



II-338 - AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO ALQUILBENZENO SULFONATO LINEAR (LAS) POR MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS ENRIQUECIDOS EM LABORATÓRIO

Daniele Maria Campos Silva⁽¹⁾

Universidade Federal de Pernambuco - Depto. de Engenharia Civil - Laboratório de Saneamento Ambiental. Mestranda em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos na UFPE.

Letícia Maria de Oliveira

Bolsista de pós doutorado do Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE

Ednaldo Gomes da Silva

Doutorando em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos da UFPE

Luiz Galdino da Silva

Bolsista de iniciação científica do Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE

Sávia Gavazza dos Santos

Professora do Campus do Agreste da UFPE

Endereço⁽¹⁾: Av. Acadêmico Hélio Ramos, S/N - Recife-PE, CEP 50740-530, Brasil - tel: (81) 21268229 – email: campdaniele@gmail.com

RESUMO

O presente trabalho buscou verificar a degradação do LAS por microrganismos enriquecidos em meio anaeróbio e isolados de inóculo de reator UASB usado no tratamento de esgoto doméstico. Estes microrganismos foram crescidos em meio contendo 25mg/L de LAS, utilizando meio mineral adicionando de 200mg/L de co-substrato (etanol). Em todos os reatores houve a degradação do etanol e do LAS, entretanto, houve uma maior degradação do último, foco principal do trabalho, quando utilizado apenas um dos seus homólogos. O C10, chegando a 75% de degradação. Enquanto que para a mistura foi quantificada uma degradação de apenas 35%. As análises microscópicas das amostras pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) revelaram como principais morfologias presentes no reator as eubactérias. Além de mostrar que esta diversidade microbiana sofreu uma redução ao longo do período experimental.

PALAVRAS-CHAVE: Inóculo, microrganismos, biodegradação, LAS, anaerobiose, FISH.

INTRODUÇÃO

O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) é um tensoativo aniônico constituído de uma mistura de homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares variando de C₁₀ a C₁₆ com predominância de C₁₀ a C₁₃ (Figura 1) (PENTEADO et al., 2006).

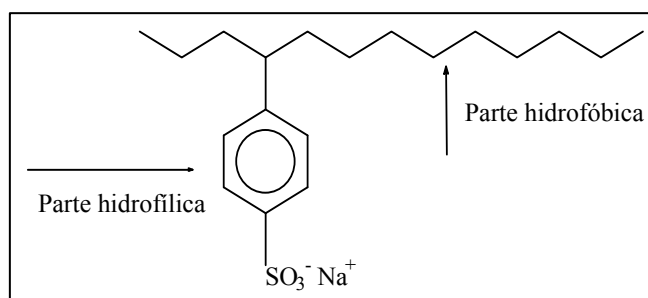


Figura 1 – Estrutura química de um tensoativo aniônico

Atualmente, o LAS é o mais importante surfactante aniônico, o qual é usado como componente ativo nos produtos de limpeza doméstica e industrial, por exemplo, detergentes e sabões em pó. Devido a grande utilização de produtos que o contém, este composto acaba alcançando o ambiente através de descargas de efluentes, tratados ou não (SANZ et al., 2000).

O LAS é considerado biodegradável em condições aeróbias por culturas mistas de microrganismos encontrados em ambientes naturais ou em estações de tratamento.



Apesar do LAS ser considerado inibidor severo da digestão anaeróbia, estudos sobre a biodegradação nessas condições tiveram um importante impulso, mostrando recentemente que tal biodegradação é possível (SANZ et al., 2003; DUARTE, 2006).

Os microrganismos anaeróbios podem utilizar os compostos sulfonados como: a) aceptores de elétrons; b) doadores de elétrons para a respiração anaeróbia e c) substrato para a fermentação. A redução do grupo sulfonado foi relatada em culturas enriquecidas com LAS em condições anóxicas, em meio contendo glicose. Essas culturas utilizaram o surfactante como fonte de enxofre para o crescimento microbiano. Os autores obtiveram os maiores valores de similaridade para os gêneros *Aeromonas* e *Shewanella* (DENGGER & COOK, 1999).

Considerando-se os problemas ambientais causados pelo LAS, como formação de espumas nas superfícies das águas, diminuição do contato oxigênio/água, transporte a longas distâncias de outros poluentes, os quais estão no interior das espumas formadas, as quais podem ser transportadas pela ação dos ventos dentre outros é que se procurou avaliar neste trabalho a sua degradação através da aplicação de microrganismos obtidos de lodo de tratamento anaeróbio, purificados e enriquecidos em laboratório, assim como a biodegradabilidade de um de seus homólogos de menor cadeia carbônica, o C10.

MATERIAIS E MÉTODOS

A biomassa utilizada como inóculo para obtenção dos microrganismos foi o lodo anaeróbio proveniente de um reator UASB utilizado no tratamento de esgoto doméstico do bairro Mangueira (ETE-Mangueira). Esta biomassa foi colocada em um recipiente de vidro de 20 mL contendo o meio de cultivo composto por macronutrientes e micronutrientes mostrados na Tabela 1 ao qual ainda foi adicionado uma massa de etanol para uma concentração de 460 mg/L que atuou como co-substrato. Este experimento foi realizado em reatores em batelada.

Tabela 1 - Concentrações das soluções macro e micronutrientes

Solução	Reagente	Concentração (g/L)
Macronutrientes	NH ₄ Cl	0,280
	K ₂ HPO ₄	0,250
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,100
	CaCl ₂	0,007
	NaHCO ₃	0,400
	Extrato de levedura	0,100
Micronutrientes	FeCl ₂ .4H ₂ O	2,000
	ZnCl ₂	0,050
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,500
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,142
	NaSeO ₃ .5H ₂ O	0,164
	H ₃ BO ₃	0,050
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,038
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,000
	AlCl ₃ . 6H ₂ O	0,090
	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,050
	EDTA	1,000
	Resazurina	0,200
	HCl	1,000 (mL/L)

Este inóculo foi submetido a cinco diluições sequenciais (Figura 2), ainda utilizando o meio de cultura descrito acima, esta consistiu a primeira etapa que teve como objetivo selecionar os microrganismos mais bem adaptados ao meio. Por fim foram acrescentadas massas de LAS e do homólogo C10 separadamente para as seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40mg.L⁻¹, para cada uma das diluições realizadas a partir do inóculo. O *headspace* manteve-se em 30% (v/v) e o meio foi inoculado com lodo em 5% do volume final.

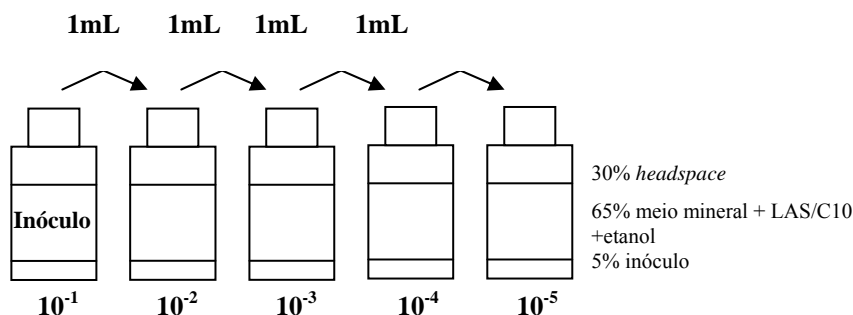


Figura 2 – Esquema da metodologia da diluição seriada

A segunda fase do experimento consistiu em realizar novas diluições sequenciais a partir do inóculo da fase anterior para diferentes concentrações do co-substrato, a saber, 50; 100 e 200 mg.L⁻¹. No entanto a concentração de LAS e do homólogo C10 permaneceu a maior que se obteve crescimento na primeira fase do experimento. Esta fase teve como objetivo submeter os microrganismos a condições mais críticas, pela diminuição do co-substrato, principal fonte de energia dos microrganismos, de modo a promover a sua adaptação ao meio contendo LAS e o homólogo C10. Desse modo foi possível obter um meio enriquecido em microrganismos anaeróbios capazes de resistir à presença de LAS.

A última fase do experimento consistiu em aumentar a massa celular dos microrganismos obtidos na segunda fase, as quais foram transferidas sequencialmente para reatores em batelada de 100, 250, 500 e 1000 mL, contendo o meio de cultivo descrito na primeira fase, assim como a maior concentração de LAS e do homólogo C10 e a menor concentração de co-substrato da segunda fase. Nesta fase foram monitoradas as concentrações de LAS e do homólogo C10 quando alcançado o aumento de volume para 500 e 1000mL.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS

Análises de pH e a demanda química de oxigênio (DQO) foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for Wastewater* (2005). A concentração de LAS foi determinada por HPLC equipado com detector de fluorescência, coluna C18 nas condições analíticas apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições analíticas para determinação de LAS.

Condições	Descrição
Solvente A	Acetonitrila e água (25:75), na qual foram acrescidos ácido acético para obter uma concentração de 5 mM e trietilamina para obter uma concentração final de 5 mM.
Solvente B	Acetonitrila.
Fluxo	1.0 mL / min
Compartimento termostatizado	40°C
Detector	Fluorescência: λ_{exc} 230 nm e λ_{em} 290 nm
Eluição isocrática	55% do Solvente A e 45% do Solvente B

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Lâminas de teflon (FEDELCO ER-308) receberam 10µL de amostra, em cada poço, previamente fixadas e hibridizadas, utilizando sondas específicas para arqueas e eubactérias. A visualização foi realizada por meio de um microscópio LEICA DM RB, lente DC 300F, com programa LEICA IM 50 Image. Esse exame foi feito para identificar e avaliar as principais morfologias das bactérias envolvidas no processo.

RESULTADOS

Os melhores resultados de biodegradação do LAS e do homólogo C10 ocorreram para a concentração de 200 mg/L de etanol. As concentrações de 50 e 100 mg/L de etanol se mostraram insuficientes para promover o crescimento adequado das células.

Após o crescimento da biomassa para 1L, e na presença de etanol foi observado uma redução de 10% da concentração do homólogo C10 em 40 dias. Entretanto, nos últimos dias do experimento (60 dias), quando o etanol havia sido completamente biodegradado, essa redução passou para 75% (Figura 3). Essa redução provém da biomassa remanescente, que acelerou a degradação deste homólogo no final dos 60 dias, pois o meio em que se encontravam os microrganismos só possuía como substrato disponível o surfactante.

Para o experimento contendo a mistura LAS, houve uma degradação de apenas 35% em sua concentração, após 70 dias (Figura 4), mostrando assim, que a complexidade das varias estruturas dos homólogos do LAS contribuem significativamente na sua degradação. Uma das razões pela qual se observa uma maior biodegradabilidade do C10 seria devido a sua maior hidrosolubilidade, quando comparado à mistura LAS.

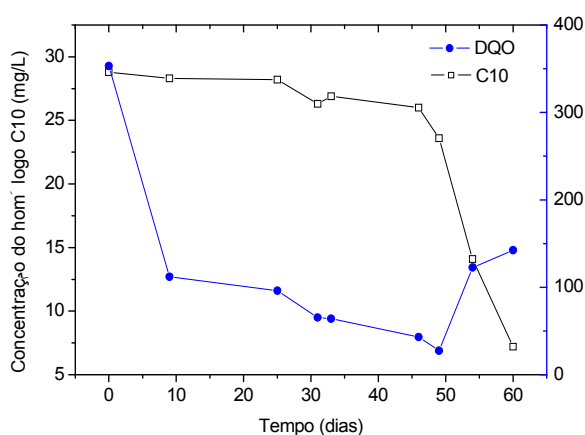


Figura 3 - Concentrações de DQO e C10 em meio contendo 200 mg/L de etanol.

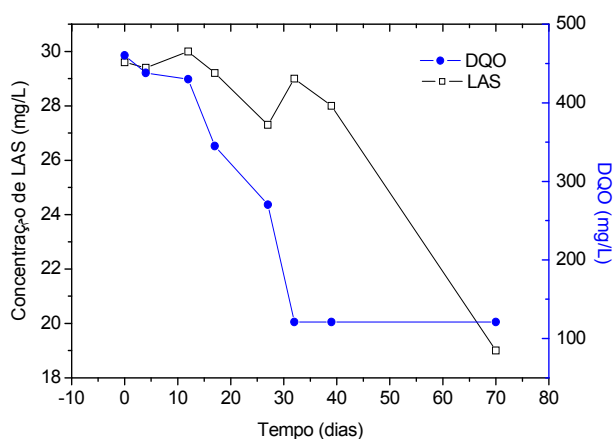


Figura 4 - Concentrações de DQO e LAS em meio contendo 200 mg/L de etanol.

A identificação dos microrganismos presentes nas amostras foi possibilitada pela técnica de FISH usando sondas fluorescentes. O monitoramento microscópico do presente experimento demonstrou que, diferentemente do observado no início do experimento onde cocobacilos eram predominantes (Figuras 5). Após 50 dias quando já iniciado o consumo do LAS e do seu homólogo C10, os bacilos passaram a ser predominantes (Figura 6). No entanto não se pode afirmar quais destes microorganismos estão diretamente ligados a biodegradação do LAS.

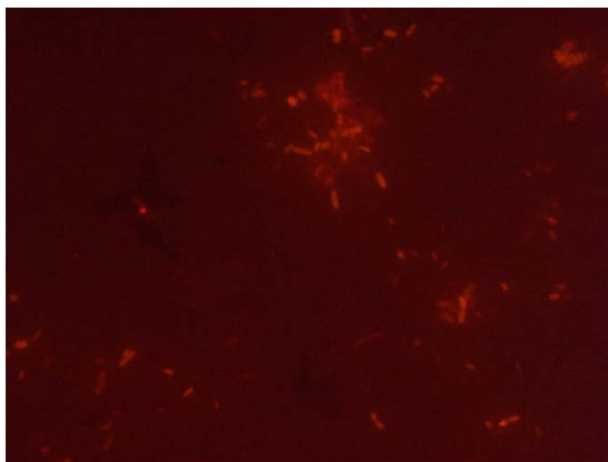


Figura 5 - Resultado da hibridização *in situ* após 15 dias de experimento

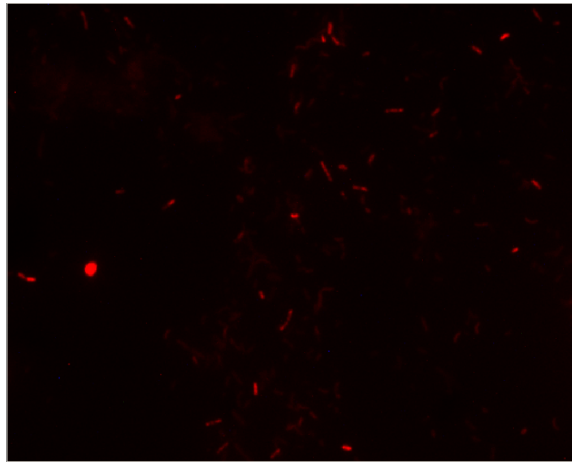


Figura 6 - Resultado da hibridização *in situ* após 50 dias de experimento



CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Os resultados obtidos em relação ao limite máximo de LAS e de seu homólogo C10, que favoreceram o crescimento dos microrganismos, foi de 25 mg/L utilizando 200 mg/L de etanol, na presença dos quais houve um aumento da sua biomassa, e a biodegradabilidade do composto foi favorecida.

Foi observada uma redução de 75% na concentração do homólogo C10 em 60 dias de experimento. Já para a mistura LAS foi observada uma redução de 35% em sua concentração, durante 70 dias de experimento. Essa diferença decorre do fato de que o homólogo C10 possui uma menor cadeia carbônica, sendo mais solúvel em água, e estando assim, mais biodisponível.

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* pode ser usada de maneira satisfatória como ferramenta de análise microbiana, identificando as principais morfologias das Eubactérias envolvidas nos processos de degradação envolvendo o LAS.

Que embora possível, o processo de degradação anaeróbia deste composto é muito lento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DENGGER, K.; COOK, A.M. (1999). Linear alkylbenzene sulphonate (LAS) bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulphur. *J. Appl. Microbiol.*, v. 86, p. 65-168.
2. DUARTE, I. C. S (2006). Caracterização microbiológica da remoção e degradação de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) em reatores anaeróbios com biofilme e células planctônicas. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia da Universidade de São Carlos-SP, Brasil.
3. PENTEADO, J. C. P., EL SEOUD, O. A., CARVALHO, L. R. F. (2006). Alquilbenzeno sulfonato linear: Uma abordagem ambiental e analítica. *Química Nova*, Vol. 29, Nº 5. 1038 – 1046;
4. SANZ, JL, CULUBRET, E, FERRER, J. DE, MORENO, A, BERNA, JL. (2003) Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Biodegradation* 14:57-64