**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO**

**Polímeros Extracelulares Insolúveis (ESP) nos Reatores
Anaeróbios Operados em Bateladas Sequenciais: Caracterização e
Fatores que Favorecem a Produção.**

ANA PAULA MIQUELETO

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Associado Marcelo Zaiat

São Carlos
2006

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

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

M669p Miqueleto, Ana Paula
Polímeros extracelulares insolúveis (ESP) nos reatores anaeróbios operados em bateladas seqüenciais : caracterização e fatores que favorecem a produção / Ana Paula Miqueleto ; orientador Marcelo Zaiat. -- São Carlos, 2006.

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

1. EPS. 2. Polímero extracelular. 3. Tratamento anaeróbio. 4. ASBBR. 5. Glicose. 6. Extrato de carne. 7. Óleo de soja. 8. Macronutrientes. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **ANA PAULA MIQUELETO**

Tese defendida e julgada em 07-11-2006 perante a Comissão Julgadora:

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Titular **EDUARDO CLETO PIRES**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Dr. **MARLEI BARBOSA PASOTTO**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof^a. Dr^a. **NELMA REGINA SEGNINI BOSSOLAN**
(Instituto de Física de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Dr. **SÉRGIO FRANCISCO DE AQUINO**
(Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP)

Aprovada

Prof^a. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Nesta jornada, muitos obstáculos foram encontrados, mas passo a passo estes foram enfrentados e mais uma conquista foi alcançada. Dedico esta e todas as outras conquistas de minha vida à minha Família:

Aos meus pais, João e Cecília,

*Aos meus irmãos e cunhadas, Kleber & Nélida e
Ronaldo & Elis,*

Aos meus lindos sobrinhos, Gabi e Gui.

*Ao meu Grande Amor Ricardo, por todo
carinho, compreensão, dedicação e paciência.*

AGRADECIMENTOS

Ao Marcelo Zaiat, pela amizade, orientação, incentivo, dedicação, compreensão e principalmente por ser um exemplo de honestidade e competência.

À Eloísa Pozzi Gianotti, pela amizade e colaboração nas análises microbiológicas.

À Beth Moraes e Janja, pela amizade e auxílio no LBP.

À Simone Mendonça e Carolina Dolosic, alunas de Iniciação Científica, pela amizade e pela grande contribuição neste trabalho.

À grande amiga Derce Recouvrex por toda contribuição e apoio na realização deste trabalho.

Às eternas amigas Laurice e Leonice, que de maneira direta ou indireta também contribuíram para o meu crescimento.

Aos amigos Katt & Luis Hamilton por toda ajuda e pelos momentos agradáveis.

Agradecimento especial aos colegas: Larinha, Flavinha, Gunther, Karina Querne, Arnaldo, Julia, Márcia Damianovic, Damasceno, Bruna, Ronan e o grande Betão pela amizade, carinho, ajuda e pelos momentos de descontrações.

A todos os colegas do LPB que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Flavia e Fernanda da contabilidade pela ajuda na contabilização das prestações de contas para a FAPESP.

Aos professores e funcionários do SHS/EESC, enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Novozymes Latin America Ltda que gentilmente forneceu as enzimas para este trabalho, em especial à Sabrina Ganem por toda atenção. Ao Professor Willibaldo Schmidell Netto, a Professora Valéria Reginatto Spiller e a Professora Edna Regina Amante pela ajuda com as enzimas.

À Central de Análises Químicas do Instituto de Química de São Carlos na Universidade de São Paulo, em especial ao Mauro e Paulinho pelas análises de FTIR e MEV.

Ao Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Paulo, em especial ao Augusto pelas análises de Raio-X.

À FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto e pela bolsa de estudos concedida.

Uma nuvem não sabe porque se move em tal direção.

Sente um impulso...

É para este lugar que devo ir agora. Mas o céu sabe os motivos e desenhos por trás de todas as nuvens, e você também saberá, quando se erguer o suficiente para ver além dos horizontes.

(Richard Bach)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
<i>1. INTRODUÇÃO.....</i>	<i>1</i>
<i>2. OBJETIVOS.....</i>	<i>3</i>
<i>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</i>	<i>4</i>
<i>3.1. Estudos realizados no ASBBR</i>	<i>4</i>
<i>3.2 Biofilmes e Exopolissacarídeos (EPS)</i>	<i>9</i>
3.2.1 Composição dos exopolissacarídeos bacterianos nos biofilmes	11
3.2.2 Efeito das condições nutricionais na produção de EPS	15
<i>3.3. Considerações Finais</i>	<i>18</i>
<i>4. MATERIAL E MÉTODOS</i>	<i>19</i>
<i>4.1. Material</i>	<i>19</i>
4.1.1. Configuração do Reator em Batelada.....	19
4.1.2. Suporte de Imobilização da Biomassa Anaeróbia	20
4.1.3. Inóculo.....	20
4.1.4. Água Residuária Sintética	21
<i>4.2. Métodos</i>	<i>22</i>
4.2.1. Determinação da Concentração de Glicose.....	22
4.2.2. Determinação da Concentração de Proteína.....	23
4.2.3. Ácidos Voláteis Totais por Cromatografia Gasosa	23
4.2.4. Análise DQO, N-NTK, Sólidos, Carbono Orgânico Total e Alcalinidade a Bicarbonato.....	24
4.2.5. Potencial Redox.....	24
4.2.6. Determinação da Estrutura e Composição do EPS.....	25

Testes Enzimáticos.....	25
Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	25
Espectroscopia de Raio-X.....	26
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	26
4.2.7 .Testes Realizados para a Purificação do Polímero Extracelular.....	27
Liu & Fang (2002)	27
Bertocchi <i>et al.</i> (1997)	28
Skairi <i>et al.</i> (1997)	28
4.2.8. Análises Microbiológicas.....	28
Coloração Gram	29
Coloração Neisser	30
Coloração de Polihidroxialcanoato (PHA)	30
4.2.9. Investigação de enzimas respiratórias.....	31
4.2.10. Extração, amplificação de DNAr pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	31
4.2.11. Clonagem e seqüenciamento.....	32
5. Procedimento experimental	33
5.1. Imobilização da biomassa anaeróbia	33
5.2. Operação do ASBBR.....	34
5.3. Ensaio de Adsorção do Óleo de Soja	37
5.4. Isolamento do microrganismo responsável pela produção da celulose quando o ASBBR foi alimentado com Glicose/extrato de carne/óleo de soja	39
5.5. Amostragem	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
6.1. Análises do Desempenho do ASBBR nas Diferentes Condições Nutricionais.....	42
6.2. Estudos Cinéticos da Degradação da GLICOSE	47
6.3. Produção de Exopolissacarídeos (EPS)	52
6.4. Análises microbiológicas do material polimérico	58
6.4.1. Isolamento e Identificação do Microrganismo Responsável pela Produção de Celulose quando o ASBBR foi Alimentado com Glicose/Extrato de Carne/Óleo de Soja.	61

6.5. <i>Análises do Material Polimérico</i>	66
6.5.1. Testes Enzimáticos	66
6.5.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	67
6.5.3. Espectroscopia de Raio-X	69
6.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
7. CONCLUSÕES	75
8. SUGESTÕES	77
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
9.1. <i>Referência Eletrônica</i>	87
APÊNDICE A	88
Gráficos do monitoramento diário dos parâmetros obtidos no ASBBR quando alimentado nas diferentes condições nutricionais.	88
APÊNDICE B	91
Determinação das isotermas de adsorção do óleo de soja na espuma de poliuretano.	91
APÊNDICE C	94
Fotografias do ASBBR após a operação com as diferentes condições nutricionais	94
APÊNDICE D	97
Testes de Purificação do EPS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. No <i>quorum sensing</i> , os auto-indutores, quando em concentração elevada, ligam-se a moléculas sensoras das bactérias (chamadas em geral de ‘proteínas R’), que atuam como reguladores da expressão de genes específicos.....	10
Figura 3.2. Rota metabólica proposta para a biosíntese de nucleotídeos-açúcares e produção de glucanose pela <i>A. xylinum</i> I 2281 com glicose e frutose usada como substrato. 1, glicose permease, 2; glicose desidrogenase, 3; glicose hexoquinase, 4; fosfoglicomutase; 5, UDP-glicose pirofosforilase; 6, glicose desidrogenase; 7, D-gliconato desidrogenase; 8, D-gliconato desidrogenase; 9, fosfoglicoisomerase; 10, glicose-1-fosfato timidilil transferase; 11, glicose desidratase; 12, ramnose sintase; 13, frutose permease; 14, frutose hexoquinase; 15, manose isomerase; 16, manose mutase; 17, manose-1-fosfato guanilil transferase; 18, levansacarase, 19, PPP polimerase, rota pentose fosfato.	13
Figura 4.1: Esquema do reator operado em bateladas seqüenciais (Cubas <i>et al.</i> , 2001)	20
Figura 4.2: Métodos de extração e purificação de EPS.	27
Figura 5.1: Esquema representativo do ASBBR quando o operou em anaerobiose estrita. ...	36
Figura 5.2: Esquema experimental da operação do ASBBR.	37
Figura 6.1. Parâmetros monitorados no ASBBR no período de operação com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN). (a) eficiência de remoção da DQO total e filtrada, (b) alcalinidade a bicarbonato do afluente e efluente e concentração do AVT, obtidos por CG, do efluente.	44
Figura 6.2. Fotos retiradas no final da operação do ASBBR alimentado com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN): (a) superfície do cesto, (b) espumas do cesto.	45
Figura 6.3. Diagrama proposto para a rota de degradação da matéria orgânica no ASBBR, durante um ciclo, quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN) em condição normal de operação (anaeróbia).	47
Figura 6.4. Diagrama proposto para a rota de degradação da matéria orgânica no ASBBR, durante um ciclo, quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN) em condição de anaerobiose estrita.	48
Figura 6.5. (a) e (c) perfil de decaimento da concentração de glicose e produção e consumo de ácidos voláteis no ASBBR alimentado com glicose na razão C/N1 em condição normal de operação (anaeróbia) e anaeróbia estrita, respectivamente. (b) e (d) velocidades de consumo da glicose e de produção e consumo dos ácidos voláteis em condição normal de operação (anaeróbia) e anaeróbia estrita, respectivamente. (■) concentração de glicose obtida experimentalmente, (●) concentração de ácido acético obtida experimentalmente, (▲) concentração de ácido butírico obtida experimentalmente, (▼) concentração de ácido propiônico obtida experimentalmente, (—) valores preditos pelo modelo.	50

Figura 6.6. Quantidade de EPS produzido nas diferentes condições nutricionais, produção diária de biomassa e relação C/N.	53
Figura 6.7: Perfis temporais de DQO, das fontes de carbono, ácidos voláteis totais (AVT) e potencial redox obtidos no ASBBR nas diferentes condições nutricionais: (a) glicose na razão C/N1; (b) glicose na razão C/N2; (c) glicose na razão C/N3; (d) Ácidos acético, propiônico e butírico; (e) glicose borbulhando N ₂ , (f) Óleo de Soja, (g) Extrato de Carne e (h) Glicose/Extrato de Carne/Óleo de Soja.	56
Figura 6.8. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e coloração-Gram, com o aumento de 1500 vezes, referentes às amostras de EPS obtidas no ASBBR alimentado com glicose nas diferentes relações C/N: (a) e (b) glicose C/N1; (c) e (d) glicose C/N2; (e) e (f) glicose C/N3.....	60
Figura 6.9. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e coloração-Gram, com aumento de 1500 vezes, referentes às amostras de EPS obtidas no ASBBR alimentado com diferentes fontes de carbono: (a) e (b) extrato de carne; (c) e (d) óleo de soja; (e) e (f) glicose/extrato de carne/óleo de soja.	61
Figura 6.10. Primeira etapa do isolamento em meio sólido contendo os corantes Congo red e Comassie blue em diferentes diluições. As colônias de coloração avermelhada são de espécies capazes de produzir celulose. Porém, isolou-se a espécie cuja as características da colônia era de borda rugosa de aspecto seco e áspero; colônia indicada pela seta.....	62
Figura 6.11. Segunda etapa do isolamento, cultivo das culturas selecionadas na primeira etapa em meio líquido. Formação do biofilme na interface líquido/ar.....	63
Figura 6.12. (a) Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase da cultura isolada; (b) coloração Gram da cultura jovem; (c) coloração Gram da cultura em estágio tardio de desenvolvimento - presença de segmentos Gram negativos; (d) coloração Neisser negativa; (e) coloração PHA negativa.....	64
Figura 6.13. Estrutura linear da celulose.....	67
Figura 6.14. Espectros de FTIR dos EPS produzidos nas diferentes condições nutricionais.	69
Figura 6.15. Espectros de difração de raio-X da celulose microcristalina e dos EPS produzidos nas diferentes condições nutricionais.	71
Figura 6.16. Micrografias de MEV dos polímeros extracelulares formados no reator em diferentes fontes de carbono: (a) glicose na razão C/N1, com aumento de 5000 vezes e (b) glicose na razão C/N1, com aumento de 10000 vezes; (c) extrato de carne (proteína), com aumento de 5000 vezes e (d) extrato de carne, com aumento de 10000 vezes, (e) óleo de soja (lipídio) , com aumento de 5000 vezes e (f), óleo de soja, com aumento de 10000 vezes.	73
Figura 6.17. Micrografias de MEV, com aumento de 10.500 vezes e dimensão da barra de 1 µm, das colônias de <i>A. xylinum</i> , microfibrilas de celulose (setas brancas) e pedaços de celulose (seta preta).	74
Figura A.1. Gráficos do monitoramento diário do ASBBR nas diferentes condições nutricionais.	90

Figura B.1. Isotermas de adsorção do óleo de soja na espuma de poliuretano: (a) Isoterma de Langmuir, (b) Isoterma de Freundlich.....	93
Figura C.1. Fotografias da superfície do cesto e das espumas ao final da operação do ASBBR alimentado com glicose: (a) e (b) razão C/N1 (13,6 gC/gN), (c) e (d) razão C/N2 (6,8 gC/gN), (e) e (f) razão C/N3 (3,4 gC/gN).....	95
Figura C.2. Fotografias da superfície do cesto e das espumas ao final da operação do ASBBR nas diferentes fontes de carbono: (a) e (b) extrato de carne, (c) e (d) óleo de soja, (e) e (f) glicose/extrato de carne/óleo de soja.....	96
Figura D.1. Espectros de FTIR dos EPS produzidos no ASBBR alimentado com glicose após os testes descritos por Liu & Fang (2002).	99
Figura D.2. Espectros de difração de raio-X do polímero produzido a partir da glicose na relação C/N1 (13.6 gC/gN) após tratamento descrito por Skairi <i>et al.</i> (1997) e Bertocchi <i>et al.</i> (1997).	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Efeito de nutrientes limitantes de crescimento no rendimento do EPS (Margaritis & Pace, 1985).....	16
Tabela 4.1 - Composição de água residuária sintética utilizada (Del Nery, 1987).	21
Tabela 4.2 - Concentrações das fontes de carbono correspondentes a DQO de 1000 mg/L.	22
Tabela 5.1 – Resumo das condições experimentais, baseado na alimentação do reator.	35
Tabela 6.1 - Valores médios dos parâmetros obtidos no monitoramento do ASBBR quando operado em cada condição.....	43
Tabela 6.2 - Constantes cinéticas aparentes obtidas nos experimentos realizados utilizando-se glicose na razão C/N1, em condição de operação normal (anaeróbia) e de anaerobiose estrita, no ASBBR.	51
Tabela 6.3 - Rendimento de EPS, relação C/N e produção diária de biomassa, nas diferentes condições nutricionais.....	53
Tabela B.1 - Parâmetro de adsorção do óleo de soja na espuma de poliuretano obtidos a partir das isotermas de Langmuir e de Freundlich.	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ASBBR – anaerobic sequencing batch biofilm reactor

ASBR – anaerobic sequencing batch reactor

C/N – relação carbono/nitrogênio

C/N1 – relação carbono/nitrogênio na proporção de 13,6 gcarbono/gnitrogênio

C/N2 - relação carbono/nitrogênio na proporção de 6,8 gcarbono/gnitrogênio

C/N3 - relação carbono/nitrogênio na proporção de 3,4 gcarbono/gnitrogênio

EPS – polímero extracelular (s) ou exopolissacarídeo (s)

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

MEV – microscopia eletrônica de varredura

SDS – dodecilsulfato de sódio

UASB – upflow anaerobic sludge blanket

LISTA DE SÍMBOLOS

AB – alcalinidade a bicarbonato

ABa - alcalinidade a bicarbonato afluente

ABe – alcalinidade a bicarbonato efluente

AV – ácidos voláteis específicos, obtidos por cromatografia gasosa

AVT – ácidos voláteis totais

C_S – concentração de substrato

C_{SR} – concentração residual de substrato

C_{S0} – concentração inicial de substrato

$C_{acético}$ – concentração de ácido acético

$C_{butírico}$ – concentração de ácido butírico

C_{EPS} – concentração de exopolissacarídeos

$C_{glicose}$ – concentração de glicose

$C_{propiónico}$ – concentração de ácido propiónico

k^{app} – constante cinética aparente

m_{SVT} - massa de sólidos voláteis totais no final de operação

m_{SVT_0} - massa de sólidos voláteis totais no início de operação

DQO – demanda química de oxigênio

DQOr – porcentagem de remoção de demanda química de oxigênio

DQO – demanda química de oxigênio

DQOr – porcentagem de remoção de demanda química de oxigênio

$r_{glicose}$ – velocidade consumo da glicose

$r_{butírico}$ – velocidade produção de consumo ácido butírico

$r_{propiónico}$ – velocidade de produção e consumo do ácido propiónico

r_{EPS} – velocidade de produção de exopolissacarídeos

$r_{acético}$ – velocidade de produção de consumo do ácido acético

PR – potencial redox

SVT – sólidos voláteis totais

t - tempo

$Y_{SVT / dia}$ - crescimento bacteriano diário, medido em sólidos voláteis totais,

$Y_{EPS / fontecarbono}$ - produção de exopolissacarídeos por massa de fonte de carbono fornecida

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) insolúveis produzidos em processos de tratamento anaeróbios de certos tipos de água residuárias são indesejáveis devido a problemas operacionais que podem vir causar, inviabilizando, muitas vezes, o processo. O reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais contendo biomassa imobilizada (ASBBR) é uma nova configuração de reator que vem sendo estudada no tratamento de águas residuárias cujos resultados são positivos, no entanto em algumas condições observou-se a produção de EPS que inviabilizou o processo. Para evitar estes problemas operacionais em escala real é importante saber os fatores que favorecem a produção de EPS nestes sistemas. Portanto, os objetivos deste trabalho foram verificar a influência de diferentes fontes de carbono e a relação carbono/nitrogênio (C/N), na produção e composição de polímeros extracelulares (EPS) e no desempenho do ASBBR contendo biomassa imobilizada em espuma de poliuretano. As fontes de carbono utilizadas foram glicose, extrato de carne, óleo de soja, as três fontes de carbono juntas, e os ácidos acético, butírico e propiônico juntos. Nos experimentos variando-se a relação C/N utilizou-se glicose como fonte de carbono e uréia como fonte de nitrogênio. As relações C/N foram 13,6 (C/N1), 6,8 (C/N2) e 3,4 (C/N3) gC/gN. Para verificar a influência das condições de microaerofilia na produção do EPS, foi feito também um experimento borbulhando gás nitrogênio, mantendo sob anaerobiose estrita e utilizando glicose como fonte de carbono. Em todos os experimentos o reator foi alimentado com 1000 mgDQO/L. O reator atingiu eficiências médias de remoção da matéria orgânica de 82% em todas as condições, exceto quando o reator foi alimentado com óleo de soja, pois constatou-se o fenômeno de adsorção no material suporte. A produção de EPS por grama de fonte de carbono fornecida foi de 23,60 mg, 13,3 mg, 9,0 mg, 5,9 mg, 5,7 mg, 2,6 mg e 1,4 mg quando o reator foi alimentado com glicose na relação C/N1, óleo de soja, ácidos voláteis, glicose na relação C/N2, glicose/extrato de carne/óleo de soja, glicose na relação C/N3 e extrato de carne, respectivamente. Em condições de anaerobiose estrita não foi observada a produção de EPS. Os resultados sugerem que, a fonte de carbono, condição de microaerofilia e alta relação C/N favorecem a produção de EPS. Por meio de ensaios enzimáticos, com celulase combinada, verificou-se que o principal exopolissacarídeo presente no material polimérico foi celulose. Comparando os espectros de infravermelho das amostras de EPS constatou-se que as diferentes condições nutricionais não influenciaram na composição do polímero. A celulose bacteriana produzida, nesses casos, apresenta organizações alomórficas diferentes quando há glicose no substrato, constatada pelas análises de raios-X.

Palavras-chave: EPS, polímero extracelular, tratamento anaeróbio, ASBBR, glicose, extrato de carne, óleo de soja, macronutrientes.

ABSTRACT

The insoluble exopolysaccharides (EPS) produced in anaerobic treatment processes from some kinds of wastewater are unwelcome due to operational problems that it may cause, making the process unfeasible most of times. The anaerobic sequential batch biofilm reactor (ASBBR), containing immobilized biomass, is a new configuration of reactor that has been studied for wastewater treatment with positive results. Nevertheless, it was verified the production of EPS in some conditions, which made the process impracticable. To avoid these operational problems in full scale it is important to know the factors that enhance EPS production on those systems. Thus, the objectives of this work were investigating the influence of different carbon sources and the relation carbon/nitrogen (C/N), on the production and composition of extracellular polymers (EPS) and on the performance of the ASBBR with immobilized biomass in polyurethane foam. The carbon sources used were glucose, meat extract, soybean oil, the three carbon sources combined and acetic, butyric and propionic acids combined. On the experiments with variation of C/N relation, glucose was used as carbon source and urea as nitrogen source. The C/N relations were: 13.6 (C/N1), 6.8 (C/N2) and 3.4 (C/N3) gC/gN. Another experiment was accomplished to verify the influence of microaerophilic conditions on EPS production, bubbling nitrogen gas, keeping under strict anaerobic conditions and using glucose as carbon source. The reactor was fed with 1000 mgDQO/L in all experiments, achieving 82% of organic substance removal average efficiency, except when fed with soybean oil. At this condition it was verified the adsorption phenomenon in the material support. The yield of EPS was 23.60 mg/g carbon, 13.3 mg/g carbon, 9.0 mg/g carbon, 5.9 mg/g carbon, 5.70 mg/g carbon, 2.6 mg/g carbon and 1.4 mg/g carbon when the reactor was fed with glucose in the relation C/N2, glucose/meat extract/soybean oil, glucose in the relation C/N3 and meat extract, respectively. The production of EPS was not observed at strict anaerobic conditions. Results suggest that the carbon source, microaerophilic condition and high C/N relation favor EPS production. Through enzymatic tests with combined cellulase, it was verified that cellulose was the main exopolysaccharide present at the polymeric material. Furthermore, polymers composition is not influenced by different nutritional conditions, comparing infrared spectra of EPS samples. In these cases, the produced bacterial cellulose presents different allomorphic organizations as showed by X-rays analysis.

Key-words: EPS, extracellular polymer, anaerobic treatment, ASBBR, glucose, meat extract, soybean oil, macronutrients.

1. INTRODUÇÃO

O reator anaeróbio operado em bateladas seqüenciais contendo biomassa imobilizada (ASBBR – anaerobic sequencing batch biofilm reactor) é uma nova configuração de reator, para tratamento de águas residuárias, que tem sido estudada por grupos de pesquisa da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) e da Escola de Engenharia Mauá (EEM) do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT). O ASBBR foi proposto por Ratusznei *et al.* (2000) com base na configuração prévia de Hirl & Irvine (1997). O ciclo operacional típico do reator anaeróbio operando em bateladas seqüenciais (ASBR – anaerobic sequencing batch reactor), contendo biomassa granular ou floculenta, originalmente proposto por Dague *et al.* (1992), é composto por quatro passos: alimentação, reação, sedimentação e descarga. O uso do suporte inerte para a imobilização da biomassa, elimina a etapa de sedimentação e, conseqüentemente, reduz o tempo de ciclo (Zaiat *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos com essa nova configuração em escala de bancada (Cubas *et al.*, 2004; Pinho *et al.*, 2005; Ratusznei *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2003) ou em escala piloto (Sarti, 2004) são positivos. No entanto, observou-se, em algumas condições, a produção elevada de um material polimérico viscoso de consistência gelatinosa, cuja conseqüência foi a redução nas velocidades de transferência de massa, com queda na eficiência de remoção da matéria orgânica (Borges *et al.*, 2004, Miqueleto *et al.*, 2005, Orra *et al.*, 2004, Siman *et al.*, 2004, Ratusznei *et al.*, 2003b.).

Em ambientes aquáticos naturais, os microrganismos se organizam na forma de biofilmes, como estratégia de sobrevivência. Esses biofilmes são constituídos por uma

comunidade estruturada de células aderentes a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica), embebidas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares. Esta matriz é composta principalmente por exopolissacarídeos (EPS), que podem estar associados ou não à superfície celular. Algumas das funções do EPS são: aderência em superfícies, agregação de bactérias em flocos ou biofilmes, estabilização da estrutura do biofilme, formação de uma barreira de proteção que aumenta a resistência contra efeitos considerados agressivos às células, retenção de água, sorção de compostos orgânicos exógenos para a acumulação de nutrientes que provêm do meio, acúmulo de atividades enzimáticas, assim como a digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutrientes. Um novo conceito é que o EPS é um meio que permite a cooperação e a comunicação (*quorum sensing*) entre células e agregados microbiológicos (Laspidou & Rittmann, 2002).

A estrutura desses biofilmes é muito complexa e envolve muitos micro-ambientes, onde há heterogeneidade entre diferentes subpopulações de algumas espécies de bactérias. Algumas podem produzir um exopolímero simples, enquanto outras em diferentes partes do mesmo biofilme podem formar diferentes polímeros ou mais que um polissacarídeo que podem exercer diferentes funções (Sutherland, 2001a).

A estrutura, a composição e a quantidade de substrato convertida a EPS dependem de muitos fatores, tais como espécie microbiana, natureza do substrato e condições de fermentação (Margaritis & Pace, 1986).

A elevada produção de polímeros extracelulares insolúveis também é observada em pesquisas com outros sistemas de tratamento de águas residuárias, causando muitas vezes a colmatação dos leitos, quando a biomassa é imobilizada em leito fixo, ou então problemas com a floculação (ou granulação) do lodo, impedindo, desta forma, que os sistemas atinjam a eficiência necessária para o tratamento. No tratamento, em escala real, dependendo da composição da água residuária, a produção elevada do EPS pode interferir de modo a inviabilizar o tratamento biológico. Daí vem a importância de estudos para verificar o que pode favorecer a produção de EPS de forma a impedir problemas futuros.

Tendo em vista os problemas operacionais que podem ser causados pela elevada produção de EPS no ASBBR, em escala de bancada, e de modo a evitar problemas operacionais em escala real, o trabalho proposto teve como enfoque verificar a influência das fontes de carbono e de macronutrientes na formação do EPS e no desempenho do reator.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi investigar os fatores que favorecem a produção de exopolissacarídeos em reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa fixa tratando efluentes em diferentes condições nutricionais.

Os objetivos específicos desta pesquisa foram:

- Avaliar o desempenho do reator nas diferentes condições nutricionais.
- Avaliar a produção do EPS variando a fonte de carbono na água residuária sintética.
- Investigar a influência da relação C/N na produção do EPS com glicose como fonte de carbono.
- Verificar a influência de condições de microaerofilia na produção do EPS.
- Avaliar a cinética de degradação da glicose em condições anaeróbias e de anaerobiose estrita.
- Estudar a composição do EPS quando tratados em diferentes fontes de carbono e nas diferentes relações C/N.
- Isolar e identificar o principal microrganismo responsável pela produção do principal EPS em uma das condições nutricionais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ESTUDOS REALIZADOS NO ASBBR

Reatores anaeróbios operados em bateladas seqüenciais vêm recebendo maior atenção nos últimos anos, estando o seu uso prático voltado para o tratamento de águas residuárias em geral. A aplicação de processos descontínuos em tratamento anaeróbio de águas residuárias é apropriada nos seguintes casos (Zaiat *et al.*, 2001):

- Indústrias que lançam efluentes de forma intermitente ou atividades que geram efluentes apenas em algumas épocas do mês ou do ano.
- Indústrias que trabalham com padrões de lançamento muito restritivos ou com compostos de difícil degradação; neste caso, a qualidade do efluente pode ser controlada lançando-o no ambiente apenas quando os padrões forem atingidos ou quando o composto tóxico tiver sido satisfatoriamente degradado.
- Sistemas que visam o reúso de águas residuárias ou de substâncias nelas dissolvidas. O controle sobre a reutilização das águas pode ser maior e melhor do que em sistemas contínuos.
- Em trabalhos fundamentais que visem a elucidação de alguns fenômenos da degradação anaeróbia, devido à facilidade de instrumentação e controle.

Novas configurações de reatores anaeróbios descontínuos são alternativas para solução de problemas relacionados à aplicação prática. Dentre as inovações, está a utilização de

suportes inertes que permitem melhor retenção de biomassa, assim como, eliminação da fase de sedimentação, proporcionando a redução de tempo no ciclo total. Além disso, a imobilização em suporte inerte elimina as incertezas quanto ao processo de granulação.

O reator anaeróbio operado em bateladas seqüenciais e contendo biomassa imobilizada (ASBBR), proposto por Ratusznei *et al.* (2000), em escala de bancada, composto por frasco de vidro cilíndrico (volume: 2 litros), era agitado mecanicamente por agitador magnético alocado no fundo do frasco. Partículas cúbicas de espuma de poliuretano com biomassa imobilizada eram confinadas em uma espécie de “gaiola” no interior do sistema. O reator, mantido a 30° C, atingiu estabilidade operacional após 10 dias de experimento, tratando 0,5 litro de esgoto sanitário sintético (0,48 g DQO/L) com 3 ciclos/dia (ciclos de 8 horas). A máxima eficiência de remoção em termos de DQO de 86% foi alcançada depois de 36 dias de operação com apenas 3 horas do início do ciclo.

Cubas *et al.* (2004) estudaram a influência das velocidades de agitação na transferência de massa na fase líquida e no desempenho global do ASBBR. O reator foi operado a 30°C, com ciclos de 8 horas e alimentado com 4,2 L de água residuária sintética com DQO próxima de 500 mg/L. A agitação no reator foi realizada por três impelidores, variando as intensidades de agitação de 300 a 1100 rpm. A máxima eficiência alcançada na remoção da matéria orgânica alcançada foi de 78%. Constatou-se que a transferência de massa na fase líquida afetou o desempenho global do reator e o tempo de ciclo requerido para atingir a máxima eficiência. Por exemplo, o tempo de ciclo para alcançar a mesma eficiência de remoção da matéria orgânica com 300 rpm foi três vezes maior que o tempo necessário quando o reator operou com 900 rpm.

Operando nas mesmas condições citadas acima, porém em reator de menor escala (0,5 L de volume útil) e com agitação suprida por agitador magnético, Ratusznei *et al.* (2001) estudaram a influência da velocidade de agitação no ASBBR. Os estudos das intensidades de agitação variaram do não agitado à 750 rpm. Constatou-se, também, que o aumento da intensidade de agitação causou o aumento da eficiência de remoção de matéria orgânica, permitindo a redução do tempo de ciclo.

Pinho *et al.* (2004 e 2005a), estudaram a influência da intensidade de agitação e a viabilidade de aplicação do ASBBR no tratamento água residuária parcialmente solúvel (leite de soja) com DQO de aproximadamente 1000 mg/L. Constatou-se que o ASBBR foi capaz de tratar a água residuária parcialmente solúvel com remoção da matéria orgânica suspensa em torno de 70%. A agitação no ASBBR, além de promover a boa mistura e melhorar a

transferência de massa na fase líquida, permitiu a solubilização da matéria orgânica particulada com benefícios positivos para as velocidades de consumo da matéria orgânica.

Cubas *et al.* (2002) avaliaram os efeitos da transferência de massa na fase sólida no desempenho do ASBBR. Nesses experimentos, variou-se o tamanho dos cubos de espuma de poliuretano entre 0,5 a 3,0 cm de aresta. O ASBBR foi alimentado com substrato sintético com DQO de aproximadamente 500 mg/L. A agitação foi promovida por três impelidores de 3 cm de diâmetro com intensidade constante de 500 rpm. Verificou-se que a transferência de massa na fase sólida não foi o fator limitante na conversão da matéria orgânica quando foram utilizadas partículas de espuma entre 0,5 e 2,0 cm.

Pinho *et al.* (2005b) estudaram a influência do tamanho da biopartícula na cinética de degradação de água residuária sintética parcialmente solúvel e a viabilidade de aplicação do ASBBR no tratamento dessa água residuária. Foram utilizadas partículas de espuma de poliuretano com 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 cm de aresta. O reator foi operado com 4,5 L, a temperatura constante de 30°C e intensidade de agitação de 500 rpm promovida por 3 impelidores de 6 cm de diâmetro. O reator foi alimentado com substrato sintético com DQO de aproximadamente 1000 mg/L, sendo 50% correspondente à material em suspensão. Verificou-se que o tamanho da biopartícula exerceu influência decisiva no desempenho do processo anaeróbio nestas condições. A velocidade de dissolução foi aparentemente influenciada, principalmente, pelo tamanho da espuma, enquanto o consumo da DQO filtrada envolveu fatores mais complexos.

Ratusznei *et al.* (2003a) estudaram a viabilidade da aplicação do ASBBR no tratamento de soro de queijo diluído, com diferentes valores de DQO. O reator operou com agitação constante de 200 rpm, temperatura de 30°C e com tempos de ciclos de 8 horas. Os valores da DQO afluente variaram entre 500 a 4000 mg/L. O reator operou de maneira estável alcançando 96% na eficiência de remoção da matéria orgânica.

Pinho *et al.* (2005c) aplicaram o ASBBR no tratamento de dejetos de suinocultura. O reator foi operado a 30°C, com biopartícula de 1 cm de aresta e a agitação foi promovida por três impelidores de 6 cm de diâmetro com intensidade de agitação variando de 0 a 500 rpm. Os dados operacionais indicaram que o processo permaneceu estável durante o período de operação. Depois de 2 horas de operação a 500 rpm, a DQO suspensa foi removida com eficiência de 65% (de 1500 para 380 mg/L).

Dos estudos cinéticos realizados no ASBBR (Borges *et al.*, 2004; Cubas *et al.*, 2002; Miqueleto *et al.*, 2005; Orra *et al.*, 2004; Pinho *et al.*, 2004, 2005b e 2005c, Ramos *et al.*, 2003; Ratusznei *et al.*, 2001) constatou-se que o modelo cinético de primeira ordem

modificado, no qual é considerada a concentração do substrato residual (eq. 3.1) ajustou-se muito bem aos dados experimentais da degradação da matéria orgânica, medida como DQO. Porém, de acordo com Pinho *et al.* (2005b) a DQO, em alguns casos, não é o melhor parâmetro para análises cinéticas de degradação anaeróbia, visto que os parâmetros estimados podem ser fortemente influenciados por coeficiente de difusibilidade de diferentes macromoléculas na partícula.

$$C_S = C_{SR} + (C_{So} - C_{SR})e^{-K_1^{app} \cdot t} \quad (3.1)$$

Na equação 3.1, k_1^{app} é a constante cinética aparente de primeira-ordem, C_{So} é a concentração inicial de substrato e C_{SR} concentração residual de substrato.

Sarti (2004) reportou os resultados obtidos no ASBBR, em escala piloto, aplicado para o tratamento de esgoto sanitário. O reator, com volume de 1,2 m³, foi operado com 8 horas de ciclo tratando 0,65 m³ de esgoto por batelada. Cada ciclo era compreendido por 2 horas de alimentação, 5 horas de reação e 0,5 hora de descarte. A estabilidade operacional foi atingida com 25 dias de operação. A remoção da DQO total foi em torno de 60% com DQO efluente de 175 ± 71 mg/L.

Ratusznei *et al.* (2003b) estudaram a influência da estratégia de alimentação no desempenho e estabilidade do ASBBR. O reator foi alimentado com substrato sintético com DQO de 500 mg/L, com tempo total de ciclo de 180 min, temperatura constante de 30°C e intensidade de agitação de 200 rpm. O reator foi operado no modo batelada com 3 minutos de enchimento e no modo batelada alimentada com tempos de enchimento de 30, 60 e 180 minutos. Durante a operação em batelada, o sistema atingiu estabilidade mantendo eficiência na remoção da matéria orgânica em torno de 86%. Porém, durante a operação no modo batelada alimentada, a estabilidade e a eficiência do sistema foram prejudicadas devido à produção de quantidades significativas de polímeros extracelulares insolúveis, os quais afetaram a transferência de massa da fase líquida para a fase sólida.

Nos estudos realizados por Borges *et al.* (2004), com o ASBBR tratando água residuária sintética com 500 mg DQO/L também se observou a produção de EPS que interferiu no desempenho do reator. O volume total de água residuária tratada era de 2,5 L, sendo 1,5 L, quantidade suficiente para cobrir o leito, adicionado em 10 min e 1,0 L era adicionado em tempos de enchimento diferentes: 10, 120, 240, 260 e 480 min. O tempo total de cada ciclo era de 8 horas (480 min). Com tempos de enchimentos maiores que 240 min foi

verificada instabilidade operacional devido à presença do EPS.

Miqueleto *et al.* (2005) estudaram o desempenho do ASBBR com o aumento progressivo da concentração de matéria orgânica de fácil degradação. O reator foi alimentado com glicose nas concentrações de 500, 1000 e 2000 mg/L, com ciclos de 8 horas e 3 horas, intensidade de agitação constante de 300 rpm à 30°C. Quando o reator foi alimentado com concentrações de glicose acima de 1000 mg/L verificou-se queda no desempenho do reator devido à produção significativa de EPS, que dificultou a transferência de massa da fase líquida para a fase sólida.

Siman *et al.* (2004), estudando o desempenho do ASBBR com a variação da concentração da água residuária sintética e dos tempos de ciclos, verificaram a produção de EPS quando o reator foi alimentado com concentração próxima de 2000 mg DQO/L em ciclos de 8 horas, o que interferiu no equilíbrio do sistema.

Outra configuração de ASBBR, proposta por Camargo *et al.* (2002), diferenciou da configuração proposta por Ratusznei *et al.* (2000) por não possuir agitação mecânica, sendo a agitação suprida por recirculação da fase líquida por meio de bombeamento. Vários estudos foram conduzidos nessa configuração.

Ramos *et al.* (2003) estudaram a influência da recirculação interna da fase líquida na transferência de massa no ASBBR. O reator foi operado a 30°C utilizando ciclos de 8 horas para tratar água residuária sintética com DQO de 500mg/L. Verificou-se que o desempenho do reator melhorou com a implementação da recirculação, atingindo eficiência de 87%.

Orra *et al.* (2004) estudaram a influência da estratégia de alimentação no desempenho do ASBBR operando em batelada alimentada com recirculação da fase líquida. O reator operou com tempo total de ciclo de 6 horas, temperatura constante de 30° C e velocidade de recirculação de 6 L/h. O reator era alimentado com água residuária sintética com DQO de 500 mg/L. As estratégias de alimentação foram implementadas com tempo de enchimento de 6 minutos (modo batelada), 60, 120, 240 e 360 minutos. Quando o reator operou no modo batelada alimentada verificou-se o favorecimento da produção de EPS e conseqüente redução do volume útil do reator.

Com os resultados obtidos até o momento, o ASBBR demonstrou ter grande potencial na aplicação em escala real para o tratamento de uma extensa gama de águas residuárias, porém a produção de EPS insolúvel, em alguns trabalhos, inviabilizou o processo devido às dificuldades na transferência de massa da fase líquida para a fase sólida. Portanto, a elevada produção de EPS em sistemas de tratamento anaeróbio de águas residuárias deve ser elucidada, uma vez que este pode causar problemas operacionais e instabilidade do sistema.

3.2 BIOFILMES E EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

A maioria dos microrganismos tem a habilidade de sintetizar polissacarídeos e excretar para fora das células na forma de polímeros solúveis ou insolúveis cujas funções podem ser várias.

Biofilmes são comunidades microbiológicas formadas pela adesão inicial a uma superfície, biótica ou abiótica, seguida por interações célula-célula para formar camadas múltiplas e desenvolver estruturas tridimensionais, incluindo canais de água através do qual ocorre o fluxo de nutrientes e metabólitos produzidos pelos microrganismos (Costerton *et al.*, 1995). Esses biofilmes são sistemas heterogêneos, nos quais as células bacterianas são embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, parecidas com gel, sendo 98% do peso devido, principalmente, à água e sais.

De acordo com Davey & O'Toole (2000), a produção de biofilmes, por muitas espécies microbianas, ocorre em três etapas: (1) aderência inicial às superfícies, (2) formação de microcolônias e (3) maturação das microcolônias através do revestimento com o exopolissacarídeos (EPS). Acredita-se que o processo de formação do biofilme começa quando a bactéria sente certos parâmetros ambientais, ou condições de estresse, que desencadeiam a transição do crescimento planctônico para a vida em superfície. É importante ressaltar que os fatores, que desencadeiam essa transição, variam de acordo com a espécie microbiana. Segundo Speece (1996), o biofilme permite o sinergismo entre os microrganismos alocados em forma de grânulos ou aderidos em suportes. Esta agregação peculiar otimiza a cooperação entre os organismos constituintes do biofilme devido à redução da distância para a transferência de produtos metabólicos.

Numerosas evidências experimentais sugerem que o processo de formação do biofilme é regulado por uma cascata de reguladores completa. O sistema de *quorum sensing* é um mecanismo de regulação que depende do acúmulo, no meio ambiente, de uma molécula sinal autoindutora, que permite a bactéria sentir a densidade populacional existente. Em bactérias Gram-negativas o principal indutor é a acil-homoserinalactona (acil-HSL), enquanto que nas bactérias Gram-positivas os autoindutores são peptídeos. Quando, no meio extracelular, se acumula uma quantidade de autoindutor, este ativa um receptor específico que altera a expressão de genes afetando distintos fenótipos (Figura 3.1) (Lasa *et al.*, 2005).

O arranjo estrutural do biofilme tem um papel importante na função do biofilme, uma vez que a comunicação entre células é essencial para as bactérias estabelecerem uma

comunidade de superfície bem ordenada. Foi observado, em alguns estudos, que a acil-homoserinalactona (acil-HSL) também regula o arranjo estrutural do biofilme. Essas conclusões foram obtidas após verificar que a estrutura do biofilme sintetizado por espécie mutante de *Pseudomonas aeruginosa*, a qual não sintetiza a acil-HSL, eram diferentes em relação à organização entre as microcolônias e não eram tão resistentes à ataques químicos quanto o biofilme formado pela espécie selvagem (Davey & O'Toole, 2000).

Figura 3.1. No *quorum sensing*, os auto-indutores, quando em concentração elevada, ligam-se a moléculas sensoras das bactérias (chamadas em geral de 'proteínas R'), que atuam como reguladores da expressão de genes específicos.

Fonte: Antunes (2003).

Segundo Allison (1998), a HSL pode agir também como regulador global da fisiologia específica do biofilme. Em biofilmes, as substâncias sinalizadoras, como a HSL, podem estar relacionadas com o crescimento lento das microcolônias e estimular a produção de EPS. Davies *et al.* (1993) também constataram que o gene específico envolvido na produção do exopolissacarídeo alginato foi ativado logo após a associação da bactéria com o meio suporte.

De acordo com Ross *et al.* (1991), todas as bactérias produtoras de celulose conhecidas até o momento são distinguidas pela natureza do produto glicano extracelular e

pela formação de agregados celulares, conhecidos como flocos, aos quais se atribui a auto-afinidade pelo material celulósico. Além disso, a celulose bacteriana também parece apresentar um papel estrutural que confere proteção mecânica, química ou biológica no habitat natural, como é no caso da *Acetobacter xylinum* e da *Sarcina ventriculi*, ou então, facilita o processo de adesão celular necessários para interações simbióticas ou infecciosas, como no caso das espécies *Rhizobium* e *Agrobacterium*. Segundo Argenio & Miller (2004), a celulose produzida pela *Acetobacter xylinum* é regulada pelo dinucleotídeo cíclico c-di-GMP e as proteínas com domínios GGEF e EAL controlam o nível intracelular desse regulador.

É importante lembrar que a quantidade de EPS sintetizado no biofilme é fortemente dependente da disponibilidade de carbono no substrato e do balanço de massa entre carbono e outros nutrientes limitantes. A presença de carbono disponível em excesso e limitações de nutrientes, como nitrogênio, potássio e fosfato, irá promover a síntese de EPS (Sutherland, 2001b).

A estrutura de biofilmes é muito complexa e envolve muitos micro-ambientes, na qual há heterogeneidade entre diferentes subpopulações de algumas espécies de bactérias. Algumas podem produzir um exopolímero simples, enquanto outras em diferentes partes do mesmo biofilme podem formar diferentes polímeros ou mais que um polissacarídeo que podem exercer diferentes funções (Sutherland, 2001a). Esta heterogeneidade constitui uma importante estratégia de sobrevivência, pois essas células terão maior probabilidade de sobreviver a agressões externas.

3.2.1 Composição dos exopolissacarídeos bacterianos nos biofilmes

A maioria dos biofilmes é composta por uma mistura de comunidades microbianas e seus produtos metabólicos. O componente predominante dos biofilmes é o exopolissacarídeo (EPS), o qual compõe, aproximadamente, 90% da matriz de substâncias polimérica.

De acordo com Margaritis & Pace (1986) os polissacarídeos podem ser classificados em dois tipos: os homopolissacarídeos, os quais contêm somente um tipo de açúcar (carboidrato); e os heteropolissacarídeos, que contêm dois ou mais tipos de açúcar. Os heteropolissacarídeos são, normalmente, produzidos por microrganismos que utilizam um sistema complexo de enzimas e fontes de carbono, enquanto a síntese de homopolissacarídeos envolve um único e simples sistema enzimático. Dependendo do arranjo entre as unidades

monoméricas os polissacarídeos podem ser lineares ou ramificados. Outra distinção importante entre os polissacarídeos é baseada em suas propriedades de cargas que podem ser classificados como aniônico, catiônico ou neutro. Alguns polissacarídeos com propriedades aniônicas contêm grupos ácidos como os carboxílicos, ou então, constituintes inorgânicos como, fosfato ou sulfato. Outros, em seu estado natural, podem ter alguns grupos amino livres resultando em suas propriedades catiônicas.

De acordo com Sutherland (1990¹ apud Kornmann *et al.*, 2003), a construção de blocos de polissacarídeos, presente na maioria dos EPS, pode ser uma maneira de armazenar energia na forma de monossacarídeos. Os nucleotídeos de açúcar ativado (açúcar-UDP) são sequencialmente adicionados a carregadores de lipídios para formar unidades repetidas de polissacarídeos. Este último passo envolve o transporte de unidades repetidas através da membrana celular para a camada externa e a conseqüente polimerização do EPS (Figura 3.2).

Segundo Sutherland (2001c), diferentes classes de EPS podem ser distinguidas baseadas no mecanismo de biossíntese e no precursor requerido. A primeira classe compreende a produção de homopolissacarídeos como a dextrana e a levana. A reação de polimerização nesses casos é realizada via extracelular com o auxílio da glicosiltransferase, a qual auxilia na transferência de um monossacarídeo para a cadeia de polissacarídeo. É uma síntese simples, uma vez que é independente do metabolismo central do carbono e as variações na estrutura são limitadas. A outra classe é a biossíntese de homo e heteropolissacarídeo, com unidades repetidas regulares ou não, a partir de um açúcar-nucleotídeo como precursor. Porém, o exopolissacarídeo resultante depende dos sinais obtidos do meio, e da biogenética do microrganismo.

¹ Sutherland, I. W. (1990). Bio/Technology of microbial exopolysaccharides, vol. 9. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

sobre suas concentrações em biofilme são escassas (Liu & Fang, 2002).

Liu & Fang (2002), extraíram substâncias poliméricas extracelulares de lodo acidogênico, metanogênico, e aeróbio. O material extraído era composto, principalmente, por carboidratos, proteínas, substâncias húmicas, e pequenas quantidades de ácido urônico. Os carboidratos foram predominantes no lodo acidogênico (62%) e proteínas foram predominantes no lodo metanogênico (41%). As quantidades de substâncias húmicas, as quais muitas vezes vêm sendo omitidas nas análises, encontradas nos materiais extraídos dos lodos aeróbios, acidogênico e metanogênico foram, respectivamente, de 30,6%; 8,4% e 22,8%.

Jia *et al.* (1996), examinaram as características dos polímeros extracelulares de dois tipos de culturas. Uma cultura era composta somente por metanogênicas hidrogenotróficas (MH) enquanto a outra era composta por MH e bactérias hidrogenotróficas redutoras de sulfato (BHRS). O polímero foi extraído do lodo de ambas as culturas para análise do conteúdo de proteína (ECP_p) e carboidrato (ECP_c). As quantidades de ECP_c e ECP_p ao final de cada experimento foram de 14 mgcarboidrato/gSSV e 24 mgproteína/gSSV na cultura de metanogênicas hidrogenotróficas e de 12 mgcarboidrato/gSSV e 17 mgproteína/gSSV na cultura de MH/BHRS.

Veiga *et al.* (1997) estudaram a composição de polímeros extracelulares de duas espécies isoladas (*Methanobacterium formicicum* e *Methanosarcina mazei*) provenientes de grânulos de um reator anaeróbio de fluxo ascendente alimentado com uma mistura de ácidos acético, butírico e propiônico. Entre 14% e 20% do material polimérico extraído era constituído de polissacarídeos. A fração remanescente, provavelmente, continha frações significativas de proteínas extracelulares e outros compostos. As cadeias monoméricas dos exopolissacarídeos, produzido por ambas as espécies, diferenciavam-se somente na composição dos açúcares. As *Methanobacterium formicicum* produziram exopolissacarídeos compostos por raminose, manose, galactose, glicose e aminoaçúcares, enquanto que o produzido pelas *Methanosarcina mazei* continha ribose, galactose, glicose e glucosamina.

A goma xantana, biopolímero produzido por *Xanthomonas campestris* é um heteropolissacarídeo ramificado aniônico. A estrutura polimérica da xantana contém glicose, manose, gluconato e quantidades variáveis de acetato e piruvato (McNeely & Kang, 1973² *apud* Margaritis & Pace, 1986).

As dextranas são produzidas por dois microrganismos: *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum*. Dependendo da espécie do microrganismo, do tipo de substrato e

² McNeely, W. H., and King, K. S. (1973). Xanthan and other biosynthetic gums. In Industrial Gums, ed R. L. Whisther and J. N. BeMiller, pp. 473-497. Academic, N.Y.

das condições de fermentação, uma grande variedade de dextranas pode ser produzida com estruturas que podem ser pouco ou muito ramificadas. A dextrana é um homopolissacarídeo, neutro, ramificado e composto, exclusivamente, por glicose.

Deinema & Zevenhuizen (1971) constataram a presença de fibrilas celulósicas nos flocos bacterianos presente em reatores de lodos ativados. A quantidade de celulose presente nos flocos variava entre 1% e 4%. A celulose é outro exopolissacarídeo, que consiste de uma cadeia linear contendo unidades de glicose unidas por ligações β -1,4- e pode ser sintetizado por diversas espécies bacterianas. A celulose produzida pelas bactérias é um exopolissacarídeo excretado no meio, onde é rapidamente agregado em forma de microfibrilas. A celulose bacteriana possui alta cristalinidade, alto grau de polimerização, grande resistência elástica e é altamente hidrofílica, o que a distingue das outras formas da celulose (Paterson-Bedle *et al.*, 2000).

Paterson-Bedle *et al.* (2000) estudaram a composição e a estrutura de um exopolissacarídeo celulósico produzido pela *Zoogloea* sp a partir do melaço de cana. A película de polissacarídeo, um material parecido com gel, foi formada na interface líquido/ar. Os principais monossacarídeos presentes no biofilme foram glicose (87,6%), xilose (8.6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0.1%), arabinose (0,4%) e ácido glucurônico (0,8%). A hidrólise enzimática do polissacarídeo com celulase confirmou a presença de unidades de (1-4)- β -D-glicopiranosil.

Diferentes espécies microbianas podem produzir diferentes exopolissacarídeos. No entanto, é importante ressaltar que, no presente estudo, há uma comunidade microbiana, a qual, pode conter várias espécies capazes de produzir diferentes EPS com funções variadas.

3.2.2 Efeito das condições nutricionais na produção de EPS

Estudos contínuos sobre o efeito do substrato limitante na síntese de exopolissacarídeos, por vários tipos diferentes de microrganismos, demonstraram claramente que a composição do meio pode afetar a síntese do polímero. Alguns exemplos do efeito da composição do meio no rendimento da produção de polímeros de células livres são apresentados na Tabela 3.1 (Margaritis & Pace, 1985).

Tabela 3.1 - Efeito de nutrientes limitantes de crescimento no rendimento do EPS (Margaritis & Pace, 1985)

Microrganismo	Polímero	Nutriente Limitante	Rendimento ¹
<i>X. campestris</i> *	Xantana	Glicose	0.54
		NH ₄ ⁺	0.6
		SO ₄ ⁻	0.53
		Mg	0.55
		K ⁺	0.42
		PO ₄ ³⁻	0.31
<i>Ps. Aeruginosa</i> **	Alginato	Glicose	0.33
		N (extrato de levedura)	0.61
		NH ₄ ⁺	0.53

* Davidson, (1978)

** Mian *et al.* (1978)

¹ Cada conjunto de resultados é de experimentos conduzidos em uma razão de diluição constante, e o valor se refere à quantidade de polímero produzido por células livres por unidade de glicose consumida.

Margaritis & Pace (1986), afirmam que a quantidade de substrato convertida pelas células a polímero depende da composição do meio de crescimento. Geralmente meios contendo altas razões entre C/N podem favorecer a produção de exopolissacarídeos. Mengistu *et al.* (1994) sugerem que a deficiência de um nutriente essencial, como por exemplo, o nitrogênio, pode limitar o crescimento celular e a energia proveniente do excesso de carbono é então usada para a biossíntese de polissacarídeos. Em estudos cinéticos realizados com as *Klebsiella aerogenes* (Neijssel & Tempest, 1975) e com as *Agrobacterium radiobacter* (Linton *et al.*, 1987) indicaram que a síntese de polissacarídeos ocorre devido à produção elevada de ATP que acontece quando há fonte de carbono em excesso.

Segundo Veiga *et al.* (1997), a temperatura, substratos e concentração de nutrientes chaves (nitrogênio e fosfato) afetaram a produção do EPS produzido pelas *Methanobacterium formicicum*. A redução na quantidade de nutrientes favoreceu a produção de EPS.

Norberg & Enfors (1982) reportaram que a espécie *Zoogloea ramigera* 115 chegou converter 40% da glicose em EPS quando a razão C/N foi de 26 gC/gN e que em razões maiores o rendimento de EPS aumentou.

Son *et al.* (2001) realizaram estudo para a otimização das condições de fermentação na produção de celulose a partir da espécie *Acetobacter* sp A9. Foi constatado que a produção de EPS foi afetada pela fonte de carbono, fonte de nitrogênio e suas respectivas concentrações, pela concentração de fosfato, pelo pH e pela temperatura. A composição ótima do meio continha 4% (m/v) de glicose, 0,1 % (m/v) de extrato de levedura, 0,7% (m/v) de polipeptona e 0,8% (m/v) de fosfato de sódio. Nos ensaios verificou-se que quantidades menores de

extrato de levedura favoreceram a produção da celulose. A temperatura ótima foi de 30°C e o pH ótimo foi de 6,5.

Estudos realizados por Petry *et al.* (2000), os quais utilizaram meio quimicamente específico, contendo glicose como fonte de carbono, alterando para ácido orótico em culturas de *Lactobacillus delbreckii* subsp. *bulgaricus*, sugerem que as unidades estruturais do polissacarídeo podem variar de acordo com alterações específicas do meio.

A influência das condições da cultura na produção de EPS pelos *Bacillus licheniformis* foi estudada por Larpin *et al.* (2002) e verificou-se que, ao aumentar a concentração de açúcar no meio, a produção do EPS não aumentou e quando o meio foi suplementado com etanol houve aumento na produção do polímero.

Mozzi *et al.* (2001) estudaram o efeito da glicose e da galactose na produção do EPS pelos *Lactobacillus casei* CRL 87 e observaram que a fonte de carbono presente no meio de cultura afetou a produção do polímero.

Quagliano (1999) estudou a biossíntese de PHB (polihidroxibutirato) e EPS por *Azotobacter chroococcum* utilizando fontes de carbono simples e complexa e observou que, em meio contendo sulfato de amônio e glicose, sacarose e frutose, como fonte de carbono, a produção de PHB e EPS foi reduzida. Meios contendo melão de cana de açúcar, glicose e frutose favoreceram a síntese de EPS.

Gamar-Nourani *et al.* (1998) estudaram a influência das condições de cultura na composição do exopolissacarídeo produzido por uma linhagem de *Lactobacillus rhamnosus* C83 e descreveram que o EPS produzido é um heteropolissacarídeo neutro contendo, principalmente, glicose e galactose. A composição dos açúcares do polímero foi independente das condições de cultura, como fonte de carbono, composição do meio, temperatura, pH e pressão parcial de oxigênio.

Fuscone (2005) estudou a produção de EPS pela *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137 isolada de água subterrânea contaminada usando melão de cana como meio de cultura, em diferentes concentrações e observou-se que maiores concentrações de melão favoreceram a produção de EPS.

A produção de celulose bacteriana usando melão de cana tratado com ácido sulfúrico e não tratado foi estudada por Bae & Shoda (2005). Quando se utilizou melão tratado, a produção de celulose atingiu até 76% a mais que quando se utilizou o melão não tratado. Isto se deve a complexidade da composição do melão sem o tratamento, pois, após o tratamento com ácido sulfúrico, a sacarose presente no melão é hidrolisada a frutose e glicose, o que contribui para o aumento da produtividade da celulose, pois a frutose é o açúcar mais

utilizado na produção de celulose pela *Acetobacter xylinum* BRP2001.

Em estudos realizados por Danesi & Wosiacki (2005) verificou-se que a produção de celulose com sacarose e a adição de ácido cítrico ao meio de composição definida foi maior do que com adição dos ácidos málico, tartárico, láctico e acético.

3.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como apresentado nessa revisão, os EPS produzidos por culturas puras são pesquisados há décadas tendo em vista sua aplicação prática, pois são produtos de características interessantes para diversos fins. No entanto, a produção de EPS em sistemas de tratamento de águas residuárias é pouco enfocada nos estudos. Embora sejam considerados prejudiciais à operação dos reatores pelos motivos já mencionados, pode-se vislumbrar a possibilidade de obtenção desses polímeros para usos diversos. Assim, duas linhas podem ser propostas para estudo dos EPS em reatores aplicados ao tratamento de águas residuárias: uma que investigue as formas de minimizar a produção e, conseqüentemente, os problemas operacionais decorrentes e a outra que avalie a composição desses polímeros e, dependendo da aplicabilidade, passe a considerá-lo como produto de valor comercial.

Esse estudo de caracterização do EPS produzido em ASBBR visa elucidar alguns aspectos que influenciam a produção de polímeros com finalidade de prevenção de problemas operacionais por eles causados e, em trabalhos futuros, para o aproveitamento desse subproduto nos processos de tratamento anaeróbio de diferentes águas residuárias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Configuração do Reator em Batelada

O reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais, contendo células imobilizadas, apresentado na Figura 4.1, é constituído por um frasco de vidro cilíndrico de 22 cm de diâmetro e 26 cm de altura, com capacidade total de cinco litros. Agitação foi suprida por um agitador mecânico com 2 impelidores tipo turbina de 3 cm de diâmetro com 4 pás planas, distanciados 8 cm um do outro. A alimentação e descarga foram realizadas por bombas tipo diafragma Prominente, modelo α . Para manter a temperatura, o reator é encamisado com uma estrutura de vidro, por onde circula água aquecida em Banho Ultratermostatizado Marconi modelo BTC-9090. As biopartículas foram confinadas em um cesto ou “gaiola” de aço Inox – 316 perfurado, com um cilindro no meio de 4 cm de diâmetro, onde é introduzida a barra de agitação.

Figura 4.1: Esquema do reator operado em bateladas seqüenciais (Cubas *et al.*, 2001)

4.1.2. Suporte de Imobilização da Biomassa Anaeróbia

Como suporte de imobilização da biomassa foi utilizado espuma de poliuretano na forma de cubos, com densidade aparente de 23 kg/m^3 e porosidade próxima a 95% da Edmil Indústria e Comércio - Elói Mendes, MG e da Guilherme Colchões – São Carlos, SP, porém a densidade e porosidade não foram determinadas. A espuma, cortada na forma de cubos de 1 cm de aresta, foi confeccionada sem adição de corantes ou aditivos.

4.1.3. Inóculo

O inóculo utilizado foi proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB), tratando água residuária de abatedouro de aves.

4.1.4. Água Residuária Sintética

A água residuária sintética está descrita na Tabela 4.1. No entanto, a fonte de carbono foi variada. Foram utilizados como fontes de carbono: glicose, extrato de carne (proteína), óleo de soja (lipídio) emulsionado com detergente, as três fontes de carbono juntas, em proporções iguais, equivalentes em DQO, e os ácidos voláteis acético, propiônico e butírico juntos.

Para verificar a influência das condições de microaerofilia na produção do EPS, utilizou-se como fonte de carbono a glicose, porém borbulhou-se gás nitrogênio no meio reacional, durante todo o ciclo, para garantir o meio estritamente anaeróbio.

Nos ensaios realizados com diferentes relações carbono e nitrogênio (C/N), utilizou-se o substrato apresentado na Tabela 4.1, porém variou-se a concentração de uréia (fonte de nitrogênio). A fonte de carbono, neste caso, foi a glicose. Foram consideradas três relações C/N: (1) concentração de uréia descrita na Tabela 4.1, igual a 62,5 mg/L e relação C/N de 13,6 gC/gN (C/N1); (2) concentração de uréia igual a 123 mg/L e relação C/N de 6,8 gC/gN (C/N2); (3) concentração de uréia igual a 246 mg/L e relação C/N de 3,4 gC/gN (C/N3).

Tabela 4.1 - Composição de água residuária sintética utilizada (Del Nery, 1987).

Composto	Concentração (mg/L)
Fonte de carbono	*
Uréia	62,5
Sulfato de níquel	0,5
Sulfato ferroso	2,5
Cloreto férrico	0,25
Cloreto de cálcio	23,5
Cloreto de cobalto	0,04
Óxido de selênio	0,035
Fosfato de potássio monobásico	42,5
Fosfato de potássio dibásico	10,85
Fosfato de sódio dibásico	16,7
Bicarbonato de sódio	1000,0

* Foi adicionado fonte de carbono suficiente para uma DQO de 1000mg/L

Em cada etapa, o substrato foi preparado com demanda química de oxigênio (DQO) inicial aproximada de 1000 mg/L. Esta concentração foi determinada devido aos resultados já obtidos por Miqueleto (2001).

A Tabela 4.2 apresenta as concentrações de cada fonte de carbono em mg/L e a relação DQO/substrato.

Tabela 4.2 - Concentrações das fontes de carbono correspondentes a DQO de 1000 mg/L.

Fonte de Carbono	Concentração (mg/L)	Relação $C_{DQO}/C_{substrato}$
Glicose	1000	1,07
Extrato de Carne / Proteína	910 / 576	1,1 / 1,7
Óleo de Soja* / Lipídios	435 / 346	2,3 / 2,89
Glicose/Extrato de Carne/Óleo de Soja*	333 / 363 / 145	1,07 / 1,1 / 2,3
Acetato/Propionato/Butirato	375 / 63 / 250	1,07 / 1,51 / 1,82

* Foram adicionadas aproximadamente 4 gotas de detergente por litro de solução, para emulsionar o óleo.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Determinação da Concentração de Glicose

A concentração de glicose foi medida por método espectrofotométrico utilizando o kit Glicose, método enzimático da Laborlab, desenvolvido para determinação de glicose no sangue. A glicose reage com a enzima glicose oxidase, dando uma coloração rosa, detectada no comprimento de onda 505 nm. Foram adicionados 20 µL de amostra para 3 mL de reagente, que foi preparado conforme descrito na bula do kit. Para determinação da concentração de glicose na amostra foi feita curva padrão de absorbância em função da concentração.

4.2.2. Determinação da Concentração de Proteína

A concentração de proteína foi medida pelo método colorimétrico Folin (Lowry *et. al.*, 1951). Foram preparados quatro reagentes: (A) 250 mL de solução de NaOH 0,1 M contendo 5 g de carbonato de sódio; (B) solução aquosa contendo 0,5 g de tartarato de sódio e 0,25 g de sulfato de cobre; (C) mistura do reagente (A) com o reagente (B), na proporção 50:1, e reagente (D) diluição 1:1 do reagente de Folin com água milliQ. As soluções (C) e (D) foram preparadas somente no momento do uso.

Para a quantificação de proteína nas amostras, foram adicionadas 500 µL da solução contendo a amostra em 2,5 mL do reagente (C) que, após a agitação foram mantidas por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 250 µL do reagente (D), mantendo-se por 20 min no escuro após a agitação. As amostras contendo proteína apresentam coloração azul que é lida no espectrofotômetro em 750 nm. A curva de calibração foi feita utilizando como padrão soro albumina bovina (BSA).

4.2.3. Ácidos Voláteis Totais por Cromatografia Gasosa

As amostras coletadas do afluente e efluente para análise de ácidos eram filtradas, alcalinizadas com uma solução de NaOH concentrada e em seguida congeladas, para posteriormente serem analisadas

As análises dos ácidos voláteis foram feitas segundo Moraes *et al.* (2000) por cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo HP 6890, com detector de ionização de chama, coluna HP INNOWAX 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme. O gás de arraste foi H₂ com fluxo de 2,0 mL/min., temperatura do injetor igual a 250°C, *split* de 20, volume de injeção de 1,0 µL. A temperatura do forno foi igual a 100°C durante 3 minutos, rampa de aquecimento 5°C/min, até 180°C, durante 5 minutos e “*postrun*” de 200°C durante 3 minutos. A temperatura do detector foi de 300°C, com vazão de ar sintético de 300 mL/min, vazão de N₂ (*make up*) 35 mL/min e vazão de H₂ igual a 30 mL/min.

Antes de fazer as análises dos ácidos, eram obtidas as curvas de calibração para cada ácido por regressão linear simples:

$$y = m.x + b \quad (4.1)$$

Nessa expressão: y é a razão entre as áreas cromatográficas do ácido e do padrão interno, x é a concentração do ácido, m é a inclinação (coeficiente angular) e b é a interseção (coeficiente linear).

A partir das curvas, foram determinados os valores do limite de detecção (LD), que é a concentração mínima de cada ácido que o cromatógrafo pode detectar. O limite de detecção foi calculado de acordo com a expressão 4.2.

$$LD = \frac{(3.SE_b + b)}{m} \quad (4.2)$$

Nessa expressão: SE_b é o erro padrão do intercepto (Miller & Miller, 1984).

4.2.4. Análise DQO, N-NTK, Sólidos, Carbono Orgânico Total e Alcalinidade a Bicarbonato

Análises de demanda química de oxigênio (DQO) de amostras brutas e filtradas, série de sólidos, análise realizada somente na quantificação da biomassa contida da espumas de poliuretano, e carbono orgânico total foram realizadas segundo American Public Health Association - APHA (1998). Alcalinidade total e a bicarbonato foram analisadas por titulometria utilizando método de Dilallo & Albertson (1961), modificado por Ripley *et al.* (1986).

4.2.5. Potencial Redox

A medida do potencial redox foi feita com o medidor Orion Modelo 920A. Foi utilizado o eletrodo combinado de platina da Digmed. O eletrodo foi colocado no topo do reator e o contato com o efluente ocorreu na superfície do líquido.

4.2.6. Determinação da Estrutura e Composição do EPS

Vários testes foram realizados para determinação da estrutura e composição do EPS, os quais são descritos a seguir. As amostras de EPS coletadas do reator foram lavadas três vezes com água milliQ, centrifugadas e liofilizadas. As amostras eram liofilizadas no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos.

Testes Enzimáticos

Os testes enzimáticos foram realizados com celulase Denimax® 362 S (doadada pela empresa Novozyme).

Devido à consistência gelatinosa do EPS, que é uma das características da celulose bacteriana, utilizou-se a enzima celulase para verificar se o EPS produzido no ASBBR era composto por celulose. A celulase é uma enzima que quebra, especificamente, as ligações glicosídicas β ,1-4 liberando glicose como monômero.

Adicionou-se 0,003 g de EPS liofilizado em um frasco contendo pérolas de vidro, 8 mL de solução tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH de 6,5) e 0,2 g de celulase. A solução foi mantida sob agitação mecânica constante a 50°C. É importante ressaltar que esta enzima é estimulada por choques mecânicos. Em intervalos de 15 minutos, 20 μ L da solução enzimática, contendo as amostras de EPS, foram retiradas e a glicose foi quantificada pelo método enzimático da Laborlab. Os testes foram feitos em paralelo com amostras de celulose microcristalina, que foi o controle. Todas as determinações de glicose eram feitas em duplicata.

Para preparar a solução tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,5, adicionou-se 1,089 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) mais 0,284 g de fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) em 100 mL de água milliQ.

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma análise química, na qual foi utilizada para comparar a composição química dos EPS

produzidos nas diferentes condições nutricionais.

As análises de espectroscopia de infravermelho foram realizadas na Central de Análises Químicas do Instituto de Química de São Carlos na Universidade de São Paulo.

As amostras foram feitas em pastilhas de KBr na proporção de 1 mg de amostra para 100 mg KBr. Utilizou-se uma pastilha de KBr para fazer o background, o número de varredura foi de 16, a resolução de 4 cm^{-1} no espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) BOMEM MB-102.

Espectroscopia de Raio-X

As análise de espectroscopia de raio-X foram realizadas para verificar se os EPS produzidos nas diferentes condições nutricionais apresentavam diferenças no arranjo cristalino.

As análises de espectroscopia de raio-X foram realizadas no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Paulo.

As amostras de EPS liofilizadas foram analisadas no equipamento de raio-X Rigaku Rotaflex, modelo RU 200B em câmara multipurpose. Utilizou-se anodo de cobre, potência de 50 kV em corrente de 100 mA.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas na Central de Análises Químicas do Instituto de Química de São Carlos na Universidade de São Paulo.

As amostras liofilizadas foram fixadas no estabe (suporte) com fita de carbono dupliface. Em seguida as amostras foram recobertas com ouro 30 nm no metalizador Bal-Tec, modelo MD020. As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura MEV-LEO-440.

4.2.7. Testes Realizados para a Purificação do Polímero Extracelular

Os métodos utilizados para a purificação de polímeros, ou seja, a extração dos microrganismos presentes nos EPS, foram baseados na literatura descrita por Liu & Fang (2002), Bertochi *et al.* (1997) e Sakairi *et al.* (1997).

Estes testes foram realizados somente com as amostras do EPS produzido durante a alimentação do ASBBR com glicose. As amostras coletadas do reator foram lavadas três vezes com água milliQ, centrifugadas e liofilizadas.

Após os testes, análise de raio-X, infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para avaliar as alterações ocorridas após os testes de purificação.

Liu & Fang (2002)

A Figura 4.2 ilustra o procedimento detalhado de cada processo de purificação proposto por Liu & Fang (2002). Porém, ao invés de lodo, utilizou-se 10 mL de solução de EPS em água.

Figura 4.2: Métodos de extração e purificação de EPS.

Fonte: Liu & Fang (2002)

Bertocchi *et al.* (1997)

A metodologia proposta por Bertocchi *et al.* (1997) é utilizada para purificação de celulose bacteriana.

O EPS liofilizado foi hidratado durante uma noite com água milliQ, filtrado e lavado com metanol por três vezes (1 hora cada). O metanol foi removido, por evaporação e em seguida lavado por três vezes (1 hora cada) com N,N- dimetilacetamida (DMAc). O EPS pré-tratado foi coletado num funil de Buchner deixando secar, durante a noite, em atmosfera de nitrogênio. Este pré-tratamento enfraquece as pontes de hidrogênio, facilitando a dissolução da celulose.

Posteriormente, adicionou-se 0,35 g de EPS pré-tratado em 10 mL de solução de LiCl/DMAc pré tratada (0,9 g de LiCl em 10 mL de DMAc a 100°C). A mistura foi mantida a 80 °C com agitação constante por 3 horas. A suspensão foi resfriada a temperatura ambiente, mantendo a agitação constante até a completa dissolução da celulose.

Skairi *et al.* (1997)

A metodologia proposta por Skairi *et al.* (1997) também é utilizada na purificação de celulose.

Uma solução de 10mL contendo 0,35 g de EPS liofilizado em dodecilsulfato de sódio (SDS) 2% foi fervida e posteriormente centrifugada e lavada 3 vezes com água milliQ, descartando o sobrenadante. Em seguida, o material polimérico foi fervido em solução aquosa de NaOH 4% por 1,5 h. Finalmente, lavou-se o material extensivamente com água milliQ deixando secar a temperatura ambiente.

4.2.8. Análises Microbiológicas

Os exames microbiológicos do lodo anaeróbio e dos EPS foram realizados por microscopia ótica utilizando microscópio Olympus modelo BX 60-FLA, acoplado à câmara colorida digital Optronics. O software usado para aquisição das imagens foi o *Image Pro-Plus* versão 3.0.1. Através desse equipamento foi possível capturar as imagens e registrar os tipos

morfológicos presentes nas amostras.

Todas as amostras foram examinadas em lâminas de vidro cobertas com filme de ágar a 2%.

Para uma melhor caracterização dos morfotipos celulares presentes no lodo e EPS foram realizados os ensaios de coloração de Gram. A coloração Neisser e de grânulos de PHA foram feitas para a caracterização da cepa isolada em uma das condições nutricionais.

Coloração Gram

A análise da coloração Gram baseia-se na composição química e na integridade da célula. Para a análise da coloração Gram, foi utilizado o método modificado de Hücker (Jenkins *et al.*, 1993).

Nesta metodologia foram usadas três soluções:

- Solução 1: é a mistura da Solução A com a Solução B.

Foram preparadas duas soluções: Solução A, composta de 2 g de violeta cristal em 20 mL de etanol 95% e Solução B, composta de 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada.

- Solução 2: (solução de lugol) é composta de 1 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 300 mL de água destilada.
- Solução 3: é composta de 10 mL de safranina (2,5% peso/volume em etanol 95%) em 10 mL de água destilada.

O seguinte procedimento foi seguido:

- a) Colocou-se uma gota da amostra na lâmina e esperou secar
- b) A lâmina foi coberta com a Solução 2 por 1 minuto e em seguida lavada rapidamente com água
- c) Posteriormente a lâmina foi coberta com a Solução 1 por 1 minuto e lavada muito bem com água
- d) Para descobrir a amostra, foi adicionado etanol 95% gota a gota durante 25 segundos. Este procedimento foi realizado até eliminar o excesso de violeta cristal
- e) A lâmina foi coberta com a Solução 3 por 1 minuto, lavada muito bem com água e seca com papel
- f) A lâmina foi então examinada em óleo de imersão em aumento de 1000 vezes com iluminação direta

Se o resultado for coloração azul-violeta significa que o microrganismo é Gram-positivo e Gram-negativo quando a coloração é vermelha.

Coloração Neisser

A coloração de Neisser é uma técnica utilizada para identificação de grânulos intracelulares de polifosfato, que são reservas energéticas de algumas espécies bacterianas. A metodologia utilizada foi descrita por Jenkins *et al.* (1993).

Nesta metodologia foram utilizadas 2 soluções:

- **Solução 1:** é a mistura da Solução A e Solução B na proporção 2:1 v/v.

A solução A é composta por 0,1 g de azul de metileno, 5 mL de etanol 95%, 5 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água destilada. A Solução B contém 3,3 mL de violeta cristal (10 % p/v em etanol 95 %) em 6,7 mL de etanol 95 % e 100 mL de água destilada.

- **Solução 2:** é a mistura de 33,3 mL de Bismark Brown ($C_{18}H_{18}N_8$ 1 % p/v aquoso) em 66,7 mL de água destilada.

O seguinte procedimento foi seguido:

- a) Uma gota da amostra foi colocada na lâmina e deixada secar ao ar;
- b) A lâmina foi coberta com a Solução 1 por 30 segundos e lavada rapidamente com água;
- c) A lâmina foi coberta com a Solução 2 por 1 minuto, lavada muito bem com água e seca com papel;
- d) A lâmina foi então examinada em óleo de imersão em aumento de 1000 vezes com iluminação direta.

Se o resultado for coloração azul-violeta (na célula inteira ou em grânulos intracelulares) significa que o microrganismo é Neisser-positivo e coloração amarelo-marrom que é Neisser-negativo.

Coloração de Polihidroxialcanoato (PHA)

Os PHAs também é material de reserva energética intracelular, produzido por alguns tipos de bactérias e pode ser visualizado através de coloração com Negro de Sudão B seguindo metodologia descrita por Jenkins *et al.* (1993).

Nesta metodologia foram utilizadas 2 soluções:

Solução 1: consiste da mistura de 0,3 g do corante Negro de Sudão B (IV) em 100 mL de etanol 60 %.

Solução 2: contém 0,5 g de safranina O dissolvida em 100 mL de água destilada.

Seguiu-se o seguinte procedimento:

- a) Uma gota da amostra foi colocada na lâmina e deixada secar ao ar;

- b) A lâmina foi coberta com a Solução 1 por 10 minutos e era adicionado mais um pouco da Solução 1 se a lâmina começasse a secar;
- c) A lâmina foi lavada rapidamente com água;
- d) A lâmina foi coberta com a Solução 2 por 10 segundos, lavada muito bem com água e seca com papel;
- e) A lâmina foi então examinada em óleo de imersão em aumento de 1000 vezes com iluminação direta.

Nos resultados, se houver grânulos de PHA estes apresentam coloração negra, caso contrário o citoplasma da bactéria apresenta coloração rosa.

4.2.9. Investigação de enzimas respiratórias

O teste de identificação de enzimas respiratórias, citocromo oxidase e catalase, foram realizados de acordo com metodologia descrita por Holt *et al.*, 1994. A enzima citocromo oxidase é encontrada em algumas bactérias que utilizam o oxigênio como doador de elétrons e a enzima catalase é encontrada na maioria dos microrganismos que decompõe o peróxido de hidrogênio. Portanto, para a determinação da enzima citocromo oxidase utilizou-se fitas para determinação de oxidase PROBAC e H₂O₂ concentrada para a catalase.

4.2.10. Extração, amplificação de DNAr pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Para se obter as amostras do material biológico do ASBBR, as espumas de poliuretano foram submetidas à maceração com bastão de vidro na presença de tampão biológico até que todo biofilme fosse desprendido. O biofilme, dessa forma ressuspendido, foi centrifugado e o pelete resultante serviu para a extração do DNA.

Amostras de DNA foram obtidas com o método de extração descrito por Griffithins *et al* (2000). Resumidamente, as amostras são expostas a uma solução de fenol, clorofórmio e tampão, nas proporções 1:1:1 v/v, junto com a ação mecânica de ruptura celular por pérolas de vidro. As seqüências do DNA correspondentes ao gene que decodifica o RNAr 16S foram amplificadas em reações de PCR utilizando “eubacterial primers” 27F (5’ AGA GTT TGA

TCC TGG CTC AG 3') e 907r (5' -CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'), seguindo metodologia descrita por So & Young (1999).

Os fragmentos de DNAr 16S foram separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE), permitindo a avaliação do perfil da diversidade de microrganismos nas amostras através do padrão de bandas obtidos (Muyzer *et al.*, 1993). Foi utilizado o formador de gradiente modelo 475 da BIO-RAD Laboratories e a eletroforese foi realizada em corrente constante de 75 V a uma temperatura de 65°C por 16 h. Depois da eletroforese, o gel foi corado em 1XTAE com brometo de etídio (0,5 µg / mL). O gel foi fotografado com luz Ultra Violeta de onda curta no Eagle Eye II, Stratagene, utilizando o programa Eaglesight versão 3.2. A comparação do perfil de bandas foi realizada visualmente.

4.2.11. Clonagem e seqüenciamento

As amostras dos produtos de PCR da cultura isolada (DNAr 16S contendo 880 pb) foram clonadas em plasmídeo pCR 2.1 TOPO-TA “easy vector system-Invitrogen”. Células competentes de *E. Coli* DHα5 foram transformadas com o plasmídeo seguindo metodologia descrita pelo fabricante. Os clones foram selecionados ao acaso e a verificação da presença dos incertos realizada através de digestão com endo-nuclease HhaI. Foram clonadas 142 colônias das quais 60 clones foram seqüenciados. O seqüenciamento dos nucleotídeos foi realizado em seqüenciador ABI 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Foram utilizados “primers” M13 *forward* e *reverse*, respectivamente. As seqüências obtidas foram agregadas e alinhadas usando DNASTAR-package Software (Lasergene Sequence Analysis). Depois do alinhamento e averiguação da presença de quimeras, as seqüências de nucleotídeo foram comparadas às seqüências do banco de dados eletrônico NCBI-database para a aproximação da identidade filogenética.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA ANAERÓBIA

Nos experimentos realizados com glicose na relação C/N1 (13,6 gC/gN), com glicose em condições de anaerobiose estrita, com extrato de carne e com óleo de soja, foram utilizadas espumas obtidas da Edmil Indústria e Comércio. As espumas obtidas de Guilherme Colchões foram utilizadas nos experimentos com glicose nas relações C/N2 (6,8 gC/gN) e C/N3 (3,4 gC/gN), com glicose/extrato de carne/óleo de soja e com os ácidos voláteis (acético/butírico/propiónico). Para imobilização da biomassa anaeróbia em matrizes de espuma de poliuretano, colocou-se 45 g de espuma, proveniente da Edmil Indústria e Comércio em um recipiente e, aproximadamente, 3,5 L de lodo foram adicionados até que toda a espuma ficasse em contato com a suspensão. Esse contato ocorreu por um período de 24 horas. Decorrido este período, o excesso do lodo foi retirado e as matrizes com as células aderidas foram colocadas no cesto e este colocado dentro do reator. Quando se utilizou as espumas de poliuretano provenientes de Guilherme Colchões, foram colocadas 70 g de espuma no recipiente contendo aproximadamente 3,5 L de lodo. Essa diferença de massa entre as espumas de cada fabricante é devida à diferença na densidade do material.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando as espumas provenientes de Guilherme Colchões, neste caso, utilizando 70 g de espuma. A diferença entre a quantidade de espumas

A lavagem dos sólidos fracamente aderidos foi feita através de bateladas de 12 horas

durante 3 dias com os descartes feitos manualmente. Após os 3 dias, as bateladas passaram a ser de 6 horas, com o descarte realizado por meio de bomba, por período de 4 dias, totalizando uma semana. Durante este período não houve agitação. Antes de iniciar a agitação, 9 amostras de espumas eram retiradas, sendo 3 da parte superior, 3 da parte mediana e três da parte inferior do cesto, para a quantificação inicial da biomassa por SSV.

5.2. OPERAÇÃO DO ASBBR

O reator foi operado à temperatura constante de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, intensidade de agitação constante de 300 rpm e com concentrações da matéria orgânica, expressa como DQO, em torno de 1000 mg/L. Os ciclos eram de 6 horas, ou seja, 4 bateladas sequenciais por dia.

O reator era alimentado com um volume aproximado de 4,2 litros de água residuária sintética durante 10 min e o descarte também era feito em 10 min. Após o esvaziamento do reator, foi estabelecido um intervalo de tempo de 1 min como segurança no sincronismo de operação das duas bombas usadas na alimentação e descarga, controladas por temporizadores, para então, o próximo ciclo ser reiniciado.

Antes de entrar no reator, o substrato armazenado em geladeira a 4°C , era bombeado através de serpentina alocada em banho de água aquecida possibilitando que a água residuária entrasse no reator à temperatura de 30°C , evitando choques térmicos no sistema.

As condições experimentais, com base na alimentação do reator são apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Resumo das condições experimentais, baseado na alimentação do reator.

Experimento	Fonte de Carbono	Uréia no substrato (mg/L)	Relação C/N (gC/gN)	Tempo de operação* (dias)
1	Glicose C/N1	62,5	13,6	60
2	Glicose C/N2	123,0	6,8	30
3	Glicose C/N3	246,0	3,4	30
4	Glicose (anaerobiose estrita)	62,5	13,6	30
5	Extrato de Carne	62,5	2,1	30
6	Óleo de Soja	62,5	11,3	30
7	Glicose/Extrato de Carne/Óleo de Soja	62,5	2,7	30
8	Acetato/Propionato/Butirato	62,5	13,3	30

* Tempo aproximado de operação.

No primeiro experimento, quando o reator foi alimentado com glicose na relação C/N1, o reator foi operado por um tempo maior que nas outras condições a fim de se obter quantidade representativa de EPS para as análises preliminares, tais como o teste enzimático, FTIR, raio-X, MEV e os testes para retirar os microrganismos das amostras. Nas outras condições, operou-se o reator em torno de 30 dias, visto que a estabilidade era atingida em tempos menores e que a quantidade de EPS utilizada nas análises era pequena. O reator era reinoculado a cada mudança de condição.

Para verificar se as condições de microaerofilia no reator, que eram obtidas durante o preparo do substrato e durante a alimentação e descarte do meio líquido no reator, influenciavam na produção de EPS, realizou-se um experimento no qual era borbulhado gás nitrogênio no meio reacional, durante todo o ciclo, garantindo, dessa forma, o meio estritamente anaeróbico. Nesse experimento, um cilindro de gás nitrogênio foi conectado a um registro agulha, onde era feito o controle da vazão do gás. Na saída do registro agulha era conectada uma mangueira de silicone de 0,3 cm de diâmetro interno e 0,5 cm de diâmetro externo. No final da mangueira de silicone, estava conectada uma mangueira aeradora flexível (utilizada em aquários), que ficava localizada sob o cesto de inox, de forma a distribuir o gás por todo o meio reacional (Figura 5.1). A vazão de gás borbulhada no reator era em torno de 75 ml/minuto.

Figura 5.1: Esquema representativo do ASBBR quando o operou em anaerobiose estrita.

O reator era monitorado ao longo de uma batelada do dia. Antes da alimentação da batelada era coletada uma amostra do afluente para as análises de demanda química de oxigênio (DQO), concentração de fonte de carbono específica, alcalinidade a bicarbonato (AB), ácidos voláteis (AV) e pH. Durante o descarte, 200 mL de amostra do efluente eram coletados para realizar as mesmas análises que eram feitas no afluente.

Em todas as condições, depois de atingida a estabilidade operacional, foram realizadas análises de alguns parâmetros de monitoramento ao longo de uma batelada para que fossem obtidas as variações temporais (perfis temporais). Durante as 6 horas da batelada eram coletadas amostras para análise de DQO, fonte de carbono (glicose, proteína e lipídeos) e ácidos voláteis por cromatografia. Foram realizados, também, perfis temporais de potencial redox.

Após finalizar cada condição, amostras de biopartículas de espuma de poliuretano e amostras de polímeros, produzidos durante a operação, eram retiradas do reator para análise microbiológica. A quantificação de sólidos suspensos voláteis das biopartículas de espuma era realizada após a análise microbiológica. Os polímeros extracelulares, produzidos em cada condição, eram raspados do reator e do cesto de inox, lavados 3 vezes com água milliQ, centrifugados, liofilizados e pesados.

A Figura 5.2 apresenta o esquema experimental, em forma de fluxograma, da operação do ASBBR.

Figura 5.2: Esquema experimental da operação do ASBBR.

5.3. ENSAIOS DE ADSORÇÃO DO ÓLEO DE SOJA

Como os lipídeos causam, normalmente, problemas operacionais em reatores contendo biomassa imobilizada devido adsorção nas superfícies de partículas e biofilmes, foram realizados estudos de adsorção para quantificação dessa interferência.

Os ensaios de adsorção do óleo de soja na espuma foram realizados no ASBBR contendo 45 g de espumas de poliuretano com 1 cm de aresta, sem a biomassa. A temperatura foi mantida constante a 30° C e agitação mecânica constante a 300 rpm.

O reator foi alimentado com o substrato contendo óleo de soja num volume de 4,5 L. As concentrações do substrato utilizadas, medidas em DQO, foram em torno de 1000 mg/L, 2500 mg/L, 5000 mg/L e 10000 mg/L. Em intervalos de 1 ou 2 horas durante 24 horas, alíquotas do efluente eram retiradas até se atingir a concentração de equilíbrio (C_e), ou seja, quando a concentração do efluente não variasse mais.

A quantidade de óleo adsorvida em mg por grama de adsorvente foi determinada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração final (C_e) do óleo no meio aquoso após a adsorção por:

$$q_e = \frac{(C_o - C_e) \cdot V}{P} \quad (5.1)$$

onde q_e é a quantidade de óleo adsorvido por grama de espuma (mg/g), C_o é a concentração inicial de óleo no meio aquoso (mg), C_e é a concentração de óleo final, ou de equilíbrio, no meio aquoso (mg), V é o volume de substrato (L) e P é a quantidade de adsorvente (g).

A análise da capacidade de adsorção da espuma foi feita através da isoterma de Langmuir e Freundlich descritas pelas equações 5.2 e 5.3, respectivamente.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Kq_{\max}} + \frac{C_e}{q_{\max}} \quad (5.2)$$

O modelo de isoterma de adsorção de Langmuir considera adsorção em monocamadas em superfícies homogêneas, com numero finito de sítios idênticos, dos quais são energeticamente equivalentes e que não há interações entre as moléculas adsorvidas. Portanto, na equação 5.2 K é a constante de equilíbrio de adsorção (L/mg) e $q_{\max}$ é a adsorção máxima na monocamada (mg/g).

$$\ln q_e = \frac{1}{n} \cdot \ln C_e + \ln K_f \quad (5.3)$$

A expressão de Freundlich é uma equação empírica baseada na adsorção em superfícies heterogêneas possuindo sítios de energia não específicos, portanto não existe um fator limitante estequiométrico (saturação). Portanto, K_F e $\frac{1}{n}$ são constantes características de Freundlich, indicando capacidade de adsorção e intensidade de adsorção respectivamente.

5.4. ISOLAMENTO DO MICRORGANISMO RESPONSÁVEL PELA PRODUÇÃO DA CELULOSE QUANDO O ASBBR FOI ALIMENTADO COM GLICOSE/EXTRATO DE CARNE/ÓLEO DE SOJA

Após constatar que o EPS produzido nas diferentes condições nutricionais era composto principalmente por celulose, decidiu-se isolar e identificar um dos microrganismos responsável pela produção de celulose em uma das condições nutricionais.

Ao final da operação do reator quando alimentado com glicose/extrato de carne/óleo de soja separou-se amostras de espumas de poliuretano da superfície, do centro e do fundo do cesto, contendo a biomassa, e do material polimérico da superfície do cesto para o isolamento, caracterização e identificação do microrganismo responsável pela produção de celulose.

Foi coletado 1 mL de amostras microbiológicas das espumas de poliuretano e do material polimérico. Em seguida foram feitas diluições sucessivas até se chegar à fração de 10^{-7} da concentração inicial. O plaqueamento foi realizado através do método de espalhamento em superfície, utilizando a espátula de Drigalsky, das amostras mais diluídas, em meio de cultura Luria Bertani (LB: 1 % triptona, 0,5% extrato de levedura e 1,6% ágar). Após a inoculação as placas de Petri foram envolvidas em filme de PVC para dificultar a entrada de oxigênio, na tentativa de reproduzir as condições do reator.

O meio de cultura LB induz a produção de celulose e para visualizar a celulose, adicionou-se 0,004% de Congo Red (CR) e 0,002 % de Coomassie Brilhante Blue G-250 (Römling & Lünsdorf, 2004).

As amostras eram incubadas a 30°C durante cinco dias. As colônias de espécies produtoras de celulose, que apresentavam coloração avermelhada e aparência rugosa, devido à adsorção do corante CR, eram inoculadas em meio de cultura LB líquido. O procedimento de incubação de alternância entre o meio líquido e sólido (contendo os corante CR e Coomassie blue) foi repetido até se obter culturas puras nas placas contendo meio sólido.

A caracterização foi realizada através de microscopia óptica comum, coloração de Gram, de Neisser e Polihidroxialcanoato (PHA). Foi feita também a clonagem através da técnica de PCR para posterior seqüenciamento do DNA e identificação da espécie. O seqüenciamento foi realizado no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

5.5. AMOSTRAGEM

Amostras do afluente e efluente foram coletadas para as análises: DQO de amostras brutas e filtradas, fonte de carbono, AVT por cromatografia, pH e alcalinidade a bicarbonato.

O afluente foi coletado no final da mangueira de alimentação no ponto conectado ao reator sendo que os 200 mL iniciais eram descartados para evitar coletar o líquido que ficava na mangueira entre os intervalos de alimentação. O efluente era coletado no final da mangueira de descarte.

Ao final de cada condição, todo o material polimérico presente no vidro do reator, no cesto e no fundo do reator era raspado, colocados em tubos Falcon, lavado com água milliQ, centrifugado e liofilizado.

Para análises microbiológicas e de sólidos, foram retiradas amostras de espumas da superfície, do centro e do fundo do cesto. O número total de espumas retiradas ao final de cada operação, para análise microbiológica, era em torno de 12 cubos. As amostras eram armazenadas na geladeira em frascos de vidro contendo aproximadamente 3 mL de água. Para fazer as análises de microscopia óptica comum, a biomassa era desprendida da espumas e 200 μ L da solução contendo biomassa era diluída em 800 μ L de água. Desta solução diluída, 200 μ L eram espalhados na lâmina. Após as análises microbiológicas, a biomassa contida nos frascos era quantificada por sólidos voláteis totais (SVT).

Para as análises microbiológicas dos expolissacarídeos, uma pequena quantidade de amostra era retirada da superfície da tampa do cesto e armazenada em frascos contendo 3 mL de água. Pérolas de vidro eram adicionadas no frasco e agitada fortemente para romper a estrutura do biofilme de forma a homogeneizar a amostra. Para as análises de microscopia óptica comum utilizou-se o mesmo procedimento descrito acima para a biomassa na espuma.

Para as análises de DGGE, também foram coletadas amostras de espuma da superfície, do centro e do fundo do cesto, e do material polimérico, obtido na superfície do cesto de inox,

porém um maior número de espumas para se ter amostras suficientes para extração do DNA. As amostras foram armazenadas em frascos de plástico contendo o substrato e eram congeladas para posterior análise.

Para o isolamento do microrganismo responsável pela produção de celulose também foram retiradas amostras de espumas da superfície, do centro e do fundo do cesto, e do material polimérico, obtido na superfície do cesto de inox. As amostras foram armazenadas no substrato contendo glicose/extrato de carne/óleo de soja em geladeira por um dia.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. ANÁLISES DO DESEMPENHO DO ASBBR NAS DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS

O desempenho e estabilidade do ASBBR foi avaliado através dos parâmetros de DQO total, alcalinidade a bicarbonato afluente e efluente, ácidos voláteis totais efluente, obtidos por cromatografia gasosa e pH afluente e efluente. Na Tabela 6.1 encontram-se os valores médios dos parâmetros avaliados.

Cabe ressaltar que neste capítulo não serão expostos os gráficos do monitoramento diário, visto que o reator obteve bom desempenho, ou seja, partidas rápidas, atingindo valores altos na remoção da matéria orgânica já nos primeiros ciclos, e relativamente constância nesses valores durante todo o período de operação em cada condição. No Apêndice A encontram-se os gráficos dos parâmetros de monitoramento diário.

É importante informar, também, que, para evitar confusão com nomenclatura, a operação do reator alimentado com glicose e com borbulhamento de nitrogênio para expulsão do oxigênio será tratada como “operação sob anaerobiose estrita”, enquanto que a operação com glicose com relação C/N1 será denominada “operação normal”, quando as duas operações forem comparadas.

Tabela 6.1 - Valores médios dos parâmetros obtidos no monitoramento do ASBBR quando operado em cada condição.

	DQOr (%)	ABa (mg CaCO ₃ /L)	ABe (mg CaCO ₃ /L)	AVT (mg DQO/L)	pH _a	pH _e
Glicose (C/N1)	80 ± 13 (16)	1202 ± 159 (17)	1212 ± 142 (17)	93 ± 94 (17)	7,9 ± 0,4 (17)	7,2 ± 0,2 (17)
Glicose (C/N2)	81 ± 5 (7)	1224 ± 63 (7)	1442 ± 81 (7)	124 ± 25 (6)	7,9 ± 0,2 (7)	7,0 ± 0,1 (7)
Glicose (C/N3)	78 ± 4 (7)	1053 ± 73 (7)	1586 ± 104 (7)	116 ± 17 (4)	7,8 ± 0,1 (7)	7,5 ± 0,2 (7)
Glicose em anaerobiose estrita	79 ± 4 (8)	1170 ± 79 (8)	1198 ± 38 (8)	159 ± 36 (8)	7,8 ± 0,2 (8)	7,8 ± 0,4 (8)
Acetato/Propionato/Butirato	98 ± 1 (5)	515 ± 27 (5)	992 ± 57 (5)	14 ± 2 (4)	6,4 ± 0,1 (5)	7,6 ± 0,2 (5)
Extrato de Carne	85 ± 7 (10)	1078 ± 59 (10)	1808 ± 118 (10)	0 (10)	7,9 ± 0,2 (10)	7,6 ± 0,1 (10)
Óleo de Soja	34 ± 17 (10)	1147 ± 127 (9)	1317 ± 182 (9)	12* ± 11 (10)	8,9 ± 0,2 (9)	7,8 ± 0,2 (9)
Glicose/Extrato de Carne/Óleo de Soja	75 ± 14 (8)	1075 ± 163 (8)	1555 ± 157 (8)	65 ± 54 (8)	7,4 ± 0,5 (8)	7,7 ± 0,4 (8)

() número de amostras

* abaixo do limite de detecção (40 mg/L)

Na Tabela 6.1 pode-se observar que o ASBBR apresentou bom desempenho na redução de DQO total em todas as condições estudadas, com exceção de quando o reator foi alimentado com óleo de soja, pois valores médios de 34% na eficiência de remoção foram atingidos. Porém, nesse caso, houve degradação da matéria orgânica e não só adsorção do óleo no meio suporte, uma vez que se observou a produção significativa de polímeros extracelulares (EPS), em torno de 13,0 mg EPS/g óleo. Além disso, pelos exames de microscopia comum, constatou-se a presença de morfologias semelhantes à *Arqueas Methanosaeta*, *Arqueas Metanosarcina* e à *Arqueas fototróficas anoxigêncas*.

Quando o reator foi alimentado com óleo de soja, verificou-se também o fenômeno de adsorção do óleo na espuma. Através de ensaios de adsorção, constatou-se que a capacidade máxima de adsorção da espuma foi de 588 mg óleo/g espuma (no Apêndice B encontram-se os resultados dos ensaios de adsorção). Contudo, no tratamento de águas residuárias contendo óleo vegetal, com quantidades adequadas de nutrientes, o ASBBR pode ser viável, porém os tempos de ciclos devem ser maiores, uma vez que a adsorção do óleo na espuma pode facilitar o processo de biodegradação devido à biodisponibilidade do substrato.

Quando o reator foi alimentado com água residuária contendo glicose, extrato de carne e óleo de soja, juntos, não se observou interferência do óleo adsorvido na espuma no

desempenho do reator, permitindo que este mantivesse uma média de 75% na remoção da matéria orgânica. A alcalinidade a bicarbonato efluente também se manteve maior que a afluente, comprovando a estabilidade do processo. Beccari *et al.* (1996) realizaram ensaios acidogênicos e metanogênicos e constataram que houve maior degradação dos lipídios quando a água residuária continha glicose. Porém, nos ensaios realizados com o ASBBR não foi possível avaliar a degradação dos lipídios, devido às dificuldades encontradas na coleta de amostras homogêneas e ao método de determinação de lipídios descrita por Postma & Stroes (1968) que se aplica somente a concentrações elevadas de lipídios totais.

O EPS foi um fator limitante para o bom desempenho do ASBBR quando alimentado com glicose, na condição C/N1 (13,6 gC/gN). A Figura 6.1 ilustra os resultados obtidos durante aproximadamente 60 dias de operação (233 ciclos). Pode-se observar, na Figura 6.1a, a queda no desempenho do reator quanto à remoção da matéria orgânica a partir do 16º dia de operação (60º ciclo) devido ao crescente aumento na produção do EPS. A Figura 6.1b comprova a queda da eficiência do reator com o acúmulo dos ácidos voláteis orgânicos e, conseqüentemente, o consumo da alcalinidade a bicarbonato, indicando, dessa forma, o início do desequilíbrio da degradação anaeróbica da matéria orgânica. Na Figura 6.2 pode-se observar que o EPS produzido, durante os 60 dias de operação, ficou aderido na superfície da espuma e por todo o cesto, impedindo a transferência de massa do meio líquido para o meio sólido, explicando o acúmulo dos ácidos voláteis totais.

Figura 6.1. Parâmetros monitorados no ASBBR no período de operação com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN). (a) eficiência de remoção da DQO total e filtrada, (b) alcalinidade a bicarbonato do afluente e efluente e concentração do AVT, obtidos por CG, do efluente.

Figura 6.2. Fotos retiradas no final da operação do ASBBR alimentado com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN): (a) superfície do cesto, (b) espumas do cesto.

Águas residuárias de fácil degradação podem, potencialmente, causar problemas operacionais devido às altas velocidades de acidificação, pois dependem da eficiência do sistema de retenção de biomassa que garanta equilíbrio entre as populações produtoras e consumidoras de ácidos orgânicos e H_2 . Segundo Bagley & Brodtkorb (1999), os processos anaeróbios em batelada deveriam estar mais susceptíveis ao desbalanceamento quando fossem aplicados no tratamento de águas residuárias de fácil degradação. No entanto, quando o reator foi alimentado com glicose em condições de anaerobiose estrita ou quando se dobrou e quadruplicou a concentração de uréia observou-se o contrário. O reator apresentou, nessas três condições, ótimo desempenho, resultando em eficiências médias de remoção da matéria orgânica de 79%, 81% e 78%, respectivamente, e com alcalinidade a bicarbonato efluente maior que afluente indicando a estabilidade do processo. Portanto, pôde-se constatar que, em condições de anaerobiose estrita ou com concentrações maiores de nitrogênio (C/N iguais a 3,4 e 6,8 gC/gN), a produção de EPS foi reduzida e, conseqüentemente, o ASBBR apresentou grande potencial no tratamento de água residuária contendo glicose, substrato de fácil degradação. Assim, o tratamento de água residuária pode ser viabilizado no ASBBR uma vez que seja feito estudo em relação às condições ideais de operação, de modo a viabilizar, economicamente, o tratamento.

Por meio dos estudos cinéticos obtidos com os perfis temporais realizados no ASBBR quando alimentado com glicose C/N1 (13,6 gC/gN) em condições de operação normal e de anaerobiose estrita (resultados apresentados no item 6.2), foi possível visualizar as vias de

degradação da glicose e o equilíbrio do sistema.

Segundo alguns autores, águas residuárias que contêm proteínas, de maneira geral, dificilmente são degradadas em processos anaeróbios de tratamento de despejos, devido à elevada massa molecular e a presença de pontes dissulfeto nas moléculas (Petrury & Lettinga, 1997 e McInerney, 1988). No entanto, o desempenho do ASBBR quando alimentado com extrato de carne, substrato rico em proteínas, foi estável, mantendo uma média de 85% de eficiência na remoção da matéria orgânica. Porém, a proteína não era totalmente degradada, sendo responsável pelos 15% da matéria orgânica residual, visto que não foi constatada a presença de ácidos voláteis totais no efluente. Porém, parte da matéria orgânica residual pode ser devido à presença de microrganismo nas amostras, tendo em vista que as amostras eram filtradas em filtros com poros de 1,2 μm . A alcalinidade a bicarbonato efluente sempre foi maior que afluente e os valores médios estão bem acima dos valores observados nas outras condições, devido ao fato da liberação do nitrogênio amoniacal presente nas moléculas de proteína (aminoácidos).

O ensaio com os ácidos acético, propiônico e butírico foi realizado para verificar a influência dos intermediários, produzidos durante a degradação anaeróbia da glicose, na produção de EPS. Constatou-se que, além de não haver o favorecimento da produção de EPS como observado na operação com glicose, na relação C/N de 13,6 gC/gN, como fonte de carbono, o reator apresentou elevado desempenho, visto que não se verificou o acúmulo dos ácidos, sendo estes totalmente degradados atingindo 98% na remoção da matéria orgânica, como DQO. Verificou-se, também, por meio dos valores da alcalinidade efluente e do aumento do pH efluente, que o sistema operou de maneira estável. Já em estudos realizados por Brito *et al.* (1997) tratando água residuária sintética contendo 10% de glicose e 90% de ácido acético, propiônico e butírico nas proporções 2:1:1 com DQO próxima de 1000 mg/L, foi observada eficiência de remoção de DQO entre 60% e 70% com tempos de reação entre 5 e 6 horas.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho com o ASBBR, exceto quando o reator foi alimentado com glicose na condição C/N1 (13,6 gC/gN), e os resultados obtidos por outros autores, em escala de bancada e piloto, permitem concluir que esta nova configuração de reator é adequada no tratamento de diversos tipos de água residuária devido a sua flexibilidade operacional. Porém, alguns fenômenos devem ser elucidados, tais como a produção de EPS e o comportamento cinético, de forma a se buscar a otimização o processo.

6.2. ESTUDOS CINÉTICOS DA DEGRADAÇÃO DA GLICOSE

Os perfis temporais, obtidos quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN) sob condição de operação normal (anaeróbia, porém sem o controle de entrada de oxigênio) e sob condição de anaerobiose estrita (obtida com o borbulhamento contínuo de N₂ no meio reacional), possibilitaram uma compreensão maior das rotas de degradação da matéria orgânica ao longo de um ciclo.

O modelo cinético obtido considera reações irreversíveis em série e paralelo de primeira ordem, baseado nas possíveis reações que ocorrem no interior do reator, de acordo com os diagramas apresentado nas Figuras 6.3 e 6.4. Nessas Figuras 6.3 e 6.4, k_1^{app} , k_2^{app} , k_3^{app} , k_4^{app} , k_5^{app} , k_6^{app} , k_7^{app} são constantes cinéticas aparentes dos processos descritos.

Figura 6.3. Diagrama proposto para a rota de degradação da matéria orgânica no ASBBR, durante um ciclo, quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN) em condição normal de operação (anaeróbia).

Figura 6.4. Diagrama proposto para a rota de degradação da matéria orgânica no ASBRR, durante um ciclo, quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN) em condição de anaerobiose estrita.

Considerando essas expressões cinéticas de velocidades de reação, foram feitos balanços de massa no reator em batelada para glicose, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico e para o EPS gerado (em condição de operação normal), resultando em sistemas de equações diferenciais (Equações 6.1 a 6.9), os quais foram resolvidos pelo algoritmo de Rung-Kutta de quarta ordem por meio do Microsoft Excel 2003 – SOLVER. Os dados obtidos experimentalmente e o modelo ajustado, estão apresentados na Figura 6.5 (a e c) e as velocidades de reação são apresentadas na Figura 6.5 (b e d). As constantes cinéticas fornecidas pelos modelos são apresentadas na Tabela 6.2.

As expressões cinéticas 6.1 a 6.9 foram obtidas a partir do mecanismo proposto para representar a variação das concentrações de glicose e ácidos voláteis ao longo do tempo, sendo r_{glicose} a velocidade de consumo de glicose, $r_{\text{acético}}$ a velocidade de produção e consumo do ácido acético, $r_{\text{propiônico}}$ a velocidade de produção (em condição anaeróbia) de ácido propiônico e de produção e consumo (em condição anaeróbia estrita), $r_{\text{butírico}}$ a velocidade de produção e consumo do ácido butírico e r_{EPS} a velocidade de produção de EPS na condição anaeróbia.

Condição Anaeróbia

$$r_{\text{glicose}} = -\frac{dC_{\text{glicose}}}{dt} = -(k_1^{\text{app}} + k_2^{\text{app}} + k_3^{\text{app}} + k_4^{\text{app}}) \cdot C_{\text{glicose}} \quad (6.1)$$

$$r_{\text{acético}} = \frac{dC_{\text{acético}}}{dt} = k_2^{\text{app}} \cdot C_{\text{glicose}} + k_5^{\text{app}} \cdot C_{\text{butírico}} - k_7^{\text{app}} \cdot C_{\text{acético}} \quad (6.2)$$

$$r_{butírico} = \frac{dC_{butírico}}{dt} = k_1^{app} \cdot C_{gli\ cos\ e} - k_5^{app} C_{butírico} \quad (6.3)$$

$$r_{propiónico} = \frac{dC_{propiónico}}{dt} = k_3^{app} \cdot C_{gli\ cos\ e} \quad (6.4)$$

$$r_{EPS} = \frac{dC_{EPS}}{dt} = k_4^{app} \cdot C_{gli\ cos\ e} \quad (6.5)$$

Condição Anaeróbia Estrita

$$r_{gli\ cos\ e} = -\frac{dC_{gli\ cos\ e}}{dt} = -(k_1^{app} + k_2^{app} + k_3^{app}) \cdot C_{gli\ cos\ e} \quad (6.6)$$

$$r_{acético} = \frac{dC_{acético}}{dt} = k_2^{app} \cdot C_{gli\ cos\ e} + k_5^{app} \cdot C_{butírico} + k_6^{app} \cdot C_{propiónico} - k_7^{app} \cdot C_{acético} \quad (6.7)$$

$$r_{butírico} = \frac{dC_{butírico}}{dt} = k_1^{app} \cdot C_{gli\ cos\ e} - k_5^{app} C_{butírico} \quad (6.8)$$

$$r_{propiónico} = \frac{dC_{propiónico}}{dt} = k_3^{app} \cdot C_{gli\ cos\ e} - k_6^{app} \cdot C_{propiónico} \quad (6.9)$$

As velocidades de consumo e formação da matéria orgânica ao longo de um ciclo quando o ASBBR foi alimentado com glicose na razão C/N1 em condições anaeróbia e anaeróbia estrita são apresentadas na Figura 6.5 (b e d), respectivamente.

Figura 6.5. (a) e (c) perfil de decaimento da concentração de glicose e produção e consumo de ácidos voláteis no ASBBR alimentado com glicose na ralação C/N1 em condição normal de operação (anaeróbia) e anaeróbia estrita, respectivamente. (b) e (d) velocidades de consumo da glicose e de produção e consumo dos ácidos voláteis em condição normal de operação (anaeróbia) e anaeróbia estrita, respectivamente. (■) concentração de glicose obtida experimentalmente, (●) concentração de ácido acético obtida experimentalmente, (▲) concentração de ácido butírico obtida experimentalmente, (▼) concentração de ácido propiônico obtida experimentalmente, (—) valores preditos pelo modelo.

Tabela 6.2 - Constantes cinéticas aparentes obtidas nos experimentos realizados utilizando-se glicose na razão C/N1, em condição de operação normal (anaeróbia) e de anaerobiose estrita, no ASBBR.

	k_1^{app} (h ⁻¹)	k_2^{app} (h ⁻¹)	k_3^{app} (h ⁻¹)	k_4^{app} (h ⁻¹)	k_5^{app} (h ⁻¹)	k_6^{app} (h ⁻¹)	k_7^{app} (h ⁻¹)	Somatória dos Desvios
Condição de operação normal (anaeróbia)	0,25	0,08	0,03	0,47	0,41	0	0,39	587
anaerobiose estrita	0,78	1,13	1,02	-	0,42	0,22	2,64	1141

O conjunto de valores das constantes cinéticas aparentes, nas duas condições, observados na Tabela 6.2, foram obtidos de forma a se ter a menor somatória dos desvios.

Os valores das constantes cinéticas aparentes (Tabela 6.2), em geral, foram maiores para a operação sob anaerobiose estrita. Conseqüentemente, as velocidades de reação sob essa condição foram, também, maiores, indicando grande vantagem cinética na remoção da matéria orgânica e no equilíbrio entre produção e consumo de intermediários da digestão anaeróbia. Assim, do ponto de vista de otimização do processo, a operação sob condição de anaerobiose estrita leva vantagem, pois as mais altas velocidades resultarão em menores tempos de ciclo necessários para a obtenção de determinada eficiência do processo.

Quando o reator foi operado com glicose em condições de anaerobiose estrita, condição na qual o reator operou de maneira estável durante todo o tempo de operação, as velocidades de produção e de consumo dos intermediários são próximas (Fig. 6.5d), confirmando, dessa forma, o equilíbrio do sistema. No entanto, quando o reator foi alimentado com glicose na condição normal de operação esse equilíbrio não foi detectado. Nesse caso, os perfis temporais foram realizados no 101º ciclo de operação, quando a produção de EPS já era alta gerando desequilíbrio no processo (Figura 6.1b). A Figura 6.5b reforça a ocorrência desse desequilíbrio do sistema, na qual se constata que a velocidade de produção do ácido butírico foi maior que a do ácido acético. Além das velocidades de consumo e produção dos ácidos, comparando-se os valores da constante cinética k_7^{app} nas duas condições observa-se que o consumo do ácido acético é mais favorável em condição estritamente anaeróbia.

O comprometimento do processo anaeróbio na condição de operação normal (anaeróbia - sem borbulhamento de N₂), com baixos valores das constantes cinéticas aparentes, está relacionado com a produção e acúmulo dos EPS, o que gerou o aumento da

resistência à transferência de massa líquido-sólido, resultando na diminuição das velocidades globais de reação.

6.3. PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

O EPS produzido em cada condição foi quantificado pelo peso das amostras liofilizadas após a coleta de todo o material no reator e no cesto. No Apêndice C encontram-se as fotografias da superfície do cesto e das espumas retiradas ao final da operação do ASBBR nas diferentes condições.

A Tabela 6.3 e a Figura 6.6 apresentam a produção de EPS em função da fonte de carbono, as razões C/N e o crescimento bacteriano diário. A produção de biomassa foi calculada de acordo com a equação 6.10.

$$Y_{SVT / dia} = \frac{(m_{SVT} - m_{SVT_0})}{t} \quad (6.10)$$

Na equação 6.10, m_{SVT} é a massa de sólidos voláteis totais contida nas espumas de poliuretano, no reator, ao final de cada condição (g); m_{SVT_0} é a massa de sólidos voláteis totais contida nas espumas no início de cada condição (g); t é o tempo total de operação em cada condição (dia) e $Y_{SVT / dia}$ é a produção diária de biomassa obtida em termos de SVT (g SVT/dia). Esta equação é uma maneira grosseira de se obter a produção diária de biomassa, porém é útil para esclarecer uma hipótese levantada, a qual será discutida a seguir.

Tabela 6.3 - Rendimento de EPS, relação C/N e produção diária de biomassa, nas diferentes condições nutricionais.

Fonte de Carbono	$Y_{EPS / fonte\ carbono}$ (mg EPS/g fonte carbono)	C/N	$Y_{SVT / dia}$ (gSVT/dia)
Glicose (C/N1)	23,6	13,6	0,48
Óleo de Soja	13,3	11,3	*
Acetato/Propionato/Butirato	9,0	13,3	0,44
Glicose (C/N2)	5,9	6,8	0,77
Glicose/Extrato de Carne/Óleo de Soja	5,7	2,7	0,59
Glicose (C/N3)	2,6	3,4	1,32
Extrato de Carne	1,4	2,1	1,07
Glicose (anaerobiose estrita)	0	13,6	0,24

*houve perda de biomassa do sistema

Figura 6.6. Quantidade de EPS produzido nas diferentes condições nutricionais, produção diária de biomassa e relação C/N.

Pela Tabela 6.3 e pela Figura 6.6 constata-se que quando o reator foi alimentado com glicose na condição C/N1 ocorreu maior produção de EPS. Em muitos estudos realizados na otimização da produção de EPS verifica-se que a frutose, a sacarose e a glicose favorecem a produção de EPS.

De acordo com Sutherland (1990³ apud Kornmann *et al.*, 2003), a construção de blocos de polissacarídeos, presente na maioria dos EPS, pode ser uma maneira de armazenar energia na forma de monossacarídeos. Os nucleotídeos de açúcar ativado (açúcar-UDP) são sequencialmente adicionados a carregadores de lipídios para formar unidades repetidas de polissacarídeos. Este último passo envolve o transporte de unidades repetidas através da membrana celular para a camada externa e a conseqüente a polimerização do EPS

A Figura 6.7 apresenta os perfis temporais de DQO, AVT, potencial redox, concentração de glicose e proteína ao longo do ciclo para as condições operacionais avaliadas. Quando o reator foi alimentado com glicose, nas diferentes relações C/N, (Figuras 6.7 a, 6.7 b e 6.7 c), observa-se que o comportamento do potencial redox difere das outras condições. Há o decaimento dos valores enquanto a glicose é degradada e após este intervalo de tempo, os valores aumentam. Este comportamento pode estar relacionado com a produção de EPS a partir da glicose, que é diretamente incorporada pelos microrganismos e liberada na forma de exopolissacarídeos. Quando o reator é alimentado somente com os ácidos graxos voláteis, intermediários da degradação anaeróbia, o potencial redox decai e se mantém constante, comprovando, portanto, que o aumento do potencial redox, observado nas Figuras 6.8a, 6.8b e 6.8c, após a degradação da glicose está relacionado com outros componentes obtidos a partir da glicose, que não são os ácidos graxos voláteis.

Quando o ASBBR foi alimentado com os ácidos acético, butírico e propiônico, intermediários da digestão anaeróbia, e mesma razão C/N1 (13,6 gC/gN), a produção de EPS foi menor que quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1. De acordo com Benziman & Burger-Rachamimov (1962); Schramn *et al.* (1957); Weinhouse & Benziman (1974); Weinhouse & Benziman (1976), as fontes de carbono para a produção de EPS podem ser hexose, hexanoatos, compostos de três carbonos, como piruvato, glicerol e dihidroxiacetona, e de quatro carbonos, como os ácidos dicarboxílicos do ciclo do citrato (ciclo de Krebs). Porém, quando o substrato é glicose, a conversão de fosfato-hexose é direta, uma vez que não é necessária a união de unidades menores de carbono para formar a hexose.

Outro fator importante observado é que a presença de quantidades pequenas de oxigênio no substrato e na superfície do reator (interface água-ar) favoreceu a produção de EPS no ASBBR, pois quando o reator foi alimentado com glicose em condição estritamente anaeróbia, não houve produção de EPS.

³ Sutherland, I. W. (1990). Bio/Technology of microbial exopolysaccharides, vol. 9. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Quando o reator foi alimentado com óleo de soja, constatou-se que a produção de EPS foi a segunda maior. Na Figura 6.8f, pode-se observar que o valor do potencial redox inicial foi de 0 mV caindo para -200 mv e mantendo-se constante. O valor médio foi maior que os valores observados nas outras condições. Os valores altos são devidos à maneira em que o substrato era preparado, pois para que o óleo fosse emulsinado com detergente, o substrato era preparado no liquidificador, permitindo assim maior aeração do meio líquido. O óleo é um composto de difícil biodegradação, porém de acordo com Mackie *et al.* (1991), os lipídios são hidrolisados, por bactérias fermentativas, com a liberação de ácidos graxos de cadeias longas e médias, glicerol e unidades de galactose que, posteriormente, são fermentados para ácidos graxos voláteis. Como, nesta condição, não se observou produção de ácidos voláteis, devido ao curto tempo de ciclo, os lipídios podem ter sido fermentados até ácidos graxos de cadeias longas ou médias, glicerol e galactose. Portanto, a produção de EPS, nesta condição, foi favorecida pelas fontes de carbono (glicerol e galactose), pela alta razão C/N e pela presença de oxigênio no meio líquido.

Figura 6.7: Perfis temporais de DQO, das fontes de carbono, ácidos voláteis totais (AVT) e potencial redox obtidos no ASBBR nas diferentes condições nutricionais: (a) glicose na razão C/N1; (b) glicose na razão C/N2; (c) glicose na razão C/N3; (d) Ácidos acético, propiônico e butírico; (e) glicose borbulhando N₂, (f) Óleo de Soja, (g) Extrato de Carne e (h) Glicose/Extrato de Carne/Óleo de Soja.

Nos trabalhos realizados por Borges *et al.* (2004), Orra *et al.* (2004) e Ratusznei *et al.* (2003b), nos quais o reator foi alimentado com substrato sintético contendo carboidrato, proteína e lipídios, também verificou-se a produção significativa de EPS, sem, no entanto, proceder-se a quantificação. Esses trabalhos estavam relacionados com a estratégia de alimentação do reator e, em algumas condições com elevado tempo de enchimento, parte da biomassa ficava exposta ao ar, ou, então, utilizava-se a recirculação do líquido, que também permitia condições de microaerofilia. Estes estudos permitem concluir que, de certa forma, a biomassa tinha contato com pequena quantidade de oxigênio, o que poderia estar favorecendo a produção do EPS.

Além da fonte de carbono e das condições de microaerofilia serem importantes na produção de EPS, de acordo com Margaritis & Pace (1986), a quantidade de substrato convertida pelas células a polímero depende da composição do meio de crescimento. Geralmente, meios contendo altas razões entre C/N podem favorecer a produção de exopolissacarídeos. Esta hipótese pode ser confirmada neste trabalho, pois quando o ASBBR foi alimentado com glicose nas razões C/N2 e C/N3 e com extrato de carne, fonte de carbono rica em proteína, constatou-se que a produção de EPS foi menor.

Quando a razão C/N no substrato é alta, as bactérias podem estar desviando a rota metabólica do crescimento celular para a produção de EPS, uma vez que não há nitrogênio suficiente para as sínteses protéicas e a produção de EPS, processo que não envolve muitas proteínas, e é uma maneira de armazenar energia na forma de polissacarídeos. Segundo Ross *et al.* (1991), a produção de celulose pela *A. xylinum* é condicional ao processo oxidativo concorrente, mas não é dependente da rede de síntese protéica. Este fato se tornou mais evidente quando células lavadas continuaram sendo capazes de produzir celulose em condições de privação de nitrogênio e supridas com fonte de carbono adequada. Mengistu *et al.* (1994) sugerem que a deficiência de um nutriente essencial, como por exemplo, o nitrogênio, pode limitar o crescimento celular e a energia proveniente do excesso de carbono é então usada para a biossíntese de polissacarídeos.

Na Tabela 6.3 ou Figura 6.6 pode-se verificar que o crescimento da população microbiana presente nas espumas, expressa em gSVT/ dia, é maior quanto menor é a razão C/N. Confirmando, desta forma, a afirmativa feita por Mengistu *et al.* (1994), pois na presença de quantidades suficientes de nitrogênio no substrato, verifica-se o crescimento bacteriano e uma menor produção de EPS.

Os resultados obtidos sugerem que a produção de EPS no ASBBR é favorecida pela alta razão C/N, pela fonte de carbono, principalmente hexoses, e condições de microaerofilia.

A presença de pequenas quantidades de oxigênio dissolvido no meio líquido é obtida, principalmente durante a alimentação e descarga do sistema e pela interface ar-líquido, uma vez que o reator não é hermeticamente vedado. Os microrganismos responsáveis pela produção de EPS podem ser facultativos e na presença de pequenas quantidades de oxigênio e em altas razões C/N podem desviar a rota metabólica para a produção dos polímeros.

6.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO MATERIAL POLIMÉRICO

Através de testes enzimáticos, utilizando a enzima celulase, constatou-se que o principal EPS que compõe a matriz polimérica é celulose.

A celulose pode ser sintetizada por vários gêneros de bactérias, dentre eles, os mais estudados são do gênero *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, e *Sarcina*. Estas podem ser gram-negativas, obrigatoriamente aeróbias, ou alternativamente anaeróbias gram-positivas, como é o caso de algumas espécies do gênero *Sarcina* (Ross *et al.*, 1991). A produtora mais eficiente é a bactéria gram-negativa, acidogênica *Acetobacter xylinum*, a qual vem sendo aplicada como microrganismo modelo para estudos aplicados e básicos sobre produção de celulose (Cannon & Anderson, 1991).

As Figuras 6.8 e 6.9 apresentam micrografias dos principais tipos morfológicos sob microscopia óptica comum e contraste de fase de amostras de EPS obtidas no ASBBR nas diferentes condições nutricionais.

Diferentes morfologias microbianas predominaram nas amostras de EPS produzidas nas diferentes condições nutricionais. Quando o reator foi alimentado com glicose na condição C/N1, predominaram bacilos longos com extremidades arredondadas e bacilos com grânulos intracelulares (Figura 6.8a e 6.8b). Quando o reator foi alimentado com glicose na condição C/N2 observou-se a predominância de bacilos de formas variadas gram-positivos e arranjo de cocos gram-negativos (Figura 6.8c e 6.8d). Quando o reator foi alimentado com glicose na condição C/N3 observou-se predominância de bacilos gram-negativos e gram-positivos (Figura 6.8e e 6.8f). Bacilos finos com extremidades arredondadas gram-negativos prevaleceram quando o reator foi alimentado com extrato de carne (Figura 6.9a e 6.9b). Bacilos longos com grânulos intracelulares gram-negativos predominaram quando o reator foi alimentado com óleo de soja (Figura 6.9c e 6.9d). Quando o reator foi alimentado com o

substrato contendo glicose/ extrato de carne/ óleo de soja predominaram bacilos pequenos gram-positivos e gram-negativos (Figura 6.9e e 6.9f).

Estes resultados sugerem que diferentes tipos de bactérias, presentes no ASBBR, foram capazes de produzir celulose. No entanto, a biogênese da celulose de certas bactérias depende da fonte de carbono, da razão C/N e da presença de oxigênio dissolvido no meio líquido. É importante ressaltar que a celulose foi o principal polímero presente no reator, porém outros exopolissacarídeos podem compor o material polimérico. De acordo com Ross *et al.* (1991), muitas bactérias produtoras de celulose também produzem outros polímeros extracelulares, mas a relação entre esses polímeros e a celulose ainda não é clara. Além disso, como a estrutura de biofilmes é muito complexa e envolve vários micro-ambientes é possível que exista heterogeneidade entre diferentes subpopulações de algumas espécies de bactérias. Algumas podem produzir um exopolímero simples, enquanto outras, em diferentes partes do mesmo biofilme, podem formar diferentes polímeros ou mais que um polissacarídeo que podem exercer diferentes funções (Sutherland, 2001a).

Quando o reator foi alimentado com glicose/extrato de carne/ óleo de soja separou-se material para isolar uma cepa bacteriana responsável pela produção da celulose, cujos resultados estão apresentados no item 6.4.1.

Figura 6.8. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e coloração-Gram, com o aumento de 1500 vezes, referentes às amostras de EPS obtidas no ASBBR alimentado com glicose nas diferentes relações C/N: (a) e (b) glicose C/N1; (c) e (d) glicose C/N2; (e) e (f) glicose C/N3.

Figura 6.9. Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase e coloração-Gram, com aumento de 1500 vezes, referentes às amostras de EPS obtidas no ASBBR alimentado com diferentes fontes de carbono: (a) e (b) extrato de carne; (c) e (d) óleo de soja; (e) e (f) glicose/extrato de carne/óleo de soja.

6.4.1. Isolamento e Identificação do Microrganismo Responsável pela Produção de Celulose quando o ASBBR foi Alimentado com Glicose/Extrato de Carne/Óleo de Soja.

Para isolar a cepa bacteriana responsável pela produção de celulose no ASBBR quando alimentado com glicose/extrato de carne/óleo de soja, baseou-se no artigo de Zogaj *et*

al. (2003). Os pesquisadores isolaram bactérias do intestino humano, capazes de produzir celulose utilizando o corante Congo Red (CR) que é absorvido por polissacarídeos. Quando o polissacarídeo é celulose, as colônias de bactérias produtoras de celulose apresentam coloração *pink* ou vermelho vivo, facilitando, desta forma, a seleção das colônias. Além disso, utilizou-se o meio de cultura Luria Bertani (LB) sem a adição do cloreto de sódio, que induz a biossíntese de celulose, com CR e Comassie Brilliant blue, de acordo com a metodologia descrita por Römmling & Lünsdorf (2004) que caracterizaram a celulose produzida pela *Salmonella typhimurium*.

Na primeira etapa do isolamento, cultivo de microrganismos presentes na amostra de espumas e do polímero, em meio sólido, já se pôde observar a presença das cepas semelhantes às produtoras de celulose segundo Zogaj *et al.* (2001), coloração vermelho vivo, borda rugosa e aspecto seco e áspero (Figura 6.10). O meio de cultura preparado mostrou-se seletivo e diferencial, no qual observou-se o desenvolvimento de colônias bacterianas com morfologias variadas e também colônias de fungos. Nesta etapa, dentre as dezesseis placas iniciais, somente aquelas provenientes das amostras do polímero, da espuma da superfície do cesto e do meio do cesto apresentaram colônias com coloração rosa avermelhada.

É importante ressaltar que a formação das colônias das cepas isoladas foram observadas já no segundo dia de cultivo e seu desenvolvimento foi acompanhado até a segunda etapa dos ensaios de isolamento.

Figura 6.10. Primeira etapa do isolamento em meio sólido contendo os corantes Congo red e Comassie blue em diferentes diluições. As colônias de coloração avermelhada são de espécies capazes de produzir celulose. Porém, isolou-se a espécie cuja as características da colônia era de borda rugosa de aspecto seco e áspero; colônia indicada pela seta.

Na segunda etapa dos ensaios de isolamento, na qual as culturas selecionadas na primeira etapa foram cultivadas em meio líquido sem agitação, observou-se a formação de biofilme na interface líquido-ar e em alguns casos, devido à manipulação, o biofilme descia para o fundo do recipiente (Figura 6.11). Através do teste enzimático com celulase, constatou-se que o biofilme formado na superfície do líquido era celulose.

Figura 6.11. Segunda etapa do isolamento, cultivo das culturas selecionadas na primeira etapa em meio líquido. Formação do biofilme na interface líquido/ar.

As culturas em meio líquido, nas quais se verificava a formação do biofilme, eram novamente cultivadas em meio sólido contendo os corantes. Esta alternância de cultivo em meio líquido e sólido das cepas selecionadas foi feita até se obter cultura pura. A cultura pura do microrganismo isolado foi obtida a partir das amostras do polímero coletado na superfície do reator. Os microrganismos presentes nas amostras das espumas do reator não superaram as etapas de alternância entre meios sólido e líquido. Geralmente ao se passar a colônia de um meio para o outro elas cessavam seu crescimento.

Após a obtenção da cultura pura foi feita a caracterização morfológica por microscopia óptica comum da cultura em suspensão, na qual se constatou morfologia semelhante a bacilos ou coco bacilos (Figura 6.12a), Gram positivos com alguns segmentos Gram negativos em culturas velhas (Figura 6.12b e 6.12c), Neisser negativo (Figura 6.12d) e PHA negativos (Figura 6.12e). Observando as Figuras 6.9e e 6.9f, referentes às análises de microscopia óptica, realizadas com a amostra do EPS coletado do reator nessa mesma condição, verifica-se que as morfologias predominantes encontradas no reator foram semelhantes às da cepa isolada. Portanto, a hipótese de que outras espécies presentes no reator são capazes de produzir celulose se confirma, uma vez que se constatou morfologias

diferentes predominantes na análise microscópica do EPS nas diferentes condições.

Figura 6.12. (a) Observações morfológicas sob microscopia de contraste de fase da cultura isolada; (b) coloração Gram da cultura jovem; (c) coloração Gram da cultura em estágio tardio de desenvolvimento - presença de segmentos Gram negativos; (d) coloração Neisser negativa; (e) coloração PHA negativa.

O seqüenciamento do DNAr 16S da cepa isolada, após alinhamento e comparação com as seqüências do banco de dados eletrônico NCBI-database, mostrou 96% de similaridade com o gênero *Agromyces* (número de identificação em tal banco de dados: DQ 311007). A seqüência de nucleotídeos obtida, com 667 pares de base (PB) foi:

TAGCCTTGCGGCCGTA TCCCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTACGACACGGAAACCGTGGA
 AAGGTCCCCACATCTAGCGCCCAACGTTTACGGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCT
 CCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAAGTGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCTCC
 TGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCTACACCACTCAAGTCTGCCCCG
 TACCACTGCAGGCTAGAGGTTGAGCCTCTAGTTTTTCACAGTCAGACGCGACAAACCCGCCTACGA
 GCTTCTTTACGCCCCAATAATTCCGGACACGCTCGGACCCTACGTATTACCCGCGGCTGCTGGGCAC
 GTAGTAGCCGGTCTTTTCTGTAGGTATCGCCACCCGAAGGATTCTTCCTACTAAAAGCGGGTTAAA
 AACCGAAGGCCGTCATCCGCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGGTGCAATATTCC
 CCAATGGCTGCCTCCGTAAGAGTCTGGGCCGTGTCTCATCCCAGTGTGGCCGGTCACCTCTCAGG
 CCGGGTAACCGTCGAAGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAG

O DNAr 16S, utilizado nos procedimentos de identificação da cepa isolada, é uma sequência altamente conservada de nucleotídeos e por isso ideal para a realização de estudos de inferência de relações filogenéticas. Assim os resultados obtidos com o sequenciamento adquirem certo grau de confiabilidade quanto ao gênero identificado.

Os resultados obtidos com as análises microscópicas e de coloração estão de acordo com o descrito por Holt *et al.* (1994) para o gênero *Agromyces*: Células compostas de ramificações, elementos filamentosos e delgados com diâmetro de 0,3-1,0 µm nas fases iniciais de desenvolvimento, fragmentando-se em coco bacilos e células irregulares em culturas mais velhas. Indivíduos Gram positivos, com segmentos Gram negativos em culturas mais velhas, imóveis, sem formação de endósporos. Geralmente encontradas no solo e algumas espécies, tais como *Agromyces luteolus*, *Agromyces rhizospherae* e *Agromyces brachium*, foram isoladas a partir de ambientes ricos em matéria orgânica e com elevada taxa de decomposição, em rizosfera de plantas de manguezais (Takeuchi & Hatano, 2001).

As bactérias do gênero *Agromyces* crescem em meio aeróbio ou em condições de microaerofilia e, em condições anaeróbias, o crescimento é muito lento (Holt *et al.*, 1994). A cepa bacteriana isolada no presente trabalho apresentou reação oxidase negativa e reação catalase positiva sugerindo a adaptação à condição de microaerofilia existente no reator. Gledhill & Casida (1969), descreveram o gênero como sendo composto por microrganismos intermediários entre *Actinomyces* e *Nocardia*, predominantemente catalase negativos. Entretanto, Zgurskaya *et al.* (1992) descreveram cepas, isoladas do solo, que mostravam reações catalase e oxidase positivas, e que posteriormente foram classificadas como pertencentes à espécie *Agromyces cerinus*. A avaliação nas características gerais do gênero demonstra heterogeneidade entre as espécies que o compõem.

De acordo com o site do DSMZ (German Resource Centre for Biological Material) há

apenas vinte espécies conhecidas e registradas do gênero *Agromyces*. De todas as espécies conhecidas, não se encontram na literatura dados relacionados à produção de EPS a partir de espécies do gênero *Agromyces*. Como o grau de similaridade da cepa isolada foi de apenas 96% com a espécie *Agromyces* sp. *Xb-3*, abaixo de 97%, valor mínimo indicado para definir a espécie da bactéria, tudo indica que a cepa isolada pode ser uma nova espécie. Porém, muitos estudos ainda devem ser feitos para uma melhor caracterização desta espécie. Caso este fato se confirme, mais uma espécie de bactéria capaz de produzir celulose é descoberta e muitos estudos podem ser realizados, de forma a otimizar a produção da celulose e suas aplicações.

Foram feitos testes comparativos, através de análises de DGGE, com amostras microbiologias do EPS coletado na superfície do cesto em todas as condições de alimentação do reator com o microrganismo isolado, para verificar se a espécie isolada estava presente nas outras condições. Porém, os resultados obtidos não permitiram que se tirasse nenhuma conclusão, pois a banda de DGGE relativo à cultura pura não estava presente em nenhuma das condições, nem mesmo na condição em que o microrganismo foi isolado. Portanto, estes resultados não serão apresentados nesta Tese.

6.5. ANÁLISES DO MATERIAL POLIMÉRICO

6.5.1. Testes Enzimáticos

Devido ao EPS produzido no ASBBR em todas as condições nutricionais, apresentar consistência gelatinosa e aparência semelhante à celulose bacteriana, optou-se por fazer o teste com a enzima celulase.

Pelos testes enzimáticos, utilizando a enzima celulase, constatou-se que o EPS produzido no ASBBR em todas as condições é composto basicamente por celulose. Foram realizados ensaios com as amostras dos polímeros extracelulares produzido nas quatro condições adicionando-se quantidades iguais de EPS e celulose microcristalina (origem vegetal), em frascos separados, com quantidades iguais de celulose em tampão fosfato 0,1 M e pH de 6,5. Em intervalos de 15 minutos, alíquotas de cada amostra eram retiradas e quantificava-se glicose (monômero da celulose). Verificou-se que as concentrações de glicose iam aumentando com o tempo em todas as amostras, incluindo a amostra com celulose microcristalina. A quantidade de glicose quantificada nos testes realizados com os EPS

obtidos em todas as condições, inclusive na celulose microcristalina, após 5 horas de agitação foi em torno de 500 mg/L.

A estrutura da celulose se forma pela união de moléculas de β - glicose através de ligações β -1,4-glicosídica (Figura 6.13), o que a faz ser insolúvel em água. A celulose é um polímero de cadeia longa, de massa molecular variável, com fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, com um valor mínimo de $n=200$.

Figura 6.13. Estrutura linear da celulose.

Além dos testes com celulase, foram feitas, também: análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), para comparar a composição dos polímeros produzidos em diferentes condições nutricionais através de grupos funcionais; espectroscopia de raio-X para verificar o arranjo cristalino desse material celulósico e observações em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas para verificar a disposição da comunidade microbiana entre o material polimérico.

6.5.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica usada na análise qualitativa e quantitativa de substâncias químicas “in vivo” (Mantsch & Chapman, 1996). A espectroscopia de infravermelho é uma das espectroscopias vibracionais cujas bandas espectrais são função principalmente da força das ligações químicas e das massas dos átomos envolvidos nestas ligações. Por isso, essa técnica é extremamente útil para a identificação de grupos funcionais das moléculas orgânicas com ligações O-H, N-H, ligações C=O de diferentes grupos funcionais como carboxilas, carbonilas, amidas etc., que estão nos principais constituintes dos seres vivos como proteínas, açúcares, DNA, ácidos graxos, entre outros.

A partir dos espectros de FTIR foi possível analisar se os polímeros extracelulares,

produzidos em diferentes condições nutricionais, possuíam diferentes composições químicas.

Na Figura 6.14 estão os espectros de FTIR dos polímeros extracelulares produzidos em diferentes condições nutricionais e da celulose microcristalina de origem vegetal. Comparando, de maneira geral, os espectros de FTIR dos polímeros produzidos nas diferentes condições nutricionais possuem, basicamente, a mesma estrutura. No entanto, quando comparados com o espectro da celulose, verifica-se que os EPS apresentam bandas de absorção nas mesmas regiões. No entanto, as bandas são mais largas e difusas, com principal atenção na região de 1650 e 1550 cm^{-1} que apresenta duas bandas intensas, não observadas no espectro da celulose. Essas bandas são características de grupos amida, devido ao estiramento da ligação C-N e deformação angular da ligação N-H, ambas dos grupos peptídicos de proteínas, podendo indicar a presença de microrganismos. De acordo com Sócrates (2001), espectros de substâncias cristalinas contêm, geralmente, bandas estreitas e discretas, enquanto os não cristalinos contêm bandas largas e difusas. Quando o polímero é de baixa cristalinidade ou amorfo, várias mudanças espectrais são observadas, as bandas se alargam e muitas vezes novas bandas aparecem. As novas bandas são devidas aos movimentos vibracionais de diferentes conformações ou configurações rotacionais das partes das cadeias do polímero presente na fase desordenada, amorfa.

Figura 6.14. Espectros de FTIR dos EPS produzidos nas diferentes condições nutricionais.

Após as primeiras análises de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura constatou-se a presença de muitos microrganismos nas amostras, que poderiam estar interferindo nos resultados das análises. Para minimizar essas interferências, foram feitos os testes, descritos por Liu & Fang (2002), para purificar as amostras, ou seja, retirar os microrganismos de modo a se obter resultados reais nas análises.

Os resultados dos testes para a purificação do EPS, no qual se constatou que não houve a purificação do material polimérico, estão apresentados no Apêndice D.

6.5.3. Espectroscopia de Raio-X

A celulose bacteriana é quimicamente idêntica à celulose de planta, porém as estruturas e as propriedades macromoleculares diferem umas das outras.

A morfologia macroscópica da celulose bacteriana depende estritamente das condições da cultura (Yamanaka *et al.*, 2000). Em condições estáticas, as bactérias acumulam celulose em camadas na interface ar/líquido, rico em oxigênio. Em culturas agitadas a celulose produzida forma grânulos.

A estrutura da celulose pode ser cristalina ou não cristalina (amorfa). A celulose cristalina tem duas alomorfias distintas, a celulose I e II. Na celulose I a orientação da cadeia glicana é paralela e é sintetizada pela maioria das plantas e também pela *A. xilinum*; na celulose II, a orientação é antiparalela. Ambas são sintetizadas na natureza, no entanto, a celulose I é predominante.

As análises de difração de raio-X foram usadas para caracterizar os efeitos das diferentes condições nutricionais no arranjo cristalino das cadeias glicanas.

A Figura 6.15 apresenta os espectros de raio-X da celulose microcristalina, de origem vegetal, e das amostras de EPS produzidos nas diferentes condições nutricionais: glicose C/N1, glicose C/N2, glicose C/N3, extrato de carne, e óleo de soja, glicose/extrato de carne/óleo de soja.

Nos espectros de difração de raio-X pode-se observar que o EPS produzido a partir da glicose, nas três razões C/N, e de glicose/extrato de carne/óleo de soja possui o arranjo cristalino diferente do EPS produzido nas outras condições, apresentando amplitude máxima somente em $2\theta = 22^\circ$. Nos espectros de raio-X dos EPS produzidos a partir do extrato de carne e do óleo de soja observa-se amplitudes máximas em $2\theta = 12^\circ$ e 22° . No espectro da celulose microcristalina há amplitudes máximas em $2\theta = 15^\circ$, 22° e 34° .

Contudo, não é possível verificar as alomorfias do EPS celulósico, produzido nas diferentes condições nutricionais, e nem o arranjo entre as microfibrilas se são cristalinos ou amorfos, uma vez que se constatou que as amostras continham microrganismos e as proteínas da parede celular podem interferir nos resultados. Tudo que se pode afirmar é que os EPS produzidos a partir de substratos contendo glicose possuem alomorfias diferentes dos EPS produzidos a partir do extrato de carne e do óleo de soja.

Figura 6.15. Espectros de difração de raio-X da celulose microcristalina e dos EPS produzidos nas diferentes condições nutricionais.

Os resultados dos testes realizados para a purificação dos materiais poliméricos seguindo as metodologias descritas por Skairi *et al.* (1997) e Bertocchi *et al.* (1997) não apresentaram nenhuma modificação nas estruturas dos EPS. Os resultados estão apresentados no Apêndice D.

6.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 6.16 apresenta as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) na superfície dos polímeros extracelulares produzidos no ASBBR na diferentes fontes de carbono: glicose C/N1, extrato de carne, e óleo de soja.

No polímero produzido a partir da glicose na razão C/N1, pode-se observar que a superfície é compacta composta por microrganismos, com algumas microfibrilas de celulose (Figura 6.16a). A morfologia predominante observada é composta, basicamente, de bacilos (Figura 6.16 b).

As superfícies dos polímeros produzidos a partir do extrato de carne e a partir do óleo de soja apresentam estruturas reticuladas (Figuras 6.16c e 6.16f), típicas de celulose bacteriana. Os microrganismos predominantes observados nas Figuras 6.16d e 6.16f apresentam forma de cocos, porém, no polímero produzido a partir do óleo de soja, o agrupamento é diferente do polímero produzido a partir do extrato de carne. No polímero produzido a partir do extrato de carne, os microrganismos estão aparentemente mais distribuídos ao longo da superfície e no polímero produzido a partir do óleo de soja os cocos estão agrupados.

Sowden & Colvin (1978) estudaram a microestrutura de colônias de *Acetobacter xylinum*, principal bactéria estudada na produção de celulose. Comparando-se as Figuras 6.16c e 6.16f com a Figura 6.17 verificam-se muitas semelhanças nas estruturas fibrilares da celulose e como as microfibrilas ficam fixadas nas bactérias.

Figura 6.16. Micrografias de MEVdos polímeros extracelulares formados no reator em diferentes fontes de carbono: (a) glicose na razão C/N1, com aumento de 5000 vezes e (b) glicose na razão C/N1, com aumento de 10000 vezes; (c) extrato de carne (proteína), com aumento de 5000 vezes e (d) extrato de carne, com aumento de 10000 vezes, (e) óleo de soja (lipídio) , com aumento de 5000 vezes e (f), óleo de soja, com aumento de 10000 vezes.

Figura 6.17. Micrografias de MEV, com aumento de 10.500 vezes e dimensão da barra de 1 μm , das colônias de *A. xylinum*, microfibrilas de celulose (setas brancas) e pedaços de celulose (seta preta).

Fonte: Sowden & Colvin (1978).

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nesse trabalho de pesquisa, pode-se concluir que:

- O ASBBR operou de maneira estável em todas as condições nutricionais, obtendo eficiências na remoção da matéria orgânica, na forma de DQO, acima de 80%. Porém, quando o reator foi operado com glicose na razão C/N1 (13,6 gC/gN) verificou-se a instabilidade operacional devido à grande produção de EPS, dificultando a transferência de massa da fase líquida para a fase sólida e desbalanceando do processo anaeróbio.
- A produção de EPS foi favorecida pela alta razão C/N, uma vez que se constatou que quando o reator foi alimentado com glicose nas razões C/N2 (6,8 gC/gN), C/N3 (1,4 gC/gN) e extrato de carne (2,8gC/gN), razões menores que C/N1 (13,6 gC/gN), houve menor produção de EPS.
- Condições de microaerofilia foi outro fator importante no favorecimento da produção de EPS no ASBBR, pois quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1(13,6 gC/gN) em condições de anaerobiose estrita não houve a produção de EPS.
- Além da alta razão C/N e de condições de microaerofilia, a fonte de carbono também foi outro fator importante. De maneira geral, frutose, sacarose, galactose e glicose favorecem a produção de EPS, e nesse trabalho verificou-se que houve maior produção de EPS quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1

(13,6 gC/gN) e com óleo de soja, cujo um dos produtos da fermentação é a galactose.

- O EPS produzido em todas as condições nutricionais foi composto principalmente por celulose.
- A partir dos espectros de FTIR constatou-se que a composição química dos polímeros, produzidos nas diferentes condições nutricionais, não foi influenciada pelas fontes de carbono.
- Os EPS produzidos a partir de substratos contendo glicose apresentaram alomorfismos diferentes dos EPSs produzidos a partir do extrato de carne e do óleo de soja. Porém, não se pôde obter o grau de cristalinidade, pois as amostras continham microrganismos.
- Por meio de microscopia óptica comum constatou-se que diferentes morfologias predominaram nos EPS produzidos nas diferentes condições nutricionais; indicando que vários tipos de bactérias, capazes de produzir celulose, estão presentes no ASBBR e que estas dependem das condições do meio para produzir o polímero extracelular.
- Uma das espécies isoladas, a partir o material polimérico extraído do ASBBR quando alimentado com glicose/extrato de carne/óleo de soja, capaz de produzir celulose pertence ao gênero *Agromyces*. Não há relatos, na literatura, de nenhuma espécie pertencente ao gênero da *Agromyces* capaz de produzir celulose, e nenhum tipo de EPS. Além disso, o baixo grau de similaridade com a espécie reportada no sequenciamento, indica que há a possibilidade do microrganismo isolado pertencer a uma nova espécie do gênero *Agromyces*

8. SUGESTÕES

Para prosseguimento das pesquisas nessa área, com base nos resultados obtidos, sugere-se:

- Desenvolver metodologia para a purificação dos EPS produzidos no ASBBR.
- Realizar estudos de caracterização do EPS, tais como a reologia do material polimérico, ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia, para verificar se há na cadeia polimérica algum grupo funcional.
- Avaliar a possibilidade de reaproveitamento dos EPS produzidos nos processos de tratamento anaeróbio e verificar a possibilidade de desenvolver materiais com aplicações práticas.
- Fazer a caracterização da espécie isolada para verificar se realmente é uma nova espécie do gênero *Agromyces*.
- Realizar estudos de caracterização da celulose produzida pela espécie isolada e de otimização na produção para fins aplicáveis.
- Avaliar o desempenho do ASBBR no tratamento de águas residuárias contendo compostos recalcitrantes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison, D.G. and Sutherland, I.W. (1987). The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Journal of General Microbiology*, **133**: 1319-1327.
- Allison, D.G. (1998). Exopolysaccharide production in bacterial biofilms. *Biofilm Journal*, **3** (paper 2): *Online Journal* – URL:<http://www.bdt.org.br/bioline/bf>.
- Antunes, L.C.M. (2003). A linguagem das bactérias. *Ciência Hoje – Microbiologia*, **33** (193): 16-20.
- APHA, AWAA, and WPCF (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 18^a ed., American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, USA.
- Argenio, D.A. and Miller S. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology*, **150**: 2487-2502.
- Bae, S.O., Shoda, M. (2005). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Biotechnological Products and Process Engineering*, **67**: 45-51.
- Bagley, M. and Brodtkorb, T.S. (1999). Modeling microbial kinetics in an anaerobic sequencing batch reactor: model development and experimental validation. *Water Environmental Research*, **71**: 1320-1332.
- Beccari, M., Bonemazzi, F., Majone, M., Riccardi, C. (1996). Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Water. Research*, **30** (1): 183-189.

- Benziman, M., Burger-Rachamimov, H. (1962). Synthesis of cellulose from pyruvate by succinate-grown cells of *Acetobacter xylinum*. *Journal of Bacteriology*, **84**: 625-630.
- Bertochi, C., Delneri, D., Signore, S., Weng, Z., Bruschi, C.V. (1997). Characterization of microbial cellulose from a high-producing mutagenized *Acetobacter pasteurianus* strain. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subject*. **1336** (2): 211-217.
- Borges, A.C., Siman, R.R., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M., Foresti, E., Borzani, W. (2004). Stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass: a behavior study when submitted to different fill times. *Water Science and Technology*, **49** (11-12): 311-318.
- Brito A.G., Rodrigues A.C., Melo F.L. (1997). Feasibility of a pulsed sequencing batch reactor with anaerobic aggregated biomass for the treatment of low strength wastewaters. *Water Science and Technology*, **35**: 193-198.
- Camargo, E.F.M., Canto, C.S.A., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Zaiat, M., Borzani, W. (2002). Treatment of low-strength wastewater using immobilized biomass in a sequencing batch external loop reactor influence of the medium superficial velocity on the stability and performance. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **19** (3): 267 - 275.
- Cannon, R.E., Anderson S.M. (1991). Biogenesis of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Microbiology*, **17** (6):435-447.
- Cescutti, P.; Toffanin, R.; Polleselo, P., Sutherland, I.W. (1999). Structural determination of the acidic exopolysaccharide produced by a *Pseudomonas* sp. strain 1.15. *Carbohydrate Research*, **315**: 159-168.
- Costerton, W.J., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin, H.M.S. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, **49**: 711-745.
- Cubas, S.A., Foresti E., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M. (2001). Influence of the liquid-phase mass transfer on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass. In *Proceedings of the 9th World Congress Anaerobic Digestion - Anaerobic Conversion for Sustainability 2001*, Antuérpia, Bélgica. Vol. 1, 847-852.
- Cubas, S.A., Foresti, E., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M. (2004). Influence of liquid-phase mass transfer on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass. *Biochemical Engineering Journal*, **17**: 99-105.
- Dague R.R., Habben C.E., Pidaparti S.R. (1992) Initial studies on the anaerobic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, **26**: 2429-2432.

- Danesi, E.D.G., e Wosiacki, G. (2005). Biblioteca Virtual da Universidade de São Paulo. Disponível em:<http://www.bibivirt.futuro.usp.br/textos/hemeroteca/cta/vol18n1/cta18n1_25.pdf>. Acesso em 19 mar 2006.
- Davey, M.E. and O'Toole, G. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64** (4): 847-867.
- Davidson, I.W. (1978). Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture. *FEMS Microbiology Letters*, **3**: 347-349.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., Geesey, G.G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (4): 1181-1186.
- Deinema, M.H., and Zevenhuizen, L.P.T.M. (1971). Formation of cellulose fibrils by Gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. *Archive für Mikrobiologie*, **78**: 42-57.
- Del Nery, V. (1987). *Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos; Universidade São Paulo, Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil com ênfase em Hidráulica e Saneamento, 187p.
- Dilallo, R., Albertson, O.E. (1961). Volatile Acids by Direct Titration. *Journal WPCF*, **33** (4): 356-365.
- Fang, H.H.P. and Jia, X.S. (1996). Extration of extracellular polymer from anaerobic sludges. *Biotechnology Techniques*, **10** (11): 803-808.
- Frølund, B., Griebe, T., Nielsen, P. H. (1995). Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**: 755-761.
- Fuscone, R. (2005). *Aspectos metabólicos, fisiológicos e taxonômicos de actinomiceto produtor de exopolissacarídeos, provenientes de águas subterrâneas contaminadas (São Carlos, SP)*. São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas com ênfase em Ecologia e Recursos Naturais, 112p.
- Gamar-Nourani, L.; Blondeau, K.; Simonet, J.M.(1998). Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*, **85**: 664-672.

- Gledhill, W.E. e Casida, L.E.JR., (1969). Predominant catalase-negative soil bacteria1. III. *Agromyces*, gen. n., microorganisms intermediary to *Actinomyces* and *Nocardia*. *Applied Microbiology*, 18 (3): 340-349.
- Griffiths, R.I.; Whiteley, A.S.; O'Donnell, A.G.; Bailey, M.J. (2000). Rapid method for extraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5488-5491.
- Hirl, P.J., and Irvine, R.L. (1997). Reductive chlorination of perchloroethylene using anaerobic sequencing batch biofilm reactors (AnSBBR). *Water Science and Technology*, **35**: 49–55.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T.b & Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9^a ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 787 p.
- Jenkins, D., Richard, M.G., Daigger, G.T. (1993). Manual on the causes and control of activated sludge and foaming, 2^a ed., Lewis Publishers, Inc., 193p., Estados Unidos.
- Jia, X.S.; Furumai, H.; Fang, H.H.P. (1996). Extracellular polymers of hydrogen-utilizing methanogenic and sulfate-reducing sludges. *Water. Research*, **30**: 1439-1444.
- Kornmann, H., Duboc, P., Marison, I., Stockar von U. (2003). Influence of nutritional factors on the nature, yield, and compositions of exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinum* I-2281. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (10): 6091-6098.
- Larpin, S., Sauvageot, N., Pichereau, V., Laplace, J.M., Auffray, Y. (2002). Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. *International Journal Food of Microbilology*, **77**: 1-9.
- Lasa, I., del Pozo, J.L., Penadés, J.R., Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Annales del sistema sanitario de Navarra*, **28** (2): 153-298.
- Lapidou, C.S., Rittman, B.E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, **36**:2711-2720.
- Linton, J.D., Jones, D.S., Woodward, S. (1987). Factors that control the rate of exopolysaccharide production in *Agrobacterium radiobacter* NCIB11883. *Journal of General Microbiology*, **133**: 2979–2987.
- Liu, H. and Fang, H.H.P. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, **95**: 249-256.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1995). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.

- Mackie, R.I., White, B.A., Bryant, M.P. (1991). Lipid metabolism in a anaerobic ecosystems. *Critical Reviews in Microbiology*, **17** (6): 449-479.
- Mantsch, H. H., Chapman, D. (1996). Infrared spectroscopy of biomolecules. Wiley-Liss, 359p. New York.
- Magaritis, A. and Peace, G.W. (1986). Microbial polysaccharides. Comprehensive Biotechnology. The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. Ed.Pergamn Press, vol. 3.
- McInerney, M.J. (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: Zehnder, A. J. B. *Biology of anaerobic microorganisms*. Ed. John Wiley & Sons, Inc, 381- 402.
- Mengistu, Y., Edwards, C., Saundes, J.R. (1994). Continuous culture studies on the synthesis of capsular polysaccharide by *Klebsiella pneumoniae* K1. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**: 424-430.
- Mian, F.A., Jarman, T.R., Righelato, R.C. (1978). Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **134**: 418-422.
- Miller, J.C., Miller, J.N. (1984). *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chischester. p. 96, cap. 4.
- Miqueleto, A.P. (2001). *Comportamento de reator anaeróbio operado em batelada seqüencial, contendo biomassa imobilizada e submetido a aumento progressivo da concentração de substrato de fácil degradação*. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos; Universidade São Paulo, Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil com ênfase em Hidráulica e Saneamento, 92p.
- Miqueleto, A.P., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Foresti, E., Zaiat, M. (2005). Treatment of easily degradable wastewater in a stirred anaerobic sequencing batch biofilm reactor. *Water Research*, **39**: 2376-2384.
- Moraes, E.M., Adorno, M.A. T., Zaiat, M., Foresti E. (2000). Determinação de Ácidos Voláteis Totais por Cromatografia Gasosa em Efluentes de Reatores Anaeróbios Tratando Resíduos Líquidos e Sólidos. In Anais da VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, Editora Universitária da UFPE, Recife-PE, 235-238.
- Mozzi, F., Rollan, G., de Giori, G.S., de Valdez, G.F. (2001) Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. *J. Applied of Microbilolgy*, **91** (1): 160-167.

- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, **59**: 695-700.
- Neijssel, O.M., and Tempest, D.W. (1975). The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC418 organisms growing in chemostat culture. *Archives of Microbiology*, **106**: 251-258
- Norberg, A.B., Enfors, S.,O. (1982). Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Applied Environmental Microbiology*, **44**: 1231-1237.
- Orra, A.A., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Foresti, E., Zaiat, M. (2004). Effects of feeding strategies on the performance of an anaerobic discontinuous reactor containing immobilized biomass with circulation system for liquid-phase mixing. *Water Science and Technology*, **49** (11): 303-310.
- Parolis, H., Parolis, L.A.S., Boán, I.F., Valera, F.R., Wdmalm, G., Manca, M.C., Jansson, P.E., Sutherland, I.W. (1996). The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydrate Research*, **295**: 147-156.
- Paterson-Bedle, M.; Kennedy, J.F.; Melo, F.A.D.; Lloyd, L.L.; Medeiros, V. (2000). A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasse by a *Zoogloea* sp. *Carbohydrate Polymers*, **42**: 375-383.
- Petrury, R., and Lettinga, G. (1997) Digestion of a milk – fat emulsion. *Bioresource Technology*, **61**: 141-149.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M.J., Cerning, J., Desmazeaud, M. (2000). Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 3427-3431.
- Pinho, S.C, Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A., Foresti, E., Zaiat, M. (2004). Influence of the agitation rate on the treatment of partially soluble wastewater in anaerobic sequencing batch biofilm reactor. *Water Research*, **38**: 4117-4134.
- Pinho, S.C., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Foresti, E., Zaiat, M. (2005a). Feasibility of treating partially soluble wastewater in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR) with mechanical stirring. *Bioresearch Technology*, **96**: 517-519.
- Pinho, S.C., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Foresti, E., Zaiat, M. (2005b). Influence of bioparticle size on the degradation of partially soluble wastewater in an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR). *Process Biochemistry*, **40**: 3206-3212.

- Pinho, S.C., Fernandes, B.S., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Foresti, E., Zaiat, M. (2005c). Feasibility of treating swine manure in an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR) with mechanical stirring. *Applied biochemistry and Biotechnology*, 120:,109–120.
- Postma, T., Stroes, J.A.P. (1968). Lipid Screening in Clinical Chemistry. *Clinical Chimica Acta*, **22**: 569-578.
- Quagliano, J.C. and Miyazaki, S.S. (1999) Biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate and exopolysaccharides on *Azotobacter chroococcum* strain 6B utilizing simple and complex carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **82** (3): 199-208.
- Ramos, A.C.T., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Zaiat, M (2003). Mass transfer improvement of a fixed-bed anaerobic sequencing batch reactor with liquid-phase circulation. *Interciência*, **28** (4): 214–219.
- Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D, Camargo, E.F.M., Zaiat, M., Borzani, W. (2000). Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, **75**: 127-132.
- Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D, Camargo, E.F.M., Zaiat, M., Borzani, W. (2001). Influence of agitation rate on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass. *Water Science and Technology*, **44** (4): 305-412.
- Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D, Foresti, E., Zaiat, M. (2003a). Operating feasibility of anaerobic whey treatment in a stirred sequencing batch reactor containing immobilized biomass. *Water Science and Technology*, **48** (6): 179-186.
- Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D, Camargo, E.F.M., Ribeiro, R., Zaiat, M. (2003b). Effect of feeding strategy on a stirred anaerobic sequencing fed-batch reactor containing immobilized biomass. *Bioresource Technology*, **90**: 199-205.
- Ribeiro, R. (2001). *Influência do tipo de substrato na dinâmica de formação do biofilme em matrizes de espuma de poliuretano*. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos; Universidade São Paulo, Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil com ênfase em Hidráulica e Saneamento, 189p.
- Ripley, L.E., Boyle, W.C. and Converse, J.C. (1986) Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal WPCF*, **58**: 406– 411.
- Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M. (2003). Fed-batch and batch operating mode analysis of a stirred anaerobic sequencing reactor with self-immobilized biomass treating low-strength wastewater. *Journal of Environmental Management*, **69**: 193–200.

- Römling U., and Lünsdorf, H. (2004). Characterization of cellulose produced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Cellulose*, **11**: 413-418.
- Ross P., Mayer R., Benziman M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, **55** (1): 35-58.
- Sakairi, N., Asano, H., Ogawa, M. Nishi, N., Tokura, S. (1997). A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers*, **35**: 233-237.
- Sarti, A. (2004). *Desempenho de reatores anaeróbios operados em bateladas seqüenciais em escala piloto no tratamento de esgoto sanitário*. Escola de Engenharia de São Carlos; Universidade São Paulo, Tese de Doutorado em Engenharia Civil com ênfase em Hidráulica e Saneamento, 154p.
- Schramm, M., Gromet, Z., Hestrin, S. (1957). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. III. Substrates and inhibitors. *Biochemical Journal*, **67**: 669-679.
- Siman R.R., Borges A.C., Ratusznei S.M., Rodrigues J.A.D., Zaiat, M., Foresti, E., Borzani, V. (2004). Influence of organic loading on an anaerobic sequencing biofilm batch reactor (ASBBR) as a function of cycle period and wastewater concentration. *Journal of Environmental Management*, **72**: 241-247.
- Socrates, G. (2001) Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts, 3rd Edition, Wiley & Sons, New York.
- Sowden, L.C., Colvin, R. (1978). Morphology, microstructure, and development of colonies of *Acetobacter xylinum*. *Canadian Journal of Microbiology*, **24**: 772-779.
- So, C.; Young, L.Y. (1999). Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 2969-2976.
- Son, H.J., Heo, M.S., Kim, Y.G., Lee, S.J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology Applied Biochemistry*, **33**: 1-5.
- Speece, R. E. (1996). Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Ed. Archea Press, Nashville, Tennessee, 394p.
- Sutherland, I.W., and Kennedy, L. (1996). Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. *Microbiology*. **142**:867-872.
- Sutherland, I.W. (2001a). Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology*, **43**: 77-87.

- Sutherland, I.W. (2001b). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Mini-Review. *Microbiology*, **147**: 3-9.
- Sutherland, I.W. (2001c). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, **11**: 663-674.
- Takeuchi, M., and Hatano, K. (2001). *Agromyces luteolus* sp. nov., *Agromyces rhizosphaerae* sp. nov. and *Agromyces brachium* sp. nov., from the mangrove rhizosphere. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**: 1529-1537
- Tsuneda, S., Park, S., Hayashi, H., Jung, J., Jorate, A. (2001). Enhancement of nitrifying biofilm formation using selected EPS produced by heterotrophic bacteria. *Water Science and Technology*, **43** (6):197-204.
- Veiga, M.C., Jain, M.K., Wu, W.M., Hollingsworth, R.I., Zeikus, J.G. (1997). Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 403-407.
- Weinhouse, H., Benziman, M. (1974). Regulation of hexose phosphate metabolism in *Acetobacter xylinum*. *Biochemical Journal*, **138**:537-542.
- Weinhouse, H., Benziman, M. (1976). Phosphorylation of glycerol and dihydroxyacetone in *Acetobacter xylinum* and its possible regulatory role. *Journal Bacteriological*, **127**: 747-754.
- Yamanaka S.Q., Sugiyama J.Q., (2000). Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, **7** (3), 213-225.
- Yang, Z.; Huttunen, E.; Staaf, M.; Widmalm, G.; Tenhu, H. (1999) Separation, purification and characterization of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains. *International Dairy Journal*, **9**: 631-638.
- Zaiat, M., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Camargo, E.F.M. and Borzani, W. (2001) Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater treatment: a developing technology. *Applied Microbiology Biotechnology*, **55**: 29-35.
- Zhang, X.Q., Bishop, P.L., Kinkle, B.K. (1999). Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science Technnnology*, **39** (7): 211-218.
- Zgurskaya, H.I., Evtushenko, L.I., Akimov, V.N., Voyevoda, H.V., Dobrovolskaya, T.G., Lysak, L.V., Kalakoutskii, L.V. (1992). Emended description of the genus *Agromyces* and description of *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces cerinus* subsp. *nitratus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces fucosus* subsp. *fucosus* sp. nov., subsp. nov., and *Agromyces fucosus* subsp. *hippuratus* sp. nov., subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 635-641.

- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, **39**: 1452-1463.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimts, M., Römling, U. (2003). Production of cellulose and curli fibriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, **71** (7): 4151-4158.

9.1. REFERÊNCIA ELETRÔNICA

www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/agromyces.html

APÊNDICE A

Gráficos do monitoramento diário dos parâmetros obtidos no ASBBR quando alimentado nas diferentes condições nutricionais.

Glucose C/N1 (13,6 gC/gN)

Glucose C/N2 (6,8 gC/gN)

Glucose C/N3 (3,4 gC/gN)

Glucose em condições de anaerobiose estrita

Figura A.1. Gráficos do monitoramento diário do ASBBR nas diferentes condições nutricionais.

APÊNDICE B

Determinação das isotermas de adsorção do óleo de soja na espuma de poliuretano.

Ensaio de Adsorção do Óleo de Soja na Espuma de Poliuretano

Os ensaios de adsorção do óleo de soja na espuma foram realizados no ASBBR contendo 45 g de espumas de poliuretano com 1 cm de aresta, sem a biomassa. A temperatura foi mantida constante a 30° C e agitação mecânica constante a 300 rpm.

O reator foi alimentado com o substrato contendo óleo de soja num volume de 4,5 L. As concentrações do substrato utilizadas, medidas em DQO, foram em torno de 1000 mg/L, 2500 mg/L, 5000 mg/L e 10000 mg/L. Em intervalos de 1 ou 2 horas alíquotas do efluente eram retiradas até se atingir a concentração de equilíbrio (C_e), ou seja, quando a concentração do efluente não variasse mais.

A quantidade de óleo adsorvida em mg por grama de adsorvente foi determinada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração final (C_e) do óleo no meio aquoso após a adsorção por:

$$q_e = \frac{(C_o - C_e) \cdot V}{P} \quad (1)$$

onde q_e é a quantidade de óleo adsorvido por grama de espuma (mg/g), C_o é a concentração inicial de óleo no meio aquoso (mg), C_e é a concentração de óleo final, ou de equilíbrio, no meio aquoso (mg), V é o volume de substrato (L) e P é a quantidade de adsorvente (g).

A análise da capacidade de adsorção da espuma foi feita através da isoterma de Langmuir ou Freundlich descritas pelas equações (2) e (3), respectivamente.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Kq_{\max}} + \frac{C_e}{q_{\max}} \quad (2)$$

O modelo de isoterma de adsorção de Langmuir considera adsorção em monocamadas em superfícies homogêneas, com número finito de sítios idênticos, dos quais são energeticamente equivalentes e que não há interações entre as moléculas adsorvidas. Portanto, na equação (2) K é a constante de equilíbrio de adsorção (L/mg) e $q_{\max}$ é a adsorção máxima na monocamada (mg/g).

$$\ln q_e = \frac{1}{n} \cdot \ln C_e + \ln K_F \quad (3)$$

A expressão de Freundlich é uma equação empírica baseada na adsorção em superfícies heterogêneas possuindo sítios de energia não específicos, portanto não existe um

fator limitante estequiométrico (saturação). Portanto, K_F e $\frac{1}{n}$ são constantes características de Freundlich, indicando capacidade de adsorção e intensidade de adsorção respectivamente.

Com os resultados obtidos foi possível obter as isotermas de adsorção de Langmuir e de Freundlich, observadas nas Figuras B.1a e B.1b. Os parâmetros de adsorção estão apresentados na Tabela B.1.

Figura B.1. Isotermas de adsorção do óleo de soja na espuma de poliuretano: (a) Isoterma de Langmuir, (b) Isoterma de Freundlich.

Tabela B.1 - Parâmetro de adsorção do óleo de soja na espuma de poliuretano obtidos a partir das isotermas de Langmuir e de Freundlich.

	Parâmetros de Langmuir		Parâmetros de Freundlich	
	q _{max} mg óleo/g espuma	K L/mg óleo	K _F mg óleo/g espuma	1/n
Óleo de Soja	588	0,001427	2,1	0,76

APÊNDICE C

Fotografias do ASBBR após a operação com as diferentes condições nutricionais

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura C.1. Fotografias da superfície do cesto e das espumas ao final da operação do ASBBR alimentado com glicose: (a) e (b) razão C/N1 (13,6 gC/gN), (c) e (d) razão C/N2 (6,8 gC/gN), (e) e (f) razão C/N3 (3,4 gC/gN).

(a)

(b)

(c)

(d)

(f)

(g)

Figura C.2. Fotografias da superfície do cesto e das espumas ao final da operação do ASBBR nas diferentes fontes de carbono: (a) e (b) extrato de carne, (c) e (d) óleo de soja, (e) e (f) glicose/extrato de carne/óleo de soja.

APÊNDICE D

Testes de Purificação do EPS

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Após as primeiras análises de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura constatou-se a presença de muitos microrganismos nas amostras, que poderiam estar interferindo nos resultados das análises. Para minimizar essas interferências foram feitos alguns testes para purificar as amostras, ou seja, retirar os microrganismos para se obter resultados reais nas análises.

A Figura D.1 apresenta os espectros de FTIR após os testes para a purificação do EPS, descritas por Liu & Fang (2002).

Em todos os testes não foi verificada diferenças nos espectros de FTIR, com exceção das amostras que foram tratadas com EDTA (ácido etilenodiaminatetracético) e com formaldeído e NaOH, no qual verifica-se alterações nas bandas compreendidas entre as regiões de 1600 a 1300 cm^{-1} . Estas alterações podem ser devido a interferência dos sais que podem ter se ligado ao polímero. Além disso, na micrografia obtida por MEV da amostra tratada com formaldeído e NaOH (Figura 7f) observou-se a presença de microcristais, confirmando, desta forma, a presença dos sal nas amostras.

Como não se constatou alterações nos espectros das outras amostras tratadas comparadas com as amostras não tratadas, pode-se concluir que não houve a purificação do EPS, sendo comprovada com as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Figura D.1. Espectros de FTIR dos EPS produzidos no ASBBR alimentado com glicose após os testes descritos por Liu & Fang (2002).

Raio-X

Os espectros de raio-X das análises das amostras em que foram realizados testes para purificação do EPS, descritos por Skairi *et al.* (1997) e Bertocchi *et al.* (1997) estão apresentados na Figura D.2. Esses testes foram feitos somente com as amostras do EPS obtido quando o reator foi alimentado com glicose na relação C/N1. O único espectro diferente é o da amostra tratada com SDS e NaOH, pois apresenta um pico bem definido em $2\theta = 5^\circ$ podendo ser devido ao sódio.

Pode-se concluir que, os tratamentos do EPS obtidos no ASBBR seguindo metodologia descrita por Kairi *et al.* (1997) e Bertocchi *et al.* (1997) não foram adequados para se purificar as amostras neste caso. Visto que não houve alterações nos espectros de raio-X, não foi necessário fazer as análises de FTIR e nem de MEV.

Figura D.2. Espectros de difração de raio-X do polímero produzido a partir da glicose na relação C/N1 (13.6 gC/gN) após tratamento descrito por Skairi *et al.* (1997) e Bertocchi *et al.* (1997).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura D.3 apresenta as imagens do EPS obtido quando o reator foi alimentado com glicose na razão C/N1 após os testes descritos por Liu & Fang (2002) para purificação das amostras.

Comparando-se todas as imagens não se observou alterações significativas, com exceção da Figura D.3f que apresentou esferas, aparentemente, de microcristais na superfície do polímero. Esses microcristais podem ser de sódio, pois esta amostra foi tratada com formaldeído e hidróxido de sódio (NaOH). O espectro de FTIR dessa mostra também se apresentou diferente das outras amostras, podendo ser devido aos microcristais.

Figura D.3. Observações sob microscopia eletrônica de varredura dos polímeros extracelulares formados no reator utilizando glicose como substrato, que recebeu o tratamento descrita por Liu & Fang (2002): (a) tratamento com EDTA (aumento de 5000 vezes), (b) tratamento com EDTA (aumento de 1000 vezes), (c) tratamento com formaldeído (aumento de 5000 vezes), (d) tratamento com formaldeído (aumento de 1000 vezes), (e) tratamento com formaldeído e NaOH (aumento de 5000 vezes), (f) tratamento com formaldeído e NaOH (aumento de 1000 vezes), (g) tratamento com formaldeído e ultra-som (aumento de 5000 vezes), (h) tratamento com formaldeído e ultra-som (aumento de 1000 vezes).