média		7,20	23,77	1,000	1448,72	1255,37	786,16
Desv. Padrão		0,95	0,89	0,31	15,20	15,87	51,81
Amostra A	24:00	10,88	29,73	0,904	1426,91	1281,42	735,47
Amostra B		9,12	29,40	0,839	1468,48	1307,98	764,32
Amostra C		9,94	28,33	0,845			
média		9,98	29,16	0,862	1447,70	1294,70	749,90
Desv. Padrão		0,88	0,73	0,04	29,39	18,78	20,41
Amostra A	37:00	12,88	40,90	0,663	1421,98	1237,86	569,81
Amostra B		11,59	35,16	0,523	1532,58	1315,05	781,17
Amostra C		2,42	38,72	0,247			
média		8,96	38,26	0,478	1477,28	1276,46	675,49
Desv. Padrão		5,71	2,90	0,21	78,21	54,58	149,45
Amostra A	47:30	12,65	39,21	0,418	1561,02	1287,68	625,39
Amostra B		10,65	34,99	0,513	1838,22	1368,93	744,23
Amostra C		11,59	37,26	0,390			
média		11,63	37,16	0,441	1699,62	1328,30	684,81
Desv. Padrão		1,00	2,11	0,06	196,01	57,46	84,03
Amostra A	119:15	32,87	59,74				
Amostra B		23,35	54,91	0,000	1144,00	1226,68	29,92
Amostra C		28,52	56,70		940,78	1233,12	13,38
média		28,25	57,12	0,000	1042,39	1229,90	21,65
Desv. Padrão		4,77	2,44		143,70	4,55	11,70
Amostra A	239:00	33,58	57,14		18,48	1282,63	0,68
Amostra B		30,99	63,01		168,61	1592,43	2,70
Amostra C		33,70	58,15	0,000	106,72	1581,73	6,73
média		32,76	59,44	0,000	97,94	1485,60	3,37
Desv. Padrão		1,53	3,14		75,45	175,85	3,08

10 mg/L							
Amostra	Tempo (horas)	Produção			ácidos voláteis		
		biogás (mL)	metano (%)	PCP (mg/L)	acético (mg/L)	propiónico (mg/L)	butírico (mg/L)
Amostra A	0:00	2,89	4,03		1152,81	763,06	970,44
Amostra B		3,00	3,68	5,190	1272,82	693,98	840,92
Amostra C		1,71	4,38	5,410			
média		2,53	4,03	5,300	1212,81	728,52	905,68
Desv. Padrão		0,72	0,35	0,16	84,86	48,84	91,59
Amostra A	3:00	3,00	6,66	1,456	1082,73	703,12	800,93
Amostra B		3,47	7,47	3,890	1247,21	787,96	856,29
Amostra C		3,12	7,55	4,726			
média		3,20	7,23	3,357	1164,97	745,54	828,61
Desv. Padrão		0,24	0,49	1,70	116,30	60,00	39,15
Amostra A	10:00	3,47	11,67	4,354	1362,96	961,61	872,40
Amostra B		3,95	13,43	3,770	1510,81	1206,45	974,88
Amostra C		4,06	11,87	3,815			
média		3,83	12,32	3,980	1436,88	1084,03	923,64
Desv. Padrão		0,31	0,96	0,32	104,55	173,13	72,47
Amostra A	17:00	5,00	15,39	3,685	1577,26	1279,72	917,89
Amostra B		5,59	16,02	3,407	1550,29	1228,64	906,35
Amostra C		6,18	15,54	3,816			
média		5,59	15,65	3,636	1563,77	1254,18	912,12
Desv. Padrão		0,59	0,33	0,21	19,07	36,12	8,16
Amostra A	24:00	6,65	18,93	2,463	1552,92	1243,02	917,77
Amostra B		7,59	19,01	2,337	1608,45	1271,41	926,46
Amostra C		6,65	21,15	2,707			
média		6,96	19,70	2,502	1580,69	1257,21	922,11
Desv. Padrão		0,54	1,26	0,19	39,27	20,08	6,15
Amostra A	36:00	8,53	23,15	2,116	1667,11	1257,87	985,40
Amostra B		8,30	24,91	2,265	1943,59	1365,96	1064,18
Amostra C		7,71	22,92	2,292			
média		8,18	23,66	2,224	1805,35	1311,91	1024,79
Desv. Padrão		0,42	1,09	0,09	195,50	76,43	55,70
Amostra A	48:45	7,94	24,52	1,888	1863,64	1298,06	984,27
Amostra B		8,06	22,89	2,206	1988,83	1411,00	1112,80
Amostra C		2,77	25,05	2,506			
média		6,26	24,15	2,200	1926,24	1354,53	1048,54
Desv. Padrão		3,02	1,13	0,31	88,52	79,86	90,88
Amostra A	117:30	9,59	23,57	1,086	1932,30	1371,72	971,16
Amostra B		9,24	25,40	1,206	1876,08	1315,80	1105,17
Amostra C		9,94	25,42	1,288			
média		9,59	24,80	1,193	1904,19	1343,76	1038,17
Desv. Padrão		0,35	1,06	0,10	39,75	39,54	94,76
Amostra A	237:15	9,83	23,30	0,204	1890,36	1397,11	1034,31
Amostra B		9,47	28,39	0,093	1771,62	1299,36	1075,64
Amostra C		5,83	28,71	0,097			
média		8,37	26,80	0,131	1830,99	1348,24	1054,98
Desv. Padrão		2,21	3,03	0,06	83,96	69,12	29,22

10 mg/L + sulfato							
Amostra	Tempo (horas)	Produção			ácidos voláteis		
		biogás (mL)	metano (%)	PCP (mg/L)	acético (mg/L)	propiónico (mg/L)	butírico (mg/L)
Amostra A	0:00	3,24	3,92	5,735	1120,98	696,82	514,45
Amostra B		3,24	4,35	6,308	1193,07	716,33	535,19
Amostra C		3,00	3,85	4,314			
média		3,16	4,04	5,452	1157,03	706,58	524,82
Desv. Padrão		0,14	0,27	1,03	50,97	13,79	14,67
Amostra A	3:00	3,00	6,35		1246,41	833,91	591,17
Amostra B		3,71	5,93	3,751	1436,79	845,43	582,64
Amostra C		3,83	5,51	4,117			
média		3,51	5,93	3,934	1341,60	839,67	586,90
Desv. Padrão		0,45	0,42	0,26	134,62	8,14	6,03
Amostra A	8:45	3,95	8,23	3,150	1330,80	859,49	593,02
Amostra B		3,59	7,79	3,582	1285,71	831,30	559,34
Amostra C		-0,05	12,06	2,957			
média		2,49	9,36	3,230	1308,26	845,39	576,18
Desv. Padrão		2,21	2,35	0,32	31,88	19,93	23,82
Amostra A	12:15	5,00	11,32	3,415	1540,87	1177,03	690,81
Amostra B		3,95	12,35	2,998	1459,60	921,98	576,20
Amostra C		3,95	13,58	2,851			
média		4,30	12,42	3,088	1500,23	1049,51	633,50
Desv. Padrão		0,61	1,13	0,29	57,47	180,35	81,04
Amostra A	24:15	6,89	16,05	3,221	1765,07	1171,80	698,62
Amostra B		6,30	16,90	2,654	1520,38	1115,79	644,59
Amostra C		6,77	15,86	2,598			
média		6,65	16,27	2,824	1642,72	1143,80	671,60
Desv. Padrão		0,31	0,56	0,35	173,02	39,61	38,20
Amostra A	36:15	8,06	22,31		1767,21	1103,75	686,72
Amostra B		7,94	20,85	2,236	1860,59	1184,66	751,87
Amostra C		8,53	20,74	2,321			
média		8,18	21,30	2,278	1813,90	1144,21	719,30
Desv. Padrão		0,31	0,88	0,06	66,03	57,21	46,07
Amostra A	55:30	7,94	22,63	2,189	2173,00	1308,42	876,29
Amostra B		8,41	22,30	1,572	1650,97	1007,80	633,29
Amostra C		7,71	23,74	2,715	2169,70	749,81	563,73
média		8,02	22,89	2,159	1997,89	1022,01	691,10
Desv. Padrão		0,36	0,76	0,57	300,44	279,58	164,10
Amostra A	126:45	9,24	22,09	1,571	3440,50	1191,97	990,66
Amostra B		7,47	25,58	1,287	2572,47	639,74	688,17
Amostra C		9,35	23,80	1,308	3926,65	870,88	702,87
média		8,69	23,82	1,389	3313,21	900,86	793,90
Desv. Padrão		1,05	1,75	0,16	686,01	277,33	170,56
Amostra A	247:45	7,83	24,10	0,453	3952,97	937,21	947,42
Amostra B		8,18	26,68	0,442	2383,41	312,75	484,81
Amostra C		8,41	27,79	0,347	2655,35	395,73	623,06
média		8,14	26,19	0,414	2997,24	548,57	685,10
Desv. Padrão		0,30	1,89	0,06	838,77	339,13	237,46

15 mg/L							
Amostra	Tempo (horas)	Produção biogás (mL)	metano (%)	PCP (mg/L)	ácidos voláteis		
					acético (mg/L)	propiónico (mg/L)	butírico (mg/L)
Amostra A	0:00	4,06	4,35	8,237	1102,29	663,62	866,26
Amostra B		3,24	2,20	6,514	1419,25	775,22	925,87
Amostra C		4,18	3,07	7,899			
média		3,83	3,21	7,550	1260,77	719,42	896,06
Desv. Padrão		0,51	1,08	0,91	224,12	78,91	42,16
Amostra A	3:00	4,65	4,50	6,625	903,72	530,64	666,92
Amostra B		4,89	4,17	6,154	1183,04	742,83	935,44
Amostra C		4,65	5,36	5,755	1060,68	676,31	934,61
média		4,73	4,68	6,178	1049,15	649,93	845,66
Desv. Padrão		0,14	0,61	0,44	140,02	108,53	154,79
Amostra A	8:00	4,89	8,49	5,970	1105,82	707,11	875,75
Amostra B		4,42	7,70	6,436	1184,14	691,28	821,17
Amostra C		3,95	8,64	5,386			
média		4,42	8,28	5,931	1144,98	699,20	848,46
Desv. Padrão		0,47	0,51	0,53	55,38	11,19	38,60
Amostra A	17:30	5,71	9,56	4,296	1501,87	1046,27	1161,70
Amostra B		5,71	11,09	5,503	1790,50	1134,99	1140,81
Amostra C		5,24	10,52	5,965	1293,05	860,24	917,27
média		5,55	10,39	5,255	1528,47	1013,83	1073,26
Desv. Padrão		0,27	0,77	0,86	249,79	140,22	135,49
Amostra A	27:30	6,06	15,92	4,551	1677,50	1233,24	1102,10
Amostra B		7,47	12,82	4,180	1735,24	1115,41	1038,59
Amostra C		6,06	15,20	3,852			
média		6,53	14,65	4,194	1706,37	1174,32	1070,35
Desv. Padrão		0,81	1,62	0,35	40,82	83,32	44,91
Amostra A	40:30	7,36	19,82	4,114	2077,28	1152,88	1217,61
Amostra B		8,77	18,13	5,278	1769,12	1105,54	1160,03
Amostra C		9,12	17,86	4,160	2480,36	1006,49	1075,14
média		8,41	18,61	4,518	2108,92	1088,30	1150,93
Desv. Padrão		0,93	1,06	0,66	356,67	74,70	71,67
Amostra A	52:00	9,59	19,82	3,257	1592,43	1011,51	1175,13
Amostra B		7,94	18,13	3,715	1947,06	1160,82	1130,22
Amostra C		7,94	22,96	3,394	1969,84	921,16	988,08
média		8,49	20,31	3,455	1836,44	1031,17	1097,81
Desv. Padrão		0,95	2,45	0,24	211,63	121,03	97,65
Amostra A	123:15	8,30	22,62	1,403	1793,22	1105,26	1147,30
Amostra B		6,89	24,23	1,859	2279,44	1306,58	1214,69
Amostra C		7,59	24,20	1,506	1570,12	1029,91	1054,55
média		7,59	23,68	1,589	1880,93	1147,25	1138,85
Desv. Padrão		0,71	0,92	0,24	362,70	143,04	80,40
Amostra A	244:15	7,47	26,61	0,000	2236,71	1250,82	1298,24
Amostra B		5,71	26,07	0,075	1798,54	1090,63	988,14
Amostra C		7,00	25,58	0,000	1997,92	1033,78	1041,27
média		6,73	26,09	0,025	1655,36	933,10	909,38
Desv. Padrão		0,91	0,51	0,04	219,38	112,55	165,84

20 mg/L							
Amostra	Tempo (horas)	Produção biogás (mL)	metano (%)	PCP (mg/L)	ácidos voláteis		
					acético (mg/L)	propiónico (mg/L)	butírico (mg/L)
Amostra A	0:00	2,77	3,11	8,777	1877,99	837,30	919,83
Amostra B		5,71	7,13	7,469	1335,44	752,53	840,71
Amostra C		2,89	2,93	9,098			
média		3,79	4,39	8,448	1606,72	794,92	880,27
Desv. Padrão		1,66	2,37	0,86	383,64	59,94	55,95
Amostra A	2:30	2,53	4,65	7,869	2069,17	964,88	1039,66
Amostra B		6,16	6,16	6,274	1356,94	753,30	849,16
Amostra C		5,04	5,04	6,764	1128,99	776,38	922,15
média		2,53	5,28	6,969	1518,36	831,52	936,99
Desv. Padrão			0,78	0,82	490,43	116,07	96,11
Amostra A	12:30	4,77	8,70	5,775	1300,07	787,37	848,87
Amostra B		5,59	8,23	5,604	1471,30	823,03	866,53
Amostra C		6,53	8,90	7,011			
média		5,63	8,61	6,130	1385,68	805,20	857,70
Desv. Padrão		0,88	0,34	0,77	121,08	25,22	12,49
Amostra A	16:30	6,18	9,15	5,663	2292,39	945,45	931,12
Amostra B		7,47	10,39	6,590	1716,48	891,43	991,03
Amostra C		6,53	10,37	6,761	1321,05	695,05	761,85
média		6,73	9,97	6,338	1776,64	843,98	894,67
Desv. Padrão		0,67	0,71	0,59	488,45	131,77	118,86
Amostra A	24:00	5,94	12,34	5,671	1666,68	969,64	1036,23
Amostra B		5,94	12,07	6,564	1420,03	852,42	834,85
Amostra C		5,36	12,39	5,999			
média		5,75	12,26	6,078	1543,35	911,03	935,54
Desv. Padrão		0,34	0,17	0,45	174,41	82,89	142,40
Amostra A	36:15	8,53	16,02	6,235	2069,97	1084,05	1152,78
Amostra B		6,41	17,43	6,164	1676,56	940,68	1013,54
Amostra C		5,36	18,57	5,894	1465,69	969,59	981,11
média		6,77	17,34	6,098	1737,41	998,11	1049,14
Desv. Padrão		1,62	1,28	0,18	306,70	75,82	91,21
Amostra A	47:45	7,24	20,32	6,699	1894,88	1051,26	1161,19
Amostra B		7,71	21,57	6,318	1467,34	856,40	944,63
Amostra C		6,89	21,78	6,188			
média		7,28	21,22	6,402	1681,11	953,83	1052,91
Desv. Padrão		0,41	0,79	0,27	302,31	137,79	153,13
Amostra A	119:00	9,00	25,13	3,025	2093,98	972,96	1066,32
Amostra B		7,71	24,08	3,495	1511,86	848,92	901,25
Amostra C		8,30	23,71	3,632	1803,69	914,78	1124,81
média		8,34	24,31	3,384	1803,18	912,22	1030,79
Desv. Padrão		0,65	0,74	0,32	291,06	62,06	115,94
Amostra A	240:00	7,12	25,59	0,489	2096,67	422,96	475,03
Amostra B		6,18	23,71	0,639	1650,34	900,78	1102,16
Amostra C		6,41	26,34	0,587	1488,78	938,46	1163,32
média		6,57	25,21	0,572	1466,01	647,30	777,45
Desv. Padrão		0,49	1,36	0,08	314,87	287,37	380,96

Amostra	Tempo (horas)	Produção biogás (mL)	metano (%)	PCP (mg/L)	ácidos voláteis		
					acético (mg/L)	propiónico (mg/L)	butírico (mg/L)
Sem PCP controle autoclavado							
autoclavada	24:00	0,77	2,01		1428,74	792,17	926,90
autoclavada	121:00	1,48	2,65	0,737	1235,97	776,00	872,20
autoclavada	240:45	-	3,38	-0,065	1206,61	734,91	859,53
5 mg/L controle autoclavado							
autoclavada	24:00	1,01	3,32		1316,39	719,39	891,99
autoclavada	119:15	-	4,70	1,848	1237,60	731,14	877,91
autoclavada	239:00	-	-	2,611	1601,54	854,57	980,22
10 mg/L controle autoclavado							
autoclavada	24:00	-	-		1370,67	807,99	999,11
autoclavada	117:30	1,48	2,84	3,635	1236,19	731,69	881,57
autoclavada	237:15	-	7,11	4,794	1357,46	767,51	969,65
10 mg/L + sulfato controle autoclavado							
autoclavada	24:15	0,42	3,36		1537,01	774,79	568,61
autoclavada	126:45	2,18	3,94	2,998	1398,47	708,57	508,88
autoclavada	247:45	-	-	5,762	1241,49	777,90	575,95
15 mg/L controle autoclavado							
autoclavada	27:30	-	12,70		1305,55	759,60	922,35
autoclavada	123:15	2,18	3,85	4,631	1380,69	824,53	1008,74
autoclavada	244:15	-	-	4,676	1606,63	751,50	974,16
20 mg/L controle autoclavado							
autoclavada	24:00	-0,05	2,34		1244,50	709,05	822,21
autoclavada	119:00	0,06	3,58	9,579	2024,21	1192,07	1386,18
autoclavada	240:00	-	-		1116,25	699,24	807,84

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAENS, P. and VOGEL, T. M. (1995). Biological treatment of chlorinated organics. In: YOUNG, L.Y. and CERNIGLIA, C. E. *Microbiol. Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Willey-Liss, Inc., cap.12, p. 487-513.
- AGOUSTINOUS, M. T.; BRITZ, T. J.; TRACEY, R. P. (1989). Anaerobic digestion of petrochemical effluent using an anaerobic hybrid digester. *Biotechnology Letters*, v.11, n.5, p.369-74.
- ANNACHHATRE, A. P.; GHEEWALA, S. H. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology Advances*, v.14, n.1, p.35-56.
- ARAUJO, J. C. (1995). *Caracterização e Evolução do Biofilme Anaeróbico de Leito Fluidificado Alimentado com Esgoto Sanitário Sintético*. São Carlos. 158p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ARAUJO, J. C. (2001). *Biofilmes anaeróbicos: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação in situ com sondas fluorescentes*. São Carlos. 189p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ARAUJO, J. C.; BRUCHA, G.; CAMPOS J. R.; VAZOLLER R. F. (2000). Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Water Science and Technology*, v.41, p.69-77.
- ARMENANTE, P. M.; KAFKEWITZ, D.; LEWANDOWSKI, G. A.; JOU, C.-J. (1999). Anaerobic - aerobic treatment of halogenated phenolic compounds. *Wat. Res.*, v.33, n.3, p.681-92.
- ATLAS, R. M.; BARTHA. R. (1987). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- BALLAORAGADA, B. S.; STENSEL, H. D.; PUHAKKA, J. A.; FERGUSON, J. F. (1997). Effect of hydrogen on reductive dechlorination of chlorinated ethenes. *Environ. Sci. Technol.*, v.31, n.6, p.1728-34.
- BANERJI, S. K.; BAJPAI, R. K. (1994). Cometabolism of pentachlorophenol by microbial species. *Journal of Hazardous Materials*, v.39, p.19-31.
- BASU, S. K.; OLESZKIEWICZ, J. A.; SPARLING, R. (1996). Dehalogenation of 2-chlorophenol (2-CP) in anaerobic batch cultures. *Wat. Res.*, v.30, n.2, p.315-322.
- BHATTACHARYA, S. K.; YUAN, Q.; JIN, P. (1996). Removal of pentachlorophenol from wastewater by combined anaerobic-aerobic treatment. *J. Hazard. Mater.*, v.49, p.143-154.
- BOUWER, E. J.; ZEHNDER, A. J. B. (1993). Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work. *Tibtech*, v.11, p.360-7.

- BOYD, S. A.; SHELTON, D. R. (1984). Anaerobic biodegradation of Chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, n.2, p.272-7.
- BRUIN, W. P.; KOTTERMAN, M. J. J.; POSTHUMUS, M. A.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A. J. B. (1992). Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.6, p.1996-2000.
- BUITRON, G.; CAPDEVILLE, B.; HORNY, P. (1994). Improvement and control of the microbial activity of a mixed population for degradation of xenobiotic compounds. *Wat. Sci. Technol.*, v.29, n.7, p.317-26.
- CHEESEMAN, P.; TOMS-WOOD, A.; WOLFE, R. S. (1972). Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420 from Methanobacterium strain M.O.H. *Journal of Bacteriology*, v.112, p.527-31.
- CHEN, S.-T.; DONG, P.; BERTHOUEX, P. M.; BOYLE, W. C. (2000). Fate of pentachlorophenol (PCP) in an anaerobic digester. *Water Environ. Res.*, v.72, n.2, p.201-6.
- CHRISTIANSEN, N.; AHRING, B. K. (1996). Introduction of a De Novo bioremediation activity into anaerobic granular sludge using the dechlorination bacterium DCB-2. *Antonie van Leeuwenhoek.*, v.69, p.61-6.
- COLE, J. R.; CASCARELLI, A. L.; MOHN, W. W.; TIEDJE, J. M. (1994). Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, n.10, p.3536-3542.
- CRAVEIRO, A. M. (1994). *Desempenho e estudos cinéticos de biodigestores híbridos com diferentes porcentagens de enchimento*. São Paulo. 246p. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- CROSBY, D. G. (1981) Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure and Appl. Chem.*, v.53, p.1051-80.
- DAMIANOVIC, M. H. R. Z. (1997). *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 176p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DeWEERD, K. A.; CONCANNON, F.; SULFITA, J. M. (1991). Relationship between hydrogen consumption, dehalogenation, and the reduction of sulfur oxyanions by *Desulfomonile tidjei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.7, p.1929-34.
- DeWEERD, K. A.; MANDELCO, L.; TANNER, R. S.; WOESE, C. R.; SULFITA, J. M. (1990). *Desulfomonile tidjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reductin bacterium. *Arch. Microbiol.*, v.154, p.23-30.
- DENNIE, D.; GLADU, I.; LÉPINE, F.; VILLEMUR, R.; BISAILLON, J.-G.; BEAUDET, R. (1998). Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.64, n.11, p.4603-6.
- DOLFING, J.; HARRISON, B. K. (1992). Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environmental Science & Technology*, v.26, n.11, p.2213-8.
- DROSTE, R. L.; KENNEDY, K. J.; LU, J.; LENTZ, M. (1998). Removal of chlorinated phenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Sci. Technol.*, v.38, n.8-9, p.359-67.
- DUBOURGUIER, H. C. (1987) Curso de Ecologia da Digestão Anaeróbia - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, São Paulo.

- DUBOURGUIER, H. C.; BUISON, N. M.; TISSIER, J. P.; ALBAGNAC, G. (1987). Structural characteristics and metabolic activities of granular methanogenic sludge on a mixed defined substrate. In: LETTINGA, G.; ZEHNDER, A. J. B. GROTENHUIS, J. T. C.; HULSHOFF POL, L. W. (Eds.) *Granular Anaerobic sludge; microbiology and Technology*, p.78-86. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
- DUFF, S. J.; KENNEDY, K. J.; BRADY, A. J. (1995). Treatment of dilute phenol/PCP wastewaters using the upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Water Res.*, v.29, n.2, p.645-51.
- EDWARDS, T.; MCBRIDE, B. C. (1975). A new method for the solation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.*, v.29, p.540-5.
- EMDE, R.; SCHINK, B. (1990). Oxidation of glycerol, lactate, and propionate by *Propionibacterium freudenreichii* in a poised-potential amperometric culture system. *Arch. Microbiol.*, v.153, p.506-12.
- ENNIK-MAARSEN, K. A.; LOUWERSE, A.; ROELOFSEN, W.; STAMS, J. M. (1998). Influence of monochlorophenols on methanogenic activity in granular sludge. *Water Res.*, v.32, n.10, p.2977-82.
- FANG, H. H. P.; CHEN, T.; LY, Y. Y.; CHUI, H. K. (1996). Degradation of phenol in wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Wat. Res.*, v.30, n.6, p.1353-1360.
- FATHEPURE, B. Z.; TIEDJE, J. M.; BOD, S. A. (1988). Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, n.2, p.327-30.
- FENNEL, D. E.; GOSSET, J.M.; ZINDER, S. H. (1997). Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the redctive dechlorination of tetrachloroethene. *Environ. Sci. Technol.*, v.31, p.918-26.
- FETZNER, S.; LINGENS, F. (1994). Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and, biotechnological applications. *Microbiological Reviews*, v.58, n.4, p.641-85.
- FIEBIG, R.; DELLWEG, H. (1985). Comparison between the process performance of an UASB-reactor and an UASB-fixed film-combination with an acetic acid enrichment culture. *Biotech. Letters*, v.7, n.7, p.487-92.
- FIELD, J. A.; STAMS, A. J. M.; KATO, M.; SCHRAA, G. (1995). Enhanced biodegradation af aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.67, p.47-7.
- FLORA, J. R. V.; SUIDAN, M. T.; WUELLNER, A. M.; BOYER, T. K. (1994). Anerobic treatment of a simulated high-strength industrial wastewater containing chlorophenols. *Water Environmental Research*, v.66, p.21-31.
- FLORÊNCIO, L. (1994). *The fate of methanol in anaerobic bioreactors*. Thesis Wageningen. The Neterlands. 137p.
- GENTHNER, B. R. S.; PRICE II, W. A.; PRITCHARD, P. H. (1989). Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, n.6. p.1466-71.
- GERRITS, J.; RENARD, V.; GOMES, T. M. P.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D.; GOTTSCHAL, J. C. (1996). *Desulfitobacterium* sp.strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination oftetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Arch Microbiol.*, v. 165, p.132-40.

- GIBSON, S. A.; SULFITA, J. M. (1986). Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, n.4, p.681-8.
- GIBSON, S. A.; SULFITA, J. M. (1990). Anaerobic biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in samples from a Methanogenic aquifer: stimulation by short-chain Organic acids and alcohols. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.6, p.1825-32.
- GRADY Jr., C. P. L. (1990). Biodegradation of toxic organics: status and potential. *Journal of Environmental Engineering*, v.116, n.5, p.805-828.
- GU, Y.; KORUS, R. A. (1995). Effects of *p*-cresol and chlorophenols on pentachlorophenol biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.47, p.470-5.
- HÄGGBLUM, M. M.; YOUNG, L. Y. (1990). Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.11, p.3255-60.
- HÄGGBLUM, M. M.; YOUNG, L. Y. (1995). Anaerobic degradation of halogenated phenols by sulfate-reduction consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.4, p.1546-50.
- HÄGGBLUM, M. M.; RIVERA, M. D.; YOUNG, L. Y. (1993). Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and bezoic acids *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.4, p.1162-7.
- HALE, D. D.; ROGERS, J. E.; WIEGEL, J. (1990). Reductive dechlorination of dichlorophenols by nonadapted and adapted microbial communities in pond sediments. *Microbial Ecology*, v.20, p.185-96.
- HENDRIKSEN, H. V.; AHRING, B. K. (1993). Anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in fixed-film and upflow anaerobic sludge blanket reactors using different inocula. *Biodegradation*, v. 3, p.399-408.
- HENDRIKSEN, H. V.; LARSEN, S.; AHRING, B. K. (1992). Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.1, p.365-70.
- HENRY, M. P.; DONLON, B. A.; LENS, P. N.; COLLERAN, E. M. (1996). Use of anaerobic hybrid reactors for treatment of synthetic pharmaceutical wastewaters containing organic solvents. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v.66, p.251-64.
- HOLLIGER, C.; SCHUMACHER, W. (1994). Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.66, p.239-46.
- HOLLIGER, C.; SCHRAA, G.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. (1992). Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-Trichlorobenzene to 1,3-Dichlorobenzene. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.5, p.1636-44.
- HOLLIGER, C.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. (1988). Anaerobic degradation of recalcitrant compounds. Advances in Water Pollution Control - IAWPRC. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion Held*. Bolonha, Italy, 22-26 may, 1988.
- HWU, C.-S.; DONLON, B.; LETTINGA, G. (1996). Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Wat. Sci. Technol.*, v. 34, n.5-6, p.351-8.

- IMACHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. (2000). Cultivation and *in situ* detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.8, p.3608-15.
- JIN, P.; BHATTACHARYA, S. K. (1996). Anaerobic removal of pentachlorophenol in presence of zinc. *Journal of Environmental Engineering*, v.122, n.7, july, p.590-8.
- JIN, P.; BHATTACHARYA, S. K. (1997). Toxicity and biodegradation of chlorophenols in anaerobic propionate enrichment culture. *Water Environ. Res.*, v.69, n.5, p.938-47.
- JUTEAU, P.; BEAUDET, R.; McSWEEN, G.; LÉPINE, F.; BISAILLON, J.-G. (1996). Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Can. J. Microbiol.*, v.41, p.862-8.
- KARAMANEV, D. G.; SAMSON, R. (1998). High-rate biodegradation of pentachlorophenol by biofilm developed in the immobilized soil bioreactor. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, n.7, p.994-9.
- KEITH, L. H.; TELLIARD, W. A. (1979). Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.*, v.13, p.416-23.
- KENNEDY, K. J.; GORUR, S. S.; ELLIOTT, C. A.; ANDRAS, E.; GUIOT, S. R. (1989). Media effects on performance of anaerobic hybrid reactors. *Wat. Res.*, v.23, n.11, p.1397-1405.
- KENNEDY, K. J.; HAMODA, M. F.; GUIOT, S. G. (1988). Anaerobic treatment of leachate using fixed film and sludge bed systems. *Journal WPCF*, v.60, n.9, p.1675-83.
- KENNEDY, K. J.; LU, J.; MOHN, W. W. (1992). Biosorption of chlorophenols to anaerobic granular sludge. *Wat. Res.*, v.26, n.8, p.1085-92.
- KENNES, C.; WU, W.-M.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, J. G. (1996). Anaerobic dechlorination and mineralization of pentachlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol by methanogenic pentachlorophenol-degradin granules. *Applied Microbiol Biotechnol.*, v.44, p.801-6.
- KHODADOUST, A. P.; WAGNER, J. A.; SUIDAN, M. T.; BRENNER, R. C. (1997). Anaerobic treatment of PCP in fluidized-bed GAC bioreactors. *Wat. Res.*, v.31, n.7, p.1776-86.
- KIM, S.; YOUNG, J. C.; TABAK, H. H. (1996). Impact of chloroanilines on hydrogenotrophic methanogenesis in ethanol-enriched cultures. *Water Research*, v.30, n.3, p.601-12.
- KING, G. M. (1988). Dehalogenation in marine sediments containing natural sources of halophenols. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, n.12, p.3079-85.
- KOHRING, G.-W.; ZHANG, X.; WIEGEL, J. (1989). Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, n.10, p.2735-7.
- KÖRING, H.; STETTER, K. O. (1989). Archaeobacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. JT Staley, MP Bryant, N Pfennig, JH Holf. Baltimore, Williams & Wilkins, 1^aed. v.3, p.2171-2253.
- KRUME, M. L.; BOYD, S. A. (1988). Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. *Water Research*, v.22, p.171-7.

- KUHN, E. P.; TOWNSEND, T.; SUFLITA, J. M. (1990). Effect of sulfate and organic carbon supplements on reductive dehalogenation chloroanilines in anaerobic aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.9, p.2630-7.
- KUO, C-W.; GENTHNER, B. R. S. (1996). Effect of added heavy metal ions on biotransformation and biodegradation of 2-chlorophenol and 3-chlorobenzoate in anaerobic bacterial consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.7, p.2317-23.
- LARIZZATTI, S. F. (1997). *Avaliação da degradação anaeróbia de pentaclorofenol por consórcios metanogênicos enriquecidos*. São Carlos. 136p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- LA ROCHE, S. and LEISINGER, T. (1990) Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dehalogenase structural gene, a member of the glutathione S - transferase supergene family. *J. Bacteriol.* v.172, p.164-71.
- LARSEN, S.; HENDRIKSEN, H. V.; AHRING, B.K. (1991). Potential for thermophilic (50°C) anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.7, p.2085-90.
- LETTINGA, G.; van VELSEN, A. F. M.; HOBMA, S. W.; de ZEEUM, W.; KLAPWIJK, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotech. Bioeng.*, v.22, p.699-734.
- LINKFIELD, T. G.; TIEDJE, J. M. (1990). Characterization of the requirements and substrates for reductive dehalogenation by strain DCB-1. *Journal of Industrial Microbiology*, n.5, p.9-16.
- LOVLEY, D. R.; DARYL, D. F.; KLUNG, M. J. (1982). Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.43, n.6, p.1373-9.
- MADSEN, T.; AAMAND, J. (1991). Effects of sulfoxo anions on degradation of pentachlorophenol by a metanogenic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.9, p.2453-8.
- MADSEN, T.; AAMAND, J. (1992). Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p.557-61.
- MADSEN, T.; LICHT, D. (1992). Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.9, p.2874-8.
- MANUAL EHC 71 - PENTACHLOROPHENOL Environmental Health Criteria 71. (1987) Report United Nations Environment Programme International Labour Organisation World Health Organisation Geneva, 1987. 233p.
- MASUNAGA, S.; SUSARLA, S.; GUNDERSEN, J. L.; YONEZAWA, Y. (1996). Pathway and rate of chlorophenol transformation in anaerobic estuarine sediment. *Environ. Sci. Technol.*, v.30, p.1253-60.
- MATHEUS, D. R. (1997). *Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por Basidiomicetos brasileiros*. Rio Claro. 162p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

- MATUS, V.; VÁSQUES, M.; VICENTE, M.; GONZÁLEZ, B. (1996). Microbial mineralization of 2,4,5-trichlorophenol in soil. *Environmental Science & Thechnology*, v.30, n.5, p.1472-6.
- McALLISTER, K. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation*, v.7, p.1-40.
- MEER, J. R. van der; LEVEAU, J.; WERLEN, C. (1994). Genetic adaptation of microorganisms to environmental pollutants. *EAWAG news*, v.35E, p.8-15.
- MIETHLING, R.; KARLSON, U. (1996). Accelerated mineralization of pentachlorophenol in soil upon inoculation with *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP1 and *Sphingomonas chlorophenolica* RA2. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.12, p.4361-4366.
- MIKESELL, M. D.; BOYD, S. A. (1986). Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, n.4, p.861-5.
- MIKESELL, M. D.; BOYD, S. A. (1988). Enhancement of pentachlorophenol degradation in soil through induced anaerobiosis and bioaugmentation with anaerobic sewage sludge. *Environmental Science & Thechnology*, v.22, n.12, p.1411-4.
- MILESKI, G. J.; BUMPUS, J. A.; JUREK, M. A.; AUST, S. D. (1988) Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrisosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, p.2885-9.
- MILLER, T. L.; WOLLIN, M. J. (1974). A serum bottle modification of Hungate thechnique for the cultivating obligate anaerobs. *Applied Microbiology*, v.27, n.5, p.985-7.
- MINK, R. W.; DUGAN, P. R. (1977). Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.33, p.713-7.
- MOHN, W. W.; KENNEDY, K. J. (1992). Reductive dehalogenation of chlorphenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 *Applied. and Environmental Microbiology*, v.58, n.4, p.1367-70.
- MOHN, W. W.; TIEDJE, J. M. (1990). Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. *Arch. Microbiol.*, v.153, p.267-71.
- MOHN, W. W.; TIEDJE, J. M. (1991). Evidence for chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedjei*. *Arch. Microbiol.*, v.157, p.1-6.
- MOHN, W. W.; TIEDJE, J. M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological Reviews*, v.56, n.3, p.482-507.
- MONTENEGRO, M. A. P. (1994). *Avaliação da comunidade microbiana em reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) submetido a aumentos progressivos da concentração do íon sulfato*. São Carlos. 186p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- MORAES, E. M.; ADORNO, M. A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2000). Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: OFICINA E SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, 6., Recife, 2000. *Anais. Pernambuco*. v.2, p.235-8.
- MORT, S. L.; DEAN-ROSS, D. (1994). Biodegradation of phenolic compounds by sulfate-reducing bacteria from contaminated sediments. *Microbial Ecology*, v.28, p.67-7.

- NAKAYAMA, C. R. (1999). *Avaliação da biodegradação de pentaclorofenol por bactérias*. São Carlos. 141p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.
- NICHOLSON, D. K.; WOODS, S. L.; ISTOK, J. D.; PEEK, D. C. (1992). Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.7, p.2280-6.
- NIES, L.; VOGEL, T. M. (1990) Effects of organic substrates on dechlorination of Aroclor 1242 in anaerobic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.9, p.2612-7.
- NING, Z.; FERNANDES, L.; KENNEDY, K. J. (1999). Chlorophenol sorption to anaerobic granules under dynamic conditions. *Wat. Res.*, n.33, n.1, p.180-8.
- NING, Z.; KENNEDY, K. J.; FERNANDES, L. (1996). Biosorption of 2,4-dichlorophenol by live and chemically inactivated anaerobic granules. *Wat. Res.*, v.30, n.9, p.2039-44.
- OWEN, W. F.; STUCKEY, D. C.; HEALY, Jr., J. B.; YOUNG, L. Y.; McCARTY, P. L. (1997). Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.*, v.13, p.485-92.
- PAK, D. (1994). Enhanced dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol by anaerobic microbial populations in the presence of ethanol. *Biotechnology Letters*, v.18, n.8, p.981-4.
- PATEL, G. B.; KHAN, A. W.; ROTH, L. A. (1978). Optimum levels of sulphate and iron for the cultivation of pure cultures of methanogens in synthetic media. *Journal of Applied Bacteriology*, v.45, p.347-56.
- PAVLOSTATHIS, S. G.; BEYDILLI, I.; MISRA, G.; PRYTULA, M.; YEH, D. (1997). Anaerobic Process. *Water Environmental Research*, v.69, n.4, p. 500-21.
- PERKINS, P. S.; KOMISAR, S. J.; PUHAKKA, J.; FERGUSON J. F. (1994). Effects of electron donors and inhibitors on reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol. *Wat. Res*, v.28, n.10, p.2101-7.
- PRAKASH; GUPTA, S.K. (2000). Effect of carbon source on PCE dehalogenation. *Journal of Environmental Engineering*, v.126, n.7, p.622-8.
- QUENSEN III, J. F.; BOYD, S. A.; TIEDJE, J. M. (1990). Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by Anaerobiosis organisms from sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.8, p.2360-9.
- QUENSEN III, J. F.; TIEDJE, J. M.; BOYD, S. A. (1988). Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. *Science*, v.242, p.752-4.
- RADEHAUS, P. M.; SCHMIDT, S. K. (1992). Characterization of a Novel Pseudomonas sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.9, p.2879-85.
- RIFFAT, R.; DARARAT, S.; KRONGTHAMCHAT, K. (1999). Anaerobic Process. *Water Environmental Research*, v.71, n.5, p.656-76.
- RIFFAT, R.; SAJJAD, M. W.; DARARAT, S. (1998). Anaerobic Process. *Water Environmental Research*, v.70, n.4, p.518-40.

- SAKAMOTO, I.K. (1996). *Comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo anaeróbio granulado metanogênico, submetido a adições crescentes de sulfato*. São Carlos. 150p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- SAMSON, R.; GUIOT, S. (1985). Mixing characteristics and performance of the anaerobic upflow blanket filter (UBF) reactor. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v.35B, p.65-74.
- SANFORD, R. A.; COLE, J. R.; LÖFFLER, F. E.; TIEDJE, J. M. (1996). Characterization do *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.10, p.3800-8.
- SHELTON, D. R.; TIEDJE, J. M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoate. *Applied and Environmental Microbiology*. v.48, p.840-8.
- SHIN, H.-S.; TOO, K.-S.; PARK, J. K. (1999). Removal of polychlorinated phenols in sequential anaerobic - aerobic biofilm reactor packed with tire chips. *Water Environ. Res.*, v.71, p.363-7.
- SIERRA-ALVAREZ, R.; LETTINGA, G. (1991). The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.34, p.544-50.
- SMATLAK, C. R.; GOSSETT, J. M.; ZINDER, S. H. (1996). Comparative kinetics of hydrogen utilization for reductive dechlorination of tetrachloroethene and methanogenesis in anaerobic enrichment culture. *Environ. Sci. Technol.*, v.30, n.9, p.2850-8.
- SOARES, H. M.; HIRATA, T. S. (1997). Práticas de laboratório. In: CURSO DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE RESÍDUOS, 3., Florianópolis, 1997. *Curso*. Santa Catarina, CBAB, MCT/CNPq, CPGEQ/UFSC, CDB. p.23.
- SPEECE, R. E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater*. England, Vanderbilt University. 393pp.
- STANDARD METHODS for the Examination of Water and Wastewater. (1995). 19th edition. Publication Office American Public Health Association, Washington. APHA; AWWA, WEF.
- STEIERT, J. G.; THOMA, W. J.; UGURBIL, K.; CRAWFORD, R. L. (1988). ³¹P Nuclear magnetic resonance studies of effects of some chlorophenols on *Escherichia coli* and a pentachlorophenol-degrading bacterium. *J. Bacteriol.*, v.170, n.10, p.4954-7.
- STUART, S. L.; WOODS, S. L. (1998). Kinetic Evidence for pentachlorophenol-dependent growth of a dehalogenation population in a pentachlorophenol- and acetate-fed methanogenic culture. *Biotechnol. Bioeng.*, v.57, p.420-9.
- STUART, S. L.; WOODS, S. L.; LEMMON, T. L.; INGLE, Jr., J. D. (1999). The effect of redox potential changes on reductive dechlorination of pentachlorophenol and the degradation of acetate by a mixed methanogenic culture. *Biotechnol. Bioeng.*, v.63, p.69-78.
- SUFLITA, J. M.; TOWNSEND, G. T. (1995). The microbial ecology and physiology of aryl dehalogenation reactions and implications for bioremediation. In: YOUNG, L. Y. and CERNIGLIA, C. E. *Microbiol. Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Willey-Liss, Inc., cap.6, p.243-68.

- SUFLITA, J. M.; GIBSON, S. A.; BEEMAN, R. E. (1988). Anaerobic biotransformation of pollutant chemicals in aquifers. *Journal of Industrial Microbiology*, v.3, p.179-94.
- SUIDAN, M. T.; FLORA, J. R. V.; BOYER, T. K.; WUELLNER, A. M.; NARAYANAN, B. (1996). Anaerobic dechlorination using a fluidized-bed GAC reactor. *Wat. Res.*, v.30, n.1, p.160-70.
- SUSARLA, S.; YONEZAWA, Y.; MASUNAGA, S. (1998). Reductive transformation of halogenated aromatics in anaerobic estuarine sediment: Kinetics, products and pathways. *Wat. Res.*, v.32, n.3, p.639-48.
- SWOBODA-COLBERG, N. G. (1995). Chemical contamination of the environment: sources, types, and fate of syntetic organic chemicals. In: YOUNG, L. Y. and CERNIGLIA, C. E. *Microbiol. Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Willey-Liss, Inc., cap.2, p.27-76.
- THAVEERSI, J.; DAFFONCHIO, D.; LIESSENS, B.; VERSTRAETE, W. (1995). Different types of sludge granules in UASB reactors treating acidified wastewaters. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.68, p.329-37.
- TOLKER-NIELSEN, T.; MOLIN, S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbiol. Ecol.*, v.40, p.75-84.
- TSUNO, H.; KAWAMURA, M.; SOMIYA, I. (1996). Anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP) in biological expanded-bed reactor. *Wat. Sci. Tech.*, v.34, n.5-6, p.335-44.
- TUR, M.-Y.; HUANG, J.-C. (1997). Treatment of phthalic waste by anaerobic hybrid reactor. *Journal of Environmental Engineering*, v.123, n.11, nov, p.1093-9.
- UTKIN, I.; DALTON, D. D.; WIEGEL, J. (1995). Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, n.1, p.346-51.
- UTKIN, I.; WOESE, C.; WIEGEL, J. (1994). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.44, n.4, p.612-99.
- VALLECILLO, A.; GARCIA-ENCINA, P. A.; PEÑA, M. (1998). Anaerobic biodegradability and toxicity of chlorophenols. *V Taller y Seminario Latinoamericano Tratamiento Anaerobio de aguas residuales 27-30 Outubro 1998*, Viña del Mar, Chile.
- VAZOLLER, R. F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. São Carlos. 259p. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VICINO, J. R. L. (1993). *Extração em fase sólida de pesticidas organofosforados e organoclorados de matrizes aquosas*. São Carlos. 150p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VIEIRA, L. G. T. (1996). *Estimativa de parâmetros cinéticos intrínsecos de utilização de substratos por lodo anaeróbio imobilizado*. São Carlos. 63p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- VOGEL, T. M.; McCARTY, P. L. (1985). Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.49, p.1080-3.
- VOGEL, T. M.; CRIDDLE, C. S.; McCARTY, P. L. (1987). Transformation of halogenated aliphatic compounds. *Environmental Science & Thechnology*, v.21, n.8, p.722-35.
- WACKETT, L. P. (1995). Bacterial co-metabolism of halogenated organic compounds. In: YOUNG, L. Y. and CERNIGLIA, C. E. *Microbiol. Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Willey-Liss, Inc., cap.5, p.217-42.
- WACKETT, L. P. (1997). Biodegradation of Halogenated Solvents. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; McINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. (Eds.). *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, cap. 86, p.784-9.
- WALTER, M. V.; CRAWFORD, R. L. (1997). Overview: Biotransformation and Biodegradation. In: HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M.V. (Eds.). *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, cap. 76, p.707-708.
- WANG, Y.-T.; MUTHUKRISHNAN, S.; WANG, Z. (1998). Reductive dechlorination of chlorophenols in methanogenic cultures. *Journal of Environmental Engineering*, v.124, n.3, p.231-238.
- WIDDEL, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed. A.J.B. Zehnder. John Wiley & Sons, Inc., EUA., p.469-586.
- WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1989). Dissimilatory sulfate- or sulfur- reducing bactreria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. JT Staley, MP Bryant, N Pfennig, JH Hof. Baltimore, Williams & Wilkins, 1^a ed. v.2, p.663-679.
- WILD, S. R.; HARRAD, S. J.; JONES, K. C. (1992). Pentachlorophenol in the UK environmental I: A budget and source inventory. *Chemosphere*, v.24, n.7, p.833-45.
- WILSON, G. J.; KHODADOUST, A. P.; SUIDAN, M. T.; BRENNER, R. C. (1997). Anaerobic/aerobic biodegradation of pentachlorophenol using GAC fluidized bed reactors: optimization of the empty bed contact time. *Water Sci. Technol.*, v.36, n.6, p.107-15.
- WOODS, S. L.; FERGUSON, J. F.; BENJAMIN, M. M. (1989). Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. *Environmental Science & Thechnology*, v.23, n.1, p.62-8.
- WU, W.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, J. G. (1993). Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.2, p.389-97.
- WU, W.; HICKEY, R. F.; ZEIKUS, J. G. (1991). Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.12, p.3438-49.
- YE, D.; QUENSEN III, J. F.; TIEDJE, J. M.; BOYD, S. A. (1992). Anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls (Aroclor 1242) by pasteurized and ethanol-treated microorganisms from sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.4, p.1110-4.
- YOUNG, J. C.; TABAK, H. H. (1993). Multilevel protocol for assessing the fate and effect of toxic organic chemicals in anaerobic treatment processes. *Water Environmental Research*, v.65, n.1, p.34-45.

- ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; FORESTI, E. (1996). Liquid-phase mass transfer in fixed bed of polyurethane foam matrices containing immobilized anaerobic sludge. *Biotechnology Techniques*, v.10, p.121-6.
- ZHANG, X. M.; WIEGEL, J. (1990). Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p.1119-27.
- ZINDER, S. H.; KOCH, M. (1984). Non-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, v.138, p.263-72.
- ZINDER, S. H.; CARDWELL, S. C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, p.796-807.
- ZITOMER, D. H.; SPEECE, R. E. (1993). Sequential environments for enhanced biotransformation of aqueous contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, v.27, n.2, p.226-244.