

# REMOÇÃO DE ETANOL E BENZENO EM REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO NA PRESENÇA DE SULFATO

## ETHANOL AND BENZENE REMOVAL IN A HORIZONTAL-FLOW ANAEROBIC IMMOBILIZED BIOMASS REACTOR IN THE PRESENCE OF SULFATE

*EDUARDO BOSCO MATTOS CATTONY*

Biólogo (UFSCar). Doutor em Engenharia Civil - Departamento de Hidráulica e Saneamento (EESC/USP)

*ROGERS RIBEIRO*

Engenheiro Químico (UNICAMP). Doutor em Engenharia Civil - Departamento de Hidráulica e Saneamento (EESC/USP)

*MARCELO ZAIAT*

Engenheiro Químico (UFSCar). Professor Doutor do Departamento de Hidráulica e Saneamento (EESC/USP)

*EUGÊNIO FORESTI*

Engenheiro Civil (EESC/USP). Professor Doutor do Departamento de Hidráulica e Saneamento (EESC/USP)

*MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE*

Bióloga (UNESP/Botucatu). Professora Doutora do Departamento de Hidráulica e Saneamento (EESC/USP)

Recebido: 03/05/06 Aceito: 15/03/07

### RESUMO

Reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), preenchido com espumas de poliuretano, foi usado para tratar benzeno em solução etanólica, sob condições sulfetogênicas. Benzeno foi adicionado em concentração inicial de 2,0 mg.l<sup>-1</sup>, seguido de aumentos que variaram até 10 mg.l<sup>-1</sup>. O etanol foi adicionado em concentrações de 170 mg.l<sup>-1</sup> a 980 mg.l<sup>-1</sup>. Soluções de sulfato ferroso e sulfato de sódio foram usadas, nas concentrações de 91 e 550 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. O reator foi operado a 30 (± 2) °C com tempo de detenção hidráulica de 12 h. A remoção da matéria orgânica foi próxima a 90% com taxa máxima de degradação de benzeno de 0,07 mg<sub>benzeno</sub>.mg<sup>-1</sup>SSV.d<sup>-1</sup>. O presente trabalho corrobora os dados obtidos por Cattony et al (2005), na medida em que torna mais consistente a proposta do uso de unidades compactas de RAHLF, para a biorremediação *in situ* de compostos aromáticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Benzeno, etanol, reator anaeróbio, biofilme, redução de sulfato e PCR/DGGE.

### INTRODUÇÃO

Os campos da engenharia sanitária e ambiental, aliados a biotecnologia, têm evoluído rapidamente no desenvolvimento de métodos para o tratamento de águas residuárias. Isso ocorre principalmente em razão das exigências cada vez maiores dos órgãos públicos de

controle do ambiente, como resposta ao interesse da saúde pública, das crescentes condições adversas causadas pelas descargas de águas residuárias e de uma maior cobrança da sociedade na defesa do ambiente.

Inserido neste contexto, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) publicou (em Maio

### ABSTRACT

*In this study it is reported the operation of a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor under sulfate-reducing condition which was also exposed to different amounts of ethanol and benzene. The HAIB reactor comprised of an immobilized biomass on polyurethane foam and ferrous and sodium sulfate solutions were used (91 and 550 mg.l<sup>-1</sup>, respectively), to promote a sulfate-reducing environment. Benzene was added at an initial concentration of 2.0 mg.l<sup>-1</sup> followed by an increased to 9 e 10 mg.l<sup>-1</sup>, respectively. Ethanol was added at an initial concentration of 170 mg.l<sup>-1</sup> followed by an increased range of 960 mg.l<sup>-1</sup>. The reactor was operated at 30 (± 2) °C with hydraulic detention time of 12 h. Organic matter removal efficiency of 90% with a maximum benzene degradation rate of 0.07 mg<sub>benzene</sub>.mg<sup>-1</sup>VSS.d<sup>-1</sup>. Thus, this work corroborate the data obtained for Cattony et al (2005) and also demonstrate that compact units of HAIB reactors, under sulfate reducing conditions, are a potential alternative for *in situ* aromatic compounds bioremediation.*

**KEYWORDS:** Benzene, ethanol, anaerobic reactor, biofilm, sulfate reduction and PCR/DGGE.

de 2002) um relatório no qual havia a afirmação de que aproximadamente 80% das contaminações de águas subterrâneas no estado de São Paulo-Brasil eram ocasionadas por vazamentos de postos de combustível. Os maiores problemas de contaminação são atribuídos aos hidrocarbonetos monoaromáticos denominados BTEX (benzeno, tolué-

no, etilbenzeno e xilenos) que são os constituintes da gasolina mais solúveis e com maior potencial de migração nas águas subterrâneas (Franzmann et al, 2002). Porém, como a gasolina brasileira é uma mistura de aproximadamente 76% de gasolina e 24% de etanol, o álcool também representaria problema de contaminação, ainda mais, se levado em conta, o seu potencial em aumentar a solubilidade de compostos orgânicos aromáticos (Corseuil et al, 2004).

Tais constatações motivaram o grupo do Laboratório de Processos Biológicos, da Escola de Engenharia da USP de São Carlos, a desenvolver um sistema de baixo custo e alta eficiência para o tratamento biológico das águas subterrâneas contaminadas por vazamentos de gasolina.

Alguns trabalhos de pesquisa já foram realizados dentro deste grupo; tais como, "Anaerobic Degradation of BTEX in a Packed-Bed reactor" (De Nardi et al, 2002), "Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulfate" (Cattony et al, 2005) e "Anaerobic Packed-Bed Reactor for Bioremediation of Gasoline-Contaminated Aquifers" (De Nardi et al, 2005). Sendo assim, o presente trabalho visou dar continuidade a mesma linha de pesquisa realizada por Cattony et al (2005), ou seja, o RAHLF como sistema de baixo custo e alta eficiência para o tratamento biológico de águas subterrâneas contaminadas por compostos orgânicos aromáticos. No presente trabalho foi dado ênfase a remoção de benzeno na presença de sulfato.

## MATERIAL E MÉTODOS

O reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) foi construído em

vidro de boro-silicato, com 100 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, perfazendo 2,0 L de capacidade (Figura 1). O RAHLF foi preenchido com matrizes de espuma contendo lodo imobilizado proveniente de reator UASB. O lodo foi macerado em liquidificador com meio basal Zinder (Zinder et al, 1984) e colocado em contato com espumas de poliuretano por período de aproximadamente 24 horas. Após este período de imobilização da biomassa, as espumas foram transferidas para o interior dos reatores (Zaiat, 1996).

## Inóculo

O reator foi inoculado com lodo proveniente de reator UASB (reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo) usado no tratamento de águas residuárias provenientes de abatedouro de aves.

## Material suporte para crescimento microbiano

Foram usadas espumas de poliuretano (densidade aparente de 23 kg. m<sup>-3</sup>) cortadas em cubos de 0,5 cm de aresta.

## Condições operacionais

A Figura 2 mostra o diagrama das fases 1, 2, 3, 4 e 5, onde estão descritas as composições do meio Zinder usadas em cada fase.

O reator foi mantido a temperatura controlada de, aproximadamente, 30±2°C, com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12±0,5 h em todas as fases. O reservatório afluyente ao reator, foi submetido a atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70/30%) por 15 minutos, antes de ser conectado ao reator, a fim de se manter as condições de anaerobiose do sistema.

A bolsa de gás acoplada ao frasco de alimentação teve como função manter a atmosfera do frasco em condições de anaerobiose.

Após período inicial de enriquecimento do biofilme, o reator foi usado para o ensaio com benzeno. Como substrato para as bactérias, foi utilizado o meio basal descrito por Zinder et al (1984). A solução de vitaminas utilizada foi a descrita por Touzel & Albagnac (1983), acrescida de ácido 4-aminobenzóico (4 mg.l<sup>-1</sup>). Segundo Widdel & Bak (1992), este ácido é necessário ao melhor desenvolvimento de BRS. A princípio foi utilizada relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> igual a 2:1 na alimentação do reator. Todavia, com o decorrer do experimento esta relação não foi mais respeitada.

Na fase 1, de enriquecimento do biofilme, o reator foi alimentado com lactato de sódio e etanol (99%), nas concentrações de 750 mg.l<sup>-1</sup> e 170 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. Nessa fase, foram adicionados sulfato ferroso e sulfato de sódio nas concentrações de 91 mg.l<sup>-1</sup> e 550 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. Após a adição de benzeno, lactato de sódio não foi mais usado e as concentrações de etanol e de sulfato de sódio foram elevadas para 490 mg.l<sup>-1</sup> e 695 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. A concentração de sulfato ferroso não foi alterada em nenhuma fase dos experimentos. Sendo assim, o conteúdo total de íon sulfato no substrato afluyente foi de 400 mg.l<sup>-1</sup> na fase 1 e de 500 mg.l<sup>-1</sup> nas fases subsequentes. A concentração final de sulfato foi definida experimentalmente, após, a estabilização do sistema; ou seja, para concentrações de sulfato de sódio superiores a 500 mg.l<sup>-1</sup> no substrato afluyente, sempre foram observadas concentrações residuais de sulfato no efluente. Desse modo, o conteúdo equivalente aos valores residuais foi, então, subtraído do meio nutritivo.

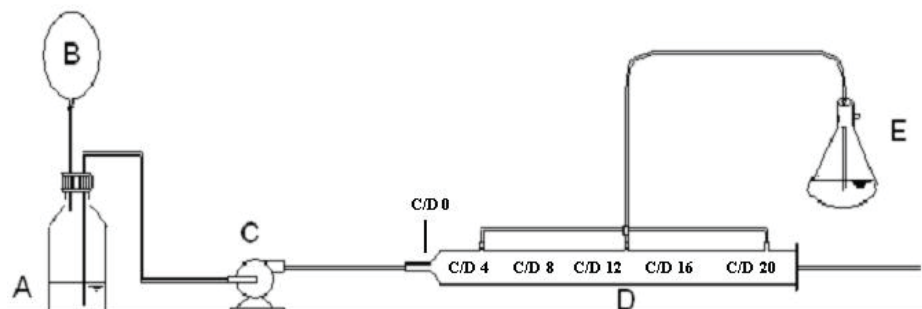
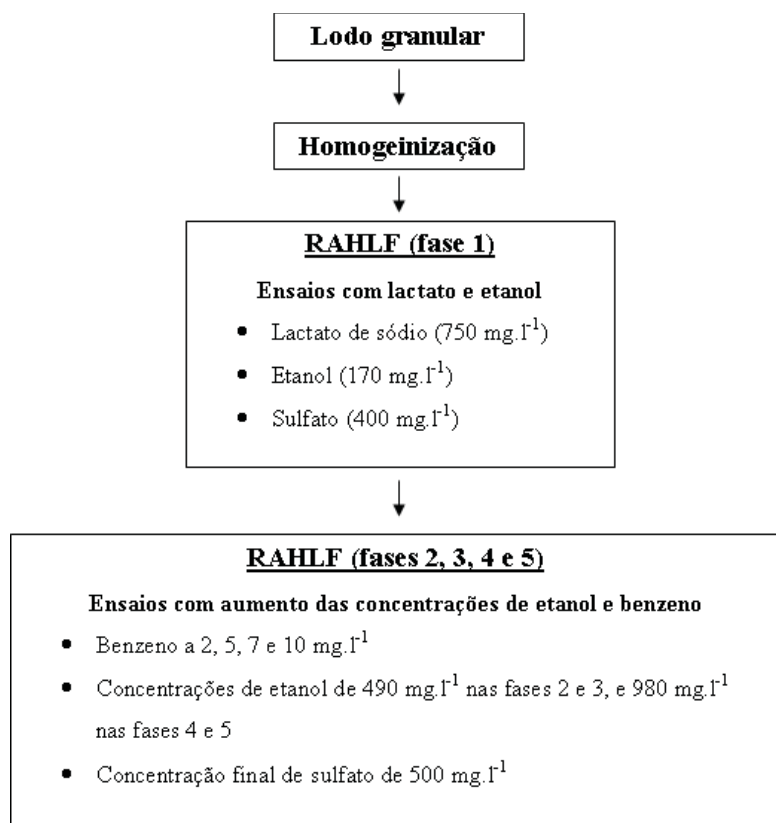


Figura 1 - Esquema do reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) em escala de bancada: (A) reservatório de afluyente, (B) bolsa de gás com N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, (C) bomba peristáltica, (D) reator, (E) saída do gás



**Figura 2 - Diagrama das fases operacionais 1, 2, 3, 4 e 5 em RAHLF. Na figura a concentração de sulfato refere-se ao íon e não a solução de sulfato de sódio**

O etanol foi utilizado como substrato principal, nas fases 2, 3, 4 e 5, por sua capacidade de aumentar a solubilidade de benzeno no meio e, conseqüentemente, favorecer a disponibilidade do mesmo. Sendo assim, benzeno foi adicionado em volume calculado de etanol (99%) antes de ser misturado ao substrato sintético. Na fase de enriquecimento (fase 1), volume específico de etanol (99%) foi adicionado diretamente ao meio para a obtenção da concentração final de 170 mg.l<sup>-1</sup>.

Nas fases 2 e 3, a concentração de etanol foi elevada de 170 para 490 mg.l<sup>-1</sup>. Nas fases 4 e 5, houve a necessidade do aumento da concentração de etanol para 980 mg.l<sup>-1</sup> possibilitando, deste modo, a solubilização completa do composto aromático no meio.

O aumento nas concentrações de benzeno só ocorreu depois da estabilização do reator verificada através dos valores obtidos para conteúdo de matéria orgânica (expressa em DQO), conteúdo de sulfato, de sólidos suspensos voláteis (SSV), de ácidos e alcalinidade gerados (método volumétrico) na entrada e saída do reator. Depois de verificada a

estabilização do reator, foram realizadas amostragens ao longo de todo o leito do reator. Nesta fase, foram realizadas análises do conteúdo de matéria orgânica, conteúdo de sulfato, sólidos suspensos voláteis, de ácidos e alcalinidade, ácidos orgânicos e compostos aromáticos por cromatografia gasosa. Somente, após estas análises as concentrações dos compostos aromáticos foram aumentadas configurando nova fase operacional.

### Amostragem

As amostras estudadas foram retiradas do afluente, efluente e ao longo do reator. Os pontos de amostragem correspondem a relação C/D (comprimento/diâmetro) de 0, 4, 8, 12, 16 e 20 (Figura 1). O zero representa o afluente.

### Análises físico-químicas

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sulfato foram realizadas de acordo com métodos descritos no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998). Somente

as amostras usadas para as análises de DQO e sulfato foram filtradas em membranas com diâmetro de poro de 0,45 µm.

As análises de SSV da biomassa final foram realizadas com dez espumas de poliuretano retiradas do trecho inicial e final do leito do reator na fase de enriquecimento e ao final da fase com 10 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno. A biomassa aderida foi extraída através de agitação manual em frascos de antibiótico com pérolas de vidro e água destilada (2 g de pérolas/10 ml de água). Os frascos foram agitados durante 20 minutos em ângulo de 45°. Posteriormente, a biomassa livre foi transferida para cápsulas apropriadas para a análise de SSV.

As análises volumétricas de ácidos e alcalinidade seguiram os protocolos propostos por Dilallo & Albertson (1961) e modificada por Ripley et al (1986), respectivamente.

### Análises cromatográficas

A composição do biogás foi analisada na atmosfera do reator através de cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo Gow Mac, serie 150, com detector de condutividade térmica. Foi utilizada coluna Porapak Q, temperatura de injeção de 50°C, volume de injeção de 0,5 mL e fluxo do gás de arraste (hidrogênio) de 60 mL.min<sup>-1</sup>.

As análises de ácido acético e propiônico foram realizadas por cromatografia gasosa (GC-FID HP 6890, HP-1 coluna 100% bi-methylpolissiloxano) segundo Moraes et al, 2000. As análises de benzeno foram realizadas por cromatografia gasosa (GC-FID HP 6890, HP-1 coluna 100% dimetilpolissiloxano) segundo De Nardi et al, 2002.

### Modelo cinético

Foi proposto modelo cinético a partir de reações paralelas em série de primeira e segunda ordem irreversíveis com dois produtos metabólicos intermediários para a remoção de benzeno. As constantes cinéticas do processo descritas na Figura 3 foram estimadas através de otimização algorítmica baseada no método Runge-Kutta (Microsoft Excel 2000 - Solver).

O balanço de massa realizado para cada substrato e para os produtos intermediários, considerando o reator

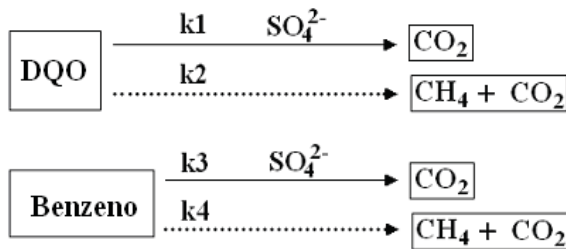


Figura 3 - Diagrama do modelo cinético proposto

como perfeito plug-flow (De Nardi et al, 1999), resultaram nos seguintes sistemas de equações diferenciais não lineares:

Balço de massa para DQO;

$$-\frac{v_s}{D} \cdot \frac{dC_{DQO}}{d\left(\frac{C}{D}\right)} = k_1 \cdot (C_{DQO} - C_{DQO-R}) \cdot C_{SO_4^{2-}} + k_2 \cdot (C_{DQO} - C_{DQO-R}) \quad (1)$$

Balço de massa para Benzeno;

$$-\frac{v_s}{DD} \cdot \frac{dC_{benzeno}}{d\left(\frac{C}{D}\right)} = k_3 \cdot C_{benzeno} \cdot C_{SO_4^{2-}} + k_4 \cdot C_{benzeno} \quad (2)$$

Balço de massa para sulfato;

$$-\frac{v_s}{D} \cdot \frac{dC_{SO_4^{2-}}}{d\left(\frac{C}{D}\right)} = [k_1 \cdot (C_{DQO} - C_{DQO-R}) + k_3 \cdot C_{tolueno}] \cdot C_{DO_4^{2-}} \quad (3)$$

As equações (1) a (3) estão relacionadas a: (1) degradação de matéria orgânica (DQO), (2) remoção de benzeno, (3) consumo de sulfato. O significado de cada parâmetro é dado a seguir: D é o diâmetro do reator; C é o comprimento;  $v_s$  é a velocidade superficial;  $C_{DQO}$  é a concentração de matéria orgânica ( $mg_{DQO} \cdot l^{-1}$ );  $C_{benzeno}$  é a concentração de benzeno ( $mg_{benzeno} \cdot l^{-1}$ );  $C_{SO_4^{2-}}$  é a concentração de sulfato ( $mg_{sulfato} \cdot l^{-1}$ );  $C_{DQO-R}$  é a concentração de matéria orgânica residual ( $mg_{DQO-R} \cdot l^{-1}$ );  $k_1$  e  $k_3$  ( $mg \cdot l^{-1} \cdot sulfato \cdot h^{-1}$ ) são os coeficientes cinéticos aparentes de segunda-ordem, e  $k_2$  e  $k_4$  ( $h^{-1}$ ) são os coeficientes cinéticos aparentes de primeira-ordem. A adsorção do composto aromático não foi considerada no modelo matemático devido ao fato de não ter sido considerada etapa limitante nas taxas de remoção.

### Exames microscópicos

O exame microbiológico do lodo enriquecido e biofilme foi realizado em microscópio Leica DM LB, acoplado a câmara Leica DC 200 e software Image-Pro plus (versão 4.5.0.19).

As células crescidas na espuma de poliuretano foram observadas, também através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme método descrito por Nation (1983).

### Análises de biologia molecular

No presente trabalho, a partir do DNA extraído da biomassa aderida as espumas de poliuretano, foram obtidos fragmentos de DNAr 16S, utilizando-se a técnica do PCR com primers homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S. Os primers usados foram os seguintes: 968F-GC e 1392R específicos para o Domínio Bacteria; GM5F-GC e 907R específicos para BRS, 1100F-GC e 1400R que amplificam o DNA 16S do Domínio Archaea. Como o inóculo utilizado no reator apresentava comunidades mistas de microrganismos, foram realizadas três abordagens de estudo: (1) análise da comunidade bacteriana, (2) análise da comunidade de BRS e (3) análise da comunidade de arqueias (Tabela 1).

As ampliações foram realizadas com o uso de termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Para as ampliações específicas de fragmentos de DNAr 16S para o grupo das BRS, para Bacteria e para Archaea, foi utilizada mistura de reação (volume final de 50µl) descrita a seguir: 0,8µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl), 10µl de tampão da Taq (1x) (contendo  $MgCl_2$ ), 5,0µl de DMSO (5%), 0,8 µl de dNTP's (0,2mM), 2µl de F968 (0,4µM), 2µl de R1392 (0,4µM), 2µl de 1100F (0,4µM) e 2µl de 1400R (0,4µM). A amplificação para BRS e Bacteria ocorreu seguida de 35 ciclos variando-se a temperatura entre 92°C (por 30 segundos), 57°C (por 1 minuto) e 72°C (por 45 segundos); 1 ciclo a temperatura de 72°C (por 5 minutos) e, finalmente, resfriamento à 4°C. A amplificação para Archaea ocorreu seguida de 30 ciclos variando-se a temperatura entre 94°C (por 30 segun-

dos), 55°C (por 30 segundos) e 72°C (por 1 minuto e 30 segundos); 1 ciclo a temperatura de 72°C (por 3 minutos) e finalmente resfriamento à 4°C.

O sistema de DGGE utilizado foi o "DCode™ - Universal Mutation Detection System" (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia) e, utilizado, exatamente, como descrito pelos fabricantes no manual de instruções. Os géis paralelos foram feitos variando-se a concentração de desnaturante (uréia) de 30 a 70%. Os géis polymerizaram pela adição de 150 µl de persulfato de amônio 10% e 14 µl de TEMED (para concentração final de 0,09%). As eletroforeses ocorreram na voltagem constante de 50 V e temperatura de 60°C por 14 horas. As alíquotas de PCR adicionadas no gel foram de 24 µl. Os géis foram corados com 10 ml de solução de coloração (TAE 1x contendo 1µg/ml de Brometo de Etídeo). Finalmente, os géis foram fotografados em câmara escura "Eagle Yey II" (Stratagene) e processados com o software "Eaglesight" (Stratagene - versão 3.22).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio contínuo em RAHLF foi iniciado com alimentação baseada no meio Zinder acrescido de lactato de sódio, etanol e ácido 4-aminobenzoico. Sob tais condições o reator foi alimentado por período de, aproximadamente, 15 dias, até a completa estabilização do sistema, a qual foi verificada através das análises físico-químicas. Após esta fase de enriquecimento (fase 1), foram iniciados ensaios com as concentrações crescentes de benzeno, 2, 5, 7 e 10  $mg \cdot l^{-1}$  (fases 2, 3, 4 e 5, respectivamente).

A concentração de matéria orgânica expressa como DQO, a carga orgânica volumétrica e a concentração de sulfato, afluente e efluente do reator, em todos os ensaios com benzeno, estão mostrados na Figura 4.

Na fase 1, a DQO inicial afluente foi de, aproximadamente,  $1000 \pm 7 mg \cdot l^{-1}$ , diminuindo para cerca de  $130 \pm 6 mg \cdot l^{-1}$  (eficiência de remoção de aproximadamente 87%) no efluente. Foram necessários 15 dias, aproximadamente, para que os valores de DQO se estabilizassem, sendo que o maior consumo da matéria orgânica, expressa em DQO, ocorreu logo no primeiro trecho do reator, correspondendo aos pontos de amostragem C/D 4 e C/D 8. No restante do reator, não



Tabela I - Primers usados nos experimentos com PCR

Primers <sup>a</sup>	DNAr 16S alvo	Seqüência (5'→3')	Referência
<b>968F-GC</b>	Bacteria	GC-AACGCGAAGAACCTTAC	Nielsen et al (1999)
<b>1392R</b>	Bacteria	ACGGGCGGTGTGTAC	
<b>1100F-GC</b>	Archaea	GC-AACCGTGCACAGTCAGGYAACGAGCGAG	Kudo et al (1997)
<b>1400R</b>	Archaea	CGGCGAATTCGTGCAAGGAGCAGGGAC	
<b>GM5F-GC</b>	BRS	CCTACGGGAGGCAGCAG	Nakagawa et al (2002)
<b>907R</b>	Universal	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	Muyzer et al (1995)
<b>GC.</b>		CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG	Muyzer et al (1996)

<sup>a</sup> F, forward primers; R, Reverse primers; GC., seqüência rica em G+C anexada ao final 5' da molécula de DNA.

houve alteração significativa da DQO (Figura 4A). Nas fases de alimentação com benzeno a eficiência na remoção de matéria orgânica aumentou, sensivelmente, com exceção da fase 4 onde houve incremento na concentração de etanol de 460 para 960 mg.l<sup>-1</sup>.

Após a introdução de 5 mg.l<sup>-1</sup> benzeno na fase 2, a eficiência de remoção da matéria orgânica aumentou para 92%, ou seja, 1000 ± 4 mg.l<sup>-1</sup> foram reduzidos a 80 ± 3 mg.l<sup>-1</sup> no efluente. Esta eficiência se manteve inalterada na fase 3, diminuiu para 90% na fase 4 e melhorou até o valor de 97% na fase 5. Estes valores indicaram que as concentrações de 2, 5, 7 e 10 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno estudadas não foram prejudiciais ao equilíbrio do sistema. O maior consumo de matéria orgânica, em todos os ensaios, ocorreu sempre no primeiro trecho do reator, correspondendo aos pontos de amostragem C/D 4 a 8. Nos demais pontos de amostragem ao longo do reator, constatou-se a presença de DQO residual, cujo valor, praticamente, não se alterou (Figura 4A).

Vários trabalhos já demonstraram a importância do sulfato, em sítios contaminados com compostos orgânicos aromáticos, uma vez que este acceptor final de elétrons possibilita o desenvolvimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Boopathy et al, 1998; Kolmert et al, 2000; Franzmann et al, 2002; Da Silva et al, 2005). Confirmando a tendência dos dados obtidos in situ, pelos autores anteriormente citados, o biofilme sulfetogênico formado no RAHLF também se mostrou capaz de remover tolueno (Cattony et al, 2005). No presente trabalho, a remoção do sulfato, na fase 1, apresentou o mesmo comportamento da matéria orgânica e sugeriu a presença de BRS (Figura 4B).

Elevada eficiência de remoção, próxima a 100%, foi verificada no primeiro trecho do reator (C/D 4 a 8), após 15 dias de enriquecimento.

O pH efluente próximo a 7,9 (± 0,1) na fase de enriquecimento (Figura 4C), mostrou-se ligeiramente mais alcalino, em relação ao afluente de 7,6 (± 0,1). Esta leve tendência de alcalinização foi comprovada, também, pelas análises volumétricas de alcalinidade (Figura 4D), correspondendo a 131±8 mg.l<sup>-1</sup> e 195±5 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores, também, foram relacionados com a produção de bases de sais de ácidos inorgânicos fracos (como, por exemplo, bicarbonato), de sais de ácidos voláteis (acético e propiônico na fase 1) e pela formação de íons OH<sup>-</sup> devido a hidrólise da água promovida pelos íons HS<sup>-</sup> e S<sup>2-</sup>.

Esta capacidade de alcalinização do reator se mostrou eficiente em todos os ensaios com benzeno. Mesmo com pH afluente tendo seu valor diminuído sensivelmente em todos os diferentes ensaios, principalmente na fase 5, com valor em torno de 7,4 (± 0,1), o pH efluente se manteve estável próximo ao valor de 7,7 (± 0,1).

Após a adição de benzeno, as concentrações de etanol adicionadas ao meio foram elevadas com a intenção de aumentar a solubilidade do composto aromático. O valor de 170 mg.l<sup>-1</sup>, na fase 1, foi elevado para 490 mg.l<sup>-1</sup> nas fases 2 e 3. Nas fases 4 e 5, foi necessária concentração de etanol afluente de 960 mg.l<sup>-1</sup>. Estes aumentos na concentração de etanol, que é um ácido fraco, foram também responsáveis pela diminuição nos valores de pH afluente.

A análise volumétrica de ácidos (Figura 4E) apresentou valores contrastantes na fase 1. Devido a grande

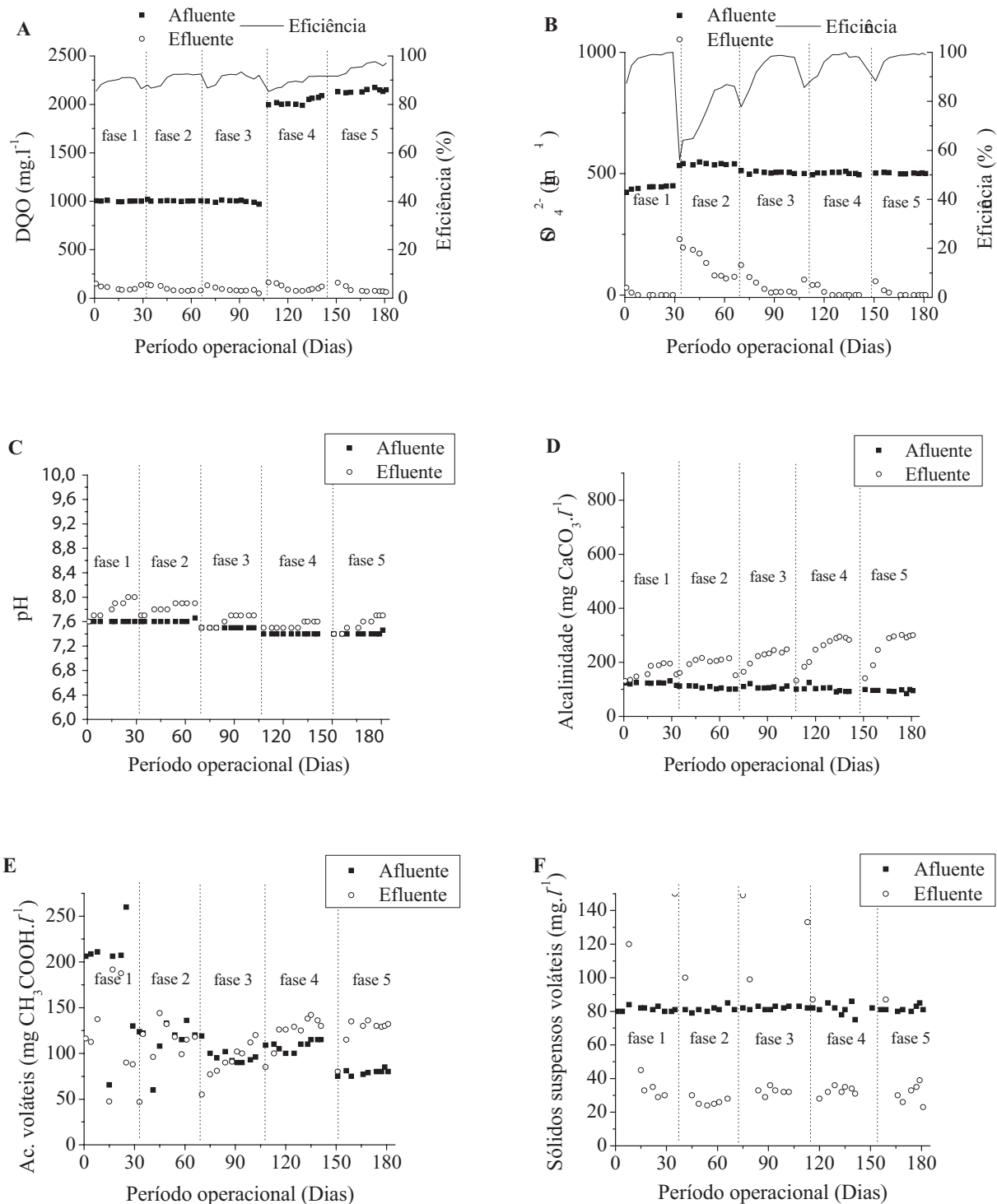
diferença entre as concentrações de etanol no afluente da fase 1 em relação as fases 4 e 5, iguais a 170 mg.l<sup>-1</sup> e 960 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente, o acúmulo de ácidos orgânicos gerado pela oxidação do etanol produzindo, principalmente, ácido acético, foi maior nas últimas duas condições. As fases 2 e 3 apresentaram concentração intermediária de etanol e, portanto, valores intermediários de acúmulo de ácido. Como já observado por Cattony et al (2005), as diferenças entre os valores obtidos nas análises de DQO e de ácidos nas amostras de efluente refletem as limitações da abordagem proposta por Dilallo & Albertson (1961). É possível que as concentrações residuais de S<sup>2-</sup> tenham interferido na análise. O S<sup>2-</sup> pode ter provocado acréscimo nos valores de ácidos devido a formação de Na<sub>2</sub>S, o que explicaria estas discrepâncias.

Os sólidos suspensos voláteis (SSV) afluente (Figura 4F) apresentaram valores próximos a 80±3 mg.l<sup>-1</sup> e no efluente próximos a 30±4 mg.l<sup>-1</sup>, em todas as condições.

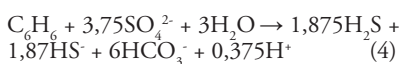
Foi observada, também, a detecção de metano no biogás, tendo sua porcentagem variado entre 10 e 55% em todas as fases de operação do reator.

Quanto ao benzeno, observou-se sua remoção antes do segundo ponto de amostragem do reator (C/D 8) em todos as fases, remanescendo apenas a concentração residual de aproximadamente 0,2±0,1 mg.l<sup>-1</sup> nas fases 2 e 3 e 0,8±0,1 mg.l<sup>-1</sup> nas fases 4 e 5. Sendo assim, o consumo do benzeno teve o mesmo comportamento observado para sulfato e matéria orgânica (expressa em DQO).

Burland & Edwards (1999) sugeriram a seguinte reação (4) para a oxidação de benzeno em condições sulfetogênicas:



**Figura 4 - Variação temporal da matéria orgânica (DQO) (A), sulfato (B), pH (C), alcalinidade (D), ácidos (E) e sólidos suspensos voláteis (SSV) (F), nas diferentes fases operacionais do RAHLF alimentado com benzeno**



Considerando-se que as células estivessem oxidando benzeno através da redução de sulfato, em todas as diferentes concentrações, no total teriam sido consumidos de 30 a 170 mg.l<sup>-1</sup> de sulfato. O restante do sulfato consu-

mido, aproximadamente, 330 mg.l<sup>-1</sup>, teriam sido, usados na oxidação de toda a matéria orgânica (ácido acético e, principalmente, etanol) distribuída no leito do reator.

A Tabela 2 e Figura 5 apresentam as variações espaciais obtidas para cada fase operacional e os resultados do mo-

delo cinético proposto (reações paralelas em série irreversíveis com dois produtos intermediários). De acordo com o modelo, a análise dos valores de  $k_1$  e  $k_2$  revelaram que as taxas de consumo de matéria orgânica, pela sulfetogênese ou pelo metabolismo fermentativo, foram similares quando submetidas a

concentrações de sulfato próximas a 300 mg.l<sup>-1</sup>, desde que  $k_2$  seja igual a  $k_1$  multiplicado pela concentração de sulfato ( $C_{SO_4^{2-}}$ ), nesta condição. Para concentrações de sulfato maiores do que 330 mg.l<sup>-1</sup>, a atividade sulfetogênica foi o processo metabólico predominante. Por outro lado, outros processos metabólicos, que não a redução do sulfato, foram responsáveis pela remoção da matéria orgânica quando as concentrações de sulfato forem inferiores 330 mg.l<sup>-1</sup>. Deste modo, os dados cinéticos sugeriram que o metabolismo variou ao longo do reator, acompanhando o decréscimo na concentração de sulfato. Esta conclusão corrobora com observações microscópicas de morfologias semelhantes a arqueias metanogênicas como sendo mais freqüentes no trecho final do leito do reator.

A remoção, quase que total, de benzeno foi observada sempre antes do ponto de amostragem C/D 8 em todas as fases operacionais. Como os valores de  $k_4$  foram nulos em todas as fases, é provável que o benzeno tenha sido consumido principalmente por atividade sulfetogênica com taxa máxima de 0,07 mg<sub>benzeno</sub>.mg<sup>-1</sup>SSV.d<sup>-1</sup>. Este valor foi calculado da equação (2) para concentração de benzeno de 10 mg.l<sup>-1</sup>, concentração de sulfato de 500 mg.l<sup>-1</sup>, para  $k_3$  de 0,021 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Tabela 2) e para concentração de SSV de 43,9 g.l<sup>-1</sup>, baseado nos dados obtidos com C/D 4 (dados não mostrados).

De Nardi et al (2002) mediram a capacidade do RAHLF em adsorver benzeno. Os autores relataram valor de adsorção de benzeno de 12,81 (±1,21) µmol por grama de biofilme. Adotando-se os valores obtidos por De Nardi et al (2002), no presente trabalho, a capacidade total de adsorção de benzeno pelo sistema sulfetogênico teria sido de, aproximadamente, 300 mg por todo biofilme. Durante

todo período experimental foram introduzidos 1612,53 mg de benzeno no reator. Portanto, apesar da adsorção, a biodegradação foi, provavelmente, o principal fenômeno relacionado com a remoção do benzeno.

Exames de microscopia óptica e eletrônica de varredura do biofilme (Figura 6), na fase de enriquecimento e nas fases com benzeno, mostraram morfologias semelhantes ao longo de todo o leito. Foram visualizados filamentos, bacilos, bacilos ovalados, bacilos delgados, bacilos curvos, cocos, cocos fluorescentes, e morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp.. As produções de metano, na atmosfera do reator, além da presença das células fluorescentes confirmaram a presença de arqueias metanogênicas.

Comparando os diferentes pontos de amostragem nas diferentes fases de operação do reator, os perfis de DGGE revelaram que a diversidade, de populações de bactérias, foi particularmente menor nos primeiros pontos de amostragem. Os perfis mostraram a predominância no início do reator (C/D 0 e 4) de pelo menos duas população bacterianas na fase 1 (Figura 7). As setas indicam as populações predominantes em cada amostra. Diferentes fontes de carbono como lactato, etanol e benzeno produziram perfis distintos, mas, de qualquer modo, foi observada a mesma tendência de divisão de populações na primeira porção do reator horizontal (Figura 7).

As adições de benzeno nas fases 2 e 3 mostraram perfil de DGGE similar, com poucas populações dominantes, provavelmente, quatro ou menos espécies (Figura 7). Nas fases 3, 4 e 5 foram visualizadas as mesmas duas bandas no ponto de amostragem C/D 4, porém, com intensidade crescente em relação a concentração crescente de benzeno no reator. Sendo assim, os *finger-print* gerados nos diferentes ensaios sugeriram

aumento da competitividade na comunidade microbiana do reator depois da adição de benzeno. Aparentemente, esta competição favoreceu pelo menos duas populações distintas que se destacaram na fase 3, 4 e 5, sugerindo que estas novas populações estiveram relacionadas com a degradação de benzeno.

No trecho final do reator os perfis não mostraram alteração significativa no padrão de bandas. Sendo assim, as concentrações residuais de benzeno não exerceram pressão seletiva representativa a ponto de modificar a composição de populações bacterianas no final do leito do reator, em nenhuma das fases operacionais.

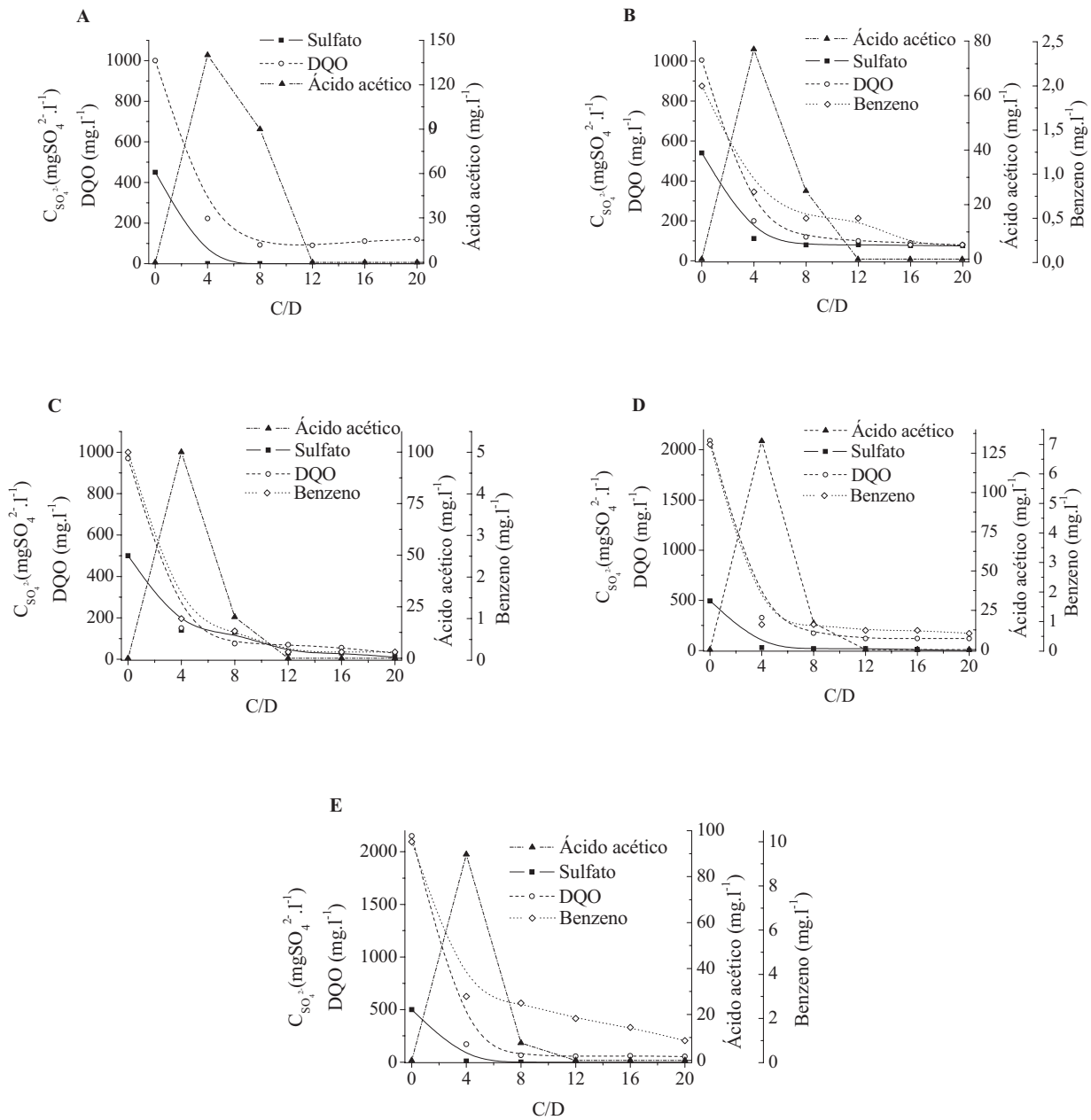
A abordagem com *primers* específicos para BRS (Figura 8) mostrou a mesma tendência observada com os *primers* utilizados para Domínio *Bacteria*, ou seja, perfil uniforme. As populações de BRS foram, preferencialmente, selecionadas nas fases 4 e 5, onde as poucas mudanças, pelo menos de duas novas populações, foram mais facilmente observadas nos pontos de amostragem C/D 0 e 4.

No gel com as amostras para C/D 20 (dados não mostrados) o perfil, praticamente, nada mudou. Portanto, apesar de apresentarem mudanças sutis no perfil de bandas, algumas populações de BRS foram favorecidas a partir da introdução de benzeno no meio de cultura e, sendo assim, é provável que a degradação do benzeno possa, também, estar relacionada com este grupo de microrganismos.

Os perfis de DGGE com *primers* específicos para *Archaea* mostraram que este grupo variou geneticamente, nos diferentes tratamentos e ao longo do reator (Figura 9). As análises de DGGE para o Domínio *Archaea* evidenciaram diferenças no perfil populacional entre os trechos inicial (Figura 9) e final (dados não mostrados) do reator, inclusive nos diferentes ensaios nutricionais. Pelo menos duas novas populações foram selecionadas ao ponto de já serem visualizadas no gel a partir da fase 2.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos aparentes do processo

Concentração de benzeno afluente (mg.l <sup>-1</sup> )	Parâmetros cinéticos aparentes					Coeficiente de Correlação R <sup>2</sup>
	$k_1$ (mg.l <sup>-1</sup> <sub>sulfato</sub> .h <sup>-1</sup> )	$K_2$ (h <sup>-1</sup> )	$k_3$ (mg.l <sup>-1</sup> <sub>sulfato</sub> .h <sup>-1</sup> )	$k_4$ (h <sup>-1</sup> )	$C_{COD,R}$ (mg.l <sup>-1</sup> )	
2	0,004	0,95	0,003	0	95	0,999
5	0,004	1,03	0,005	0	56	0,982
7	0,003	1,53	0,013	0	126	0,994
10	0,006	2,11	0,021	0	57	0,995



**Figura 5 - Variação espacial de sulfato, matéria orgânica (expressa em DQO) e ácido acético na fase 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E) de operação do RAHLF**

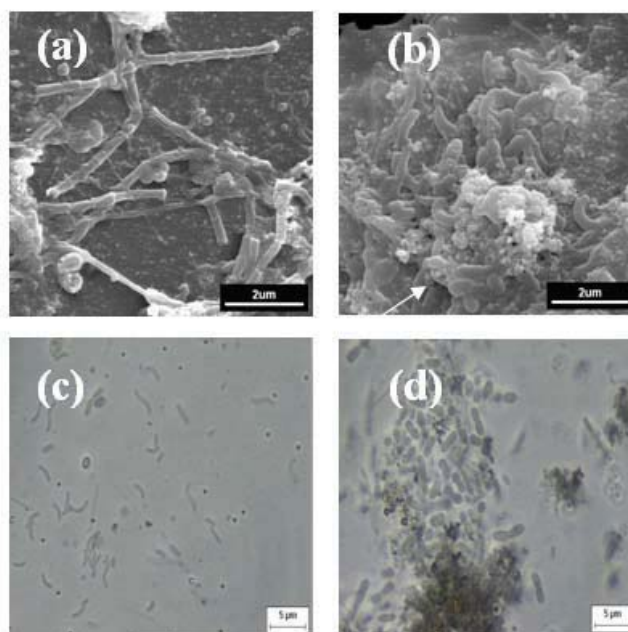
Portanto, a variação no perfil das comunidades, em todas as fases, mesmo que sutis, sugeriram que as arqueias sofreram pressão seletiva e, desta forma, poderiam apresentar relação com a degradação de benzeno. Como os processos metanogênicos representam o mecanismo final de degradação da matéria orgânica no ambiente, é pouco provável que as arqueias estejam diretamente ligadas a quebra de anéis aromáticos. Provavelmente, a participação das arqueias deve estar relacionada com a utilização de produtos intermediários, derivados

da degradação de etanol e benzeno, no consórcio microbiano.

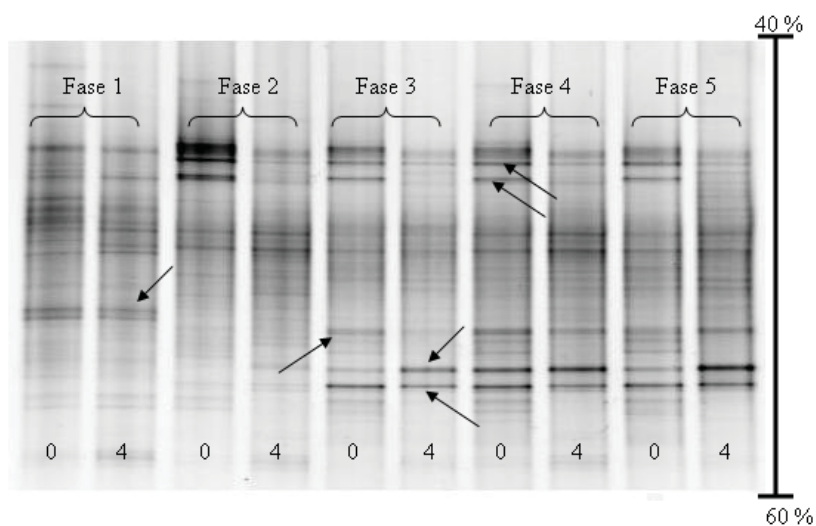
Finalmente, pode-se concluir que o RAHLF foi eficiente na remoção de etanol e benzeno, na presença de sulfato. A adição de benzeno não interferiu no metabolismo oxidativo do reator, que manteve estabilidade em todas as fases operacionais. As análises de microscopia, óptica e eletrônica de varredura, sugeriram que, tanto, na fase de enriquecimento, com etanol e lactato, quanto, nas fases subsequentes, com etanol e benzeno, populações de bacilos

ovalados e morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. foram favorecidas. Ainda, como ácido acético foi o único ácido orgânico detectado, pelas análises cromatográficas, é provável que as BRS não oxidadoras de acetato (oxidadoras incompletas), como, por exemplo, *Desulfobulbus propionicus* (bacilos ovalados), estiveram presentes de forma significativa no biofilme enriquecido. As análises com gel de DGGE sugeriram que a seletividade do benzeno adicionado ao meio de cultura, tenha favorecido o crescimento de populações

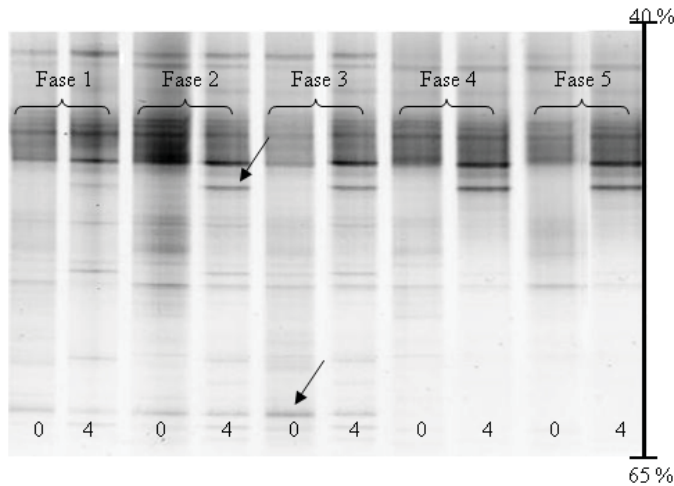




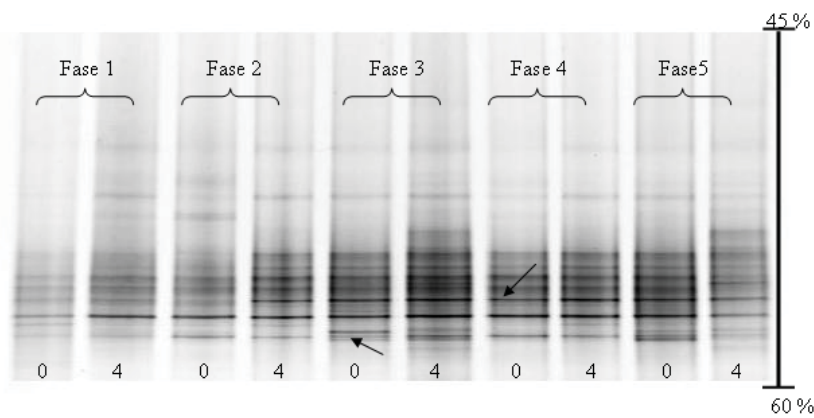
**Figura 6 - Microscopias ópticas de contraste de fase e eletrônica de varredura do biofilme do RAHLF na fase 4 (com 7,0 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno): (a) morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp., (b) bacilos ovalados e bacilos curvos, (c) bacilos curvos, (d) bacilos ovalados**



**Figura 7 - Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de primers específico para Domínio Bacteria dos pontos C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno**



**Figura 8 - Gel de DGGE (gradiente de 40-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de primers específico para BRS dos pontos de amostragem C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno**



**Figura 9 - Gel de DGGE (gradiente de 45-60%) com amostras de DNA amplificadas com set de primers específico para Domínio Archaea dos pontos de amostragem C/D 0 e 4 do RAHLF em todas as fases operacionais de alimentação com benzeno**

que não eram predominantes na biomassa enriquecida. Sugeriram, também, provável relação indireta de arqueias e relação direta de bactérias fermentativas e BRS com a remoção de benzeno.

## CONCLUSÕES

- O RAHLF e as condições adotadas neste experimento foram favoráveis em promover o crescimento microbiano e reduzir sulfato, sob a influência de diferentes concentrações de etanol e benzeno;

- Modelos cinéticos de primeira e segunda ordem foram combinados de modo a explicar, satisfatoriamente, as diferentes fases no metabolismo anaeróbico do reator. Segundo este modelo

a degradação do benzeno foi alcançada em condições sulfetogênicas, enquanto que, o etanol foi oxidado, tanto, através da redução do sulfato, quanto, através de processos fermentativos e metanogênicos;

- Remoção de etanol e benzeno, na presença de sulfato em RAHLF, foi satisfatória em todas as diferentes concentrações dos mesmos. A adição dos compostos aromáticos não interferiu no metabolismo oxidativo dos reatores, que mantiveram a estabilidade em todas as fases experimentais. As análises dos géis de DGGE sugeriram participação de populações de *Bacteria* e de BRS para a degradação de benzeno;

- A aplicação do RAHLF em unidades compactas é viável a biorre-

mediação de águas contaminadas com etanol e benzeno;

- As concentrações residuais de benzeno no efluente do reator não atenderam aos critérios requeridos pela Resolução CONAMA nº 020/86 (0,01 mg.l<sup>-1</sup> de benzeno) para as classes 1, 2 e 3, sendo assim, outro sistema de tratamento deverá ser acoplado para a remoção da concentração residual deste aromático, caso o RAHLF, operado em condições sulfetogênicas, seja adotado para o tratamento *in situ* de águas contaminadas.

## REFERÊNCIAS

- BOOPATHY, R.; KULPA, C.F.; MANNING, J. *Anaerobic Biodegradation Of Explosives And Related Compounds By Sulfate-Reducing And Methanogenic Bacteria: A Review*. *Bioresource Technology* 63: 81-89, 1998.
- BURLAND, S.M. & EDWARDS, E.A. *Anaerobic Benzene Biodegradation Linked to Nitrate Reduction*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (2): 529-533, 1999.
- CATTONY, E.B.M. et al. *Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulfate*. *Biotechnology and Bioengineering*, 91 (2): 244-253, 2005.
- CORSEUIL, H. X.; KAIPPER, B. I.; FERNANDES, M. *Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol*. *Water Research* 38 (6): 1449-56, 2004.
- DA SILVA, M. L. B.; RUIZ-AGUILAR, G. M. L.; ALVAREZ, P. J. J. *Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate*. *Biodegradation* 16: 105-114, 2005.
- DE NARDI, I. R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors*. *Bioprocess Engineering* 21: 469-476, 1999.
- DE NARDI, I.R. et al. *Anaerobic Degradation of BTEX in a Packed-Bed reactor*. *Water Science and Technology* 45: 175-180, 2002.
- DE NARDI, I. R. et al. *Anaerobic Packed-Bed Reactor for Bioremediation of Gasoline-Contaminated Aquifers*. *Process Biochemistry* 40: 587-592, 2005.
- DILALLO, R. & ALBERTSON, O. E. *Volatile acids by direct tritiation*. *Journal of Water Pollution C. Fed.* 33: 356-365, 1961.
- FRANZMANN, P. D. et al. *The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface*. *Biodegradation* 13:65-78, 2002.
- KOLMERT, A.; WIKSTRÖM, P.; HALLBERG, K.B. *A Fast And Simple Turbidimetric Method For The Determination Of Sulfate In Sulfate-Reducing Bacterial Cultures*. *Journal Of Microbiological Methods* 41: 179-184, 2000.
- KUDO, Y. et al. *Methanogen Flora of Paddy Soils in Japan*. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 39-48, 1997.
- MORAES, E. M. et al. *A gas chromatographic determination approach for total volatile acids in effluents of anaerobic reactors treating liquid and*

*solid wastes*. Proceedings of the VI Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion 2: 235-238, 2000.

MUYZER, G. et al. *Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments*. Archives of Microbiology, 164: 165-72, 1995.

MUYZER, G. et al. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Of Pcr-Amplified 16s rDNA – A New Molecular Approach To Analyze The Genetic Diversity Of Mixed Microbial Communities*. Molecular Microbial Ecology Manual 3.4.4.: p. 1-23, 1996.

NAKAGAWA, T. et al. *Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulphate-reducing consortium*. Water Research 36: 2813–2823, 2002.

NATION, J. L. *A new method using hexamethyl-disilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy*. Stain Technology 58: 347-351, 1983.

NIELSEN, T. A. et al. *Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor*. Applied Environmental Microbiology 65: 1251-1258, 1999.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. *Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes*. Journal of Water Pollution C. Fed. 58 (5): 406-465, 1986.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTE WATER. 19th edition. American Public Health Association/ American Water Association/ Water Environment Federation, Washington, DC, USA, 1995.

TOUZEL, J.P. & ALBAGNAC, G. *Isolation and characterization of Methanococcus mazei strain MC3*. FEMS Microbiology Letters, 16: 241-245, 1983.

ZAIAT, M. *Desenvolvimento do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias*. Tese de Doutorado, EESC-USP. 156p., 1996.

ZINDER, S.H. et al. *Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester. Methanotherrix sp. As an important acetoclastic methanogen*. Applied And Environmental Microbiology 47: 796-807, 1984.

WIDDEL, F. & BAK, F. *Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria*. Capítulo 183, The prokaryotes – Second Edition. Springer-Verlag New York Inc., 1992.

---

---

#### Endereço para correspondência:

**Eduardo Bosco Mattos Cattony**  
**Centro Federal de Educação**  
**Tecnológica do Ceará**  
**Gerência da Construção Civil**  
**LABIOSAN - Laboratório de**  
**Bioremediação e Saneamento**  
**Av. Treze de Maio, 2081 - Benfica**  
**60040-531 Fortaleza - CE - Brasil**  
**Tel: (85) 3307-3720**  
**Email: ebmcattony@gmail.com**