

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS

METODOLOGIAS AVANÇADAS PARA AVALIAÇÃO DE BIOMASSA
METANOGÊNICA EM REATORES DE BAIXA CARGA

Isabel Cristina Telles Silveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Porto Alegre, fevereiro de 2000.

Apresentação

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do Prof. Luiz Olinto Monteggia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e co-orientação do Prof. João Antônio Pêgas Henriques da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradeço aos meus orientadores o incentivo recebido, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Ao Diego Bonatto, agradeço pelo auxílio prestado na construção dos *primers* e pela sua dedicação ao trabalho experimental. À Omara Lange e ao Leandro Meirelles Santana, pela cooperação na realização das análises laboratoriais.

Aos meus pais, por terem me guiado neste caminho, sempre oferecendo seu apoio. À minha filha Camile, pelo amor, carinho e pela compreensão nos momentos que não lhe dediquei a merecida atenção.

Resumo

Os sistemas anaeróbios, amplamente utilizados para o tratamento de efluentes de alto conteúdo orgânico, têm encontrado cada vez mais aplicabilidade no tratamento de efluentes diluídos, como os esgotos domésticos. Reatores de alta taxa permitem que o tempo de retenção hidráulico seja desvinculado do tempo de retenção celular, atingindo-se elevadas taxas de remoção de matéria orgânica em poucas horas.

Para a otimização destes sistemas de tratamento, é de fundamental importância a caracterização da biomassa bem como o acompanhamento da sua evolução. Sendo a metanogênese a etapa limitante do processo de degradação anaeróbio, principal atenção deve ser dada aos organismos responsáveis pela etapa final do processo de conversão de matéria orgânica a biogás.

O parâmetro tradicionalmente utilizado para estimar a biomassa é a concentração de sólidos voláteis. Técnicas mais modernas, como os testes de atividade metanogênica específica, fornecem resultado mais precisos. Contudo, existe grande dificuldade em testar-se a biomassa presente em reatores que recebem efluentes de baixa carga orgânica.

Com o objetivo de buscar-se técnicas alternativas, foram monitorados, durante um período de seis meses, três reatores de manto de lodos de fluxo ascendente, em escala de bancada, nos quais utilizou-se como inóculo o lodo coletado em reator anaeróbio de uma estação de tratamento de efluentes municipais. Cada reator recebeu substrato distinto: acetato; mistura de ácidos graxos voláteis; e sacarose em concentrações de DQO de aproximadamente 600 mg.L^{-1} , simulando a concentração média encontrada em esgotos domésticos.

Mensalmente, a biomassa foi analisada através da concentração de sólidos voláteis totais; atividade metanogênica específica para os substratos acetato, etanol, formiato e mistura de acetato e etanol; e reação em cadeia da polimerase para *primers* específicos a bactérias metanogênicas totais e acetoclásticas associados à técnica de determinação do número mais provável de organismos.

A melhoria na eficiência de remoção de matéria orgânica obtida nos reatores foi acompanhada pelo aumento progressivo da atividade metanogênica específica. Os reatores A e M apresentaram, ao término do experimento, atividade em acetato de 7,39 e 8,97

$\text{mLCH}_4.\text{gSVT}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. O reator S, por sua vez, obteve maior atividade em etanol, de $9,55 \text{ mLCH}_4.\text{gSVT}^{-1}.\text{h}^{-1}$, indicando o desenvolvimento preferencial de outros grupos de organismos que não os acetoclásticos.

A utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase para identificação e quantificação de bactérias metanogênicas indicou a necessidade de estudos mais detalhados, principalmente no que se refere à construção dos *primers*.

Abstract

Anaerobic systems, widely used in the treatment of organic concentrated effluents, are increasingly being applied in the treatment of diluted effluents, such as domestic wastewaters. High rate anaerobic reactors allow the hydraulic retention time, thus achieving in few hours, high rates of organic matter removal.

In order to optimize these treatment systems, the characterization of the biomass and the monitoring of its evolution are of fundamental importance. Special attention must be given to the methanogenic organisms, since the methanogenesis is the limiting step of the anaerobic degradation process.

The parameter traditionally used to estimate the biomass is the volatile solids concentration. Modern techniques, such as specific methanogenic activity tests, provide more accurate results. However, there are some difficulties in testing biomass developed in low organic load reactors.

With the purpose of finding alternative methods, three lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactors, were monitored during six months. The inoculum came from a full scale anaerobic reactor treating municipal wastewaters. Each reactor received different substrate: acetate, volatile fatty acids and sucrose, with COD concentration of 600 mg.L⁻¹, simulating the mean concentration found in domestic wastewater.

The biomass was analysed monthly through the total volatile solids concentration, the specific methanogenic activity for the substrates acetate, ethanol, formate and a mixture of acetate and ethanol; and polynuclear chain reaction with primers developed to methanogenic bacteria and acetoclastic methanogens associated to the most probable number technique.

The increase of the efficiency of organic matter removal was accompanied by a progressive increasing of the methanogenic specific activity. The A and M reactors showed by the end of the experiment, acetate activity of 7.39 and 8.97 mLCH₄.gTVS⁻¹.h⁻¹, respectively. The S reactor showed a higher activity in ethanol, 9.55 mLCH₄.gTVS⁻¹.h⁻¹, indicating main development of other microorganisms than acetoclastics.

The use of polymerase chain reaction technique for the identification and quantification of methanogenic bacteria indicated the necessity of more detailed studies, mainly about the primers desing.

Sumário

Apresentação.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Sumário.....	vii
Lista de quadros.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Considerações Iniciais.....	4
3.2 Processo de Degradação Anaeróbio.....	4
3.3 Parâmetros de Influência e Controle do Processo.....	11
3.3.1 Temperatura.....	11
3.3.2 Carga orgânica aplicada.....	12
3.3.3 pH e alcalinidade.....	13
3.3.4 Nutrientes.....	13
3.3.5 Ácidos graxos voláteis.....	14
3.3.6 Produção de gás.....	16
3.4 Identificação e Monitoramento de Bactérias Metanogênicas.....	16
3.4.1 Atividade metanogênica específica.....	18
3.4.2 Níveis de coenzimas e ATP.....	20
3.4.3 Técnicas baseadas na biologia molecular.....	21
3.4.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	21
3.4.3.2 Hibridização.....	26
3.4.4 Testes imunológicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Considerações Gerais.....	28
4.2 Alimentação dos Reatores.....	29
4.3 Partida e Controle Operacional.....	31
4.4 Monitoramento da Biomassa Anaeróbia.....	31

4.4.1 Atividade Metanogênica Específica.....	32
4.4.2 Reação em cadeia da polimerase.....	33
4.5 Monitoramento dos efluentes líquidos.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Caracterização da Biomassa Anaeróbia de Inóculo.....	38
5.2 Partida e Operação dos Reatores Experimentais.....	42
5.3 Reator A.....	43
5.3.1 Análise do efluente líquido.....	43
5.3.2 Análise da biomassa anaeróbia.....	47
5.4 Reator S.....	52
5.4.1 Análise do efluente líquido.....	52
5.4.2 Análise da biomassa anaeróbia.....	55
5.5 Reator M.....	62
5.5.1 Análise do efluente líquido.....	62
5.5.2 Análise da biomassa anaeróbia.....	65
6 CONCLUSÕES.....	66
7 RECOMENDAÇÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXO 1	

Lista de Quadros

- Quadro 3.1 Bioreações da digestão anaeróbia de glicose, propionato, butirato, acetato, formiato, etanol e hidrogênio
- Quadro 3.2 Percentagens relativas de bactérias encontradas em lodo originalmente alimentado por efluente de indústria açucareira e quando alimentado com etanol ou propionato como única fonte de matéria orgânica
- Quadro 3.3 Características diferenciais das bactérias metanogênicas normalmente presentes em digestores anaeróbios
- Quadro 4.1 Programa utilizado para os ciclos de amplificação
- Quadro 4.2 Sequência dos *primers*
- Quadro 4.3 Análises realizadas para o monitoramento dos reatores experimentais
- Quadro 5.1 Resultados dos testes realizados com o lodo inoculado nos reatores experimentais
- Quadro 5.2 Dados operacionais dos reatores experimentais
- Quadro 5.3 Número de diluições amostrais em que o teste de PCR foi positivo
- Quadro 5.4 Atividade metanogênica específica máxima obtida no último teste realizado com a biomassa dos reatores experimentais

Lista de Figuras

- Figura 3.1 Fluxograma da digestão anaeróbia de materiais poliméricos
- Figura 3.2 Ciclo de PCR
- Figura 4.1 Esquema dos reatores UASB
- Figura 5.1 Teste de AME com acetato e etanol na proporção 1:1 em termos de concentração de DQO, totalizando o valor de 2000 mg.L^{-1} , com período de 6 horas de aclimação do lodo
- Figura 5.2 Teste de AME com acetato e etanol na proporção 1:1 em termos de concentração de DQO, totalizando o valor de 2000 mg.L^{-1} , sem período de aclimação do lodo
- Figura 5.3 Valores de pH afluente e efluente do reator A
- Figura 5.4 Concentração de alcalinidade, em $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$, afluente e efluente do reator A
- Figura 5.5 Sólidos suspensos voláteis efluentes do reator A
- Figura 5.6 Percentual de remoção de ácido acético no reator A
- Figura 5.7 Percentual de remoção de DQO total do reator A
- Figura 5.8 Percentual de remoção de DQO filtrada do reator A
- Figura 5.9 Médias mensais dos percentuais de remoção de DQO total e solúvel do reator A
- Figura 5.10 Concentração de sólidos voláteis totais presentes no reator A
- Figura 5.11 Atividade metanogênica máxima para os substratos acetato, etanol, formiato e mistura de acetato e etanol do reator A
- Figura 5.12 Número mais provável de organismos metanogênicos acetoclásticos e metanogênicos totais determinados pela análise de PCR para o reator A
- Figura 5.13 Número mais provável de organismos metanogênicos acetoclásticos e metanogênicos totais determinados pela análise de PCR para o reator A
- Figura 5.14 Resultados das análises de atividade metanogênica específica máxima em etanol e número mais provável de organismos metanogênicos totais da biomassa presente no reator A
- Figura 5.15 Valores de pH afluente e efluente do reator S
- Figura 5.16 Concentração de alcalinidade, em $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$, afluente e efluente do reator S
- Figura 5.17 Concentração de sólidos suspensos voláteis efluentes do reator S

- Figura 5.18 Concentração de ácidos graxos voláteis efluentes do reator S
- Figura 5.19 Percentual de remoção de DQO filtrada do reator S
- Figura 5.20 Percentual de remoção de DQO total do reator S
- Figura 5.21 Médias mensais dos percentuais de remoção de DQO total e filtrada do reator S
- Figura 5.22 Concentração de sólidos voláteis totais presentes no lodo do reator S
- Figura 5.23 Número mais provável de bactérias metanogênicas totais e acetoclásticas encontradas no lodo do reator S
- Figura 5.24 Atividade metanogênica específica para os substratos acetato, etanol, mistura de acetato e etanol e formiato do reator S
- Figura 5.25 Atividade metanogênica específica máxima em acetato e número mais provável de organismos acetoclásticos para a biomassa do reator S
- Figura 5.26 Atividade metanogênica específica máxima em etanol e número mais provável de organismos metanogênicos para a biomassa do reator S
- Figura 5.27 Concentração de sólidos voláteis totais e atividade metanogênica específica máxima em acetato da biomassa do reator S
- Figura 5.28 Relação entre a concentração de sólidos voláteis totais e atividade metanogênica específica máxima em acetato da biomassa do reator S
- Figura 5.29 Número mais provável de bactérias acetoclásticas e atividade metanogênica específica em formiato para a biomassa do reator S
- Figura 5.30 Relação entre o número mais provável de bactérias acetoclásticas e atividade metanogênica específica em formiato para a biomassa do reator S
- Figura 5.31 Valores de pH afluente e efluente do reator M
- Figura 5.32 Valores de alcalinidade afluente e efluente do reator M
- Figura 5.33 Concentração de sólidos suspensos voláteis presentes no efluente do reator M
- Figura 5.34 Percentuais de remoção dos ácidos acético, propiônico e butírico do reator M
- Figura 5.35 Percentual de remoção de DQO dissolvida do reator M
- Figura 5.36 Percentual de remoção de DQO total do reator M
- Figura 5.37 Médias mensais dos percentuais de remoção de DQO total e filtrada
- Figura 5.38 Concentração de sólidos voláteis totais presente na biomassa do reator M
- Figura 5.39 Atividade metanogênica específica em acetato, etanol, formiato e mistura de acetato e etanol para a biomassa do reator M

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AME	atividade metanogênica específica
ATP	adenosina trifosfato
CODH	monóxido de carbono desidrogenase
DBO	demanda biológica de oxigênio
DNA	ácido desoxirribonucleico
DQO	demanda química de oxigênio
ELISA	enzime-linked immunosorbent assay
MCR	coenzima M metil redutase
mM	milimoles
μmol	micromoles
N	nitrogênio
NMP	número mais provável
Pa	Pascal
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucleico
SFT	sólidos fixos totais
SSV	sólidos suspensos voláteis
SVT	sólidos voláteis totais
UASB	upflow anaerobic sludge blanket

1. INTRODUÇÃO

Os processos biológicos anaeróbios têm sido estudados há cerca de 90 anos, quando Omelianski, em 1906, descreveu a degradação da celulose com formação de metano através da ação de uma bactéria específica. Durante longo tempo foram utilizados somente para o tratamento de águas residuárias com altas concentrações de matéria orgânica. Contudo, tem sido demonstrado que estes tratamentos também apresentam grande aplicabilidade para efluentes diluídos, como os esgotos domésticos.

Em sistemas de tratamento de alta taxa, como em reatores de manto de lodos de fluxo ascendente, o tempo de retenção hidráulico é independente do tempo de retenção celular. Isso permite que o projeto seja baseado na capacidade de degradação dos microrganismos e não na taxa de crescimento, reduzindo o tempo de tratamento de dias para horas.

O efetivo contato entre a biomassa e o efluente não se deve somente às características hidráulicas do reator mas também ao biogás produzido. A produção do biogás a partir de substratos complexos, como os esgotos domésticos, depende de diversas populações microbianas que devem estar perfeitamente balanceadas.

Ocorre que no desenvolvimento e otimização dos sistemas biológicos de tratamento existe uma forte tendência de direcionar a atenção unicamente ao processo como um todo, esquecendo-se das espécies microbianas envolvidas ou na estrutura e função destas comunidades. Na maior parte dos casos, projetos de sistemas de tratamento são feitos sem o completo entendimento ou sem que seja dada a devida consideração ao processo biológico envolvido.

Os parâmetros tradicionalmente utilizados para o monitoramento do tratamento consistem em pH, alcalinidade, DQO, DBO e vazão de biogás. Estes dados fornecem apenas um indicativo da atividade global da população microbiana, não podendo antecipar alguma desordem no reator. Uma melhor compreensão do processo, quando aplicado ao tratamento de efluentes contendo concentrações significativas de poluentes em suspensão, requer um monitoramento mais detalhado do acúmulo de biossólidos no reator. Devido a isso, faz-se necessário a utilização de parâmetros complementares à análise de sólidos suspensos voláteis para adequado monitoramento dos organismos ativos no processo de tratamento.

A compreensão e o conhecimento da comunidade microbiana de um tratamento biológico de águas residuárias pode, de muitas maneiras, levar ao aperfeiçoamento dos projetos e ao aumento da eficiência. Sem o conhecimento básico da estrutura e função da comunidade microbiana não é possível calcular com adequada segurança a capacidade de conversão de matéria orgânica de um sistema.

Além disso, para aplicações eficientes em larga escala, há a necessidade de um controle efetivo durante a partida e a operação. Isso muitas vezes requer uma rápida avaliação da composição da população metanogênica presente pois tanto as condições ambientais como hidráulicas irão influenciar na composição da população microbiana. Ocorre porém, que em reatores cujos substratos apresentam baixa concentração de matéria orgânica, existe grande dificuldade na caracterização desta população.

A quantificação de organismos metanogênicos é de fundamental importância para o tratamento anaeróbio não somente por realizarem a etapa final do processo, a conversão de acetato, hidrogênio e dióxido de carbono em metano, mas também por apresentarem lenta reprodução e serem o primeiro grupo de organismos a sucumbir quando ocorre algum stress no meio.

2. OBJETIVOS

O trabalho tem por objetivo avaliar técnicas para o monitoramento de microrganismos metanogênicos presentes em reatores anaeróbios de baixa carga. Neste contexto, podem ser apresentados como objetivos específicos:

- Definir metodologias para a complementação de informações obtidas com parâmetros convencionais de caracterização da biomassa mediante técnicas modernas como atividade metanogênica específica (AME) e reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Avaliação da biomassa acetoclástica através do teste de AME, realizada em respirômetro anaeróbio, do lodo cultivado em três substratos distintos: acetato, sacarose e mistura de ácidos graxos voláteis;
- Avaliação da técnica de PCR utilizada em conjunto com a técnica de determinação do número mais provável de organismos (NMP) para a identificação e quantificação de bactérias metanogênicas utilizando-se *primers* descritos na literatura e *primers* desenvolvidos para detecção de bactérias metanogênicas acetoclásticas;
- Testar os substratos etanol e formiato como alternativas ao acetato para avaliação de biomassa metanogênica em testes de respirometria anaeróbia; e
- Identificar possíveis relações existentes entre os resultados obtidos com as análises de sólidos suspensos voláteis, AME e PCR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Considerações Iniciais

A digestão anaeróbia é um processo biológico natural, no qual populações bacterianas interagem estreitamente para promover a fermentação estável e auto-regulada da matéria orgânica, da qual resultam principalmente os gases metano e dióxido de carbono (Horan, 1996).

A importância do processo anaeróbio no tratamento de resíduos orgânicos cresceu de forma extraordinária nas últimas décadas. Este crescimento pode ser atribuído às vantagens que este oferece em relação aos processos aeróbios convencionais. As principais vantagens são: baixo consumo de energia, por não exigir a introdução forçada de oxigênio no meio como nos processos aeróbios; pequena produção de lodo (estimativas indicam como sendo inferior a 20% da quantidade gerada em processos aeróbios convencionais); pequena necessidade de nutrientes e a possibilidade do aproveitamento energético do metano gerado.

Contudo, o lento desenvolvimento destes organismos torna-se uma dificuldade no que diz respeito a partida operacional de um reator anaeróbio, bem como a aclimação a novos substratos. Também apresentam grande sensibilidade a modificações ambientais drásticas.

3.2 Processo de Degradação Anaeróbio

A conversão anaeróbia de substratos orgânicos, como os esgotos domésticos, em metano é um processo complexo que envolve associações simbióticas entre diferentes grupos de microrganismos (figura 3.1). Em uma primeira etapa, compostos poliméricos como proteínas, lipídeos e polissacarídeos são hidrolisados pela ação de enzimas extracelulares. Da hidrólise resultam compostos solúveis, com moléculas de tamanho pequeno suficiente para que possam atravessar a membrana celular, tais como açúcares, ácidos graxos e aminoácidos.

Este material é então fermentado ou oxidado anaerobiamente a ácidos graxos voláteis, álcoois, dióxido de carbono e hidrogênio. Paralelamente à produção de ácidos, amônia é

formada pela degradação de proteínas e aminoácidos mas a concentração estabelecida geralmente não é de magnitude que possa inibir o processo (Henze e Harremoes, 1983).

Os ácidos graxos que contém mais de dois carbonos são convertidos a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Dessa forma, em um processo completo de degradação anaeróbico, todo material orgânico é degradado a acetato, dióxido de carbono e hidrogênio antes de ser transformado em metano.

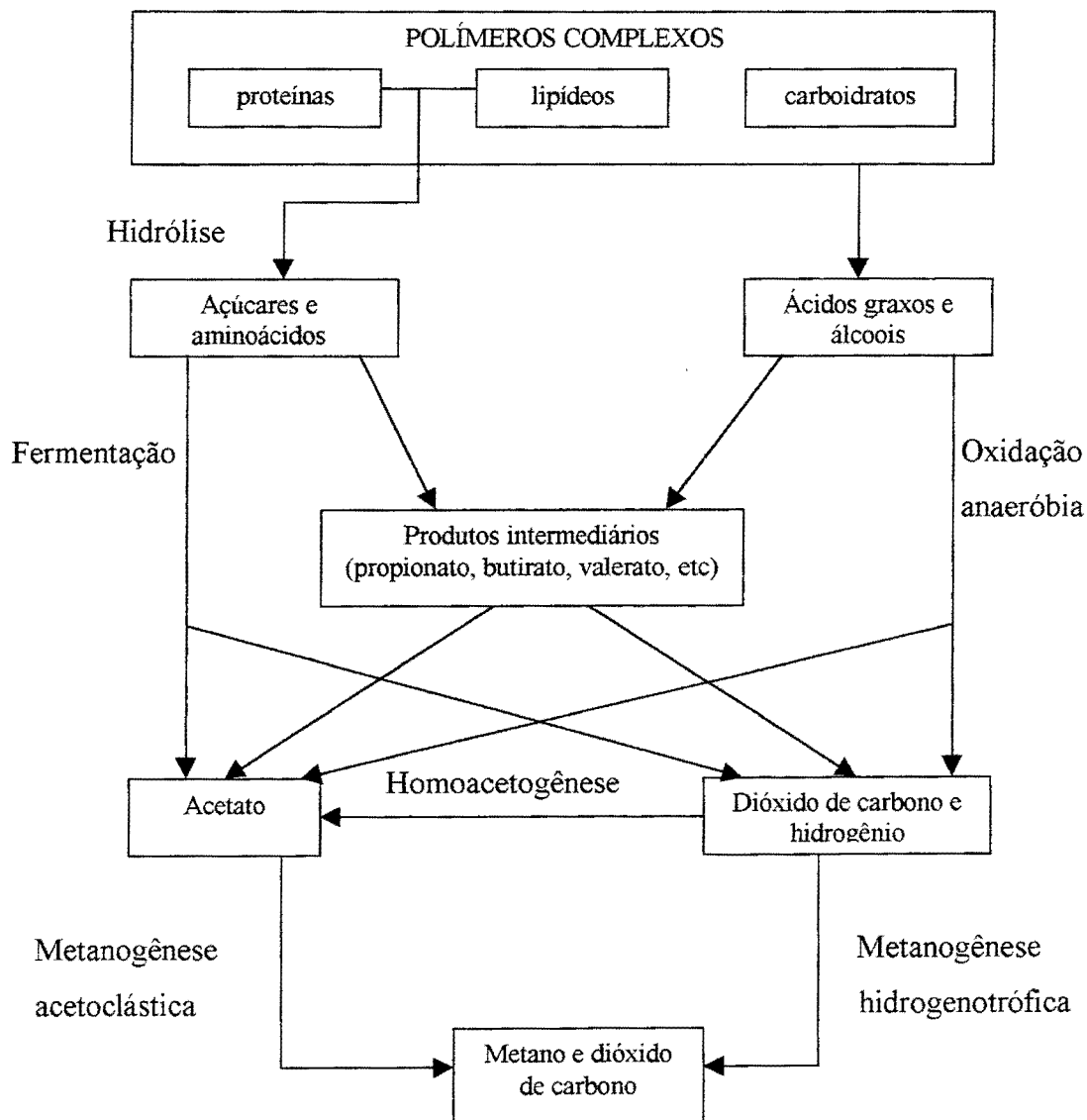


Figura 3.1: Fluxograma da digestão anaeróbica de materiais poliméricos

(Fonte: Pavlostathis and Gomez, 1991)

Os principais grupos de microrganismos que realizam este processo de degradação são as bactérias fermentativas, que produzem e excretam enzimas extracelulares; bactérias acidogênicas, que transformam aminoácidos e açúcares em ácidos graxos, hidrogênio e dióxido de carbono; bactérias acetogênicas sintróficas, que convertem álcoois e ácidos graxos em substratos específicos para as metanogênicas: acetato, formiato e hidrogênio; bactérias homoacetogênicas que sintetizam acetato a partir de hidrogênio e dióxido de carbono e bactérias metanogênicas que produzem metano e dióxido de carbono a partir de acetato, hidrogênio e dióxido de carbono.

As bactérias acetogênicas sintróficas metabolizam os produtos da fermentação hidrolítica na cadeia alimentar anaeróbia, oxidando ácidos graxos, etanol e benzoato, produzindo acetato juntamente com as bactérias que se alimentam de formiato ou hidrogênio. Através de uma análise energética, a energia livre disponível para a acetogênese a partir de etanol, propionato ou butirato com hidrogênio ou formiato como intermediário, não é termodinamicamente favorável sob condições normais (Lowe et al., 1993).

A produção e utilização de hidrogênio podem influenciar profundamente o curso da fermentação em ecossistemas anaeróbios. Perturbações com altas pressões parciais de H_2 inibem a degradação sintrófica de butirato e de propionato. Baixos níveis de hidrogênio e formiato devem ser mantidos (10^{-3} a 10^{-5} atm de H_2) via metanogênese ou redução de sulfato (Wiegant, 1986).

Bactérias metanogênicas são responsáveis pela etapa final no processo de degradação anaeróbio, realizando a remoção da matéria orgânica do sistema. São microrganismos de crescimento lento e que apresentam grande sensibilidade às condições externas, sendo o primeiro grupo a sucumbir em situações de stress ambiental. Face a isso, estudos relacionados ao processo de digestão anaeróbia voltam-se principalmente para estes organismos.

A maioria das metanogênicas utilizam hidrogênio para produção de metano e algumas destas metanogênicas hidrogenotróficas também degradam formiato. Metanogênicas acetoclásticas utilizam acetato como substrato, que é o precursor de aproximadamente 60 a 70% do metano produzido durante a digestão anaeróbia (Sørensen, 1996). Contudo, mesmo em culturas puras, o acetato não serve como único doador de elétrons para o crescimento e metanogênese. De acordo com Zeikus (1977), existe uma fermentação muito lenta de acetato em culturas que predominam espécies de *Methanosarcina barkeri* e *Methanococcus*.

Somente dois gêneros de bactérias metanogênicas que convertem acetato a metano são conhecidos: *Methanosarcina* e *Methanotrix* (ou *Methanosaeta*). Ambos gêneros crescem em baixas concentrações de acetato porém, as *Methanosarcina* não podem converter acetato em concentrações abaixo de 0,2 mM (11,8 mg.L⁻¹) enquanto que para as *Methanotrix*, o valor é de 0,01 mM (0,59 mg.L⁻¹). Sendo assim, as primeiras adaptam-se a altas concentrações de acetato enquanto que as segundas predominam em baixas concentrações. Considerando-se o processo de degradação anaeróbio, a conversão do acetato pode ser a etapa limitante tendo em vista que as metanogênicas acetoclásticas adaptam-se lentamente às mudanças ambientais (Sørensen, 1996).

Mudanças na composição da população metanogênica acetoclástica ocorrem quando o tempo de retenção hidráulico ou a taxa de alimentação é ajustada de forma a manter a concentração de acetato alta ou baixa (Fukuzaki et al., 1990). Min e Zinder (1989) relatam que *Methanosarcina* spp. predominaram logo após a partida de um digestor anaeróbio mantido a 58°C, quando a concentração de acetato ficou na faixa de 2 a 5 mM (118 a 295 mg.L⁻¹ respectivamente) enquanto que, meses após, quando a concentração caiu para valores entre 0,3 e 1,5 mM (17,7 e 88,5 mg.L⁻¹ respectivamente), *Methanotrix* spp. tornou-se mais numerosa.

Methanosarcina é o gênero mais versátil entre as metanogênicas, sendo capaz de utilizar além de acetato, H₂ + CO₂, metanol e metilaminas como substrato (Novaes, 1986 apud Monteggia, 1991). Ambos gêneros porém, *Methanosarcina* e *Methanotrix*, possuem crescimento relativamente lento, com tempos de duplicação de 24 e 72 horas, respectivamente, enquanto que as metanogênicas hidrogenotróficas duplicam-se entre 1 e 4 horas. As primeiras podem ser afetadas pela acumulação de hidrogênio, sendo importante a manutenção de baixos níveis tanto de hidrogênio como formiato (Malina and Pohland, 1992).

Determinadas populações bacterianas envolvidas na produção de metano apresentam relações mutualísticas, como *Methanobacterium* em associação com o organismo S, gram-negativo. Este organismo oxida etanol a acetato e os elétrons reduzem prótons a H₂, enquanto que as metanogênicas utilizam o H₂ para reduzir CO₂ a CH₄. Assim, as *Methanobacterium* que não metabolizam etanol, usam hidrogênio como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte de carbono, formando metano. Por outro lado, o organismo S somente fermenta etanol se hidrogênio é removido do sistema (Gaudy, 1988). Lowe et al. (1993), afirmam que

hidrogênio inibe o crescimento do organismo S em etanol obtendo-se bom crescimento somente quando bactérias metanogênicas hidrogenotróficas estão presentes.

Verifica-se este mutualismo na digestão anaeróbia de efluentes de indústrias de laticínios, onde etanol e lactato são convertidos a metano em uma associação sintrófica de três microrganismos. Nos flocos do lodo, *Desulfovibrio vulgaris* converte etanol a acetato paralelamente à redução de bicarbonato a formiato. O formiato é transferido para *Methanobacterium formicicum* que produz metano. O acetato gerado durante a oxidação do etanol é metabolizado por uma bactéria metanogênica acetoclástica, como *Methanosarcina barkeri*, a metano e dióxido de carbono (Atlas e Bartha, 1993).

Thiele et al. (1988), ao avaliarem o lodo proveniente de reator anaeróbio tratando efluente de processamento de leite, observaram maior atividade das bactérias presentes nos grânulos para conversão de etanol a acetato e metano se comparada a dos organismos presentes na forma livre. Análises microscópicas mostraram que, quando o mesmo lodo recebeu somente etanol como fonte de carbono, não foi detectada a presença de organismos na forma livre, sugerindo que substratos que dependem de associações de diferentes organismos para completa degradação propiciam a formação de grânulos.

As bioreações apresentadas no quadro 3.1 mostram a estequiometria de conversão de glicose, propionato, butirato, acetato, formiato, etanol e hidrogênio durante a digestão anaeróbia na ausência de redução de sulfato. Somente acetato, formiato e hidrogênio podem ser consumidos diretamente pelas bactérias metanogênicas.

Grotenhuis et al. (1991) observaram que em lodo proveniente de indústria açucareira, o número de organismos degradadores de glicose era dominante sobre as bactérias metanogênicas. Quando o mesmo lodo passou a ser alimentado com etanol, estes reduziram-se em um fator de 10^4 após um período de seis meses. Com propionato como substrato, este período passou para trinta e seis meses, sendo que houve um significativo acréscimo de metanogênicas hidrogenotróficas e degradadoras de formiato. Também foi constatada a presença de um pequeno número de acetoclásticas se comparado ao lodo alimentado com etanol.

Quadro 3.1 Bioreações da digestão anaeróbia de glicose, propionato, butirato, acetato, formiato, etanol e hidrogênio.

Glicose	$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \longrightarrow 2CH_3COO^- + HCO_3^- + 4H^+ + 4H_2$
Propionato	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \longrightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$
Butirato	$2CH_3(CH_2)_2COO^- + HCO_3^- + H_2O \longrightarrow 4CH_3COO^- + H^+ + CH_4$
Acetato	$CH_3COO^- + H_2O \longrightarrow CH_4 + HCO_3^-$
Formiato	$HCOO^- + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H_2$ $4HCOO^- + H_2O + H^+ \longrightarrow 3HCO_3^- + CH_4$
Etanol	$CH_3CH_2OH + H_2O \longrightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ $2CH_3CH_2OH + HCO^- \longrightarrow 2CH_3COO^- + H_2O + H^+ + CH_4$
Hidrogênio	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + 3H_2O$

(Fonte: de Zeikus, 1977)

Bactérias acetotróficas *Methanotrix* spp. e *Methanosarcina* spp. foram encontradas no lodo original. No lodo alimentado com etanol, somente foi constatada a presença de *Methanosarcina* spp. enquanto que, com propionato, predominaram *Methanotrix* spp. como indicam os resultados apresentados na tabela 3.2. A atividade metanogênica aumentou, comparada ao lodo original, quando os substratos testados foram etanol mais acetato e propionato mais acetato para os lodos alimentados com etanol e propionato, respectivamente.

Quadro 3.2. Percentagens relativas de bactérias encontradas em lodo originalmente alimentado por efluente de indústria açucareira e quando alimentado com etanol ou propionato como única fonte de matéria orgânica.

	acetotróficas		hidrogenotróficas
	<i>Methanotrix</i> spp.	<i>Methanosarcina</i> spp.	
Lodo original	20	10	15
Lodo alimentado com etanol (26 mM)	<1	20	10
Lodo alimentado com propionato (44 mM)	30	<1	40

(Fonte: Grotenhuis et al., 1991)

O acetato é produto intermediário na degradação do etanol. A elevada concentração do substrato neste caso, justifica o predomínio das espécies de *Methanosarcina*. Contudo, o mesmo não ocorreu com propionato. Observa-se um acréscimo das metanogênicas

hidrogenotróficas, que garantem baixas concentrações de hidrogênio e o predomínio das espécies de *Methanotrix*. Wiegant (1986) relata que quando propionato é utilizado como única fonte de carbono, a taxa de crescimento específico da população metanogênica acetoclástica é alta, principalmente para *Methanosarcina*, contrariamente ao encontrado por Grotenhuis et al.

Por outro lado, Guyot et al. (1990) demonstraram que bactérias acetoclásticas se desenvolveram em pequena quantidade ou não se desenvolveram ao utilizarem uma mistura de acetato e propionato como fonte de carbono em reator UASB. O crescimento das bactérias acetogênicas que alimentam-se de propionato foi responsável pelo acréscimo de sólidos suspensos voláteis contidos no lodo granular. Também foi relatada a ausência de relação estequiométrica entre a remoção de substrato e a produção de metano observada.

Em experimento realizado por Raskin et al. (1994b), dois reatores de bancada foram inoculados com lodo proveniente de um reator cujo substrato constituía-se de uma mistura de glicose e acetato. Operando a 35°C, foram alimentados durante oito meses com glicose a uma concentração de 18800 mg.L⁻¹. Após este período, um dos reatores passou a receber somente acetato, a 500 mg.L⁻¹, enquanto que o outro permaneceu com o mesmo substrato porém, com a concentração reduzida a metade. Passados três meses, ambos reatores recebiam o mesmo substrato: acetato, a 500 mg.L⁻¹.

Analisando os percentuais de organismos pertencentes aos domínios *Archeae*, *Eucaria* e *Bacteria* foi observado que no reator que permaneceu durante maior período recebendo glicose, *Bacteria* reduziram-se de 20,3% para 3,4% enquanto que *Archeae* aumentaram de 76,3% para 85,8%. As espécies de *Methanosarcina* foram as principais metanogênicas acetoclásticas presentes. No segundo reator, ao término de dez meses da mudança do substrato para acetato, havia a presença de somente 3% de *Bacteria* e de 95% de *Archeae*, sendo a maior parte de *Methanosarcinaceae* e *Methanobacteriales*. Verifica-se que em ambos os casos *Methanosarcina* é predominante, um resultado bastante previsível para as concentrações de acetato utilizadas.

3.3 Parâmetros de Influência e Controle do Processo

3.3.1 Temperatura

De acordo com Wiegant (1986), a temperatura consiste em um dos principais fatores que interferem no processo tendo em vista que os organismos apresentam faixas ótimas de crescimento e flutuações deste parâmetro levam ao desbalanceamento do sistema. Microrganismos não possuem meios de controlar a temperatura interna, sendo a temperatura da célula determinada pela temperatura externa. Bactérias metanogênicas desenvolvem-se em abundância nas faixas mesofílicas e termofílicas, ou seja, entre 20 e 45°C e acima de 55°C, respectivamente, sendo que na faixa mesofílica, a taxa máxima de crescimento e de atividade é obtida na faixa de 30-38°C.

A maioria dos processos anaeróbios são projetados para operar na faixa mesofílica. Processos de tratamento que operam na faixa termofílica são mais facilmente aplicáveis a efluentes industriais de temperaturas elevadas, como na produção de papel. Lepistö e Rintala (1995) demonstraram as facilidades da operação de reatores UASB a 70°C. Utilizando acetato como única fonte de carbono, um reator UASB inoculado com lodo termofílico e mantido a 70°C atingiu remoções de matéria orgânica na ordem de 80% e, contrariamente ao que era esperado, a atividade metanogênica específica foi maior do que a obtida a 55°C.

Atualmente grande atenção têm sido dada a aplicação de processos anaeróbios em faixas de temperatura psicofílicas (abaixo de 20°C). Sanz e Polanco (1990) avaliaram a eficiência do tratamento de efluentes municipais a 10°C, em reator de leito fluidizado, e a influência do decréscimo gradual de temperatura, de 20 para 5°C. A remoção de matéria orgânica obtida foi superior a 70%, em termos de DQO total porém, houve acúmulo de sólidos suspensos no topo do leito fluidizado, o que não ocorre a temperaturas mais elevadas.

O decréscimo lento e gradual de temperatura permitiu que os microrganismos se adaptassem às novas condições, apresentando pequeno efeito na qualidade do efluente. Concentrações de DQO e DBO efluentes tendem a aumentar com o decréscimo de temperatura contudo, recuperam seus valores iniciais em poucos dias.

O efeito da rápida redução de temperatura foi observado por Wiegant (1986). Um reator UASB cujo substrato constituía-se de mistura de sacarose e ácidos voláteis teve sua

temperatura reduzida de 55°C para 30°C com alimentação contínua, resultando no aumento da concentração de ácidos, predominantemente o acetato. Porém, mesmo com a sobrecarga na população acetoclástica, a biomassa recuperou-se completamente.

Van Lier et al. (1997) sugerem que o tratamento anaeróbio pode ser utilizado em todas as faixas de temperatura, desde que sejam observadas determinadas modificações na operação do processo. A reduzida produção de biogás em baixas temperaturas não permite um efetivo contato entre a biomassa e o efluente, que pode ser solucionado com o aumento da velocidade ascensional. Ao contrário, processos em faixas termofílicas de temperatura causam extrema turbulência, devido ao excesso de biogás produzido, acarretando no arraste do lodo. Neste caso, a solução consiste em remover o gás em diferentes níveis no reator e não somente pelo topo.

3.3.2 Carga orgânica aplicada

Processos anaeróbios de alta taxa foram originalmente desenvolvidos para o tratamento de efluentes industriais de média e alta concentração de matéria orgânica. Contudo, sua aplicação têm sido explorada para efluentes menos concentrados, com valores de DQO abaixo de 2000 mg.L⁻¹. Baixa concentração de matéria orgânica afluente acarreta em reduzida concentração de substrato no reator, podendo ainda ser inferior no interior dos grânulos quando o consumo do substrato pelas bactérias de alta atividade exceder a velocidade do transporte do substrato através dos biofilmes (Kato, 1997). Pode-se explicar a formação de grânulos de reduzido tamanho devido a esta deficiência na transferência de massa através do grânulo.

Efluentes com baixa concentração de matéria orgânica também podem conter oxigênio dissolvido, considerado tóxico para as bactérias anaeróbias. Porém, Kato (1994) testou o tratamento de efluentes sintéticos de baixa carga, contendo soluções de etanol e farinha de soja, com e sem a presença de oxigênio dissolvido, em reatores UASB mantidos a 30°C. Contrariamente ao esperado, não houve diferença na eficiência do tratamento dos efluentes que continham oxigênio dissolvido.

Tendo-se em vista que a produção de biogás será reduzida, deve-se garantir uma mistura adequada entre a biomassa e a fase líquida, aumentando-se a turbulência. Da mesma

forma como ocorre nos tratamentos a baixa temperatura, pode-se trabalhar com velocidades ascensionais mais elevadas desde que a retenção da biomassa no interior do reator não seja prejudicada.

A grande aplicação que encontra-se para o tratamento anaeróbio de efluentes de baixa carga orgânica são os esgotos domésticos, cuja DQO varia de aproximadamente 60 mg.L⁻¹ a 750 mg.L⁻¹ para populações de média e baixa renda (Silveira e Monteggia, 1998). Chernicharo e Cardoso (1998) apresentaram como alternativa, um reator UASB compartimentado, contendo três câmaras de digestão com separador individual de fases, garantindo um bom contato entre a biomassa e o afluente, velocidades ascensionais mais estáveis e menor ocorrência de zonas mortas.

3.3.3 pH e alcalinidade

Estes dois parâmetros estão fortemente relacionados, sendo o pH dependente da alcalinidade presente no sistema. O pH como único parâmetro para o controle de um processo não oferece uma indicação confiável pois se o sistema possui alta capacidade de tamponamento, a mudança no pH será mínima.

O pH do meio, juntamente com outros fatores, seleciona a população bacteriana presente no sistema. Metanogênese a partir de acetato pode ocorrer na faixa entre 6,0 e 8,0. Se o pH cair para valores inferiores a 6,0, a metanogênese será inibida e acetato poderá se acumular. A combinação de baixo pH e acumulação de acetato pode impedir a degradação de ácidos voláteis (Malina e Pohland, 1992).

3.3.4 Nutrientes

Em adição às necessidades fundamentais de macronutrientes como carbono e nitrogênio, a falta de capacidade de muitos organismos anaeróbios de sintetizar algumas vitaminas essenciais ou aminoácidos, faz com que seja necessária a suplementação de meios de cultura com nutrientes específicos para o crescimento e metabolismo (Malina and Pohland, 1992).

Hickey et al. (1991) afirmam que para a partida e operação de reatores UASB, nitrogênio e fósforo são necessários enquanto que, elementos traço como Níquel, Cobalto e Molibdênio aumentam a atividade metanogênica em digestores de laboratório e estimulam a formação do grânulo.

Todas bactérias metanogênicas utilizam amônia como fonte de nitrogênio para o crescimento. Um valor de DQO/N de 400/7 é recomendado para processos anaeróbios que tratam efluentes com altas cargas orgânicas. O requerimento de fósforo é de aproximadamente 1/7 do requerimento de nitrogênio, sendo que muitos microrganismos podem utilizar ortofosfato (Monteggia, 1991).

3.3.5 Ácidos graxos voláteis

A concentração de ácidos voláteis efluentes de um sistema anaeróbio depende do equilíbrio da população bacteriana presente neste sistema e, sendo assim, representa um bom indicador da estabilidade do processo. Ahring et al. (1995) citam que concentrações de acetato maiores que 13 mM (767 mg.L⁻¹) indicam desbalanceamento e, para um processo estável, a razão propionato/acetato deve ser inferior a 1,4. Concentrações de isobutirato ou isovalerato abaixo de 0,06 mM também indicam estabilidade do processo.

Quando um digestor anaeróbio opera em estado estacionário, ácidos voláteis estão presentes em pequenas quantidades. Contudo, quando ocorrem mudanças nas condições operacionais, há um desbalanceamento das populações bacterianas que participam das diferentes etapas do processo, levando à acumulação de ácidos voláteis, principalmente acetato. Se a capacidade tampão do meio é excedida, haverá decréscimo do pH com posterior inibição dos organismos consumidores de ácidos. Os agentes de inibição são os próprios ácidos, presentes na forma não dissociada, cujas concentrações dependem não somente da concentração total mas também do pH (Alonso, 1992).

Para observar a influência da presença de ácido acético não dissociado na metanogênese acetoclástica, foram testados lodo aclimatado em acetato onde *Methanotrix* spp. é dominante e cultura pura de *Methanosarcina barkeri*. Para o lodo aclimatado, a taxa de produção de metano decresceu com o aumento da concentração de ácido acético, sendo a taxa máxima observada à concentração inicial de 30 mM (1770 mg.L⁻¹) em pH 6,5. Para

Methanosarcina barkeri, a inibição pelo aumento da concentração de acetato somente ocorreu em pH 6,0 sendo menor na faixa de pH entre 6,6 e 7,5 com concentrações de ácido acima de 250 mM, o que corresponde a 14.750 mg.L⁻¹ (Fukuzaki et al., 1990).

Gorris et al. (1989) verificaram que a degradação de propionato em reator metanogênico alimentado com mistura de ácidos voláteis é influenciada pela concentração de acetato. Para concentrações de acetato superiores a 200 mg.L⁻¹, a mineralização de propionato foi inferior a 60% e praticamente interrompeu-se quando a concentração de acetato atingiu a faixa de 500 mg.L⁻¹. A completa degradação somente ocorreu para concentrações inferiores a 100 mg.L⁻¹. O mesmo não ocorreu para butirato, cuja degradação não foi afetada pelas diferentes concentrações de acetato.

A degradação de propionato, além de ser dependente da concentração de acetato presente, somente é termodinamicamente viável a baixas pressões parciais de hidrogênio e com a presença de pequena concentração de formiato. Estas condições são obtidas em consórcios sintróficos de bactérias acetogênicas e metanogênicas na ausência de sulfato, quando as acetogênicas convertem propionato em acetato, dióxido de carbono e hidrogênio e/ou formiato, com a subsequente utilização pelas metanogênicas. Na presença de sulfato, as bactérias redutoras de sulfato convertem propionato em acetato e sulfeto de hidrogênio (Harmsen et al., 1996).

Em experimento realizado em reator contínuo de mistura completa, utilizando esterco como substrato, Ahring et al. (1995) verificaram que as concentrações dos ácidos butírico e isobutírico representaram um excelente indicador do desbalanceamento do processo, já que estas aumentaram significativamente, na maioria dos testes realizados, após um dia de uma perturbação imposta, como a diminuição do tempo de retenção hidráulico ou aumento da temperatura. Ao contrário, a razão propionato/acetato alterou-se somente após dois dias.

A partir das referências apresentadas, pode-se concluir que diferentes sistemas anaeróbios de tratamento apresentarão diferentes níveis normais de concentração de ácidos voláteis e responderão de diferentes maneiras às mudanças nas condições ambientais. Não existe um valor absoluto de concentração de ácidos voláteis que indique a perturbação de um sistema e que seja aplicado a qualquer processo.

3.3.6 Produção de gás

Os principais gases produzidos durante a digestão anaeróbia são CH_4 e CO_2 . A taxa de produção de gases, mais especificamente a taxa de produção de metano, pode ser um indicador da eficiência do sistema. Uma redução na produção de metano para uma mesma carga orgânica aplicada, indica uma possível acumulação de produtos ácidos na fase líquida. Porém, isto é o resultado do desbalanceamento do sistema, não podendo ser utilizado como parâmetro preventivo de desordem no reator (Hickey et al., 1991).

3.4 Identificação e Monitoramento de Bactérias Metanogênicas

As bactérias produtoras de metano formam um grupo específico, de fisiologia única, distintas das bactérias típicas (*Eubacterias*), sendo classificadas em um reino separado: *Archaeobacteria*. O estabelecimento deste reino foi primeiramente baseado no estudo da composição do rRNA 16S (ácido ribonucleico ribossomal). Estes organismos se distinguem das eubactérias por ausência de peptidoglicano na parede celular; presença de lipídeos incomuns, denominados lipídeos de ligação polisoprenóides éter; e pela ocorrência de um único tRNA e rRNA 5S nos mecanismos de translação.

As bactérias metanogênicas distinguem-se dos outros membros do domínio *Archeae* na produção de enzimas, como as coenzimas M, que são essenciais para a síntese de metano e potencialmente úteis como biomarcadores de estudos ecológicos. Na última etapa da metanogênese, o grupo metil é atacado pela coenzima M metilredutase (MCR), enzima que se conserva em todas metanogênicas (Hales et al., 1996). As principais bactérias metanogênicas, frequentemente encontradas em digestores anaeróbios estão apresentadas na tabela 3.3.

A grande maioria dos métodos para o monitoramento de bactérias metanogênicas em reatores anaeróbios são indiretos, tais como a avaliação de níveis de ATP e de lipídeos de membranas celulares, atividade metanogênica específica, meios seletivos de crescimento, presença de coenzimas específicas e métodos imunológicos. Como técnicas diretas para detecção da presença de metanogênicas cita-se microscopia e técnicas de biologia molecular, como PCR (reação em cadeia da polimerase) e hibridização (Sørensen, 1996).

Quadro 3.3 Características diferenciais das bactérias metanogênicas normalmente presentes em digestores anaeróbios.

Gênero	Substrato	Fatores orgânicos de crescimento	Estimuladores	Morfologia
<i>Methanobrevibacter</i>	H ₂ +CO ₂ Formiato	Acetato Vitaminas	Acetato Cisteína Vitaminas Ext. Levedura Peptona	Pequenos bastonetes
<i>Methanocorpusculum</i>	H ₂ +CO ₂ Formiato	Acetato Vitaminas Ext. Levedura	Acetato Vitaminas Ext. Levedura Peptona	Plana
<i>Methanoculleus</i>	H ₂ +CO ₂ Formiato	Acetato Vitaminas Ext. Levedura	Acetato Vitaminas Ext. Levedura Peptona	Plana
<i>Methanospirillum</i>	H ₂ +CO ₂ Formiato	Ext. Levedura Peptonas	Acetato Vitaminas Ext. Levedura Peptona	Espiral
<i>Methanosarcina</i>	H ₂ +CO ₂ Acetato Metanol Metilaminas	p-aminobenzoato		Cocos irregulares- formam agregados de até 1 cm
<i>Methanotrix</i>	Acetato	Biotina Ext. Levedura Vitamina B		Bastonetes encapsulados

(Fonte: Holt et al., 1994, modificado)

Digestores anaeróbios, como em ecossistemas naturais, apresentam grande diversidade de organismos, muitos entre os quais ainda não foram isolados (Macario et al., 1991). De acordo com Ward et al. (1990), poucos microrganismos possuem morfologia suficientemente diferenciada para serem reconhecidos em microscópio e técnicas dependentes de meios de cultura são inadequadas para estudos da composição microbiana. Especulações apontam que aproximadamente 80% dos microrganismos presentes na natureza permanecem não identificados. O desenvolvimento de metodologias com o emprego da biologia molecular, isoladamente ou em conjunto com técnicas clássicas, apresentam-se promissoras para estudos de populações microbianas complexas.

Großkopf et al. (1998) avaliaram a diversidade e a estrutura da comunidade metanogênica em solo cultivado com arroz através de meios de cultura e sequenciamento de rRNA 16S. Os meios de cultura foram utilizados para quantificação da população metanogênica, através da técnica de NMP. Tubos foram considerados positivos quando o

metano produzido atingiu níveis de, no mínimo, 10 Pa e o número de organismos, calculado em função da massa de solo seco (a 105°C) presente em cada tubo. Foi verificada porém, uma variação do número de organismos ao longo do tempo de incubação das amostras, induzindo a resultados super ou subestimados. Os valores médios tanto para metanogênicas acetoclásticas como para metanogênicas hidrogenotróficas ficaram na faixa de 10^5 a 10^7 organismos.g solo seco⁻¹.

A avaliação da biomassa de reatores anaeróbios alimentados com substratos complexos ou com misturas de ácidos graxos voláteis, feita através de contagem direta em microscópio, indicou a presença de 10^{12} a 10^{14} organismos . gSSV⁻¹. Em termos de população (em células.mL⁻¹), haviam 10^9 bactérias utilizadoras de glicose, 10^9 metanogênicas hidrogenotróficas, 10^9 metanogênicas acetoclásticas, 10^8 a 10^9 sintróficas que utilizam etanol, 10^8 sintróficas utilizadoras de propionato e butirato e 10^7 que alimentam-se de butirato. Similarmente, no tratamento anaeróbio de efluentes de indústria açucareira, foi verificada a presença de grânulos contendo, em células.mL⁻¹, 10^{10} degradadores de sacarose, 10^9 metanogênicas hidrogenotróficas, 10^8 metanogênicas acetoclásticas e 10^7 organismos sintróficos que utilizam propionato, butirato e valerato (Malina e Pohland, 1992).

3.4.1. Atividade metanogênica específica

Testes de atividade metanogênica específica fornecem a taxa de produção de metano ou a taxa de consumo de substrato metanogênico por unidade de biomassa microbiana. Consistem em testes em batelada, sob condições ambientais controladas. O resultado é calculado a partir da medição direta da taxa de produção de metano ou consumo de um substrato, por unidade de biomassa e unidade de tempo. A biomassa é expressa como concentração de sólidos suspensos voláteis ou como volume de biomassa, quando se avalia a capacidade de conversão de ácidos voláteis em lodos de digestores anaeróbios (Monteggia, 1991). O substrato aplicado varia de uma mistura de ácidos voláteis, normalmente acético, propiônico e butírico, a um substrato simples, geralmente o acetato (James et al, 1990).

O teste é realizado em ambiente anaeróbio, o qual deve conter as condições ambientais necessárias e os nutrientes para a obtenção da atividade biológica máxima. A população de microrganismos deve estar presente em quantidade adequada e, o alimento, acima de

concentrações limitantes, para a obtenção da taxa máxima de remoção de substrato (Monteggia, 1997).

O equipamento deve ser capaz de monitorar as mudanças da atividade metabólica (produção de gás) ou o consumo do substrato com precisão satisfatória durante o período de teste. James et al. (1990) apresentam uma metodologia utilizando o respirômetro de Warburg modificado, até então usado para testes de degradação aeróbia, monitorando o consumo de oxigênio. Apresentam como uma das vantagens, a necessidade de pequena quantidade de biomassa, o que se torna atrativo para testar lodos de reatores de laboratório.

Além da avaliação da atividade metanogênica, o respirômetro anaeróbio pode ser útil para outros propósitos, como a avaliação do comportamento do lodo quando submetido a ação de compostos potencialmente inibitórios, para determinação da carga máxima aplicável e para avaliação de parâmetros cinéticos.

Dolfing e Bloemen (1985) utilizaram testes de atividade para estimar os diferentes grupos metabólicos de bactérias metanogênicas presentes em lodos procedentes de reatores anaeróbios e alimentados durante três meses com mistura de acetato, propionato e sacarose em diferentes proporções. Acetato, H_2-CO_2 e a mistura de ambos foram usados como substrato nos testes de atividade, em concentrações que variaram entre 20 a 50 mM. Foi verificado que testes com H_2-CO_2 apresentam correlação aos testes realizados com formiato, podendo este ser utilizado para estimar o potencial metanogênico hidrogenotrófico. A composição do meio de crescimento do lodo influenciou na atividade metanogênica da biomassa desenvolvida, sendo os valores médios obtidos $250 \mu mol CH_4 gSVT^{-1}.min^{-1}$ para metanogênicas hidrogenotróficas e $25 \mu mol CH_4 gSVT^{-1}.min^{-1}$ para metanogênicas acetoclásticas.

Sørensen e Ahring (1993) sugerem o emprego de testes de atividade para caracterização da biomassa e no monitoramento de reatores anaeróbios, como medidas diretas da atividade dos diferentes grupos microbianos envolvidos.

3.4.2 Níveis de coenzimas e ATP

Muitas das coenzimas presentes unicamente nas bactérias metanogênicas participam na metanogênese como transportadores de elétrons ou como transportadores de carbono (Archer and Harris, 1986). O cofator F_{420} é uma coenzima fluorescente que atua como transportador de elétrons na metanogênese e na síntese de carbono celular, estando presente em todas metanogênicas (Vogels et al. apud Van Beelen et al., 1983).

Van Beelen et al. (1983) isolaram o conteúdo do cofator F_{420} presente na mistura líquido/lodo de digestores de plantas industriais, encontrando concentrações que variavam entre 3 e 50 μM . Estas concentrações apresentaram correlações positivas com a produção de metano cujos valores estavam na faixa de 1,7 e 10 $\text{LCH}_4 \cdot \mu\text{M } F_{420}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, dependendo do tipo de processo aplicado. Diferenças no conteúdo deste cofator também foram explicadas pela presença de diferentes espécies de bactérias metanogênicas (metanogênicas acetoclásticas possuem pouca quantidade de F_{420}) em diferentes fases de crescimento.

O uso da concentração total do cofator F_{420} foi revisado e testado por De Zeeuw, em 1984 (Sørensen, 1996), onde foi observado uma correlação entre a atividade da biomassa e a quantidade presente do cofator porém, o volume de metano diário, produzido por $\mu\text{M } F_{420}$, se apresentava altamente variável. Sendo assim, foi concluído que o teste de atividade metanogênica específica era superior à estimativa do cofator F_{420} na caracterização de lodos anaeróbios.

Van der Drift e Gorris (1994) mediram o nível de vários cofatores e verificaram que estes variavam entre as diferentes metanogênicas e entre a mesma espécie em função do substrato de crescimento ou do número de testes em batelada a que foram submetidas. Não foi estabelecido uma correlação entre a taxa de utilização de substrato e os níveis de cofatores presentes. Porém, para metanogênicas acetoclásticas, foi verificado que a razão entre os conteúdos de vitamina B-12-HBI (hidroxibenzimidazolilcobamida) e STP (sarcinapterina) era independente do substrato de crescimento.

Níveis de ATP também foram medidos como tentativa de avaliar a atividade microbiana da biomassa anaeróbia. As concentrações deste parâmetro estavam relacionadas com a carga aplicada ao reator porém, variavam de acordo com a idade do lodo. Além disso,

as medidas da concentração de ATP não são específicas para bactérias metanogênicas (Sørensen, 1996).

3.4.3. Técnicas baseadas na biologia molecular

3.4.3.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR, desenvolvida em 1983 por Mullis, constitui-se em uma das mais significativas inovações na biologia molecular, permitindo replicações *in vitro* de sequências de DNA (Steffan e Atlas, 1991). Têm sido rotineiramente utilizada na detecção e identificação de microrganismos no seu habitat natural, bem como na exploração da diversidade microbiana (Muyzer, 1999). Com a amplificação de regiões específicas do DNA, que é copiado bilhões de vezes, produz-se quantidade suficiente desta amostra para que seja adequadamente testada (Brown, 1995).

A molécula de DNA possui uma estrutura de dupla fita antiparalela, cujos monômeros são nucleotídeos unidos entre si por ligações fosfodiéster. Cada nucleotídeo é formado por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato. As bases nitrogenadas são divididas em dois grupos: purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (timina e citosina). Sempre, em condições normais ou fisiológicas, uma purina irá parear com uma pirimidina. Mais especificamente, uma adenina pareia com uma timina e uma guanina, com uma citosina. Este pareamento acontece devido à formação de pontes de hidrogênio específicas entre as bases das duas fitas. As extremidades do nucleotídeo constituem-se do terminal desoxirribose (denominado extremidade 3') e do terminal fosfato (extremidade 5').

Um gene é qualquer segmento de DNA que codifica para um RNA que, potencialmente, pode ser traduzido em uma estrutura primária de aminoácidos. O gene também codifica para um polipeptídeo, que pode vir a formar uma estrutura mais complexa, como uma proteína. Uma vez que as células produzem milhares de proteínas, uma molécula de DNA contém milhares de genes, um para cada proteína (Pelczar, 1997). Para a utilização da técnica de PCR na detecção de organismos, a sequência exata dos nucleotídeos, que constituem um gene específico do organismo, deve ser conhecida (Lewin, 1994). Atualmente, mais de 47.000 genes já foram sequenciados, contendo aproximadamente 3 bilhões de bases (National Center for Biotechnology Information, 1999).

Um *primer* é uma pequena sequência de DNA, que será amplificado na reação de PCR. Podem ser específicos a uma sequência particular de nucleotídeos ou podem ser universais. Estes últimos são sequências complementares comuns a uma série particular de moléculas de DNA, ligando-se a uma grande variedade de padrões (Veilleux, 1999).

A amplificação é obtida com uma série repetitiva de ciclos realizados em termociclador que envolvem a desnaturação, anelamento de *primers*, e polimerização, resultando em uma acumulação exponencial de um fragmento específico de DNA (figura 3.2). Como os produtos sintetizados em um ciclo servem como matriz para o próximo, o número de cópias de DNA dobra a cada ciclo. Assim, 20 ciclos de PCR levam a uma amplificação de aproximadamente 2^{20} (Erich, 1989).

Em uma reação típica de PCR, a desnaturação da dupla fita de DNA é obtida com o aquecimento da amostra a temperaturas entre 90 e 95°C. Os *primers* anelam-se com suas sequências complementares quando ocorre o resfriamento para 40 a 60°C seguido pelo aquecimento a 70-75°C para a polimerização. Esta última etapa somente é possível com a presença da enzima Taq polimerase, isolada do organismo *Thermus aquaticus*, uma eubactéria termofílica que se desenvolve em temperaturas entre 70 e 75°C. Para a detecção do DNA amplificado, as amostras são analisadas em gel de agarose e visualizadas com brometo de etídio, um corante fluorescente que se intercala entre as duas fitas de DNA.

O processo requer amostras de DNA relativamente livres de impurezas que são obtidas através da ruptura celular seguidas de um processo de purificação. Steffan e Atlas (1991) citam que é possível a detecção de até 100 células por 100g de amostra de solo, água ou sedimentos.

A técnica de PCR quando acompanhada de técnicas de clonagem e sequenciamento, é capaz de identificar os microrganismos presentes em uma população complexa. Porém, requer uma extensiva análise de um grande número de clones e as espécies presentes em pequena percentagem não são detectáveis (Amann et al., 1995; Muyzer et al., 1993).

Um risco potencial quando faz-se a amplificação de um gene a partir de uma cultura mista de DNA é a formação de sequências quiméricas, ou seja, sequências formadas a partir da combinação de genes de diferentes espécies, fornecendo falsa impressão da biodiversidade da comunidade microbiana (Kopczynski, 1994). Amann et al. (1995) reportam que a análise

do sequenciamento de cinco clones obtidos de uma cultura aparentemente pura de bactéria estritamente psicrófila e barófila (vivem em ambientes de elevadas temperatura e pressão) mostrou a presença de duas sequências com 90% de semelhança do rDNA 16S desta cultura.

Godon et al. (1997) caracterizaram a comunidade microbiana presente em reator anaeróbio analisando 556 clones aos quais 460 pertenciam ao domínio *Bacteria* e 96 ao domínio *Archaea*. Embora o número total de espécies não tenha sido determinado, foi verificada a presença de inúmeros gêneros cuja função ainda é desconhecida. Isto somente foi possível com o emprego desta técnica, que não requer a cultura dos organismos.

Primers específicos têm sido utilizados para amplificar fragmentos de sequências gênicas a fim de detectar a presença de organismos específicos ou grupos de organismos em testes clínicos, alimentos e amostras ambientais (Head et al., 1998). Para tanto, basta que seja conhecida a sequência de um gene ou genes que pertençam unicamente a este organismo ou ao grupo de organismos. Contudo, a seleção de *primers* específicos e eficientes é, de certa forma, empírico. Não existem regras que, se forem seguidas, garantirão o sucesso da reação de amplificação (Erlich, 1989).

Hales et al. (1996) utilizaram a técnica de PCR para identificação de bactérias metanogênicas em banhados. Os *primers*, específicos para metanogênicas, foram desenvolvidos a partir de sequências disponíveis no *GenBank* para a subunidade alfa da enzima MCR. Embora a quantificação dos organismos não se fizesse necessária, os autores encontraram uma redução da ordem de 10 vezes na quantidade de DNA extraído de amostras coletadas na superfície do que nas amostras coletadas em maior profundidade.

Head et al. (1998) citam como vantagem deste método a alta especificidade e sensibilidade e, a principal desvantagem, a dificuldade em fazer análises quantitativas. Métodos estatísticos baseados nas estimativas de número mais provável de organismos têm sido utilizados porém, a utilização de padrões internos competitivos mostram-se mais eficientes. Smalla et al. (1993) afirmam que a técnica de PCR pode, no máximo, ser considerada semiquantitativa. Em contrapartida, Felske et al. (1998) apontam como a principal razão para utilizar-se PCR como técnica quantitativa a sua alta especificidade e sensibilidade em comparação com a especificidade e sensibilidade de outras técnicas, independentemente das interferências a que está sujeita.

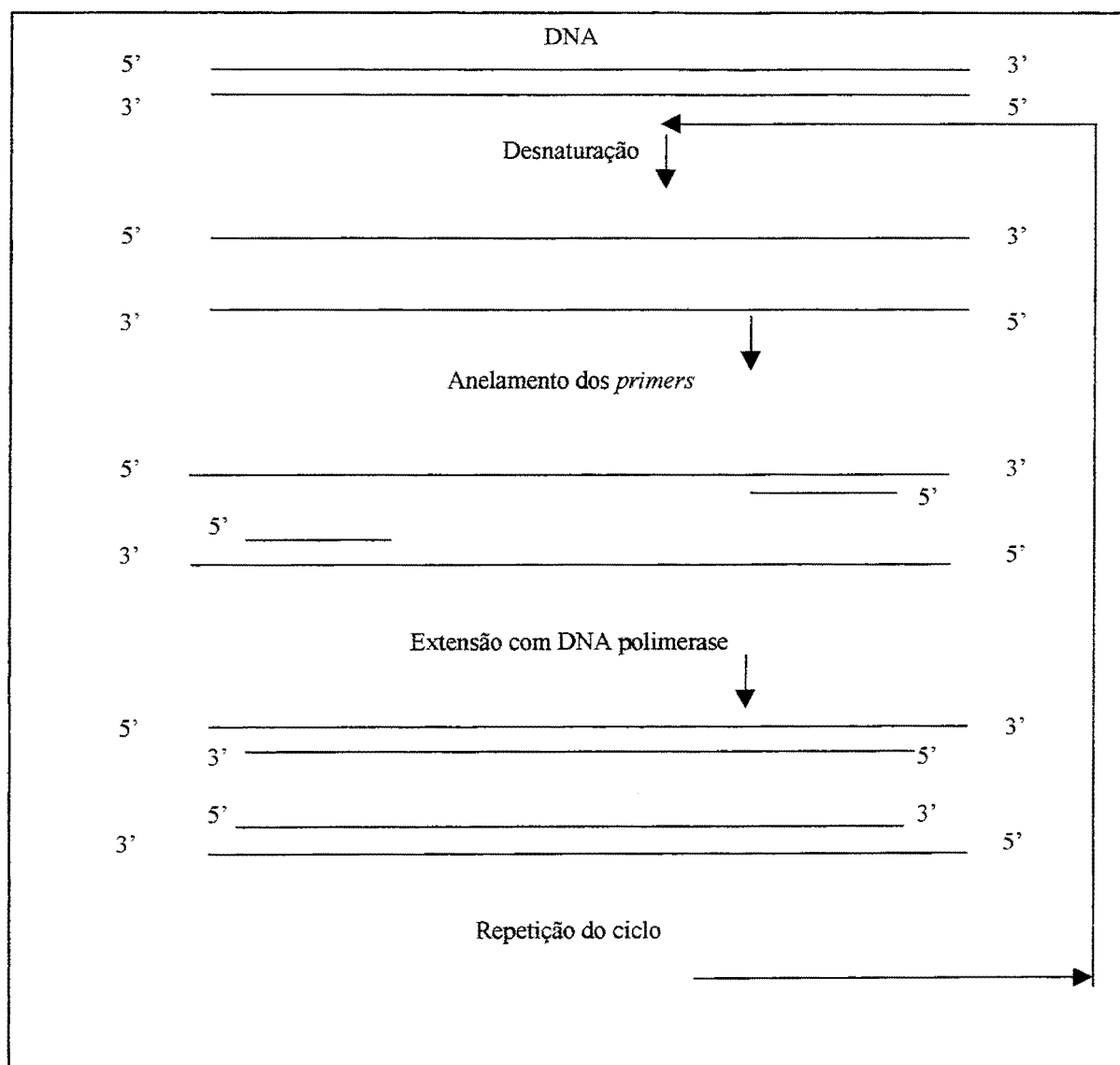


Figura 3.2 Ciclo de PCR

Fonte: Lewin, 1994.

Segundo Stefanie et al. (1998) a quantificação de organismos específicos é viável através da combinação da técnica de PCR com a técnica de determinação do número mais provável de organismos (NMP). Diferentes diluições do DNA são amplificadas em PCR e a concentração é estimada pela visualização dos produtos no gel de agarose. Rosado et al. (1997) relatam que as séries de diluições são normalmente feitas em triplicata, após um teste preliminar com uma série de dez diluições para determinar o ponto onde a reação de PCR torna-se negativa.

A limitação desta técnica é que a sensibilidade não depende somente da quantidade total de DNA do organismo a ser detectado, que pode ser acrescido pela extração de maiores quantidades de amostra, mas também da razão entre o DNA do organismo e do total extraído da amostra. Diviacco et al. (1992) e Siebert e Larrick (1992) indicam como técnica mais confiável para quantificação de PCR, a coamplificação de um DNA de referência que compartilha com a mesma sequência alvo, o mesmo sítio no *primer* e quase na totalidade da sequência amplificada. Sendo assim, as duas amostras competem pelo mesmo *primer*, amplificando na mesma taxa. Os dois produtos de amplificação podem ser reconhecidos devido aos seus diferentes tamanhos em gel de agarose.

Como o DNA a ser quantificado e o competidor são amplificados no mesmo tubo e compartilham o mesmo sítio de reconhecimento no *primer*, eles competem por amplificação. Como consequência, qualquer variável que afete a amplificação tem o mesmo efeito em ambos. Em um típico experimento de PCR competitivo, quantidades crescentes de um competidor conhecido são adicionados a uma quantidade fixa de DNA a ser quantificado. A razão entre os produtos de amplificação para as duas espécies é avaliado em cada ponto. A partir desta razão, que reflete precisamente a razão entre a quantidade inicial dos dois padrões, a quantidade de DNA desconhecido pode ser avaliado.

Baek e Kenerley (1998) utilizaram esta técnica com sucesso para detectar e quantificar determinada espécie de fungo geneticamente modificado em amostras de solo. Contudo, como uma sequência de DNA competidora não é facilmente disponível, o principal problema apresentado por esta técnica é a construção de competidores, que pode muitas vezes ser um longo trabalho de mutagênese e clonagem.

Para estudar as associações entre bactérias metanogênicas e metanotróficas, Miguez et al. (1999), utilizaram a tecnologia de PCR juntamente com métodos clássicos para o monitoramento de organismos metanotróficos em reatores híbridos anaeróbios-aeróbios. As amplificações de PCR basearam-se em fragmento do gene da enzima metanomonoxigenase. Foi verificado que o método detectava a presença de no mínimo 2000 genes da enzima por grama de lodo granular, o que indica excelente sensibilidade, e que houve boa relação entre a população que possui o gene da enzima testada com a população que exibe atividade nesta enzima.

3.4.3.2. Hibridização

Raskin et al. (1994a, 1994b) introduziram a caracterização de bactérias metanogênicas em reatores anaeróbios com o uso de sondas de hibridização de que, analogamente à técnica de PCR, apresentam alta especificidade para sequências gênicas. Amann et al. (1995) citam que as sondas tornam-se mais sensíveis com a utilização conjunta de marcadores, como corantes fluorescentes; a utilização de marcadores com grande sensibilidade ou o uso de múltiplos marcadores. Dependendo do organismo, uma técnica será mais sensível que outra.

A técnica de hibridização também pode ser utilizada quantitativamente. Os ácidos nucleicos, extraídos da amostra, são imobilizados em membranas, lado a lado com diluições do ácido nucleico puro do organismo que deseja-se quantificar. Subsequentemente, as membranas são hibridizadas com sondas de oligonucleotídeos marcadas com ^{32}P com diferentes níveis de especificidade. A quantificação é feita utilizando-se as curvas padrão obtidas com os ácidos nucleicos puros. Um resultado típico é expresso como porcentagem de uma sonda específica em relação a uma sonda universal. Sua principal limitação é que o organismo a ser quantificado deve desenvolver-se em culturas puras (Polz e Cavanaugh, 1997).

3.4.4 Testes imunológicos

Análises imunológicas têm sido amplamente utilizadas para detecção e quantificação de bactérias metanogênicas (Macario e Conway de Macario, 1988; Grotenhuis et al., 1991; Macario et al., 1991; Visser et al., 1991).

Testes com utilização de imunofluorescência utilizam corantes fluorescentes, como fluoresceína e rodamina, que podem ser adicionados aos anticorpos sem que sua especificidade seja alterada, permitindo sua identificação em microscópio de fluorescência. Os testes podem ser realizados de forma direta ou indireta. No teste direto, o anticorpo é conjugado com o corante e aplicado diretamente. No teste indireto, o anticorpo é aplicado diretamente no substrato e visualizado ao receber um tratamento com soro de anti-imunoglobulina marcada com corante.

A técnica indireta apresenta inúmeras vantagens. Com a formação de uma dupla camada de anticorpos, a fluorescência é mais brilhante pois diversas moléculas de anti-*imunoglobulina* serão ligadas a cada molécula de anticorpo presentes na primeira camada. É necessária a preparação de somente um reagente marcado com corante, a anti-*imunoglobulina*.

Quando deseja-se visualizar um anticorpo específico, utiliza-se o “teste sanduíche”. Neste teste as células são primeiramente fixadas para que o anticorpo não seja arrastado para o exterior quando então recebem tratamento com solução do antígeno específico. Se o anticorpo estiver presente na célula, o antígeno ficará retido na superfície celular. Sua identificação é feita quando o anticorpo marcado com corante é adicionado e visualizado em microscópio de fluorescência. Este teste é assim denominado pois o antígeno fica retido entre o anticorpo presente na célula e o anticorpo que é adicionado para sua identificação (Roitt, 1980).

Nos testes imunoenzimáticos, enzimas como peroxidase ou fosfatase são ligadas aos anticorpos, substituindo os marcadores fluorescentes. Sua visualização é feita através de métodos histoquímicos convencionais, tanto em microscópio eletrônico como em microscópio convencional.

O teste ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) é baseado nesta técnica e em 1984, D.B. Archer fez a primeira tentativa de utilizar este teste para detecção e quantificação de *Methanosarcina barkeri* e *Methanobacterium* sp. (Bryniok and Trösch, 1989a). Este método porém, não se mostrou adequado para quantificação de pequenas quantidades de metanogênicas presentes em co-culturas.

Bryniok e Trösch (1989a, 1989b) desenvolveram dois testes ELISA: o teste indireto e o teste sanduíche, capaz de determinar quantitativamente espécies de metanogênicas em concentrações de aproximadamente 10^5 bactérias.mL⁻¹, tanto em culturas puras como em populações complexas. Sørensen e Ahring (1997) aperfeiçoaram o teste ELISA para quantificação dos principais grupos de bactérias metanogênicas presentes em digestores anaeróbios.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Considerações Gerais

A etapa experimental foi realizada no Laboratório de Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas e no Laboratório de Radiologia Molecular e Mutagênese do Instituto de Biotecnologia, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, durante um período de oito meses, de outubro de 1998 a maio de 1999.

Construíram-se três reatores de manto de lodos de fluxo ascendente (UASB) em acrílico, (figura 4.1) cada um com volume útil de 17 litros. Para a zona de digestão, utilizaram-se colunas cilíndricas, já disponíveis no laboratório, com 12 cm de diâmetro, 140 cm de altura e dotadas de fundo cônico, constituindo um volume de aproximadamente 11,4 litros. A zona de decantação, projetada para conter cerca de 30% do volume total do reator, possuía 20 cm de diâmetro e 24 cm de altura.

Os gases gerados durante o processo eram retirados através do separador de fases, localizado na zona de decantação. Este separador consistia em um funil de vidro, com 15 cm de diâmetro na extremidade maior, colocado de forma invertida e fixado na tampa do reator. Os gases coletados eram desviados para uma garrafa de Drashoff de 250 mL de volume, onde após borbuharem em uma lâmina de aproximadamente 7 cm de água, eram lançados na atmosfera. O objetivo deste frasco era manter o selo hidráulico no separador de fases do reator com a mesma altura da lâmina de água colocada no frasco, ou seja, 7 cm. O efluente era coletado em uma calha interna, provida de vertedores triangulares e enviado diretamente a rede de esgotos do laboratório.

A temperatura interna foi mantida constante, a 35°C, através do sistema de aquecimento dos reatores e da alimentação. Os reatores foram aquecidos pela circulação externa de água a 40°C em mangueira plástica disposta em forma de serpentina até uma altura de aproximadamente 60 cm. Esta água foi mantida aquecida por um aquecedor/termostato, colocado em recipiente com capacidade de 40 litros e a circulação da água realizada através de bomba centrífuga.

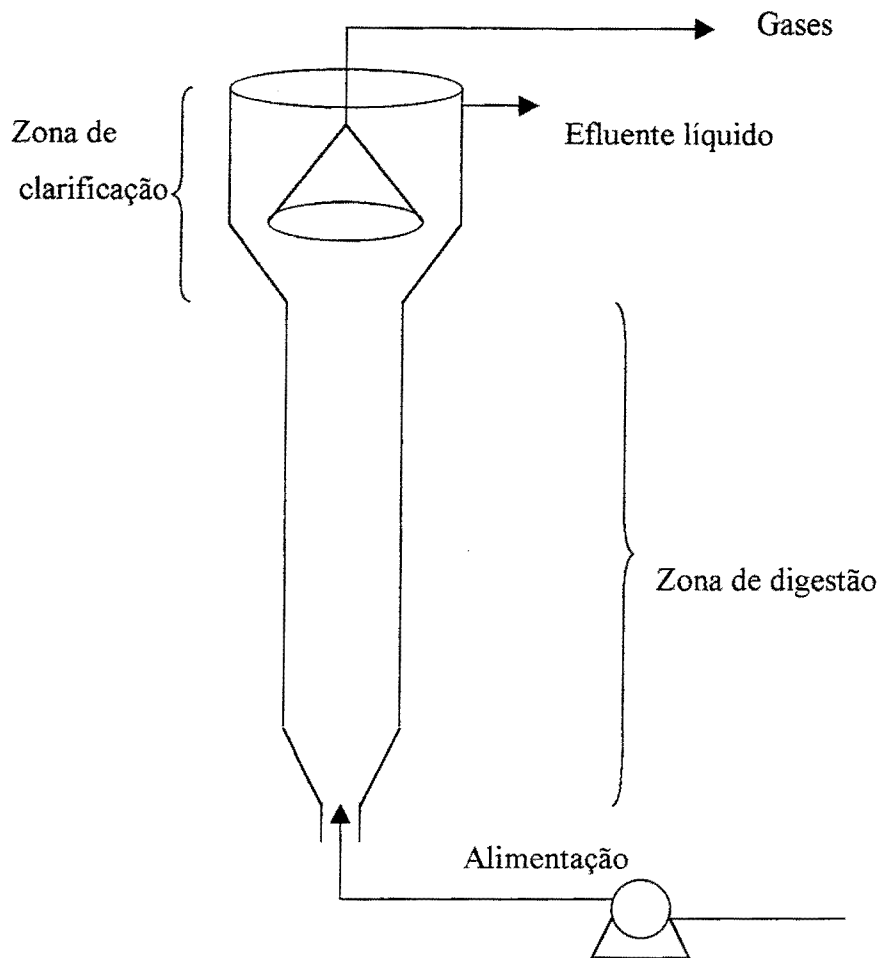


Figura 4.1 Esquema dos reatores UASB

As mangueiras de alimentação, também de material plástico, foram enroladas como serpentina em um tubo de PVC, fixado no recipiente do banho aquecido. Dessa forma, a alimentação recebeu pré-aquecimento antes de chegar ao reator.

4.2. Alimentação dos Reatores

Os reatores foram alimentados com diferentes substratos sintéticos para favorecer o desenvolvimento de diferentes grupos bacterianos envolvidos na cadeia trófica anaeróbia. O reator A recebeu acetato de sódio como substrato para que se verificasse o desenvolvimento das bactérias metanogênicas acetoclásticas; o reator M foi alimentado com uma mistura de ácidos graxos voláteis ou seus respectivos sais, ou seja, acetato de sódio, propionato de cálcio

e ácido butírico a fim de que se desenvolvessem, além das bactérias metanogênicas acetoclásticas, as bactérias acetogênicas e as metanogênicas hidrogenotróficas. As proporções de cada ácido foram 50%, 35% e 15%, em DQO, respectivamente, simulando percentuais aproximados destes ácidos em esgotos domésticos. O reator S foi alimentado com sacarose (açúcar comercial), garantindo a presença das populações microbianas já citadas e das bactérias acidogênicas, produtoras de ácidos.

Além das fontes de matéria orgânica, foram adicionados nitrogênio na forma de cloreto de amônio comercial ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$); fósforo, na forma de fosfato trissódico comercial ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) e extrato de levedura ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$). Potássio foi adicionado na forma de sulfato de potássio ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$), que além de ser utilizado como nutriente, garantiu o potencial redutor do meio.

Os substratos foram preparados a cada três dias, com água de torneira, e mantidos a temperatura entre 3 e 5 °C. Os reatores alimentados com a mistura de ácidos voláteis e com sacarose também receberam a adição de bicarbonato de sódio para manutenção do pH na faixa neutra.

Devido à capacidade do resfriador utilizado para estocagem dos substratos, dois tanques de alimentação possuíam volume útil de 140 litros enquanto o terceiro tanque somente possuía capacidade para 60 litros. Inicialmente a mistura de ácidos voláteis foi armazenada no menor tanque, de forma que o reator M, alimentado com esta mistura, possuía o maior tempo de retenção hidráulico, aproximadamente 20 horas. Os reatores A e S operavam com tempos de retenção hidráulico de 9 horas.

As concentrações de DQO foram mantidas em aproximadamente 600 mg.L^{-1} . Após dois meses de operação, ao verificar-se a reduzida eficiência do reator alimentado com acetato, este substrato passou a ser armazenado no tanque de menor tamanho, de forma que o tempo de retenção hidráulico passou a ser 20 horas para o reator A e 9 horas para o reator M.

A partir do terceiro mês, para que se realizasse um melhor estudo comparativo entre os três reatores, decidiu-se diminuir o tempo de retenção hidráulico do reator A e aumentar gradativamente a concentração de acetato de forma que a carga orgânica aplicada fosse igual para todos, ou seja, aproximadamente $1,6 \text{ Kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

4.3. Partida e Controle Operacional

O trabalho experimental teve início com dois reatores; reator A, alimentado com acetato e reator S, alimentado com sacarose, ambos com concentração de DQO de aproximadamente 1000 mg.L^{-1} . Foram inoculados dois litros de lodo proveniente do reator anaeróbio da Estação de Tratamento de Efluentes Parque da Matriz, localizado no município de Cachoeirinha, RS, em cada reator experimental.

O tempo de retenção hidráulico inicial foi de 24 horas e gradativamente reduzido para 9 horas. Após um período de duas semanas, os dois reatores apresentaram efluente com pH extremamente ácido, juntamente com grande quantidade de sólidos. Decidiu-se descartar o lodo e começar o experimento novamente.

Para a segunda partida, foi utilizado o mesmo inóculo e os mesmos substratos porém, com concentrações iniciais de DQO de 200 mg.L^{-1} . O tempo de retenção hidráulico inicial foi de 30 horas e sua redução, até que atingisse 9 horas, foi muito lenta, de modo a permitir o crescimento da população metanogênica. Quando o tempo de retenção hidráulico desejado foi atingido, a concentração de DQO foi gradativamente aumentada até o valor de aproximadamente 600 mg.L^{-1} . Optou-se por não mais trabalhar com valores de DQO de 1000 mg.L^{-1} para prevenir possíveis acidificações.

Um mês após, iniciou-se a operação do terceiro reator, alimentado com a mistura de ácidos voláteis. Foram utilizados os mesmos procedimentos para a partida, de forma que não houveram problemas de acidez ou de arraste de biomassa. Os parâmetros utilizados para o controle durante a partida foram pH, potencial redox e alcalinidade, analisados diariamente, e ácidos voláteis em menor frequência.

4.4 Monitoramento da Biomassa Anaeróbia

O lodo foi coletado mensalmente e o monitoramento feito através das análises de sólidos voláteis totais como previamente descrito por APHA (1985); PCR e atividade metanogênica específica para o acompanhamento da população metanogênica. Como o experimento foi realizado em escala laboratorial e houve pouca geração de lodo, não foi

possível coletar quantidade suficiente de amostra para que as análises fossem feitas em duplicata.

Além do lodo dos reatores experimentais, testou-se o lodo proveniente do reator anaeróbio da Estação de Tratamento de Esgotos Parque da Matriz, utilizado como inóculo, e o lodo proveniente do reator anaeróbio de uma indústria de gelatina, alimentado com elevada carga orgânica.

4.4.1. Atividade metanogênica específica

A determinação da atividade metanogênica do lodo foi realizada em respirômetro anaeróbio, composto de oito reatores que operam em batelada, cada um com volume útil de 450 mL. A temperatura foi mantida constante, em 35°C e calculou-se o resultado do teste a partir da medição direta da taxa de produção de metano por unidade de biomassa e unidade de tempo.

A taxa de produção de biogás foi monitorada continuamente com auxílio de interface digital acoplada a um computador pessoal com *software* adequado para processamento e visualização dos resultados. Análises da composição dos gases foram feitas no cromatógrafo gasoso Varian 3700, coluna 80/100 Chromosorb 102 MR 70938, com detector de condutividade térmica, gás de arraste Hélio, a partir de amostras coletadas manualmente. Biomassa foi expressa como concentração de sólidos suspensos voláteis (APHA, 1985).

Em cada reator colocou-se aproximadamente 2000 mg SVT.L⁻¹ e completou-se o volume do reator com uma solução mineral, contendo os produtos químicos requeridos para a atividade metabólica dos microrganismos. Sua formulação consiste de KH₂PO₄ (1,5 g.L⁻¹); K₂HPO₄ (1,5 g.L⁻¹); NH₄Cl (0,5 g.L⁻¹); Na₂S.7H₂O (0,05 g.L⁻¹); e extrato de levedura (0,2 g.L⁻¹).

Após a adição do lodo e da água de diluição, fez-se o ajuste do pH com bicarbonato de sódio, para valores próximo a faixa neutra, quando necessário. A purga dos eventuais traços de oxigênio e a substituição do volume de ar atmosférico contido na parte superior dos frascos de digestão foi feita com gás nitrogênio. O período para aclimatação do lodo às condições de ensaio foi de aproximadamente duas horas, quando então adicionava-se o substrato.

Considerou-se o início do teste a partir do momento da injeção do substrato e coletou-se amostras de gases para determinação do percentual de metano em intervalos de tempo de uma ou duas horas, de acordo com a vazão produzida.

Testou-se diferentes substratos: acetato, etanol, formiato e a mistura de acetato com etanol. Para os substratos simples utilizou-se concentração de DQO de 1000 mg.L⁻¹, para garantir um teste de curta duração, dificultando o crescimento da biomassa. Para a mistura de substratos, acetato e etanol, manteve-se a concentração de cada substrato simples, resultando em concentração de DQO de 2000 mg.L⁻¹. Nos testes de atividade metanogênica realizados com o lodo inoculado, utilizou-se também sacarose como substrato.

Ao término do teste, mediu-se o pH e coletou-se 2 mL de amostra para análise de ácidos voláteis, que foram realizadas no cromatógrafo gasoso Varian 3700, coluna 60/80 Carbowax 20M/0,1% H₃PO₄, detector FID, gás de arraste Hélio.

Com os dados das análises de gás obtidos ao longo do experimento, construiu-se a curva da variação do percentual de metano. Conhecendo-se a vazão total de gás, que foi armazenada pelo computador, e o percentual de metano, calculou-se a vazão de metano. A atividade metanogênica específica foi determinada dividindo-se a vazão de metano pela massa de sólidos suspensos voláteis presente no reator.

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase

A construção do *primer* para identificação de bactérias metanogênicas acetoclásticas foi realizada com o auxílio do banco de dados e *software* disponíveis no GenBank (National Center for Biotechnology Information, 1999). Em uma primeira etapa, fez-se uma busca de sequências específicas de microrganismos acetoclásticos, cujo resultado foi a subunidade alfa da enzima CODH (carbon monoxide dehydrogenase) envolvida na formação de metano a partir de acetato. Esta enzima somente é encontrada em arqueobactérias acetoclásticas anaeróbias obrigatórias.

A sequência do DNA desta enzima, encontrada em *M. thermofila*, foi comparada com outras espécies, com o objetivo de encontrar sequências semelhantes em arqueobactérias

acetoclásticas anaeróbias obrigatórias. Chegou-se na sequência de CODH em *M. frisia*. Estas duas sequências foram comparadas entre si e verificou-se a sua semelhança em 81% de sua extensão, indicando sua conservação em duas espécies distintas de microrganismos.

Baseando-se nestes dados, construiu-se dois *primers* para esta enzima, um para cada fita de DNA, com nucleotídeos degenerados nas posições em que estes não se igualavam nas duas espécies. Isto significa que, se em determinada posição da sequência o nucleotídeo é A, por exemplo, e em outro organismo é C, o *primer* poderá emparelhar-se com ambas.

A degeneração nas sequências de nucleotídeos advém do processo evolutivo dos microrganismos, mutações ou erros. Desta forma, construindo-se os *primers* com posições degeneradas, amplia-se a amostragem populacional. Caso contrário, poderíamos estar subestimando a população de acetoclásticas presentes nos reatores experimentais, tendo em vista que muitas espécies ainda são desconhecidas.

Para extração do DNA diretamente do lodo, utilizaram-se duas amostras de 600 μL cada. Adicionou-se às mesmas igual volume de fenol tamponado em pH 8,00 e incubou-se a 55°C durante 60 minutos. Após, centrifugou-se as amostras a 13000 rpm durante 3 minutos (microcentrífuga de bancada não refrigerada com timer, Incibrás) e retirou-se o sobrenadante, desprezando-se o material sedimentado. Adicionou-se então 60 μl de NaCl 5 M e 1000 μL de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ a 100%, gelado, centrifugando-se novamente a 13000 rpm, durante 10 minutos. O líquido foi desprezado e após a secagem do tubo, ressuspendeu-se a amostra em 100 μL de água Milli-q[®] ou TE (Tris-EDTA) em pH 8,00 (Sambrook et al., 1989).

Após, fez-se a purificação da amostra, adicionando-se 10 μL de RNase em concentração de 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e incubou-se durante 1 hora a 37°C. Ao término deste período, adicionou-se 110 μL de fenol tamponado em pH 8,00 e centrifugou-se, durante 3 minutos, a 13000 rpm. Retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para outro tubo, onde adicionou-se 11 μL de NaCl 5 M e 220 μl de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (100%) gelado. Centrifugou-se na mesma rotação durante 10 minutos e desprezou-se o conteúdo líquido. Novamente, após a secagem do tubo, ressuspendeu-se a amostra em 100 μL de água Milli-q[®] ou TE (Tris-EDTA) em pH 8,00 e estocou-se a -20°C.

As amostras foram submetidas a 30 ciclos de amplificação em termociclador (MJ Research / PTC-100) com a programação apresentada no quadro 4.1. Os *primers*, sintetizados

pela Carl Roth GmbH, Alemanha, têm suas sequências apresentadas no quadro 4.2. Em cada tubo de reação foi adicionado 1 µL de amostra; 0,5 µL de Taq polimerase e 23 µL de solução-mãe, constituída de 26,25 µL de tampão de PCR; 26,25 µL de MgCl₂ 25 mM; 26,25 µL de dNTP's; 10,5 µL de *primer* e 152,25 µL de água estéril.

Quadro 4.1 Programa utilizado para os ciclos de amplificação.

Etapa	Temperatura(°C)	Tempo(min)
1	94	0,7
2	50	1,5
3	72	3
4	72	10

Quadro 4.2 Sequência dos *primers*

Primer	sequência
CDH1	5'> CAT ACG G(CT)C C(AC)T GTG ACC T(CT) <3'
CDH2	5'> CAT ACC AGA (AC)GG GTT GTC C(CT) <3'
ME1	5'> GCC ATG CAG ATC GGA ATG TC <3'
ME2	5'> TCA TGG CGT AGT ATG GGT AGT <3'

Os *primers* CDH1 e CDH2 são específicos para bactérias metanogênicas acetoclásticas e os *primers* ME1 e ME2 são específicos para bactérias metanogênicas, de acordo com trabalho realizado por Hales et al. (1996).

Para que se obtivesse uma estimativa da contagem de células metanogênicas e metanogênicas acetoclásticas presentes na amostra de DNA extraída do lodo, utilizou-se em conjunto as técnicas de determinação do número mais provável de organismos (NMP), segundo APHA (1985), com PCR, conforme descrito por Stefanie et al (1998). Tomou-se uma alíquota de 100 µL de amostra e diluiu-se até 1000 µL. Desta solução, coletou-se novamente uma alíquota de 100 µL e diluiu-se a 1000 µL e assim sucessivamente, de forma que as diluições obtidas foram de 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000 e 1:100.000.

Cada diluição foi submetida à reação de PCR para determinar o ponto no qual o teste tornou-se negativo. Após, foram realizadas análises para as três últimas diluições, incluindo a diluição com resposta negativa, com cinco repetições para cada diluição. As amplificações foram resolvidas por eletroforese, voltagem constante de 70 V, em gel de agarose a 1,5%(p/v), corados com brometo de etídio.

Em todos os testes utilizou-se uma amostra controle, com DNA de bactéria aeróbia, e um tubo sem amostra (branco). Nos testes realizados tanto com o lodo inoculado, como com o lodo proveniente da indústria de gelatina, somente verificou-se a diluição na qual a reação de PCR tornou-se negativa, não quantificando-se os organismos.

4.5 Monitoramento dos efluentes líquidos

Foram coletadas amostras simples dos afluentes e efluentes líquidos em dois dias semanais. As análises efetuadas e os métodos utilizados, segundo APHA (1985), estão indicados no quadro 4.3.

Quadro 4.3 Análises realizadas para o monitoramento dos reatores experimentais

Análise	Método (APHA, 1985)	Frequência semanal	
		afluente	efluente
pH	Potenciometria	2	2
Potencial redox	Potenciometria	2	2
Alcalinidade	Titulometria	2	2
Sólidos suspensos	Gravimetria	-	2
DQO total e filtrada	Refluxo fechado Titulométrico	2	2

As análises de ácidos graxos voláteis, também realizadas em dois dias semanais para ambos afluente e efluente, seguiram a metodologia desenvolvida no Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras foram acidificadas até pH 2,00 com ácido fórmico e filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm.

Injetou-se 1 μL de amostra no cromatógrafo gasoso Varian 3700, coluna 60/80 Carbowax 20M/0,1% H_3PO_4 , detector FID, com gás de arraste Hélio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Biomassa Anaeróbia de Inóculo

Previamente à montagem e partida dos reatores experimentais, realizaram-se análises e testes com o inóculo. O lodo era proveniente do reator anaeróbio da Estação de Tratamento de Esgotos Parque da Matriz, localizado no município de Cachoeirinha (RS), atendendo a uma população de 10.000 habitantes. Em uma primeira coleta, no mês de setembro de 1998, verificou-se que a concentração de sólidos consistiam de 6.989 mg SFT.L⁻¹ e 6.234mg SVT.L⁻¹. O teste de atividade metanogênica, no qual utilizou-se acetato em concentração de DQO de 2000 mg.L⁻¹ como substrato, não apresentou produção de gás.

Contudo, ao adicionar-se 2 mL (1,58 g) de etanol 24 horas após a adição do acetato, verificou-se produção de gás, cujo valor de atividade metanogênica máxima atingiu 0,33 mLCH₄.gSSV⁻¹.h⁻¹. Realizaram-se então novos testes de atividade metanogênica específica com etanol e com diferentes relações acetato:etanol, como indicado no quadro 5.1.

Quadro 5.1: Resultados dos testes realizados com o lodo inoculado nos reatores experimentais

Substrato/ Relação em DQO	DQO total (mg.L ⁻¹)	Concentração inicial acetato (ppm)	Concentração final acetato (ppm)	pH final	Duração do teste (h)	Volume de metano produzido (mL)	% de metano recuperado	AMEmáx (mL CH ₄ . GSSV ⁻¹ .h ⁻¹)
Etanol	7300	-	1582	5,53	33	58,22	5,1	0,74
Acetato:etanol 1:1	2000	1042	1350	6,95	69	49,12	15,6	0,47
Acetato:etanol 2:1	3000	2107	2849	6,97	73	57,26	12,2	0,44
Acetato:etanol 1:2	3000	1042	863	6,68	72	86,7	18,3	0,68
Acetato:etanol 1:4	5000	1042	369	6,90	92	239,30	30,0	1,35

Ao compararmos os valores de atividade metanogênica específica máxima, o percentual de metano recuperado e a concentração residual de acetato, verificamos que o teste na qual utilizou-se a relação acetato:etanol 1:4 apresentou melhor resultado. Porém, o excessivo tempo de sua duração tornou-se prejudicial, permitindo o desenvolvimento de novos microrganismos e, com isso, induzindo a um resultado errôneo. Ao utilizarmos somente

etanol como substrato, constatamos significativa acumulação de ácido acético, o que provocou a acidificação do meio. Ao fim de 33 horas não houve mais produção de gás, provavelmente devido à inibição e morte da biomassa com o pH ácido.

Nos testes realizados com relações de DQO 1:1 e 2:1, a concentração final de acetato mostrou-se 29 e 35% superior à inicial, respectivamente. Atribui-se este fato à formação de ácido acético a partir do etanol. Contudo, como o acetato presente no substrato estava na forma de sal de sódio houve, provavelmente, a geração de alcalinidade a partir da conversão de acetato a biogás, não ocorrendo acidificação do meio. Ambos testes apresentaram pequena diferença nos resultados.

Quando a relação acetato:etanol passou a ser 1:2, observou-se um acréscimo de 55% na atividade metanogênica específica máxima. A concentração residual de acetato apresentou-se inferior à adicionada, indicando o consumo tanto do ácido presente no substrato como do ácido derivado do etanol. O percentual de metano recuperado aumentou para 18,3%.

Observou-se que os valores de atividade metanogênica foram sendo acrescidos com o aumento da concentração de etanol, exceto para etanol puro que provocou a acidificação do meio. Contudo, ao utilizar-se este álcool como substrato, não mediu-se somente a atividade acetoclástica, mas também a atividade hidrogenotrófica. Como o tempo de duplicação das bactérias metanogênicas hidrogenotróficas é de aproximadamente 4 horas e haviam quantidades crescentes de substrato disponível, seu desenvolvimento foi favorecido já que os testes prolongaram-se por aproximadamente 70 horas. Desta forma, pode-se atribuir os valores crescentes de atividade obtidos, à presença destes organismos na biomassa.

Verifica-se a necessidade de estudos mais detalhados no que diz respeito a utilização de substratos mais complexos, como o etanol, para caracterização da biomassa metanogênica. Portanto, para fins de padronização e de possíveis comparações com os testes em que se utilizou acetato ou etanol, decidiu-se trabalhar somente com a relação acetato/etanol 1:1 nos testes a serem realizados, totalizando a concentração de DQO em 2000 mg.L⁻¹.

Os períodos de aclimação, ou seja, quando a biomassa era mantida nas condições experimentais, previamente à adição do substrato, foram de 6 horas. Observou-se que, quando submetiam-se lodos de baixa atividade, como lodos de esgotos domésticos, a intervalos de aclimação de 12 horas ou superiores, a atividade tornava-se ainda mais reduzida.

Para uma melhor observação do efeito do tempo de aclimação, realizou-se o mesmo teste com a relação de DQO 1:1 sem período de aclimação. Ambos terminaram em aproximadamente 70 horas e a curva de tendência para os valores de atividade metanogênica ao longo do teste também se assemelhou porém, em maiores valores para o lodo sem aclimação (figuras 5.1 e 5.2).

Oteve-se um aumento de aproximadamente 60% na AMEmáx, ou seja, de 0,47 para 0,78 mLCH₄.gSSV⁻¹.h⁻¹ e uma redução na concentração de residual de acetato de 1350 ppm para 508 ppm. Os volumes de metano produzidos foram de 49,12 e 80,01 mL para os testes com e sem aclimação, respectivamente. Optou-se então por utilizar períodos de aproximadamente duas horas nos testes subsequentes, somente para garantir o consumo de eventual presença de substrato no lodo.

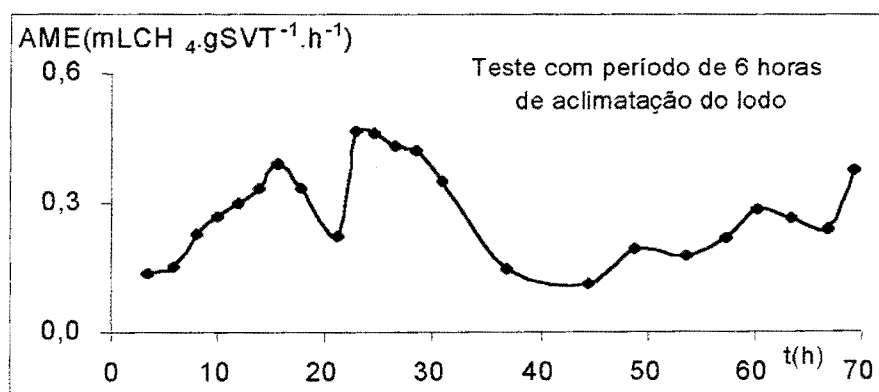


Figura 5.1 Teste de AME com acetato e etanol na proporção 1:1 em termos de concentração de DQO, totalizando o valor de 2000 mg.L⁻¹, com período de 6 horas de aclimação do lodo.

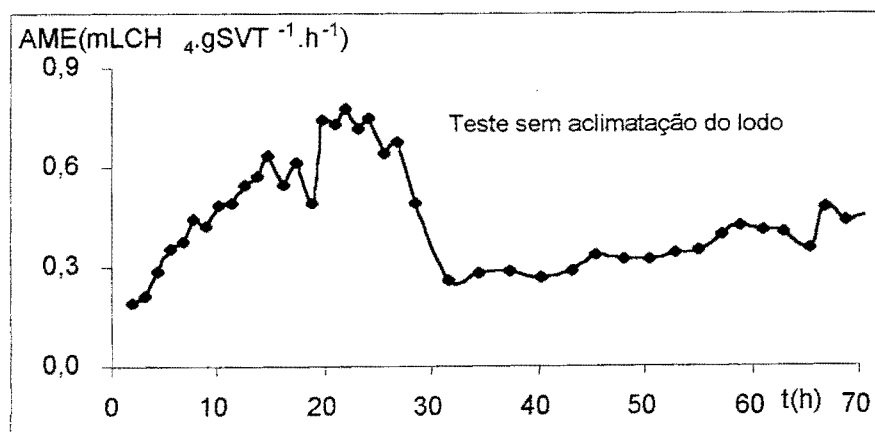


Figura 5.2 Teste de AME com acetato e etanol na proporção 1:1 em termos de concentração de DQO, totalizando o valor de 2000 mg.L⁻¹, sem período de aclimação do lodo.

Testou-se também sacarose, tendo em vista que seria um dos substratos adicionados nos reatores experimentais, e ácido fórmico, ambos em concentração de DQO de aproximadamente 2000 mg.L⁻¹. A atividade metanogênica específica máxima obtida com sacarose foi de 1,1 mLCH₄.gSSV⁻¹.h⁻¹ após 4 horas da adição do substrato.

Mediu-se a concentração de ácidos voláteis ao término do teste e verificou-se a presença de 695,3 ppm de ácido acético; 129,5ppm de ácido propiônico; e aproximadamente 10 ppm da soma dos ácidos isobutírico e butírico. Tendo em vista que o teste com acetato não apresentou formação de biogás, acredita-se que a biomassa inoculada seja pobre em organismos acetoclásticos. A excessiva quantidade de ácidos voláteis presente ao término do teste realizado com sacarose é mais um indicativo desta hipótese. O teste com ácido fórmico apresentou elevada produção de gás porém com pequeno percentual de metano, tendo sido concluído em somente três horas.

No mês de abril de 1999, fez-se nova coleta de lodo no reator da Estação de Tratamento de Esgotos Parque da Matriz para analisar-se a biomassa através das técnicas de PCR e atividade metanogênica específica. Testaram-se quatro diluições do DNA extraído, 1:10; 1:100; 1:1.000; e 1:100.000, sem repetições, para os *primers* de metanogênicas totais e acetoclásticas. Todos os resultados foram negativos. Obteve-se atividades máximas de 0,05; 0,27; e 0,43 mLCH₄.gSVT⁻¹.h⁻¹ para acetato, etanol e mistura de acetato e etanol, respectivamente.

De posse do resultado do teste de atividade metanogênica específica em acetato para a biomassa cultivada em reator pertencente a uma indústria de gelatinas (4,04 mLCH₄.gSVT⁻¹.h⁻¹) realizou-se a análise de PCR para simples comparação. O reator recebe efluente com concentração de DQO de aproximadamente 3000 mg.L⁻¹ e a concentração de voláteis no lodo é de aproximadamente 40.000 mg.L⁻¹. Testaram-se cinco diluições do DNA, 1:10; 1:100; 1:1.000; 1:100.000; e 1:1.000.000, sem repetições, para ambos os *primers*. Obteve-se resultados positivos para as duas primeiras diluições para metanogênicas acetoclásticas e para as quatro primeiras diluições para metanogênicas totais.

Comparando-se os resultados das análises realizadas com as biomassas presentes em reatores que recebem efluentes com diferentes concentrações orgânicas, verifica-se a sensibilidade destas técnicas. Também permitem uma melhor caracterização do lodo do que a resposta fornecida pela análise da concentração de sólidos voláteis totais.

5.2 Partida e Operação dos Reatores Experimentais

A partida efetiva dos reatores cujos substratos foram acetato (reator A) e sacarose (reator S) ocorreram na segunda semana do mês de novembro de 1998. Para o reator que recebeu a mistura de ácidos graxos voláteis (reator M), a partida ocorreu somente na terceira semana do mês de dezembro do mesmo ano. Os valores das médias mensais de DQO dos substratos, o tempo de retenção hidráulico (TRH) e a carga orgânica aplicada, em termos de DQO, estão sumarizadas no quadro 5.2.

Quadro 5.2 Dados operacionais dos reatores experimentais

Parâmetro : Reator	Dez 1998	Jan 1999	Fev 1999	Mar 1999	Abr 1999	Mai 1999	
TRH (h)	A	9	9	20	14	14	14
	M	-	20	9	9	9	9
	S	9	9	9	9	9	9
DQO (mg.L ⁻¹)	A	587,51	537,52	576,94	754,62	890,76	907,28
	M	-	601,36	692,93	616,51	595,52	588,61
	S	365,66	405,90	496,27	477,64	636,05	632,01
Carga orgânica aplicada (Kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	A	1,57	1,43	0,69	1,29	1,53	1,56
	M	-	0,72	1,85	1,64	1,59	1,57
	S	0,98	1,08	1,32	1,27	1,70	1,69

O reator A, embora tenha recebido substrato com aproximadamente a mesma concentração de matéria orgânica nos três primeiros meses, apresentou redução na carga orgânica, em função do aumento do tempo de retenção hidráulico. Após, com a mudança do tempo de retenção hidráulico de 20 horas para 14 horas e aumento da concentração de matéria orgânica, o valor da carga orgânica aplicada retornou ao seu valor original ao término do experimento.

O reator M durante o primeiro mês operou com tempo de retenção hidráulico de 20 horas. A partir do segundo mês, a vazão de alimentação foi sendo incrementada até atingir o tempo de retenção hidráulico de 9 horas, a qual manteve-se constante nos meses subsequentes. Desta forma, com as concentrações de DQO aproximadamente constantes ao

longo do experimento, a carga orgânica aplicada também manteve-se constante, em torno de 1,6 Kg DQO. $m^{-3}.d^{-1}$, exceto no primeiro mês.

O reator S, que manteve o tempo de retenção hidráulico constante durante os seis meses, somente recebeu a carga orgânica planejada a partir do quinto mês pois a mínima elevação na concentração de DQO afluente causava decréscimo no pH efluente. Conforme verificou-se no teste de atividade metanogênica específica realizado com sacarose, houve acúmulo de ácidos voláteis no término do experimento. Sendo assim, o aumento da carga orgânica aplicada foi muito lento, garantindo-se o equilíbrio entre os grupos iniciais de conversão de matéria orgânica (bactérias acidogênicas) e bactérias metanogênicas para incrementos de cargas orgânicas no reator.

5.3 Reator A

5.3.1 Análise do efluente líquido

O efluente do reator A manteve-se em pH alcalino, com médias próximas a 8,0 no final do experimento (figura 5.3). Atribui-se como causa, a elevada produção de alcalinidade (figura 5.4). O fato do substrato ter sido adicionado na forma de sal de sódio permitiu que os valores de alcalinidade atingissem média de 682 mg $CaCO_3. L^{-1}$ nos dois últimos meses.

O sistema de aquecimento dos reatores apresentou problemas em torno do trigésimo dia de operação. A temperatura interna dos reatores sofreu uma redução de aproximadamente 15°C, atingindo valores de 20°C em um período de 24 horas ou menor.

Esta variação drástica nas condições ambientais provocou um pequeno arraste de biomassa e inibiu temporariamente o consumo do substrato, como pode ser observado nos resultados das análises de sólidos suspensos voláteis efluentes (figura 5.5) e no percentual de remoção de ácido acético (figura 5.6). Verificou-se a grande sensibilidade dos organismos acetoclásticos a rápidas variações do meio.

Devido as perdas de eficiência que vinham sendo observadas após a falha no aquecimento do sistema, decidiu-se inocular mais 2 litros do lodo proveniente da estação de

tratamento de efluentes próximo aos 60 dias de operação, após ter sido realizada a coleta do lodo do reator experimental.

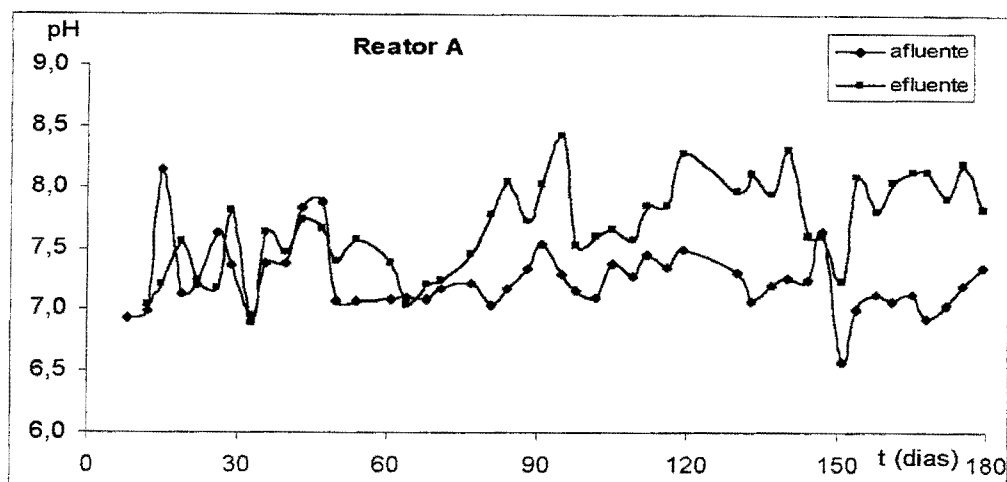


Figura 5.3 Valores de pH afluente e efluente do reator A

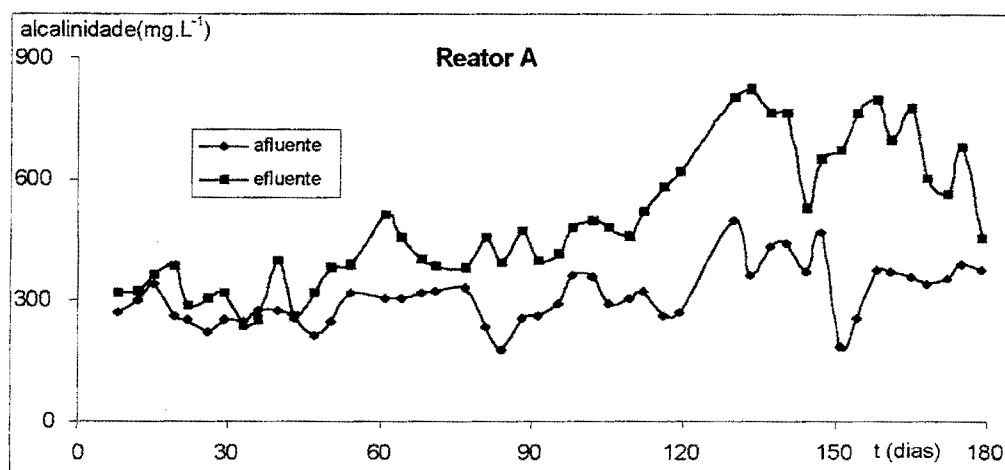


Figura 5.4 Concentração de alcalinidade, em $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, afluente e efluente do reator A.

A dificuldade de retenção da biomassa não granulada durante a fase de partida de reatores de manto de lodos de fluxo ascendente, associada com a redução do tempo de retenção hidráulico de 20 para 14 horas ocorrido durante o terceiro mês provocou acentuado arraste de biomassa. A carga orgânica aplicada também foi alterada, elevando-se de $0,69$ para $1,29 \text{ Kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ durante o mesmo período. Todos estes fatores permitiram que ocorresse novamente uma inibição do consumo de substrato, reduzindo o percentual de remoção de ácido acético.

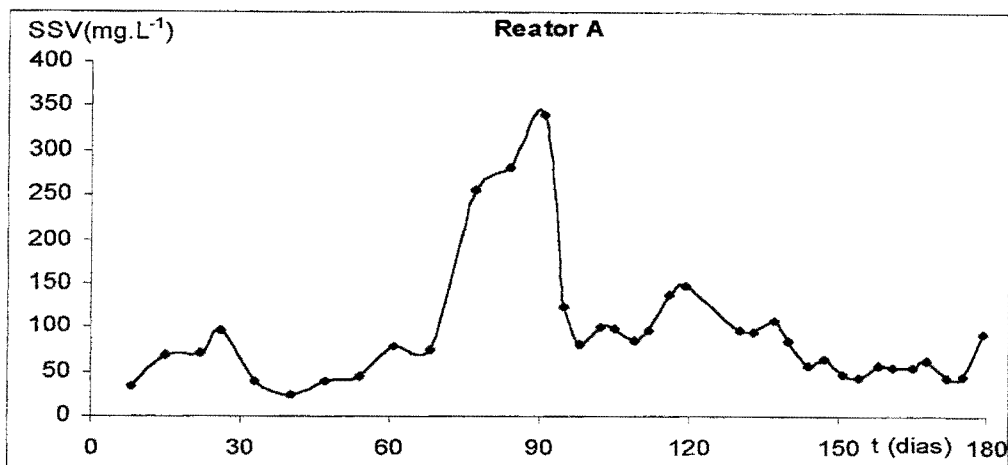


Figura 5.5 Sólidos suspensos voláteis efluentes do reator A

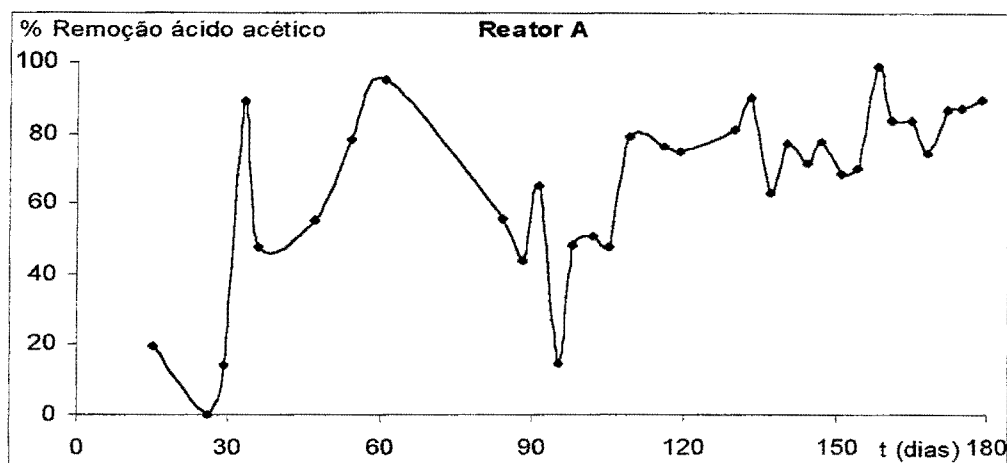


Figura 5.6 Percentual de remoção de ácido acético no reator A

Observa-se que a redução drástica na temperatura, ocorrida no primeiro mês, atuou de forma mais adversa sob a biomassa, comparando-se com os aumentos de vazão e concentração de DQO afluente ocorridos no terceiro mês. Contudo, deve-se considerar que no terceiro mês a biomassa se encontrava mais aclimatada ao novo substrato.

A eficiência dos reatores foi avaliada em função da remoção de matéria orgânica, ou seja, percentuais de remoção de DQO total e filtrada (figuras 5.7 e 5.8, respectivamente). As alterações ocorridas nas condições ambientais durante o primeiro e terceiro mês, refletem-se nestes resultados.

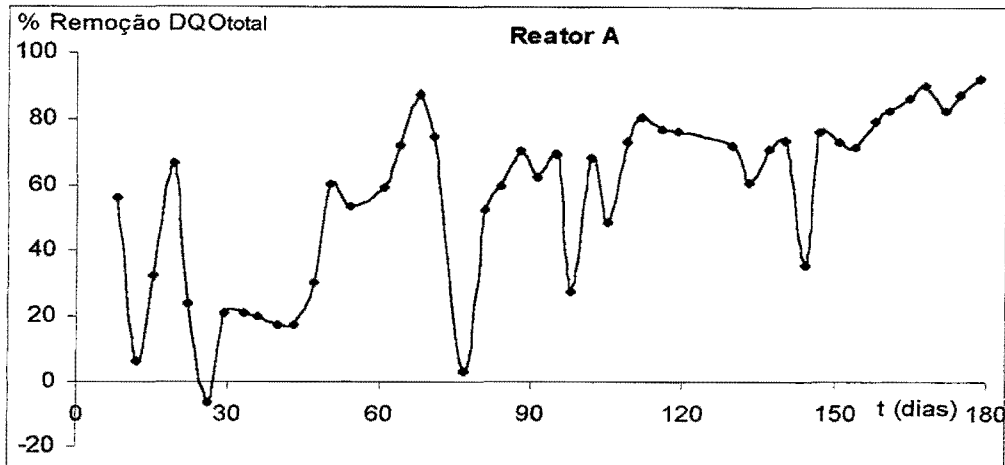


Figura 5.7 Percentual de remoção de DQO total do reator A.

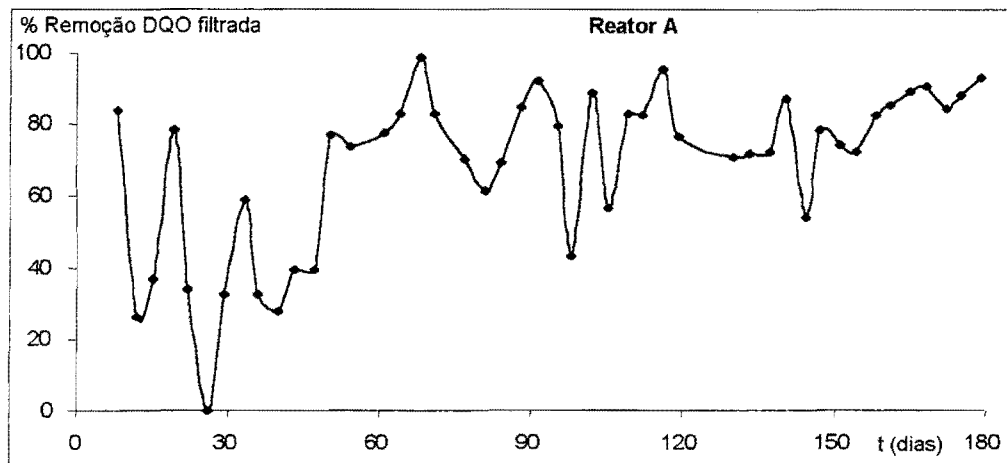


Figura 5.8 Percentual de remoção de DQO filtrada do reator A.

A perda inicial de biomassa elevou a concentração efluente de DQO total a um valor superior à afluente, chegando-se a um percentual de remoção negativo. Da mesma forma, o não consumo do substrato causou a remoção nula de DQO dissolvida.

Verifica-se que o reator A atingiu estabilidade após 150 dias do início do experimento. A biomassa mostrou-se sensível às modificações ambientais que lhe foram impostas, respondendo de forma rápida e contrária as mesmas. Foram necessários prolongados períodos de operação até o seu restabelecimento. Contudo, calculando-se as médias mensais dos percentuais de remoção de matéria orgânica dissolvida e particulada, observa-se que os valores apresentaram tendência crescente, sendo superiores a 80% (figura 5.9) ao término de 6 meses.

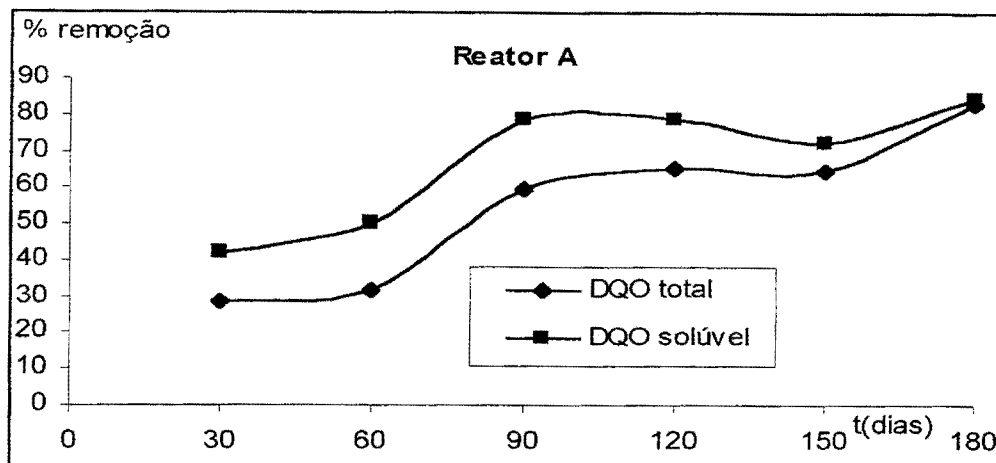


Figura 5.9 Médias mensais dos percentuais de remoção de DQO total e solúvel do reator A

5.3.2 Análise da biomassa anaeróbia

O lodo foi coletado através de uma torneira localizada na base do reator, próxima ao fundo cônico. Na fase inicial do experimento foi possível a visualização da altura do manto de lodos, parâmetro que permitiria a avaliação da biomassa total em cada reator, ou seja, o volume de lodo multiplicado pela concentração de sólidos voláteis (figura 5.10). Porém, com a incrustação de sólidos nas paredes, não foi possível determinar-se este valor.

Atribui-se a perda de voláteis após a coleta do vigésimo dia não somente a redução da temperatura interna dos reatores, mas também ao fato do lodo inoculado não ser granular e estar recebendo um substrato que somente atende a um grupo de microrganismos. Contudo, a nova inoculação com lodo proveniente do mesmo reator municipal, apresentando concentração de sólidos voláteis totais de 25.910 mg.L^{-1} , permitiu novamente o aumento da concentração de biomassa.

Porém, o reator foi submetido a outras condições de instabilidade, ou seja, o aumento da vazão afluente conjuntamente com a elevação da concentração de DQO, causando nova redução na concentração. Observa-se que, embora o efluente tenha apresentado a maior concentração de sólidos voláteis neste período, conforme mostrado na figura 5.5, esta perda não afetou sobremaneira a concentração de biomassa no reator porém pode ter influenciado na massa total presente no reator. A partir deste período, verifica-se a redução constante da concentração de sólidos voláteis, embora a eficiência do sistema tenha apresentado tendência de crescimento.

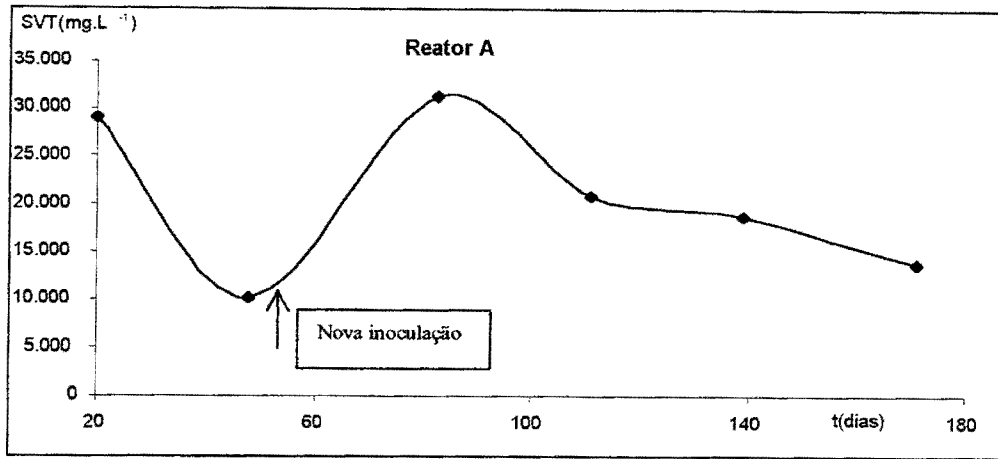


Figura 5.10 Concentração de sólidos voláteis totais presentes no reator A

Comparando-se os valores de atividade metanogênica específica máxima para os diferentes substratos testados; acetato, etanol, formiato e mistura de acetato com etanol (figura 5.11), observa-se que, em etanol e acetato com etanol, a atividade decresceu até ficar nula no término do experimento.

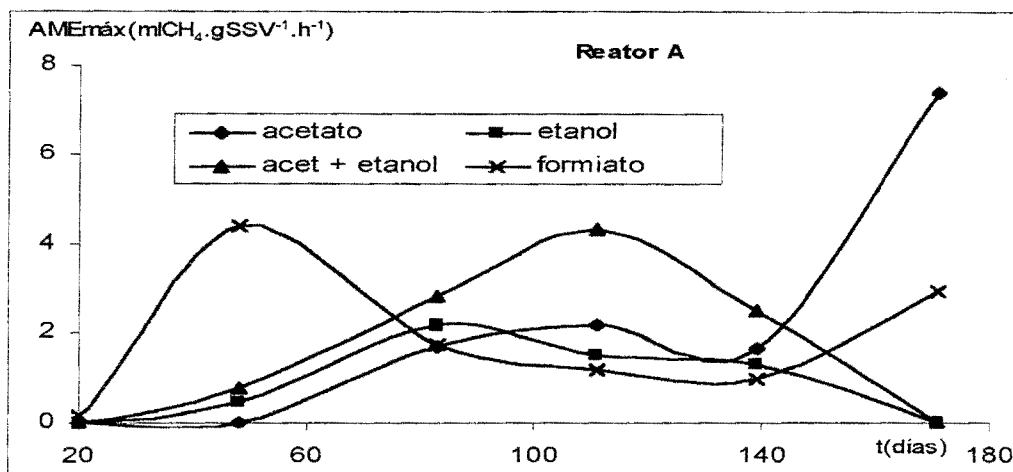


Figura 5.11 Atividade metanogênica máxima para os substratos acetato, etanol, formiato e mistura de acetato e etanol do reator A

Sabe-se que é necessária a presença do organismo S para que etanol seja convertido em acetato e hidrogênio. Como acetato foi a única fonte de carbono do reator A, acredita-se que este organismo tenha sido eliminado da biomassa, justificando a ausência da produção de biogás no teste com etanol ao término de seis meses de experimento. Contudo, é

desconhecido o motivo pelo qual também não tenha ocorrido formação de biogás no teste de atividade com a mistura de acetato e etanol.

Por outro lado, as atividades aumentaram em acetato e formiato, atingindo $7,39 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSVT}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em acetato, indicando um possível aumento da população metanogênica. Verificando-se os resultados obtidos pelas análises de PCR (figura 5.12) para detecção e quantificação aproximada de organismos metanogênicos, constatou-se um aumento na população de bactérias metanogênicas totais ao término de 6 meses de experimento.

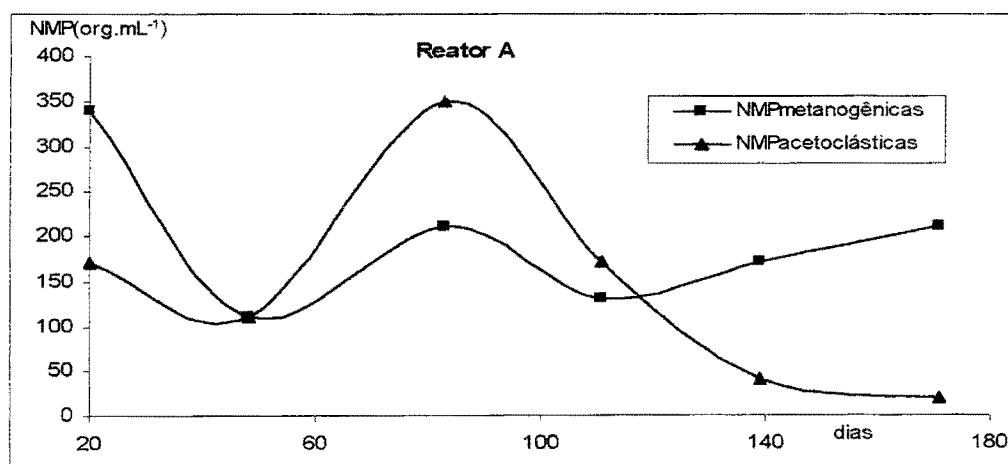


Figura 5.12 Número mais provável de organismos metanogênicos acetoclásticos e metanogênicos totais para o reator A

Contrariamente ao número mais provável de bactérias metanogênicas totais, o número de acetoclásticas sofreu drástica redução. Tendo em vista que as eficiências de remoção de matéria orgânica total e solúvel apresentaram tendência crescente e a atividade metanogênica específica máxima em acetato sofreu acréscimo de 437% no último mês, acredita-se que o *primer* utilizado para detecção de bactérias acetoclásticas esteja atuando em outros organismos.

No caso deste *primer* estar corretamente desenvolvido, esperava-se encontrar relação entre a quantidade de bactérias acetoclásticas presentes na biomassa e a atividade máxima em acetato. Porém, se compararmos os resultados das análises do número mais provável de acetoclásticas por unidade de sólidos voláteis presente na amostra, com a atividade máxima

em acetato (figura 5.13), que também é determinado por unidade de sólidos voláteis, verifica-se a inexistência de relações numéricas e até mesmo tendências.

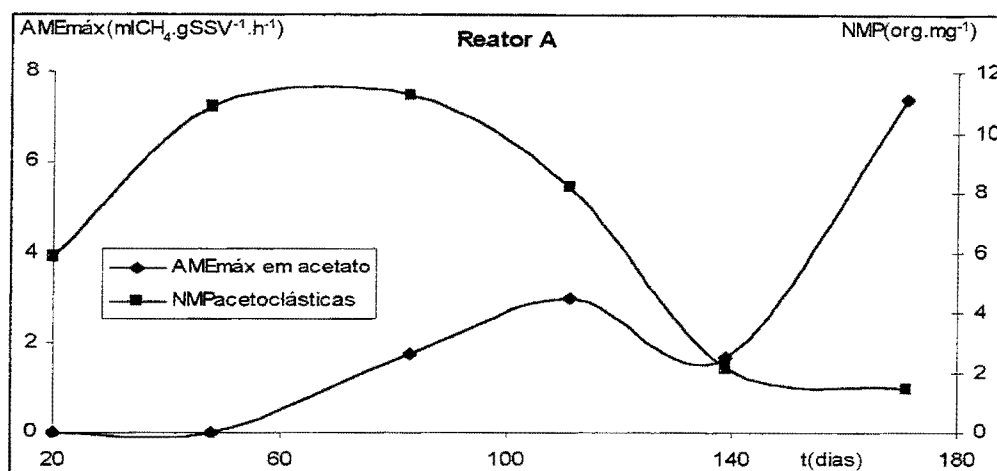


Figura 5.13 Resultados das análises de sólidos voláteis totais e número mais provável de organismos acetoclásticos e metanogênicos da biomassa presente no reator A

O número mais provável de metanogênicas totais, que sugere a possibilidade de relação entre a atividade máxima em etanol, já que participam tanto metanogênicas acetoclásticas como hidrogenotróficas na sua degradação, também foram diferenciados (figura 5.14). Pelo contrário, apresentaram tendências opostas. Encontrou-se tendência semelhante na atividade máxima em etanol e no número de organismos acetoclásticos. Neste caso, poderia-se supor que o *primer* construído para acetoclásticas estaria identificando outros organismos presentes no consórcio.

Como os reatores continuaram a ser alimentados após o término do experimento, foram realizadas análises de sólidos e PCR aos 230 dias. Não constatou-se a presença de organismos acetoclásticos enquanto que os sólidos suspensos voláteis sofreram pequena redução, de 13.740 para 11.720 mg.L⁻¹.

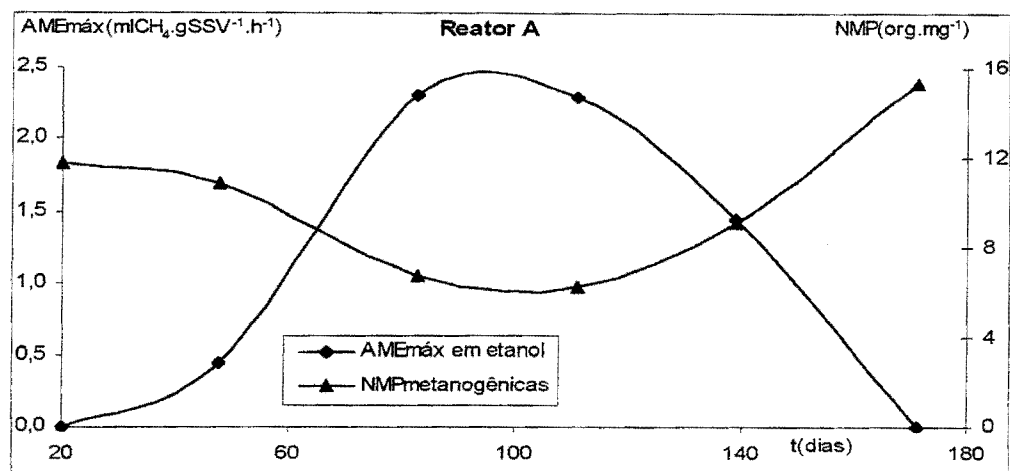


Figura 5.14 Resultados das análises de atividade metanogênica específica máxima em etanol e número mais provável de organismos metanogênicos totais da biomassa presente no reator A

O número mais provável de organismos metanogênicos, por unidade de volume, que apresentou a mesma tendência da concentração de sólidos voláteis na biomassa até o quarto mês, conforme indicado nas figuras 5.10 e 5.12, reverteu-se após este período. Desta forma, o lodo estaria se enriquecendo de organismos metanogênicos e a redução dos voláteis indica a perda dos organismos que não utilizam acetato como fonte de carbono. Os resultados dos testes de atividade comprovam esta hipótese.

Embora não se tenham estabelecido relações numéricas entre as análises realizadas com a biomassa, acredita-se que o *primer* utilizado para detecção de bactérias metanogênicas totais ofereça resultado adequado para caracterização de lodos. Contudo é importante salientar-se que somente a análise de atividade metanogênica específica caracteriza a biomassa ativa. As análises de PCR e sólidos voláteis não permitem a separação entre a parcela de organismos ativos e inativos acumulados em reatores biológicos.

5.4 Reator S

5.4.1 Análise do efluente líquido

O reator S, contendo o substrato mais complexo entre os utilizados nos reatores experimentais, provavelmente proporcionou o desenvolvimento de maior diversidade bacteriana na biomassa.

O pH do substrato apresentou comportamento instável, oscilando entre 6,0 e 8,0 (figura 5.15) sendo necessária a adição de bicarbonato de sódio para evitar-se a acidificação do meio. Com isso garantiu-se um efluente com pH próximo da faixa neutra durante todo o período experimental.

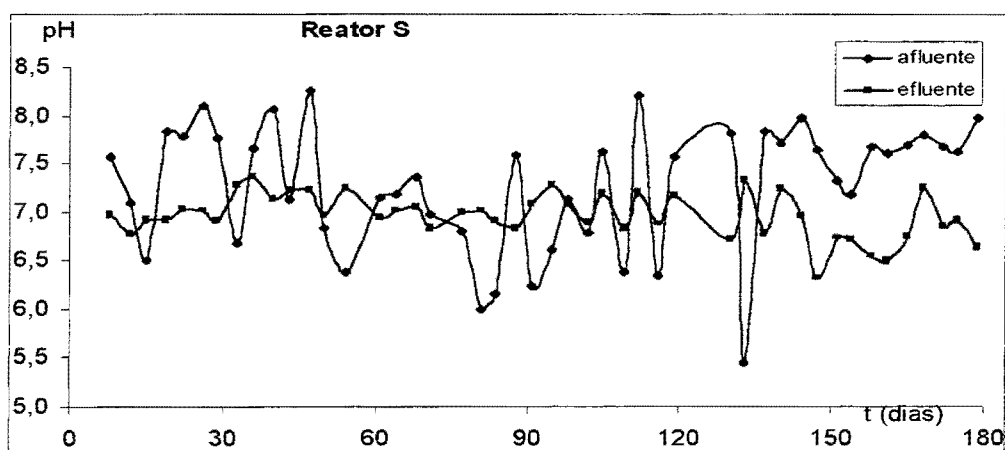


Figura 5.15 Valores de pH afluente e efluente do reator S

A elevada tendência a acidificação do meio também pode ser verificada pelas análises de alcalinidade (figura 5.16). Em 48% dos resultados, o consumo foi maior ou equiparou-se à produção. Entre os dias 54 e 84 verificou-se, contudo, que a produção havia superado o consumo. O reator S, tendo como substrato a sacarose, não apresenta possibilidades de produzir alcalinidade. Somente a parcela de proteínas presentes no extrato de levedura poderia ter contribuído para a produção da alcalinidade.

Os sólidos suspensos voláteis presentes no efluente estão apresentados na figura 5.17. Igualmente ao reator A, ocorreram perdas de sólidos nos períodos em que houve a falha no

sistema de aquecimento e durante o terceiro mês. Com a mudança dos tempos de retenção hidráulico dos outros dois reatores experimentais, as bombas de alimentação de todos reatores foram modificadas, sendo que a bomba alocada para o reator S apresentou problemas. Com isso, a vazão permaneceu, durante o período de uma semana, superior ao valor até então trabalhado provocando o arraste da biomassa.

Durante o período que os reatores não receberam aquecimento, ocorreu um acúmulo de ácido acético no reator S (figura 5.18) e o percentual de remoção de matéria orgânica dissolvida, em termos de DQO (figura 5.19), reduziu-se para aproximadamente 30%. Verifica-se com isso que toda população microbiana foi afetada porém, pela elevada concentração de ácido acético presente no efluente, constatou-se que as bactérias metanogênicas apresentaram maior sensibilidade se comparadas com as acetogênicas.

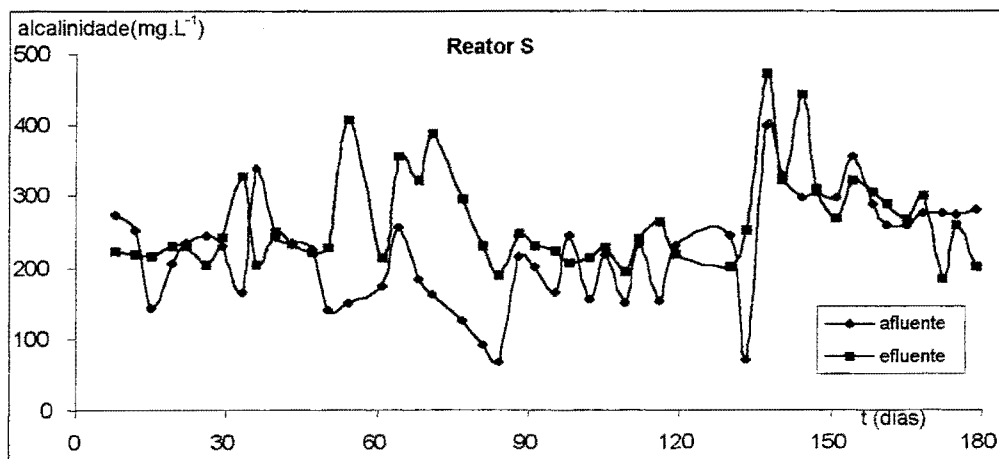


Figura 5.16 Concentração de alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) afluente e efluente do reator S.

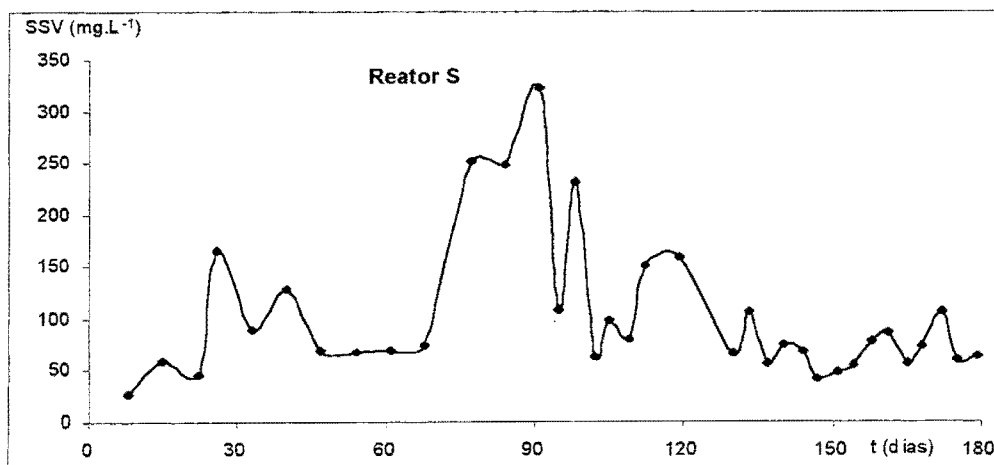


Figura 5.17 Concentração de sólidos suspensos voláteis ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) efluentes do reator S

Após este período, a concentração de ácido acético efluente estabilizou-se em média de $78,91 \text{ mg.L}^{-1}$ e permaneceu aproximadamente nulo para ácido propiônico após 100 dias de operação. A presença de ácido butírico, quando detectada, apresentou valores não significativos.

As variações de temperatura e vazão também refletiram-se no percentual de remoção de DQO total (figura 5.20). Observa-se tendência à estabilidade do processo a partir dos 120 dias de operação, com percentuais de remoção de 87% de matéria orgânica total e 90% de matéria orgânica dissolvida. As médias mensais destes percentuais de remoção encontram-se na figura 5.21.

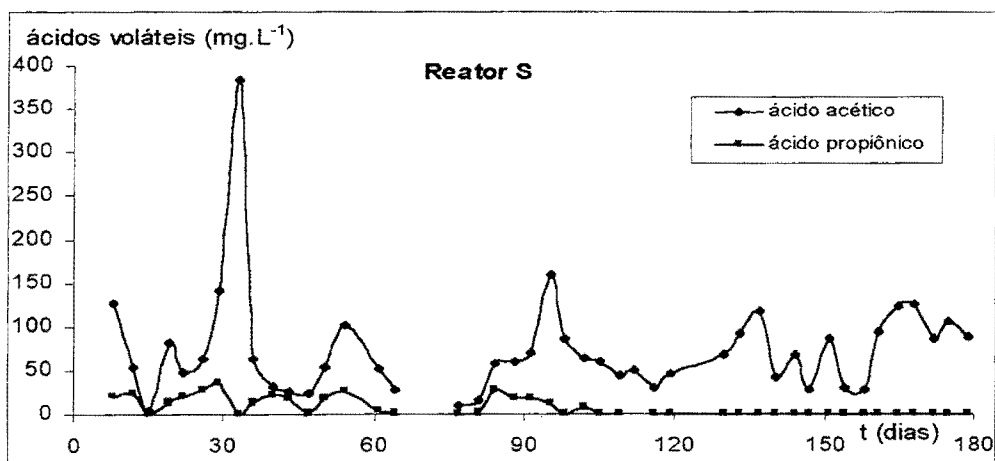


Figura 5.18 Concentração de ácidos graxos voláteis efluentes do reator S

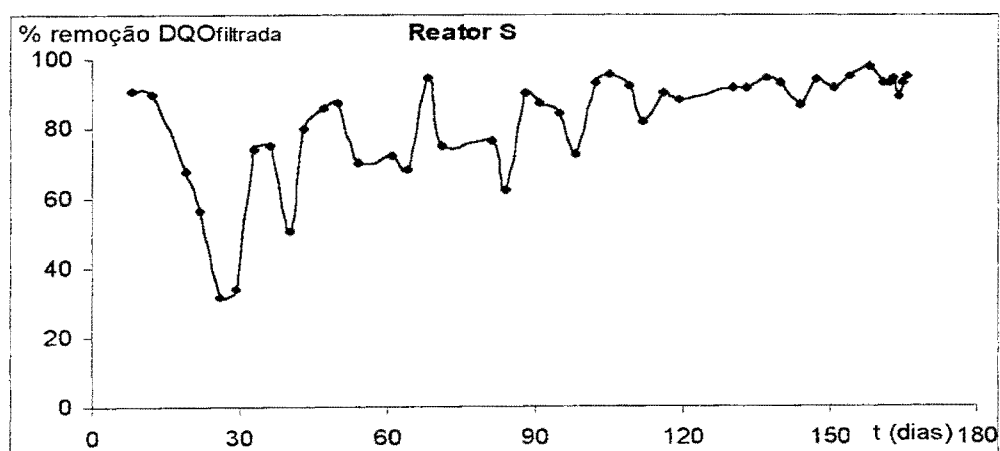


Figura 5.19 Percentual de remoção de DQO filtrada do reator S

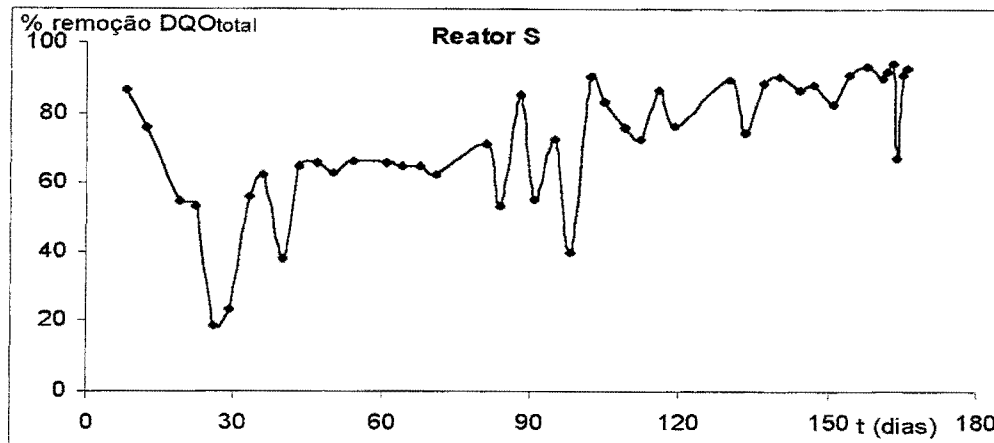


Figura 5.20 Percentual de remoção de DQO total do reator S

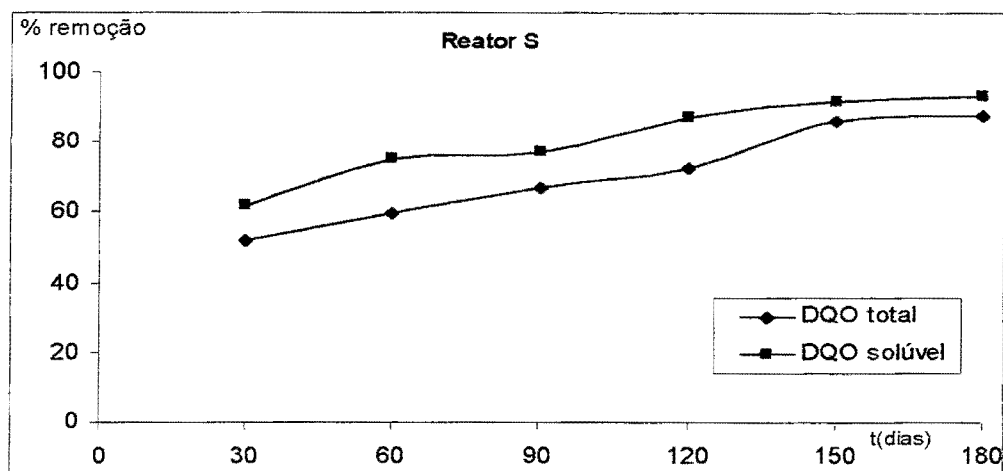


Figura 5.21 Médias mensais dos percentuais de remoção de DQO total e filtrada do reator S

5.4.2 Análise da biomassa anaeróbia

Partindo-se de uma análise visual, o lodo do reator S foi o único que apresentou formação de grânulos próximo ao quinto mês e, após seis meses, a concentração de sólidos voláteis totais sofreu um acréscimo de aproximadamente 45% (figura 5.22). Como o reator não foi desativado ao término do experimento, realizou-se nova análise aos 226 dias quando constatou-se que o valor havia duplicado, comparando-se à concentração original.

Após a segunda coleta, inoculou-se mais dois litros de lodo no reator, procedimento idêntico ao tomado para o reator A. Verificou-se, no reator A, acentuado acréscimo na concentração de voláteis já que passados trinta dias este valor havia sofrido grande redução. O

mesmo não foi verificado para o reator S. Ao contrário, a concentração de sólidos voláteis sofreu pequena redução. A nova inoculação elevou a massa total de lodo no reator porém, não causou repercussão na concentração de voláteis.

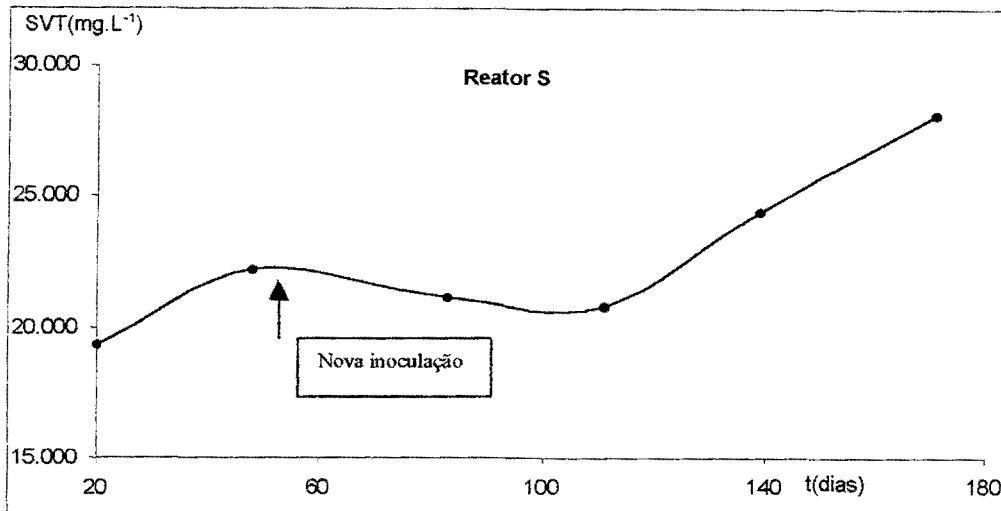


Figura 5.22 Concentração de sólidos voláteis totais presentes no lodo do reator S

Ao determinar-se o número mais provável de organismos (figura 5.23) observou-se que, na fase inicial do experimento, os valores para metanogênicas totais e acetoclásticas se equiparavam. Passados 30 dias, estas concentrações caíram drasticamente, principalmente no que diz respeito a acetoclásticas, contrariamente a concentração de voláteis, que sofreu um acréscimo. Desta forma, a biomassa em desenvolvimento estaria se enriquecendo em organismos não metanogênicos.

Se verificarmos os resultados dos testes de atividade metanogênica específica (figura 5.24) para esta mesma data, observa-se um acréscimo da atividade máxima somente com formiato. Em acordo com os resultados de PCR encontrou-se que, dentre as bactérias metanogênicas, predominam as hidrogenotróficas. Após a nova inoculação, ocorrida no final do segundo mês, o número de organismos metanogênicos e as atividades em etanol e acetato aproximaram-se do seu valor inicial.

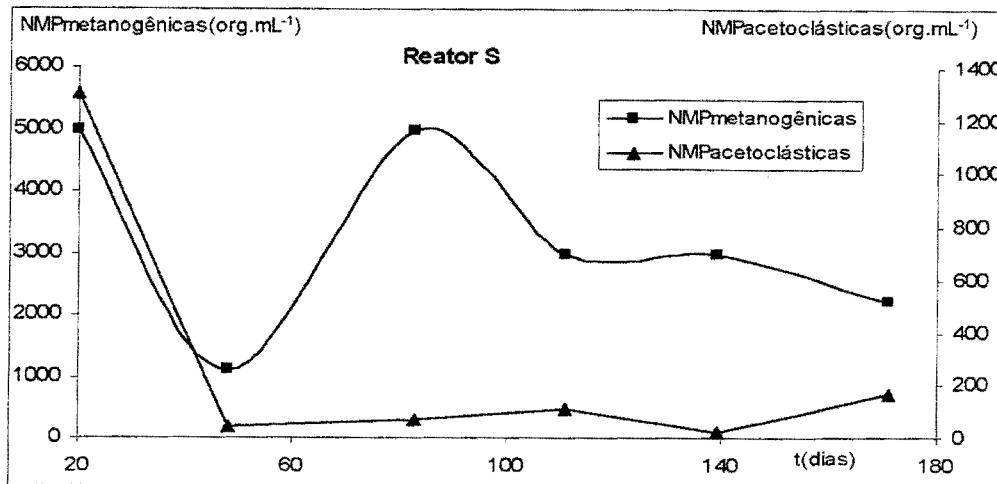


Figura 5.23 Número mais provável de bactérias metanogênicas totais e acetoclásticas encontradas no lodo do reator S

Entre o segundo e o quarto mês, a concentração de sólidos voláteis e o número mais provável de acetoclásticas permaneceram constantes, com médias de 21.000 mg.L^{-1} e 73 org.mL^{-1} respectivamente. Da mesma forma, a atividade metanogênica em acetato e formiato permaneceram constantes, indicando o equilíbrio da população destes microrganismos. Por outro lado, a concentração de metanogênicas totais permaneceu instável, decrescendo de 5000 para 3000 org.mL^{-1} .

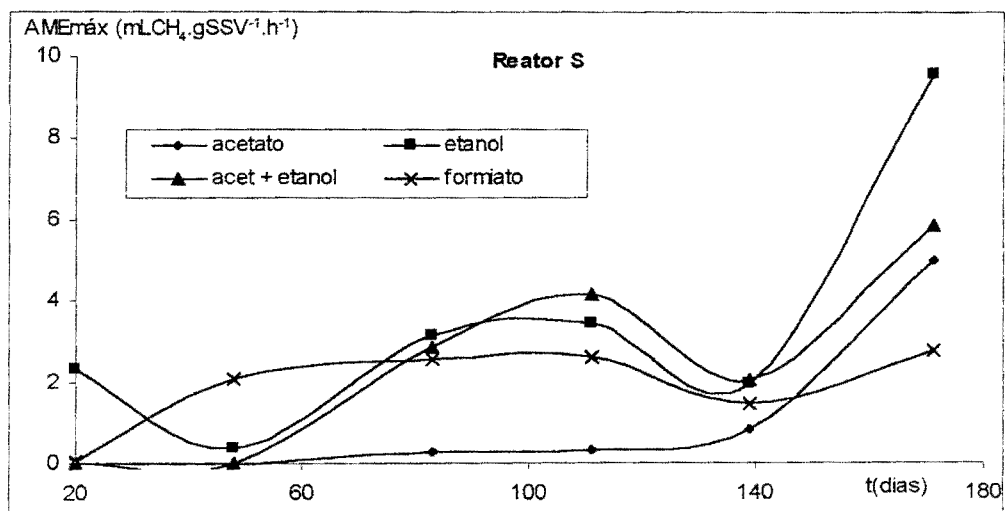


Figura 5.24 Atividade metanogênica específica para os substratos acetato, etanol, mistura de acetato e etanol e formiato do reator S

Nos últimos 60 dias de experimento, observou-se tendência ascendente na concentração de voláteis. Os valores de atividade máxima, embora tenham sofrido redução para etanol e formiato no quinto mês, elevaram-se no período final. A atividade em etanol atingiu o valor de $9,55 \text{ mLCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que em acetato permaneceu em $5,01 \text{ mLCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Durante o período em que a atividade em acetato permaneceu próximo a zero, ou seja, até o dia 140, os resultados das atividades em etanol e mistura de acetato e etanol se equipararam. Este fato sugere que o biogás produzido foi proveniente da degradação do etanol. No último experimento porém, onde a atividade em acetato evoluiu, os valores para etanol e mistura de acetato e etanol se diferenciaram, ainda permanecendo maior em etanol.

Semelhante ao ocorrido no reator A, os resultados dos testes de atividade em acetato e NMP de organismos acetoclásticos (figura 5.25), bem como de atividade em etanol e NMP de organismos metanogênicos (figura 5.26) não apresentaram relação. Encontra-se no anexo 1 os resultados dos testes realizados com a biomassa coletada ao término do primeiro mês de experimento.

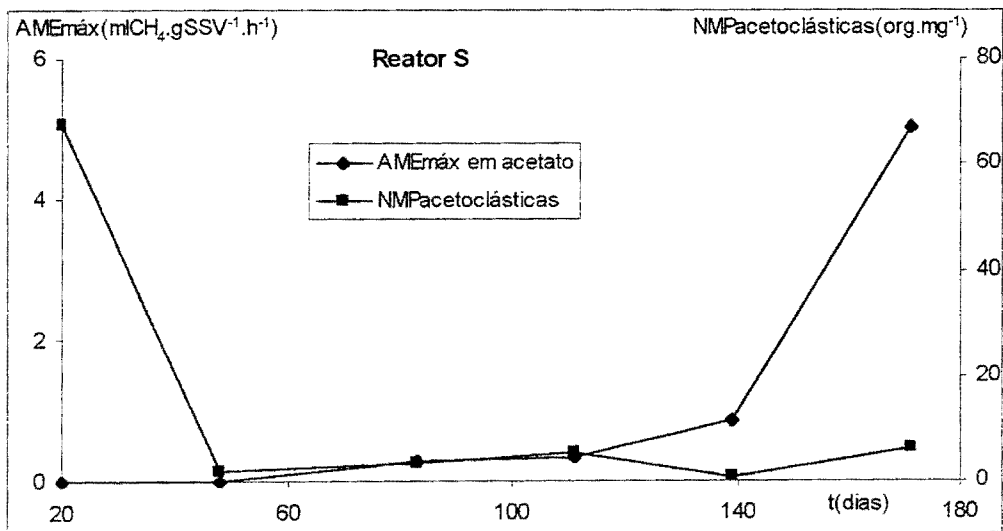


Figura 5.25 Atividade metanogênica específica máxima em acetato e número mais provável de organismos acetoclásticos para a biomassa do reator S

Ao comparar-se os diversos parâmetros analisados, encontrou-se a existência de uma relação quadrática entre a atividade em acetato e a concentração de sólidos voláteis (figuras

5.27 e 5.28), apresentando coeficiente de correlação de 0,98. Acredita-se que esta relação somente seja válida para a fase inicial de operação do reator, como neste caso, para os primeiros seis meses. A biomassa deverá atingir equilíbrio, onde a atividade permanecerá próxima a um valor constante, caso as condições operacionais não variem. Sabe-se que os reatores anaeróbios demandam tempo até que operem a plena capacidade.

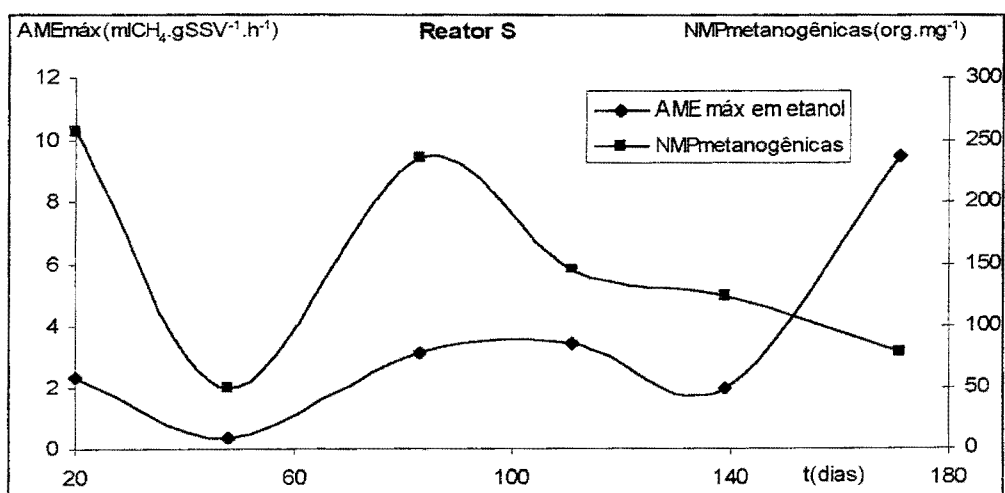


Figura 5.26 Atividade metanogênica específica máxima em etanol e número mais provável de organismos metanogênicos para a biomassa do reator S

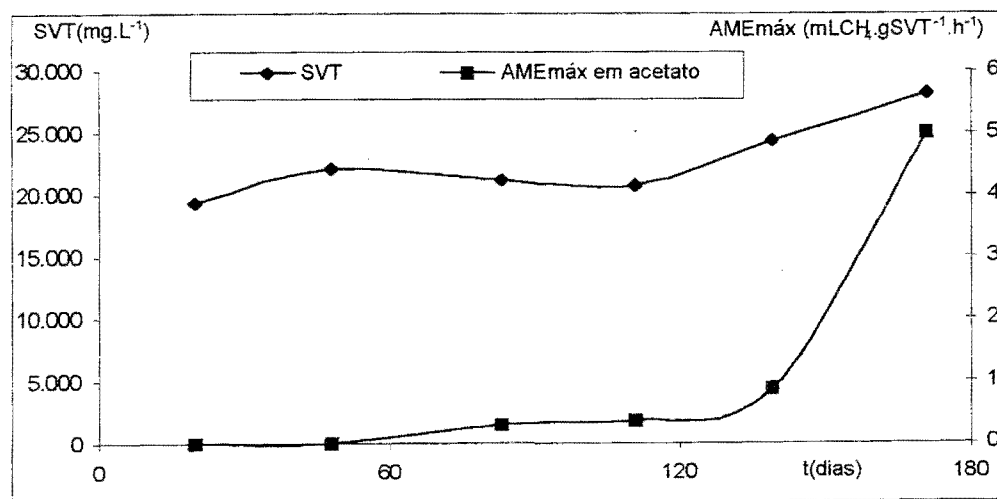


Figura 5.27 Concentração de sólidos voláteis totais e atividade metanogênica específica máxima em acetato da biomassa do reator S

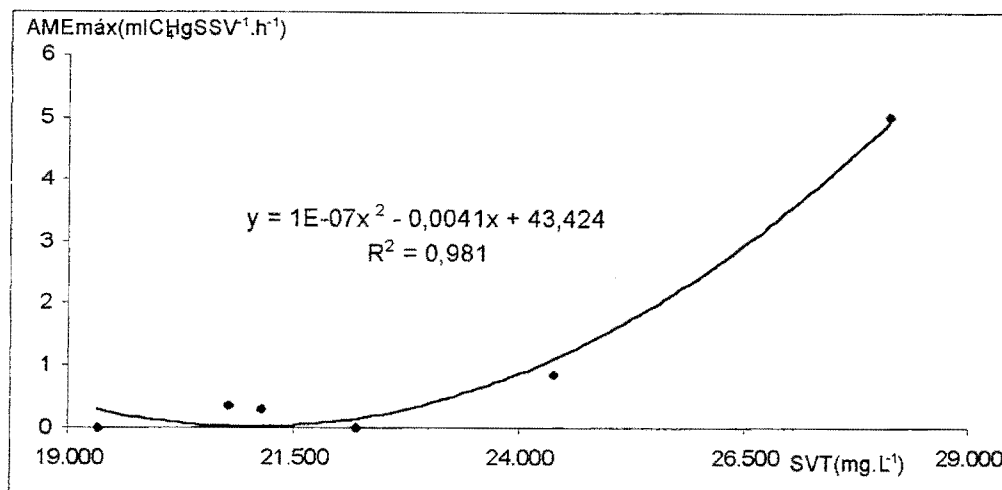


Figura 5.28 Relação entre a concentração de sólidos voláteis totais e atividade metanogênica específica máxima em acetato da biomassa do reator S

O número mais provável de organismos acetoclásticos apresentou relação também quadrática com a atividade em formiato, porém com coeficiente de correlação de 0,93 (figuras 5.29 e 5.30). Em se tratando de sistemas biológicos, considera-se um valor adequado. Neste caso, poderia formular-se a hipótese que o *primer* desenvolvido para identificação de bactérias acetoclásticas estaria detectando outro grupo de metanogênicas.

Verificou-se que nas análises da biomassa dos reatores A e S, o *primer* para metanogênicas acetoclásticas apresentou resultados distintos. No caso do reator A, poderia supor-se que foram detectados organismos não metanogênicos, pelo fato de apresentarem tendência semelhante à atividade em etanol, porém sem nenhuma relação. Para o reator S, encontrou-se relação numérica com a atividade em formiato, sugerindo a identificação de metanogênicas hidrogenotróficas.

Em ambos os casos, esperava-se encontrar relações entre os testes de atividade em acetato e a quantidade de organismos acetoclásticos presentes. Os resultados mostraram a não ocorrência destas relações e acredita-se que seja devido ao fato do *primer* não ser específico para estes organismos em questão.

Porém, a ausência de relações também foi verificada para quantidade de metanogênicas totais e atividade em etanol. O *primer* desenvolvido por Hales et al. (1996), utilizado neste trabalho, apresentou resultados promissores para organismos encontrados em ambientes naturais, como os banhados. Não necessariamente identificará todos organismos

metanogênicos encontrados em reatores anaeróbios, mais especificamente, alimentados por efluentes domésticos, sacarose ou ácidos graxos voláteis.

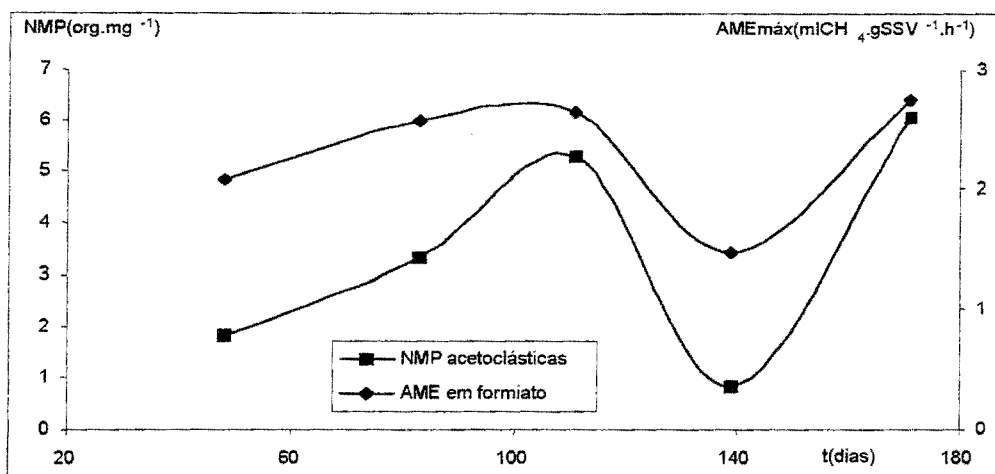


Figura 5.29 Número mais provável de bactérias acetoclásticas e atividade metanogênica específica em formiato para a biomassa do reator S

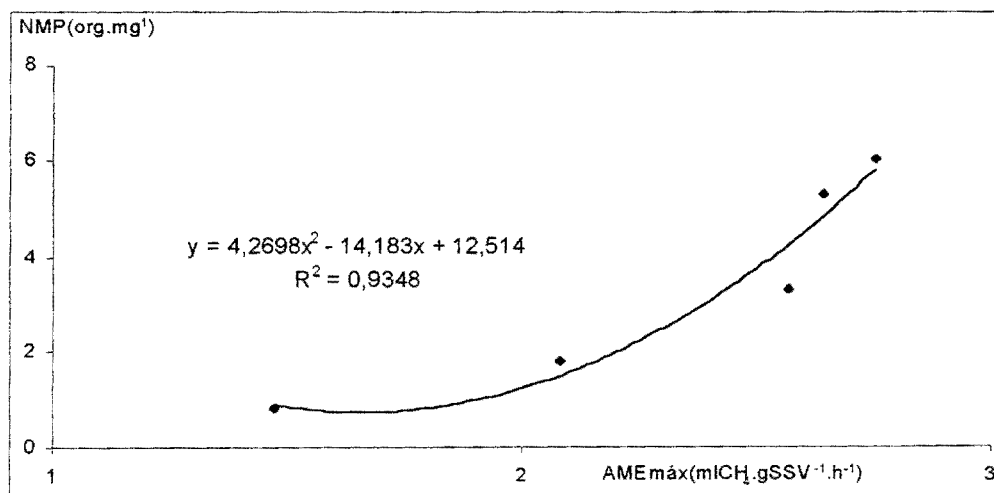


Figura 5.30 Relação entre o número mais provável de bactérias acetoclásticas e atividade metanogênica específica em formiato para a biomassa do reator S

5.5 Reator M

5.5.1 Análise do efluente líquido

O reator M, recebendo como substrato a mistura de ácidos graxos voláteis; acetato, propionato e ácido butírico; apresentou um efluente alcalino. A média do pH mensal atingiu 7,78 ao término do experimento (figura 5.31). Semelhante ao reator A, a presença dos sais de sódio e cálcio proporcionaram a produção de alcalinidade (figura 5.32).

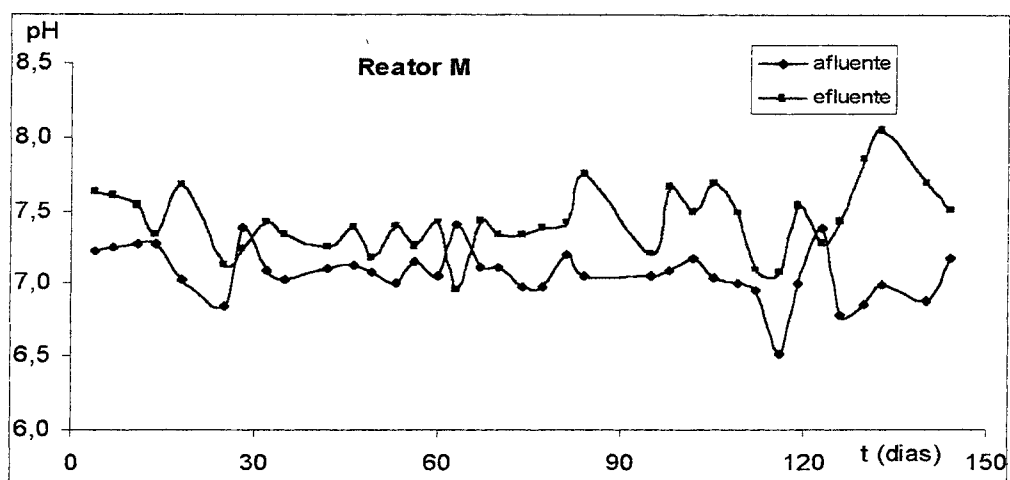


Figura 5.31 Valores de pH afluente e efluente do reator M

Com a redução do tempo de retenção hidráulico de 20 para 9 horas e a elevação da carga orgânica aplicada após o primeiro mês, verificou-se não somente o arraste de biomassa, como indicam as análises de sólidos suspensos voláteis presentes no efluente (figura 5.33), mas também uma redução no percentual de remoção dos ácidos graxos voláteis (figura 5.34).

A concentração de sólidos voláteis efluente apresentou tendência decrescente após o pico ocorrido no segundo mês. Embora o lodo não tenha apresentado formação de grânulos, a média mensal foi de aproximadamente 60 mg.L^{-1} ao término do experimento.

O percentual de remoção de ácidos voláteis somente permaneceu estável para o ácido butírico, com ocorrências isoladas de redução de eficiência, sendo de 62% o menor índice atingido. Ao término do experimento as médias mensais de remoção foram de 66,7%; 86,8% e 98,5% para os ácidos acético, propiônico e butírico, respectivamente. Verifica-se,

novamente, a etapa da metanogênese com utilização de acetato como limitante no processo de degradação anaeróbio.

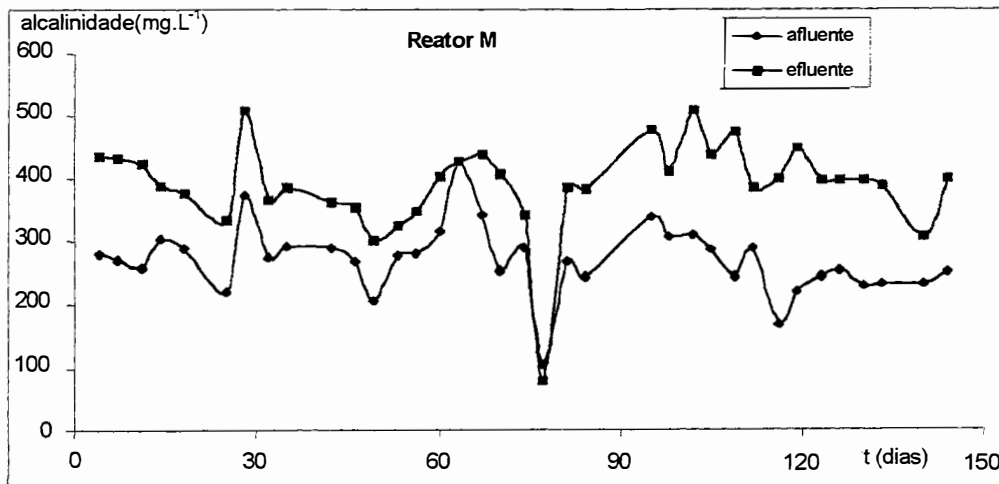


Figura 5.32 Valores de alcalinidade afluente e efluente do reator M

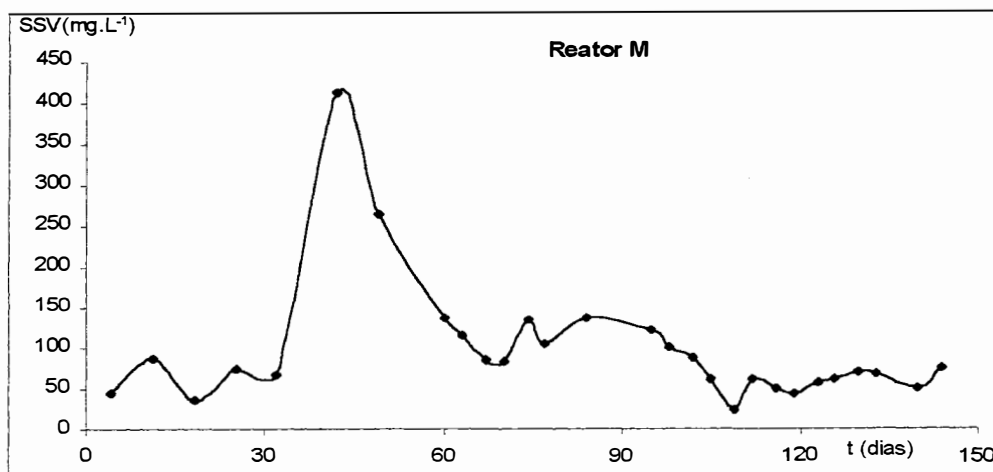


Figura 5.33 Concentração de sólidos suspensos voláteis presentes no efluente do reator M

Embora no primeiro mês a biomassa esteja se adaptando às novas condições ambientais, não foram identificados motivos pelos quais poderia se justificar o percentual de remoção negativo de ácido acético. Verifica-se que o percentual de remoção de DQO filtrada (figura 5.35) não apresentou decréscimo significativo neste mesmo período. Desta forma, acredita-se na ocorrência de erros analíticos na realização da análise de ácidos voláteis. Observa-se que, mesmo com a descontinuidade do percentual de remoção dos ácidos, houve tendência crescente na remoção de matéria orgânica solúvel.

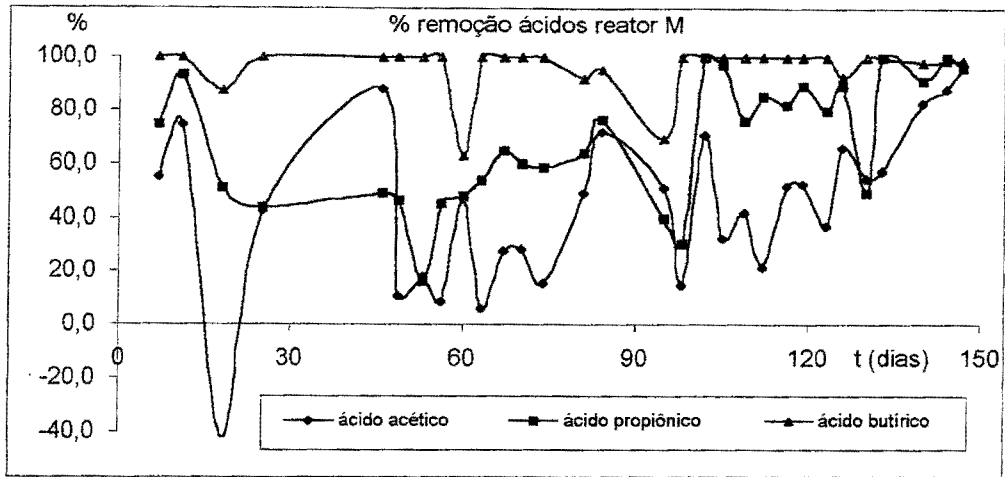


Figura 5.34 Percentuais de remoção dos ácidos acético, propiônico e butírico do reator M

A remoção de matéria orgânica, em termos de DQO total, está apresentada na figura 5.36. Ao compararmos com os resultados das análises de sólidos suspensos voláteis efluentes, verifica-se que o menor valor percentual de remoção ocorreu no período em que foi modificado o tempo de retenção hidráulico, com o maior arraste de sólidos. A figura 5.37 indica as médias mensais dos percentuais de remoção de DQO total e filtrada.

Após um período de cinco meses, obteve-se percentuais de remoção de 80,4 e 85,3% para DQO total e filtrada, respectivamente. Acredita-se que fossem atingidos estes valores antes de 150 dias caso o reator não sofresse intervenções nas suas condições operacionais.

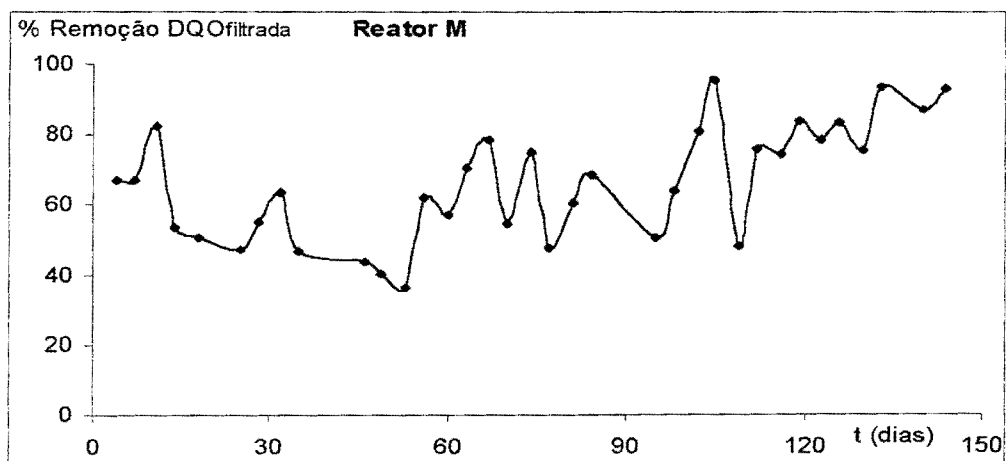


Figura 5.35 Percentual de remoção de DQO dissolvida do reator M

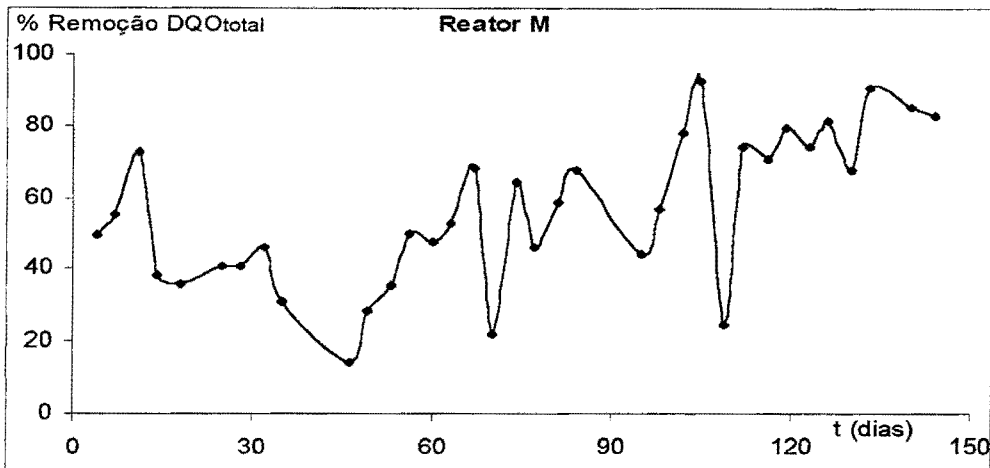


Figura 5.36 Percentual de remoção de DQO total do reator M

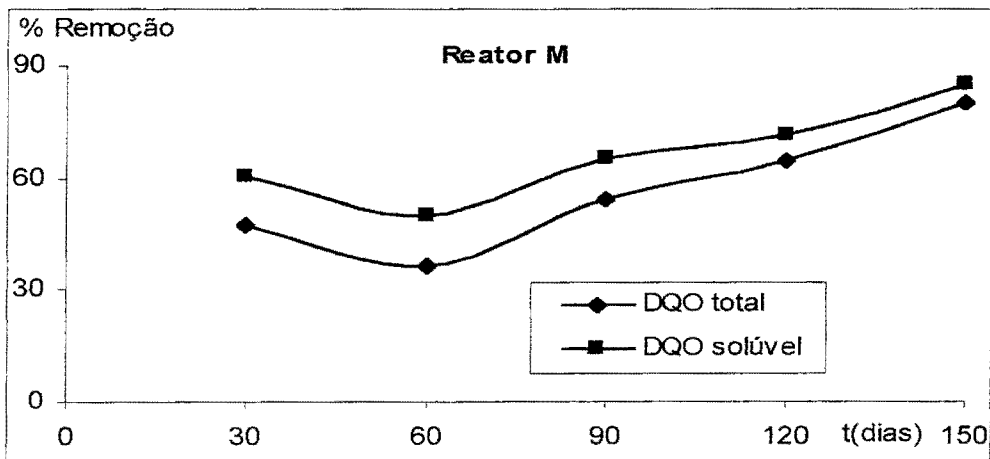


Figura 5.37 Médias mensais dos percentuais de remoção de DQO total e filtrada

5.5.2 Análise da biomassa anaeróbia

A biomassa do reator M foi avaliada através das análises de concentração de sólidos voláteis totais (figura 5.38) e atividade metanogênica específica (figura 5.39). Realizaram-se análises de PCR porém sem determinar o número mais provável de organismos. Somente identificou-se em qual diluição da amostra o teste tornou-se negativo.

O arraste da biomassa ocorrido com a modificação do tempo de retenção hidráulico refletiu-se em uma redução de mais de 200% na concentração de voláteis do lodo. Embora tenha sido recuperado para um valor próximo ao inicial em trinta dias, verificaram-se oscilações durante todo o período experimental.

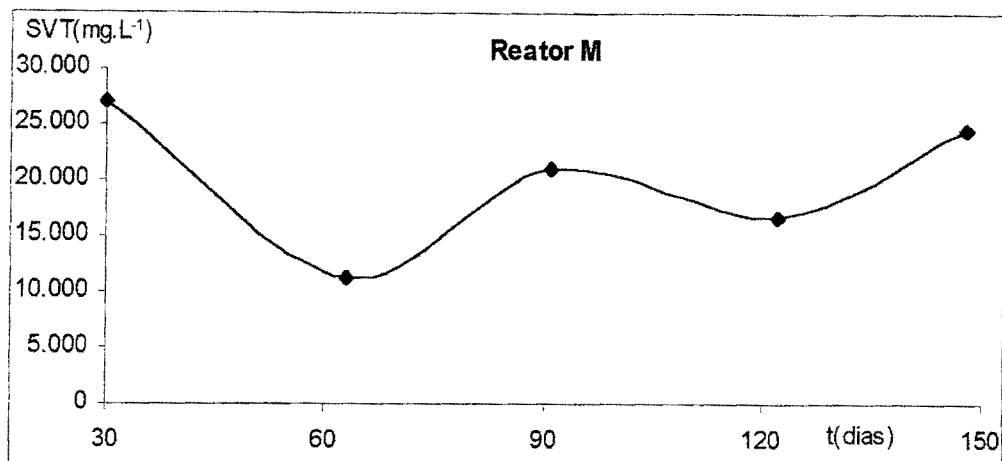


Figura 5.38 Concentração de sólidos voláteis totais presente na biomassa do reator M

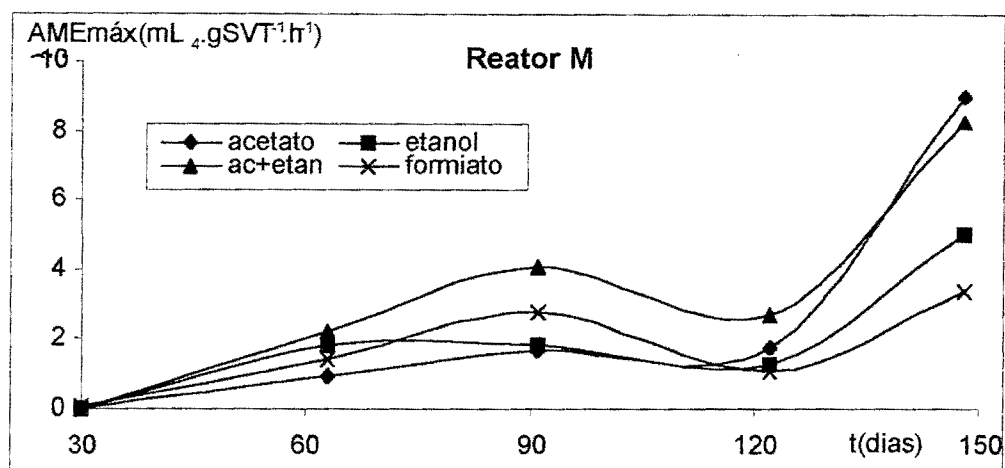


Figura 5.39 Atividade metanogênica específica em acetato, etanol, formiato e mistura de acetato e etanol para a biomassa do reator M

As atividades máximas nos substratos testados apresentaram tendência semelhante, crescendo ou decrescendo simultaneamente. Ao término de cinco meses, obteve-se o valor máximo em acetato: $8,97 \text{ mLCH}_4.\text{gSVT}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Em etanol a atividade manteve-se aproximadamente constante durante três meses em $1,66 \text{ mLCH}_4.\text{gSVT}^{-1}.\text{h}^{-1}$, elevando-se para $4,98 \text{ mLCH}_4.\text{gSVT}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no final do experimento. O menor valor foi encontrado em formiato: $3,39 \text{ mLCH}_4.\text{gSVT}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Observa-se um equilíbrio entre as populações de bactérias metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas. Porém, mesmo tendo apresentado comportamento

semelhante nos diferentes substratos testados, não verificou-se nenhuma relação entre os resultados.

A concentração de sólidos voláteis presentes no lodo mostrou-se independente da atividade apresentada pelos microrganismos. Ao analisarmos os sólidos voláteis, consideram-se todas as populações, inclusive as inativas. No teste de atividade verifica-se a presença de determinado gênero de bactérias, neste caso, metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas.

As análises de PCR mostraram um aumento da presença de metanogênicas totais e um decréscimo para acetoclásticas. O quadro 5.3 apresenta o número de diluições testadas em que o resultado foi positivo.

Quadro 5.3 Número de diluições amostrais em que o teste de PCR foi positivo

Dias	30	60	90	120	150
Metanogênicas totais	1	4	3	3	6
Metanogênicas acetoclásticas	1	4	3	3	2

Embora se observe que os resultados encontrados para metanogênicas totais apresentam a mesma tendência encontrada para o teste de atividade em acetato, estes não podem ser conclusivos. Somente indicam a presença de pelo menos uma bactéria na amostra tomada.

6. CONCLUSÕES

Ao submeter-se o mesmo lodo anaeróbio a substratos com diferentes graus de complexidade, observou-se que somente ocorreu formação de grânulos para aquele que recebeu sacarose, ou seja, o substrato que atendia a um nicho maior de microrganismos. A granulação é de extrema importância em reatores do tipo UASB, já que dificultam o arraste de biomassa e constituem suporte para o desenvolvimento de novos microrganismos. O número mais provável de organismos metanogênicos e a concentração de sólidos voláteis também foi superior neste reator.

Substratos adicionados na forma de sais de sódio ou cálcio favoreceram a produção de alcalinidade, inibindo a acidificação do meio. Mesmo com a elevação da concentração de ácidos no meio, a biomassa não sofreu com reduções de pH. Porém, a pouca produção na fase inicial do experimento não retardou a falência do reator A. Observou-se que a produção de alcalinidade apresentou tendência crescente ao longo do tempo.

Os reatores atingiram eficiências de remoção de matéria orgânica de mais de 80% ao término do experimento, sendo o reator S o único a apresentar tendência sempre ascendente até atingir estabilização. Os reatores A e M apresentaram períodos com redução de eficiência.

A concentração de sólidos voláteis presentes na biomassa também oscilou nos reatores A e M. Contudo, passados quatro meses, os valores somente decresceram para o reator A. Ao contrário, neste mesmo período os valores sofreram acréscimo de aproximadamente 35% para o reator S. Observou-se que a diversidade de organismos favoreceu a granulação do lodo e o grânulo, uma vez formado, permitiu o rápido desenvolvimento dos microrganismos.

Os valores de atividade metanogênica específica máxima obtidas quando os reatores entraram em regime estável, ou seja, na fase terminal do experimento, estão sumarizadas no quadro 6.1. O reator A, entre os substratos testados, apresentou maior atividade em acetato. Este resultado era previsível, já que este reator somente recebeu acetato como fonte de carbono. A atividade em formiato indicou a presença de metanogênicas hidrogenotróficas.

Quadro 6.1 Atividade metanogênica específica máxima ($\text{mL CH}_4.\text{gSVT}^{-1}.\text{h}^{-1}$) obtida no último teste realizado com a biomassa dos reatores experimentais

Substrato testado	Acetato	Etanol	Formiato	Acetato + etanol
Reator A	7,39	0	2,93	0
Reator M	8,97	4,98	3,39	8,21
Reator S	5,01	9,55	2,75	5,84

Maiores atividades em acetato e formiato foram obtidas pela biomassa presente no reator M. Observou-se que a mistura de ácidos graxos voláteis, substrato intermediário entre o acetato e a sacarose, permitiu o maior desenvolvimento das populações metanogênicas. A atividade em etanol mostra que também ocorreu o desenvolvimento de outros microrganismos que vivem em associações sintróficas com as metanogênicas.

No reator S, por sua vez, a população acidogênica se desenvolveu mais rapidamente. A maior atividade foi obtida em etanol e, comparando-se com os outros reatores, apresentou as menores atividades em acetato e formiato. O número mais provável de organismos metanogênicos decresceu após três meses da partida operacional enquanto que no reator A este valor apresentou tendência crescente.

Embora tenha se encontrado relação numérica somente entre os teste de atividade em formiato e número mais provável de acetoclásticas para a biomassa do reator S, verificaram-se resultados encorajadores para estudos mais detalhados a respeito de análises com a utilização da técnica de PCR.

O lodo proveniente da indústria de gelatinas, com atividade máxima em acetato de $4,04 \text{ mLCH}_4.\text{gSVT}^{-1}.\text{h}^{-1}$, apresentou resultados positivos para ambos os *primers* enquanto que, para o lodo proveniente da estação de tratamento de efluentes municipais, com atividade nula para acetato, os testes com PCR foram negativos.

Da mesma forma, o reator S obteve a menor atividade em acetato ao término do experimento e o número mais provável de metanogênicas foi decrescente. Por outro lado, o reator A, com a maior atividade em acetato, apresentou tendência crescente para o número de metanogênicas.

A presente pesquisa deu ênfase ao uso de técnicas modernas para avaliação de biomassa ativa em reatores anaeróbios em complementação às análises físicas tradicionalmente utilizadas. A análise de sólidos suspensos voláteis, parâmetro utilizado em processos biológicos, não informa a presença dos diferentes grupos de organismos que atuam na conversão anaeróbia de substratos orgânicos.

Sendo a metanogênese a etapa limitante no processo de tratamento de efluentes predominantemente solúveis, é fundamental que se mantenha um monitoramento dos organismos que atuam nesta etapa. O teste de atividade metanogênica específica, realizado em respirômetro anaeróbio, fornece a atividade de populações bacterianas definidas, de acordo com o substrato utilizado.

Os testes realizados com acetato mostraram que a presença de organismos acetoclásticos é inexpressiva em lodos que recebem efluentes diluídos, como os esgotos domésticos. A utilização de substratos alternativos, tais como etanol e formiato, permitiram uma caracterização complementar da biomassa metanogênica. A degradação do etanol envolve ambas populações, acetoclásticas e hidrogenotróficas. Com formiato, obteve-se uma aproximação da população hidrogenotrófica, tendo em vista que a grande maioria dos organismos que utilizam este substrato também são capazes de utilizar hidrogênio.

A técnica de reação em cadeia da polimerase, embora dominada no que diz respeito à detecção de determinados organismos, apresentou dificuldades para aplicação em lodos de reatores anaeróbios. Pelo fato de trabalhar-se com amostras em ordens de grandeza de microlitros, esta deve ser homogênea e representativa de toda a biomassa presente no reator. Aplicando-se em conjunto a técnica da determinação do número mais provável de organismos, este problema fica agravado. Outro fator adicional que pode ter comprometido a quantificação de organismos foi o reduzido número de espécies utilizados para a construção dos *primers*.

Mesmo não diferenciando organismos inativos e ativos na biomassa, acredita-se que esta técnica seja uma ferramenta promissora, porém demandará uma série de estudos complementares para construção de um *primer* adequado às necessidades. As principais vantagens do PCR são que, uma vez identificados a melhor técnica de extração de DNA do lodo e o(s) *primer(s)* ideal, a realização do teste demanda pequena quantidade de tempo. Organismos não cultiváveis são detectados e pode-se fazer análises a nível de espécie.

Conclui-se que o teste de atividade metanogênica específica, mesmo demandando maior quantidade de tempo para sua realização, é ideal como parâmetro de monitoramento da atividade global da biomassa. É possível prever as populações predominantes, em função dos diferentes substratos orgânicos utilizados, e a carga orgânica que o sistema tem condições de degradar.

7. RECOMENDAÇÕES

Para o aperfeiçoamento da técnica de PCR, os *primers* devem ser desenvolvidos a partir do alinhamento de sequências de genes de um maior número de espécies, principalmente das existentes em digestores anaeróbios. Para tanto, um trabalho preliminar de sequenciamento genético faz-se necessário.

A utilização de uma cultura pura de bactérias acetoclásticas em conjunto com uma técnica de contagem de organismos, permite a validação tanto do *primer* desenvolvido para a detecção destes organismos como da utilização da técnica de determinação do número mais provável. A construção de um *primer* competitivo é desejável.

Recomendam-se também, estudos mais aprofundados nos testes de atividade metanogênica específica com substratos alternativos ao acetato, buscando a padronização dos procedimentos experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, M.S. 1992. Influence of the acetate concentration on the recovery time of a perturbed anaerobic digester. **Biotechnology Letters** v.14, n.6, p. 535-538.
- AHRING, B.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.43, p.559-565.
- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews** v. 59, n.1, p.143-169.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, APHA; **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 1985. Washington.
- ARCHER, D.B.; HARRIS, J.E. 1986. Anaerobic Bacteria in Habitats other than Man. In: Society for Applied Bacteriology Symposium Series. N. 13. London: E.M. Barnes & G.C. Mead.
- ATLAS, R.; BARTHA, R. 1993. **Microbial Ecology: Fundamentals and Application**. New York: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. CA. 576p.
- BAEK, J.; KENERLEY, C.M. 1998. Detection and enumeration of a genetically modified fungus in soil environments by quantitative competitive polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Ecology** v.25/4, p.419-428.
- BROWN, J. C. 1995. What the Heck is PCR. <http://falcon.cc.ukans.edu/~jbrown/pcr/html>
- BRYNIOK, D.; TRÖSCH, W. 1989a. ELISA techniques for the determination of methanogenic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.32, p.235-242.
- BRYNIOK, D.; TRÖSCH, W. 1989b. Taxonomy of methanogens by ELISA techniques. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.32, p.243-247.

- CHERNICHARO, C.A.; CARDOSO, M.R. 1998. Development and evaluation of a partitioned UASB reactor for the treatment of domestic sewage from small villages. In: V Taller y Seminario Latinoamericano Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales, 27-30 outubro, Viña del Mar, Chile
- DE ZEEUW, W.J. **Acclimatization of anaerobic sludge for UASB-reactors start-up.** Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1984. Ph.D. Thesis.
- DIVIACCO, S.; NORIO, P.; ZENTILIN, L. et al. 1992. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. **Gene** v.122, p. 313-320.
- DOLFING, J.; BLOEMEN, W.G.B.M. 1985. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. **Journal of Microbiological Methods** v.4, p.1-12.
- ERLICH, H.A. 1989. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press, 246p.
- FELSKE, A.; AKKERMANS, A.; DE VOS, W. 1998. Quantification of 16S rRNAs in Complex Bacterial Communities by Multiple Competitive Reverse Transcription-PCR in Temperature Gradient Gel Eletrophoresis Fingerprints. **Applied and Environmental Microbiology** v.64, p.4581-4587.
- FUKUSAKI, S.; NISHIO, N.; NAGAI, S. 1990. Kinetics of the Methanogenic Fermentation of Acetate. **Applied and Environmental Microbiology** v.56, p.3158-3163.
- GAUDY, A.F. 1988. Elements of Bioenvironmental Engineering. San Jose: Enginering Press, Inc. 592p.
- GODON, J.; ZUMSTEIN, E.; DABERT, P. et al. 1997. Microbial 16S rDNA Diversity in an Anaerobic Digester. **Water Science and Technology** v.36, n.6-7, p. 49-55.

- GORRIS, L.; VAN DEURSEN, J.; VAN DER DRIFT, C. et al. 1989. Inhibition of propionate degradation by acetate in methanogenic fluidized bed reactors. **Biotechnology Letters** v.11, n.1, p. 61-66.
- GROßKOPF, B.; JANSSEN, P.; LIESACK, W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. **Applied and Environmental Microbiology** v.64, n.3, p.960-969.
- GROTENHUIS, J.; SMIT, M.; PLUGGE, C. et al. 1991. Bacteriological Composition and Structure of Granular Sludge Adapted to Different Substrates. **Applied and Environmental Microbiology** v.57, n.7, p.1942-1949.
- HALES, B.; EDWARDS, C.; RITCHIE, D. et al. 1996. Isolation and Identification of Methanogen-Specific DNA from Blanket Bog Peat by PCR Amplification and Sequence Analysis. **Applied and Environmental Microbiology** v.62, n.2, p.668-675.
- HARMSSEN, H.J.; AKKERMANS, A.; STAMS, A. et al. 1996. Population Dynamics of Propionate-Oxidizing Bacteria under Methanogenic and Sulfidogenic Conditions in Anaerobic Granular Sludge. **Applied and Environmental Microbiology** v.62, n.6, p.2163-2168.
- HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.; PICKUP, R. 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. **Microbial Ecology** n.35, p. 1-21.
- HENZE, M.; HARREMOES, P. 1983. Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors – a literature review. **Water Science and Technology** v.15, p. 1-101.
- HICKEY, R.F. et al. 1991. Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. **Water Science and Technology** v.24, n.8, p. 207-255.
- HOLT, G.H. et al. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 9^o edição

- HORAN, N. 1996. **Environmental Waste Management, a European Perspective**. New York: John Wiley & Sons
- JAMES, A. 1990. The development of a new methodology for the assessment of specific methanogenic activity. **Water Research** v.24, n.7, p.813-825.
- KATO, M.T.. **The anaerobic treatment of low strength soluble wastewaters**. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1994. Ph.D. Thesis.
- KATO, M.T.; FIELD, J.; LETTINGA, G. 1997. The anaerobic treatment of low strength wastewaters in UASB and EGSB reactors. **Water Science and Technology** v.36, n.6-7, p. 375-382.
- KOPCZYNSKI, E.D.; BATESON, M.; WARD, D. 1994. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** v.60, n.2, p.746-748.
- LEPISTÖ, R.; RINTALA, J.A. 1995. Acetate treatment in 70°C upflow anaerobic sludge-blanket (UASB) reactors: start-up with thermophilic inocula and the kinetics of the UASB sludges. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.43, p.1001-1005.
- LEWIN, B. 1994. **Genes V**. New York: Oxford University Press. 1272p.
- LOWE, S.; JAIN, M.K.; ZEIKUS, J.G. 1993. Biology, ecology and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity or substrates. **Microbiological Reviews** v. 57, n.2, p.451-509.
- MACARIO, A.J.; CONWAY DE MACARIO, E. 1988. Quantitative immunologic analysis of the methanogenic flora of digestors reveals a considerably diversity. **Applied and Environmental Microbiology** v.54, n.1, p. 79-86.
- MACARIO, A.J.; PECK, M.; CONWAY DE MACARIO, E. et al. 1991. Unusual methanogenic flora of a wood-fermenting anaerobic bioreactor. **Journal of Applied Bacteriology** v.71, p. 31-37.

- MALINA, J.F.; POHLAND, F.G. 1992. *Desing of Anaerobic Processes for the Treatment of Industrial and Municipal Wastes*. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc. 214p.
- MIGUEZ, C.B.; BOURQUE, D.; GUIOT, S. et al. 1999. Monitoring methanotrophic bacteria in hybrid anaerobic-aerobic reactors with PCR and a catabolic gene probe. **Applied and Environmental Microbiology** v.65/2, p.381-388.
- MIN, H.; ZINDER, S.H. 1989. Kinetics of Acetate Utilization by Two Termofilic Acetotrophic Methanogens: *Methanosarcina* sp. Strain CALS-1 and *Methanotrix* sp. Strain CALS-1. **Applied and Environmental Microbiology** v.55, p.488-491.
- MONTEGGIA, L.O. 1997. Proposta de Metodologia Para Avaliação do Parâmetro “Atividade Metanogênica Específica” In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 14 a 19 setembro, Foz do Iguaçu.
- MONTEGGIA, L.O. **The Use of Specific Methanogenic Activity for Controlling Anaerobic Reactors**. Newcastle: University of Newcastle, 1991. Ph.D. Thesis.
- MUYZER, G. 1999. Structure, Function and Dynamics of Microbial Communities: the molecular biological approach. <http://www.hull.ac.uk/molecol/natoabs.htm#1>
- MUYZER, G.; DE WALL, E.; UITTERLINDED, A.G. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis Analysis of polimerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology** v.59, p. 695-700.
- National Center of Biotechnology Information. 1999. <http://www.ncbi.nlm.gov/ Database/ index.html>.
- PAVLOSTATHIS, S.G.; GOMEZ, E.G. 1991. Kinetics of anaerobic treatment. **Water Science and Technology** v.24, n.8, p. 35-59.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.; KRIEG, N.R. 1997. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. São Paulo: Makron Books do Brasil Editora Ltda. 523p.

- POLZ, M.F.; CAVANAUGH, C.M. 1997. A simple method for quantification of uncultured microorganisms in the environment based on in vitro transcription of 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology** v.63, n.3, p.1028-1033.
- RASKIN, L.; STROMLEY, J.; RITTMANN, B. et al. 1994a. Group-Specific 16S rRNA Hybridization Probes to Describe Natural Communities of Methanogens. **Applied and Environmental Microbiology** v.69, n.4, p.1232-1240.
- RASKIN, L.; POULSEN, L.; NOGUERA, D. et al. 1994b. Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology** v.69, n.4, p. 1241-1248.
- ROITT, I.M. 1980. *Essential Immunology*. London: Blackwell Scientific Publications 358p.
- ROSADO et al. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia** n.28, p.135-147.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANZ, I.; POLANCO, F.F. 1990. Low temperature treatment of municipal sewage in anaerobic fluidized bed reactors. **Water Research** v.24, n.4, p.463-469.
- SIEBERT, P.D.; LARRICK, J.W. 1992. Competitive PCR. **Nature** v.359, n.6395, p.557-558.
- SILVEIRA, I.C.T.; MONTEGGIA, L.O. 1998. Performance of upflow anaerobic sludge blanket reactor applied to the treatment of municipal wastewaters. In: V Taller y Seminario Latinoamericano Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales, 27-30 outubro, Viña del Mar, Chile.
- SMALLA, T.; CRESSWELL, N.; HAGLER, L. et al. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **Journal of Applied Bacteriology** n.74, p.78-85.
- SØRENSEN, A.H. **Microbial characterization of methanogenic reactors**. Denmark: Technical University of Denmark, 1996. Ph.D. Thesis.

- SØRENSEN, A.H.; AHRING, B.K. 1993. Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.40, p.427-431.
- SØRENSEN, A.H.; AHRING, B.K. 1997. An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Whole-Cell Determination of Methanogens in Samples from Anaerobic Reactors. **Applied and Environmental Microbiology** v.63, n.5, p.2001-2006.
- STEFFAN, R.; ATLAS, R. 1991. Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology. **Annual Reviews Microbiology** v.45, p.137-161.
- STEFANIE, J.W.H. et al. 1998. Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors. In: The Biological Sulphur Cycle: Environmental Science and Technology. 19-24 April, Wageningen, The Netherlands.
- THIELE, J.H.; CHARTRAIN, M.; ZEIKUS, G. 1988. Control of interespecies electron flow during anaerobic digestion: role of floc formation in syntrophic methanogenesis. **Applied and Environmental Microbiology** v.54, n.1, p.10-19.
- VAN BEELEN, P.; DIJKSTRA, A.; VOGELS, G. 1983. Quantitation of Coenzyme F₄₂₀ in Methanogenic Sludge by the Use of reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography and a Fluorescence Detector. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.18, p.67-69.
- VAN DER DRIFT, C.; GORRIS, L.G.M. 1994. Cofactor Contents of Methanogenic Bacteria. **Biofactors** v.4, n. 3-4, p.139-145.
- VAN LIER, J.; REBAC, S.; LETTINGA, G. 1997. High-Rate Anaerobic Wastewater Treatment Under Psychrophilic and Thermophilic Conditions. **Water Science and Technology** v.35, n.10, p. 199-206.
- VISSER, F.A.; VAN LIER, J.; MACARIO, A. et al. 1991. Diversity and population dynamics of methanogenic bacteria in a granular consortium. **Applied and Environmental Microbiology** v.57, n.6, p.1728-1734.

VEILLEUX,C. 1999. PCR Technology. http://www.accessexcellence.org/LC/SS/PS/PCR/PCR_technology.html

WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature** v.345, n.6270, p.63-65.

WIEGANT, W.M. **Thermophilic Anaerobic Digestion for Waste and Wastewater Treatment**. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1986. Ph.D. Thesis.

ZEIKUS, J.G. 1977. The Biology of Methanogenic Bacteria. **Bacteriological Reviews** v.41, p.514-541.

ANEXO 1

Resultados das análises de PCR, realizadas com a biomassa coletada ao término do primeiro mês de experimento, no qual foram determinadas o número de diluições que apresentaram resultados positivos.

Figura 1, colunas da esquerda para direita: 1. branco (tubo sem amostra); 2 a 7. amostras reator A (DNA original e 5 diluições sucessivas) para o *primer* CDH; 8 a 13. amostras reator A (DNA original e 5 diluições sucessivas) para o *primer* ME; 14 a 18. amostras reator S (DNA original e 4 diluições sucessivas) para o *primer* CDH; 19. amostra controle negativo (bactéria aeróbia) para o *primer* CDH.

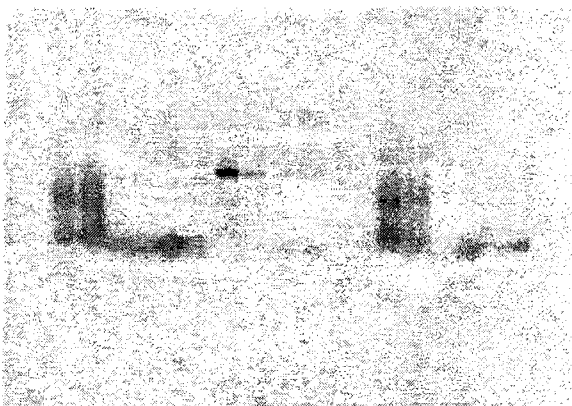


Figura 2, colunas da esquerda para direita: 1 a 6. amostras reator S (DNA original e 5 diluições sucessivas) para o *primer* ME; 7 a 13. amostras reator M (DNA original e 6 diluições sucessivas) para o *primer* CDH; 14 a 19. amostras reator M (DNA original e 5 diluições sucessivas) para o *primer* ME.

