

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Departamento de Hidráulica e Saneamento

GUNTHER BRUCHA

**Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do
pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos
do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo.**

São Carlos
2007

GUNTHER BRUCHA

**Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do
pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos
do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo.**

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

Área de Concentração: Hidráulica e
Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena
Vazoller

São Carlos
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

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

B887i Brucha, Gunther
Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na
degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade
microbiana dos sedimentos enriquecidos do Estuário de
Santos-São Vicente, Estado de São Paulo / Gunther Brucha
; orientadora Rosana Filomena Vazoller. -- São Carlos,
2007.


Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2007.


1. Tratamento de águas residuárias. 2. Desalogenação
reduativa do PCP. 2. Reator anaeróbio horizontal de leito
fixo. 3. Teoria dos recursos limitantes.
4. Biorremediação anaeróbia. 5. Estuário de Santos-São
Vicente. 6. Arquéias metanogênicas halofílicas.
I. Título.


FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **GUNTHER BRUCHA**


Tese defendida e julgada em 01/10/2007 perante a Comissão Julgadora:


 _____ APROVADO
 Prof.^a Dr.^a **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
 (Colaboradora – Instituto de Ciências Biomédicas/USP)


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


 _____ APROVADO
 Dr.^a **MÁRCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC**
 (Pós-Doutoranda/FAPESP)


 _____ APROVADO
 Prof.^a Dr.^a **VIVIAN HELENA PELLIZARI**
 (Instituto de Ciências Biomédicas/USP)


 _____ APROVADO
 Dr. **DACIO ROBERTO MATHEUS**
 (Instituto de Botânica)

 Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação
 em Engenharia (Hidráulica e Saneamento)

 Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
 Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

*Dedico este trabalho às mulheres de minha vida
Que me fizeram acreditar e lutar
ainda mais por um futuro melhor*

*À minha esposa Adriana
Às minhas filhas Clara e Luiza
Com todo amor*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Rosana Filomena Vazoller, pela orientação, amizade e compreensão das decisões tomadas. Pessoa iluminada, brilhante, amiga, acolhedora, que me inseriu no maravilhoso mundo dos microrganismos anaeróbios e sempre incentivou meu crescimento acadêmico profissional. Rô, muito obrigado por estes últimos 8 anos. Você teve influencia direta em minha formação pessoal e profissional. Terei você, sempre, como exemplo a ser seguido. Sua benção, Madrinha.

À Dra. Márcia Damianovic, pelo aceite na orientação e por estar sempre presente em todas as fases deste trabalho, contribuindo no delineamento de estratégias, na tomada de decisões e nas orientações durante a confecção de relatórios e da presente Tese. Agradeço também pela amizade, incentivo e por todo carinho.

À minha linda família, Adriana, Clara e Luiza, por tudo. Vocês são o motivo de todo meu esforço.

Aos meus Pais, Werner Brucha e Rose Marie Siciliani Brucha (*in memoriam*), por todo esforço e carinho dedicados à minha criação. Fica o pesar de não poder abraçá-los agora e compartilhar a alegria da tarefa cumprida.

Aos meus irmãos, Werner e Érika e cunhados, Silvia e Edmundo, pelo contínuo apoio e incentivo dados ao longo da realização deste trabalho e de todos os outros.

Aos meus sobrinhos João Victor e Pedro Henrique, pela nova vida que trouxeram a família.

À Roberto, Diva, Tatiana, Cris, Allan, Marcelo e minha sobrinha Camila, pelo acolhimento, paciência, ajuda e agradável convívio nos últimos 5 anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (proc. 03/07946-5).

A CAPES pela concessão de Bolsa de estudo durante os primeiros 6 meses deste doutorado.

À CETESB pela disponibilização de toda a logística e ao técnico Osvaldo pela ajuda na coleta do sedimento do Estuário de Santos –São Vicente.

Ao pesquisador Dr. Marcelo Bento, pela imprescindível ajuda e ensinamento na determinação da taxa de emissão de metano do sedimento.

Ao Prof. Dr. Eugênio Foresti, pelas contribuições durante as bancas de qualificação, pelo apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Maria Bernadete Varesche, pelas sugestões, conselhos, convívio e amizade durante estes últimos 8 anos.

Às queridas Beth Moraes, Janja e Eloisa pelos gratificantes momentos compartilhados e pela ajuda e ensinamento nas análises cromatográficas e microscópicas. Saudades...

Ao Prof. Dr. Fernando Lanças e ao técnico Guilherme Mota, pela possibilidade de uso do cromatógrafo gasoso, com espectrômetro de massa.

A todos os professores do Departamento de Hidráulica e Saneamento, pelo agradável convívio, em especial ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat e Profa. Dra. Maria do Carmo Calijuri, pelas orientações e conselhos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, em especial a Sandra, Cristine Barreto, Cristina Nakayama e Carol, pela disponibilidade de uso do DGGE e pela ajuda.

Ao Paulo, Júlio e Cidinha do Laboratório de Saneamento por estarem sempre dispostos a ajudar e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento Pavi, Sá, Flávia, André e Wagner pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Flavinha, Mércia e Lara, minhas irmãs, pela grande amizade, excelente convívio e ótimos momentos de descontração.

A todos os colegas do Departamento de Hidráulica e Saneamento, em especial do Laboratório de Processos Biológicos, com quem convivi nos últimos 8 anos, desde o mestrado, e que proporcionaram um ambiente saudável e gostoso de trabalhar. Não citarei nomes, para não cometer injustos esquecimentos. Muito Obrigado por tudo pessoal...

Aos Professores do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Rondônia, pelo apoio e compreensão nos últimos momentos desta tese.

A Johannes Janzen, Renata Aguiar e Leonardo Damasceno pelo essencial auxílio nas análises estatísticas e comparações de modelo de isoterma de adsorção.

Não poderia deixar de agradecer a todos os meus amigos de república e faculdade, em especial ao Guilherme, João Durval, Cendi, Jairo, Peninha, Grego, Bispo, Sorrizo, Zuba, Thais, Geli, Cris, Ana, Danilo, Samantha, Thiago, Heitor e Guinso, por toda a amizade.

Aos meus afilhados Helena e João Victor, com todo amor.

Aos Amigos de infância, Henrique, Zoner, Arthur, Tochinha e Serginho, que mesmo longe, pude sentir as boas vibrações enviadas. Aos ausentes Thiago e Milton, aonde quer que estiverem recebam meu forte abraço. SAUDADES.

À minha querida família, aos tios, tias, primos, primas.

À Sioni Maluf Barbieri (*in memoriam*), sempre. Por me inserir e incentivar ao mundo acadêmico. Serei sempre grato.

À DEUS, por ter me dado saúde e força para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO

Gunther

RESUMO

BRUCHA, G. (2007). Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana natural dos sedimentos do Estuário de Santos-São Vicente, Estado de São Paulo. Tese (doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

A pesquisa que ora se apresenta visou estabelecer as condições nutricionais adequadas para o uso do sedimento do estuário de Santos – São Vicente do Estado de São Paulo, como inóculo no Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) no processo de degradação anaeróbia do pentaclorofenol (PCP) em busca da aplicação da tecnologia em escala real, assim como identificar grupos microbianos envolvidos no processo. Para tanto, sedimento do estuário de Santos-São Vicente, com características metanogênicas foi utilizado. Os microrganismos provenientes do sedimento estuarino foram enriquecidos sob condições metanogênicas e halofílicas, visando a utilização do sedimento como inóculo nos ensaios nutricionais e na operação dos reatores do tipo RAHLF. O meio de cultivo salino Biota, suplementado com glicose e formiato, foi utilizado para o desenvolvimento da comunidade microbiana metanogênica halofílica.

Testes de degradação do PCP foram realizados previamente sob diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, com vistas a uma melhor compreensão da relação N:P adequada para o processo anaeróbio. Os resultados provenientes do acompanhamento da diversidade microbiana do Domínio *Bacteria* nas diferentes relações testadas indicaram a seleção de distintas comunidades microbianas, resultando em diferentes velocidades de degradação do PCP. A relação N:P de 10:1 foi a que apresentou melhores resultados, pois além da rápida degradação do PCP quando comparada com as outras relações, apresentou a maior diversidade de microrganismos.

Posteriormente, o sistema RAHLF foi operado com vazão média afluyente de aproximadamente 44 ml/hora, com meio mineral salino Biota (DQO:N:P de 1000:130:45) para R1 e com a alteração para relação DQO:N:P de 1000:10:1 para R2. Duas diferentes estratégias foram adotadas para partida dos reatores. Para R1, optou-se por acrescentar PCP na concentração inicial de 10,0 mg.L⁻¹, durante 110 dias causando desestabilização da metanogênese e acúmulo de PCP, requerendo intervenção para recuperação do reator pelo período de 90 dias. Na partida do RAHLF 2, optou-se pelo aumento gradual de concentração do PCP de 0,5 mg.L⁻¹ a 12,0 mg.L⁻¹ durante 52 dias. Após estabelecimento da metanogênese, R1 foi alimentado durante de 270 dias com 5,0 mg PCP.L⁻¹, durante 41 dias com 8,0 mg.L⁻¹ e 59 dias com 12 mg.L⁻¹. O balanço de massa no reator RAHLF 1 demonstrou que 0,52% do PCP adicionado saiu no efluente e que não ocorreu adsorção no sistema. 22,34 mg de 2,4,6 TCP, intermediário da degradação do PCP, ficaram adsorvidos na biopartícula. Os resultados das análises de diversidade microbiana apontaram para mudança da comunidade microbiana do Domínio *Bacteria* ao longo do período operacional e morfologias de bacilos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp estiveram presentes no reator.

No RAHLF 2, a degradação do PCP foi de 100%, até a concentração de 10,0 mg.L⁻¹. No final da fase com 12,0 mgPCP.L⁻¹, a concentração no efluente foi de 1,4 mgPCP.L⁻¹, com eficiência média de remoção de 93,2 ± 5,5 %. 2,4,6 TCP foi o intermediário principal no efluente do reator. 4,06 % do PCP adicionado ao sistema foram encontradas no efluente e 15,94% ficaram adsorvidas nas biopartículas do reator. Portanto, considera-se que 80% do PCP adicionado sofreu degradação anaeróbia microbiana. A presença dos microrganismos *Methanocaldococcus* e *Methanosaeta* na fase final de operação do RAHLF 2 e determinadas no sedimento coletado foi considerada fundamental para manter estabilidade do reator. Essa descoberta contribui com informações sobre a real diversidade microbiana de ecossistemas tropicais, sobretudo em habitats anaeróbios, bem como sobre as condições nutricionais e os procedimentos necessários para confiná-la em reatores e usá-la em processos de biorremediação.

Palavras-chaves: desalogenação redutiva do PCP, reator anaeróbio horizontal de leito fixo, teoria dos Recursos Limitantes, biorremediação anaeróbia, Estuário de Santos-São-Vicente, arqueias metanogênicas halofílicas.

ABSTRACT

BRUCHA, G. (2007). *Influence of nitrogen and phosphorus nutrients on the anaerobic degradation of pentachlorophenol and on the natural microbial diversity of sediments from the Santos-São Vicente Estuary, state of São Paulo, Brazil*. Doctoral thesis. São Carlos School of Engineering, University of São Paulo – USP, São Carlos, SP, Brazil

The research presented here aimed to determine the optimal nutritional conditions for the use of sediment from the Santos-São Vicente estuary in the state of São Paulo, Brazil, as an inoculum for a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor (HAIB) applied to the anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP), seeking to apply the technology on the real scale and to identify the microbial groups involved in the process. To this end, sediment with methanogenic characteristics from the Santos-São Vicente estuary was used. The microorganisms from the estuarine sediment were enriched under methanogenic and halophilic conditions, aiming to use the sediment as an inoculum in nutritional assays and in the operation of HAIB reactors. Biota saline culture medium supplemented with glucose and formiate was used to develop the halophilic methanogenic microbial community.

PCP degradation tests were carried out previously under different concentrations of nitrogen and phosphorus in order to gain a better understanding of the optimal N:P ratio for the anaerobic process. The findings on the microbial diversity of the Domain *Bacteria* at the various ratios tested here indicated the selection of distinct microbial communities, resulting in different PCP degradation velocities. The N:P ratio utilized was 10:1 since it presented the best results not only in terms of faster PCP degradation than the other ratios but also the highest diversity of microorganisms.

The HAIB reactor was then operated with a mean inflow of approximately 44 ml/hour, using the Biota saline mineral medium with a COD:N:P ratio of 1000:130:45 in R1 (reactor 1) and a COD:N:P ratio of 1000:10:1 in R2. Two distinct strategies were adopted to start up the reactors. In R1, PCP was added at an initial concentration of 10.0 mg.L⁻¹ for 100 days, causing destabilization of the methanogenesis and accumulation of PCP, requiring a 90-day intervention for the reactor's recovery. To start up R2, the PCP concentration was increased gradually from 0.5 mg.L⁻¹ to 12.0 mg.L⁻¹ for 52 days. After methanogenesis was established, R1 was fed for 270 days with 5.0 mg of PCP.L⁻¹, followed by 41 days with 8.0 mg.L⁻¹ and 59 days with 12 mg.L⁻¹. The mass balance in R1 indicated that 0.52% of the added PCP exited through the reactor's outflow and that adsorption of the system did not occur. 22.34 mg of 2,4,6 TCP, an intermediary of PCP degradation, was adsorbed in the bioparticles. The results of the analysis of microbial diversity indicated a change in the microbial community of the Domain *Bacteria* along the operational period, with fluorescent bacilli morphologies resembling *Methanobacterium* sp present in the reactor.

PCP degradation in R2 was 100% up to a concentration of 10.0 mg.L⁻¹. At the end of the phase with 12.0 mgPCP.L⁻¹, the effluent concentration was 1.4 mgPCP.L⁻¹, with a mean removal efficiency of 93.2 ± 5,5 %. 2,4,6 TCP was the main intermediary in the reactor's effluent. 4.06% of the PCP added to the system was found in the effluent and 15.94% was adsorbed in the bioparticles of the reactor. Therefore, it was concluded that 80% of the added PCP underwent microbial anaerobic degradation. The presence of *Methanocalculus* and *Methanosaeta* microorganisms in the final operating phase of R2, which was determined in the collected sediment, was considered fundamental for maintaining the reactor's stability. This discovery contributes to the body of information about the real microbial diversity of tropical ecosystems, above all in anaerobic habitats, and about the nutritional conditions and procedures involved in confining these microorganisms in reactors and using them in bioremediation processes.

Keywords: reductive dehalogenation of PCP, horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, Resource Ratio Theory, anaerobic bioremediation, Santos-São Vicente Estuary, halophilic methanogenic archaea.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da molécula do Pentaclorofenol	30
Figura 2: Rota metabólica principal de degradação do PCP no Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado, segundo os experimentos de Khodadoust et al., 1997, com etanol como fonte de carbono simples.	35
Figura 3: Rota metabólica secundária de degradação do PCP no Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado. Fonte: Khodadoust et al., 1997 – com etanol como fonte de carbono simples.	36
Figura 4: Modelo de degradação do fenol pela rota do ácido benzóico ou carboxilação do fenol, segundo Londry e Fedorak (1992).	37
Figura 5: Esquema da conversão de benzoato a metano em ambientes anaeróbios, Segundo Fang et al. (1997). Legenda: BAS - bactérias acetogênicas sintróficas; BRS-I – bactérias redutores de sulfato que realizam a degradação incompleta do substrato; BRS-C - bactérias redutores de sulfato que oxidam completamente o substrato; APM- produtoras de metano acetoclásticas e hidrogenotróficas	37
Figura 6: Diagrama geral de diferentes métodos moleculares usados para determinar a diversidade de populações microbianas mistas (Muyzer <i>et al.</i> , 1996).	64
Figura 7: Esquema geral do trabalho de pesquisa da presente tese de doutorado	73
Figura 8. Área de estudo, região da Baixada Santista, São Paulo.	74
Figura 9: Local da coleta (frente da Companhia Siderúrgica Paulista – COSIPA)	75
Figura 10: Procedimento de transferência do sedimento dos “cores” para os frascos Duran sob condições de anaerobiose.	77
Figura 11: Câmara de difusão de gases	80
Figura 12: Ampola gasométrica	80
Figura 13: Frasco reator utilizado no enriquecimento da amostra de sedimento	87
Figura 14: Imagem fotográfica do procedimento de troca do meio de cultura e retiradas de amostra: a) abertura do frasco reator sob assepsia e fluxo de N ₂ no meio de cultura a ser acrescentado, b) processo de sifonamento do meio de cultura, após retirada de amostras para análises, c) acréscimo do meio de cultura novo sob fluxo de N ₂ /CO ₂ , d) acréscimo das fontes de carbono, vitaminas, bicarbonato, solução redutora de sulfeto de sódio, PCP e macronutrientes sob fluxo de N ₂ /CO ₂	87
Figura 15: Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). As letras A, B, C, D e E correspondem ao frasco de alimentação, reservatório de N ₂ , bomba peristáltica, reator e sistema coletor de gás, respectivamente. L/D corresponde aos pontos de amostragem nas relações comprimento/diâmetro ao longo do reator	88
Figura 16: Representação gráfica dos valores de metano (%) e indicação das alimentações efetuadas ao longo dos dias de operação durante enriquecimento do sedimento a ser utilizado como inoculo na operação do RAHLF 1 (a) e no RAHLF 2 (b)	123
Figura 17: Representação gráfica dos valores de PCP (mg/g espuma) adsorvido na biomassa imobilizada ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.	129
Figura 18: Representação gráfica dos valores de PCP na fração líquida ao longo dos pontos de amostragem no 3, 10, 17, 24 e 30 dias de experimentos.	129
Figura 19: Representação gráfica dos valores dos compostos intermediários passíveis de medição no sistema de reação, ao longo do experimento na fração líquida	130

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

