

# REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:  
Investigación, desarrollo y práctica.

## AVALIAÇÃO DA RIQUEZA BACTERIANA PRESENTE EM DIFERENTES INÓCULO UTILIZADOS NA DEGRADAÇÃO DE SURFACTANTE ANIÔNICO

\*Amanda Prandini<sup>1</sup>  
Mônica Aparecida Almeida<sup>1</sup>  
Dagoberto Yukio Okada<sup>2</sup>  
Isabel Kimiko Sakamoto<sup>2</sup>  
Marianne Akemi Neroni Chogi<sup>1</sup>  
Pierre Ferreira do Prado<sup>1</sup>  
Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa<sup>3</sup>  
Iolanda Cristina Silveira Duarte<sup>1</sup>

*DEGRADATION OF ANIONIC SURFACTANTS WITH  
DIFFERENT INOCULA: EFFECT OF THE ADDITION OF CO-  
SUBSTRATES AND ELECTRON ACCEPTORS*

*Recibido el 25 de julio de 2014; Aceptado el 25 de marzo de 2015*

### Abstract

The synthetic surfactants are widely used in various domestic and industrial cleaning products and due to this it can be found in different wastewater. The degradation of these compounds by chemical processes may occur, but the biological degradation is currently considered a promising option. The aim of this paper was to evaluate the potential of different inocula and nutritional conditions for the biological degradation of anionic surfactants (AS). The inoculants were extracted from activated sludge treating domestic sewage, anaerobic sludge upflow sludge blanket (UASB) used to treat chicken slaughterhouse, cattle dung, soil and commercial septic tank sludge. The degradation of SA was assessed using different co-substrates and final electron acceptors. The experiments were performed in vials reactors facultative conditions. The experiment lasted 10 days, where they were monitored pH, dissolved and adsorbed. It was observed that the inocula had different behaviors with respect to degradation in the presence of AS co-substrates and electron acceptors through PCR / DGGE technique. The inoculum from commercial garden soil showed the largest AS degradation efficiencies at all the nutritional conditions, and the best performances obtained was using sucrose and yeast extract (77.0 and 73.1%, respectively), as these results co-substrates that signal to an optimization option.

**Keywords:** linear alkylbenzene sulphonate, inocula, methylene blue, PCR/DGGE, soil.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de São Carlos, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Química Ambiental, Instituto Federal do Ceará, Brasil

\* Autor correspondiente: Departamento de Biologia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia João Leme dos Santos, Km 110, CEP:18052-780, Sorocaba, SP, Brasil. Email: [amanda.prandini@hotmail.com](mailto:amanda.prandini@hotmail.com)

## Resumo

Os surfactantes sintéticos são amplamente utilizados em diferentes produtos de limpeza doméstica e industrial e devido a isto podem ser encontrados em diferentes águas residuárias. A degradação desses compostos pode ocorrer por processos químicos porém a degradação biológica é considerada atualmente uma opção promissora. O objetivo deste artigo foi avaliar o potencial de diferentes inóculos e condições nutricionais na degradação biológica de surfactantes aniônicos (SA). Os inóculos testados foram: lodo ativado tratando esgoto sanitário, lodo de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) usado no tratamento de abatedouro de frango, fezes bovinas, solo comercial e lodo de fossa séptica. Foram avaliadas a degradação de SA sem e com adição de cossustratos e sem e com aceptores finais de elétrons. Os experimentos foram realizados em frascos-reactores em condições facultativas. O experimento teve duração de 10 dias, onde foram monitorados pH, SA dissolvido e adsorvido. Foi observado que os inóculos tiveram comportamentos diferentes em relação à degradação de SA na presença de cossustratos e aceptores de elétrons por meio da técnica de PCR/DGGE. O inóculo proveniente de solo comercial de jardim foi o que apresentou maiores eficiências de degradação de SA para todas as condições nutricionais avaliadas, e as melhores eficiências obtidas foi utilizando sacarose e extrato de levedura (77.0 e 73.1%, respectivamente), como cossustratos resultados estes que sinalizam para uma opção de otimização.

**Palavras-chaves:** alquilbenzeno linear sulfonado, azul de metileno, inóculo, PCR/DGGE, solo.

## Introdução

O surfactante sintético mais utilizado mundialmente é o alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), considerado um surfactante aniônico cujas propriedades da superfície ativa são formadas por grupos sulfonados aniônicos hidrofílicos e cadeias alquílicas hidrofóbicas ligadas a um anel aromático (Becagli *et al.*, 2011). Este comportamento anfifílico propicia a formação de diferentes estruturas coloidais, micelas, cristais líquidos liotrópicos e vesículas, as quais são responsáveis pela capacidade de limpeza do surfactante (Penteado *et al.*, 2006).

A degradação deste composto vem sendo reportada sob condições aeróbias e anaeróbias em diversos trabalhos. A degradação anaeróbia utilizando co-substrato em condições mesofílicas foi estudada por Sanz *et al.* (2003) e Duarte *et al.* (2010a) em reatores UASB e reator anaeróbio de batelada sequencial, com concentrações do LAS adicionadas de 4-5 mg/L e 25 mg/L, respectivamente. O primeiro trabalho utilizou uma mistura de cossustratos, constituído por acetato, propionato, butirato, lactato, metanol, etanol e sacarose e o inóculo foi lodo granular de reator UASB usado no tratamento de águas de usinas de açúcar, enquanto que o segundo estudo optou por extrato de levedura, amido e sacarose, utilizando como inóculo lodo de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura. Em ambos os trabalhos foi constatado que a retirada dos cossustratos aumentou a degradação de LAS, apresentando aumentos de eficiências de 64% para 85% (Sanz *et al.*, 2003) e 34% para 53% (Duarte *et al.*, 2010a). Duarte *et al.* (2008) utilizou como inóculo lodo de reator UASB usado no tratamento de esgoto sanitário, em seu reator anaeróbio de leito fixo. Foi observado que a adição de *extrato* de levedura proporcionou um aumento da remoção de LAS de 20% para 37%.

O lodo de reator UASB usado no tratamento de efluente de abatedouro de aves foi utilizado para degradação de LAS em condições mesofílicas e anaeróbias por Delforno *et al.* (2012) e Okada *et al.* (2013), fazendo uso de reator EGSB e reator UASB, respectivamente. Ambos autores observaram que quanto maior o tempo de detenção hidráulica do reator (32 e 80 horas, respectivamente), maior a capacidade de remoção do surfactante do sistema e, que a adição de cossustratos em baixas concentrações pode influenciar positivamente o processo.

Maiores eficiências de degradação de LAS foram obtidas em reator anaeróbio de leiteo fluidizado sob condições mesofílicas e concentração inicial de 20 mg/L (Oliveira *et al.*, 2010) O inóculo escolhido para este estudo foi lodo de reator UASB proveniente do tratamento de efluente de suinocultura, acrescido de substrato sintético (extrato de levedura, sacarose, bicarbonato de sódio e solução salina). Os autores constataram que adição de cossustratos, favoreceu o processo de degradação anaeróbia de LAS, visto que, em virtude de um consumo mais rápido do substrato, a molécula de LAS tornou-se a única fonte de carbono biodisponível para a comunidade microbiana.

Em relação à temperatura Lobner *et al.* (2005) estudaram os efeitos das condições de mesofílica e termofílica no processo de biodegradação anaeróbia de LAS (10 mg/L) em reatores UASB utilizando uma mistura de inóculos: lodo granular de indústria de laticínios e lodo estação de tratamento de esgoto. Os autores constataram que em temperaturas mais altas ( $\pm 55^{\circ}\text{C}$ ), foi maior a degradação de LAS de 51%, enquanto que em temperaturas mais baixas ( $\pm 37^{\circ}\text{C}$ ), a degradação foi de 13%. Além disto, os autores observaram que a concentração de cossustratos, no caso, a glicose, pode reduzir o processo de remoção do surfactante.

Além das configurações de reatores, a origem dos inóculos é considerada um diferencial na realização de novos estudos que busquem favorecer melhores eficiências de degradação de surfactantes, visto que, os inóculos apresentam grande diversidade de micro-organismos, a qual está diretamente relacionada à remoção deste composto. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes inóculos na degradação de surfactante aniônico em condições nutricionais diversas, bem como, analisar a riqueza bacteriana envolvida no processo.

## Material e Métodos

### Reagente químico

Utilizou-se neste estudo LAS comercial, dodecilbenzeno sulfonado de sódio (Sigma), grau técnico, com peso molecular de 348.48 g/mol e pureza de 80% como padrão para surfactante aniônico.

### Métodos analíticos

Para determinação de SA adsorvido nos inóculos avaliados foi utilizado o protocolo de extração utilizando metanol e banho de ultrassom (Duarte *et al.*, 2006). O método de MBAS (Jurado *et al.*, 2006) foi aplicado para quantificação de SA dissolvido e adsorbido durante a realização dos experimentos.

### Inóculos

Os inóculos avaliados quanto ao potencial de degradação de AS foram: 1) biomassa de lodo ativado tratando esgoto doméstico; 2) lodo anaeróbio de reator UASB usado no tratamento de abatedouro de frango; 3) fezes bovinas; 4) solo comercial para jardim e; 5) lodo anaeróbio de fossa séptica. Os inóculos foram caracterizados pela riqueza da comunidade microbiana (PCR/DGGE), concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (STV) (APHA, 2005) e SA adsorvido.

### Montagem dos reatores

O experimento foi realizado em frascos-reatores com volume total de 500 mL. A fim de promover maior eficiência a degradação de SA, cada inóculo foi submetido a cinco diferentes condições nutricionais (triplicata):

- I. LAS (25 mg/L) como única fonte de carbono (Duarte *et al.*, 2010a; Oliveira *et al.*, 2010);
- II. LAS (25 mg/L) mais extrato de levedura (500 mg/L), por ser essencial aos microorganismos nos processos fermentativos (Oliveira *et al.*, 2010);
- III. LAS (25 mg/L) mais nitrato de potássio (200 mg/L) como acceptor final de elétrons (Almendariz *et al.*, 2001);
- IV. LAS (25 mg/L) mais sulfato de magnésio (100 mg/L) como acceptor final de elétrons;
- V. LAS (25 mg/L) mais sacarose (80 mg/L) como fonte adicional de carbono (Oliveira *et al.*, 2010).

O volume reacional foi de 400 mL sendo utilizado 10 g STV/L de cada inóculo e completado com meio de cultura Angelidaki (Angelidaki *et al.*, 1990), acrescido de solução de vitaminas (Wolin *et al.*, 1963). Após a montagem, os reatores foram fechados com tampa de butila e incubados a 30°C com agitação de 150 rpm. O tempo de duração dos ensaios foi de 10 dias. Amostras foram retiradas com auxílio de água e seringa para não abrir o reator, pH e SA adsorvido e dissolvido foram analisados a cada 48 horas.

### Análises moleculares

As análises moleculares foram realizadas com as amostras obtidas na caracterização inicial dos inóculos e com as amostras referentes às cinco melhores eficiências de degradação de SA para cada condição nutricional testada. Sendo assim, as extrações de DNA foram realizadas através

do kit *Power Soil DNA Isolation (MO BIO)*, o qual é utilizado para extrações específicas de amostras ambientais definidas pelo fabricante, sendo, em seguida, purificadas pelo *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare)* de acordo com o fabricante.

Para as análises de DGGE, fragmentos do gene 16S RNAr foram amplificados através da reação de polimerização em cadeia (PCR), fazendo uso de *primers* específicos para o Domínio *Bacteria*, sendo estes 968f-GC e 1401r (Nübel *et al.*, 1996). Os produtos de PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (massa/volume) em TAE 1X (Tris acetato de EDTA), com gradiente linear de desnaturante (uréia e formamida) variando de 45% a 65%. A electroforese foi realizada em voltagem constante de 75 V a temperatura constante de 60°C para o período de 16 h. A imagem do perfil de DGGE foi adquirida por um Instrumento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) equipado com iluminação UV. A comparação dos padrões de bandas de DGGE, confeccionado pelo método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*), foi realizada usando o coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do programa *Bionumerics* (versão 2.5).

Índices de diversidade de Shannon-Wiener (H) foram calculados conforme as intensidades das bandas nas pistas de gel, tal como avaliado pela altura do pico nas curvas densitométricas, de acordo com a equação  $H = - \sum (P_i \ln(P_i))$ , em que H é o índice de diversidade,  $P_i$  é a importância da probabilidade das bandas em uma pista,  $n_i$  é a altura de um pico individual e,  $N$  a soma de todas as alturas de pico na curva densitométrica.

## Resultados e discussões

### Caracterização do inóculos

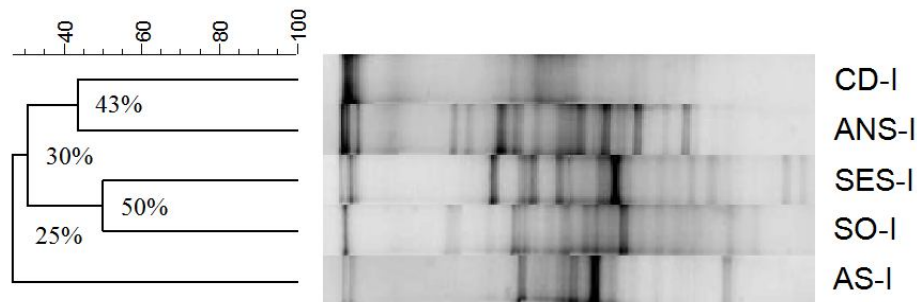
O inóculo com maior concentração de sólidos foi o solo comercial com 530.8 mgST/L e 148.5 mgSTV/L e o inóculo com menor concentração de sólidos foi o lodo de lodo ativado com 17.5 mgST/L e 13.6 mgSTV/L (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização inicial dos inóculos

INÓCULOS	ST (mg/L)	STV (mg/L)	SA adsorvido (mg/g)
Lodo ativado tratando esgoto doméstico	17.5	13.6	17.9
Lodo anaeróbio de reator UASB	103.0	80.7	12.3
Fezes bovinas	57.3	43.1	4.7
Solo comercial	530.8	148.5	1.1
Lodo de fossa séptica	157.9	86.0	98.4

A exposição prévia aos surfactantes aniônicos foi constatada nos inóculos lodo ativado (17.9 mg/g), lodo anaeróbico de reator UASB (12.3 mg/g) e com destaque para o lodo de fossa séptica (98.4 mg/g). Diferentemente dos outros dois inóculos, o lodo de fossa séptica é proveniente de um processo “estático” de tratamento do esgoto doméstico, o que explicaria sua elevada concentração de SA.

A estrutura da comunidade microbiana mostrou-se bastante diversificada com relação às amostras iniciais de cada inóculo (Figura 1). As populações de bactérias que apresentaram maior coeficiente de similaridade (50%) foram as da fossa séptica e do solo. Foi observado também que a amostra que apresentou elevada porcentagem de dissimilaridade (75%) foi o inóculo lodo ativado tratando esgoto doméstico, o qual foi coletado diretamente de um tanque de aeração, diferentemente dos outros inóculos estudados (anaeróbios e sem aeração forçada).



**Figura 1.** Dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard a partir do padrão de bandas do DGGE. Amostras iniciais de cada inóculo. CD-I: fezes bovinas; ANS-I: lodo de frango; SES-I: lodo de fossa séptica; SO-I: solo; AS-I: lodo ativado

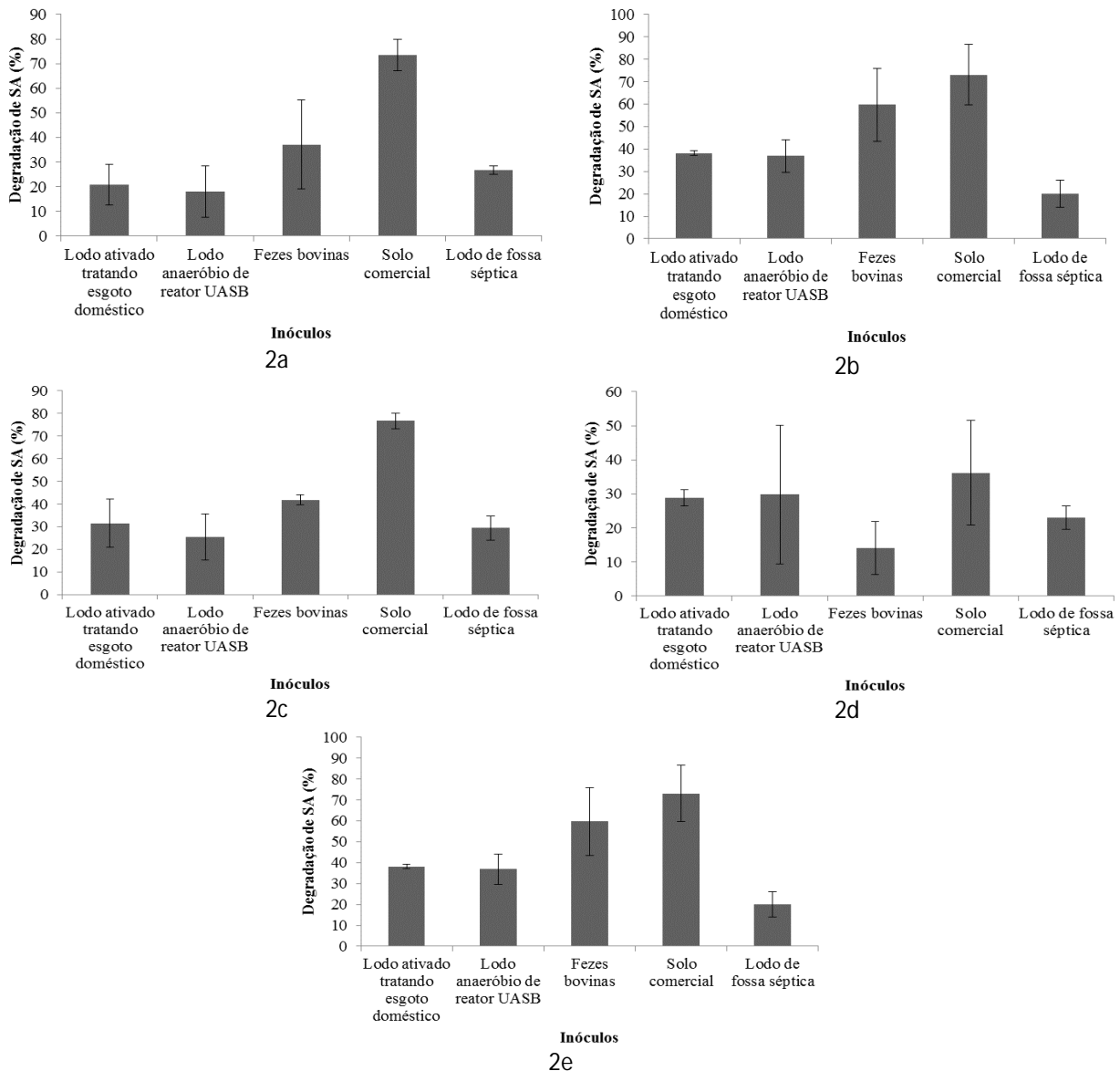
Por meio do índice de diversidade de Shannon (H) verificou-se que o inóculo solo apresentou maior diversidade de espécies (2.92), sendo seguido pelo lodo de fossa séptica (2.85), biomassa de lodo ativado (2.57), lodo de frango (2.44) e por último, fezes bovinas (2.37).

### Degradação de SA nas diferentes condições nutricionais.

#### **LAS como fonte única de carbono**

A primeira condição estudada propõe que a comunidade microbiana consuma o LAS mais rapidamente e em maior quantidade, visto que este seria a única fonte de carbono biodisponível (Oliveira *et al.*, 2010). Sendo assim, vários outros autores tais como Mogensen *et al.* (2003), Sanz *et al.* (2003) e Duarte *et al.* (2010b) também fizeram testes com o objetivo de

avaliarem a melhor condição nutricional para que a remoção do surfactante fosse mais eficaz. No presente trabalho, verificou-se que ambos os inóculos utilizados foram capazes de degradar surfactantes sem adição de cossubstratos, no entanto, as eficiências mostraram-se bastante diversificadas (Figura 2a).



**Figura 2.** Eficiências de degradação (%) de SA para as diferentes condições nutricionais. (a) LAS como única fonte de carbono, (b) cossubstratos (extrato de levedura), (c) cossubstratos (sacarose), (d) acceptor final de elétron ( $KNO_3$ ), (e) acceptor final de elétron ( $MgSO_4$ )

O inóculo lodo ativado foi escolhido devido a sua prévia exposição ao LAS na ETE, ao tratar o esgoto doméstico, e por ser empregado em diversos estudos relacionados com a degradação de LAS (González *et al.*, 2007; Mungray & Kumar 2008; Duarte *et al.*, 2008). Devido à essas características, era esperado um melhor resultado com relação a eficiência de degradação de SA, pois a microbiota encontrada no lodo já estaria adaptada a presença desse xenobiótico. Contudo, tal resultado não foi detectado, verificando-se eficiência de degradação de SA de 20.9%, o que foi constatado também no trabalho de Rittmann *et al.* (2001). Este comportamento pode ser explicado devido ao fato da amostra de lodo ativado ser submetida a condições anaeróbias, diferentemente das condições aeróbias na ETE onde foi coletado. Ou seja, a diminuição da concentração de oxigênio pode ter se tornado fator limitante da degradação de AS para este inóculo.

A eficiência de degradação do composto que mais se destacou corresponde ao inóculo solo, com 73.4%, sendo seguida pelo inóculo fezes bovinas, com 37.1% (Figura 2a). Sendo assim, com exceção do inóculo solo, a condição de LAS como única fonte de carbono, resultou em potencial baixo de degradação do composto para os demais inóculos, conforme também demonstrado pelos dados da velocidade aparente ( $k_{obs}$ ) de consumo de SA, destacando-se novamente os inóculos solo e fezes bovinas, com os maiores  $k_{obs}$ , de  $0.0036 \text{ d}^{-1}$  ( $R^2: 0.7944$ ) e de  $0.0025 \text{ d}^{-1}$  ( $R^2: 0.6730$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de  $K_{obs}$ , de acordo com a equação de primeira ordem encontrada para os diferentes tipos de inóculo sem adição de cossubstratos, com LAS, como única fonte de carbono

INÓCULOS	$k_{obs} \text{ (d}^{-1}\text{)}; R^2$
Lodo ativado tratando esgoto doméstico	0.0010; 0.9082
Lodo anaeróbio de reator UASB	0.0009; 0.7111
Fezes bovinas	0.0025; 0.6730
Solo comercial	0.0036; 0.7944
Lodo de fossa séptica	0.0011; 0.5779

### Cossubstratos

Para o cossubstrato extrato de levedura, as eficiências de degradação de AS foram maiores para o inóculo solo (73.1%) (Figura 2b), o qual apresentou velocidade aparente de remoção ( $k_{obs}$ ) de  $0.0049 \text{ d}^{-1}$  ( $R^2: 0.8264$ ). Quando comparado com o experimento somente com LAS (Figura 2a), o extrato de levedura contribuiu para aumento da eficiência de degradação, tendo-se registrado, nesta condição de ausência de cossubstrato, eficiência de remoção de 57% e  $k_{obs}$  de  $0.0036 \text{ d}^{-1}$  ( $R^2: 0.7944$ ) para o inóculo solo. Esta velocidade foi inferior à alcançada pelo uso de extrato de levedura no mesmo tipo de inóculo, o que foi justificado pelo fato do extrato ser composto rico em vitaminas do complexo B que estimulam o crescimento bacteriano, sendo ainda fonte



biológica natural de nitrogênio e micronutrientes, muito utilizado em processos fermentativos (Duarte *et al.*, 2008).

Oliveira *et al.* (2010) constataram que a adição de cossustrato sintético, constituído de extrato de levedura (500 mg/L), sacarose (80 mg/L), bicarbonato de sódio (400 mg/L) e solução salina, resultaram em aumento da remoção de LAS do sistema (81 a 99%). Comparando-se com o presente trabalho, no qual foi usada a mesma concentração de extrato de levedura, observou-se que os percentuais alcançados por Oliveira *et al.* (2010) foram superiores. No entanto, é importante frisar que aqueles autores adicionaram, em conjunto com o extrato de levedura, outras fontes de carbono para constituir o substrato, o que pode ter proporcionado melhores resultados de remoção do composto.

Na Tabela 3 são apresentados os valores de  $k_{obs}$ , segundo equação de primeira ordem, encontrados para os diferentes tipos de inóculo quando da adição dos cossustratos extrato de levedura e sacarose. Verificou-se que o inóculo solo alcançou  $k_{obs}$  ligeiramente superior quando do uso da sacarose em relação ao extrato de levedura, cerca de 1.16 vezes maior que o  $k_{obs}$  obtido com a adição de extrato. Porém, o emprego do extrato de levedura como cossustrato resultou no alcance de maiores  $k_{obs}$  para a maioria dos inóculos testados em comparação com os valores registrados pela adição de sacarose, mostrando que o extrato de levedura, em termos gerais, foi o cossustrato mais eficiente.

**Tabela 3.** Valores de  $K_{obs}$  de acordo com a equação de primeira ordem encontrada para os diferentes tipos de inóculo com adição de extrato de levedura e sacarose como co-substratos

INÓCULOS	$k_{obs} (d^{-1}); R^2$	
	Extrato de Levedura	Sacarose
Lodo ativado tratando esgoto doméstico	0.0017; 0.8157	0.0016; 0.9106
Lodo anaeróbio de reator UASB	0.0020; 0.9260	0.0015; 0.8192
Fezes bovinas	0.0035; 0.6339	0.0026; 0.7825
Solo comercial	0.0049; 0.8264	0.0057; 0.9144
Lodo de fossa séptica	0.0010; 0.8905	0.0013; 0.8582

No entanto a sacarose é um açúcar de fácil assimilação pelos micro-organismos e já foi utilizado na degradação de surfactantes em inúmeros trabalhos (Sanz *et al.*, 2003; Lobner *et al.*, 2005; Abboud *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2010a; Duarte *et al.*, 2010b; Oliveira *et al.*, 2010) com o objetivo de fornecer uma fonte extra de carbono as comunidades microbianas envolvidas no processo e, sendo assim, favorecer o desenvolvimento das mesmas. O inóculo que apresentou maior eficiência de degradação de SA foi o solo (77%), seguido por fezes bovinas (41.9%) e, lodo ativado tratando esgoto doméstico (31.5%) (Figura 2c).

Sanz *et al.* (2003) trabalharam com a degradação anaeróbia de LAS (4 – 5 mg/L) em reatores UASB, utilizando como inóculo lodo granular de usina de açúcar. Foram montados dois reatores sob condições mesofílicas (30°C) e um deles foi alimentado com uma mistura de cossustratos (acetato, propionato, butirato, lactato, metanol, etanol e sacarose). Verificou-se que a ausência de cossustratos aumentou a eficiência de degradação de LAS de 65% para 85%. Comparando-se com os resultados encontrados no presente trabalho, pode-se indicar que a adição de sacarose aos inóculos lodo ativado, lodo anaeróbio de reator UASB e lodo de fossa séptica, não favoreceu o desenvolvimento da comunidade microbiana presente, a qual seria responsável por degradar a molécula de LAS, resultando em baixas eficiências de remoção do composto.

#### Aceptores finais de elétrons

A adição de nitrato de potássio comoceptor final de elétrons favorece o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes e está presente no meio aquático, em águas residuárias e em águas de abastecimento. Bactérias desnitrificantes já foram relatadas na literatura como sendo responsáveis pela degradação de diferentes compostos aromáticos (Gusmão *et al.*, 2007). Constatou-se que as eficiências de degradação de SA foram diferentes. No entanto, verificou-se que o melhor consórcio microbiano no consumo do surfactante foi o solo (36.2%), seguido pelo lodo anaeróbio de reator UASB (29.8%) e lodo ativado tratando esgoto doméstico (28.9%) (Figura 2d) quando do uso de nitrato de potássio.

Abboud *et al.* (2007) isolaram bactérias anaeróbias facultativas, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pantoea agglomerans* de águas residuárias. Estas foram inoculadas em meio nutriente, a temperatura de 30°C, pH 8.5 e agitação de 250 rpm. O consórcio microbiano conseguiu remover 60% do surfactante, tendo a molécula do mesmo, como única fonte de carbono. Com a adição de cossustratos tais como caseína, extrato de levedura e triptona, e fontes de nitrogênio nitrato de amônio, cloreto de amônio, a remoção de LAS aumentou de 60 para 90 a 100%, demonstrando a importância de fontes extras de carbono e nitrogênio na melhora da eficiência de degradação do composto. O mesmo não ocorreu no presente trabalho, visto que, as eficiências de degradação do LAS foram inferiores para todos os inóculos testados com adição de KNO<sub>3</sub>.

Ao estimar a velocidade aparente ( $k_{obs}$ ), os inóculos solo e lodo proveniente do UASB foram os que apresentaram os maiores valores, conforme mostrado na Tabela 4, sendo que  $k_{obs}$  do solo foi 1.32 vezes superior ao valor registrado para o lodo de UASB para a condição em que foi empregado o nitrato de potássio. Quando o solo recebeu adição de sulfato de magnésio, o solo apresentou  $k_{obs}$  3 vezes superior ao valor encontrado para o inóculo lodo de UASB, nesta mesma condição, indicando que dentre os aceptores adicionados, o sulfato de magnésio foi o mais eficiente em termos gerais.

**Tabela 4.** Valores de  $K_{obs}$  de acordo com a equação de primeira ordem encontrada para os diferentes tipos de inóculo com adição de  $KNO_3$  e  $MgSO_4$  como aceptores de elétrons

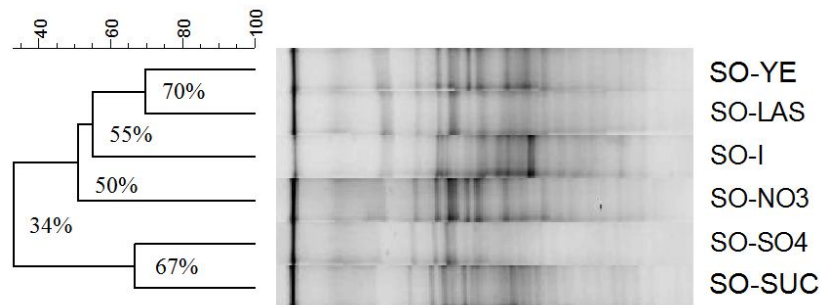
INÓCULOS	$k_{obs} (d^{-1}); R^2$	
	$KNO_3$	$MgSO_4$
Lodo ativado tratando esgoto doméstico	0.0012; 0.9109	0.0016; 0.9106
Lodo anaeróbio de reator UASB	0.0019; 0.8362	0.0019; 0.6343
Fezes bovinas	0.0008; 0.6324	0.0011; 0.7145
Solo comercial	0.0025; 0.8804	0.0033; 0.9420
Lodo de fossa séptica	0.0008; 0.5096	0.0011; 0.9430

A adição do sulfato de magnésio foi escolhida para favorecer o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) as quais estariam relacionadas com a degradação da molécula de LAS (Denger & Cook, 1997). Verificou-se novamente que o inóculo solo obteve a melhor eficiência de degradação do surfactante, com valor de 47.4% (Figura 2e). Para os outros inóculos, as eficiências de degradação mantiveram-se entre 24% à 32% aproximadamente. Contudo, é importante salientar que na ausência de acceptor e tendo o LAS como fonte única de carbono o desempenho do inóculo solo foi melhor, tendo este desenvolvido  $k_{obs}$  de 1.44 vezes superior à condição em que o mesmo recebeu adição de sulfato de magnésio. Observou-se que o acceptor final de elétrons não atingiu as mesmas eficiências de degradação quando comparado com a adição de cossustratos.

#### Riqueza Microbiana

O inóculo solo destacou-se significativamente neste trabalho, visto que foram observados os melhores resultados com relação à eficiência de remoção de SA para todas as condições nutricionais testadas. Como visto anteriormente, este inóculo apresentou maior índice de diversidade de Shannon (2.92) com relação aos demais inóculos, o que pode ter influenciado significativamente seus resultados de eficiências de degradação do composto. No dendograma apresentado na Figura 3 são observadas as relações de similaridade que as amostras dos inóculos empregados possuem. Comparando-se com o padrão de bandas da amostra inicial do inóculo solo, grande parte das demais amostras (solo + condições nutricionais, sendo: adição de LAS como fonte de carbono, cossustratos e aceptores finais de elétrons) mantiveram bandas em posições semelhantes. No entanto, é possível verificar também que a adição de determinadas condições promoveu mais modificações na estrutura da comunidade microbiana do que outras, tendo como exemplo, as amostras do solo referentes às condições com sulfato e sacarose, as quais obtiveram coeficiente de similaridade de 34% com relação às demais.

As condições nutricionais com extrato de levedura e com LAS como única fonte de carbono mantiveram-se similares (55%) com a amostra inicial do inóculo solo do que com as amostras de solo com  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$  e sacarose. A eficiência de degradação de SA destas duas condições foram muito próximas, cerca de 73%, o que condiz com o coeficiente de similaridade entre as mesmas (70%).



**Figura 3.** Dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard a partir do padrão de bandas do DGGE. As amostras referem-se ao inóculo solo e suas diferentes condições nutricionais. SO-YE: solo + extrato de levedura (500 mg/L); SO-LAS: solo + LAS (25 mg/L); SO-I: inóculo solo (inicial); SO-NO<sub>3</sub>: solo + NO<sub>3</sub> (200 mg/L); SO-SO<sub>4</sub>: solo + SO<sub>4</sub> (100 g/L) SO-SUC: solo + sacarose (80 mg/L)

### Conclusões

As diferentes condições nutricionais promoveram resultados diversificados para cada inóculo testado e as fontes adicionais de carbono (cossustratos) demonstraram serem fundamentais para degradação do surfactante, visto que a condição nutricional com sacarose foi o que mais favoreceu o consumo do xenobiótico.

Constatou-se que as melhores eficiências de degradação de SA para todas as condições nutricionais foram referentes ao inóculo solo, o qual apresentou maior diversidade de espécies com base no índice de Shannon, sendo a de maior destaque, na presença de sacarose (76.7%). Resultados bastante significativos foram encontrados usando-se o inóculo fezes bovinas, sendo submetido às condições nutricionais de extrato de levedura e sacarose, obtendo 59.7% e 41.9%, respectivamente, demonstrando seu elevado potencial de degradação do composto.

O inóculo lodo de fossa séptica apresentou resultados semelhantes de eficiência de degradação de SA (entre 20 e 30%) para todas as condições nutricionais, demonstrando pouca influência destes durante o processo de remoção do xenobiótico. A elevada concentração inicial do surfactante neste inóculo (98.4 mg/g) pode ter inibido o processo de degradação anaeróbia do composto.

A prévia exposição dos inóculos ao LAS não demonstrou melhores eficiências de degradação quando comparados com os inóculos com baixa exposição ao LAS. Com destaque para o inóculo solo, o qual foi caracterizado inicialmente com menor concentração de SA.

A análise de DGGE referente à caracterização inicial dos inóculos mostrou que a semelhança entre as estruturas de suas comunidades microbianas foram pequenas (de 25% a 50%), sendo que a amostra de lodo ativado foi a que mais apresentou dissimilaridade com relação às demais, com coeficiente de 75%. A adição das condições nutricionais promoveu alterações na estrutura da comunidade microbiana para o inóculo solo, destacando-se as amostras referentes às condições com  $MgSO_4$  e sacarose, que apresentaram 34% de similaridade com a amostra inicial do inóculo e as demais condições. Não foi possível estabelecer um comportamento específico da estrutura da comunidade microbiana com relação aos inóculos e suas condições nutricionais.

### Agradecimentos

O presente estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). Os autores agradecem a bolsa recebida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### Referências bibliográficas

- Abboud, M.M., Khleifat, K.M., Batarseh, M., Tarawneh, K.A., Al-Mustafa, A., Al-Madadhah, M. (2007) Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzenesulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pantoea agglomerans*, *Enzyme and Microbial Technology*, **41**(4), 432-439.
- Almendariz, F.J., Meraz, M., Soberon, G., Monroy, O. (2001) Degradation of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugmented with a *Pseudomonas aeruginosa* (M113) strain, *Water Science and Technology*, **44**(4), 183-188.
- Angelidaki, I., Petersen, S.P., Ahring, B.K. (1990) Effects of lipids on thermophilic anaerobic-digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite, *Applied Microbiology Biotechnology*, **33**, 469-472.
- APHA, AWWA, WPCF (2005) *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC.
- Bae, H., Rash, B.A., Rainey, F.A., Nobre, M.F., Tiago, I., Costa, M.S., Moe, W.M. (2007) Description of *Azospira restricta* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from groundwater, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**(7), 1521-1526.
- Becagli, S., Ghedini, C., Peeters, S., Rottiers, R., Traversi, R., Udisti, R., Chiari, M., Jalba, A., Despiou, S., Dayan, U., Temara, A. (2011) MBAS (methylene blue active substances) and LAS (linear alkylbenzene sulphonates) in mediterranean coastal aerosols: sources and transport processes, *Atmospheric Environment*, **45**, 6788-801.
- Delforno, T.P., Okada, D.Y., Polizel, J., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A. (2012) Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. *Bioresource Technology*, **107**, 103-109.

- Denger, K., Cook, A.M. (1997) Assimilation of sulfur from alkyl- and arylsulfonates by *Clostridium spp.*, *Archives of Microbiology*, **167**, 177-181.
- Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Buzzini, A.P., Adorno, M.A.T., Varesche, M.B.A. (2006) Development of a method by HPLC to determine LAS and its application in anaerobic reactors, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **17**, 1360-1367.
- Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Mayor, M.S., Okada, D.Y., Varesche, M.B.A. (2010a) Degradation of detergent (linear alkylbenzene sulfonate) in an anaerobic stirred sequencing-batch reactor containing granular biomass., *International Biodeterioration & Biodegradation*, **64**(2), 129-134.
- Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Saavedra, N.K.D., Fantinatti-Garboggini, F., Menezes, C.B.A., Oliveira, V.M., Varesche, M.B.A. (2010b) Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in a horizontal anaerobic immobilized biomass reactor, *Bioresource Technology*, **101**, 606-612.
- Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Saavedra, N.K.D., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.M., Varesche, M.B.A. (2008) Evaluation of the microbial diversity in a horizontal flow anaerobic immobilized biomass reactor treating linear alkylbenzene sulfonate, *Biodegradation*, **19**(3), 375-385.
- González, S., Petrovic, M., Barceló, D. (2007) Advanced liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods applied to wastewater removal and the fate of surfactants in the environment, *Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 116-124.
- Gusmão, V.R., Chinalia, F.B., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A. (2007) Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period, *Journal of Hazardous Materials*, **139**, 301-309.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2006) Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: Applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening tests, *Chemosphere*, **65**(2), 278-285.
- Lobner, T., Toräng, L., Batstone, D.J., Schmidt, J.E., Agelidaki, I. (2005) Effects of process stability on anaerobic biodegradation of LAS in UASB reactors, *Biotechnology and Bioengineering*, **89**, 759-765.
- Mogensen, A.S., Haagensen, F., Ahring, B.K. (2003) Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**(4), 706-711.
- Mungray, A.K., Kumar, P. (2008) Anionic surfactants in treated sewage and sludges: risk assessment to aquatic and terrestrial environments, *Bioresource Technology*, **99**(8), 2919-2929.
- Nevin, K.P., Holmes, D.E., Woodard, T.L., Covalla, S.F., Lovley, D.R. (2007) Reclassification of trichlorobacter thiogenes as geobacter thiogenes comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 463-466.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis, *Journal of Bacteriology*, **178**(19), 5636-5643.
- Okada, D.Y., Delforno, T.P., Esteves, A.S., Sakamoto, I.K., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A. (2013) Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate, *Bioresource Technology*, **128**(January), 125-133.
- Oliveira, L.L., Costa, R.B., Duarte, I.C.S., Silva, E.L., Varesche, M.B.A. (2010) Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials, *Bioresource Technology*, **101**(14), 5112-5122.
- Pentado, J.C.P., Seoud, O.A.E., Carvalho, L.R.F. (2006) Linear alkylbenzene sulfonates: chemistry, environmental impact and analysis, *Química Nova*, **29**(5), 1038-1046.

- Rittmann, B.E., Tularak, P., Lee, K.C., Federle, T.W., Itrich, N.R., Kaiser, S.K., Shi J., Mcavoy, D.C. (2001) How adaptation and mass transfer control the biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by activated sludge, *Biodegradation*, **12**(1), 31-37.
- Sanz, J.L., Culubret, E., Ferrer, J., Moreno, A., Berna, J.L. (2003) Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge Blanket (UASB) reactors, *Biodegradation*, **14**(1), 57-64.
- Wollin, E.A., Wollin, M.J., Wolfe, R.S. (1963) Formation of methane by bacterial extracts, *Journal of Biological Chemistry*, **238**, 2882-2886.
- Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Sekiguchi, Y. (2007) *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum *Chloroflexi* isolated from methanogenic propionate-degrading consortia, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57** (Pt 10), 2299-2306.