

DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE FENOL EM REATORES EM BATELADA SOB CONDIÇÕES FERMENTATIVAS

Sandra Imaculada Maintinguer^{*1}, Isabel Kimiko Sakamoto¹, Iolanda Cristina Silveira Duarte², Edson Luiz Silva³, Carlos Dias Maciel⁴, Maria Bernadete Amâncio Varesche¹

1- Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Avenida Trabalhador Sãcarlense, 400, São Carlos-SP.

2- Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba.

3 -Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos.

4 -Departamento de Engenharia Elétrica, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

*E-mail: mainting2008@gmail.com

Recebido em 05 de setembro de 2008

Aceito em 01 de dezembro de 2008

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a potencialidade do inóculo na degradação de fenol sob diferentes condições nutricionais. Os reatores foram alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura, mantidos a $30 \pm 1^\circ \text{C}$, sob agitação 150 rpm. Os reatores alimentados com fenol (240 mg L⁻¹) e extrato de levedura obtiveram 100% de eficiência de degradação em 11 dias. Os reatores alimentados com fenol (234 mg L⁻¹), sulfato (162,5 mg L⁻¹) e extrato de levedura; e fenol (256 mg L⁻¹), sulfato (500 mg L⁻¹) e extrato de levedura obtiveram eficiências de degradação de respectivamente 98,8% e 99,3%, em 17 dias. Tais ganhos foram obtidos devido às adições de extrato de levedura no início dos experimentos. As análises de Biologia Molecular confirmaram que as bactérias presentes no inóculo permaneceram nos reatores, apesar de terem sido operados sob condições nutricionais distintas. Essas condições propiciaram a permanência de populações bacterianas capazes de degradar fenol sob condições fermentativas e consumir sulfato.

Palavras-chave: microrganismos anaeróbios, fenol, extrato de levedura, BRS.

1 Introdução

Compostos fenólicos e seus derivados podem estar presentes no ambiente como intermediários da biodegradação de polímeros naturais como lignina e taninos. O fenol está presente em águas residuárias provenientes de minas de carvão, refinarias de petróleo, preservação de madeira e indústrias químicas; além de ser utilizado no preparo de antioxidantes, herbicidas, adesivos, solventes e resinas sintéticas [1, 2]. O limite permissível de fenol em efluentes industriais é de 1,0 mg L⁻¹ e níveis superiores são tóxicos à vida aquática, ocasionando desequilíbrio ecológico no corpo receptor [3].

A degradação de fenol é processo complexo envolvendo seqüência de reações enzimáticas que ocorrem em função do estabelecimento de relações sintróficas entre diferentes grupos de microrganismos. Em ambientes anaeróbios, esses grupos podem ser exemplificados por bactérias desnitrificantes, bactérias redutoras de ferro, bactérias redutoras de sulfato, consórcios fermentativos e metanogênicos [4]. Zhou e Fang [1] descreveram que em ambientes reduzidos é necessária atuação de diferentes microrganismos para que o fenol seja primeiramente degradado por bactérias acidogênicas, em benzoato, posteriormente convertidos

em acetato por bactérias acetogênicas e, finalmente, em metano pelas arqueias metanogênicas.

A eficiência na degradação de fenol, através da utilização de reatores biológicos anaeróbios, tem sido confirmada por diversos autores como Bolaños *et al.* [5] e Sarfaraz *et al.* [6] em condições mesofílicas e por Fang *et al.* [2] em condições termofílicas. No entanto, a participação das bactérias redutoras de sulfato (BRS) na degradação de fenol, ainda, foi pouco estudada [7].

O sulfato é encontrado em abundância em sedimentos marinhos e mais da metade do carbono disponível nesses ambientes pode ser metabolizado utilizando-o como aceptor de elétrons. Bactérias redutoras de sulfato (BRS) têm importante atividade metabólica em diversos ambientes reduzidos como sedimentos marinhos, lodo anaeróbio e aquífero contaminado por hidrocarbonetos de petróleo (benzeno, tolueno, etil-benzeno, xileno, alcanos) e compostos halogenados. Levantamento de 38 aquíferos contaminados revelou que bactérias redutoras de sulfato foram responsáveis por 70% da atenuação dos hidrocarbonetos de petróleo [8]. Ácidos orgânicos derivados da fermentação servem como fonte de carbono para as BRS em sedimentos marinhos. Culturas isoladas de BRS como *Desulfovibrio* sp. foram aptas em degradar fenol a acetato [9].

Um passo importante na degradação de compostos aromáticos é a escolha do inóculo com diversidade de bactérias capaz de transformá-lo em produtos intermediários. Boopathy [9] verificou que a utilização do inóculo de

suinocultura foi o passo inicial para degradação de fenóis. Sob tais condições, as BRS metabolizaram fenol a ácido acético e arqueias metanogênicas converteram acetato a metano.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a degradação de fenol em condições fermentativas, com adições de sulfato e extrato de levedura. O inóculo usado foi uma mistura de três lodos anaeróbios: a) proveniente de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura, b) lodo de reator UASB usado no tratamento de efluente de abatedouro de aves e c) lodo de abatedouro de aves enriquecido com BRS. A biomassa presente nos ensaios foi caracterizada através de técnicas de Biologia Molecular como a reação de polimerização em cadeia (PCR) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos do RNA ribossomal 16s para Domínios *Archaea*, *Bacteria* e Grupo das bactérias redutoras de sulfato (BRS).

2 Material e Métodos

2.1 Sistema em batelada anaeróbia

Duplicatas de reatores foram montadas em batelada, em frascos de 2000 mL com volume reacional de 1300 mL e 700 mL de *headspace*, em atmosfera de N₂ (100%), mantidas sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 30±1°C.

O inóculo perfazia 20% do volume total de reação, na seguinte composição: 50% de lodo proveniente de reator UASB usado no tratamento de resíduos de suinocultura, 25% de lodo de reator UASB usado no tratamento de abatedouro de aves e 25% de lodo de reator UASB usado no tratamento de abatedouro de aves enriquecido com BRS.

A seguinte composição do meio de cultura descrito por Balch e Wolfe [10] foi adicionada (60 mL em cada reator) para favorecer o crescimento de BRS: KCl (155,4 mg L⁻¹), NH₄Cl (201,4 mg L⁻¹), CaCl₂ (45,14 mg L⁻¹), K₂HPO₄ (243,6 mg L⁻¹), KH₂PO₄ (189 mg L⁻¹), NaCl (34,8 mg L⁻¹), MgCl₂ (9,4 mg L⁻¹), pH 6,8. Foram utilizados sais minerais, vitaminas e metais traços descritos a seguir. As soluções de vitaminas adicionadas (13 mL em cada reator) foram compostas por: biotina (2,0 mg L⁻¹), ácido fólico (2,0 mg L⁻¹), piridoxina-HCl (10,0 mg L⁻¹), tiamina-HCl.2H₂O (5 mg L⁻¹), riboflavina (5,0 mg L⁻¹), ácido nicotínico (5,0 mg L⁻¹), D-pantotenato de cálcio (5 mg L⁻¹), Vitamina B₁₂ (0,1 mg L⁻¹), ácido p-aminobenzóico (5,0 mg L⁻¹), ácido lipóico (5,0 mg L⁻¹), de acordo com Widdel e Pfennig [11]. A solução de metais traços adicionada (13 mL em cada reator) foi utilizada com a seguinte composição: HCl (25%), FeCl₂.4H₂O (1,5 mL), ZnCl₂ (70 mg L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (100 mg L⁻¹), H₃BO₃ (6,0 mg L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (24,0 mg L⁻¹), CuCl₂.2H₂O (2,0 mg L⁻¹), NiCl₂.6H₂O (24,0 mg L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (36 mg L⁻¹), de acordo com Widdel e Pfennig [11]). Os reatores foram suplementados com 0,05% de extrato de levedura, por ser essencial aos microrganismos nos processos fermentativos da degradação do fenol.

Os reatores anaeróbios foram submetidos a cinco ensaios distintos: (I) fenol (240 mg L⁻¹); (II) fenol (234 mg L⁻¹) e sulfato (162,5 mg L⁻¹); (III) fenol (256 mg L⁻¹) e sulfato (500 mg L⁻¹); (IV) reatores controle alimentados sem fenol, mas com sulfato (200 mg L⁻¹) e; (V) sulfato (170 mg L⁻¹) e sem extrato de levedura.

2.2 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas

2.2.1 Determinação de metano

Foram feitas determinações das concentrações de metano por cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo a gás, Gow-Mac série 150. A coluna utilizada foi Porapak-Q (comprimento de 2 metros e diâmetro interno de ¼" - 80 a 100 mesh), detector de condutividade térmica. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio super seco (White Martins), e o integrador HP 3396 série II. As condições de operação dos aparelhos foram: vazão do gás de arraste de 60 mL min⁻¹; temperatura do detector, coluna e injetor, 55°C; corrente 150 mA; volume de injeção de 500 µL. Os reatores foram despressurizados antes das análises. Os valores foram expressos em mg L⁻¹.

2.2.2 Determinação de fenol

A solução estoque de fenol (1 g.l⁻¹) preparada foi padronizada com adições da solução de KBrO₃ (2,78 g.l⁻¹) KBr (10 g.l⁻¹) e, em seguida, procedida titulação com K₂S₂O₈ (5%) e HCl (1N). A concentração da solução estoque de fenol foi obtida através da relação (1):

$$\text{mg L}^{-1} \text{ fenol} = 7,842 (\text{AB}-\text{C}) \quad (1)$$

A = mL de K₂S₂O₈ (5%) utilizado para branco (solução sem fenol)

B = mL de solução KBrO₃ (2,78 g L⁻¹) KBr (10 g L⁻¹) adicionado/10

C = mL de K₂S₂O₈ (5%) utilizado para titulação (solução com fenol)

O método colorimétrico da 4-amino-antipirina foi utilizado para determinação de fenol, de acordo com Standard Methods for Examination of Water and Wastewater [12].

2.2.3 Ácidos graxos voláteis

Os ácidos voláteis foram determinados através de cromatografia gasosa, no cromatógrafo HP 6890/FID de ionização de chama, com coluna HP INNOWAX, 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm de espessura do filme, com fluxo de hidrogênio como gás de arraste de 20 mL min⁻¹, com temperatura de 250°C, com volume de injeção de 10 µL, temperatura do forno de 100°C (3 minutos) a 180°C (5 minutos), 5°C/min, temperatura do detector de 300°C, com

fluxo de ar sintético de 300 mL min⁻¹, com fluxo de nitrogênio como gás auxiliar a 33 mL min⁻¹ e fluxo de hidrogênio a 30 mL min⁻¹ [14].

2.2.4 Determinação de Sólidos

As determinações de sólidos totais voláteis (STV) foram efetuadas no início e final dos ensaios, de acordo com metodologia descrita pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater [12].

2.2.5 Determinação de sulfato

A determinação das concentrações de sulfato foi efetuada de acordo com Standard Methods for Examination of Water and Wastewater [12].

2.3 Análises de Biologia Molecular

2.3.1 Extração de ácidos nucleicos, amplificação do fragmento do gene RNAr 16S e análise de DGGE

As análises da diversidade microbiana foram efetuadas através de reação de polimerização em cadeia (PCR) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). O DNA foi extraído segundo protocolo descrito por Griffiths *et al.* [14]. Na amplificação dos fragmentos do DNA, foi utilizado o set de primers para o Domínio *Bacteria*: 968F (5' - AACGCGAAGAACCTTAC - 3'), junto com o GC clamp (5' - CGC CCG CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG - 3') e 1392 R (5' - AACG GGC GGT GTG TAC - 3') descritos por Nilsen *et al.* [15]. Para o Domínio *Archaea* foi utilizado o set de primers 1100F (5' - AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG - 3'), junto com o GC clamp e 1400 R (5' - CGC CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC - 3') descritos por Kudo *et al.* [16]. Para o Grupo das BRS, o set de primers usado foi 341F (5' - CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3'), junto com o GC clamp e 907 R (5' - CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT - 3') descritos por Nakagawa *et al.* [17]. Os produtos do PCR foram utilizados para a separação dos fragmentos de DNA de mesmo tamanho na metodologia do DGGE [19]. A amplificação dos fragmentos do gene RNAr 16S para as análises de PCR foi programada de acordo com os primers usados, sendo para o Domínio *Archaea*, protocolo descrito por Kudo *et al.* [16]., Domínio *Bacteria*, de acordo com Nilsen *et al.* [15] e para o Grupo das BRS por Nakagawa *et al.* [17].

A solução do gel de gradiente desnaturante foi utilizada nas seguintes concentrações: 35% e 55% para o Domínio *Archaea*; 30% e 60% para o Domínio *Bactéria* e Grupo BRS. O aparelho utilizado para a leitura dos padrões de bandas obtidas no DGGE foi o Eagle Eye TMIII (Stratagen) sob exposição de a 254 nm UV, acoplado ao computador e software Eagle Sight. O controle positivo para o Domínio *Archaea* foram culturas DSM 668 - HS - *Halobacterium salinarum* e ATCC

43241 - *Methanosarcina barkeri*. Para o Domínio *Bacteria* - *Pseudomonas sp* e DMS 183 - *Allochromatium vinosum* e; para o Grupo BRS ATCC 23193 - *Desulfotomaculum ruminis*.

2.3.1.1 Densidade relativa das bandas

A avaliação das bandas foi feita considerando-se a sua presença ou ausência. Para a medida de distância entre as bandas dos diferentes ensaios (canaletas) foi adotado o método Jaccard e dendograma UPMGA de acordo com Graur e Li [19].

2.4 Estatística dos dados experimentais

Foi aplicado o programa BioEstat 3.0, com objetivo de comparar os resultados obtidos nos diferentes ensaios. Os cálculos realizados e o tratamento estatístico foram feitos por meio do Microsoft Excel 2000. Os testes de hipótese utilizados foram Kruskal-Wallis, Anova - um critério e t-Student.

3 Resultados e discussão

Ensaio preliminares foram realizados (dados não apresentados), com reatores anaeróbios com diversas concentrações de fenol e sulfato. Nesses ensaios o lodo anaeróbio utilizado foi enriquecido com substratos orgânicos previamente sem fenol, com objetivo de propiciar aumento da biomassa e diversidade de bactérias capaz de consumir o composto aromático. Os reatores foram montados nas proporções de 1,5 mols de fenol/mol de sulfato. Nesses ensaios, onde a única fonte de carbono foi fenol, a degradação foi muito lenta, justificando assim, a adição de extrato de levedura nos ensaios seguintes. No entanto, não foi detectada a presença de sulfeto. Provavelmente, esse composto foi produzido e, instantaneamente consumido pelo consórcio microbiano presente. Tal hipótese justificou a não efetivação dessa análise nos ensaios posteriores.

A Tabela 1 sumariza os resultados obtidos no ensaio de degradação para os cinco ensaios estudados. A Figura 1 apresenta o comportamento dos reatores para o consumo de fenol e sulfato. Os reatores do ensaio I (fenol 240 mg L⁻¹) obtiveram 100% de remoção em 11 dias. Aos três dias do início do ensaio a remoção de fenol foi de aproximadamente 5%. Com sete dias a concentração de fenol foi de 90 mg L⁻¹, o que representou degradação de 62%. A produção de metano ocorreu após 24 horas com concentrações de 146 mg L⁻¹, aos 50 dias foi de 400 mg L⁻¹ e aos 59 dias a concentração de metano foi de 300 mg L⁻¹, apresentando estabilidade do sistema. Mesmo sem fenol como fonte de carbono, pois este foi degradado em 11 dias, ácidos orgânicos gerados no processo de degradação ou endogenia fez com que houvesse ainda liberação de metano no headspace do reator.

Os reatores dos ensaios II (fenol 234 mg L⁻¹ e sulfato 162,5 mg L⁻¹) e; ensaio III (fenol 256 mg L⁻¹ e sulfato 500 mg L⁻¹) tiveram remoções de fenol de 100% e 99%

respectivamente, aos 17 dias de operação. As concentrações de metano, após 24 horas, foram de 127,7 mg L⁻¹ e 157,7 mg L⁻¹ e aos 57 dias foi de 333,8 mg L⁻¹ e 316 mg L⁻¹ para as condições II e III, respectivamente e estabilização do sistema ocorreu aos 59 dias. Ambas os ensaios realizados (II e III) apresentaram comportamento semelhante quanto a geração de metano, quando comparado com a condição I, onde somente fenol foi adicionado. No entanto, a presença de sulfato retardou a degradação do fenol em 6 dias quando comparada com o ensaio I (somente fenol).

O fato dos reatores dos ensaios I, II, III terem sido operados em condições nutricionais distintas não houve diferenças significativas na eficiência de degradação do fenol. Esse fato foi confirmado com a aplicação do teste de hipótese ANOVA, com nível de significância de 5%, obtendo-se p = 0,9096. Os reatores foram considerados estatisticamente iguais. Ressalta-se que a degradação final foi semelhante, mas deve-se levar em consideração a duração da degradação do fenol, que foi mais rápida na ausência de sulfato. Isso demonstra o potencial do sulfato em inibir o processo fermentativo dos microrganismos presentes nos reatores.

Tabela 1. Remoção de fenol, sulfato e geração de metano nos reatores

Condição	Reatores			Remoção (%)		Produção CH ₄ (mg L ⁻¹)	
	Fenol	Sulfato	Ext.Lev.	Fenol	Sulfato	Após 1 dia	Final
	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(%)				
1	240	-	0,05	100 (11dias)	-	146	300,0 (59 dias)
2	234	162,5	0,05	100 (17dias)	98,8 (24 dias)	127,7	290,5 (59 dias)
3	256	500	0,05	99,3 (17dias)	100 (50 dias)	157,5	289,6 (59 dias)
4	-	200	0,05	-	100 (13 dias)	43,6	203,3 (30 dias)
5	-	170	-	-	100 (14 dias)	160,2	273,9 (57 dias)

Nos ensaios controle, IV (sulfato- 200 mg L⁻¹e extrato de levedura - 0,05%) e V (somente sulfato -170 mg L⁻¹), apresentaram redução do sulfato completamente em 13 e 14 dias, respectivamente. Após 24 horas, as concentrações de metano foram de 160,2 mg L⁻¹ e 43,6 mg L⁻¹, respectivamente. Essa diferença nas concentrações de metano, pode ser atribuída a presença de extrato de levedura que proporciona maior quantidade carbono disponível para a fermentação e geração de metano. A adição de extrato de levedura favoreceu o crescimento de bactérias fermentativas e por sua vez, proporcionou melhores condições à metanogênese. A estabilização na produção de metano, ocorreu aos 30 dias com 203,3 mg/l para o ensaio IV e aos 57 dias para ensaio V com 273,9 mg L⁻¹. A redução do sulfato ocorreu mesmo sem as fontes orgânicas adicionadas. Esse processo pode ter ocorrido devido: (1) presença de ácidos orgânicos provenientes do

inóculo; (2) decomposição celular com liberação de ácidos orgânicos e; (3) metabolismo microbiano endógeno.

Ensaio preliminares foram realizados com fenol (470 mg/L) como única fonte de carbono e sulfato (283 mg L⁻¹). Entretanto, até 94 dias de operação apenas 12% de fenol e 25% de sulfato foram consumidos. Tal fato justificou a adição do extrato de levedura nos experimentos realizados. A adição de extrato de levedura, no início dos ensaios, pareceu ser o fator acelerador na degradação do fenol. A rica composição do extrato de levedura em aminoácidos essenciais, além de excelente fonte de nitrogênio e carbono [20], justificou o aumento das concentrações de metano mesmo após o consumo do fenol. Barkovskii *et al.* [21] verificaram que o fenol não foi degradado sem a adição de extrato de levedura; o que confirmou sua importância na biodegradação anaeróbia.

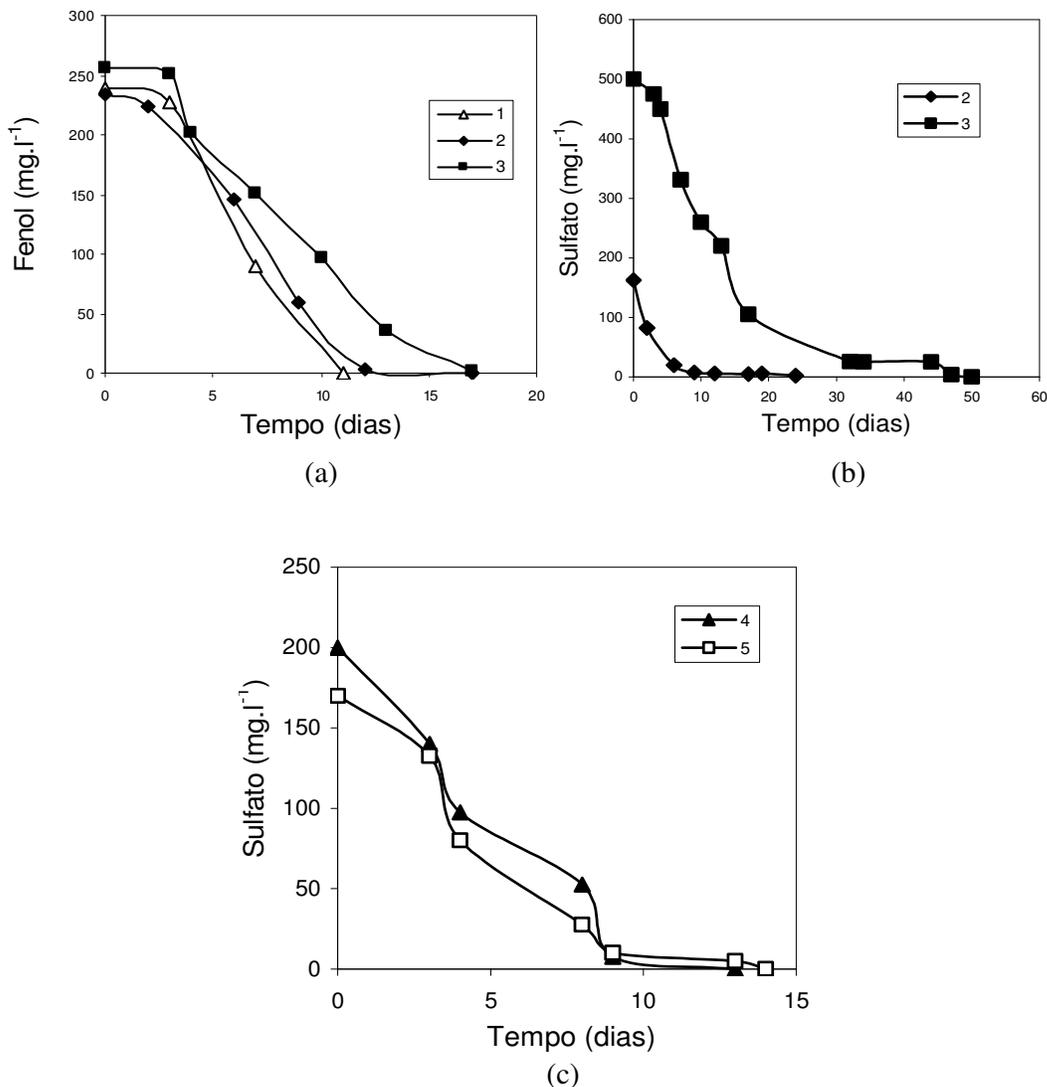
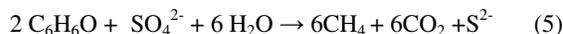
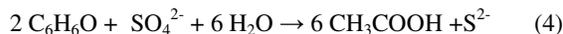
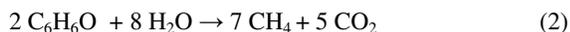


Fig. 1 - Variação temporal da concentração de (a) fenol; (b) sulfato; nos reatores em batelada para os ensaios : I (fenol - 240 mg L⁻¹); II (fenol - 234 mg L⁻¹ e sulfato - 162,5 mg L⁻¹); III (fenol - 256 mg L⁻¹ e sulfato - 500 mg L⁻¹) e; (c) sulfato, nos reatores controle dos ensaios IV (sulfato - 200 mg L⁻¹) e V (sulfato - 170 mg L⁻¹ sem extrato de levedura).

As determinações de sólidos totais voláteis para os reatores dos ensaios I, II, III, IV e V não apresentaram diferenças significativas entre o início e final dos ensaios (menores de 10%) não sendo possível inferir sobre variação da concentração de biomassa microbiana.

O modelo de degradação de fenol via fermentação anaeróbia pode ser expresso pelas equações (2) com transformação a metano e monóxido de carbono ou (3) a ácido acético e metano. Com adição de sulfato a degradação anaeróbia de fenol pode ser expressa pelas equações (4) com transformação a ácido acético e sulfeto ou, (5) a metano e sulfeto, como descrito a seguir:



Em todos os ensaios de degradação realizados, a concentração de ácidos orgânicos esteve abaixo do limite de detecção do método (acético 5,13 mg L⁻¹, propiônico 13,46 mg L⁻¹, isobutírico 14,91 mg L⁻¹, butírico 25,45 mg L⁻¹, isovalérico 7,90 mg L⁻¹, valérico 12,46 mg L⁻¹, capríco 6,63 mg L⁻¹). Resultados similares foram observados por Bolaños *et al.* [5] e Fang *et al.* [2] na degradação de fenol utilizando Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) e reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), Esse

fato pode indicar que o fenol foi removido e não convertido em produtos intermediários [5], de acordo com as equações (2) e (5) ou; provavelmente, vários ácidos foram produzidos; como descrito nas equações (3) e (4), e serviram como fonte de carbono para os microrganismos metanogênicos [22], e, instantaneamente, consumidos nesses reatores, não sendo possível sua detecção.

Morfologias semelhantes à *Methanosaeta* e *Methanosarcina* além de bacilos fluorescentes, semelhantes a *Methanobacterium* foram observados em microscopia óptica em todas os ensaios (I, II, III, IV e V),

conforme ilustrado na Figura 2. Porém, para que as etapas da degradação do fenol em ácidos voláteis fossem detectadas seria necessária adição de inibidores da atividade metanogênica como ácido bromo-etano-sulfônico (BES) [9 e 23]. Segundo Karlsson *et al.* [23], as presenças de microrganismos metanogênicos ou homoacetogênicos, contribuíram para a degradação do fenol, pois utilizaram os ácidos orgânicos formados durante esse processo.

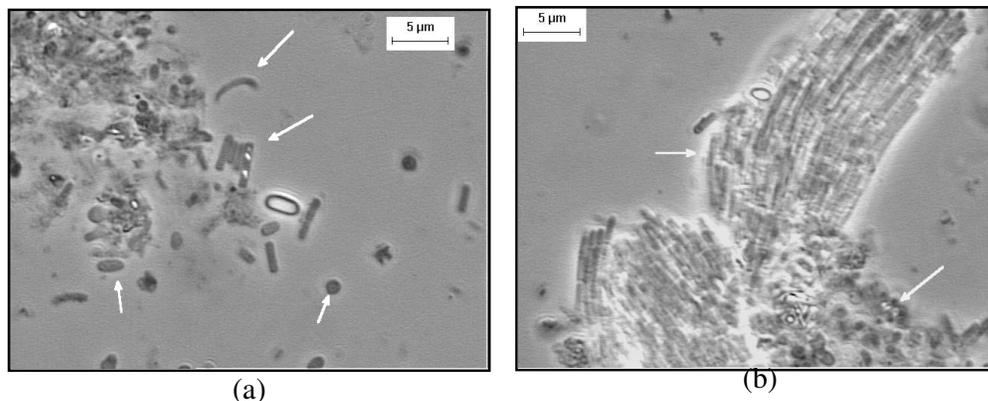


Fig. 2 - Morfologias observadas através de microscopia de contraste de fase de amostras de reatores alimentados com fenol, sulfato e extrato de levedura: (a) bacilos curvos, morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp, cocos e bacilos, (b) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. e cocos.

A Figura 3 ilustra a dissimilaridade do perfil das bandas de DGGE para o Domínio *Bacteria* e grupo BRS. As diferenças foram evidenciadas em relação ao inóculo e as condições impostas no experimento.

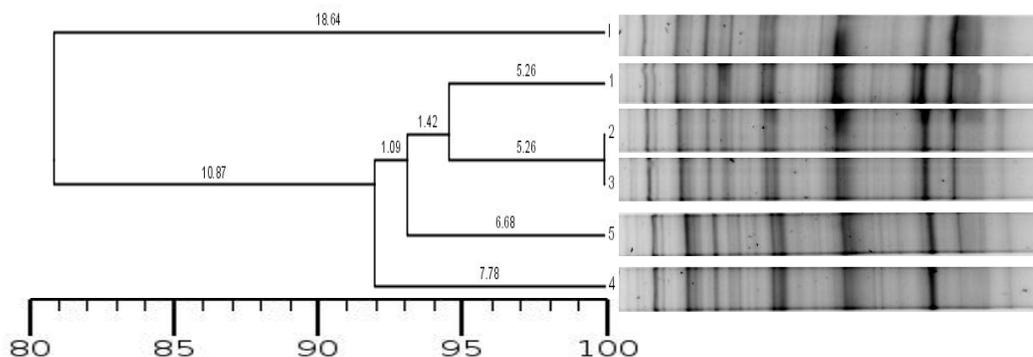
Para o Domínio *Bacteria* as populações microbianas do inóculo (I) apresentaram-se 19% diferentes em relação às populações que foram favorecidas nos ensaios (canaletas 1, 2, 3, 4 e 5). Os reatores dos ensaios II e III onde as concentrações de fenol foram de 234 e 256 mg L⁻¹ e sulfato de 162,5 e 500 mg L⁻¹, respectivamente, não apresentaram diferenças significativas na estrutura da comunidade microbiana. Nesse caso pode-se afirmar que as populações microbianas permaneceram nos reatores apesar das diferentes concentrações de sulfato. Esse fato pode ser explicado através do comportamento do consumo de fenol nesses reatores. Para o ensaio I obteve-se consumo total de fenol com 11 dias de operação; como não havia sulfato nesse reator, admitiu-se que o fenol foi consumido por populações fermentativas. Nos ensaios II e III foram obtidos consumos do fenol na mesma porcentagem que o ensaio I, porém em 17 dias. Nesse caso o fenol também foi consumido pelas bactérias

fermentativas, pois a redução do sulfato ocorreu muitos dias após a degradação total do fenol, levando 24 e 50 dias nos ensaios II e III, respectivamente.

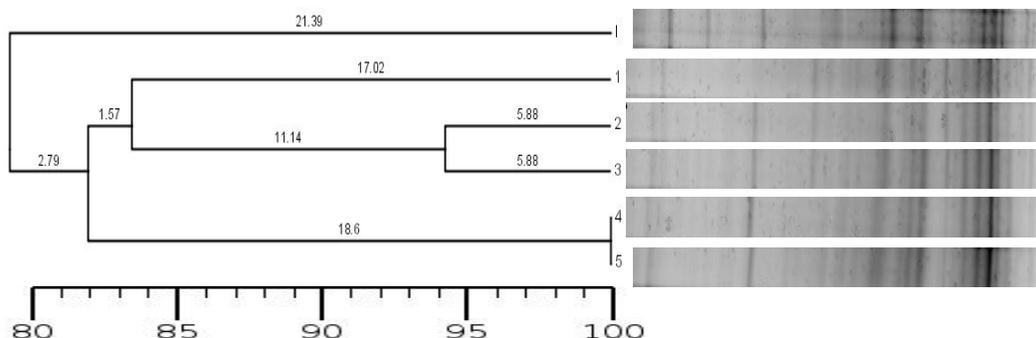
Para o grupo das BRS as populações microbianas do inóculo (canaleta I) apresentaram-se 21,4% diferentes em relação às populações favorecidas de acordo com as condições impostas nos ensaios (canaletas 1, 2, 3, 4 e 5). Os reatores dos ensaios (IV) e (V) não apresentaram diferenças entre as populações microbianas. Esse fato foi confirmado também pelo consumo total do sulfato que foram muito próximos (13 e 14 dias), conforme Tabela 1.

As condições impostas nos ensaios foram adequadas para manutenção das populações de bactérias advindas do inóculo. As diferenças entre as populações tanto para o Domínio *Bacteria* quanto para o grupo BRS foram próximos de 20%, em relação ao inóculo, confirmando os resultados dos testes estatísticos aplicados aos resultados.

O inóculo anaeróbio misto apresentou potencial em degradar fenol em condições fermentativas, no entanto a degradação sulfetogênica do fenol não pode ser constatada.



Domínio Bacteria



Grupo BRS

Fig. 3 - Análises dos dendogramas de bandas do DGGE do Domínio Bacteria e Grupo das BRS: (I) inóculo; (1) (fenol - 240 mg L⁻¹); (2) (fenol - 234 mg L⁻¹ e sulfato 162,5 mg L⁻¹); (3) (fenol - 256 mg L⁻¹ e sulfato 500 mg L⁻¹); (4) (sulfato - 200 mg L⁻¹); (5) (sulfato - 170 mg L⁻¹, sem extrato de levedura).

A diversidade microbiana presente no inóculo foi mantida nos diversos reatores. Esse fato pode ter sido decorrente da composição do meio nutricional e também ao tempo de operação dos reatores, uma vez que o fenol foi degradado antes dos primeiros 20 dias de operação. As condições nutricionais impostas propiciaram a permanência de populações microbianas capazes de fermentar fenol, no entanto a degradação do fenol não ocorreu concomitante à redução do sulfato.

Para o Domínio Archaea foi observada homogeneidade na estrutura das populações das comunidades microbianas dos diferentes ensaios. Ou seja; os resultados de perfis de DGGE apresentaram populações 100% semelhantes entre o inóculo e as condições impostas pelo experimento. As populações microbianas advindas do inóculo permaneceram nos reatores alimentados com fenol; sulfato e nos reatores controles com sulfato (ensaio IV) e somente sulfato (ensaio V). Essa comprovação foi evidenciada nas

análises de microscopia óptica onde ocorreram presenças de morfologias semelhantes à *Methanosaeta* sp. e *Methaosarcina* sp, além de bacilos fluorescentes em todos reatores. A presença de tais arqueias foi justificada; uma vez que esses microrganismos utilizam compostos intermediários da degradação anaeróbia.

A técnica de PCR/DGGE confirmou que, não houve variação significativa das populações microbianas e estas foram capazes de degradar fenol. Desse modo, a diversidade microbiana do inóculo continha bactérias fermentativas, BRS, além de arqueias metanogênicas. Mesmo constatado a presença de BRS, a degradação do fenol foi devido a processos fermentativos. Alguns pesquisadores atribuíram a degradação do fenol pelas BRS: Boopathy [9] isolou bactéria redutora de sulfato de inóculo de suinocultura e esse microrganismo foi capaz de degradar fenol a ácido acético na presença de sulfato. Knight *et al.* [24] conseguiram degradar fenol com consórcio microbiano sob condições sulfetogênicas. Kleikemper *et al.* [22] verificaram que não houve alteração no



perfil do DGGE entre as populações de microrganismos redutores de sulfato originados de aquífero contaminado por hidrocarbonetos de petróleo.

4 Conclusão

A degradação de fenol ocorreu nos reatores por processos fermentativos.

As concentrações de fenol utilizadas neste trabalho não foram tóxicas para as populações do Domínio *Archaea*, *Bacteria* e grupo BRS.

Apesar da presença de BRS na biomassa dos reatores, a degradação do fenol não foi por via sulfetogênica, uma vez que a redução do sulfato ocorreu muito depois de todo fenol adicionado ter sido degradado.

As análises do DGGE confirmaram que as populações microbianas presentes no inóculo permaneceram nos reatores sob as condições nutricionais distintas, em todo período dos experimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a Fapesp pelo suporte financeiro recebido.

PHENOL ANAEROBIC DEGRADATION IN BATCH REACTORS ON DIFFERENT NUTRITIONAL CONDITIONS

ABSTRACT: The goal of this research was to assess phenol degradation on different nutritional conditions. The reactors were carried out in a batch fed with phenol, sulfate and yeast extract, at $30 \pm 1^\circ\text{C}$, under 150 rpm agitation. The reactors fed with phenol (240 mg L^{-1}) and yeast extract obtained 100% degradation efficiency in 11 days. The reactors fed with phenol (234 mg L^{-1}), sulfate (162.5 mg L^{-1}) and yeast extract; and phenol (256 mg L^{-1}), sulfate (500 mg L^{-1}) and yeast extract obtained degradation efficiency of 98.8% and 99.3%, respectively, in 17 days. Such efficiencies were obtained by the addition of yeast extract in the reactors, in the beginning of the essays. The analysis of Molecular Biology had confirmed that the present bacterial community in inoculum remained in the reactors, although to have been operated under distinct nutritional conditions. These conditions had propitiated the permanence of bacterial populations capable to degrade phenol; to leaven phenol and to use sulfate as acceptor electron end.

Keywords: microorganisms anaerobics, phenol, yeast of extract, RSB.

REFERÊNCIAS

[1] ZHOU, G. M.; FANG, H. *Biores. Tech.*, vol. 61, p.47-52, **1997**.

[2] FANG, H. H. P.; LIANG, D. W.; ZANG, T.; LIU, Y. *Wat. Sci. Tech.*, vol. 40, p.427-434, **2006**.

[3] SATSANGEE, R.; GHOSH, P. *Appl. Microbiol. Biotech.*, vol. 34, p. 127-130, **1990**.

[4] HEIDER, J.; FUCHS, G. *Anaerobe*. Vol. 3, p.1-22, **1997**.

[5] BOLÃNOS, R. M. L.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Wat. Sci. Tech.*, vol. 44, p.167-174, **2001**.

[6] SARFARAZ, S.; THOMAS, S.; TEWARI, U. K.; IYENGAR, L. *Wat. Res.*, vol. 38, p.965-961, **2004**.

[7] SCHIE, P. M.; YOUNG, L. Y. *Bioremediation J.*, vol. 4, p.1-18, **2000**.

[8] SOMSAMAK, P.; COWAN, R. M.; HÄGGBLÖM, M. M. *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 37, p. 249-264, **2001**.

[9] BOOPATHY, R. *Biores. Tech.*, vol. 54, p.29-33, **1995**.

[10] BALCH, W. E.; WOLFE, R. S. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 32, p.781-791, **1976**.

[11] WIDDEL, F.; PFENNIG, N. Dissimilatory sulfate or sulphur reducing bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. N.R Krieg e J.G. Holt (eds), vol. 1, p.663-679, **1984**.

[12] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed.. American Public Health Association. Washington, DC, **2005**.

[13] MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Determinação de Ácidos Voláteis por Cromatografia Gasosa em Efluentes de Reatores Anaeróbios Tratando Resíduos Líquidos e Sólidos In: VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, 2000, Recife - PE. Anais: VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia. Recife - PE. Ed. Universitária - UFPE, 2000. vol. 2, p.235 - 238, **2000**.

[14] GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, p.5488-5491, **2000**.

[15] NIELSEN, A. T.; LIU, W. T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D.A. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, p.1251-1258, **1999**.

[16] KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H.. *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 22, p.39-48, **1997**.

[17] NAKAGAWA, T.; SATO S.; YAMAMOTO, Y.; FUKUI, F. *Wat. Res.*, vol. 36, p.2813-2823, **2002**.

[18] MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, G. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, p.695-700, **1993**.

[19] GRAUR & LI. *Fundamentals of Molecular Evolution 2nd Edition*. Ed. Sinauer, **2004**.

[20] SOLOMONS, G. L. *Materials and Methods in Fermentation*. Academic Press. London and New York. Library of Congress Catalog Card number: 76-107933. Standard Book Number: 12-654450-6, **1969**.

[21] BARKOVSKII, A. L.; KOSHUNOVA, V. E.; POZDNYACOVA, L. I. *Appl. Soil Ecol.*, vol. 2, p.17-24, **1995**.



[22] KLEIKEMPER, J.; SCHROTH, M. H.; SIGLER, W. V.; SCHMUCKI, M.; BERNASCONI, S. M.; ZEYER, J. Appl. Environ. Microbiol., vol. 68, p.1516-1523, **2002**.

[24] KNIGHT, V.K.; KERKHOF, L.J.; HAGGBLOM, M.M. FEMS Microbiol. Ecol. vol. 29, p.137-147, **1999**.

[23] KARLSSON, A.; EILERTSSON, J.; SVENSSON, B. H.. Arch. Microbiol., vol. 173, p.398-402, **2000**.