

**AVALIAÇÃO DA METANOGÊNESE E SULFETOGENÊSE
EM REATORES ANAERÓBIOS EM BATELADA E DE
LEITO FIXO, SOB CONDIÇÕES TERMOFÍLICAS**

MERCIA REGINA DOMINGUES

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Hidráulica e Saneamento.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARIA BERNADETE VARESCHE

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 19/03/02

Ass.: *Guilherme*



São Carlos
2001

DEDALUS - Acervo - EESC

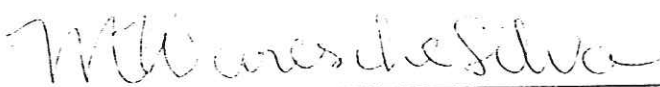



31100036903

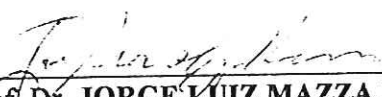
FOLHA DE JULGAMENTO

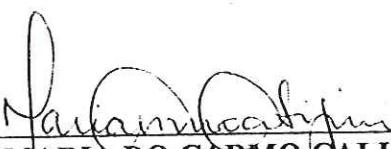
Candidata: Bacharela **MERCIA REGINA DOMINGUES**

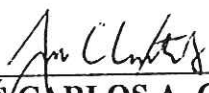
Dissertação defendida e julgada em 30-11-2001 perante a Comissão Julgadora:


Dra. **MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE SILVA** (Orientadora)
(Pesquisadora - Escola de Engenharia de São Carlos/USP) Aprovada


Dra. **ROSANA FILOMENA VAZOLLER**
(Pesquisadora - Instituto de Ciências Biomédicas/USP) Aprovada


Prof. Dr. **JORGE LUIZ MAZZA RODRIGUES**
(Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP) Aprovada


Profa. Associada **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia (Hidráulica e Saneamento)


JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

**Dedico este trabalho a minha
família querida e ao meu
namorado Evandro pelo amor
e compreensão.**

CULTURA

“O GIRINO É O PEIXINHO DO SAPO
O SILÊNCIO É O COMEÇO DO PAPO
O BIGODE É A ANTENA DO GATO
O CAVALO É PASTO DE CARRAPATO
O CABRITO É O CORDEIRO DA CABRA
O PESCOÇO É A BARRIGA DA COBRA
O LEITÃO É UM PORQUINHO MAIS NOVO
O GALINHA É UM POUQUINHO DO OVO
O DESEJO É O COMEÇO DO CORPO
ENGORDAR É A TAREFA DO PORCO
A CEGONHA É A GIRAFÁ DO GANSO
O CACHORRO É UM LOBO MAIS MANSO
O ESCURO É A METADE DA ZEBRA
AS RAIZES SÃO AS VEIAS DA SEIVA
O CAMELO É UM CAVALO SEM SEDE
TARTARUGA POR DENTRO É PAREDE
O POTRINHO É O BEZERRO DA ÉGUA
A BATALHA É O COMEÇO DA TRÉGUA
PAPAGAIO É UM DRAGÃO MINIATURA
BACTÉRIAS NUM MEIO É CULTURA”

ARNALDO ANTUNES

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria Bernadete, pela amizade e orientação durante o mestrado e pela contribuição para o meu aperfeiçoamento profissional e científico.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC / USP, por ter propiciado a oportunidade da convivência com profissionais de diversos segmentos relacionados à Hidráulica e Saneamento.

Ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB) EESC / USP pelo apoio técnico e logístico.

Ao Instituto de Física – EESC / USP, pela disponibilização de apoio técnico fundamental na execução de todas as etapas deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de estudos durante o período de vigência do mestrado.

A FAPESP pelo fornecimento de apoio técnico e financeiro.

A Profa. Dra. Rosana Vazoller, pela enorme contribuição para minha formação acadêmica, pelo apoio nas minhas decisões profissionais, pela grande amizade, pelas sugestões e críticas que ajudaram a delinear o presente trabalho.

As Dras. Elisabeth Moraes e Maria Ângela Adorno pela contribuição profissional durante a realização deste trabalho, pela valiosa amizade e pelos grandes momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat pelo ensinamento e amizade.

Aos técnicos Paulo, Júlio e Eloísa pelo auxílio no laboratório e pela amizade.

Aos Drs. Donato e Juliana Calábria pela valiosa contribuição para o meu aprendizado na técnica de FISH, além da simpatia e boa vontade.

Aos companheiros de laboratório André Mineiro, André “Velhinho”, Betão, Chuchu, Douglas, Fernandão, Flavinha, Gica, Ivana, Helinho, Luciana, Marcinho Maceió, Marilu, Martinha, Neyson, Rogers, Samanta,, Sávia, Selma, Sidnei, Sônia, Valmir.

Aos amigos que conheci durante o mestrado: Caê e Sofia, Caio e Ju, Éliton, Rinaldinho, Adeildo, Andréia Patê, Celina, Camilinha, Conceição, Patinha, Gunther, K6enia, Mau-Mau e Carol, Dick, Cascia, Vinícius, Helinho, Cristiano e todos da turma pelos momentos de alegria e descontração.

As minhas amigas de república Dirlane, Isabel e Luana pela paciência e momento de felicidade.

Em especial ao meu querido namorado Evandro alegria e felicidade de estarmos juntos.

E aos meus pais Walter e Rosa, aos meus irmãos Jú e Má e ao meu sobrinho querido Victor. Todos eles tornam minha vida mais alegre.

SUMÁRIO	Pág.
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	05
3. REVISÃO DA LITERATURA	06
3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS O ÍON SULFATO (BRS)	06
3.1.1. UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS ORGÂNICOS	11
3.1.1.1. ACETATO	11
3.1.1.2. LACTATO	13
3.1.1.3. PROPIONATO E BUTIRATO	15
3.1.2. CRESCIMENTO SINTRÓFICO	18
3.1.3. CONSUMO DE SUBSTRATOS FERMENTÁVEIS	19
3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ARQUEAS METANOGÊNICAS (AM)	20
3.3. COMPETIÇÃO ENTRE BRS E METANOGÊNICAS	26
3.4. IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA	31
3.5. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH)	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. ORGANOGRAMA EXPERIMENTAL	43
4.2. MEIO DE CULTIVO E SOLUÇÕES ESTOQUE	46
4.2.1. MEIO BASAL ZINDER	46
4.2.2. SOLUÇÕES ESTOQUE DE BICARBONATO DE SÓDIO 10%, REDUTORA DE SULFETO DE SÓDIO 5% E DIFERENTES SOLUÇÃO DE VITAMINAS	47
4.2.3. SOLUÇÃO ESTOQUE DE EXTRATO DE LEVEDURA 2%	49
4.2.4. SOLUÇÃO ESTOQUE DE SULFATO DE SÓDIO	50

4.2.5. SOLUÇÕES ESTOQUE DE SUBSTRATOS ORGÂNICOS	50
4.2.6. SOLUÇÃO DE LACTATO DE SÓDIO	50
4.2.7. SOLUÇÃO DE METANOL	51
4.3. INÓCULO	51
4.4. ENRIQUECIMENTO DO LODO TERMOFÍLICO	52
4.5. ENSAIOS COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE VITAMINAS	53
4.6. CULTIVO EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS ESPECÍFICAS	55
4.7. ENSAIOS EM REATORES ANAERÓBIOS	55
4.7.1. REATOR ANAERÓBIO EM BATELADA	56
4.7.2. REATOR ANAERÓBIO DIFERENCIAL DE LEITO FIXO	56
4.8. MÉTODOS ANALÍTICOS	59
4.8.1. DETERMINAÇÃO DE SULFATO	59
4.8.2. DETERMINAÇÃO DE SULFETO TOTAL DISSOLVIDO	60
4.8.3. DETERMINAÇÃO DE PH	61
4.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	62
4.9.1. DETERMINAÇÃO DE METANO	62
4.9.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS	62
4.10. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA	64
4.10.1. MICROSCOPIA ÓPTICA	64
4.10.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	64
4.11. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH)	65
4.11.1. SONDAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS FLUORESCENTES	65
4.11.2. PREPARAÇÃO E FIXAÇÃO DAS AMOSTRAS	66
4.11.3. TRATAMENTO DAS LÂMINAS DE VIDRO	67
4.11.4. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH)	68
4.12. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS GRUPOS ANAERÓBIOS TERMOFÍLICOS	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1. ENRIQUECIMENTO SOB CONDIÇÕES TERMOFÍLICAS	73
5.2. CULTIVO EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS ESPECÍFICAS	76
5.3. ENSAIOS EM REATORES EM BATELADA E DIFERENCIAIS	81
5.3.1. REATORES ANAERÓBIOS ALIMENTADOS COM ACETATO DE SÓDIO E SULFATO DE SÓDIO	82

5.3.1.1. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO	82
5.3.1.2. MAPEAMENTO MORFOLÓGICO	86
5.3.1.3. CONCENTRAÇÃO CELULAR	91
5.3.1.4. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i>	97
5.3.1.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	108
5.3.2. REATORES ANAERÓBIOS ALIMENTADOS COM LACTATO DE SÓDIO E	
SULFATO DE SÓDIO	112
5.3.2.1. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO	112
5.3.2.2. MAPEAMENTO MORFOLÓGICO	114
5.3.2.3. CONCENTRAÇÃO CELULAR	118
5.3.2.4. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH)	124
5.3.2.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	130
5.3.3. REATORES ANAERÓBIOS ALIMENTADOS COM PROPIONATO DE SÓDIO	
E SULFATO DE SÓDIO	133
5.3.3.1. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO	133
5.3.3.2. MAPEAMENTO MORFOLÓGICO	137
5.3.3.3. CONCENTRAÇÃO CELULAR	139
5.3.3.4. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	145
5.3.3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	147
6. CONCLUSÕES	150
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	152
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Possíveis rotas anaeróbias da degradação de compostos orgânicos na presença de sulfato. BF : bactérias fermentativas, BRS : bactérias redutoras do íon sulfato, BAPH : bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio, BHA : bactérias homoacetogênicas e AM : arqueas metanogênicas. Adaptado de VAZOLLER (1995) ..	27
Figura 2. Desenho esquemático da técnica de hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes. Adaptado de ABE (1998).....	36
Figura 3. Fluxograma das atividades experimentais nos reatores em batelada e diferenciais, sob temperatura termofílica (55°C)	45
Figura 4. Reator utilizado nos ensaios em batelada: (a) atmosfera livre e (b) lodo anaeróbio com células planctônicas	56
Figura 5. Reator diferencial	57
Figura 6. Desenho esquemático do aparato experimental: (1) agitador magnético; (2) frasco de alimentação; (3) amostrador de substrato; (4) bomba peristáltica; (5) trocador de calor; (6) câmara termostatizada; (7) reatores diferenciais	57
Figura 7. Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridação <i>in situ</i>	68
Figura 8. Esquema da distribuição da amostra nos frascos de diluição e nos frascos de contagem pela técnica do NMP	72
Figura 9. Produção média de gás metano, em função do tempo, nos ensaios de enriquecimento do lodo termofílico, posteriormente utilizados como inóculo para os ensaios em condições fisiológicas específicas: (a) 71,9% de metano, (b) 70,2% de metano e (c) 72,4% de metano	75
Figura 10. Valores médios da produção de metano, em função do tempo durante os ensaios de cultivo em condições específicas: (1) acetato de sódio e solução de vitaminas ¹ , (2) acetato de sódio, sulfato de sódio e solução de vitaminas ¹ , (3) acetato de sódio, sulfato de sódio e solução de vitaminas ²	78

- Figura 11. Reatores em batelada: (a) variação temporal das concentrações de sulfato, ácido acético e sulfeto total e (b) produção de metano 83
- Figura 12. Reatores diferenciais de leito fixo: variação temporal das concentrações de sulfato, ácido acético e DQO 85
- Figura 13. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no reator em batelada alimentado com acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) e (b) organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp., (c) bacilos retos e curvos, (d) bacilos curvos, (e) bacilos com extremidades arredondadas, (f) bacilos com extremidades afiladas 87
- Figura 14. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no reator diferencial alimentado com acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos com extremidades arredondadas, (b) bacilos com esporo terminal, (c) e (d) organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp., (e) e (f) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos 90
- Figura 15. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e luz comum no ensaio de NMP_{inicial} contendo acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) cistos de sarcinas, (b) organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp. – diluição 10⁻²; (c) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. – diluição 10⁻², (d) organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp. – diluição 10⁻³, (e) bacilos com extremidades arredondadas e afiladas – diluição 10⁻⁶ e (f) bacilos curvos – diluição 10⁻⁸ 93
- Figura 16. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase no ensaio de NMP_{final} contendo acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos com extremidades afiladas e bacilos em cadeia, (b) bacilos com extremidades afiladas aos pares – diluição 10⁻², (c) bacilos com extremidades afiladas – diluição 10⁻⁴, (d) espirilos, (e) e (f) bacilos com extremidades afiladas – diluição 10⁻⁶ 96

- Figura 17. Composição da comunidade microbiana determinada pela técnica de FISH, em função do tempo, para células planctônicas. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915) e sonda específica para *Methanobacteriaceae* (MB1174). A porcentagem de células pertencentes ao grupo das BRS foi estimada baseando-se nas características morfológicas das células e nos valores obtidos com sonda (SRB385) específica para as BRS Gram-negativas. Os valores da abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro padrão 99
- Figura 18. Hibridação de amostras do reator em batelada – acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos com extremidades arredondadas hidridados com a sonda EUB338, (c) coloração com DAPI, (d) bacilos com extremidades arredondas (EUB338), (e) coloração com DAPI, (f) *Methanosarcina* sp. hidridada com a sonda ARC915+MB1174..... 101
- Figura 19. Composição da comunidade microbiana determinada pela técnica de FISH, em função do tempo, para células do biofilme. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915) e sonda específica para *Methanobacteriaceae* (MB1174). A porcentagem de células pertencentes ao grupo das BRS foi estimada baseando-se nas características morfológicas das células e nos valores obtidos com sonda (SRB385) específica para as BRS Gram-negativas. Os valores da abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro padrão 103

- Figura 20. Hibridação de amostras do reator em batelada – acetato de sódio e sulfato de sódio: **(a)** coloração com DAPI, **(b)** bacilos em cadeia hibridados com a sonda EUB338, **(c)** coloração com DAPI, **(d)** filamentos hibridados com a sonda EUB338, **(e)** coloração com DAPI, **(f)** filamento com extremidades arredondadas hibridado com sonda EUB338, **(g)** coloração com DAPI, **(h)** *Methanosaeta* sp. hibridada com sonda ARC915+MB1174, **(i)** coloração com DAPI, **(j)** *Methanosaeta* sp. hibridada com sonda ARC915+MB1174, **(k)** coloração com DAPI, **(l)** *Methanosaeta* sp. hibridada com sonda ARC915+MB1174 104-105
- Figura 21. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo acetato de sódio e sulfato de sódio – **(a)** e **(b)** colonização inicial por bacilos, **(c)** células e polímeros extracelulares, **(d)** organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos, **(e)** e **(f)** microgrânulos e agregados celulares, **(g)** agregados celulares, **(h)** organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos, **(i)** agregados celulares, **(j)** organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos, **(k)** microgrânulos e agregados celulares, **(f)** agregados celulares 110-111
- Figura 22. Reator em batelada: variação temporal das concentrações de sulfato, ácido láctico e sulfeto total dissolvido..... 113
- Figura 23. Reator diferencial: variação temporal das concentrações de sulfato, ácido láctico e DQO 114
- Figura 24. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no reator em batelada alimentado com lactato de sódio e sulfato de sódio: **(a)**, **(b)**, **(c)**, **(d)**, **(e)** e **(f)** bacilos retos metanogênicos 115

- Figura 25. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no reator diferencial alimentado com lactato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos retos fluorescentes, (b) bacilos em cadeia, (c) bacilos com extremidades afiladas aos pares, (d) bacilos com esporo terminal, (e) organismos semelhantes *Methanosarcina* sp.; (f) bacilos com extremidades afiladas 117
- Figura 26. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no ensaio de NMP_{inicial} contendo lactato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos com esporos terminais e (b) bacilos em cadeia – diluição 10^{-4} , (c) e (d) bacilos com extremidades arredondadas – diluição 10^{-5} , (e) bacilos retos metanogênicos – diluição 10^{-6} , (f) bacilos curvos – diluição 10^{-7} ... 120
- Figura 27. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase no ensaio de NMP_{final} contendo lactato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos curvos – diluição 10^{-1} , (b) e (c) bacilos com extremidades arredondadas – diluição 10^{-2} , (d) bacilos com extremidades arredondadas – diluição 10^{-8} , (e) e (f) bacilos com pontuações e extremidades afiladas – diluição 10^{-10} 123
- Figura 28. Composição da comunidade microbiana determinada pela técnica de FISH, em função do tempo, para células planctônicas. Abundância relativa de células pertencentes ao Domínio *Bactéria* e grupo geral de BRS. A porcentagem de células pertencentes ao grupo das BRS foi estimada baseando-se nas características morfológicas das células e nos valores obtidos com sonda (SRB385) específica para as BRS Gram-negativas. Os valores da abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro padrão 125

- Figura 29. Hibridação de amostras do reator em batelada – lactato de sódio e sulfato de sódio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda EUB338, (c) coloração com DAPI, (d) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda EUB338, (e) coloração com DAPI, (f) bacilos em cadeia hibridados com a sonda EUB338, (g) coloração com DAPI, (h) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda SRB385, (i) coloração com DAPI, (j) bacilos em cadeia hibridados com a sonda SRB385, (k) coloração com DAPI, (l) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda SRB385 126-127
- Figura 30. Composição da comunidade microbiana determinada pela técnica de FISH, em função do tempo, para células do biofilme. Abundância relativa de células pertencentes ao Domínio *Bactéria* e grupo geral de BRS. A porcentagem de células pertencentes ao grupo das BRS foi estimada baseando-se nas características morfológicas das células e nos valores obtidos com sonda (SRB385) específica para as BRS Gram-negativas. Os valores da abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro padrão 128
- Figura 31. Hibridação de amostras do reator diferencial – lactato de sódio e sulfato de sódio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos com extremidades arredondadas e afiladas hibridados com a sonda EUB338, (c) coloração com DAPI, (d) bacilos em cadeia hibridados com a sonda SRB385, (e) coloração com DAPI, (f) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda SRB385 129

- Figura 32. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo lactato de sódio e sulfato de sódio – (a) agregados celulares, (b) bacilos com extremidades arredondadas, (c) e (d) bacilos com extremidades arredondadas e afiladas, (e) agregados celulares, (f) bacilos com extremidades arredondadas e polímeros extra-celulares, (g) bacilos em cadeia, (h) bacilos com extremidades afiladas, (i) agregados celulares, (j) bacilos com extremidades afiladas, (k) microgrânulos e agregados celulares, (f) agregados celulares 131-132
- Figura 33. Variação temporal das concentrações de sulfato, ácido propiônico e sulfeto total dissolvido..... 134
- Figura 34. Reatores diferenciais de leito fixo: variação temporal das concentrações de sulfato, ácido propiônico e DQO 135
- Figura 35. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência na técnica NMP_{inicial} contendo propionato de sódio e sulfato de sódio: (a) e (b) organismos semelhantes a *Methanosarcina* – diluição 10^{-1} , (c) bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais e bacilos em cadeia – diluição 10^{-2} , (d) bacilos com extremidades afiladas esporulando – diluição 10^{-2} , (e) bacilos com pontuações e extremidades arredondadas – diluição 10^{-5} , (f) bacilos curvos – diluição 10^{-7} 141
- Figura 36. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase na técnica NMP_{final} contendo propionato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos em cadeia e (b) bacilos curvos – diluição 10^{-1} , (c) bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais e (d) bacilos com pontuações e extremidades arredondadas – diluição 10^{-5} , (e) bacilos curvos – diluição 10^{-5} , (f) bacilos com pontuações e extremidades arredondadas – diluição 10^{-6} 143

- Figura 37. Hibridação de amostras do reator em batelada – acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda EUB338, (c) coloração com DAPI, (d) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda SRB385, (e) coloração com DAPI, (f) *Methanosarcina* sp. hibridada com a sonda ARC915+MB1174 146
- Figura 38. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo propionato de sódio e sulfato de sódio – (a) célula semelhante a *Methanosaeta* sp. (b) bacilos com extremidades afiladas, (c) e (d) agregados celulares, (e) bacilo em cadeia, (f) bacilos curvos, (g) e (h) agregados celulares, (i) bacilos em cadeia, (j) bacilos curvos, (k) microgrânulos, (l) agregados celulares 148-149

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Reações de redução de sulfato e os respectivos valores de energia livre	11
Tabela 2. Reações de conversão e os respectivos valores de energia livre.....	22
Tabela 3. Composição do meio de cultivo ZINDER.....	46
Tabela 4. Composição da solução traço de metais – meio ZINDER.....	47
Tabela 5. Composição da solução de vitaminas.....	49
Tabela 6. Composição da solução de vitaminas BRS	49
Tabela 7. Composição nutricional no enriquecimento do lodo termofílico.....	53
Tabela 8. Condições nutricionais e diferentes vitaminas utilizadas nos ensaios de enriquecimento.....	54
Tabela 9. Meio de cultivo e soluções estoques utilizados nos ensaios de enriquecimento com diferentes soluções de vitaminas.....	54
Tabela 10. Condições nutricionais utilizadas nos ensaios de cultivo em condições fisiológicas específicas.....	55
Tabela 11. Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação <i>in situ</i>	66
Tabela 12. Concentrações estoque e final de cada sonda	66
Tabela 13. Protocolos de hibridação.....	70
Tabela 14. Condições nutricionais utilizadas nos ensaios de cultivo com diferentes vitaminas.....	76
Tabela 15. Condições nutricionais utilizadas nos ensaios de cultivo com lactato e propionato, na presença de sulfato.....	78
Tabela 16. Morfologias das células presentes nos reatores em batelada alimentados com substratos orgânicos específicos, sulfato de sódio e diferentes vitaminas.....	80
Tabela 17. Ocorrência das morfologias observadas no biofilme dos reatores diferenciais alimentados com acetato de sódio e sulfato de sódio.....	89
Tabela 18. Números estimados de microorganismos anaeróbios totais e produtores de metano obtidos através da técnica do NMP com acetato de sódio e sulfato de sódio.....	91
Tabela 19. Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP _{inicial} para acetato de sódio e sulfato de sódio.....	92

Tabela 20.	Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP _{final} para acetato e sulfato.....	95
Tabela 21.	Morfologias dos microrganismos presentes nos reatores diferenciais alimentados com lactato de sódio e sulfato de sódio em função do tempo.....	116
Tabela 22.	Números estimados de microrganismos anaeróbios totais e produtores de metano obtidos através da técnica do NMP com lactato de sódio e sulfato de sódio.....	118
Tabela 23.	Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP _{inicial} para lactato e sulfato.....	119
Tabela 24.	Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP _{final} para lactato e sulfato.....	122
Tabela 25.	Ocorrência das morfologias observadas no biofilme do reator diferencial alimentado com propionato de sódio e sulfato de sódio.....	139
Tabela 26.	Números estimados de microrganismos anaeróbios totais e produtores de metano obtidos através da técnica do NMP com propionato de sódio e sulfato de sódio.....	139
Tabela 27.	Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP _{inicial} para propionato de sódio e sulfato de sódio.....	140
Tabela 28.	Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP _{final} para propionato de sódio e sulfato de sódio.....	142

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ΔG°	- Energia livre padrão ou grau de entalpia.
μL	- Microlitro.
μM	- Micromolar.
AM	- Arqueas metanogênicas.
ARC95	- Sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr de membros do Domínio <i>Archaea</i> .
BAPH	- Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio.
BF	- Bactéria fermentativas.
BHA	- Bactérias homoacetogênicas.
BRS	- Bactéria redutora do íon sulfato.
DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenilindol (corante fluorescente específico ao DNA)
DQO	- Demanda química de oxigênio.
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetracético.
EUB338	- Sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr de membros do Domínio <i>Bacteria</i> .
FISH	- Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (hibridação fluorescente <i>in situ</i>).
$\text{H}_2:\text{CO}_2$	Mistura de gases hidrogênio e gás carbônico.
H_2S	- Sulfeto de hidrogênio
K_s	- Constante de afinidade pelo substrato.
MB1174	- Sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr de membros das arqueas metanogênicas da família <i>Methanobacteriaceae</i> .
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura.
N_2	- Gás nitrogênio.
$\text{N}_2:\text{CO}_2$	- Mistura de gases nitrogênio e gás carbônico.
NMP	- Número Mais Provável.
NON338	- Sonda de oligonucleotídeo utilizado como controle negativo, não complementar ao RNAr microbiano.
PBS	- Phosphate saline buffer (tampão salino fosfato).
RAHLF	- Reator anaeróbio horizontal de leito fixo.
RNAr	- RNA ribossomal.
SDS	- Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio).

SRB385 - Sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr das bactérias redutoras de sulfato mesofílicas Gram-negativas, da subdivisão delta de *Proteobacteria*.

RESUMO

DOMINGUES, M. R. (2001). **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e de leito fixo, sob condições termofílicas.** Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Neste trabalho, investigou-se o crescimento e as interações de microrganismos anaeróbios, em reatores em batelada com células planctônicas e em reatores diferenciais com biofilme, sob condições termofílicas (55°C). Foram utilizadas técnicas clássicas para caracterizar os microrganismos anaeróbios estritos e biologia molecular (FISH), com sondas fluorescentes específicas, para caracterizar e quantificar os microrganismos pertencentes aos Domínios *Archaea* e *Bacteria*. Foram realizados experimentos com meios de cultivo contendo acetato de sódio, lactato de sódio e propionato de sódio, na presença de sulfato de sódio. Os resultados do FISH mostraram, para os ensaios em batelada com acetato e sulfato, o predomínio de organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* (ARC915+MB1174) representados pelo gênero *Methanosarcina* sp. e bacilos fluorescentes. No biofilme, para a mesma condição, houve predomínio de células do Domínio *Bacteria* (EUB338) e relacionadas com a oxidação do acetato. Para a condição de cultivo com lactato e sulfato, as células bacterianas semelhantes a *Desulfotomaculum* sp. predominaram nos reatores em batelada e diferenciais, justificando a elevada porcentagem de células do Domínio *Bacteria*. Os resultados do NMP mostraram uma maior concentração de anaeróbios totais na condição lactato e sulfato ($10^{11} - 10^{12}$). Para as arqueas metanogênicas essa concentração foi evidenciada para a condição de cultivo com acetato e sulfato (10^4). Os resultados desse trabalho sugeriram que em reatores em batelada, na condição de cultivo com acetato e sulfato, ocorreu equilíbrio entre metanogênese, oxidação de acetato e sulfetogênese, enquanto no biofilme, foram favorecidos os dois primeiros tipos de metabolismo. A condição lactato mais sulfato favoreceu a sulfetogênese em ambos os reatores. No reator diferencial, alimentado com propionato e sulfato ocorreu fermentação com crescimento sintrófico entre oxidadoras de propionato, metanogênicas e redutoras de sulfato hidrogenotróficas.

Palavras-chave: Anaeróbios, termofílicos, células planctônicas, biofilme, FISH.

ABSTRACT

DOMINGUES, M. R. (2001). **Evaluation of methanogenesis and sulfidogenesis of batch and differential anaerobic reactors under thermophilic conditions.** Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

In this work, were investigated the growth and interactions of anaerobic microorganisms, in batch and differential reactors with planktonic cells and biofilm, respectively, in thermophilic conditions (55°C). Classic and molecular biology methods (FISH) were utilized to characterize strict anaerobes, with specific fluorescence probes, to characterize the *Archaea* and *Bacteria* Domain cells. Experiments with sodium acetate, sodium lactate and sodium propionate plus sodium sulfate were realized. To the acetate and sulfate batch assays the results of FISH showed the predominance of *Archaea* Domain cells (ARC915+MB1174), represented by genera *Methanosarcina* sp. and fluorescent rods. Under the same conditions the biofilm results showed predominance of *Bacteria* Domain cells (EUB338) and those related to the acetate oxidation. In lactate plus sulfate condition the bacteria cells, as *Desulfotomaculum* sp., predominated in batch and differential reactors, justifying the high percentage of *Bacteria* Domain cells. The MPN results showed a high concentration of total anaerobes under lactate plus sulfate condition ($10^{11} - 10^{12}$). For methanogenic archaea this concentration was obtained in the acetate plus sulfate condition (10^4). These results suggest a process equilibrium may have occurred among methanogenesis, acetate oxidation and sulfidogenesis in batch reactors under acetate plus sulfate conditions. However, methanogenesis and acetate oxidation metabolisms predominated in the biofilm. Sulfidogenesis was easier in both reactors, under lactate plus sulfate conditions. In the differential reactors with propionate plus sulfate, the fermentation was in syntrophic co-culture among propionate oxidizing bacteria, methanogenic and hydrogenotrophic sulfate reducing bacteria.

Keywords: Anaerobes, thermophilic, planktonic cells, biofilm, FISH.

1. INTRODUÇÃO

O sulfato é uma importante reserva de enxofre na Terra e está presente como composto dissolvido em mares e oceanos ou como sais insolúveis na ordem de 1,3 e 5,0 megatoneladas, respectivamente. Nos corpos d' água, os compostos de enxofre são oriundos de descargas diretas de efluentes líquidos ou por deposição ácida proveniente dos aerossóis, dos sais dissolvidos do ambiente marinho e das erupções vulcânicas (LETTINGA *et al.*, 1998).

Em relação aos efluentes líquidos, a presença de compostos de enxofre está vinculada com as atividades das indústrias de papel e celulose, como por exemplo, a utilização de sulfeto no processamento do papel reciclado, sulfito na preparação do papel sulfite e tiosulfato no branqueamento de papel e fixadores de fotografia. Os compostos reduzidos de enxofre também são usados nas indústrias de fermentação do melão, nas refinarias de óleos comestíveis e curtumes (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994; LETTINGA *et al.*, 1998). No esgoto sanitário a concentração média de sulfato varia de 20 a 500 mg/L (LETTINGA *et al.*, 1998).

O principal problema de contaminação por sulfato está ligado à sua redução a gás sulfídrico, o qual provoca corrosão em tubulações de esgoto e odor desagradável (McCARTNEY & OLESZKIEWICZ, 1991). Além disso, a poluição por sulfato poderá afetar o ciclo do enxofre na natureza e também a qualidade das águas superficiais e subterrâneas, tornando-as impróprias para o consumo humano (LETTINGA *et al.*, 1998).

Segundo STAMS & OUDE ELFERINK (1997), atualmente, muitos processos biotecnológicos visam a remoção de sulfato das águas residuárias antes de serem lançadas nos corpos receptores ou no meio ambiente. Uma alternativa é a utilização de

biorreatores anaeróbios. Segundo VAZOLLER (1995), o elevado desempenho desses processos é consequência da organização eficiente dos microrganismos, pela formação de nichos ecológicos em lodos granulados ou biofilmes, permitindo maior retenção biológica no sistema operacional.

A redução desassimilatória de sulfato, em reatores anaeróbios, merece atenção especial dos pesquisadores por vários motivos, dentre os quais pode-se destacar a necessidade da remoção do sulfato das águas residuárias que contém esse íon em concentrações elevadas (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). Uma alternativa é a utilização do metabolismo das bactérias redutoras do íon sulfato (BRS), cuja energia para o crescimento celular é obtida através da oxidação de compostos orgânicos e utilização de hidrogênio, durante a redução do sulfato a sulfeto de hidrogênio (BUISMAN *et al.*, 1990; LETTINGA *et al.*, 1998). Os principais nutrientes requeridos pelas BRS são a amônia, como fonte de nitrogênio, formiato, etanol, acetato, fumarato, malato, lactato, piruvato, propionato ou succinato, como fontes de carbono (MARSHALL *et al.*, 1993; LETTINGA *et al.*, 1998).

Geralmente, os reatores anaeróbios são operados sob condições mesofílicas e poucas informações são obtidas para o desempenho em temperaturas termofílicas. No Brasil, VAZOLLER (1995) avaliou o ecossistema microbiano de biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), operado com vinhaça, sob condições termofílicas (55°C). O autor isolou a bactéria redutora do íon sulfato e degradadora do propionato de sódio, identificada como *Desulfotomaculum* sp., com tempo de geração de 38±3 horas.

Os fatores que determinam a distribuição espacial e o desenvolvimento temporal das espécies microbianas predominantes e específicas em biofilmes termofílicos também devem ser avaliados.

Condições físico-químicas e biológicas influenciam a adesão microbiana em suportes orgânicos e inorgânicos (FLETCHER, 1977; ROUXHET & MOZES, 1990; SHREVE *et al.*, 1991). As propriedades dos biofilmes são influenciadas pelo tipo e concentração inicial do substrato disponível (EHLINGER *et al.*, 1987; SPEITEL & DIGIANO, 1987). A estrutura e a rigidez do biofilme, bem como o desprendimento celular do suporte, são características dependentes dos diferentes microrganismos que o constitui e das condições impostas para o seu desenvolvimento (LAZAROVA & MANEM, 1995).

A caracterização dos tipos microbianos na série do Número Mais Provável (NMP) desempenha importante papel para a análise dos grupos presentes no lodo ou biofilme. Embora o NMP forneça importantes informações sobre a concentração dos microrganismos, deve-se ressaltar que muitos não podem ser cultivados em meio artificial, tornando essa técnica inviável (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). Além disso, o NMP pode subestimar o número de microrganismos que estiverem aderidos ao substrato sólido, associados a outras células ou os relacionados em consórcios sintróficos, como as acetogênicas degradadoras de propionato ou butirato. Alguns pesquisadores tentam resolver este problema com as degradadoras sintróficas, adicionando uma espécie metanogênica hidrogenotrófica no meio de diluição do NMP (WU *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1993).

Freqüentemente, as velocidades de conversão do substrato também são usadas para a caracterização microbiana. No tratamento de águas residuárias, as velocidades de conversão podem ser avaliadas, por exemplo, pela quantidade de sólidos suspensos voláteis ou peso seco. Essas respostas propiciam informações valiosas sobre a atividade máxima metabólica possível dos diferentes grupos microbianos. Porém, não podem ser usadas para identificação e quantificação dos microrganismos no lodo ou células que constituem o biofilme (DUBOURGUIER *et al.*, 1988; WU *et al.*, 1992).

Exames microscópicos diretos são importantes na caracterização dos morfotipos celulares presentes nos lodos e biofilmes anaeróbios. É possível visualizar as morfologias presentes no lodo granulado e biofilme através de técnicas microscópicas simples, sem preparação prévia das amostras. Podem ser utilizadas também, práticas mais específicas como a fixação e/ou coloração das amostras antes do exame microscópico, a fim de possibilitar um aumento na qualidade do estudo morfológico das células microbianas. No estudo dos organismos metanogênicos, o exame morfológico sob microscopia de epifluorescência é bastante facilitado pela presença do fator F₄₂₀ nessas células, resultando na autofluorescência celular sob luz ultra-violeta. (DODDEMA & VOGELS, 1978).

Outros procedimentos vantajosos para examinar lodos e biofilmes incluem a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (VARESCHE *et al.*, 1997) e a microscopia confocal a laser (MCL) (VAZOLLER, 1995).

É importante salientar que os exames de microscopia eletrônica de varredura, óptica comum, contraste de fase e de fluorescência permitem compreender melhor os processos de evolução de biofilmes anaeróbios, através do estudo da estrutura e

composição microbiana de agregados celulares. Porém, o conjunto dos métodos citados apenas auxilia na caracterização morfológica, não constituindo uma avaliação segura para a identificação dos organismos pertencentes aos Domínios *Archaea* e *Bacteria*. De acordo com ZELLNER *et al.* (1993), a melhor maneira de estudar a estrutura e composição de lodos e biofilmes anaeróbios consiste na combinação de técnicas tradicionais, como por exemplo, a técnica do NMP e moleculares incluindo àquelas relacionadas ao uso de sondas genéticas para hibridação *in situ* das amostras.

Portanto, o presente trabalho é uma contribuição para o estudo de biofilmes microbianos e células planctônicas em reatores anaeróbios de leito fixo e em batelada, respectivamente, empregando-se métodos clássicos para quantificação de anaeróbios estritos e hibridação *in situ* na avaliação da metanogênese e sulfetogênese, com diferentes substratos orgânicos de crescimento. Sob tais condições, buscou-se analisar a degradação de acetato, lactato ou propionato na presença de sulfato, além de verificar a ocorrência das bactérias anaeróbias, arqueas metanogênicas e BRS que atuaram nos dois sistemas estudados.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar o crescimento celular planctônico e aderido em reatores anaeróbios de batelada e de leito fixo com suporte, respectivamente, sob condições termofílicas e com diferentes substratos orgânicos, na presença de sulfato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as populações metanogênicas e não metanogênicas na presença de substratos orgânicos e de sulfato, através de técnicas clássicas de anaeróbios estritos e de Biologia Molecular (FISH) com sondas específicas para os Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338) e para o grupo geral de BRS (SRB385);
- Avaliar a capacidade das culturas enriquecidas na degradação de substratos orgânicos e sulfato em reatores anaeróbios;
- Verificar a dinâmica de formação e desenvolvimento do biofilme microbiano termofílico em matrizes de poliuretano, em reatores diferenciais, através de exames microscópicos;
- Avaliar os produtos do metabolismo microbiano durante a digestão anaeróbia em reatores em batelada e diferenciais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS REDUTORAS DO ÍON SULFATO (BRS)

De acordo com CANHOS & VAZOLLER (1999), os microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* encontram-se presentes nos mais diversos habitats. Apresentam diversidade metabólica com representantes heterotróficos, organotróficos, quimiorganotróficos, litotróficos e fototróficos. As bactérias redutoras do íon sulfato estão alocadas neste Domínio, de acordo com a filogenética construída com base na comparação de seqüências do RNAr 16S (MADIGAN *et al.*, 1997; CANHOS & VAZOLLER, 1999).

Segundo CASTRO *et al.* (2000), as BRS estão filogeneticamente agrupadas em quatro grupos distintos: BRS Gram-negativas, BRS formadoras de esporos Gram-positivas, BRS termofílicas e arqueas termofílicas redutoras do íon sulfato.

As BRS Gram-negativas são organismos heterotróficos e estão alocadas na subdivisão delta de *Proteobacteria*. Em algum ponto da história evolutiva, a subdivisão delta divergiu de outra *Proteobacteria* a partir de um ancestral comum fototrófico). Além das BRS, esta subdivisão inclui as bactérias redutoras de enxofre *Desulfurella*, *Desulforomusa* e *Desulforomonas*, *Myxobacteria* e *Bdellovibrio*, *Pelobacter* e *Geobacter* (WOESE *et al.*, 1984). As relações filogenéticas entre as BRS e outros membros da subdivisão delta ainda não estão bem esclarecidas. CASTRO *et al.* (2000) comentaram que os grupos *Myxobacteria* e *Bdellovibrio* apresentam adaptações aeróbias derivadas de um ancestral capaz de metabolizar enxofre. Contudo,

DEVEREUX *et al.* (1992) relataram que a posição exata do grupo *Myxobacteria* é afetada pela seqüência do grupo externo na árvore filogenética sugerindo que sua origem, provavelmente, não foi a partir do grupo das BRS.

Pelobacter e *Geobacter* reduzem Fe(III) a Fe(II), uma característica metabólica parcialmente compartilhada com algumas BRS pertencentes a este grupo. Contudo, ainda não se sabe se as BRS Gram-negativas que reduzem Fe(III) a Fe(II) são capazes de crescer com Fe(III) como único aceptor de elétrons (CASTRO *et al.*, 2000).

Dentro do grupo delta de *Proteobacteria* foram propostas duas famílias de BRS: (1) *Desulfovibrionaceae* e (2) *Desulfobacteriaceae* (WIDDEL & BAK, 1992). A primeira inclui os gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium*. A segunda corresponde a todas as demais BRS do grupo delta de *Proteobacteria*. Esta última classificação inclui espécies dos gêneros *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfobotulus* e *Desulfoarculus*. Baseados em análises das seqüências do RNAr, CASTRO *et al.* (2000) sugeriram que os gêneros *Desulfobacula*, *Desulfospira*, *Desulfocella*, *Desulfobacca*, *Desulfacinum*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulforhabdus*, *Desulfocapsa*, *Desulforhapalus* e *Desulfofofustis* também sejam incluídos na segunda família. Os autores afirmaram que, embora a maioria dos membros dessa família possua representantes mesofílicos, *Desulfacinum infernum* e *Thermodesulforhabdus norvegicus* são termofílicos. Aspectos morfológicos interessantes da Família *Desulfobacteriaceae*, como por exemplo, a formação de arranjos em sarcinas observados em *Desulfosarcina* sp., auxilia na proteção contra mudanças ambientais desfavoráveis ou relacionadas, por exemplo, como a alteração do potencial redox (CASTRO *et al.*, 2000).

O grupo das BRS formadoras de esporos é representado principalmente pelo gênero *Desulfotomaculum*. Este compartilha características morfo-fisiológicas com *Bacillus* sp. e *Clostridium* sp., ou seja, forma endosporos resistentes ao calor, as células são Gram-positivas e apresentam baixo conteúdo de guanina e citosina (GC) no DNA. Embora a maioria das BRS cresça em temperaturas mesofílicas, na faixa de 25°C a 40°C, algumas espécies de *Desulfotomaculum* são termofílicas, com temperatura ótima entre 40°C e 65°C. Deve-se destacar também, que diferentes espécies de *Desulfotomaculum* apresentam grande versatilidade em relação ao tipo de doadores de elétrons usado para o crescimento, como por exemplo, acetato, anilina, succinato, catecol, indol, etanol, nicotinato, fenol, estearato entre outros, oxidando-os completa ou incompletamente,

respectivamente, a dióxido de carbono e acetato. Além disso, a espécie *Desulfotomaculum reducens* é capaz de utilizar Fe(III) como único acceptor final de elétrons em contraste com as BRS do grupo delta de *Proteobacteria* (CASTRO *et al.*, 2000).

No grupo BRS termofílica, as espécies melhores caracterizadas são *Thermodesulfobacterium commune* e *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, ambas isoladas de águas hidrotermais do Parque Nacional de Yellowstone (E.U.A.). As duas bactérias apresentaram temperatura ótima de crescimento de 65°C e 70°C, respectivamente, oxidaram incompletamente o acetato e utilizaram um número limitado de doadores de elétrons (LOWE *et al.*, 1993). Embora apresentem características fisiológicas e fenotípicas semelhantes, diferem na morfologia e conteúdo de GC no DNA. Análises das seqüências do RNAr 16S também sugerem que as duas espécies são filogeneticamente distantes, confirmando sua colocação em gêneros distintos (CASTRO *et al.*, 2000).

O grupo das arqueas termofílicas redutoras do íon sulfato apresentam temperatura ótima de crescimento acima de 80°C. Apenas duas espécies foram descritas até agora, ambas isoladas de sistemas marinhos hidrotermais, *Archaeoglobus fulgidus* e *Archaeoglobus profundus* (CASTRO *et al.*, 2000). Segundo os autores, a espécie *A. fulgidus* isolada possui flagelo, apresenta metabolismo quimiolitotrófico e produz pequenas quantidades de metano. No entanto, a espécie *A. profundus* não apresenta flagelo, é quimiolitoheterotrófica obrigatória e não produz metano. Usando análises fisiológicas e seqüências dos RNAr 16S e 23S, WOESE *et al.* (1984) indicaram que a espécie *A. fulgidus* foi considerada halófila extrema, incluída na Ordem *Methanomicrobiales* do Reino *Euryarchaeota*, com origem ancestral metanogênica. A questão de como a redução de sulfato em *Archaeoglobus* foi adquirida continua sem explicação, porém CASTRO *et al.* (2000) sugeriram que os ancestrais comuns dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente, possuíam a enzima ou o gene, posteriormente transferidos para *Archaeoglobus* pouco depois da divergência dos domínios.

Portanto, as BRS fazem parte de um grupo heterogêneo de procariotos que apresentam a capacidade peculiar de utilizar o íon sulfato como acceptor final de elétrons na oxidação da matéria orgânica, reduzindo-o a sulfeto de hidrogênio, no processo denominado redução desassimilativa do sulfato ou respiração anaeróbia do sulfato (CASTRO *et al.*, 2000). São microrganismos anaeróbios estritos, ou seja, presentes em

ambientes isentos de oxigênio, com potencial de oxi-redução de -200mV (WIDDEL, 1988; SCHAUDER & KRÖGER, 1993; MADIGAN *et al.*, 1997). Em relação à temperatura, estes microrganismos têm representantes psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos, bem como halófilos, hiperhalófilos e halófilos moderados, em relação às concentrações de cloreto de sódio (LOWE, 1993; HANSEN, 1994).

As BRS, em sua maioria, são quimiorganotróficas (WIDDEL & PFENNIG, 1984) e utilizam como doadores de elétrons compostos de baixo peso molecular como ácidos orgânicos, ácidos graxos, alcoóis e hidrogênio, os quais são conhecidos como metabólitos ou produtos finais do processo de fermentação anaeróbia de carboidratos e proteínas. Contudo, algumas BRS utilizam apenas o hidrogênio como única fonte de elétrons (WIDDEL, 1998). Outras BRS são capazes de utilizar alcoóis com mais de três carbonos, açúcares como a glicose e frutose, indol, fenol ou catecol (OLLIVIER *et al.*, 1994). Ainda, algumas espécies pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* podem crescer autotroficamente com CO₂ como única fonte de carbono (WIDDEL, 1988; WIDDEL & BAK, 1992).

Segundo COLLERAN (1994), em relação à nutrição, teoricamente existem quatro diferentes processos que envolvem as BRS: (1) oxidação completa dos produtos da acidogênese a dióxido de carbono e redução de sulfato a sulfeto, (2) oxidação incompleta dos produtos da acidogênese a acetato, (3) degradação sintrófica dos compostos intermediários, ácidos orgânicos e álcoois, pelas bactérias acetogênicas com BRS utilizadoras de hidrogênio e (4) crescimento fermentativo das BRS em substratos como propionato e etanol. Na ausência de sulfato ocorre a associação sintrófica com metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas.

Como mencionado anteriormente, dentro da diversidade nutricional das BRS dois grupos metabólicos são distinguidos pela capacidade de oxidar compostos orgânicos: (1) o grupo das oxidadoras completas ou acetoclásticas, capazes de usar completamente os substratos orgânicos, incluindo o acetato, a dióxido de carbono e (2) o grupo das oxidadoras incompletas ou acetogênicas, que utilizam incompletamente os compostos orgânicos como lactato a acetato e dióxido de carbono (WIDDEL, 1988; COLLERAN, 1994; STAMS & OUDE ELFERINK, 1997).

Entre as oxidadoras completas são conhecidos os seguintes representantes: *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* e *Desulfobacterium*.

Exceções são encontradas entre *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfotomaculum sapomandens* e *Desulfovibrio baarsii*, que diferem dos demais representantes do mesmo gênero e classificados nesse grupo metabólico (MADIGAN *et al.*, 1997). Embora definidas como oxidadoras completas, seus representantes não apresentam a mesma eficiência na utilização do acetato. Tipos especializados como *Desulfobacter* usam acetato como único substrato orgânico e crescem bem, com tempo de geração de 20 horas (WIDDEL & PFENNIG, 1981). Outras oxidadoras completas preferem outros ácidos orgânicos ou álcool, e usam acetato muito lentamente com baixa produção celular (WIDDEL, 1988).

São exemplos de oxidadoras incompletas, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas pigra*, *Desulfovibrio thermophilus*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Thermodesulfobacterium commune* e *Desulfobulbus* (WIDDEL, 1998). Apenas compostos com um ou dois carbonos como oxalato e glicina, formiato e metanol, respectivamente, podem ser oxidados completamente. O acetato poderá ser assimilado como fonte de carbono orgânico no material celular se esses organismos utilizarem hidrogênio ou formiato como doadores de elétrons. As oxidadoras incompletas são nutricionalmente menos versáteis que as oxidadoras completas (WIDDEL, 1998). Provavelmente, entre as BRS acetogênicas a mais versátil seja a *Desulfovibrio* sp. que utiliza não apenas hidrogênio, lactato, piruvato, malato, fumarato e etanol, mas também glicerol, colina e aminoácidos (STAMS *et al.*, 1995).

A característica especial das BRS é a capacidade de utilizar compostos orgânicos reduzidos como propionato e butirato. Algumas oxidam completamente esses compostos a dióxido de carbono, enquanto outras levam apenas a acetato. Outros compostos podem ser completa ou incompletamente degradados como ácidos graxos de cadeias longas e ramificadas, etanol e outros alcoóis, ácidos orgânicos como lactato, succinato e malato e aqueles contendo radicais fenila, bem como compostos aromáticos como benzoato, catecol, fenol, indol e anilina (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). Compostos sem grupo funcional, como tolueno e alcanos também podem ser degradados pelas BRS (BAK & WIDDEL, 1991). Todos esses compostos representam, do ponto de vista bioenergético, substratos de baixa energia sob condições anaeróbias (MADIGAN *et al.*, 1997).

A Tabela 1 apresenta algumas reações importantes realizadas pelas BRS e os respectivos valores das variações de energia livre. Pode-se observar que todas as reações de redução desassimilatória do íon sulfato são termodinamicamente possíveis.

Tabela 1. Reações de redução de sulfato e os respectivos valores de energia livre.

SUBSTRATO	REAÇÃO	ΔG° (kJ/mol) ¹	ΔG° (kJ/mol) ²
Hidrogênio	$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow 4H_2O + HS^-$	-152,2	-
Acetato	$CH_3COO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2HCO_3^- + HS^-$	-47,6	-
Propionato	$4CH_3CH_2COO^- + 3SO_4^{2-} \rightarrow 4CH_3COO^- + 4HCO_3^- + 3HS^- + H^+$	-150,6	-
Lactato	$2CH_3CHOHCOO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + HS^- + H^+$ $2CH_3CHOHCOO^- + 3SO_4^{2-} \rightarrow 6HCO_3^- + 3HS^- + H^+$	-160,1 -255,3	-
Formiato	$4CHOO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 4HCO_3^- + S^{2-}$	-	-182,6
Malato	$2C_2HOHCOO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 2CO_2 + 2HCO_3^- + S^{2-}$	-	-181,0
Etanol	$2C_2H_5OH + SO_4^{2-} \rightarrow 2CH_3COO^- + 2H_2O + S^{2-}$	-	-59,3
Piruvato	$4CH_3COCOO^- + SO_4^{2-} \rightarrow 4CH_3COO^- + 4CO_2 + S^{2-}$	-	-331,0
Succinato	$4C_2H_4COO^{2-} + 3SO_4^{2-} \rightarrow 4CH_3COO^- + 4CO_2 + 4HCO_3^- + 3S^{2-}$	-	-150,4
Fumarato	$2C_2H_2COO^{2-} + 2H_2O + SO_4^{2-} \rightarrow 2CH_2COO^- + 2CO_2 + 2HCO_3^- + S^{2-}$	-	-190,1

Fonte: WIDDEL (1988)¹, POSTGATE (1979)².

3.1.1. UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS ORGÂNICOS

3.1.1.1. ACETATO

O acetato, juntamente com o hidrogênio, é um dos principais intermediários na decomposição anaeróbia de compostos orgânicos em ambientes naturais e em biorreatores anaeróbios (ZHENDER, 1983; OUDE ELFERINK *et al*, 1994). As espécies que utilizam acetato exibem atividades da enzima monóxido de carbono desidrogenase que catalisa a molécula de acetato. A ausência de outras enzimas como a 2-cetoglutarato desidrogenase, sugere a quebra do acetato em metila e dióxido de carbono. Algumas culturas que realizam tal metabolismo podem apresentar tempo de

aproximadamente 30 horas, como por exemplo, *Desulfotomaculum acetoxidans* (WIDDEL, 1988).

A degradação desse composto pode ser realizada anaerobiamente de duas maneiras: (1) sob concentração limitante ou ausência de sulfato, o acetato é utilizado principalmente por organismos metanogênicos acetoclásticos e (2) sob disponibilidade de sulfato, as BRS acetoclásticas utilizam-no em seu metabolismo (WIDDEL, 1988; STAMS, 1994).

Segundo OUDE ELFERINK *et al.* (1995), a maioria das BRS Gram-negativas utilizadoras de acetato cresce preferencialmente em ambientes marinhos. Entretanto, outras BRS Gram-negativas de ambientes de água doce tais como *Desulfoarculus barsii*, *Desulfobacterium cathecolicum* e *Desulfococcus biacutus* crescem muito pouco com acetato. Porém, espécies de *Desulfobacter* são nutricionalmente especializadas e crescem adequadamente com acetato, hidrogênio e etanol.

Desulfotomaculum acetoxidans é exemplo de BRS Gram-positiva utilizadora de acetato e proveniente de ambiente de água doce. Contudo, a maioria das espécies desse gênero prefere temperaturas mais altas (WIDDEL, 1988; WIDDEL, 1992; LOWE *et al.*, 1993; OUDE ELFERINK *et al.*, 1995).

OUDE ELFERINK *et al.* (1995) isolaram duas BRS acetoclásticas mesofílicas, denominadas *Desulforhabdus amnigenus* linhagem ASRB1 e *Desulfobacca acetoxidans* linhagem ASRB2. Sendo a primeira isolada do lodo granulado de reator UASB em escala piloto, tratando água residuária de indústria de papel. A segunda foi isolada de reator UASB, em escala de laboratório, alimentado com acetato e sulfato. No reator em escala piloto, a relação DQO/sulfato era de aproximadamente 1,1, sendo 75% da DQO degradada via redução de sulfato. O reator, em escala de laboratório, era operado com excesso de sulfato e relação DQO/sulfato de 0,6. Nesse sistema, o acetato foi degradado via redução de sulfato. As culturas de BRS acetoclásticas, mencionadas anteriormente, foram isoladas pela diluição seriada do lodo, a 37°C, e apresentaram bom crescimento com acetato e sulfato. Os resultados indicaram que as espécies foram degradadoras de acetato e dominantes nos lodos de origem. Contudo, foram marcantes as diferenças fisiológicas das duas BRS acetoclásticas. *Desulfobacca acetoxidans* foi estrita em relação ao substrato, utilizou apenas acetato como única fonte de carbono e energia e apresentou tempo de geração, sob as condições estudadas, de aproximadamente 1,7 a 2,2 dias. *D. amnigenus* utilizou ampla variedade de substratos, tais como acetato,

propionato, butirato, lactato, hidrogênio mais dióxido de carbono e alcoóis, com tempo de geração de 3,5 a 5,0 dias.

PIKUTA *et al.* (2000) isolaram da mistura de esterco bovino e suíno, na proporção de 1:1, uma bactéria redutora de sulfato termofílica quimiolitoheterotrófica, denominada *Desulfotomaculum alkaliphilum*. A espécie isolada cresceu sob anaerobiose estrita e apresentou as seguintes características: bacilos Gram-positivos, ligeiramente curvos com extremidades arredondadas, ocorrem sozinhos, em pares ou em curtas cadeias espiraladas, formam esporos e apresentam crescimento ótimo em valores de pH e temperatura na faixa de 8,6 a 8,7 e 50 a 55°C, respectivamente. A bactéria foi cultivada e isolada sob condições anaeróbias a 55°C, em meio mineral suplementado com vitaminas e solução traço de metais. Sob tais condições, os autores relataram que na presença de sulfato a linhagem cresceu com hidrogênio e acetato, formiato, etanol, lactato e piruvato. Quando esse microrganismo foi cultivado em etanol, lactato ou piruvato, produtos finais do metabolismo como ácido acético e outros ácidos voláteis como propiônico, valérico e isovalérico foram encontrados em quantidades traços. Segundo os autores, essa linhagem não cresceu com acetato, propionato, butirato, metanol, glicerol, extrato de levedura, peptona, metilamina, caseína, cisteína, valina, sorbitol, dulcitol, manitol, inositol, glicose, sacarose, arabinose, lactose ou xilose.

3.1.1.2. LACTATO

O lactato é um importante intermediário metabólico na digestão anaeróbia de resíduos e pode ser degradado através de diferentes rotas bioquímicas anaeróbias (VAZOLLER, 1995). Segundo WIDDEL & HANSEN (1992), a oxidação do lactato a piruvato é mediada pela enzima lactato desidrogenase e é descarboxilado em acetil-CoA por *Desulfovibrio vulgaris*, com flavodoxinas ou ferredoxinas usadas como aceptores de elétrons.

Segundo WIDDEL (1998), a degradação do lactato pelas BRS ocorre com certa facilidade através da respiração anaeróbia do sulfato ou pela fermentação. O lactato é o doador de elétrons preferencial para a maioria dessas espécies. Os resultados de QATIBI *et al.* (1991) para lodos mesofílicos, revelaram a preferência da respiração do sulfato na presença de lactato, em relação à fermentação desse composto, por bactérias redutoras

do íon sulfato. Nesse processo, o acetato foi o produto final. A fermentação do lactato, por sua vez, resultou na formação em quantidades semelhantes de acetato e propionato.

O lactato é um excelente substrato orgânico para o enriquecimento, isolamento, contagens e cultivo de bactérias redutoras de sulfato, principalmente para *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* (WIDDEL, 1988). As espécies de *Desulfovibrio* são capazes de utilizar tanto o *L*-lactato quanto o *D*-lactato. Contudo, as oxidadoras completas, como por exemplo, *Desulfobacter* sp., *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfovibrio barsii*, *Desulfococcus niacini*, *Desulfobacterium* sp. e *Desulfonema magnum* não crescem com lactato. Com exceção de *Desulfovibrio sapovorans*, outras BRS que oxidam incompletamente ácidos graxos, não conseguem utilizar o lactato (WIDDEL & HANSEN, 1992). A BRS *Desulfovibrio thermophilus*, capaz de oxidar incompletamente o lactato, cresce autotroficamente com hidrogênio e dióxido de carbono ou formiato. A BRS *Thermodesulfobacterium commune*, isolada em temperatura de 70°C, cresce com lactato ou hidrogênio (WIDDEL, 1988).

Com exceção de *Desulfovibrio sapovorans*, as BRS que realizam oxidação incompleta do lactato geralmente são capazes de crescer apenas com hidrogênio como doador de elétrons. Esse aspecto foi demonstrado para diferentes espécies de *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbeus* e *Thermodesulfobacterium commune* (WIDDEL, 1988).

Sob condições mesofílicas (37°C), McINERNEY & BRYANT (1981) observaram degradação sintrófica anaeróbia do lactato entre *Desulfovibrio* sp. e arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina* sp., na ausência de sulfato. De acordo com os autores, a espécie *Methanosarcina smithii* utilizou apenas hidrogênio ou formiato, enquanto hidrogênio, acetato, metanol ou metilaminas foram usados por *Methanosarcina barkeri*. Nos ensaios experimentais, na ausência de sulfato, os autores verificaram que co-culturas sintróficas formadas por *Desulfovibrio desulfuricans* e *M. smithii* oxidaram lactato a acetato e dióxido de carbono, como produtos finais. Nas mesmas condições, *D. desulfuricans* e *M. barkeri* degradaram completamente lactato a metano e dióxido de carbono. Os autores realizaram ensaios com *D. desulfuricans* e *M. barkeri* em meio mineral, acrescido de acetato (20mM) mais lactato (20mM), e verificaram que a degradação do acetato não ocorreu até o lactato ser completamente catabolizado.

3.1.1.3. PROPIONATO E BUTIRATO

Depois do acetato, o propionato e o butirato são provavelmente os mais importantes produtos orgânicos da decomposição fermentativa da biomassa, em sedimentos e lodos anaeróbios (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). Além disso, a degradação do propionato e butirato a metano é possível apenas pela associação sintrófica de metanogênicas e bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio (WIDDEL, 1988). Porém, na presença de sulfato, as BRS apresentam considerável vantagem ecológica sobre as degradadoras sintróficas. De acordo WIDDEL (1988), teoricamente, a mineralização de propionato e butirato, na presença de sulfato, pode ser realizada por duas vias: (1) simbiose entre BRS hidrogenotróficas e acetoclásticas com bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio. Co-culturas entre esses microrganismos crescem mais rápido do que com as com metanogênicas, indicando a vantagem competitiva da redução de sulfato *versus* metanogênese e (2) utilização direta de ácidos graxos pelas BRS, como observado em culturas puras.

Considerando as duas possibilidades, BANAT & NEDWEEL (1983) determinaram que a utilização de propionato e butirato em sedimentos de pântano foi inibida pelo molibdato como antagonista do sulfato, mas não pelo aumento na concentração de hidrogênio. A partir desse dado, os autores concluíram que estes substratos orgânicos foram de fato diretamente oxidados pelas BRS. Aparentemente, a oxidação do propionato e butirato via redução de sulfato foi mais rápida e efetiva em relação à via sintrófica.

WIDDEL & PFENNIG (1982) isolaram *Desulfobulbus propionicus*, capaz de crescer com propionato mais sulfato, sob condições mesofílicas (37°). A cultura foi isolada em meio mineral com vitaminas, bicarbonato, propionato e sulfato. Os autores verificaram que *D. propionicus* foi capaz de oxidar o propionato sem depender de organismos sintróficos. Além disso, a cultura também cresceu com lactato, piruvato, etanol e propanol oxidando-os a acetato, como produto final. Porém, não cresceu com acetato, valerato, succinato, fumarato, malato e açúcares. Sulfato, sulfeto e tiosulfato foram utilizados como aceptores de elétrons. Os bacilos isolados foram elipsoidais ou em formato de limão.

VAZOLLER (1995), a partir de lodo granulado proveniente de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo termofílico (55°C) operado com vinhaça,

isolou uma cultura de BRS termofílica capaz de degradar propionato na presença de sulfato. Tal cultura cresceu em meio Zinder contendo propionato de sódio (20mM) e sulfato de sódio (10mM). De acordo com o autor, as células isoladas apresentam forma de bacilos livres ou em pares, extremidades afiladas, formam esporos centrais, tamanhos entre 3,0 μ m - 5,0 μ m de comprimento e 0,6 μ m - 0,8 μ m de diâmetro e velocidade específica máxima de crescimento de 0,017h⁻¹. A cultura isolada cresceu bem com o substrato orgânico lactato de sódio (20mM) e sulfato de sódio (10mM). Pelos resultados obtidos, o autor sugere que o organismo isolado pertence ao gênero *Desulfotomaculum*.

WALLRABENSTEIN *et al.* (1995) isolaram uma bactéria fermentativa oxidadora de propionato denominada *Syntrophobacter pfennigii* linhagem KoProp1, sob condições mesofílicas (37°C). Tal organismo é capaz de oxidar propionato ou lactato em sintrofismo com a arquea metanogênica hidrogenotrófica *Methanospirillum hungatei*. As células da linhagem isolada apresentam forma de bacilos ligeiramente curvos com extremidades arredondadas, podem estar sozinhos, em pares ou em cadeia, são Gram-negativas, apresentam conteúdo de GC no DNA igual a 57,3mol% e não formam endosporos, apesar de vesículas gasosas serem observadas no final da fase de crescimento.

WALLRABENSTEIN *et al.* (1995) salientaram ainda que a linhagem KoProp1 apresenta características semelhantes a *Syntrophobacter wolinii* e está filogeneticamente correlacionada a essa espécie, apresentando divergência na seqüência de pares de bases de apenas 4%. Entretanto, diferem em relação à morfologia. Comparações entre as seqüências de RNAr 16S revelaram que as espécies *Syntrophobacter pfennigii* linhagem KoProp1 e *Syntrophobacter wolinii* também estão filogeneticamente relacionadas ao grupo das bactérias redutoras de sulfato. Contudo, a fisiologia e a bioquímica da linhagem isolada diferem substancialmente de *Desulfobulbus propionicus* e *Desulfobulbus elongatus*. Estas últimas oxidam incompletamente propionato, na presença de sulfato. Porém, não oxidam sintroficamente com metanogênicas hidrogenotróficas esse substrato orgânico, na ausência de sulfato. Fisiologicamente, a linhagem KoProp1 caracteriza-se pelo metabolismo quimiorganotrófico sob anaerobiose estrita, cresce em cultura pura com propionato ou lactato, utilizando sulfato como aceptor de elétrons. Porém, não cresce com glicose, frutose, xilose, arabinose, etanol, metanol, piruvato, succinato, fumarato, oxalacetato, malato, butirato e valerato. Sulfito e tiosulfato também podem ser utilizados como aceptores de elétrons alternativos.

HARMSSEN *et al.* (1998) isolaram uma bactéria sintrófica oxidadora de propionato denominada *Syntrophobacter fumaroxidans* linhagem MPOB^T, proveniente de lodo granulado anaeróbio, sob condições mesofílicas (37°C). Segundo os autores, a linhagem isolada oxidou propionato (20mM) sintroficamente em co-cultura com a hidrogenotrófica *Methanospirillum hungatei*, convertendo o substrato orgânico a acetato, dióxido de carbono e metano. Em cultura pura, na ausência de sulfato, cresceu com fumarato (20mM), malato (20mM), piruvato (20mM), propionato (20mM) e fumarato (20mM), hidrogênio (80%) e fumarato (20mM), formiato (20mM) e fumarato (20mM). Na presença de sulfato (20mM), cresceu em cultura pura com propionato (20mM), formiato (20mM), succinato (20mM), hidrogênio (80%). Porém, o mesmo não foi observado com butirato (10mM), isobutirato (10mM), acetato (20mM), lactato (20mM), butanol (10mM), propanol (20mM), etanol (20mM), metanol (10mM), frutose (10mM), xilose (10mM) e glutamato (20mM). Além de sulfato, tiosulfato e fumarato foram usados como aceptores de elétrons. Os autores verificaram que as células isoladas são bacilos com extremidades afiladas, Gram-negativas, não formam endosporos e apresentam conteúdo de GC no DNA igual a 60,6mol%. A linhagem MPOB^T apresenta características semelhantes às espécies oxidadoras de propionato *S. wolinii* e *S. pfennigii*. Essas últimas também crescem com propionato em co-cultura com *M. hungatei* ou em cultura pura via redução de sulfato. Contudo, *S. wolinii* utiliza fumarato e piruvato em cultura pura, e *S. pfennigii* cresce em co-cultura com propanol e lactato. No entanto, a utilização de succinato e formiato como substratos para redução de sulfato não foi observada nesses dois representantes.

De acordo com os autores, comparações entre as seqüências de RNAr 16S revelaram que filogeneticamente as espécies oxidadoras sintróficas de propionato *S. wolinii*, *S. pfennigii*, linhagem HP1.1 e a linhagem isolada MPOB^T estão estreitamente relacionadas e pertencem à subclasse delta de *Proteobacteria*. Estas espécies estão alocadas no mesmo grupo filogenético da BRS *Desulforhabdus amnigenus*, que é incapaz de crescer sintroficamente com propionato.

3.1.2. CRESCIMENTO SINTRÓFICO

Na ausência de sulfato, vários tipos de BRS crescem pela fermentação de substratos orgânicos. Algumas espécies de *Desulfovibrio* e *Desulfobacterium* fermentam fumarato e malato. *Desulfosarcina variabilis* fermenta apenas malato. Os produtos da fermentação são succinato, acetato, dióxido de carbono e às vezes propionato (WIDDEL & PFENING, 1984). O piruvato é facilmente fermentado por várias BRS como *Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Desulfobulbus* sp, *Desulfococcus* sp. e *Desulfobacterium* sp. (WIDDEL, 1988). Os produtos da fermentação do piruvato por *Desulfovibrio desulfuricans* são o acetato, dióxido de carbono e hidrogênio (STAMS *et al.*, 1985).

Segundo WIDDEL & PFENNING (1981), a espécie *Desulfovibrio sapovorans* não possui hidrogenase e excreta o lactato, acetato e dióxido de carbono como produtos da fermentação. Várias linhagens de *Desulfobulbus* fermentam o lactato ou etanol, mais dióxido de carbono, produzindo propionato e acetato (WIDDEL & PFENNING, 1982). Deste modo, *Desulfobulbus* sp. não apenas oxida como excreta propionato. A espécie *Desulfovibrio desulfuricans* pode fermentar colina a trimetilamina, etanol e acetato (FIEBIG & GOTTSCHALK, 1983).

Espécies de *Desulfovibrio* sp. que não fermentam etanol ou lactato, crescem com esses compostos na ausência de sulfato se estiverem em co-cultura com arqueas metanogênicas hidrogenotróficas. Nessas associações sintróficas, as BRS atuam como bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio (TRAORE *et al.*, 1983).

As bactérias redutoras de sulfato em associação sintrófica com metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas degrada alcoóis, formiato e propionato, na ausência de sulfato. TANAKA (1992) afirmou que organismos semelhantes a *Desulfovibrio* sp. e *Methanospirillum humgatei* degradaram sintroficamente 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1-butanol e 1-propanol, na presença de acetato (10mM). WU *et al.* (1991 e 1992) relataram que as BRS em associação sintrófica com organismos hidrogenotróficos degradaram propionato. Em relação à dinâmica populacional, a conversão do propionato é termodinamicamente possível a baixas pressões parciais de hidrogênio e concentrações de formiato (HARMSSEN *et al.*, 1996). Tais condições favorecem consórcios sintróficos entre organismos acetogênicos e metanogênicos, sendo os primeiros responsáveis pela

conversão do propionato a acetato, dióxido de carbono, hidrogênio e/ou formiato, subsequentemente utilizados pelas metanogênicas (STAMS, 1994).

3.1.3. CONSUMO DE SUBSTRATOS FERMENTÁVEIS

Na fermentação de lactato, etanol ou aminoácidos, as BRS competem com as bactérias fermentativas. Em concentrações limitantes de crescimento, em reatores enriquecidos, o lactato e o etanol foram utilizados por espécies de *Desulfovibrio* (LAANBROEK *et al.*, 1982). Estudos sobre a inibição de consumo de substrato com adição de molibdato em sedimento de lago sugeriram que as BRS usaram diretamente o lactato em baixa concentração (SMITH & KLUG, 1981). Há evidências no mesmo estudo que os aminoácidos foram diretamente usados pelas BRS. O lactato em alta concentração foi utilizado para o enriquecimento rápido e seletivo de espécies de *Desulfovibrio* (POSTGATE, 1984). Contudo, o lactato adicionado (10mmoles/L) em amostra de sedimento estuarino não foi oxidado com sulfato, mas fermentado devido à abundância populacional das bactérias fermentativas (LAANBROEK & PFENNIG, 1981). Posteriormente, os produtos de fermentação, propionato e acetato, foram oxidados como doadores de elétrons para a redução de sulfato. O lactato e o etanol, presentes em altas concentrações, em reatores em batelada enriquecidos, foram seletivos para as espécies de *Desulfovibrio* (LAANBROEK *et al.*, 1982).

A presença dos substratos lactato e etanol favoreceram a ocorrência do metabolismo fermentativo em algumas espécies de *Desulfobulbus*, produzindo propionato e acetato. Espécies de *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* que não cresceram pelo metabolismo fermentativo do etanol ou do lactato, cresceram com esses compostos na ausência de sulfato em co-cultura com organismos metanogênicos e hidrogenotróficos, obtendo energia apenas pela oxidação do substrato (WIDDEL & HANSEM, 1992). O piruvato foi facilmente fermentado por espécies que utilizaram o lactato, como por exemplo, *Desulfovibrio desulfuricans* que produziram acetato, dióxido de carbono e hidrogênio (POSTGATE, 1979).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA ARQUEAS METANOGÊNICAS (AM)

Os organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* são considerados únicos, com propriedades metabólicas extraordinárias e filogenia particular. Compreendem organismos anaeróbios sensíveis ao oxigênio, termófilos e halófilos extremos. São organismos evolutivamente distintos daqueles pertencentes ao Domínio *Bacteria* em função das características de organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia; apesar de ambos apresentarem organização celular procariótica (CANHOS & VAZOLLER, 1999).

Alguns organismos, pertencentes a este Domínio, apresentam vias metabólicas semelhantes às aquelas encontradas em organismos do Domínio *Bacteria*. Porém, outros apresentam vias metabólicas raras, como as arqueas metanogênicas, que através de sistemas enzimáticos únicos, produzem gás metano. O metabolismo autotrófico é comum em muitos organismos metanogênicos e termófilos extremos. Existem também arqueas quimiorganotróficas que utilizam diferentes compostos orgânicos como fonte de energia para o seu crescimento (MADIGAN *et al.*, 1997).

A árvore filogenética do Domínio *Archaea*, baseada na análise de seqüências do RNAr 16S, compreende 3 subdivisões, representadas pelos Reinos *Euryarchaeota*, *Chenarchaeota* e *Korarchaeota*. O primeiro reino inclui grupos extremamente diversos como *Archaeoglobus* spp., halófilos extremos como *Halobacterium* spp. e *Halococcus* spp., espécies metanogênicas como *Methanobacterium* spp., *Methanococcus* spp., *Methanosarcina* spp., *Methanospirillum* spp. e *Methanotermus* spp., uma espécie hipertermófila denominada *Methanopyrus* spp., além das halófilas extremas. O Reino *Crenarchaeota* inclui arqueas redutoras de enxofre hipertermófilas representadas por organismos dos gêneros *Dessulfurococcus*, *Pyrodictium*, *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Thermofilum* e *Thermoproteus*. Finalmente, o Reino *Korarchaeota* engloba organismos hipertermófilos pouco conhecidos (MADIGAN *et al.*, 1997; CANHOS & VAZOLLER, 1999).

As arqueas metanogênicas atuam na etapa final da decomposição anaeróbia dos compostos orgânicos complexos, desempenhando importante papel na mineralização da matéria orgânica. Esses organismos encontram-se amplamente distribuídos em habitats como sedimentos aquáticos, pântanos, sistemas de tratamento de resíduos, digestores anaeróbios e aterros sanitários. Sob o ponto de vista ecológico, o metabolismo

metanogênico é dependente da presença de outros microrganismos, cuja atividade no meio anaeróbio gera precursores para a metanogênese (BLAUT, 1994; VAZOLLER, 1995).

O primeiro grupo microbiano classificado taxonomicamente, com base na filogenia inferida através da comparação do RNAr 16S, foi das arqueas metanogênicas (BALCH, 1979). Representam um grupo polifilético, compreendendo 3 Ordens, 8 famílias e 21 gêneros (CANHOS & VAZOLLER, 1999). De acordo com SOWERS (1995), a Ordem *Methanobacteriales* compreende a família *Methanobacteriaceae*, com os gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanosphaera*, contendo 18 espécies; e Família *Methanothermaceae*, com o gênero *Methanothermus* e 2 espécies. A Ordem *Methanococcales* congrega as Famílias *Methanococcaceae*, gênero *Methanococcus*, com 7 espécies, *Methanomicrobiaceae*, com os gêneros *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanoladinia*, *Methanomicrobium* e *Methanospirillum*, com 13 espécies; *Methanocorpusculaceae*, gênero *Methanocorpusculum*, com 5 espécies; *Methanoplanaceae*, gênero *Methanoplanus*, com 2 espécies; *Methanosarcinaceae*, com os gêneros *Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Methanohalophilus*, *Methanolobus*, *Methanopyrus*, *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, com 19 espécies.

Os organismos metanogênicos possuem representantes Gram-positivos e Gram-negativos. Algumas arqueas metanogênicas tais como *Methanosarcina* sp., *Methanobrevibacter* sp. e *Methanobacterium* sp., exceto *Methanosaeta* sp., apresentam fluorescência sob iluminação ultravioleta decorrente da presença da coenzima F₄₂₀ (JONES *et al.*, 1987). Contudo, KAMAGATA & MIKAMI (1991) isolaram uma metanogênica termofílica do gênero *Methanosaeta* linhagem P_T, e verificaram que as células isoladas autofluoresciam quando observadas sob microscopia de epifluorescência.

As arqueas metanogênicas apresentam morfologias comuns às células procarióticas, sendo encontradas na forma de cocos, sarcinas, filamentos e bacilos de vários tamanhos (CANHOS & VAZOLLER, 1999). Apesar da diversidade morfológica, fisiologicamente são similares, ou seja, todas são organismos anaeróbios estritos, requerem condições anaeróbias de crescimento, com potencial de oxi-redução de aproximadamente -300mV (MADIGAN *et al.*, 1997) e compartilham a capacidade metabólica comum de produzir metano a partir de compostos de cadeia curta com um ou dois carbonos (WASSERFALLEN *et al.*, 2000). Os substratos utilizados pelas arqueas

metanogênicas são hidrogênio e dióxido de carbono, monóxido de carbono, formiato, metanol, 2-propanol, metilaminas, dimetilsulfeto e acetato (BLAUT, 1994; CANHOS & VAZOLLER, 1999). As principais reações de conversão dos diferentes substratos realizados pelas metanogênicas e os respectivos valores das variações de energia livre estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Reações de conversão e os respectivos valores de energia livre.

SUBSTRATO	REAÇÃO	ΔG° (kJ / mol CH ₄)
Dióxido de carbono e hidrogênio	$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130
Formiato	$4\text{HCOO}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-134
Metanol	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-106
Metilaminas	$4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$	-76
Acetato	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-32

Fonte: BLAUT (1994).

O acetato é um dos principais intermediários da decomposição anaeróbia da matéria orgânica em ambientes de água doce (ZEHNDER *et al.*, 1982). Apesar de ser considerado um dos principais precursores de metano na natureza poucas espécies, como por exemplo, *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. são capazes de utilizar esse substrato para a metanogênese. A principal diferença, entre estas espécies, consiste na capacidade da primeira utilizar hidrogênio e dióxido de carbono, metanol e metilaminas na presença de acetato, enquanto a segunda é capaz de utilizar apenas o acetato (BLAUT, 1994). Além disso, *Methanosaeta* sp. apresenta maior afinidade pelo acetato e predomina em ambientes com concentrações menores que 1mM. No entanto, o crescimento e predomínio de *Methanosarcina* sp. são favorecidos em altas concentrações de acetato (FURUZAKI *et al.*, 1990; ZINDER, 1993).

A linhagem metanogênica acetoclástica CHTI 55 foi isolada a partir de culturas enriquecidas com acetato de sódio de um digestor termofílico (55°C) tratando mistura de resíduos sólidos, com tempo de detenção hidráulica e carga de matéria orgânica de 10 dias e 12kg/m³/dia, respectivamente (TOUZEL *et al.*, 1985). As culturas foram enriquecidas e isoladas em meio de cultura BCTY, contendo 200mg/L de vancomicina,

solução de acetato de sódio (50mM) e tampão carbonato, incubadas durante uma semana, a 55°C, sob atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (85:15). Após esse período, os autores verificaram crescimento da linhagem metanogênica em acetato, metanol, mono-, di- ou trimetilaminas. Porém, não cresceu com formiato, etanol, propionato, butirato, benzoato e hidrogênio mais dióxido de carbono (80:20). A produção de metano, em culturas crescendo com acetato cessou completamente quando submetidas à atmosfera de hidrogênio e dióxido de carbono (80:20). Contudo, aplicando o mesmo procedimento, em células crescendo em metanol, a produção de metano recomeçou após 10 horas, indicando que a adição de dióxido de carbono não causou significativo decréscimo no valor de pH, para explicar a interrupção da metanogênese a partir do acetato. Os autores relataram que, em pH 6,8 e 57 °C, a linhagem CHTI 55 apresentou velocidade máxima de crescimento de $0,085h^{-1}$, com constante de afinidade pelo acetato e produção celular de 9,6mM e 1,4g/mol, respectivamente. O conteúdo de DNA (G+C) foi de 39,3mol%. Baseados nas características fisiológicas e morfológicas, os autores consideraram a linhagem CHTI 55 como nova espécie termofílica do gênero *Methanosarcina*.

KAMAGATA & MIKAMI (1991), no intuito de elucidar a ecologia e aspectos morfo-fisiológicos de arqueas metanogênicas termofílicas, isolaram a *Methanosaeta* linhagem P_T. Os autores inocularam a biomassa proveniente de digestor anaeróbico (55°C), em meio mineral enriquecido contendo soluções de vitaminas, acetato de sódio (80mM), vancomicina e neomicina, sob atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (80:20). A linhagem utilizou apenas acetato, como fonte de carbono e energia. Ou seja, o crescimento e a produção de metano não foram observados com hidrogênio e dióxido de carbono, formiato, metilaminas ou metanol, como substratos. A característica mais notável da linhagem P_T foi a autofluorescência. Geralmente, organismos pertencentes ao gênero *Methanosaeta*, incluindo espécies termofílicas, exibem fraca autofluorescência ou simplesmente não autofluorescem devido à pequena quantidade de coenzima F₄₂₀ nas células.

Apenas membros pertencentes à Família *Methanosarcinaceae*, como por exemplo, as espécies *Methanosarcina mazei* e *Methanosarcina barkeri* são capazes de utilizar metanol ou metilaminas como única fonte de energia (ZHENDER *et al.*, 1982). Contudo, além dos organismos da Família *Methanosarcinaceae*, *Methanosphaera* sp. da

Família *Methanobacteriaceae* utiliza compostos metilados apenas na presença de hidrogênio (MILLER & WOLIN, 1985). Organismos pertencentes aos gêneros *Methanolobus*, *Methanococcoides* e *Methanohalophilus* crescem exclusivamente com compostos metilados. *Methanolobus siciliae* e algumas *Methanohalophilus* sp. utilizam dimetilsulfeto como substrato (BLAUT, 1994).

Muitas metanogênicas são capazes de utilizar formiato e/ou hidrogênio e dióxido de carbono, como fontes de energia, incluindo *Methanobacterium formicicum*, *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanobrevibacter smithii*, *Methanococcus voltae* e *Methanococcus vanniellii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanogenium marisnigri* e *Methanospirillum hungatei* (ZEHNDER *et al.*, 1982; TOUZEL *et al.*, 1988; BLAUT, 1994).

Recentemente, linhagens de organismos metanogênicos capazes de utilizar formiato ou hidrogênio e dióxido de carbono, foram isolados e caracterizados, como por exemplo, arqueas metanogênicas mesofílicas *Methanococcus marisplaudis*, *Methanococcus deltae*, *Methanoplanus limicola*, *Methanogenium tationis* e *Methanogenium aggregans* e termofílicas *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Methanogenium thermophilicum*, *Methanogenium* linhagem UCLA, *Methanogenium frittonii* e *Methanobacterium thermoficicum* (TOUZEL *et al.*, 1988).

ZHILINA & ILARIONOV (1984), a partir de estrume bovino isolaram a arquea metanogênica *Methanobacterium thermoformicicum* linhagem Z-245. Os organismos cresceram em meio mineral, sob condições termofílicas (55°C), utilizando formiato de sódio ou hidrogênio e dióxido de carbono como única fonte de energia e carbono. Os autores observaram tipos morfológicos semelhantes a mesofílica *Methanobacterium formicicum* linhagem Z-281, ou seja, bacilos ligeiramente curvos, com extremidades arredondadas, simples, em pares ou cadeias curtas. Além de compartilhar características fisiológicas comuns, como crescimento na faixa de pH entre 6,0 e 8,6, e utilizar formiato ou hidrogênio e dióxido de carbono para crescimento e produção de metano.

ZHAO *et al.* (1986) isolaram a arquea metanogênica denominada *Methanobacterium* linhagem CB12, de amostra de digestor anaeróbio mesofílico alimentado com mistura de fezes suína e humana. Após isolamento, as células foram cultivadas em meio mineral, acrescido de peptona, tripticase e extrato de levedura, sob atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30). Segundo os autores, as células metanogênicas autotróficas cresceram, sob condições termofílicas (60°C), com formiato

ou hidrogênio e dióxido de carbono, mas não com acetato, metanol, monometilamina ou trimetilamina. Os tipos morfológicos observados na linhagem CB12 foram predominantemente bacilos curtos simples, às vezes, aos pares e filamentos curvos. Os autores verificaram, que valores de pH e temperatura favoráveis para o crescimento dessa linhagem foram entre 6,0 e 10,0 e 55 °C e 65°C, respectivamente. Porém, a velocidade máxima de crescimento foi de 0,546 h⁻¹, com tempo de geração igual à 74 minutos, em pH 7,4 e 55 °C. Os autores verificaram que a linhagem CB12 apresentou morfologia e tipo de metabolismo semelhante a *M. thermoautotrophicum* e temperatura ótima de crescimento semelhante a *M. formicicum* linhagem JF-1.

TOUZEL *et al.* (1988) isolaram e caracterizaram a arquea metanogênica, denominada *Methanobacterium* linhagem FTF, usando amostra de digestor anaeróbio termofílico (55°C), em escala de bancada, tratando mistura de resíduos sólidos. Segundo os autores, em cultura pura, a linhagem cresceu com hidrogênio, dióxido de carbono e formiato como substratos e cisteína como fonte de enxofre. Porém, o mesmo não foi verificado em compostos como acetato, metanol, mono-, di- e trimetilamina, etanol, propionato, butirato, benzoato, glicerol, 2,3-butanediol e etilenoglicol. Os valores de pH e temperatura ótimos de crescimento foram 7,5 e 55°C, respectivamente. Os autores verificaram também que a linhagem capaz de utilizar formiato foi Gram positiva, apresentou conteúdo de bases G+C igual a 49,2 mol% e morfologia semelhante a bacilos ligeiramente curvos, com extremidades arredondadas, simples ou em filamentos. Baseados nas particularidades fenotípicas e filogenéticas, os autores verificaram similaridades da linhagem isolada com a espécie *Methanobacterium thermoformicicum*.

3.3. COMPETIÇÃO ENTRE BRS E METANOGÊNICAS

Sob condições anaeróbias, os compostos orgânicos são oxidados em etapas sucessivas; os produtos finais de cada etapa de oxidação atuam como substratos para os membros seguintes da cadeia alimentar, até que a matéria orgânica seja degradada a biogás (VAZOLLER, 1995). Para HANSEN *et al.* (1999), a redução desassimilatória do sulfato e a metanogênese são os principais processos terminais da cadeia alimentar anaeróbia.

Na ausência de aceptores de elétrons, tais como sulfato, nitrato e ferro, os compostos orgânicos são transformados em produtos finais, ou seja, metano e dióxido de carbono, através da interação de vários grupos de microrganismos. Entre esses, pode-se destacar as fermentativas, acetogênicas produtoras de hidrogênio, homoacetogênicas, metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas. Porém, a presença de sulfato pode modificar as rotas metabólicas do processo e, conseqüentemente, os grupos microbianos envolvidos e suas interações (COLLERAN *et al.*, 1994; OUDE ELFERINK *et al.*, 1997). Os produtos finais da degradação anaeróbia de compostos orgânicos, na presença de sulfato, são metano, dióxido de carbono e sulfeto de hidrogênio.

As BRS podem competir com bactérias fermentativas por compostos orgânicos e aminoácidos, com bactérias acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio (BAPH) por propionato, butirato e etanol; com bactérias homoacetogênicas pelo hidrogênio; e com arqueas metanogênicas pelo acetato e hidrogênio (COLLERAN *et al.*, 1994; VAZOLLER, 1995). A Figura 1 apresenta as possíveis vias de degradação da matéria orgânica, na presença do íon sulfato, e os correspondentes grupos de microrganismos responsáveis em cada etapa.

Os fatores que influenciam a competição entre as BRS e metanogênicas são as propriedades cinéticas dos organismos envolvidos, tais como: concentração de sulfato, nutrientes disponíveis, concentração inicial mínima do substrato, afinidade pelo substrato, velocidade de consumo do substrato, velocidade de crescimento do microrganismo, proximidade das células (crescimento planctônico ou aderido), além de pH e temperatura (WIDDEL, 1988). Todos esses parâmetros foram extensivamente estudados por OUDE ELFERINK *et al.* (1994).

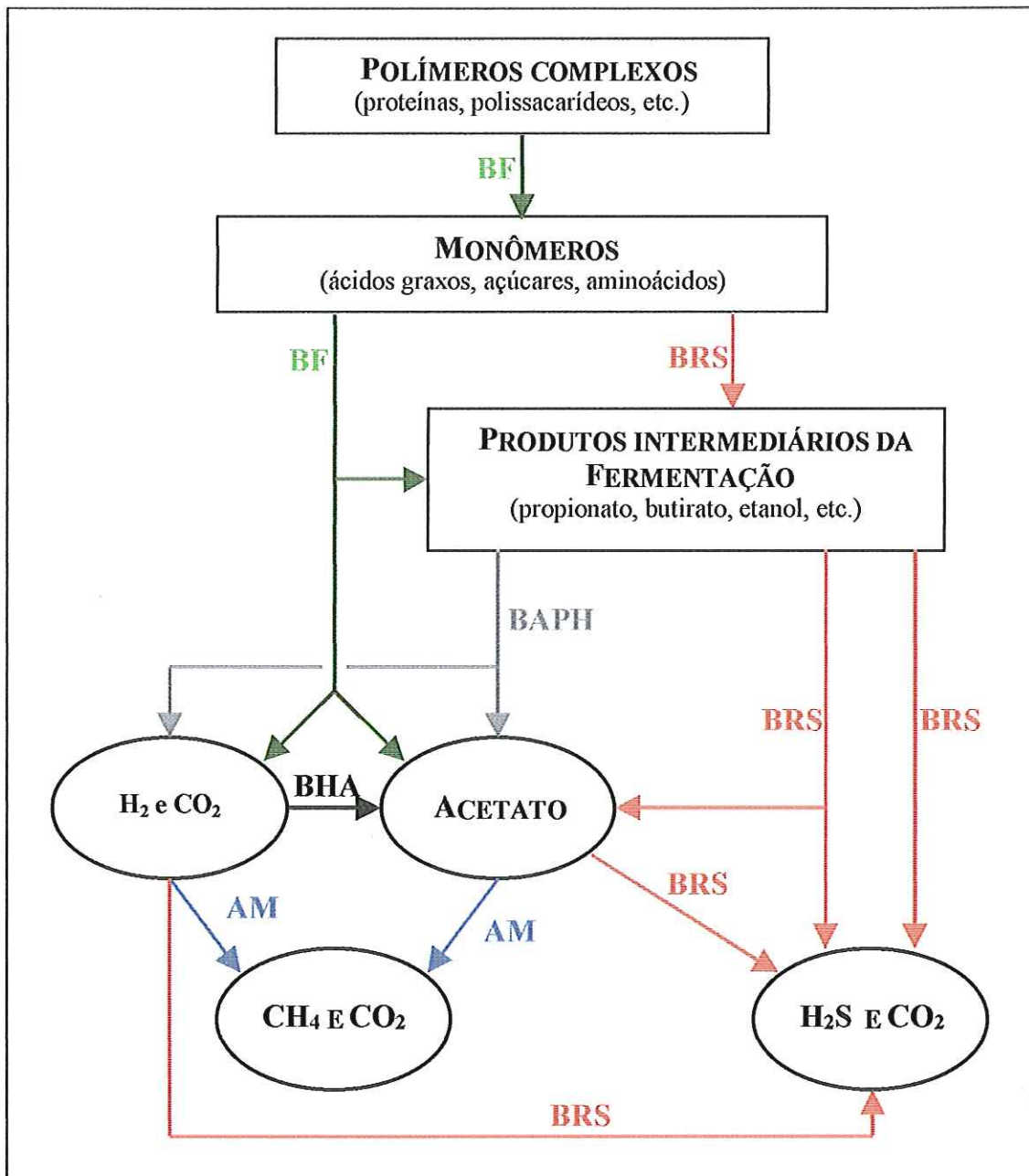


Figura 1. Possíveis rotas anaeróbicas da degradação de compostos orgânicos na presença de sulfato. **BF**: bactérias fermentativas, **BRS**: bactérias redutoras do íon sulfato, **BAPH**: bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio, **BHA**: bactérias homoacetogênicas e **AM**: arqueas metanogênicas. Adaptado de VAZOLLER (1995).

A competição entre as BRS e as AM foi estudada extensivamente. No entanto, algumas dúvidas persistem. Por exemplo, teoricamente, os organismos metanogênicos deveriam ser completamente eliminados de reatores anaeróbios submetidos a concentrações elevadas de sulfato, uma vez que as BRS competem em condições

termodinâmicas e cinéticas mais favoráveis. No entanto, foi comprovado que a metanogênese ocorre concomitantemente com a redução de sulfato em muitas situações (OUDE ELFERINK *et al.*, 1995).

De acordo com GUPTA *et al.* (1994) e SPEECE (1996), apesar das vantagens termodinâmicas das BRS sobre as AM, a toxicidade relativa do sulfeto a esses grupos permite que a metanogênese prossiga, e em alguns casos, exceda amplamente a redução de sulfato. Do ponto de vista prático, é importante determinar a sensibilidade da biomassa pelo sulfeto. No tratamento anaeróbio, as quantidades de sulfetos produzidas dependem da temperatura e pH do meio, da composição do substrato orgânico e da relação DQO/sulfato (CHERNICHARO, 1997). A 25°C e pH neutro, KOSTER *et al.* (1986) e KARHADKAR (1987), verificaram que a atividade metanogênica foi inibida em 50% por concentrações de sulfeto de 250mgH₂S/L e 100mgH₂S/L - 224mgH₂S/L, respectivamente. Nas mesmas condições, LETTINGA *et al.* (1984) observaram que na presença de 150mg/L de H₂S houve inibição de 20% a 90% da atividade metanogênica.

Reatores anaeróbios com elevada capacidade de retenção de biomassa, como por exemplo, reatores UASB e filtros anaeróbios podem tolerar níveis elevados de sulfetos da ordem de 170mg H₂S/L. Contudo, os sulfetos passam a ser bastante tóxicos quando presentes em concentrações acima de 200mg H₂S/L, mas podem ser tolerados a até esta concentração se a operação do sistema for contínua e se alguma aclimatação for propiciada à biomassa. Concentrações de sulfetos entre 50 e 100mg/L podem ser toleradas com pequena ou nenhuma aclimatação do sistema (CHERNICHARO, 1997).

Considerando que o hidrogênio e o acetato são compostos intermediários chave, tanto para a sulfetogênese como para a metanogênese, qualquer consideração de competição entre as BRS e as arqueas metanogênicas deve ser enfocada primeiramente quanto à cinética do consumo desses compostos (WIDDEL, 1988; McCARTNEY & OLESZKIEWICZ, 1993; COLLERAN *et al.*, 1994; HANSEN *et al.*, 1999).

Segundo McCARTNEY & OLESZKIEWICZ (1991), em reservatórios de água doce e baixa concentração de sal, a conversão do acetato ocorreu predominantemente via metanogênese. Neste estudo, 50% da atividade metanogênica foi inibida por concentrações de sulfeto total entre 50 e 270mgH₂S/L. Enquanto a sulfetogênese foi afetada por 85mg H₂S/L.

WIDDEL (1988) relatou que em ambientes hidrotermais e em reatores anaeróbios termofílicos (55°C) a competição entre as BRS e as metanogênicas resultou

em vantagens para as produtoras de metano. Porém, outros estudos relataram a predominância da degradação do acetato via redução de sulfato (VISSER *et al.*, 1993; OUDE ELFERINK *et al.*, 1994).

VISSER *et al.* (1992) estudaram a competição entre bactérias redutoras do íon sulfato e arqueas metanogênicas, em reator UASB tratando água residuária sintética, sob condições termofílicas (55°C). O reator foi inoculado com lodo granulado mesofílico e alimentado com acetato (2g/L) e sulfato de sódio (4g/L). Inicialmente, o reator operou em temperatura mesofílica de 30°C. Sob tais condições, os autores verificaram que quase todo o acetato presente no sistema foi degradado principalmente pelas arqueas metanogênicas e apenas 0 a 3% por BRS. Após 3 semanas operando a 30°C, a temperatura do reator foi elevada para 55°C e a degradação do acetato e produção de metano diminuíram drasticamente. Entretanto, após 1 semana de operação, sob condições termofílicas, a degradação do acetato e produção de metano foram restabelecidas, além da redução do sulfato. Gradualmente, tanto a degradação do acetato quanto à remoção do sulfato foram melhorando. Porém, a produção de metano foi diminuindo, cessando completamente no 45º dia de operação. A partir de então, progressivamente a degradação do acetato foi realizada pelas BRS. Os resultados indicaram que a 55°C e para as condições do sistema operacional, as BRS competiram com metanogênicas acetoclásticas. Nos ensaios de atividade específica com acetato, os autores confirmaram o predomínio de BRS.

GUPTA *et al.* (1994) estudaram as interações entre BRS e arqueas metanogênicas em reatores anaeróbios em batelada mesofílicos (35°C), alimentados com diferentes substratos orgânicos, na presença e ausência de sulfato. Seis reatores foram inoculados com cultura mista de BRS e arqueas metanogênicas, sendo três alimentados individualmente com acetato (2,51g/L), metanol (1,93g/L) e formiato (8,34g/L), sem sulfato, e três com os mesmos substratos orgânicos mais sulfato. Os autores verificaram que, na ausência de sulfato, os reatores foram exclusivamente metanogênicos com predomínio de filamentos, cocos e pequenos bacilos retos, respectivamente. Contudo, na presença de sulfato, 95% de acetato foi utilizado por vibrios redutores de sulfato. No reator alimentado com metanol não houve redução de sulfato e 87% da matéria orgânica foi convertida via metanogênese por pequenos bacilos retos. Segundo os autores, em cultura mista, as acetogênicas converteram metanol a acetato ou hidrogênio e dióxido de

carbono. Contudo, no reator alimentado com formiato houve competição entre BRS e metanogênicas com 62% e 24% do substrato utilizado via redução de sulfato e metanogênese, respectivamente. Neste reator as morfologias predominantes foram vibrios redutores de sulfato e bacilos retos metanogênicos. Os autores concluíram que o consumo dos substratos orgânicos foi diretamente relacionado com os parâmetros cinéticos.

OUDE ELFERINK *et al.* (1994) verificaram que *Desulfobacter postgatei* predominou em amostras de sedimentos marinhos devido a maior afinidade pelo acetato em relação a *Methanosarcina barkeri*, com valores de K_s iguais a 0,2 e 3,0mM, respectivamente. Contudo, altas concentrações de acetato ou valores baixos de pH favorecem o predomínio de *Methanosarcina* sp. em biorreatores. Geralmente, *Methanosaeta* sp. são as acetoclásticas mais importantes em reatores de alta taxa, apresentam maior afinidade pelo acetato que *Methanosarcina* sp., com valor de K_s igual a 0,4mM. As BRS acetoclásticas de ambiente de água doce como *Desulfoarculus baarsii*, *Desulfobacterium cathecolicum* e *Desulfococcus biacutus* crescem pouco em acetato. Apenas *Desulfobacterium* linhagem AcKo e *Desulfotomaculum acetoxidans* crescem bem com acetato sob condições mesofílicas.

OUDE ELFERINK *et al.* (1997) estudaram as interações competitivas e sintróficas entre BRS e arqueas metanogênicas presentes em lodo granulado de biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) com 2500m³, tratando água residuária de indústria de papel. O reator foi alimentado com acetato, propionato, butirato e formiato, com relação DQO/sulfato de 9,5. Técnicas de hibridação *in situ* (FISH) e número mais provável (NMP) determinaram os grupos microbianos presentes no lodo. Os resultados mostraram que o acetato foi degradado principalmente por *Methanosaeta* sp., e o propionato pelas redutoras de sulfato. A BRS *Desulfobulbus* sp. utilizou e competiu com a *Syntrophobacter* sp. pelo propionato. Observaram também, que o hidrogênio e o formiato foram, provavelmente, utilizados por organismos da Ordem *Methanobacteriales*. Neste estudo, as BRS utilizadoras hidrogênio, formiato e butirato não foram caracterizada com a sonda RNAr 16S, o mesmo acontecendo para as degradadoras sintróficas de butirato.

Como mencionado anteriormente, outro fator importante na competição pelo acetato é a utilização de outros compostos como substrato. Por exemplo, *Methanosaeta* sp. cresce apenas com acetato, enquanto *Methanosarcina* sp. utiliza outros substratos

como hidrogênio, metanol e metilaminas na presença de acetato (BLAUT, 1994). A acetoclástica *Desulfobacter* sp. cresce apenas com hidrogênio, acetato e etanol, contudo a espécie *Desulfotomaculum acetoxidans* utiliza ampla gama de substratos como formiato, acetato, butirato, isobutirato, butanol e etanol.

3.4. IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA

A maioria dos métodos de análise de tratamento de águas residuárias foi desenvolvida e testada a partir de culturas de células planctônicas. Sua aplicação para a análise em biofilmes requer ajustes e adaptações. É importante lembrar que a biomassa imobilizada é menos afetada, que culturas de células planctônicas, por variações ambientais como temperatura, pH, concentração de nutrientes, produtos metabólicos e substâncias tóxicas (LAZAROVA & MANEM, 1995; WATNICK & KOLTER, 2000).

A imobilização é um fenômeno que ocorre em ambientes naturais ou artificiais, como reatores. No tratamento de águas residuárias, torna-se importante e necessário o desenvolvimento e a agregação de microrganismos formando quantidade adequada de biomassa, para a aplicação da carga a ser tratada no reator. A imobilização da biomassa, em reatores biológicos, pode ser realizada na superfície de suportes inertes como espumas de poliuretano, areia e plástico (KATO *et al.*, 1999).

ZAIAT (1996) afirmou que o uso de reatores anaeróbios contendo biomassa imobilizada representou grande avanço no desenvolvimento de processos anaeróbios de tratamento de águas residuárias. Segundo o autor, a utilização de suportes inertes para a imobilização da biomassa resultou em sistemas mais estáveis e controlados. Para tanto, os suportes devem ser resistentes a degradação biológica e forças mecânicas; os métodos de imobilização devem ser simples, para viabilizar a operação em escala industrial; e o custo do material suporte deve ser levado em consideração na sua escolha. ZAIAT *et al.* (1996) concluíram que matrizes de poliuretano foram completamente adequadas para imobilização de biomassa anaeróbia, ou seja, apresentaram perda de biomassa por arraste da ordem de 9% para velocidades superficiais superiores a $1,5\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. VARESCHE *et al.* (1997) confirmaram que as matrizes de poliuretano foram excelentes suportes de imobilização e além de oferecerem condições de retenção e crescimento da biomassa anaeróbia, favoreçam fluxos de substrato e produtos metabólicos.

FYNN & WHITMORE (1984), realizando estudos em reatores do tipo mistura alimentados apenas com formiato de sódio, como única fonte de carbono, observaram imobilização da biomassa metanogênica em espumas de poliuretano. Os autores verificaram maior colonização em espumas de 60 poros/polegada linear que naquelas com 20, 30 e 45, ou seja, a colonização do suporte aumentou com a diminuição de tamanho dos poros.

GIJZEN *et al.* (1988) estudaram a degradação anaeróbia de lodo em água residuária de papel *kraft*, em reatores anaeróbios de duas fases, inoculado com rúmen, contendo matrizes de poliuretano como suporte de imobilização. Os autores verificaram a presença de biopartículas, formadas por organismos metanogênicos, nas cavidades das espumas de poliuretano. Aparentemente, os microrganismos estavam associados fisicamente ao material suporte e as biopartículas foram constituídas principalmente por *Methanosaeta* sp. e pequena porcentagem de *Methanosarcina* sp.

HUYSMAN *et al.* (1993) testaram a capacidade de diferentes materiais na imobilização de biomassa metanogênica, tais como zeólita, pérolas de vidro, carvão ativado, esponja natural e espumas de poliuretano com e sem retículos, em reator de fluxo ascendente (1.0L) com substrato sintético (DQO afluyente 5000mg/L). Segundo os autores, as espumas de poliuretano reticuladas apresentaram melhores resultados, sendo colonizadas rápida e densamente, por arqueas metanogênicas, em torno de 8 dias. Através da microscopia eletrônica de varredura, os autores verificaram que a biomassa apresentava-se na forma de biopartículas e estavam mecanicamente retidas no interior dos poros das espumas. Com base nestes dados, os autores concluíram que a velocidade de colonização das espumas foi fortemente influenciada pelo tamanho dos poros, grau de porosidade e tamanho dos suportes.

PERÉZ *et al.* (1997) estudaram materiais suporte, como argilas minerais, espumas de poliuretano e PVC, para imobilização de organismos metanogênicos e bactérias redutoras de sulfato. Segundo os autores, as espumas de poliuretano foram preferencialmente colonizadas pela biomassa anaeróbia. As BRS não foram encontradas em argila sepiolite, provavelmente, pela adsorção de alguns componentes necessários para o crescimento dessas bactérias no material suporte.

CADAVID (1997), em experimentos realizados em reator anaeróbio horizontal de leito fixo, confirmou a vantagem da utilização de espumas de poliuretano como suporte de imobilização para organismos anaeróbios. Baixas concentrações de sólidos

suspensos voláteis no efluente, menores que 70 mg/L, confirmaram boa adesão da biomassa anaeróbia nesse suporte. Esse aspecto evitou severo arraste da biomassa durante a operação do reator.

VARESCHE *et al.* (1997) estudaram a colonização microbiana em reatores anaeróbios de leito fixo, sob condições mesofílicas (30°C). Os reatores foram preenchidos com espumas de poliuretano como suporte de imobilização para biomassa anaeróbia, alimentados com substrato sintético, sendo glicose a principal fonte de carbono. A partir de exames de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os autores observaram três diferentes tipos de colonização microbiana: microgrânulos mecanicamente retidos em poros, microgrânulos aderidos em espuma de poliuretano e células dispersas aderidas às partículas. Através de MEV e microscopia óptica de fluorescência, os autores constataram a composição microbiana do lodo imobilizado, constituído por diferentes tipos morfológicos como bacilos, cocos, filamentos, e a importância ecológica dos mesmos dentro das matrizes.

ALVES *et al.* (1999) afirmaram que o uso de suportes porosos na imobilização de biomassa em sistemas anaeróbios reduz o tempo de partida, permitindo a aplicação de altas taxas de carga orgânica e favorecendo crescimento do biofilme. De acordo com os autores, o fenômeno de aderência dependeu das propriedades físico-químicas da superfície do suporte como porosidade, área superficial, rugosidade e distribuição do tamanho dos poros, ou seja, essas determinaram a capacidade de retenção celular. Portanto, os autores salientaram que o tipo de suporte pode influenciar a atividade metanogênica devido a possíveis interações químicas entre o material, o meio líquido e os microrganismos envolvidos.

SILVA (1999) em experimentos realizados em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), utilizou espumas de poliuretano como material suporte para aderência e crescimento de BRS. Para tanto, as espumas foram mantidas por 2 horas em recipiente contendo inóculo e, em seguida, colocadas no reator. Os resultados mostraram que o suporte foi rapidamente colonizado proporcionando retenção da biomassa anaeróbia nas matrizes de poliuretano.

TOMMASO (1999) estudou a estrutura, caracterização e cinética de lodo anaeróbio, imobilizado em espumas de poliuretano, tratando substrato sintético contendo gelatina como única fonte de carbono. Através das técnicas de microscopia óptica e eletrônica de varredura, o autor verificou as características da biomassa e acompanhou a

evolução e dinâmica de formação do biofilme, respectivamente. No início da colonização, foi verificada a presença de pequenos bacilos e bacilos curvos semelhantes a *Clostridium* sp. e *Desulfovibrio* sp., respectivamente, cocos semelhantes a *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Na fase final do processo, vigésimo segundo dia, foi verificado predomínio de arqueas metanogênicas fluorescentes.

RIBEIRO (2001) estudou a influência de vários substratos na dinâmica de formação de biofilme em matrizes de poliuretano, em reatores diferenciais de leito fixo, sob condições mesofílicas (25°C). O autor verificou que a colonização das matrizes de poliuretano foi similar, durante operação do reator, com os substratos glicose, amido, extrato de carne e esgoto sintético. O valor médio da velocidade de colonização, levando em conta todos os casos estudados, foi de $0,056 \pm 0,004$ g STV/g espuma. Através de MEV e microscopia óptica comum verificou-se que a fase inicial de colonização, do material suporte, se deu preferencialmente pela aderência de bacilos, ou seja, esses organismos foram pioneiros na formação do biofilme.

TELH (2001) avaliou o uso de reator anaeróbio horizontal de leito fixo durante tratamento de vinhaça sob condições termofílicas (55°C). Os valores de $DQO_{inicial}$ e tempo de residência hidráulica (TRH) foram de 2000mg/L e 26h, respectivamente. Neste estudo, o reator preenchido com matrizes de poliuretano, apresentou resultados satisfatórios de 70% e 63% de remoção de DQO e produção de metano, respectivamente. Exames de microscopia óptica comum e varredura revelaram a presença de cocos, pequenos bacilos retos, bacilos longos e células semelhantes a *Methanosaeta* sp. Pelos resultados obtidos, o autor constatou a viabilidade do tratamento de vinhaça em reator horizontal de leito fixo, sob condições termofílicas.

3.5. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

Avanços na utilização de técnicas moleculares estão abrindo novas fronteiras para a caracterização e quantificação da comunidade microbiana em biofilmes e lodos granulados (AMMAN *et al.*, 1995; RASKIN *et al.*, 1996; OUDE ELFERINK *et al.*, 1998).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) permite identificar e quantificar os grupos microbianos presentes nos ecossistemas naturais, biofilmes e lodos granulados, tais como BRS e arqueas metanogênicas (HARMSSEN *et al.*, 1996a; OKABE & WATANABE, 1997; SANTEGOEDS *et al.*, 1998; SEKIGUCHI *et al.*, 1999). Além disso, possibilita verificar a localização e organização espacial das células em seu habitat natural, sem necessidade de cultivo prévio. Porém, a distribuição populacional, determinada pelo FISH, não corresponde necessariamente à distribuição da atividade microbiana, uma vez que essas populações podem apresentar baixa atividade metabólica (SANTEGOEDS *et al.*, 1999).

A intensidade do sinal fluorescente está diretamente relacionada à atividade metabólica celular, ou seja, depende da quantidade de RNAr e conseqüentemente do conteúdo ribossomal da célula (AMMAN *et al.*, 1995). Para diminuir problemas como baixo conteúdo de RNAr ou reduzida disponibilidade do alvo, recomenda-se utilizar dupla hibridação numa mesma amostra. Ou seja, usar duas sondas marcadas com mesmo fluorocromo, reconhecendo diferentes regiões do RNAr 16S, aumentando assim a intensidade do sinal fluorescente (RASKIN *et al.*, 1994a).

Basicamente, a técnica de FISH utiliza sondas de oligonucleotídeos fluorescentes, para marcar regiões específicas de RNAr. As sondas fluorescentes hibridizam seqüências complementares do ácido nucléico, permitindo localizar a região desejada. As células hibridadas apresentam sinal fluorescente, sendo facilmente visualizadas por microscopia óptica de fluorescência (AMMAN *et al.*, 1995).

Segundo STAHL & AMMAN (1991) a técnica de FISH envolve quatro etapas: fixação, hibridação, lavagem e detecção (Figura 2). Os autores ressaltam a importância das duas primeiras etapas. A etapa de fixação mantém a integridade celular, especialmente a quantidade ribossomal, uma vez que as células serão sujeitas a altas temperaturas e concentrações de formamida durante o processo de hibridação. Além de aumentar a permeabilidade da membrana celular facilitando a entrada da sonda no

interior da célula. A etapa de hibridação corresponde a ligação específica da sonda a seqüência alvo do RNAr. Para tanto, é preciso seguir corretamente o protocolo de hibridação. A temperatura exigida para cada sonda, corresponde àquela de dissociação, na qual a estrutura secundária da molécula de RNAr é desfeita. A dissociação é necessária para que o oligonucleotídeo fluorescente se ligue às bases complementares da cadeia simples de RNAr. Porém, a molécula de RNAr pode desnaturar-se, caso a temperatura de dissociação seja ultrapassada.

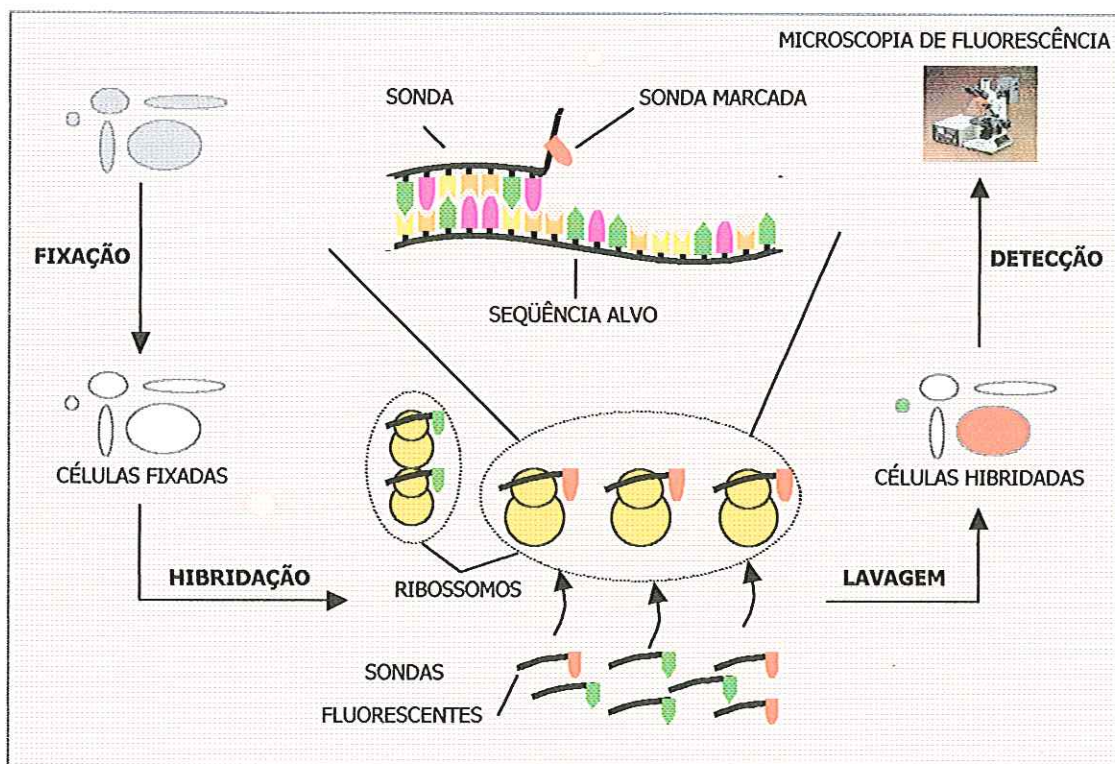


Figura 2. Desenho esquemático da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes. Adaptado de ABE (1998).

AMMAN *et al.* (1992) através de análises moleculares e FISH, estudaram a estrutura da população sulfetogênica em biofilmes formados em reatores anaeróbios de leito fixo, sob condições mesofílicas. Neste estudo, as sondas utilizadas para caracterizar os organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* e o grupo geral das BRS foram EUB338 e SRB385, respectivamente. No biofilme, os autores verificaram a distribuição uniforme de células semelhantes a *Desulforomonas* sp. e a presença de aglomerados celulares formados por *Desulfovibrio vulgaris*. Segundo os autores, a estrutura do

biofilme refletiu a influência de fatores como limitação nutricional de substrato e organização espacial das células, ou seja, mobilidade diferencial de cada membro dentro da matriz. Os autores observaram através de exames microscópicos um terceiro tipo morfológico, provavelmente uma BRS Gram-positiva, e esta não hibridou com as sondas mencionadas anteriormente.

RASKIN *et al.* (1994a), quantificaram grupos de arqueas metanogênicas, em biorreatores anaeróbios, através de hibridação fluorescente *in situ*. Dois reatores, em escala de bancada foram inoculados com esterco bovino e suíno e alimentados com água residuária doméstica. Um reator operou sob condições mesofílicas (40°C) e outro foi mantido em temperatura termofílica (60°C), com tempo de retenção celular de 20 dias. Os autores verificaram, em ambos os reatores, o predomínio de arqueas metanogênicas hidrogenotróficas pertencentes à Ordem *Methanobacteriales* (MB310). Organismos pertencentes à Ordem *Methanococcales* (MC1109) e ao gênero *Methanogenium* sp. foram observados com pouca frequência. Embora operando com alto tempo de retenção, a concentração relativa de *Methanosarcina* sp. (MS821) e *Methanosaeta* sp. (MX825) foi baixa em ambos os reatores, principalmente no termofílico. A porcentagem total da população metanogênica, representada pela porcentagem de organismos detectados com a sonda ARC915, foi de 13% e 11%, para os reatores termofílico e mesofílico, respectivamente. Este resultado foi confirmado pela produção de metano de 37,4% e 33,6%, respectivamente. Porém, os autores verificaram que as porcentagens obtidas foram menores que os valores relatados na literatura sobre digestão anaeróbia de resíduos sólidos (53% a 73%). Resultados preliminares sugeriram presença de BRS em ambos os reatores. Embora não tenham determinado a concentração de sulfato e produção de sulfeto, os autores afirmaram que baixos valores na concentração relativa de metanogênicas e produção de metano no biogás indicaram a presença de sulfato em água residuária doméstica. Os autores concluíram que o consórcio metanogênico pôde ser estudado de forma intacta, através do FISH, permitindo identificação e caracterização dos microrganismos.

RASKIN *et al.* (1996) estudaram a competição e coexistência entre populações de BRS e metanogênicas em reatores anaeróbios de leito fixo, sob condições mesofílicas (25°C). Pérolas de vidro de 3mm de diâmetro foram utilizadas como suporte de imobilização. Os experimentos foram realizados em dois reatores sulfetogênicos (SA e

SB) alimentados com a mesma concentração de glicose e sulfato (30mg/L) e em outros dois reatores metanogênicos (MA e MB) alimentados apenas com glicose (30mM). Os reatores MA e SA foram utilizados como controle. Após 17 e 11 meses de operação contínua dos reatores MA e SA (controles) e MB e SB, respectivamente, verificou-se que ambos os reatores metanogênicos apresentaram concentrações relativas de 25% de células metanogênicas pertencentes a Ordem *Methanobacteriales* e 15% de BRS com predomínio de organismos semelhantes a *Desulfovibrio* sp. Os autores verificaram que estes últimos não dependeram da presença de sulfato, sugerindo que estes organismos atuaram como acetogênicos e/ou fermentadores. Após adicionar sulfato no reator MB, a produção de metano diminuiu assim como a concentração relativa de metanogênicas, de 25% para 8%, mostrando que as BRS foram competidoras eficazes pelo substrato comum em relação às primeiras. Provavelmente as características cinéticas e termodinâmicas das BRS tenham favorecido esse comportamento, na presença de sulfato. No reator sulfetogênico SB, retirando-se a fonte de enxofre, não foram verificadas alterações imediatas. Contudo, as arqueas metanogênicas mantiveram seu conteúdo ribossomal por longo período de tempo, independente dos caminhos metabólicos primários inativos. Depois de alguns meses de operação sob condições sulfetogênicas, os organismos metanogênicos atingiram novo estado de equilíbrio apresentando uma concentração de aproximadamente 8%. Os autores relataram que métodos baseados na análise do RNAr, como o FISH, podem beneficiar o monitoramento de populações microbianas em sistemas de tratamento de resíduos.

HARMSSEN *et al.* (1996a), utilizaram FISH para estudar a composição e distribuição espacial de bactérias sintróficas oxidadoras de propionato em lodo granulado anaeróbio, proveniente de dois reatores UASB. Um reator foi alimentado com sacarose (8mM) e outro com mistura de acetato (19mM), propionato (16mM) e butirato (13mM), com demanda química de oxigênio de 5 e 10kg/m³/dia, respectivamente. Ambos os reatores apresentaram eficiência de remoção de aproximadamente 90%. Para a realização do FISH, os grânulos foram cortados e finas camadas foram hibridadas com sondas específicas para os Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338), para grupos metanogênicos e sondas MPOB e KoProp1, que detectam linhagens de bactérias sintróficas oxidadoras de propionato. Os autores verificaram que os grânulos, do reator alimentado com sacarose, apresentaram camada externa constituída de microcolônias oxidadoras de propionato semelhantes à linhagem MPOB e bacilos pertencentes ao

Domínio *Bacteria*. Interiormente, os grânulos foram formados por camada de microcolônias de arqueas metanogênicas sobrepostas com agregados da linhagem MPOB. Essa constatação indicou crescimento sintrófico entre arqueas metanogênicas utilizadoras de hidrogênio ou formiato com linhagem MPOB. Os grânulos, do reator alimentados com a mistura de ácidos voláteis, foram constituídos externamente por bactérias e arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosaeta* sp. Mais internamente, foi observada camada constituída por arqueas metanogênicas e microcolônias da linhagem MPOB. Os resultados revelaram ausência de bactérias degradadoras de propionato, linhagem KoProp1, nos grânulos provenientes dos dois reatores. Além de indicar que o centro de ambos os grânulos apresentava cavidades, materiais inorgânicos e microcolônias de arqueas metanogênicas.

No mesmo ano, HARMSSEN *et al.* (1996b) estudaram efeitos do sulfato na dinâmica populacional de bactérias sintróficas oxidadoras de propionato em lodo granulado anaeróbio, sob condições metanogênicas e sulfetogênicas. Ambos os reatores UASB metanogênico e sulfetogênico, contendo meio mineral, foram alimentados com propionato (20Mm) e propionato (20mM) mais sulfato (15Mm), respectivamente. Os reatores operaram durante 12 semanas com tempo de retenção celular de 6 horas. Através de hibridação *in situ* foram verificadas diferenças significantes na composição dos grânulos, sendo observado o predomínio da bactéria sintrófica degradadora de propionato denominada SYN7 e *Desulfobulbus* sp. nos reatores metanogênicos e sulfetogênicos, respectivamente. Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que, neste caso, *Desulfobulbus* sp. não degradou o propionato sintroficamente. No entanto, a linhagem SYN7 foi capaz de oxidar propionato via redução de sulfato e não competiu com *Desulfobulbus* sp., na presença de sulfato.

OUDE ELFERINK *et al.* (1997) estudaram as interações competitivas e sintróficas entre BRS e arqueas metanogênicas presentes em lodo granulado de biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) com 2500m³, tratando água residuária de indústria de papel. O reator foi alimentado com acetato, propionato, butirato e formiato, com relação DQO/sulfato de 9,5. Através das técnicas de hibridação *in situ* (FISH) e número mais provável (NMP), os autores determinaram grupos microbianos presentes no lodo. Verificaram ainda, que o acetato foi degradado principalmente por *Methanosaeta* sp., enquanto o propionato pelas redutoras de sulfato. A BRS *Desulfobulbus* sp. utilizou e competiu, com *Syntrophobacter* sp., pelo

propionato. Observaram também que, provavelmente, o hidrogênio e o formiato foram utilizados por organismos da Ordem *Methanobacteriales*, via metanogênese. A utilização de hidrogênio, formiato e butirato pelas redutoras de sulfato não foi caracterizada com a sonda RNAr 16S, o mesmo acontecendo com as degradadoras sintróficas de butirato.

MANZ *et al.* (1998) obtiveram informações sobre a abundância e a organização espacial de bactérias redutoras de sulfato em lodos ativados. Os autores utilizaram sondas específicas para as Famílias *Desulfobacteriaceae* (DSR651, DSB985, DSS658, DSBO224, DSMA488) e *Desulfovibrionaceae* (DSV407, DSV698, DSV1292, DSD131), combinadas com microscopia de fluorescência e microscopia confocal a laser. Os resultados indicaram que, durante o processo de tratamento, membros das duas famílias estiveram presentes em zonas anaeróbias, anóxicas e aeróbias. A porcentagem de BRS, no início do processo de tratamento de lodos ativados, foi de 6,7% indicando viabilidade desses organismos em condições não estritamente anaeróbias. Células da Família *Desulfovibrionaceae* representaram 4,0%, 5,2% e 2,8%, do total de células bacterianas, durante as etapas anaeróbias, anóxica e aeróbia, respectivamente. Contudo, após retornarem e permanecerem em compartimento anaeróbio, por aproximadamente 12 horas, a porcentagem aumentou novamente para 4,3%. Ao contrário da Família *Desulfovibrionaceae*, organismos pertencentes à família *Desulfobacteriaceae* cresceram apenas em anaerobiose e condições anóxicas atingindo 2,4% e 4,3% do total de células, respectivamente. Sondas específicas revelaram distribuição homogênea de organismos, da Família *Desulfovibrionaceae*, no interior dos flocos e arranjos em microcolônias dos membros da Família *Desulfobacteriaceae*.

SANTEGOEDS *et al.* (1998), quantificaram e determinaram a distribuição espacial de bactérias redutoras do íon sulfato em biofilmes de lodos ativados, sob condições mesofílicas (20°C), através de FISH. Com duas e onze semanas foram realizadas amostragens do biofilme. Finas seções do biofilme foram hibridadas com a sonda para o grupo geral de BRS (SRB385) e revelaram o predomínio de vibrios e bacilos retos gordos semelhantes a *Desulfovibrio* sp. e *Desulfobulbus* sp., respectivamente. Os resultados revelaram que as amostras das duas primeiras semanas apresentaram concentrações de $6,4 \times 10^7$ BRS/mL e $1,14 \times 10^8$ BRS/mL, respectivamente na superfície e interior do biofilme. Para amostras com onze semanas os valores foram de $2,0 \times 10^8$ BRS/mL e $3,6 \times 10^8$ BRS/mL. A hibridação *in situ* com sondas específicas

para bactérias nitrificantes revelaram a presença de bactérias oxidadoras de amônia ($3,0 \times 10^7$ a $9,0 \times 10^7$ células/mL), bactérias oxidadoras de nitrato ($0,6 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^6$ células/mL) e *Nitrospira* sp. ($5,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^8$ células/mL). Os autores verificaram que o biofilme apresentou estrutura heterogênea durante o processo de formação, aumentando a superfície de troca e tornando mais eficiente o transporte de substratos e produtos.

SEKIGUCHI *et al.* (1999) elucidaram a distribuição espacial de microrganismos no interior de grânulos mesofílicos (35°C) e termofílicos (55°C), provenientes de reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo, alimentados com sacarose, acetato e propionato. A organização espacial dos organismos foi visualizada em finos cortes, dos grânulos estudados, hibridados com sondas de oligonucleotídeos fluorescentes. Os resultados da hibridação com sondas específicas para os Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338) mostraram que ambos os grânulos, mesofílico e termofílico, foram formados por camadas. A camada externa e a interna eram formadas principalmente por bactérias e arqueas, respectivamente. Células semelhantes a *Methanosaeta* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanospirillum* sp. e *Methanosarcina* sp. foram encontradas no interior dos grânulos, sendo esta última predominante nas duas condições de temperatura. Através desse estudo, os autores confirmaram o modelo de distribuição em camadas dos microrganismos anaeróbios em lodos granulados, postulado inicialmente por GUIOT *et al.* (1991).

ARAÚJO (2001) através de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes e exames microscópicos, verificou a dinâmica e composição microbiana de biofilmes anaeróbios formados sobre suportes de diferentes hidrofobicidades acondicionados em sistema “Modified Robbins Device” (MRD). O sistema, mantido a 30°C, foi alimentado com meio mineral acrescido de fontes de carbono como acetato de sódio (30mM), formiato de sódio (10mM) e metanol (10mM). O autor realizou experimentos com culturas puras de *Methanospirillum hungatei*, *Methanosaeta concilii*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* e células anaeróbias oriundas de lodo granulado mesofílico. As sondas utilizadas no trabalho foram específicas para os Domínios *Archaea* (ARC915), *Bacteria* (EUB338) e para arqueas metanogênicas (MB1174, MB310, MSMX860, MG1200 E MC1109). Em relação aos principais gêneros microbianos presentes nos biofilmes formados sobre os suportes hidrofílico (vidro) e hidrofóbico (polipropileno) o autor verificou, em experimentos com culturas puras, que as arqueas metanogênicas

Methanospirillum hungatei, *Methanosaeta concilii*, *Methanobacterium formicicum* colonizaram inicialmente ambos os suportes. Nos experimentos com lodo granulado, as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas semelhantes a *Methanobacterium* sp. e *Methanobrevibacter* sp. também participaram do processo de formação inicial do biofilme, representando aproximadamente 44,0 % a 90% do total de células presentes no biofilme. Outra metanogênica hidrogenotrófica semelhante a *Methanospirillum* sp., foi detectada com sonda específica para a Ordem *Methanomicrobiales* (MG1200), representando 0,1% a 2,0% do total de células do biofilme. Contudo, os organismos pertencentes à Família *Methanosarcinaceae* não foram detectados e a hibridação, com a sonda MSMS860, foi negativa. Células bacterianas hibridadas com sonda EUB338 representaram de 3,0% a 18% do total de células do biofilme, com predomínio de BRS e células semelhantes a *Clostridium* sp., que também foram importantes no processo de colonização inicial do biofilme. Em relação ao número de células aderidas por milímetro quadrado de cupom e velocidade de colonização, o autor não verificou diferenças significativas entre as superfícies de vidro e do polipropileno, sugerindo que a hidrofobicidade do material suporte não influenciou no desenvolvimento e na composição microbiana dos biofilmes anaeróbios. Com relação à importância dos grupos metabólicos na formação inicial do biofilme, verificou-se que ambos os grupos acetogênicos, possivelmente bactérias sintróficas degradadoras de propionato e butirato hibridadas com EUB338, e metanogênicas hidrogenotróficas foram importantes no processo de colonização dos suportes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ORGANOGRAMA EXPERIMENTAL

Para a realização de todos os experimentos, foi utilizado como inóculo, lodo granulado anaeróbico termofílico proveniente do biodigestor de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado no tratamento de vinhaça da Usina São Martinho, Grupo Monte Sereno, Pradópolis – SP.

As atividades experimentais realizadas nesse trabalho estão descritas cronologicamente na Figura 3. O inóculo, obtido do reator UASB, foi enriquecido com vários substratos orgânicos e fonte de enxofre para estimular o crescimento microbiano. Seguiram-se ensaios de cultivo em condições fisiológicas específicas com acetato de sódio, lactato de sódio e propionato de sódio, individualmente, na presença de sulfato de sódio para avaliar as condições de crescimento dos organismos metanogênicos e redutores do íon sulfato. Finalmente, foram realizados ensaios nas mesmas condições anteriormente descritas, em reatores em batelada e reatores diferenciais de leito fixo.

Os ensaios em reatores em batelada e em reatores diferenciais de leito fixo foram realizados para estudar o comportamento da comunidade microbiana em crescimento planctônico e como biofilmes anaeróbios termofílicos, respectivamente, em relação aos substratos orgânicos anteriormente mencionados, na presença de sulfato. Os valores das concentrações de ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico e sulfato foram determinados por cromatografia. No entanto, é importante ressaltar que os reatores foram alimentados com soluções de acetato de sódio, lactato de sódio, propionato de sódio e sulfato de sódio.

Nos reatores em batelada e diferenciais de leito fixo, foram estudados os substratos orgânicos, acetato de sódio, lactato de sódio e propionato de sódio em concentrações de aproximadamente 2103,8mg/L, 1569,4mg/L e 1109,0mg/L, respectivamente. O sulfato de sódio foi utilizado como fonte de enxofre em concentração de aproximadamente 1125,0mg/L.

Os reatores em batelada operaram durante 675h, 55h e 148h com os substratos orgânicos acetato de sódio, lactato de sódio, propionato de sódio, na presença de sulfato, respectivamente. O comportamento da comunidade microbiana em crescimento planctônico, ao longo do tempo, foi observado através de exames de microscopia óptica de luz comum, contraste de fase e fluorescência, além do acompanhamento temporal do decaimento das concentrações de sulfato, sulfeto total dissolvido, ácidos orgânicos voláteis e da determinação de sólidos suspensos voláteis. A porcentagem de metano foi determinada em função do tempo através de cromatografia gasosa. Foi realizada também a técnica do Número Mais Provável (NMP) para quantificar e caracterizar fisiologicamente os organismos anaeróbios e metanogênicos.

Os reatores diferenciais de leito fixo, com sistema de alimentação contínua, operaram durante 166h, 43h e 151,5h, com os substratos orgânicos acetato de sódio, lactato de sódio e propionato de sódio, na presença de sulfato, respectivamente. O acompanhamento da dinâmica de formação e desenvolvimento do biofilme pelos organismos anaeróbios metanogênicos e redutores do íon sulfato, em matrizes de poliuretano, foi realizado através de exames de microscopia óptica de luz comum, contraste de fase, fluorescência e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram feitas medidas de pH no frasco de alimentação do sistema, juntamente com o acompanhamento temporal do decaimento das concentrações de sulfato, ácidos orgânicos voláteis e demanda química de oxigênio (DQO).

A técnica molecular de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada em amostras de células planctônicas e células presentes no biofilme dos reatores em batelada e reatores diferenciais, respectivamente, para descrever a composição microbiana termofílica, notadamente os organismos anaeróbios, metanogênicos e redutores do íon sulfato, durante a operação dos mesmos.

É importante salientar que todos os ensaios e análises realizados neste trabalho foram feitos em duplicata.

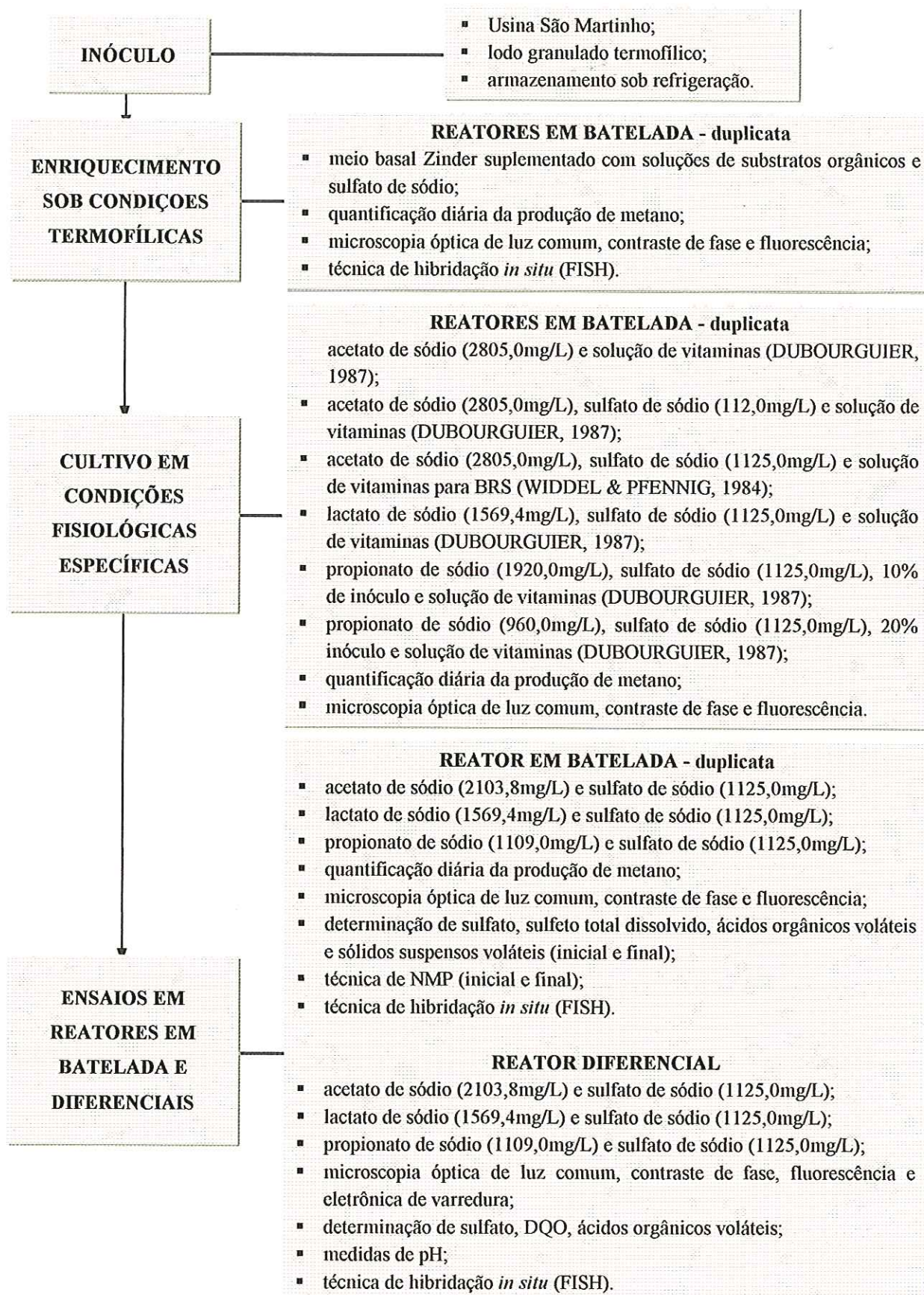


Figura 3. Fluxograma das atividades experimentais nos reatores em batelada e diferenciais, sob temperatura termofílica (55°C).

4.2. MEIO DE CULTIVO E SOLUÇÕES ESTOQUE

4.2.1. MEIO BASAL ZINDER

Foi utilizado o meio basal ZINDER (ZINDER *et al.*, 1984) no enriquecimento do lodo granulado termofílico, nos ensaios em reatores em batelada, na alimentação dos reatores diferenciais e na avaliação quantitativa dos microrganismos através da técnica do NMP.

O meio de cultivo foi preparado pela dissolução dos componentes em água Milli-Q, na ordem apresentada na Tabela 3. Após a preparação, o meio foi mantido sob atmosfera de nitrogênio (100%) durante 20 minutos. Ainda, sob fluxo desse gás, o meio foi distribuído em frascos de antibiótico (30mL) e frascos Duran (2L), em volumes exigidos para cada ensaio. O gás foi introduzido nos frascos, através do sistema de distribuição simultânea de gases, passando por coluna catalítica capaz de reter traços de oxigênio geralmente presentes nas linhas de condução e nos cilindros estoque dos gases comerciais (VAZOLLER, 1995). Em seguida, os frascos foram fechados com tampas de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio ou roscas plásticas, para manter as condições anaeróbias do meio. Foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos e estocados a temperatura ambiente, na ausência de luz. A preparação e distribuição do meio de cultivo foram realizadas de acordo com as técnicas de manipulação para anaeróbios estritos, descritos detalhadamente por VAZOLLER (1995).

Tabela 3. Composição do meio de cultivo ZINDER.

COMPONENTES	QUANTIDADES - Q.S.P. 1000ML DE ÁGUA MILLI-Q
NH ₄ Cl	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,4g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05g
Resazurina 1%	1,0mL
Solução Traço de Metais	10,0mL

Fonte: ZINDER *et al.* (1984).

A solução de resazurina 0,1%, indicadora do potencial de oxi-redução do meio de cultivo, foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração (4°C).

A solução traço de metais foi preparada pela dissolução inicial de TritriplexIII em água Milli-Q e o pH final ajustado para 7,0 com solução de KOH 10N. Posteriormente, os sais foram acrescentados e dissolvidos na solução, de acordo com a ordem apresentada na Tabela 4. Esta solução foi mantida no escuro sob refrigeração (4°C).

Tabela 4. Composição da solução traço de metais – meio ZINDER.

COMPONENTES	QUANTIDADES - Q.S.P. 1000ML DE ÁGUA MILLI-Q
Tritriplex III	4,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,086g
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,17g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21g
H ₃ BO ₃	0,19g
NiCl ₂	0,02g
Na ₂ MoO ₄	0,01g

Fonte: ZINDER *et al.* (1984).

4.2.2. SOLUÇÕES ESTOQUE DE BICARBONATO DE SÓDIO 10%, REDUTORA DE SULFETO DE SÓDIO 5% E DIFERENTES SOLUÇÕES DE VITAMINAS

Ao meio basal ZINDER foram acrescentadas soluções estoque complementares, para volume final de 10mL: 0,1mL da solução de bicarbonato de sódio (10%), 0,1mL da solução redutora de sulfeto de sódio (5%) e 0,1mL da solução de vitaminas. A seguir estão apresentados os procedimentos de preparo para cada solução.

Devido à sensibilidade as altas temperaturas, as soluções de bicarbonato de sódio, redutora, de vitaminas (DUBOURGUIER, 1987) e vitamina BRS foram esterilizadas a frio por filtração rápida em membrana de 0,22µm de porosidade pelo sistema Millipore, sob condições de assepsia. Todo o material utilizado na preparação dessas soluções foi previamente esterilizado por autoclavagem a 120 °C durante 20 minutos.

Para a manutenção do pH e redução do meio de cultivo foram utilizadas as soluções de bicarbonato de sódio 10% e redutora de sulfeto de sódio 5%, respectivamente. A solução de bicarbonato de sódio 10% foi preparada pela dissolução do respectivo sal em água Milli-Q previamente fervida e resfriada a 50°C, sob atmosfera de nitrogênio (100%). Com o auxílio de uma pipeta invertida estéril, a solução permaneceu sob fluxo desse gás por 10 minutos. A solução foi esterelizada por filtração rápida em membrana de 0,22µm utilizando o sistema Millipore e distribuída em frascos de antibiótico de 30mL, sob fluxo de nitrogênio (100%) e condições de assepsia. Para manter as condições anaeróbias, os frascos foram fechados com batoques de borracha de butila, lacrados com selos de alumínio e armazenados a temperatura ambiente na ausência de luz. A solução redutora de sulfeto de sódio 5% foi preparada nas mesmas condições descritas acima, porém a umidade do sulfeto de sódio foi retirada com auxílio de papel de filtro WHATMANN, antes da pesagem. Após esterilização, os frascos foram envoltos com papel alumínio e armazenados a temperatura ambiente na ausência de luz.

A solução de vitaminas, adaptada de DUBOURGUIER (1987), foi utilizada com o objetivo de favorecer o crescimento dos microrganismos anaeróbios. Esta solução foi preparada pela dissolução dos seus componentes, na ordem apresentada na Tabela 5, em água Milli-Q previamente fervida e resfriada a 30 °C, sob fluxo de nitrogênio. A solução foi esterelizada por filtração rápida em membrana, como descrito anteriormente, e distribuída em frascos de Duran, envolvidos em papel alumínio, fechados com borracha de butila e rosca plástica, armazenados em local escuro, sob refrigeração (4°C).

A solução de vitaminas específica para as BRS, utilizada para estimular o crescimento das bactérias redutoras do íon sulfato, foi preparada pela dissolução dos componentes em água Milli-Q, seguindo a ordem apresentada na Tabela 6. As condições de esterilização foram as mesmas descritas anteriormente. A solução foi mantida na ausência de luz, sob refrigeração (4°C).

Tabela 5. Composição da solução de vitaminas.

COMPONENTES	QUANTIDADES - Q.S.P. 1000ML DE ÁGUA MILLI-Q
Biotina	0,002g
Ácido fólico	0,002g
Tiamina.HCl	0,005g
Riboflavina	0,005g
Ácido nicotínico	0,005g
Pantotenato de cálcio	0,005g
Piridoxina.HCl	0,010g
Vitamina B ₁₂	0,0001g
Ácido lipóico	0,005g

Fonte: DUBOURGUIER (1987).

Tabela 6. Composição da solução de vitaminas BRS.

COMPONENTES	QUANTIDADES - Q.S.P. 1000ML DE ÁGUA MILLI-Q
Biotina	0,002g
Ácido fólico	0,002g
Tiamina.HCl.2H ₂ O	0,005g
Piridoxina.HCl	0,010g
Riboflavina	0,005g
Ácido nicotínico	0,005g
Pantotenato de cálcio	0,0001g
Vitamina B ₁₂	0,0001g
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,005g
Ácido lipóico	0,005g

Fonte: WIDDEL & PFENNIG (1984).

4.2.3. SOLUÇÃO ESTOQUE DE EXTRATO DE LEVEDURA 2%

Esta solução foi preparada pela dissolução de extrato de levedura em água Milli-Q, sob atmosfera de nitrogênio (100%), durante 20 minutos. Aliquotas de 20 mL foram distribuídas em frascos de antibiótico de 30 mL, sob fluxo desse gás. Os frascos foram fechados com tampas de borracha de butila, lacrados com selos de alumínio,

autoclavados a 120 °C, durante 20 minutos, e armazenados a temperatura ambiente na ausência de luz.

4.2.4. SOLUÇÃO ESTOQUE DE SULFATO DE SÓDIO

O sulfato de sódio foi utilizado como fonte de enxofre para o crescimento das bactérias redutoras do íon sulfato. A solução estoque, em concentração final de 1420,0mg/L, foi preparada pela dissolução do respectivo sal em água Milli-Q, distribuída em frascos de antibiótico de 20mL, sob atmosfera de nitrogênio (100%), esterelizada a 120°C por 20 minutos e armazenada a temperatura ambiente na ausência de luz.

4.2.5. SOLUÇÕES ESTOQUE DE SUBSTRATOS ORGÂNICOS

Foram preparadas soluções estoque dos seguintes substratos orgânicos: acetato de sódio (2721,6mg/L), propionato de sódio (1921,2mg/L), butirato de sódio (1100,9mg/L), glicose (1801,6mg/L), lactato de sódio (2241,6mg/L) e metanol (640,8mg/L). A seguir estão apresentados os procedimentos de preparo para cada solução.

As soluções de acetato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio e glicose foram preparadas pela dissolução dos respectivos compostos em água Milli-Q. Após a preparação, as soluções estoque foram distribuídas, esterelizadas e armazenadas como descrito no item 4.2.4.

4.2.6. SOLUÇÃO DE LACTATO DE SÓDIO

Esta solução foi preparada através de reação de neutralização entre as soluções de ácido láctico 4M e hidróxido de sódio 4M. O pH da solução final foi ajustado para 9,8 utilizando-se a solução de hidróxido de sódio 4M. A solução foi mantida e distribuída em frascos de antibiótico de 30mL, sob fluxo de nitrogênio (100%), esterelizada a 120°C, por 20 minutos, e armazenada a temperatura ambiente na ausência de luz.



4.2.7. SOLUÇÃO DE METANOL

A solução de metanol foi preparada pela adição de metanol (0,8mL) em água Milli-Q (9,2mL). O álcool e a água foram autoclavados, separadamente, a 120°C por 20 minutos. Após resfriamento, o metanol foi adicionado com o auxílio de seringa estéril “lavada” com nitrogênio (100%). Os frascos contendo a solução de metanol (640,8mg/L) foram armazenados a temperatura ambiente na ausência de luz.

4.3. INÓCULO

Como mencionado anteriormente, em os todos experimentos foi utilizado como inóculo, lodo granulado termofílico proveniente do biodigestor de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), utilizado no tratamento de vinhaça.

O lodo granulado foi coletado em recipiente de aço inox e suas amostras acondicionadas em recipientes plásticos, previamente lavados com detergente Extran (Merck) e água destilada; e armazenado sob refrigeração (4°C). A coleta do lodo granulado foi realizada na entressafra (fevereiro de 1999), período em que o biodigestor encontrava-se alimentado com melaço diluído e mantido em temperatura de 55±2°C. O lodo apresentava coloração escura e odor semelhante ao liberado pelo melaço de caldo de cana-de-açúcar (FATIBELLO, 2000).

Anteriormente a inoculação, o lodo granulado termofílico foi retirado da geladeira, para atingir temperatura ambiente, transferido para frasco de soro (500mL) esterelizado, contendo aproximadamente 100g de pérolas de vidro, e mantido sob atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70:30%), por 20 minutos. O sistema foi submetido à agitação manual em ângulo de 45°, por 20 minutos, para adequada separação dos arranjos celulares (VAZOLLER, 1995). Este procedimento foi realizado em todos os ensaios para melhorar o grau de homogeneização do inóculo. Foi utilizado aproximadamente 10 a 20% de inóculo para cada ensaio.

U U U U +
10

4.4. ENRIQUECIMENTO DO LODO TERMOFÍLICO

Após a preparação do inóculo, como descrito acima, a biomassa anaeróbia oriunda do biodigestor da Usina São Martinho, foi enriquecida com objetivo de estimular o processo metanogênico.

Os ensaios de enriquecimento foram realizados em reatores em batelada, em duplicata para cada condição estudada, em frascos Duran de 2L com 1L de volume de reação.

No enriquecimento foi usado meio basal ZINDER, suplementado por soluções estoque de substratos orgânicos e sulfato de sódio, precursoras diretas e indiretas da produção de metano e sulfeto, portanto, estimuladoras do crescimento microbiano de culturas metanogênicas e sulfidogênicas, respectivamente.

Sob condições de assepsia, os frascos Duran contendo 685mL de meio ZINDER estéril foram submetidos à atmosfera de nitrogênio (100%), durante 20 minutos. Posteriormente, sob atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70:30%), soluções estoque de bicarbonato de sódio, vitaminas, substratos orgânicos e solução de sulfato de sódio foram adicionadas ao meio basal, com auxílio de pipetas automáticas, com ponteiros esterelizados, na ordem apresentada na Tabela 7. A redução do meio foi realizada com solução de sulfeto de sódio.

Após adição do inóculo, ainda sob atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70:30%), os frascos foram fechados com borracha de butila e rosca plástica. Nesta fase de enriquecimento, os reatores em batelada foram mantidos sob agitação de 150 rpm a $55 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 20 dias.

Os ensaios de enriquecimento foram monitorados por análises cromatográficas e exames microscópicos, para acompanhar a produção de gás metano e observar as morfologias microbianas presentes na biomassa em suspensão, respectivamente.

Tabela 7. Composição nutricional no enriquecimento do lodo termofílico.

COMPONENTES	VOLUME (ML)
Meio basal ZINDER	685
Bicarbonato de sódio	10
Solução de vitaminas	10
Acetato de sódio (2721,6mg/L)	10
Propionato de sódio (1921,2mg/L)	10
Glicose (1801,6mg/L)	10
Butirato de sódio (1100,9mg/L)	20
Lactato de sódio (2241,6mg/L)	10
Sulfato de sódio (1420,0mg/L)	10
Metanol (640,8mg/L)	10
Extrato de levedura (0,01%)	05
Solução redutora de sulfeto de sódio	10
Inóculo (20%)	200
Volume total	1000

4.5. ENSAIOS COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE VITAMINAS

Após o enriquecimento do lodo termofílico, foram realizados ensaios com diferentes soluções de vitaminas com o objetivo de avaliar a condição nutricional mais favorável ao desenvolvimento dos microrganismos anaeróbios, metanogênicos e das bactérias redutoras do íon sulfato. Os ensaios e as respectivas condições nutricionais estão apresentados na Tabela 8.

Estes ensaios foram realizados em duplicata para cada condição estudada e em frascos de Duran de 2L, com 1L de volume de reação.

Como mencionado anteriormente, todos os ensaios foram realizados empregando-se o meio basal ZINDER estéril. O volume final foi de 1000mL, considerando a adição das soluções estoques e inóculo. Todos os componentes foram adicionados ao meio basal, com auxílio de pipetas automáticas, com ponteiros esterelizados. O inóculo utilizado, proveniente do ensaio de enriquecimento, foi manipulado da mesma maneira descrita anteriormente. O meio de cultivo, soluções

estoque e os respectivos volumes utilizados em cada ensaio estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 8. Condições nutricionais e diferentes vitaminas utilizadas nos ensaios de enriquecimento.

ENSAIOS	FONTES (MG/L)	SOLUÇÃO DE VITAMINAS
I	acetato de sódio (2805,0)	vitaminas ¹
II	acetato de sódio (2805,0) + sulfato de sódio (1125,0)	vitaminas ¹
III	acetato de sódio (2805,0) + sulfato de sódio (1125,0)	vitaminas ²

Solução de vitaminas¹: DUBOURGUIER (1987).

Solução de vitaminas²: WIDDEL & PFENNIG (1984).

Tabela 9. Meio de cultivo e soluções estoques utilizados nos ensaios de enriquecimento com diferentes soluções de vitaminas.

COMPONENTES	VOLUME (ML)		
	ENSAIO I	ENSAIO II	ENSAIO III
Meio ZINDER	855	845	845
Bicarbonato de sódio	10	10	10
Solução de vitaminas ¹	10	10	-
Solução de vitaminas ²	-	-	10
Acetato de sódio (2805,0mg/L)	10	10	10
Sulfato de sódio (1125,0mg/L)	-	10	10
Extrato de levedura (0,01%)	5	5	5
Solução redutora de sulfeto de sódio 5%	10	10	10
Inóculo (10%)	100	100	100
TOTAL	1000	1000	1000

Solução de vitaminas¹: DUBOURGUIER (1987).

Solução de vitaminas²: WIDDEL & PFENNIG (1984).

Após adição do inóculo, ainda sob atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70:30%), os frascos foram fechados com tampas de borracha de butila e roscas

plásticas e mantidos sob agitação de 150 rpm a $55\pm 1^\circ\text{C}$, durante aproximadamente 25 dias.

4.6. CULTIVO EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS ESPECÍFICAS

Após definir a melhor condição nutricional, descrita no item 4.5., adotou-se o meio basal Zinder e solução de vitaminas descrita por DUBOURGUIER (1987) para a realização dos ensaios de cultivo em condições fisiológicas específicas com os substratos orgânicos acetato de sódio, lactato de sódio e propionato de sódio na presença de sulfato. O inóculo utilizado foi o lodo anaeróbio proveniente do enriquecimento inicial. As condições nutricionais para cada ensaio, em duplicata, estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Condições nutricionais utilizadas nos ensaios de cultivo em condições fisiológicas específicas.

CONDIÇÃO NUTRICIONAL (MG/L)	SOLUÇÃO DE VITAMINAS	VOLUME DE INÓCULO (ML)
Ácido acético (2103,0) + sulfato (1125,0)	vitaminas ¹	100
Ácido láctico (1569,5) + sulfato (1125,0)	vitaminas ¹	100
Ácido propiônico (1109,0) + sulfato (1125,0)	vitaminas ¹	200

Solução de vitaminas¹: DUBOURGUIER (1987).

4.7. ENSAIOS EM REATORES ANAERÓBIOS

Foram estudados dois tipos de reatores anaeróbios: (1) reatores em batelada, com células planctônicas, e (2) reatores diferenciais, com suporte para desenvolvimento do biofilme. O inóculo, utilizado nas três condições fisiológicas, foi proveniente do cultivo em substrato orgânico específico. A seguir estão descritos detalhadamente os reatores anaeróbios utilizados nesse trabalho.

4.7.1. REATOR ANAERÓBIO EM BATELADA

Os reatores anaeróbios para os ensaios em batelada com células planctônicas foram feitos, em duplicata, em frascos Duran de 2L e fechados com tampas de borracha de butila e rosca plástica (Figura 4). Os reatores foram mantidos em agitador rotatório a 150rpm, com temperatura controlada em $55\pm 1^\circ\text{C}$.

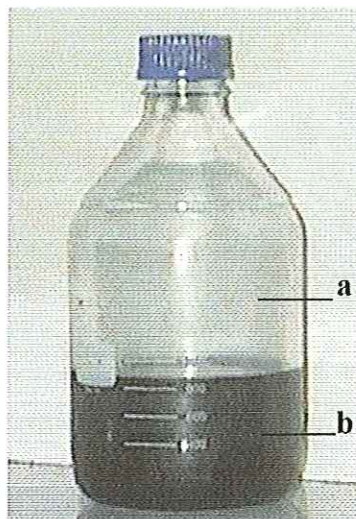


Figura 4. Reator utilizado nos ensaios em batelada: (a) atmosfera livre e (b) lodo anaeróbio com células planctônicas.

4.7.2. REATOR ANAERÓBIO DIFERENCIAL DE LEITO FIXO

Os reatores anaeróbios diferenciais de leito fixo foram confeccionados em vidro boro-silicato, com 2,4cm de comprimento, 2,9cm de diâmetro interno e 15mL de volume total (Figura 5). Nas extremidades dos reatores, foram acopladas telas de teflon para proporcionar melhor distribuição de fluxo de d'água, diminuir a presença de caminhos preferenciais e zonas mortas dentro dos reatores, além de impedir o arraste das matrizes de poliuretano e conseqüente perda da biomassa imobilizada.

O aparato experimental, utilizado para estudar a dinâmica de formação e desenvolvimento do biofilme anaeróbio termofílico, foi constituído por quatro reatores diferenciais que operaram simultaneamente, em paralelo com fluxo de alimentação hidráulico ascendente, instalados em estufa com temperatura controlada de $55 \pm 1^\circ\text{C}$. O substrato de alimentação foi acondicionado em frasco Duran de 2L, homogeneizado com auxílio de um agitador magnético, distribuído e recirculado para o sistema, em

circuito fechado, através de bomba peristáltica. Antes de chegar aos reatores diferenciais, os quais estavam acondicionados em estufa, o substrato circulava em serpentinas de aço inox, mantidas dentro do trocador de calor a $55\pm 1^\circ\text{C}$. A representação esquemática do aparato experimental está apresentado na Figura 6.

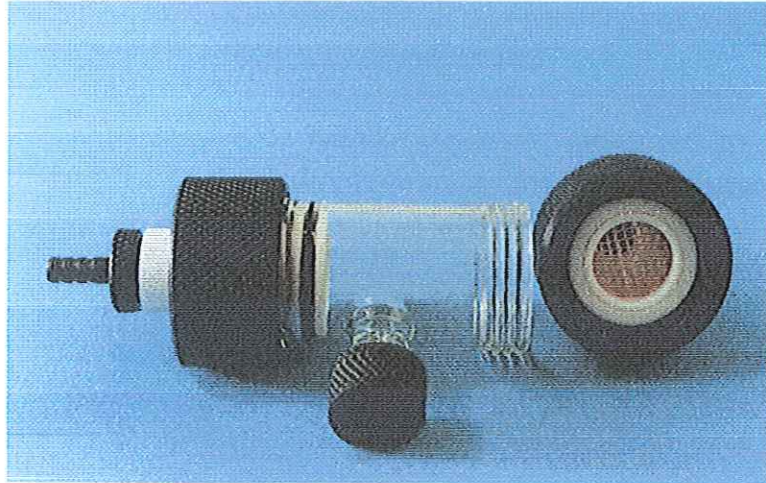


Figura 5. Reator diferencial.

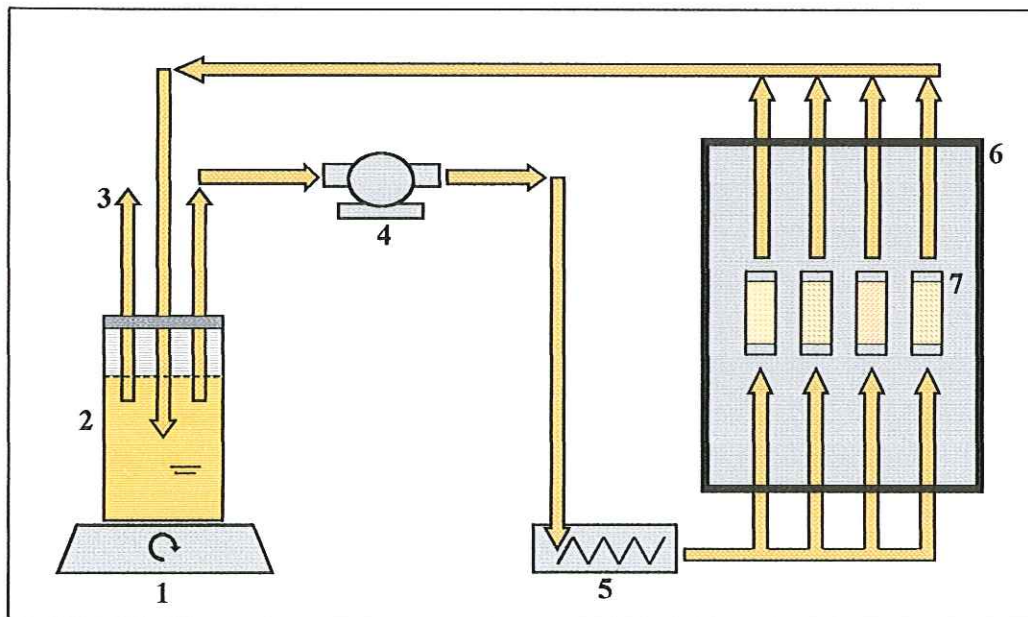


Figura 6. Desenho esquemático do aparato experimental: (1) agitador magnético; (2) frasco de alimentação; (3) amostrador de substrato; (4) bomba peristáltica; (5) trocador de calor; (6) câmara termostatizada; (7) reatores diferenciais.

Todos os ensaios foram realizados empregando-se o meio basal ZINDER estéril, num volume final de 1000mL, considerando a adição das soluções estoques e inóculo. Todos os componentes foram adicionados ao meio basal com auxílio de pipetas automáticas e ponteiros esterelizados.

O sistema de condução e distribuição do substrato foi através de mangueiras de silicone TIGON[®]. Todas as mangueiras e junções foram devidamente envolvidas com fita veda rosca e filme plástico, com o objetivo de evitar a entrada de oxigênio no sistema.

Como suporte de imobilização de biomassa, foram utilizadas espumas de poliuretano na forma de cubos, com 5mm de lado, densidade de 23kg.m⁻³ e porosidade entre 92 a 96% (Edmil Indústria e Comércio Ltda). Cada reator diferencial foi preenchido com 80 cubos de espuma. A velocidade superficial do líquido foi de 0,32±0,02mL/s.

Esse tipo de sistema composto por reatores diferenciais, contendo suportes para a imobilização da biomassa, foi utilizado por ZAIAT *et al.* (1997) para a estimativa de parâmetros cinéticos. TOMMASO (1999) avaliou a dinâmica de aderência microbiana, em matrizes de poliuretano, em lodo anaeróbio tratando substrato sintético contendo gelatina. RIBEIRO (2001) estudou a influência do tipo de substrato na dinâmica de formação do biofilme em matrizes de poliuretano.

Para realização das análises físico-químicas e microbiológicas, alíquotas do frasco de alimentação e espumas dos reatores diferenciais foram retiradas, periodicamente, de acordo com as necessidades de cada ensaio. Com o sistema de bombeamento desligado, amostras do frasco de alimentação foram retiradas com auxílio de seringas estéreis, e as espumas foram retiradas do reator com pinça Millipore. As espumas retiradas para análise foram substituídas por outras com as mesmas características. É importante ressaltar que antes de serem repostas, as novas espumas permaneciam em frasco de antibiótico contendo meio Zinder estéril (30mL) acrescido de solução redutora, durante 1 minuto. Em seguida, o reator era fechado e o sistema de bombeamento novamente ligado. Para manter as condições anaeróbias do sistema, os frascos de alimentação foram submetidos, após a retirada de amostras, a atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70:30%).

4.8. MÉTODOS ANALÍTICOS

O comportamento da comunidade microbiana, em crescimento planctônico, nos reatores em batelada, foi realizado pelo acompanhamento temporal do decaimento das concentrações de sulfato e sulfeto total dissolvido. Para quantificar a biomassa presente em cada condição estudada foram realizadas análises de sólidos suspensos voláteis (inicial e final) de acordo com o método descrito pela APHA (1995).

Durante os ensaios em reatores diferenciais, foram determinados os valores de pH e acompanhamento temporal do decaimento das concentrações de sulfato e demanda química de oxigênio (DQO). Para a realização das análises de DQO, as amostras foram filtradas em sistema Millipore com membrana de 0,22 μ m de acordo com o método descrito pela APHA (1995). Para minimizar a interferência do sulfeto na análise, adicionou-se sulfato de zinco às amostras antes da filtração. Todas as análises foram realizadas com amostras do frasco de alimentação do sistema.

4.8.1. DETERMINAÇÃO DE SULFATO

A determinação do sulfato foi realizada por método espectrofotométrico, em amostras diluídas, utilizando-se o *kit* SULFAVER[®]4 (SULFATE REAGENT-HACH), através do qual o íon sulfato foi precipitado em meio ácido com cloreto de bário, com turbidez lida a 450nm. A concentração mínima detectável pelo método foi de aproximadamente 5 μ g/L.

Sob condições de assepsia, amostras foram coletadas dos reatores em batelada e do frasco de alimentação dos reatores diferenciais, com seringas hipodérmicas esterelizadas, e filtradas em sistema Millipore com filtro de 0,22 μ m de porosidade. Para retirar o sulfeto presente nas amostras, 2,0mL do filtrado foram diluídos em 50,0mL de água Milli-Q, posteriormente submetidos à atmosfera de nitrogênio (100%), durante 5 minutos. O mesmo procedimento foi aplicado para amostra utilizada como branco, porém a absorbância era lida sem a precipitação com cloreto de bário.

4.8.2. DETERMINAÇÃO DE SULFETO TOTAL DISSOLVIDO

Para o acompanhamento da produção de sulfeto total dissolvido, durante os ensaios em reatores em batelada, foi utilizado o método descrito por QUENTIN & PACHMEYER modificado por PLAS *et al.* (1992). A concentração de sulfeto total dissolvido detectada pelo método situa-se entre 0 e 1,5 mM e foi determinada através de curva padrão previamente elaborada para sulfeto (Anexo 1). Este método foi escolhido por ser extremamente sensível e por requerer pequena quantidade de amostra, evitando assim, retirar volume excessivo durante os ensaios (VARESCHE *et al.*, 1997).

Antes de iniciar a análise, os reatores em batelada e as soluções utilizadas nesse método, descritos no quadro abaixo, foram retiradas do agitador rotatório com temperatura controlada e da geladeira, respectivamente, até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, as soluções e água Milli-Q foram mantidas sob atmosfera de nitrogênio (100%) durante 15 minutos. Água Milli-Q desoxigenada foi utilizada como branco na leitura de sulfeto total dissolvido e para a diluição das amostras.

Para evitar interferências no método, as amostras foram coletadas, com seringas hipodérmicas estéreis, e filtradas em sistema Millipore com filtro de 0,22 μ m de porosidade. Imediatamente, após a realização desse procedimento, 200 μ L do filtrado foram adicionados em tubos Pyrex[®] contendo 10mL de solução de acetato de zinco 0,01M. Em seguida, foram adicionados 1mL de solução dimetil-*p*-fenilenodiamina (DMPD) e 70 μ L de solução de sulfato férrico amoniacal. Após adição de cada solução, os tubos foram agitados vigorosamente e incubados, a temperatura ambiente na ausência de luz, durante 20 minutos. A leitura de absorbância foi realizada em comprimento de onda de 663nm.

Cuidados para evitar a oxidação do sulfeto foram tomados, como manter os tubos sempre fechados, utilizar água Milli-Q desoxigenada e realizar a análise em local com baixa intensidade luminosa.

Soluções utilizadas na análise de dosagem de sulfeto total dissolvido.

Solução de acetato de zinco 0,01M

- 20g de acetato de zinco dihidratado P.A.;
- 0,2mL de ácido acético glacial P.A.;
- 1000mL de água Milli-Q.

Armazenar no escuro e sob refrigeração por 30 dias

Solução de sulfato férrico amoniacal

- 2mL de ácido sulfúrico 96%;
- 50mL de água Milli-Q;
- 10g de sulfato férrico amoniacal 99%

Completar o volume para 100mL com água Milli-Q.

Armazenar no escuro e sob refrigeração por 30 dias

Solução de dimetil-*p*-fenilenodiamida (DMPD)

- 2,0g de DMPD em 200mL de água Milli-Q sob banho de gelo;
- 200mL de ácido sulfúrico 96% adicionado gota a gota;

Completar o volume com água Milli-Q para 1000mL.

Armazenar no escuro sob refrigeração por 30 dias.

Fonte: PLAS *et al.* (1992)

4.8.3. DETERMINAÇÃO DE PH

Valores aproximados de pH ($\pm 0,5$ unidade de pH) foram medidos, em amostras do frasco de alimentação, durante a operação dos reatores diferenciais.

Alíquotas de 1mL, foram retiradas do frasco de alimentação do sistema, com seringa hipodérmica esterelizada, e transferidas para béquer. A leitura do potencial hidrogeniônico da solução foi realizada por imersão de fita de papel indicador, Carlo Erba, na solução contida no béquer.

4.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.9.1. DETERMINAÇÃO DE METANO

O monitoramento de gás metano produzido pela atividade microbiana, nos reatores em batelada, foi realizado por cromatografia gasosa.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo Gow-Mac, equipado com detector de condutividade térmica e colunas PORAPAK-Q (de análise) e PORAPAK-T (de referência), ambas com 2m de comprimento, ¼” de diâmetro interno e 80-100mesh. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste e o forno operou a 50°C.

Os reatores em batelada, recém retirados do agitador com temperatura controlada, foram acondicionados em recipientes de isopor e suas tampas flambadas com álcool etílico. A despressurização dos frascos foi feita com agulhas esterilizadas, próxima da chama do bico de Bunsen e 1000µL da atmosfera dos frascos, retirados com o auxílio de uma seringa *gas tight*, com trava para gases. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de gás produzido.

4.9.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

O consumo dos ácidos voláteis acético e propiônico foi monitorado, durante os ensaios em reatores em batelada e diferenciais por cromatografia gasosa. O consumo do ácido láctico foi monitorado por cromatografia líquida.

As análises dos ácidos voláteis acético e propiônico foram realizadas em cromatógrafo a gás HP6890, com detector de ionização de chama a 300 °C, equipado com coluna HP INNOWAX (Cross Linked Polyethylene) com 300 x 0,25mm e 0,25µm de espessura do filme. O injetor operou a 250 °C, com taxa de *split* de 1:20. Os gases utilizados foram hidrogênio (gás de arraste), nitrogênio (gás auxiliar) e ar sintético com fluxos de 30 mL.min⁻¹, 33 mL.min⁻¹ e 300mL.min⁻¹, respectivamente. Ácido crotônico, em concentração de 700mg/L, foi utilizado como padrão interno.

Sob condições de assepsia foram coletadas duplicatas de cada amostra, acondicionadas em tubos de microcentrífuga (1,5mL) e mantidas no freezer. Antes da extração, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 2500rpm por 1 minuto.

A preparação das amostras foi realizada seguindo metodologia de extração de MORAES *et al.* (2000) e está descrita a seguir.

Procedimento:

- adicionar a 2,0mL da amostra 1,0g de NaCl (P.A.); 50 μ L de solução de H₂SO₄ 1M; 70 μ L de solução de ácido crotônico e 0,60mL de éter etílico purificado (gelado);
- agitar a amostra no agitador de tubos (vórtex) por 1 minuto;
- centrifugar a amostra por 1 minuto;
- armazenar a amostra em freezer até o momento da análise cromatográfica;
- injetar 1,0 μ L da fase orgânica.

Obs.: sempre que necessário as amostras foram diluídas.

Os resultados das concentrações, em mg/L, desses ácidos foram calculados em relação aos padrões, de acordo com os fatores de resposta (área pico do ácido/área pico padrão interno) dos picos obtidos nos cromatogramas.

As análises de ácido láctico foram realizadas em cromatógrafo HPLC SHIMADIZU, equipado com controlador SCL 10A, três bombas LC 10AD, forno CTO 10A e detector DIODE ARRAY DETECTOR em comprimento de onda de 210nm. Como fase estacionária, foi usada coluna Aminex HPX-87H BIO-RAD de exclusão iônica, 300 x 7,8mm. O eluente utilizado na fase móvel foi a solução de H₂SO₄ 0,4mM, com fluxo de 0,600mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 μ L. O procedimento para amostragem foi o mesmo descrito anteriormente para análise dos ácidos acético e propiônico.

A preparação das amostras foi realizada seguindo metodologia de extração de MORAES *et al.* (2000) e está descrita a seguir.

Procedimento:

- filtrar a amostra em filtro Millipore de 13mm de diâmetro e 0,45 μ m;
- diluir o filtrado para 10mL com solução de H₂SO₄ 0,5mM;
- injetar a amostra através de filtros de 0,45 μ m.

Os resultados das concentrações, em mg/L, desses ácidos foram obtidos pelo método de padronização externa através de curva de calibração.

4.10. CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA

4.10.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

Exames microscópicos das amostras, oriundas dos reatores em batelada, diferenciais e ensaios do NMP, foram realizados empregando-se microscopia de luz comum, contraste de fase e fluorescência em aparelho Olympus BX60-FLA, com sistema de câmera colorida digital Optronics. O software usado para aquisição das imagens foi o *Image Pro-Plus* versão 3.0.1. Através desse equipamento foi possível captar as imagens, na tela do computador de 17 polegadas, e registrar os tipos morfológicos presentes nas amostras.

Para a realização dos exames microscópicos, as amostras foram retiradas com agulha hipodérmica esterelizada. As matrizes de poliuretano provenientes dos reatores diferenciais foram submetidas à atmosfera de nitrogênio (100%). Todas as amostras foram examinadas em lâminas de vidro cobertas com filme de ágar 2%. A cobertura de ágar permite que o excesso de água da amostra seja absorvido, otimizando a qualidade da observação (VAZOLLER, 1995).

4.10.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Este exame foi realizado para caracterizar a biomassa, imobilizada nas espumas de poliuretano, durante a formação do biofilme, nos reatores diferenciais.

Para a observação das amostras em microscopia eletrônica de varredura foi utilizado o método de secagem com HMDS (hexametildisilazano, SIGMA) descrito originalmente por NATION (1983), modificado por ARAÚJO (1994), para o tratamento de biofilmes microbianos. O tratamento consistiu na fixação das amostras em solução tampão de fosfato 0,1M (pH 7,3) contendo 2,5% de glutaraldeído por 12 horas a 4 °C. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas três vezes com tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) durante 10 minutos; desidratadas em série gradativas de etanol: 50%, 70%, 80%, 90% e 95% e 100%, por 10 minutos em cada concentração. Finalmente, as amostras foram lavadas três vezes em etanol 100%, durante 10 minutos e imersas em HMDS por 30 segundos. O excesso de HMDS foi retirado em papel absorvente. As amostras tratadas foram coladas em suportes com esmalte incolor e mantidas em estufa a 55°C, por aproximadamente 1 hora. Depois de secas, as espumas foram recobertas por

camada de ouro. As análises de MEV foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM-960 (20KV).

4.11. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

A técnica hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada para contagem e caracterização dos microrganismos anaeróbios termofílicos presentes nos reatores em batelada e no biofilme dos reatores diferenciais. A metodologia utilizada foi desenvolvida por ARAÚJO (2001). As sondas de oligonucleotídeos fluorescentes utilizadas neste trabalho estão descritas a seguir.

4.11.1. SONDAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS FLUORESCENTES

As amostras foram hibridadas com sondas de oligonucleotídeos específicos ao RNAr 16S dos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338) e para o grupo geral das BRS (SRB385) pertencentes à subdivisão delta de *Protobacteria*. Todas as sondas foram marcadas com corante fluorescente rodamina, na extremidade 5'.

A sonda NON338, cuja seqüência de nucleotídeos não se hibridiza ao RNAr microbiano (MANZ *et al.*, 1992) foi utilizada como controle negativo para quantificar as porcentagens de hibridações não específicas. Segundo ABE (1988), a hibridação não específica refere-se àquela que ocorre entre a sonda e a região do RNAr microbiano não complementar a esta. Isto pode ocorrer devido a temperaturas inadequadas, secagem indevida dos tampões durante o processo de hibridação.

A sonda EUB338 foi utilizada para detectar organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* (AMANN *et al.*, 1990). Para o grupo geral das bactérias redutoras de sulfato foi utilizada a sonda SRB385 (AMANN *et al.*, 1990). Finalmente, para o Domínio *Archaea* e família *Methanobacteriaceae* foram usadas as sondas ARC915 e MB1174, respectivamente (STAHL & AMANN, 1991; RASKIN *et al.*, 1994a). As especificidades das sondas, seqüências de bases dos oligonucleotídeos e posições de hibridação do RNAr 16S estão descritas na Tabela 11.

As concentrações estoque e finais das sondas, utilizadas nesse trabalho, foram determinadas com base no trabalho de (ARAÚJO, 2001) e estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 11. Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação *in situ*.

SONDA	ESPECIFICIDADE	SEQÜÊNCIA (5' → 3')*	SÍTIO DO RNAR 16S**
NON338	Controle negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	338-355
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355
SRB385	Grupo geral de BRS gram negativas da subdivisão delta de Protobacteria	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	385-402
ARC915	Domínio <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	915-934
MB1174	<i>Methanobacteriaceae</i>	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	1174-1195

*Seqüência de bases obtidas em AMANN *et al.* (1995)

**Numeração baseada no RNAr de *E.coli*, de acordo com BROSIUS *et al.* (1981).

Tabela 12. Concentrações estoque e final de cada sonda.

SONDA	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE (NG/µL)	CONCENTRAÇÃO FINAL USADA NA HIBRIDAÇÃO (NG/µL)
NON338	543,5	54,3
EUB338	500,0	50,0
SRB385	727,3	36,4
ARC915	984,0	33,3
MB1174	493,0	49,4

Fonte: ARAÚJO (2001).

4.11.2. PREPARAÇÃO E FIXAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para as células planctônicas, oriundas dos ensaios em reatores em batelada, foram retirados 3,5mL de amostra, com seringa estéril, e transferidos para frasco de antibiótico estéril, contendo 5g de pérolas de vidro. Para as amostras do biofilme, proveniente dos reatores diferenciais foram retiradas 3 espumas com auxílio de pinça estéril, colocadas em frasco de antibiótico contendo 5g de pérolas de vidro e 2,5mL de

PBS (10x). Ambos os sistemas foram mantidos sob atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70/30%) por 5 minutos e submetidos à agitação manual em ângulo de 45° durante 20 minutos, para adequada separação dos arranjos celulares. Quando necessário, além da agitação manual com pérolas de vidro, as amostras eram submetidas a agitação em vórtex, com 2 gotas de detergente NONINDET40 e pérolas de vidro, durante 1 minuto e sonicação por 20 minutos. Após desprendimento, as amostras foram acondicionadas, em duplicata, em tubos de microcentrífuga de 1,5mL para o procedimento de fixação.

Para a fixação de células planctônicas e das células oriundas do biofilme, provenientes dos reatores em batelada e diferenciais, respectivamente, amostras foram centrifugadas, sob refrigeração, por 1min a 13000rpm, lavadas duas vezes com mesmo volume, em tampão fosfato salino (PBS: 130mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM Na₂H₂PO₄; pH 7,2); ressuspensas em 200μL de PBS (1X) mais 600μL de tampão de fixação com paraformaldeído 4% em PBS por 4 horas no gelo ou 12 horas à 4 °C. Após esse período, as amostras foram lavadas três vezes, por 1 minuto, em PBS (e/ou PBS com 0,1% de detergente Nonidet P-40); armazenadas em tubos de microcentrífuga contendo 50% de etanol/PBS (1X) a -20°C. O tampão de fixação foi preparado pela dissolução de 2g de paraformaldeído em 45mL de água Milli-Q, previamente aquecida a 60 °C. A este volume foram adicionados 150μL de NaOH 1N e 5mL de PBS (1X). O pH da solução foi ajustado, com HCl (P.A.), para valores na faixa de 7,2 a 7,4. A solução foi estocada, no máximo por dois dias, na geladeira.

Para não haver problemas com a permeabilidade celular, em relação às sondas, foram realizados 7 ciclos de congela-descongela (-80 a 60°C), de acordo com metodologia desenvolvida por SEKIGUCHI *et al.* (1999) para amostras termofílicas.

4.11.3. TRATAMENTO DAS LÂMINAS DE VIDRO

Para a realização da técnica de hibridação *in situ* foi utilizada lâmina de vidro (CEL-LINE/ERIE SCIENTIFIC CO.) revestida com teflon, com 12 pocinhos de 7mm de diâmetro cada (Figura 7).

As lâminas de vidro foram mantidas em solução de hidróxido de potássio 10% durante 1hora, enxaguadas com água destilada e secas em estufa a 45°C. De acordo com metodologia de STAHL & AMMAN (1991), as lâminas foram imersas rapidamente em

solução de gelatina 0,2% e colocadas para secar a temperatura ambiente, em posição vertical, tornando-as hidrófobas. Este procedimento é importante para que as soluções utilizadas durante o processo de hibridação se mantenham sobre a lâmina, evitando assim que o tampão de hibridação escorra sobre a mesma, o que comprometeria o sucesso do método (ABE, 1998).

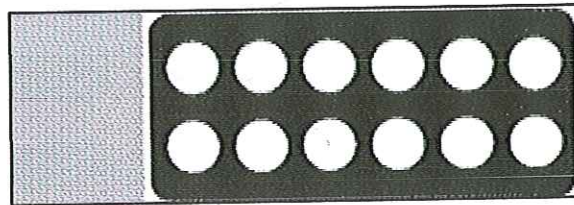


Figura 7. Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridação *in situ*.

4.11.4. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

As amostras mantidas em 50% de etanol/PBS foram retiradas do freezer e homogeneizadas em agitador de tubos por 1 minuto. Alíquota de 1 μ L de cada amostra foi espalhada no pocinho da lâmina de vidro hidrófoba e colocada para secar em forno de hibridação a 45°C, durante 20 minutos, para aumentar a adesão das células na lâmina. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries gradativas de etanol 50%, 80% e 100%, por 3 minutos cada (ABE, 1988; ARAÚJO, 2001).

Depois de desidratadas, as amostras foram cobertas com 9 μ L de tampão de hibridação pré-aquecido em temperatura específica e 1 μ L de sonda. As composições dos tampões de hibridação e lavagem, e respectivas temperaturas de hibridação para cada sonda utilizada, seguem o protocolo descrito na Tabela 13. A hibridação foi realizada no interior de frascos Falcon de 50mL, com tampa de rosca, contendo em seu interior pedaço de papel de filtro embebido com tampão de hibridação pré-aquecido. Os tubos foram revestidos externamente com papel alumínio e funcionaram como câmara úmida, mantendo a concentração do tampão de hibridação inalterada e evitando também o problema de secagem das células (ABE, 1988). Os tubos foram mantidos no forno de hibridação com temperatura e tempo apropriado para a estringência de cada sonda (Tabela 13). As amostras foram submetidas à dupla hibridação, com sondas ARC915 e MB1174, com o intuito de melhorar a intensidade do sinal fluorescente. A dupla

hibridação foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito na Tabela 13, porém a sonda MB1174, que necessita de maior concentração de formamida para alta estringência foi hibridada e lavada primeiro, seguida da sonda ARC915.

É preciso ressaltar a importância de seguir corretamente o protocolo de hibridação. Segundo STAHL & AMMAN (1991), a temperatura exigida para cada sonda corresponde à temperatura na qual a estrutura secundária da molécula de RNAr é desfeita. A dissociação é necessária para que o oligonucleotídeo fluorescente se ligue às bases complementares da cadeia simples de RNAr. Porém, a molécula de RNAr pode desnaturar-se caso a temperatura de dissociação seja ultrapassada. De acordo com os autores, a função da formamida utilizada nos tampões de hibridação é diminuir a temperatura de dissociação da molécula de RNAr, ou seja, evitar a desnaturação da mesma.

Após hibridação, as lâminas contendo amostras foram mergulhadas e mantidas, em tubos Falcon contendo 50mL dos respectivos tampões de lavagem, em temperaturas e tempos apresentados na Tabela 13. Em seguida, as lâminas foram lavadas suavemente com água destilada, para remoção dos sais e secas a temperatura ambiente. Este procedimento foi necessário para retirar do interior das células, os oligonucleotídeos fluorescentes que não hibridaram.

Para contagem total de células, amostras foram coradas com 8 μ L (por pocinho) de solução DAPI 10 μ g/mL (4',6-diamidino-2-fenil indol), durante 10 minutos, em temperatura ambiente e ausência de luz. Para retirar o excesso do corante DAPI, procedeu-se lavagem nas mesmas condições acima descritas.

As lâminas foram montadas com 1,4 μ L de água destilada, em cada pocinho, cobertas com lamínulas e observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX60-FLA, usando filtros específicos para DAPI e rodamina. As imagens foram fotografadas e congeladas com sistema de câmera de vídeo digital Optronics, em tempos de exposição de 0,08s para contraste de fase e luz comum, e 0,5s a 4,0s para epifluorescência. As microscopias de contraste de fase e de luz comum foram utilizadas para verificar a morfologia das células bem como identificar partículas abióticas que, às vezes, apresentavam fluorescência sob luz ultravioleta.

Tabela 13. Protocolos de hibridação.

SONDAS	TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO	TAMPÃO DE HIBRIDAÇÃO	TEMPERATURA E TEMPO DE LAVAGEM	TAMPÃO DE LAVAGEM
EUB338	46°C por 1,5h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7.2) + 20% formamida	48°C por 15 minutos	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7.2) + 225mM de NaCl
NON338	46°C por 1,5h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7.2) + 20% formamida	48°C por 15 minutos	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7.2) + 225mM de NaCl
ARCH915	45°C por 2h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7.2) + 20% formamida	48°C por 18 minutos	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7.2) + 225mM de NaCl
SRB385	45°C por 2h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7.2) + 30% formamida	48°C por 20 minutos	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7.2) +80 mM de NaCl
MB1174	37°C por 4h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,1% SDS (pH 7.2) + 40% formamida	37°C por 20 minutos	Igual ao tampão de hibridação

Fonte: ABE (1988), HAHN *et al.* (1992), RASKIN *et al.* (1994b), ARAÚJO (2001).

Para a contagem das células duas imagens foram congeladas e fotografadas, em mesmo campo microscópico, uma correspondente a excitação do DAPI, referente ao total de células, e outra correspondente a excitação da rodamina, referente às células hibridadas (ABE, 1988; ARAÚJO, 2001). As duas imagens foram sobrepostas para confirmar se as partículas coradas com rodamina eram realmente células hibridadas, ou seja, correspondiam às células coradas com DAPI.

Para cada sonda e amostra foram contadas entre 400 e 500 células coradas com DAPI em 20 a 25 campos microscópicos aleatórios. A porcentagem de células hibridadas com sondas específicas, em cada campo microscópico, foi calculada em relação ao total de células coradas com DAPI.

Baseado em ARAÚJO (2001), como método de contagem utilizado no FISH, considerou-se cada filamento semelhante a *Methanosaeta* sp. como sendo uma única célula. Organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp. foram contados da seguinte maneira: quando estas estavam dispostas em aglomerados, cada “cacho” de células (contendo quatro cocos) era contado como uma única célula e quando estas se encontravam soltas, contava-se um coco como uma célula.

4.10. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS GRUPOS ANAERÓBIOS TERMOFÍLICOS

Essa avaliação teve como objetivo quantificar e caracterizar fisiologicamente a população dos microrganismos anaeróbios e o grupo das arqueas metanogênicas capazes de utilizar acetato, lactato e propionato, como sais de sódio, na presença de sulfato. Para tanto, foram realizadas contagens microbianas através do valor estimado do número de células, presentes no início e final de operação dos reatores em batelada, utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP).

Antes de iniciar os ensaios do NMP, os frascos de diluição e os frascos de contagem contendo 8,80mL e 8,45mL de meio Zinder estéril, respectivamente, foram submetidos à atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70/30%) através do sistema de distribuição simultânea de gases, acoplados a filtros ACRODISC com membrana de 0,22µm de porosidade, para garantir a esterilidade dos gases (VAZOLLER, 1995).

Para cada condição estudada foram retirados 10mL de amostra dos reatores em batelada, com auxílio de seringa estéril. Esse volume foi transferido para um frasco de antibiótico estéril (30mL) contendo 5g de pérolas de vidro. O sistema foi mantido sob atmosfera de nitrogênio/dióxido de carbono (70/30%) por 5 minutos e submetido à agitação manual, em ângulo de 45°, durante 20 minutos, para a adequada homogeneização da biomassa anaeróbia (VAZOLLER, 1995). Sob condições de assepsia, 1,0mL da suspensão foi transferido desse sistema para o frasco de antibiótico contendo 9,0mL de solução de diluição (8,8mL de meio Zinder estéril, 0,1mL de solução de bicarbonato de sódio 10% e 0,1mL de solução redutora de sulfeto de sódio 5%), procedendo-se a realização da diluição decimal seriada (Figura 8). Posteriormente, alíquotas de 1,0mL da amostra diluída foram inoculadas, em quintuplicata, nos frascos de contagem contendo meio de cultivo com substratos orgânicos estudados, na presença de sulfato.

Para a inoculação dos frascos de contagem utilizou-se meio basal Zinder estéril com volume final de 9,0mL, considerando-se a adição das soluções complementares de bicarbonato de sódio 10% (0,1mL), de vitaminas¹ (0,1mL), de sulfato de sódio 10mM (0,1mL), de extrato de levedura 2% (0,05mL) e de solução redutora de sulfeto de sódio 5% (0,1mL), além das fontes orgânicas específicas acetato de sódio 30mM (0,15mL), lactato de sódio 20mM (0,10mL) e propionato de sódio 10mM (0,10mL).

A inoculação também foi realizada sob condições de assepsia utilizando-se seringas de 1,0mL, as quais foram substituídas a cada série de cinco frascos inoculados. A faixa de diluição escolhida para a realização da técnica do NMP foi de 10^{-1} a 10^{-15} . Os frascos foram armazenados em estufa mantida a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ e submetidos, após 20 dias de incubação, a verificação de desenvolvimento de turbidez, análise da atmosfera livre dos frascos por cromatografia gasosa e exames microscópicos (VAZOLLER, 1995).

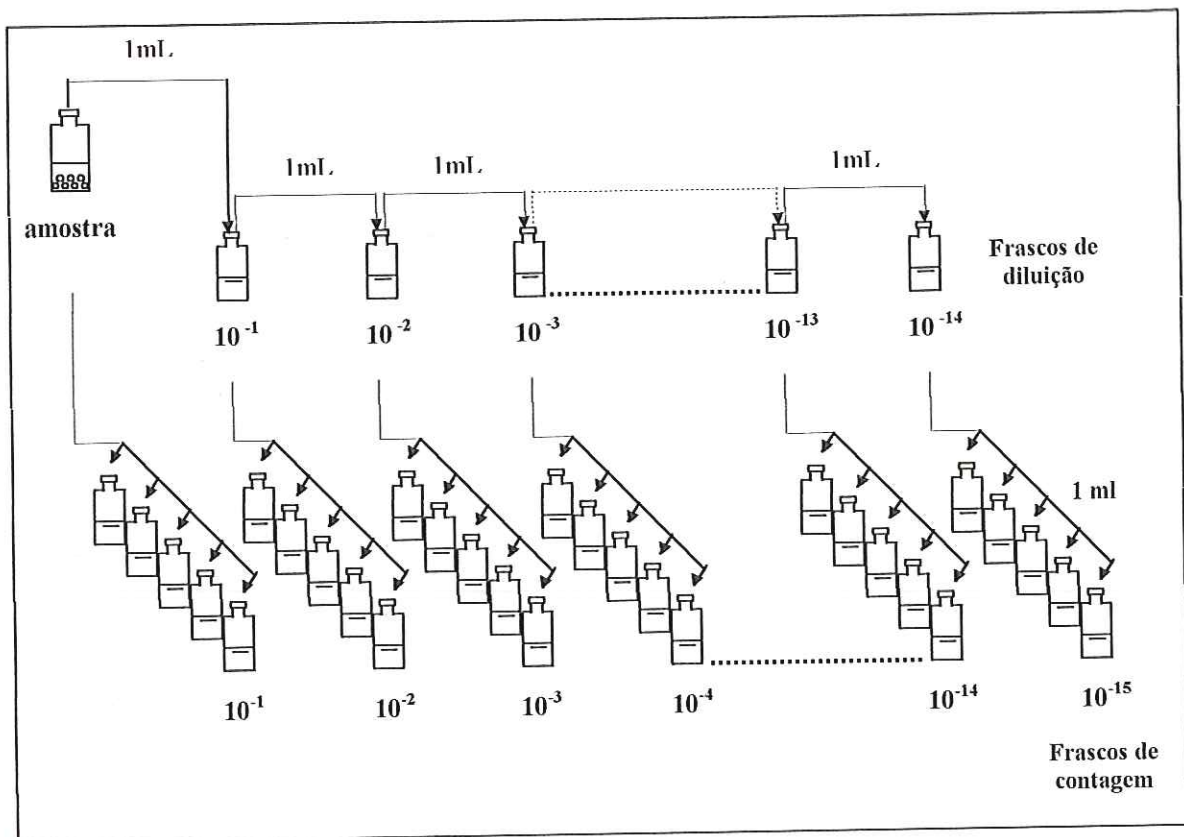


Figura 8. Esquema da distribuição da amostra nos frascos de diluição e nos frascos de contagem pela técnica do NMP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ENRIQUECIMENTO SOB CONDIÇÕES TERMOFÍLICAS

Os ensaios de enriquecimento do lodo granulado termofílico em reatores em batelada operados sob condições anaeróbias termofílicas (55°C), foram realizados para estimular o crescimento microbiano e obter boa atividade metanogênica. O lodo enriquecido foi posteriormente utilizado como inóculo em ensaios específicos com acetato de sódio, lactato de sódio e propionato de sódio, em separado, na presença de sulfato.

Para a realização do enriquecimento foi usado meio basal ZINDER suplementado com soluções de substratos orgânicos e sulfato de sódio, descritos na Tabela 7. As fontes e concentrações escolhidas foram baseadas no trabalho de VAZOLLER (1995) por serem importantes para estimular a degradação anaeróbia em todas as suas etapas.

Os ensaios de enriquecimento foram realizados em duplicatas e as análises cromatográficas permitiram o monitoramento da produção de gás metano nos reatores. Os valores do biogás produzidos foram expressos em porcentagem em função do tempo, e estão apresentados na Figura 9 (a, b e c) e Anexo 2.

A produção máxima de metano foi de aproximadamente 71,9% em 281,5 horas de incubação; 70,2% em 212,7 horas e 72,4% em 527 horas para os reatores de enriquecimento. FATIBELLO (2001), estudando lodo proveniente do mesmo reator (UASB) observou produção máxima de metano de aproximadamente 68,8% em 936 horas de operação, para as mesmas condições de enriquecimento. As diferenças

encontradas, em relação ao período para atingir a produção máxima de metano, provavelmente foram relacionadas com as características do próprio lodo, temperatura de armazenamento na geladeira e grau de homogeneização.

Neste trabalho, a produção máxima de metano também ocorreu em tempos diferentes para cada enriquecimento. Deve-se salientar que os seis reatores de enriquecimento foram operados, em diferentes épocas, de acordo com a necessidade de utilização do inóculo para os ensaios em condições fisiológicas específicas. Deste modo, as considerações mencionadas anteriormente são válidas também para explicar as diferenças, em relação ao tempo, para atingir a produção máxima de metano.

As características morfológicas da biomassa, presente nos reatores em batelada, foram avaliadas empregando-se microscopia de luz comum, contraste de fase e fluorescência. Em todos os reatores de enriquecimento foi observado o predomínio de organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp., cistos de sarcinas e bacilos retos fluorescentes. Entre as morfologias pertencentes ao Domínio *Bacteria* foram visualizados bacilos curvos, bacilos com as extremidades afiladas semelhantes a *Desulfotomaculum* sp. e esporos.

VAZOLLER (1995) e FATIBELLO (2001) também utilizaram lodo termofílico de mesma procedência e verificaram morfologias bastante semelhantes às observadas neste trabalho, ou seja, predomínio de *Methanosarcina* sp., cistos de sarcinas e bacilos retos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. No entanto, VAZOLLER (1995) destacou também o aparecimento de organismos acetoclásticos semelhantes a *Methanosaeta* sp.

É importante salientar que, além das bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas, o lodo enriquecido também apresentava quantidades significativas de material particulado. Exames microscópicos revelaram que a maioria das células microbianas ficou retida nesse material. Posteriormente, foi realizado o desprendimento celular, das amostras, através de agitação manual com pérolas de vidro, agitação em vórtex e sonicação. No entanto, foi constatada grande dificuldade em quantificar as células presentes em tal lodo. Quando aplicada à técnica do FISH, esse problema tornou-se agravado. Ou seja, a sonda marcada com rodamina ficava retida nesses materiais, formando agregados vermelhos, inviabilizando a caracterização e contagem celular. Por esses motivos, optou-se por novo cultivo do lodo enriquecido, em condições seletivas com acetato de sódio, lactato de sódio ou propionato de sódio, mais sulfato, visando diluição e seleção dos tipos morfológicos para os objetivos estudados.

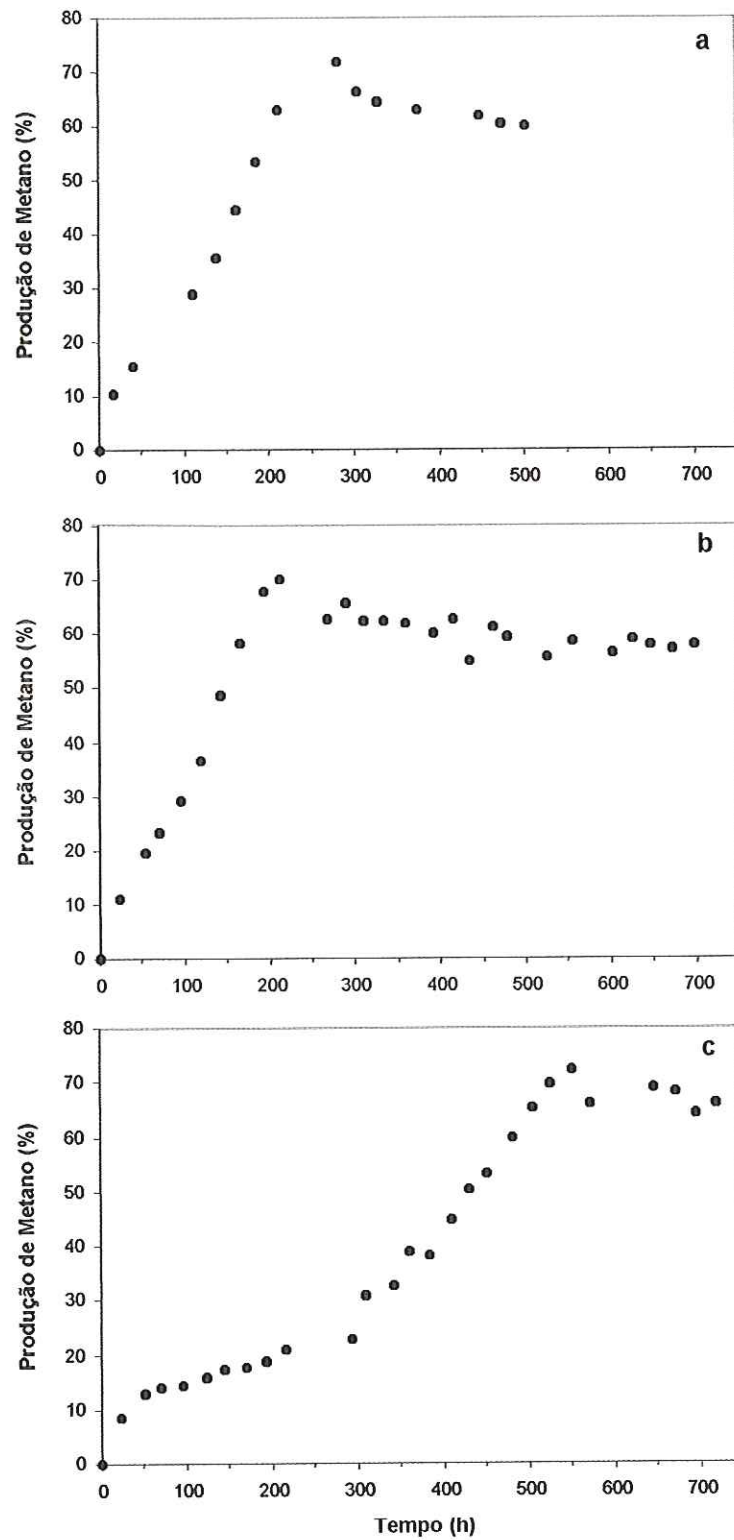


Figura 9. Produção média de gás metano, em função do tempo, nos ensaios de enriquecimento do lodo termofílico, posteriormente utilizados como inóculo para os ensaios em condições fisiológicas específicas: (a) 71,9% de metano, (b) 70,2% de metano e (c) 72,4% de metano.

5.2. CULTIVO EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS ESPECÍFICAS

Após o enriquecimento do lodo termofílico, como mostrado no item 5.1, foram realizados ensaios de cultivo em condições fisiológicas específicas, em reatores em batelada, utilizando-se acetato, lactato e propionato, como sais sódicos, na presença de sulfato. Esses ensaios visaram estimular a presença de organismos metanogênicos e bactérias redutoras do íon sulfato na biomassa anaeróbia termofílica. Os substratos orgânicos foram definidos em relação às características fisiológicas desses organismos visando estudar as possíveis relações em condições nutricionais favoráveis, específicas ou inibidoras.

Com o substrato orgânico acetato, diferentes soluções de vitaminas foram testadas. O objetivo desses experimentos foi identificar a composição da solução de vitaminas que melhor favorecesse a metanogênese e a sulfetogênese. Para isso foram utilizadas a solução descrita por DUBOURGUIER (1987) e solução específica para BRS (WIDDEL & PFENNIG, 1984). As condições nutricionais, as vitaminas e os volumes de inóculo utilizados em cada ensaio estão apresentados na Tabela 14. Os valores desta tabela representam as concentrações de ácido acético e de sulfato determinados por cromatografia. No entanto, é importante mencionar que os reatores foram alimentados com solução de acetato de sódio e sulfato de sódio.

Tabela 14. Condições nutricionais utilizadas nos ensaios de cultivo com diferentes vitaminas.

ENSAIOS	CONDIÇÃO NUTRICIONAL (MG/L)	SOLUÇÃO DE VITAMINAS	VOLUME DE INÓCULO (ML)
I	Ácido acético (2805,0)	Vitamina ¹	100
II	Ácido acético (2805,0) + sulfato (1125,0)	Vitamina ¹	100
III	Ácido acético (2805,0) + sulfato (1125,0)	Vitamina ²	100

Solução de vitaminas¹: DUBOURGUIER (1987).

Solução de vitaminas²: WIDDEL & PFENNIG (1984).

Foram realizadas análises cromatográficas para acompanhar a produção de metano, em função do tempo, para as condições descritas na Tabela 14. Os valores do

biogás produzido foram expressos em porcentagem e as médias das duplicatas estão apresentadas no Anexo 3.

No ensaio I, com acetato de sódio e solução de vitaminas¹, a produção máxima de metano foi de aproximadamente 55,4% em 746,3 horas de operação. Para a condição II, com acetato de sódio mais sulfato de sódio e solução de vitaminas¹, a produção máxima de metano foi de 51,9% em 768,7 horas, com redução de sulfato de aproximadamente 53,3%, para concentração inicial de 1125,0mg/L. A produção de sulfeto total dissolvido foi de aproximadamente 37,7mg/L. Para a condição III, com acetato de sódio mais sulfato de sódio e solução de vitaminas², a produção máxima de metano foi de 4,7% em 293,3 horas. A redução de sulfato foi de aproximadamente 40%, para concentração inicial de 1125,0mg/L, com produção de sulfeto total dissolvido de aproximadamente 7,8mg/L. Os valores médios da produção de metano, em função do tempo, para cada condição estudada estão apresentados na Figura 10.

Estequiometricamente, em condições padrão, a redução de 1125mg de sulfato produz 398,4mg de sulfeto total. No entanto, os valores das concentrações de sulfeto produzidos nos ensaios II e III foram de 37,7mg/L e 7,8mg/L, respectivamente. É importante ressaltar que em ambos os ensaios determinou-se apenas as concentrações de sulfeto dissolvido. Como a solubilidade dos gases diminui com o aumento da temperatura, possivelmente, os valores de sulfetos dissolvidos encontrados foram inferiores aos esperados devido à elevada temperatura utilizada nos ensaios (55°C) e à precipitação de sulfetos pela presença de traços de metais no meio de cultivo.

No ensaio controle I, apenas com acetato, foi verificado o predomínio de bacilos retos fluorescentes, sarcinas, bacilos com extremidades arredondadas e bacilos curvos. Na condição II, com acetato mais sulfato e solução de vitaminas¹ foram visualizados os mesmos tipos morfológicos, descritos no ensaio controle, no entanto favorecendo o crescimento mais intenso de bacilos curvos e bacilos com extremidades afiladas. Na terceira condição, acetato, sulfato e solução de vitaminas², foram visualizadas raras arqueas metanogênicas, mantendo a proporção de ocorrência, das demais morfologias, semelhante ao segundo ensaio. As morfologias observadas nas respectivas condições nutricionais estão apresentadas na Tabela 16. VAZOLLER (1995) realizou ensaios de cultivo, com lodo termofílico (55°C) de reator UASB, em meio mineral ZINDER com acetato de sódio (40mM) e sulfato de sódio (10mM). As morfologias observadas pelo autor foram sarcinas, bacilos retos fluorescentes e bacilos espessos não fluorescentes.

Pelos resultados obtidos nas análises cromatográficas e exames microscópicos, observou-se que a melhor condição para o desenvolvimento dos microrganismos anaeróbios acetoclásticos, metanogênicos e bactérias redutoras do íon sulfato foi em acetato de sódio, sulfato de sódio e solução de vitaminas¹ (DUBOURGUIER, 1987). A condição III com acetato de sódio, sulfato de sódio e solução de vitaminas² favoreceu apenas o crescimento das BRS. Segundo WIDDEL & PFENNIG (1984), esta solução de vitaminas contém o ácido *p*-aminobenzóico o qual é requerido como fator de crescimento para as BRS. No entanto, este ácido atua como inibidor do crescimento de arqueas metanogênicas.

Por esse motivo, a condição I foi definida para realizar os ensaios de cultivo nutricionais, em reatores em batelada e diferenciais. A solução de vitaminas, descrita por DUBOURGUIER (1984), também foi utilizada nos ensaios com lactato de sódio e propionato de sódio, individualmente, na presença de sulfato.

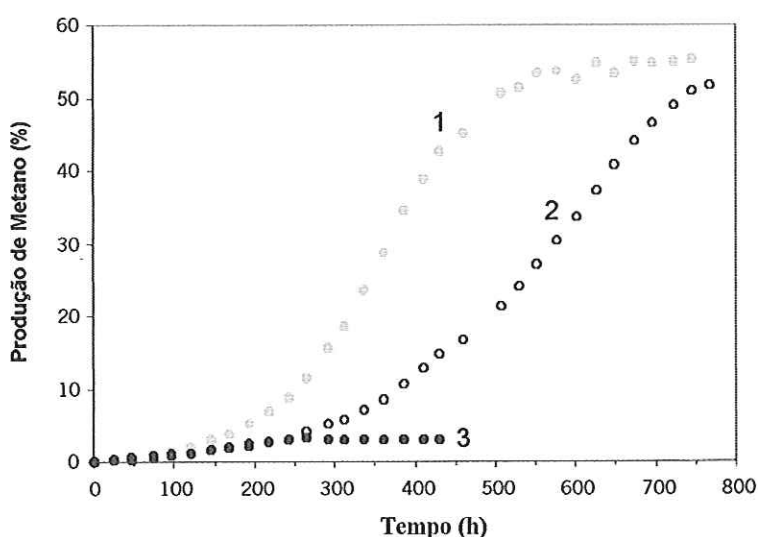


Figura 10. Valores médios da produção de metano, em função do tempo, durante os ensaios de cultivo em condições específicas: (1) acetato de sódio e solução de vitaminas¹, (2) acetato de sódio, sulfato de sódio e solução de vitaminas¹, (3) acetato de sódio, sulfato de sódio e solução de vitaminas².

Assim como o ácido acético, os valores das concentrações de ácido láctico e ácido propiônico foram determinados por cromatografia. Como mencionado anteriormente, os reatores foram alimentados com solução de lactato de sódio ou propionato de sódio e sulfato de sódio.

Nos ensaios com lactato de sódio e sulfato, praticamente não houve produção de metano e o valor obtido foi igual a 5,9% em 144 horas. As condições nutricionais deste

ensaio estão apresentadas na Tabela 15. Os exames microscópicos revelaram predomínio de bacilos fluorescentes, bacilos curvos, bacilos com extremidades afiladas e muitos esporos (Tabela 16). Em condições nutricionais semelhantes, com lodo termofílico, VAZOLLER (1995) observou a presença de sarcinas, bacilos com extremidades afiladas e bacilos curvos.

No ensaio com propionato de sódio, sulfato de sódio e 100mL de inóculo, não houve bom crescimento celular. Os exames microscópicos mostraram que a maioria das células apresentava-se na forma de esporos. Foram observados, com pouca frequência, bacilos retos fluorescentes, bacilos com extremidades afiladas e bacilos com extremidades arredondadas. Com essas considerações, foi realizado um novo ensaio visando elevar a biomassa anaeróbia. Para tanto, foram realizados ensaios nas condições escritas a seguir com diminuição nas concentrações de propionato e aumento no volume de inóculo.

O novo ensaio foi feito com propionato de sódio mais sulfato de sódio e 200mL de inóculo (Tabela 15). Para essa condição não houve produção de metano, porém o aumento no volume do inóculo favoreceu o crescimento celular. Foram visualizados, através de exames microscópicos, arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina* sp., bacilos retos fluorescentes, bacilos com extremidades arredondadas, cistos de sarcinas e outros esporos. Em seus estudos, VAZOLLER (1995) observou predomínio de bacilos com extremidades afiladas, simples ou em pares, em amostras de lodo cultivado, com propionato de sódio (20mM) e sulfato de sódio (10mM), sob condições termofílicas.

Tabela 15. Condições nutricionais utilizadas nos ensaios de cultivo com lactato e propionato, na presença de sulfato.

CONDIÇÃO NUTRICIONAL (MG/L)	SOLUÇÃO DE VITAMINAS	VOLUME DE INÓCULO (ML)
Ácido láctico (1569,5) + sulfato (1125,0)	Vitamina ¹	100
Ácido propiônico (2218,0) + sulfato (1125,0)	Vitamina ¹	100
Ácido propiônico (1109,0) + sulfato (1125,0)	Vitamina ¹	200

Solução de vitaminas¹: DUBOURGUIER (1987).

Table 16. Morfologias das células presentes nos reatores em batelada alimentados com substratos orgânicos específicos, sulfato de sódio e diferentes vitaminas.

MORFOLOGIAS	CONDIÇÕES NUTRICIONAIS							
	ÁCIDO ACÉTICO (2805,0MG/L) SOLUÇÃO DE VIT. ¹	ÁCIDO ACÉTICO/ SULFATO (2805,0/1125,0) SOLUÇÃO DE VIT. ¹	ÁCIDO ACÉTICO/ SULFATO (2805,0/1125,0) SOLUÇÃO DE VIT. ²	ÁCIDO LÁCTICO/ SULFATO (1569,4/1125,0) SOLUÇÃO DE VIT. ¹	ÁCIDO PROPIONICO/ SULFATO (2218,0,0/1125,0) SOLUÇÃO DE VIT. ¹	ÁCIDO PROPIONICO/ SULFATO (1109,0/1125,0) SOLUÇÃO DE VIT. ¹		
ARQUEAS METANOGENICAS								
<i>Methanosarcina</i> sp.	++++	++++	++	+	-	-	+++	
<i>Methanosaeata</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
Cistos de sarcina	+++	+++	+++	++	-	-	+++	
Bacilos fluorescentes	++++	++++	+++	++++	++	++	+++	
Bacilos curvos fluorescentes	-	++	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS								
Bacilos com extremidades afiladas	++	+++	++	++++	+	+	+	
Bacilos com extremidades arredondadas	+++	+++	+++	+	++	++	+++	
Bacilos curvos	++	+++	+++	++	++	++	++	
Bacilos em cadeia	-	-	-	-	-	-	-	-
Cocos	-	-	-	-	-	-	-	-
Espirilos	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++	
Filamentos	-	+	-	-	-	-	-	-

(++++) predominantes, (+++) frequentes, (++) pouco frequentes, (+) raros, (-) não foram observados.

5.3. ENSAIOS EM REATORES EM BATELADA E DIFERENCIAIS

Nesta fase foram realizados ensaios, sob condições termofílicas ($55\pm 1^\circ\text{C}$) em reatores operados em batelada e reatores diferenciais de leito fixo, alimentados com os substratos orgânicos acetato de sódio, lactato de sódio e propionato de sódio, separadamente, na presença de sulfato. Como mencionado anteriormente, as concentrações dos substratos orgânicos e fonte de enxofre foram estabelecidas com base nos resultados obtidos por VAZOLLER (1995) para lodo termofílico.

Os reatores em batelada com células planctônicas foram mantidos em agitador rotatório a 150rpm e os reatores diferenciais preenchidos com espumas de poliuretano foram mantidos em estufa. As condições específicas de cada sistema encontram-se detalhadamente descritas nos itens 4.7.1. e 4.7.2., respectivamente. Durante o período de operação foram monitorados os consumos de ácidos orgânicos e sulfato em ambos os sistemas. No reator em batelada também foram quantificadas as produções de metano e sulfeto total dissolvido, além da determinação de sólidos suspensos voláteis (inicial e final). A DQO foi monitorada apenas no frasco de alimentação dos reatores diferenciais (Figura 6).

O acompanhamento das morfologias celulares foi realizado por exames de microscopia de luz comum, contraste de fase, fluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Quantificações, usando a técnica de FISH, foram realizadas com sondas fluorescentes específicas para os Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338), para o grupo geral das BRS (SRB385) e família Methanobacteriaceae (MB1174).

Além do FISH, foram realizadas quantificações microbianas pela técnica do NMP para avaliar a concentração da população de organismos anaeróbios e de arqueas metanogênicas presentes no inóculo utilizado, nos reatores em batelada, para cada condição estudada.

A seguir, estão apresentados os resultados experimentais obtidos para cada substrato orgânico específico, na presença de sulfato, durante a operação dos reatores em batelada e diferenciais.

5.3.1. REATORES ANAERÓBIOS ALIMENTADOS COM ACETATO DE SÓDIO E SULFATO DE SÓDIO

5.3.1.1. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO

Foram realizados ensaios, com acetato de sódio e sulfato de sódio, em reatores em batelada e diferenciais, para verificar os consumos do substrato orgânico e sulfato. Ambos os sistemas operaram sob condições anaeróbias, a $55\pm 1^\circ\text{C}$, e foram alimentados com meio basal ZINDER (ZINDER, 1984) suplementado com as soluções descritas na Tabela 10. Estes sistemas foram inoculados com 10% de biomassa termofílica proveniente do cultivo em condição específica (Figura 10) e obtida na fase exponencial de crescimento, com 768,7 horas de operação, atingindo produção máxima de metano de 51,9%.

Os reatores anaeróbios com sistema de alimentação em batelada apresentaram 95,6% de eficiência de remoção de ácido acético, em 675 horas de operação, para concentração inicial de 1901,1mg/L. A redução de sulfato foi de aproximadamente 31,8%, para concentração inicial a 1062,5mg/L, com produção de sulfeto total dissolvido de aproximadamente 42,1mg/L. Estequiometricamente, a redução de 1062,5mg/L de sulfato produz 376,3mg/L de sulfeto. Conseqüentemente, a redução de 31,8% de sulfato produziria 119,3mg/L de sulfeto total. Porém, a análise de sulfeto contemplou apenas a parte dissolvida no meio. Concentrações de H_2S gasoso, presentes na atmosfera livre do reator (temperatura de incubação de 55°C) e de sulfetos precipitados por metais presentes no meio de cultivo não foram determinados e devem ser responsáveis pela diferença encontrada entre o valor esperado e o encontrado em solução. Os valores de $\text{SSV}_{\text{inicial}}$ e $\text{SSV}_{\text{final}}$ foram 1257,0mg/L e 183,0mg/L, respectivamente. A produção máxima de metano foi de aproximadamente 43,3% em 527,3 horas de operação. As variações das concentrações do substrato e da produção de metano, em função do tempo, estão apresentadas na Figura 11 (*a* e *b*, respectivamente) e Anexo 4.

Para concentrações iniciais de ácido acético e sulfato iguais a 1901,0mg/L e 1062,5mg/L, respectivamente, obteve-se relação ácido acético/sulfato de aproximadamente 1,8. BHATTACHARYA *et al.* (1996) verificaram que em culturas enriquecidas, os organismos metanogênicos e bactérias sulfetogênicas mesofílicas (35°C) foram capazes de utilizar acetato de sódio (637,0mg/L) e sulfato de sódio

(245,0mg/L), simultaneamente, numa relação de 2,6. CHOI & RIM (1991) relataram que para relação DQO/sulfato superior a 2,7 predominaram as arqueas metanogênicas acetoclásticas; enquanto para valor menor a 1,7, as bactérias redutoras de sulfato acetotróficas tornaram-se mais efetivas. Os autores verificaram também que em valores, para relação DQO/sulfato, entre 1,7 e 2,7 ocorreu competição ativa entre esses organismos. Especificamente neste trabalho, com temperatura termofílica (55°C), em reatores com células planctônicas, e relação de 1,8 verificou-se certo equilíbrio entre a metanogênese, sulfetogênese e oxidação de acetato.

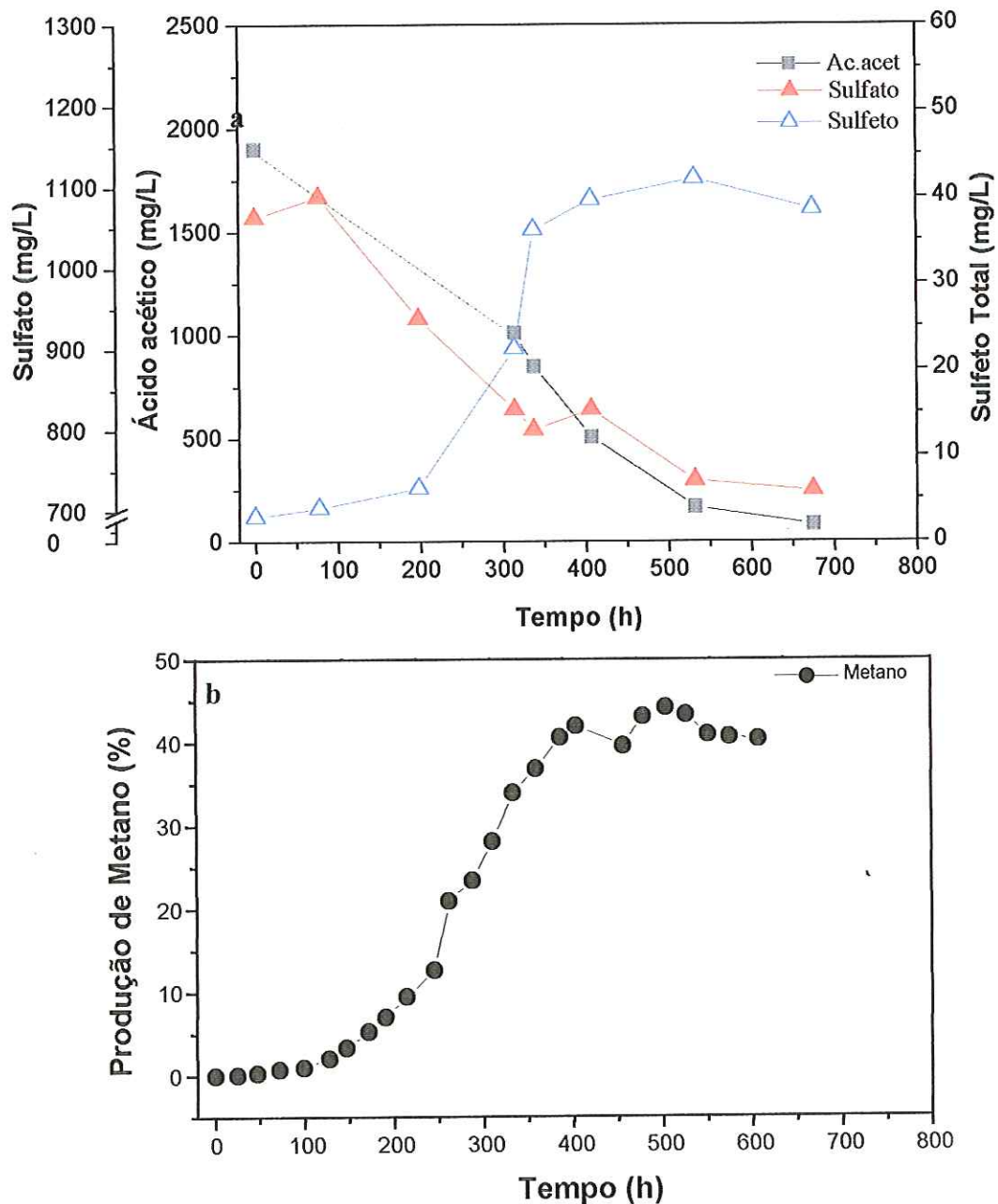


Figura 11. Reatores em batelada: (a) variação temporal das concentrações de sulfato, ácido acético e sulfeto total dissolvido e (b) produção de metano.

Os resultados mostraram que para a faixa de pH estudada e produção de sulfeto total dissolvido de aproximadamente 42,1mg/L, não houve inibição da metanogênese e sulfetogênese, sob condições termofílicas. VISSER *et al.* (1992) realizaram experimentos em reatores em batelada, com lodo granulado proveniente de reator UASB, sob condições termofílicas. Os autores mostraram que a 55°C, valores elevados de pH entre 8,3 a 8,6 favoreceram a degradação de acetato através da redução do sulfato; enquanto a metanogênese foi favorecida em valores de pH mais baixos na faixa de 6,0 e 8,0. Para temperatura mesofílica (30°C), VISSER *et al.* (1996) verificaram em reatores em batelada, com lodo granulado suspenso proveniente de reator UASB, relação DQO/sulfato igual a 1, com ácido acético como substrato orgânico, que as atividades metanogênicas e sulfetogênicas foram inibidas em 50%, para concentração de sulfeto total de 564 e 615mg/L, respectivamente, para valores de pH entre 7,2 a 7,5. Provavelmente, pelos resultados obtidos neste trabalho, não houve inibição das atividades considerando a concentração de sulfeto total dissolvido de 42,1mg/L, para faixa de pH entre 7,0 e 8,0. É importante ressaltar que a concentração de sulfeto de hidrogênio não dissociado ou livre (H₂S) não foi quantificada.

Nos experimentos, com quatro reatores anaeróbios diferenciais em paralelo, foi verificada eficiência de remoção do ácido acético de 99,6%, em 166 horas de operação, para concentração inicial de 2306,5mg/L. A eficiência de remoção de DQO foi de aproximadamente 92,3% para concentração inicial de 2015,0mg/L, indicando que o substrato orgânico foi removido do sistema pelo consórcio de bactérias anaeróbias utilizadoras de acetato e arqueas metanogênicas acetoclásticas. A redução de sulfato foi de aproximadamente 6,7%, para concentração inicial de 1125,0mg/L. As relações DQO/sulfato e ácido acético/sulfato foram iguais a 1,8 e 2,0, respectivamente. Os valores da variação da concentração do substrato, em função do tempo, estão apresentados na Figura 12.

Portanto, os resultados mostraram comportamentos distintos entre os reatores em batelada com células planctônicas e reatores diferenciais com biofilme. Como mencionado acima, no primeiro sistema ocorreu produção de metano de 42,1%, com remoção de sulfato de 31,8% e de ácido acético de 95,6%. No segundo, não foi quantificada a produção de metano devido às características operacionais do sistema. Ocorreu remoção de 6,7% de sulfato e 99,6% de ácido acético. Esses resultados mostraram claramente que a redução de sulfato foi favorecida no reator em batelada, embora a utilização do substrato orgânico tenha ocorrido adequadamente em ambos os

sistemas. Provavelmente ocorreu o predomínio de um tipo de metabolismo em relação ao outro, favorecido pelas condições de crescimento celular, ou seja, planctônico ou biofilme. Essas características levaram ao desenvolvimento de tipos morfológicos predominantes para as condições impostas, diferenciando as eficiências de tratamento. As análises de microscopia óptica e hibridação *in situ* (FISH) confirmaram esse comportamento e estão descritas detalhadamente a seguir.

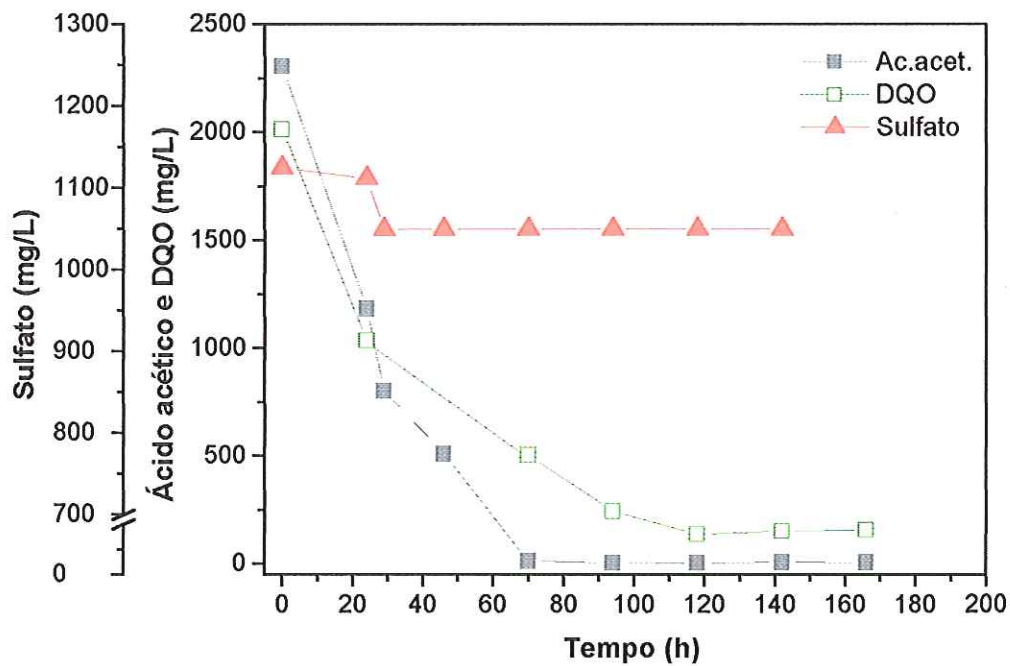


Figura 12. Reatores diferenciais de leito fixo: variação temporal das concentrações de sulfato, ácido acético e DQO.

5.3.1.2. MAPEAMENTO MORFOLÓGICO

Durante o período de 675 horas de operação, do reator em batelada, foi verificado o predomínio de organismos semelhantes à *Methanosarcina* sp., bacilos fluorescentes e bactérias semelhantes a *Desulfotomaculum* sp. Foi observada também a presença de bacilos com extremidades arredondadas, bacilos curvos, cistos de sarcinas, outros esporos e raros bacilos curvos fluorescentes (Figura 13).

VAZOLLER (1995), estudando lodo anaeróbio termofílico proveniente do reator UASB da Usina São Martinho, realizou ensaios de enriquecimento com os substratos acetato de sódio (40mM) e sulfato de sódio (10mM). Nessas condições, foram observados tipos morfológicos semelhantes a *Methanosarcina* sp., bacilos fluorescentes e bacilos espessos não fluorescentes. Segundo o autor, a degradação do substrato orgânico na presença de sulfato, foi realizada por co-cultura representada por um organismo acetoclástico, que produziu hidrogênio, com outro metanogênico hidrogenotrófico.

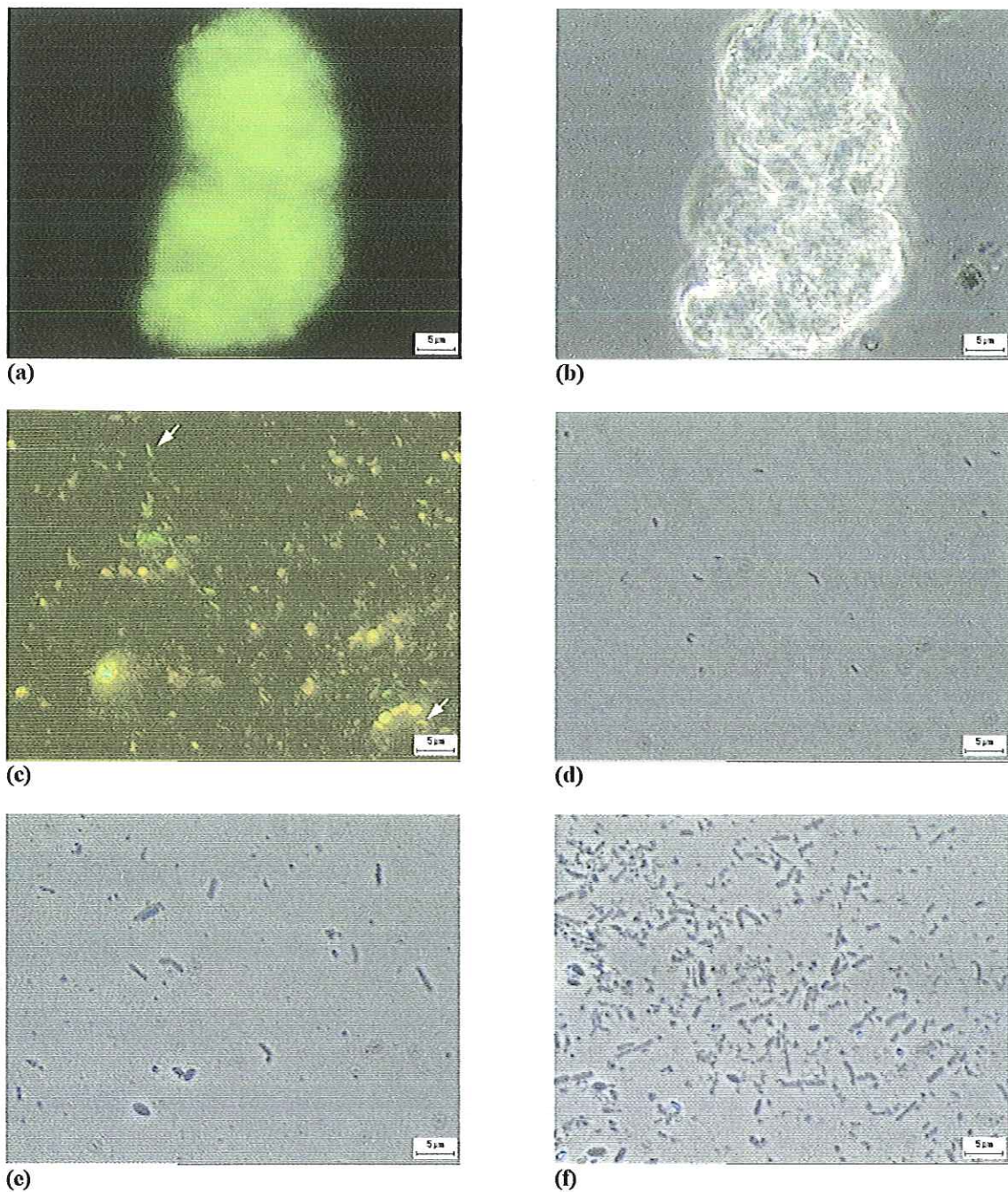


Figura 13. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no reator em batelada alimentado com acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) e (b) organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp., (c) bacilos retos e curvos, (d) bacilos curvos, (e) bacilos com extremidades arredondadas, (f) bacilos com extremidades afiladas.

No biofilme do reator diferencial foi acompanhado o desenvolvimento morfológico, em função do tempo, durante 166h de operação. Na Tabela 17 estão apresentadas as morfologias dos microrganismos presentes no biofilme durante 24h, 46h, 70h, 118h, 142 e 166h de operação. As morfologias observadas no biofilme foram semelhantes às descritas para o reator em batelada, porém com diferença na ocorrência e crescimento favorável de organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos. A ocorrência e as morfologias observadas, nesse ensaio, estão apresentadas na Tabela 17 e Figura 14, respectivamente.

É importante ressaltar que o acetato é principalmente convertido a metano e dióxido de carbono pelas arqueas metanogênicas acetoclásticas, ou seja, *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. Essa última, parece ser predominante e desempenha papel importante em reatores anaeróbios, especialmente em reator anaeróbio de fluxo horizontal com matrizes de poliuretano (VARESCHE *et al.*, 1997) tratando diferentes tipos de águas residuárias devido à alta afinidade pelo acetato quando comparada à *Methanosarcina* sp. (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). No reator de leito fixo, verificou-se que a partir de 118h de operação, com concentração de ácido acético igual a 5,1mg/L, houve o predomínio de organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. Segundo RASKIN *et al.* (1996), baixa concentração de ácido acético torna-se vantajosa para esse organismo em relação à *Methanosarcina* sp.. No entanto, WIDDEL (1998) mencionou que a relação $\mu_{\text{máx}}/K_s$ de *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. são muito similares, indicando que, quando a concentração de acetato está baixa, esses dois organismos podem coexistir. Durante o mesmo período houve considerável acréscimo de sarcinas no biofilme. Provavelmente, esses organismos utilizaram além do acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, provenientes da oxidação da fonte orgânica.

No biofilme termofílico foram também visualizados o predomínio de bacilos com extremidades arredondadas, pertencentes ao Domínio *Bacteria* e relacionados provavelmente, aos organismos oxidadores de acetato, competindo com a *Methanosaeta*, pelo substrato orgânico disponível. Esses resultados das análises morfológicas foram melhor elucidados pelo FISH.

Tabela 17. Ocorrência das morfologias observadas no biofilme dos reatores diferenciais alimentados com acetato de sódio e sulfato de sódio.

MORFOLOGIAS	TEMPO (H)					
	24	46	70	118	142	166
ARQUEAS METANOGÊNICAS						
<i>Methanosarcina</i> sp	+	+	+	+++	+++	++
<i>Methanosaeta</i> sp	-	-	-	++++	++++	++++
Cistos de sarcinas	+++	++	++	+++	+++	++
Bacilos fluorescentes	++	+	+	+	+	+
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS						
Bacilos com extremidades afiladas	++++	++++	++++	+	+	+
Bacilos com extremidades arredondadas	++++	++++	++++	+++	+++	+++
Bacilos curvos	++	++	++	++	++	++
Bacilos em cadeia	-	-	-	-	-	-
Cocos	-	-	-	-	-	-
Espirilos	-	-	-	-	-	-
Outros esporos	+++	+++	+++	+++	++++	++++
Filamentos	-	-	-	++++	++++	++++

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados.

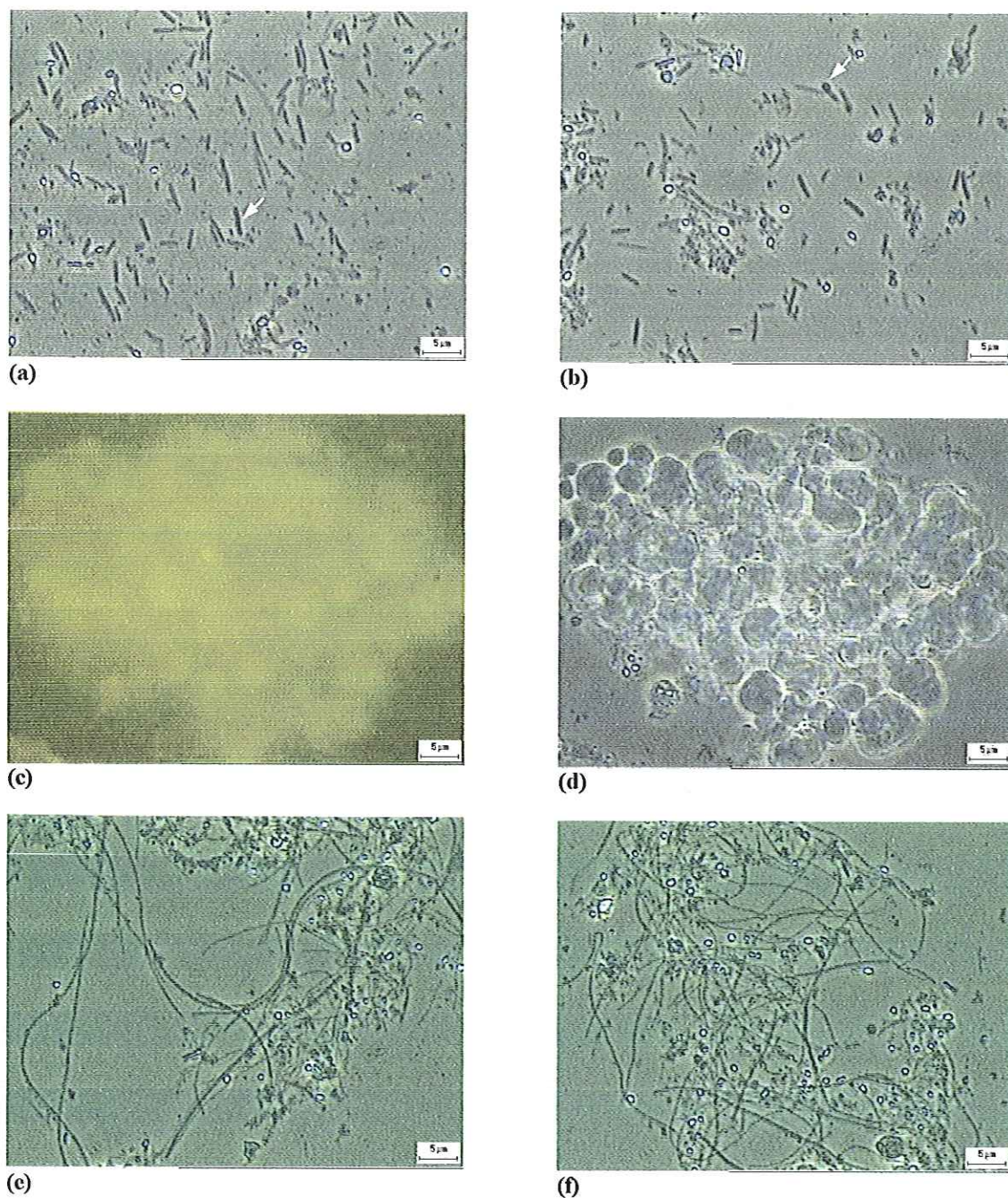


Figura 14. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no reator diferencial alimentado com acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos com extremidades arredondadas, (b) bacilos com esporos terminais, (c) e (d) organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp., (e) e (f) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos.

5.3.1.3. CONCENTRAÇÃO CELULAR

No início e final de operação, dos reatores em batelada, foram realizadas contagens microbianas, utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). A Tabela 18 apresenta as concentrações celulares obtidas nos ensaios do NMP_{inicial}.

Tabela 18. Números estimados de microrganismos anaeróbios totais e produtores de metano obtidos através da técnica do NMP com acetato de sódio e sulfato de sódio.

ORGANISMOS	CONCENTRAÇÃO (ORGANISMOS/ML)	
	INICIAL	FINAL
Anaeróbios Totais	$2,4 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{11}$
Arqueas Metanogênicas	$1,7 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$

Exames de microscopia óptica de luz comum, contraste de fase e fluorescência foram realizados para observar os tipos morfológicos presentes nos ensaios de NMP_{inicial} e NMP_{final}.

Na avaliação microscópica do ensaio de NMP_{inicial} observou-se predomínio de bacilos retos com extremidades arredondadas, bacilos retos com extremidades afiladas, organismos metanogênicos semelhantes a *Methanosarcina* sp. e bacilos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp.. Deve-se ressaltar que, os bacilos com extremidades arredondadas e afiladas cresceram até diluição de 10^{-8} , enquanto as arqueas metanogênicas cresceram favoravelmente até diluição da ordem de 10^{-4} . Foi verificada também a presença de cistos de sarcinas e bacilos curvos não fluorescentes. Estes últimos, provavelmente pertencentes ao grupo das BRS, foram favorecidos pela presença de sulfato e mostraram crescimento da ordem de 10^{-8} . Organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp., filamentos e outros esporos foram observados com pouca frequência. A ocorrência e as morfologias observadas nesse ensaio estão apresentadas na Tabela 19 e Figura 15, respectivamente.

Tabela 19. Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP_{inicial} para acetato de sódio e sulfato de sódio.

MORFOLOGIAS	DILUIÇÕES						
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
ARQUEAS METANOGENICAS							
<i>Methanosarcina</i> sp	++++	++++	++++	+++	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp	+	+++	+	-	-	-	-
Cistos de sarcinas	+++	+++	+++	+++	+	-	-
Bacilos fluorescentes	++++	++++	+++	+++	+	-	-
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS							
Bacilos com extremidades afiladas	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+
Bacilos com extremidades arredondadas	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+
Bacilos curvos	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+
Bacilos em cadeia	-	-	-	-	-	-	-
Cocos	-	-	+	+	+	-	-
Espirilos	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	++	++	++	++	++	++	+
Filamentos	+	+++	+	-	-	-	-

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados.

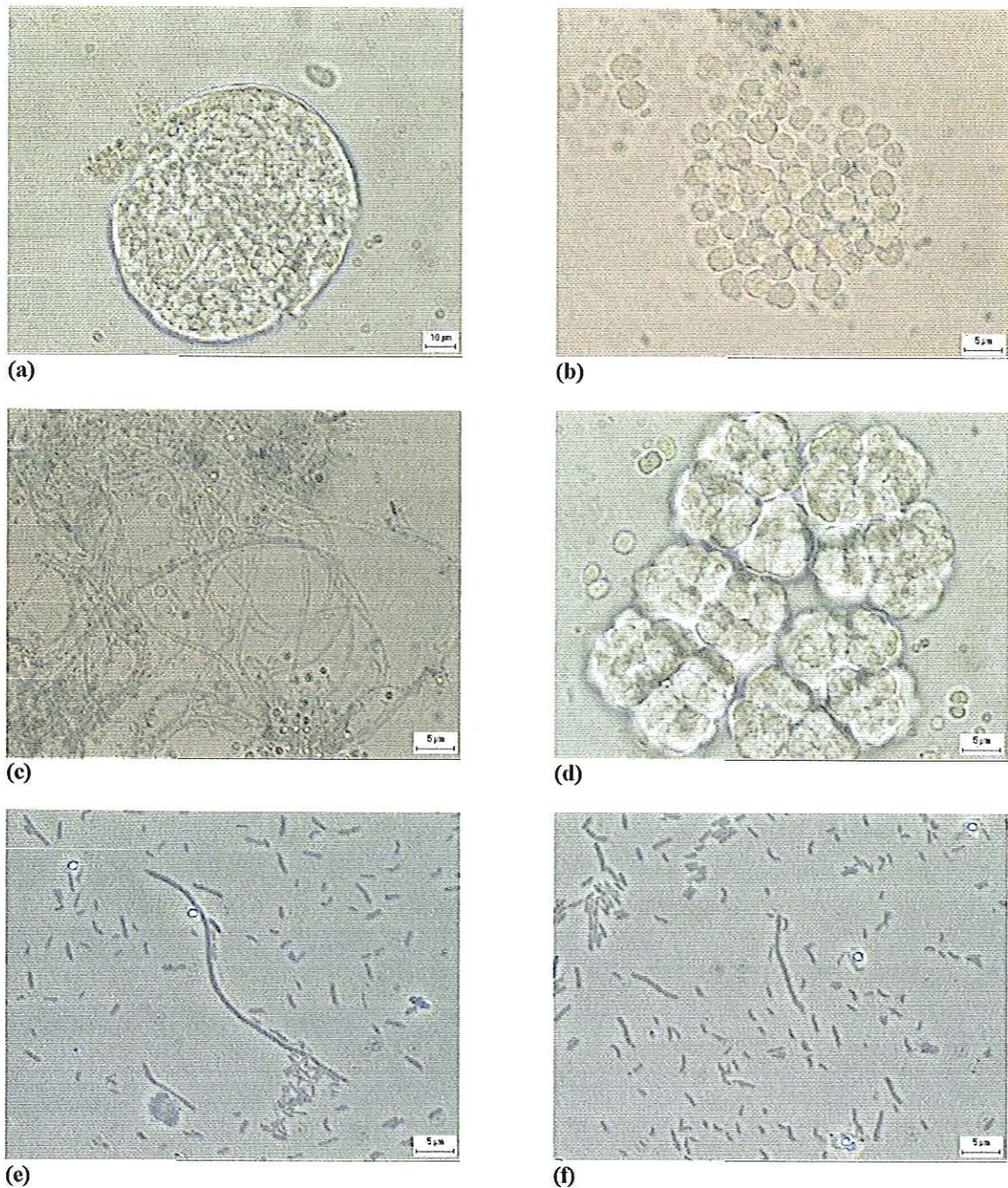


Figura 15. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e luz comum no ensaio de NMP_{inicial} contendo acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) cistos de sarcinas, (b) organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp. – diluição 10⁻², (c) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. – diluição 10⁻², (d) organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp. – diluição 10⁻³, (e) bacilos com extremidades arredondadas e afiladas – diluição 10⁻⁶ e (f) bacilos curvos – diluição 10⁻⁸.

Para o ensaio do NMP_{final}, nas mesmas condições, obteve-se valores das concentrações de organismos anaeróbios totais e metanogênicos iguais a $2,4 \times 10^{11}$ e $1,7 \times 10^4$ org/mL, respectivamente. Pelos exames microscópicos verificou-se o predomínio de bacilos com extremidades afiladas e bacilos com extremidades arredondadas. Observou-se também a presença de bacilos curvos, bacilos em cadeia, espirilos e outros esporos, além de organismos metanogênicos semelhantes a *Methanosarcina* sp., *Methanobacterium* sp. e cistos de sarcinas. Os cocos foram observados com pouca frequência. É importante salientar que, sob tais condições, os bacilos com extremidades afiladas, arredondadas e bacilos curvos foram visualizados até diluição da ordem de 10^{-10} , apresentando maior concentração em relação à condição inicial (Tabela 19). A ocorrência e as morfologias observadas nesse ensaio estão apresentadas na Tabela 20 e Figura 16, respectivamente.

Os resultados mostraram pequena variação nos valores, inicial e final, das concentrações dos organismos anaeróbios totais de $2,4 \times 10^{10}$ org/mL para $2,4 \times 10^{11}$ org/mL, respectivamente. No entanto para os organismos metanogênicos os valores das concentrações obtidas permaneceram constantes e da ordem de $1,7 \times 10^4$ org/mL. No entanto, foram observados padrões de crescimentos distintos nas duas condições estudadas, ou seja, no NMP_{inicial} verificou-se a presença de filamentos e organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp., enquanto no NMP_{final} a presença de bacilos em cadeia, espirilos e cocos. As demais morfologias estiveram presentes nas duas condições estudadas.

VARESCHE *et al.* (2000), realizaram contagens microbianas com lodo termofílico proveniente de reator UASB. O inóculo e as condições utilizadas para determinar os microrganismos anaeróbios totais e produtores de metano, foram os mesmos apresentados neste trabalho, ou seja, o autor utilizou meio Zinder suplementado com soluções estoque, acetato de sódio e sulfato de sódio em concentrações de 30mM e 10mM, respectivamente. As concentrações obtidas pelos autores foram iguais a $1,6 \times 10^5$ org/mL e $9,0 \times 10^4$ org/mL para os organismos anaeróbios totais e metanogênicos, respectivamente. Os autores realizaram a contagem após o enriquecimento com vários substratos orgânicos, semelhantes ao descrito na Tabela 7. No presente trabalho, a biomassa anaeróbia, proveniente do enriquecimento com vários substratos orgânicos, foi posteriormente utilizada como inóculo para crescimento na presença de acetato e sulfato. As células anaeróbias que se desenvolveram, nessa última condição, foram utilizadas como inóculo para a quantificação através do NMP_{inicial} e ensaios em reatores

em batelada, nas mesmas condições nutricionais. Esse caminho de enriquecimento selecionou principalmente o crescimento de bactérias anaeróbias, apresentando o dobro do valor encontrado por VARESCHE *et al.* (2000). No entanto, em relação às arqueas metanogênicas, a concentração foi ligeiramente inferior, porém com mesma ordem de magnitude. Os autores, mencionados anteriormente, também observaram o predomínio de arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina* sp. e a presença de bacilos ligeiramente curvos e não fluorescentes, provavelmente pertencentes ao grupo das BRS.

Tabela 20. Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP_{final} para acetato e sulfato.

MORFOLOGIAS	DILUIÇÕES						
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰
ARQUEAS METANOGENÊNICAS							
<i>Methanosarcina</i> sp	+++	+++	+++	+++	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp	-	-	-	-	-	-	-
Cistos de sarcinas	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Bacilos fluorescentes	+++	+++	++	++	-	-	-
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS							
Bacilos com extremidades afiladas	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
Bacilos com extremidades arredondadas	+++	++++	++++	++++	++++	++	++
Bacilos curvos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Bacilos em cadeia	-	++	+++	+++	+++	-	-
Cocos	-	++	++	++	++	+	+
Espirilos	-	+++	+++	+++	+++	++	-
Esporos	+	+	+++	+++	++	+	+
Filamentos	-	-	-	-	-	-	-

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados.

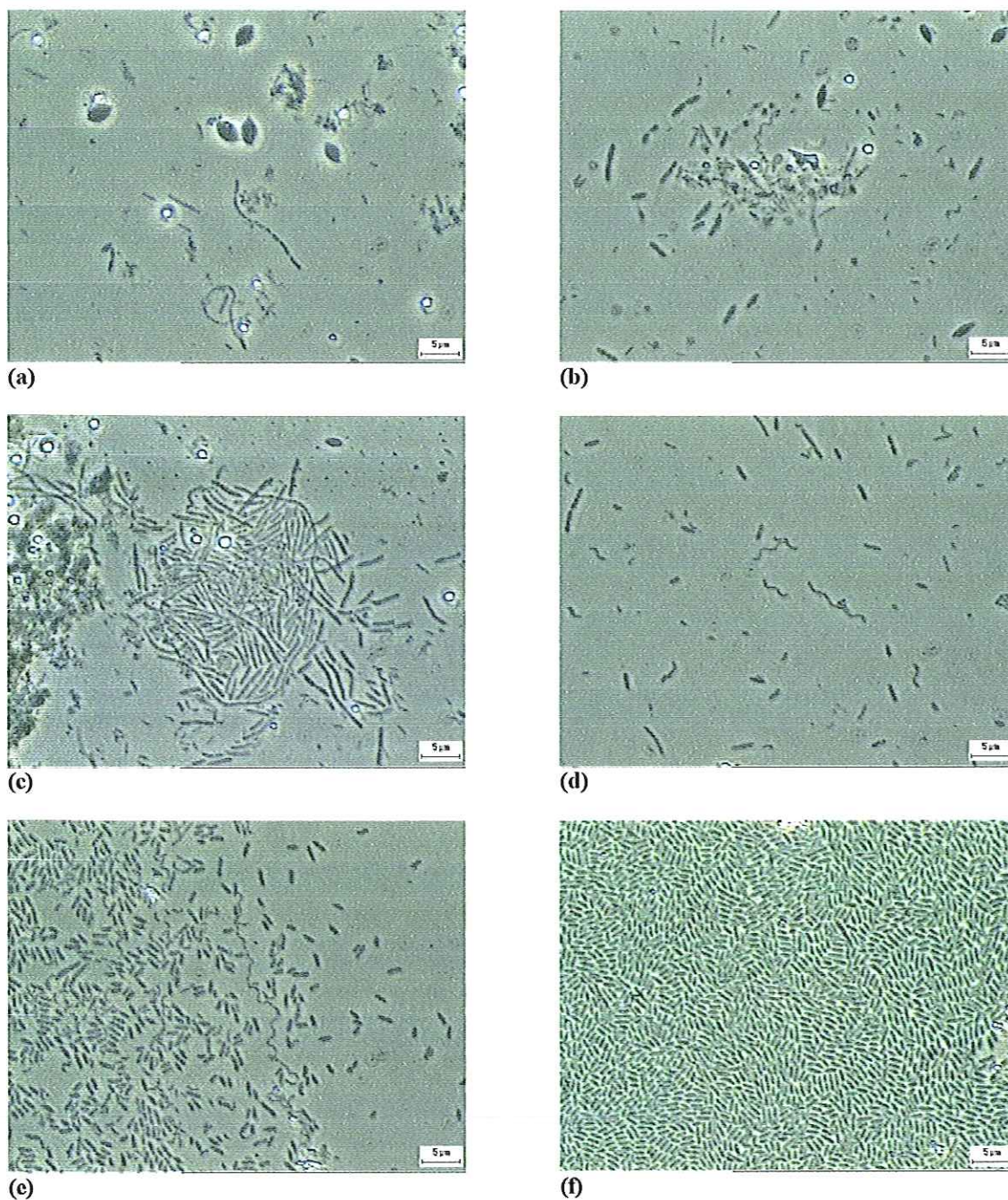


Figura 16. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase no ensaio de NMP_{final} contendo acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos com extremidades afiladas e bacilos em cadeia, (b) bacilos com extremidades afiladas aos pares – diluição 10^{-2} , (c) bacilos com extremidades afiladas – diluição 10^{-4} , (d) espirilos, (e) e (f) bacilos com extremidades afiladas – diluição 10^{-6} .

5.3.1.4. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

As amostras de células planctônicas e do biofilme foram hibridadas com sondas complementares ao RNAr dos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338), para o grupo geral das BRS (SRB385) da subdivisão delta de *Proteobacteria* e família *Methanobacteriaceae* (MB1174). Todas as sondas utilizadas foram marcadas com rodamina, como mencionado no capítulo 4.

Inicialmente, a técnica de hibridação *in situ* foi realizada para as amostras do reator em batelada com as sondas ARC915, EUB338 e SRB385. No entanto, as células hibridadas com a sonda ARC915 apresentaram sinal fluorescente muito fraco, dificultando a contagem das mesmas. Segundo POULSEN *et al.* (1993) e AMMAN *et al.* (1995), a intensidade do sinal fluorescente está relacionada com a atividade metabólica celular, ou seja, depende da quantidade de RNAr e consequentemente do conteúdo ribossomal da célula. Havendo poucas moléculas de RNAr, a quantidade de fluorocromos no interior da célula também será reduzida, dificultando sua visualização ao microscópio quando hibridadas pela técnica de FISH (ABE, 1988).

Embora com sinal fluorescente fraco, após a aplicação da sonda, microscopicamente as células metanogênicas apresentavam autofluorescência, devido ao fator F₄₂₀, ou seja, estavam metabolicamente ativas. Após alguns testes foi verificado que o fraco sinal emitido na hibridação não era devido ao baixo conteúdo de RNAr celular, mas provavelmente relacionado com a permeabilidade da parede celular. Para aumentar a permeabilidade da membrana celular à sonda, foram realizados 7 ciclos de congelamento-descongelamento (-80°C a 60°C) por 30 e 2 minutos, respectivamente, para as amostras já fixadas. Esse protocolo experimental foi realizado de acordo com o trabalho de SEKIGUCHI *et al.* (1999) para grânulos termofílicos. Depois dos ciclos de congelamento-descongelamento, o sinal fluorescente pareceu mais forte, tanto para as células hibridadas com a sonda ARC915 quanto para as hibridadas com EUB338 e SRB385, facilitando a contagem das células ao microscópio. Contudo, para os organismos metanogênicos, foi realizado teste para poder melhor detectar células semelhantes à *Methanobacterium* sp.. ARAÚJO (2001) relatou que algumas arqueas metanogênicas, com morfologias semelhantes a *Methanobacterium* sp., apresentaram sinal muito fraco quando hibridadas separadamente com ARC915 e MB1174. O autor sugeriu a realização de dupla hibridação para melhorar a intensidade do sinal fluorescente e eliminar possíveis problemas com disponibilidade da seqüência alvo.

Portanto, neste trabalho, optou-se em realizar o ciclo de congelamento-descongelamento para todas as amostras e dupla hibridação, com as sondas ARC915 e MB1174, para detectar os organismos metanogênicos.

No reator em batelada, através da hibridação *in situ*, verificou-se que a composição microbiana, relacionada ao Domínio *Bacteria*, apresentou valores de 41,0% (E.P.=5,1%), 37,7% (E.P.=7,8%), 38,7% (E.P.=3,9%), 40,7% (E.P.=3,8%) e 41,5% (E.P.=3,8%) nos tempos zero, 48, 192, 384 e 528 horas de operação, respectivamente. As células hibridadas com a sonda EUB338 foram relacionadas a morfologias semelhantes a bacilos com extremidades arredondadas, simples ou em pares, bacilos curvos e bacilos com extremidades afiladas. Os bacilos com extremidades arredondadas foram relacionados as bactérias oxidadoras de acetato e não pertencentes ao grupo das BRS, pois não hibridaram com a sonda SRB385. Durante o mesmo período, a composição microbiana detectada com a sonda SRB385, foi de 21,7% (E.P.=4,3%), 16,1% (E.P.=4,8%), 12,1% (E.P.=4,2%), 9,6% (E.P.=3,5%) e 13,3% (E.P.=3,6%) com predomínio de bacilos curvos semelhantes a *Desulfovibrio* sp. e bacilos com extremidades afiladas semelhantes a *Desulfotomaculum* sp. É importante salientar que os últimos microrganismos foram quantificados de acordo com sua morfologia particular e condições fisiológicas, ou seja, crescimento na presença de acetato e sulfato sob condições termofílicas. Segundo RAMSING *et al.* (1996), a sonda SRB385 não hibridiza com bactérias redutoras de sulfato não pertencentes ao grupo delta de *Proteobacteria*, tais como membros do gênero *Desulfotomaculum*, Gram-positivas, formadoras de esporos, contendo baixo conteúdo de GC (guanina e citosina). No entanto, bacilos curvos semelhantes a *Desulfovibrio* sp., foram hibridados com sonda SRB385 (específica para o grupo geral das BRS Gram-negativas pertencentes ao grupo delta de *Proteobacteria*).

Como mencionado anteriormente, os organismos metanogênicos foram semelhantes a sarcinas, bacilos curvos e retos. A porcentagem variou ao longo do ensaio, com valores iguais a 52,9% (E.P.=3,2%), 60,1% (E.P.= 3,6%), 57,7% (E.P.=4,2%), 67,6% (E.P.=4,6%) e 51,5% (E.P.=3,4%) nos tempos zero, 48, 192, 384 e 528 horas de operação, respectivamente. As porcentagens obtidas pelo FISH revelaram predomínio das arqueas metanogênicas sobre as bactérias anaeróbias. Deve-se destacar também que embora com eficiência de utilização de sulfato de 31,8%, as BRS apresentaram menor proporção no total de organismos hibridados com a sonda EUB338. Os demais organismos hibridados com essa sonda, representaram total de

19,3%, 21,6%, 26,6%, 31,1% e 28,2% para os tempos zero, 48, 192, 384 e 528 horas de operação, respectivamente. Provavelmente, essas porcentagens correspondem as bactérias oxidadoras de acetato e outros organismos anaeróbios. Os valores e as morfologias obtidas na hibridação *in situ* estão apresentados na Figura 17 e 18, respectivamente, e no Anexo 5.

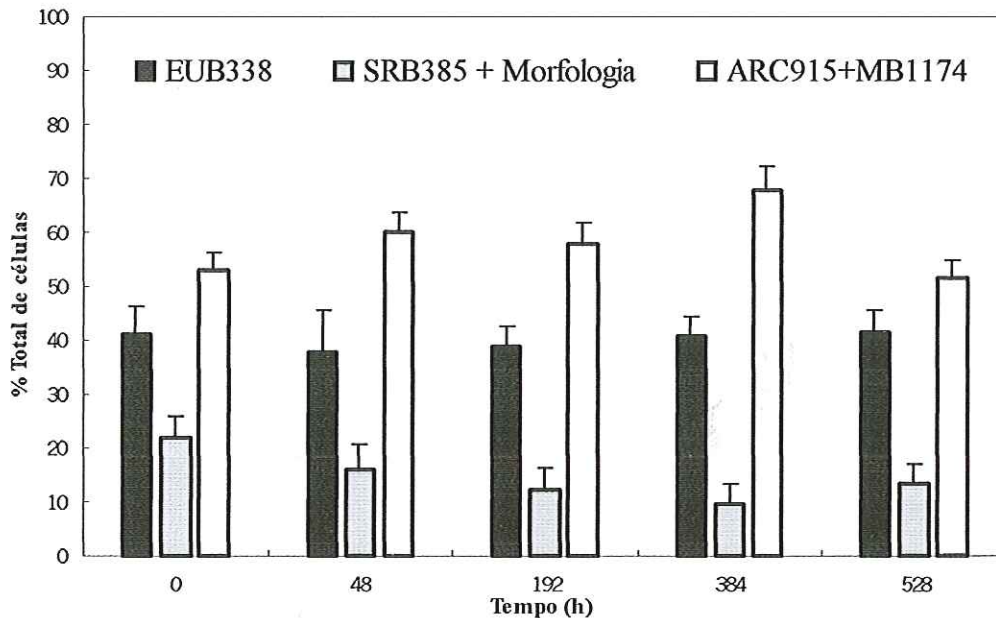


Figura 17. Composição da comunidade microbiana determinada pela técnica de FISH, em função do tempo, para células planctônicas. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915) e sonda específica para *Methanobacteriaceae* (MB1174). A porcentagem de células pertencentes ao grupo das BRS foi estimada baseando-se nas características morfológicas das células e nos valores obtidos com sonda (SRB385) específica para as BRS Gram-negativas. Os valores da abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro padrão.

Segundo RASKIN *et al.* (1994), a soma das porcentagens das células pertencentes aos Domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*, hibridadas com as sondas ARC915, EUB338 e EUK516, respectivamente, deve ser igual a 100%. Contudo, neste trabalho utilizamos apenas as sondas ARC915 e EUB338, ou seja, a somatória das porcentagens de células hibridadas com as duas sondas deveria ser igual a 100, uma vez que os organismos eucariotos não estavam presentes no inóculo. A somatória das células hibridadas com as duas sondas foi de 93% (To), 97,8% (48h), 96,4% (192h),

108,3% (382h) e 93% (528h). Portanto, houve sub e superestimativa da população total de organismos, provavelmente relacionadas com intensidade do sinal fluorescente, preparação das amostras, retirada do material celular do suporte, desprendimento dos arranjos celulares e diluições, ocasionando variação na porcentagem total das sondas. ARAÚJO (2001) estudando culturas puras de arqueas metanogênicas, em lodo granulado mesofílico, através da técnica de FISH também verificou variabilidade na somatória total. Segundo o autor, os valores encontrados podem ter sido subestimados devido ao arranjo celular, pois mesmo após vigorosa homogeneização da amostra, as células permaneceram agrupadas dificultando a contagem das mesmas e a busca de campos microscópicos que permitissem tal quantificação. No caso de valores superestimados, talvez tenham ocorrido ligações não-específicas com as sondas EUB338 ou ARC915+MB1174.

Pelas análises de FISH, observou-se que arqueas metanogênicas predominaram, nos reatores em batelada, em relação às bactérias oxidadoras de acetato e BRS, representando o Domínio *Bacteria*, confirmando o resultado obtido com 43,3% de produção de metano e 31,8% de remoção de sulfato. Entretanto, na quantificação celular pelo NMP, foi observado comportamento inverso. Ou seja, as maiores concentrações celulares foram obtidas para as bactérias anaeróbias ($2,4 \times 10^{10}$ org/mL e $2,4 \times 10^{11}$ org/mL) em relação as arqueas metanogênicas ($1,7 \times 10^4$ org/mL). Esse fato pode ser justificado principalmente pelas diferenças metodológicas realizadas em cada procedimento, ou seja, o NMP permite o crescimento celular seletivo e o FISH quantifica as células ativas em determinada condição específica.



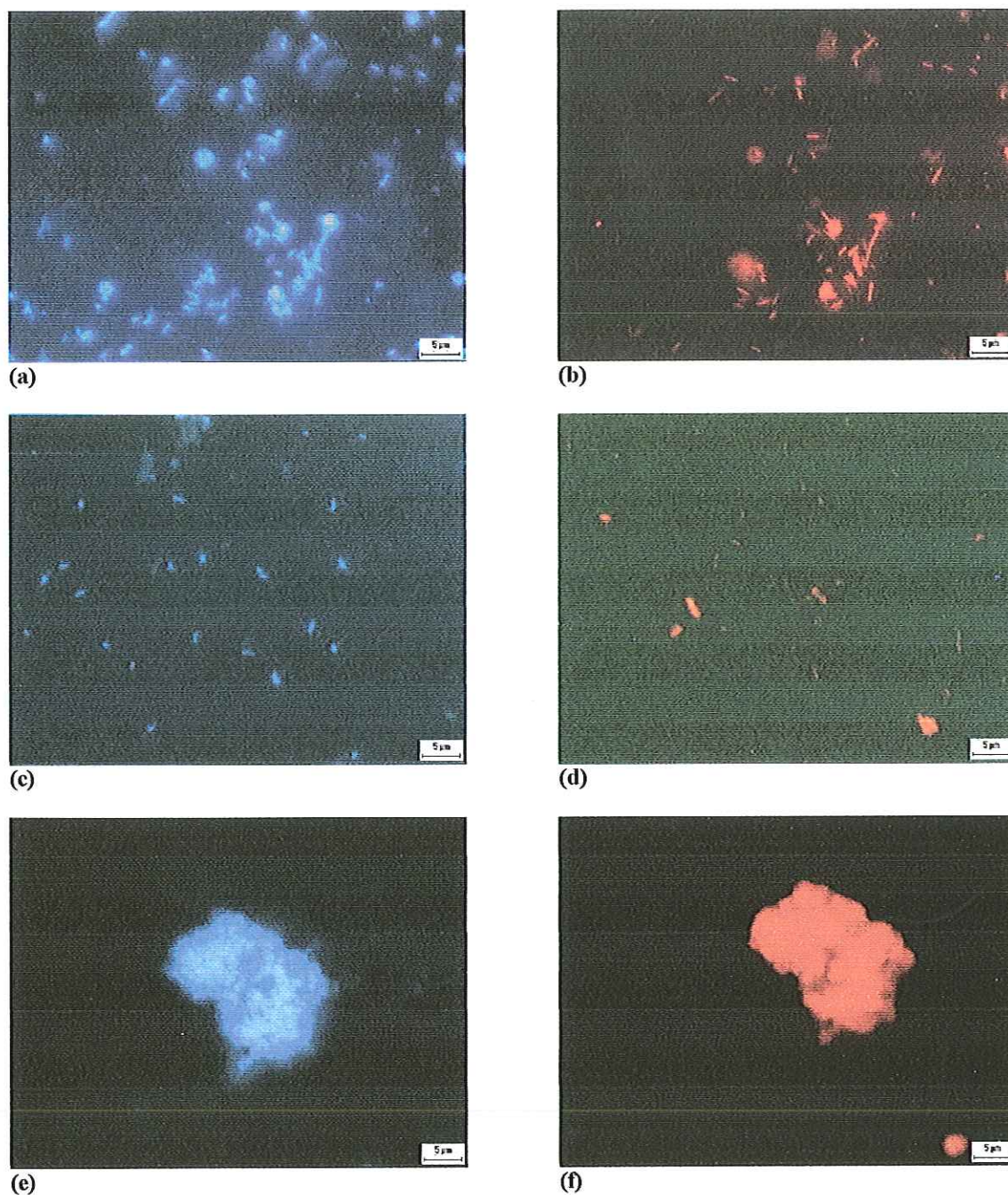


Figura 18. Hibridação de amostras do reator em batelada – acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda EUB338, (c) coloração com DAPI, (d) bacilos com extremidades arredondadas (EUB338), (e) coloração com DAPI, (f) *Methanosarcina* sp. hidridada com a sonda ARC915+MB1174.

Nas amostras do biofilme, as análises de FISH mostraram que as células bacterianas hibridadas com a sonda EUB338 semelhantes a bacilos com extremidades arredondadas predominaram. Amostras realizadas com 24 e 72 horas de operação mostraram que essas bactérias ocorriam sozinhas ou em pares. Após 120 e 168 horas, essas células formaram longas cadeias. Como mencionado anteriormente, essas células não hibridaram com a sonda específica para BRS (SRB385) e não foram consideradas membros desse grupo. Portanto, a porcentagem de células hibridadas com a sonda EUB338 foi de 57,1% (E.P.=4,2%), 56,1% (E.P.=3,3%), 60,9% (E.P.=3,0%), 65,8% (E.P.=3,5%) e 69,1% (E.P.=3,9%) nos tempos zero, 24, 72, 120 e 168 horas de operação, respectivamente. Durante o mesmo período, a composição microbiana detectada com a sonda SRB385, foi de 21,7% (E.P.=2,9%), 23,7 (E.P.=3,8%), 12,8% (E.P.=1,9%), 14,1% (E.P.=2,3%) e 12,2% (E.P.=2,5%), com predomínio de bacilos curvos semelhantes a *Desulfovibrio* sp. e bacilos com extremidades afiladas semelhantes a *Desulfotomaculum*. Foi usado o mesmo procedimento, anteriormente mencionado, para a quantificação de *Desulfotomaculum*. Deve-se salientar que o predomínio desta última morfologia foi mais efetivo até 70 horas, tornando-se raras no período de 118 a 166 horas de operação (Tabela 20). A porcentagem de arqueas metanogênicas foi de 45,5% (E.P.=3,8%), 37,4% (E.P.=3,5%), 37,9% (E.P.=2,4%), 32,2% (E.P.=2,2%) e 30,3% (E.P.=2,9%), para os tempos zero, 24, 72, 120 e 168 horas de operação. Os valores e as morfologias obtidas na hibridação *in situ*, estão apresentados na Figura 19 e 20, respectivamente, e no anexo 7.

No biofilme, a somatória total das porcentagens das células hibridadas com as sondas EUB338 e ARC915+MB1174 foi de 102,3% (To), 93,5% (24h), 98,8% (72h), 98% (120h) e 99,4% (168h). De acordo com RASKIN *et al.* (1994), os valores obtidos estão próximos de 100%, ou seja, nesse caso as sub e superestimativas foram menores que as ocorridas nos reatores em batelada.

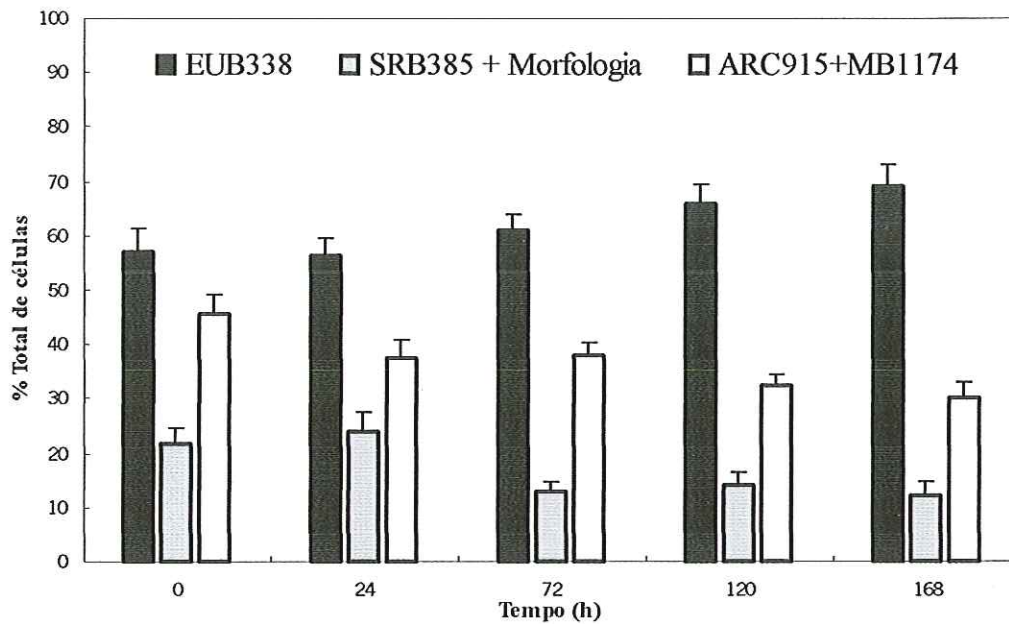


Figura 19. Composição da comunidade microbiana determinada pela técnica de FISH, em função do tempo, para células do biofilme. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915) e sonda específica para *Methanobacteriaceae* (MB1174). A porcentagem de células pertencentes ao grupo das BRS foi estimada baseando-se nas características morfológicas das células e nos valores obtidos com sonda (SRB385) específica para as BRS Gram-negativas. Os valores da abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro padrão.

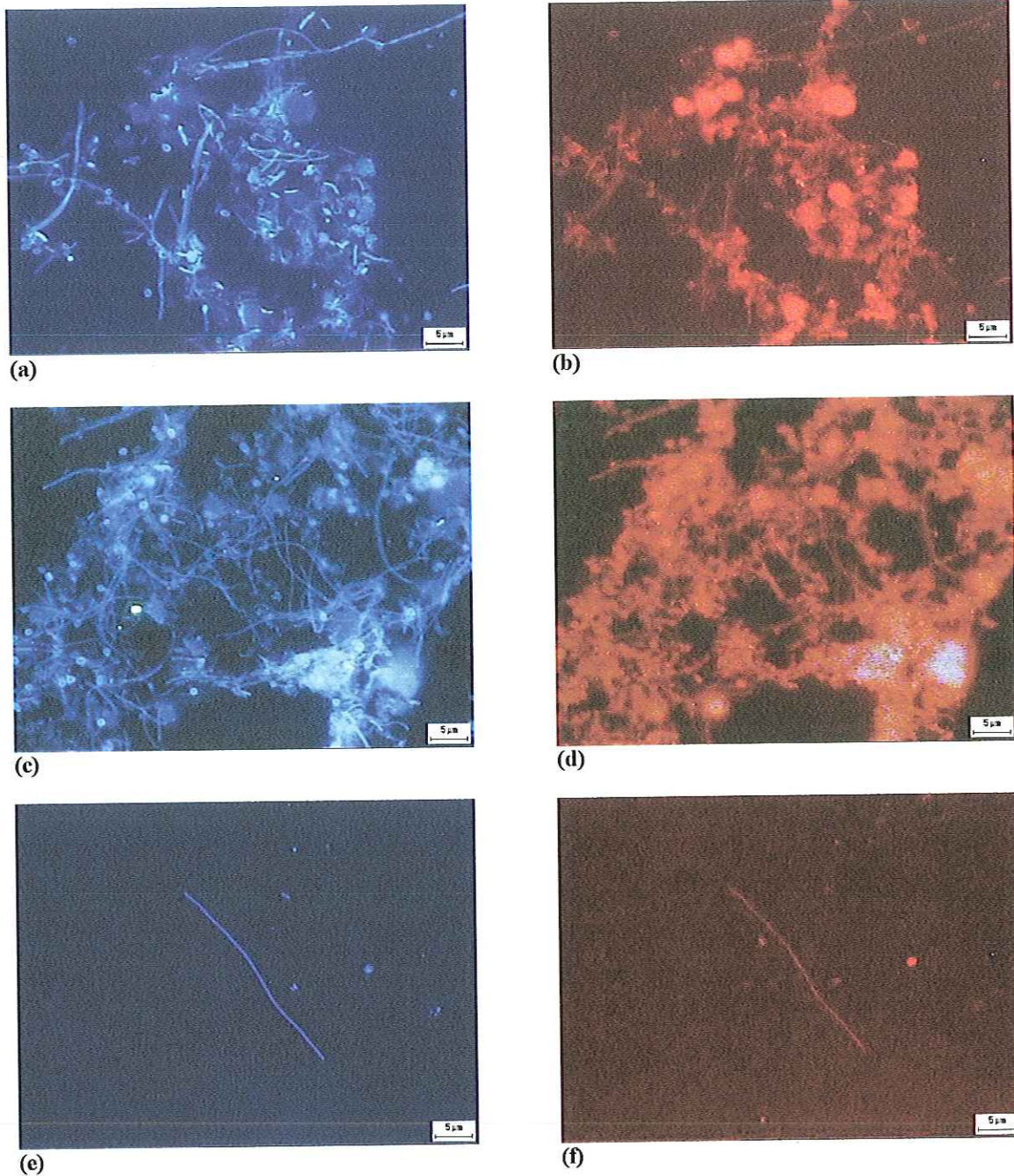
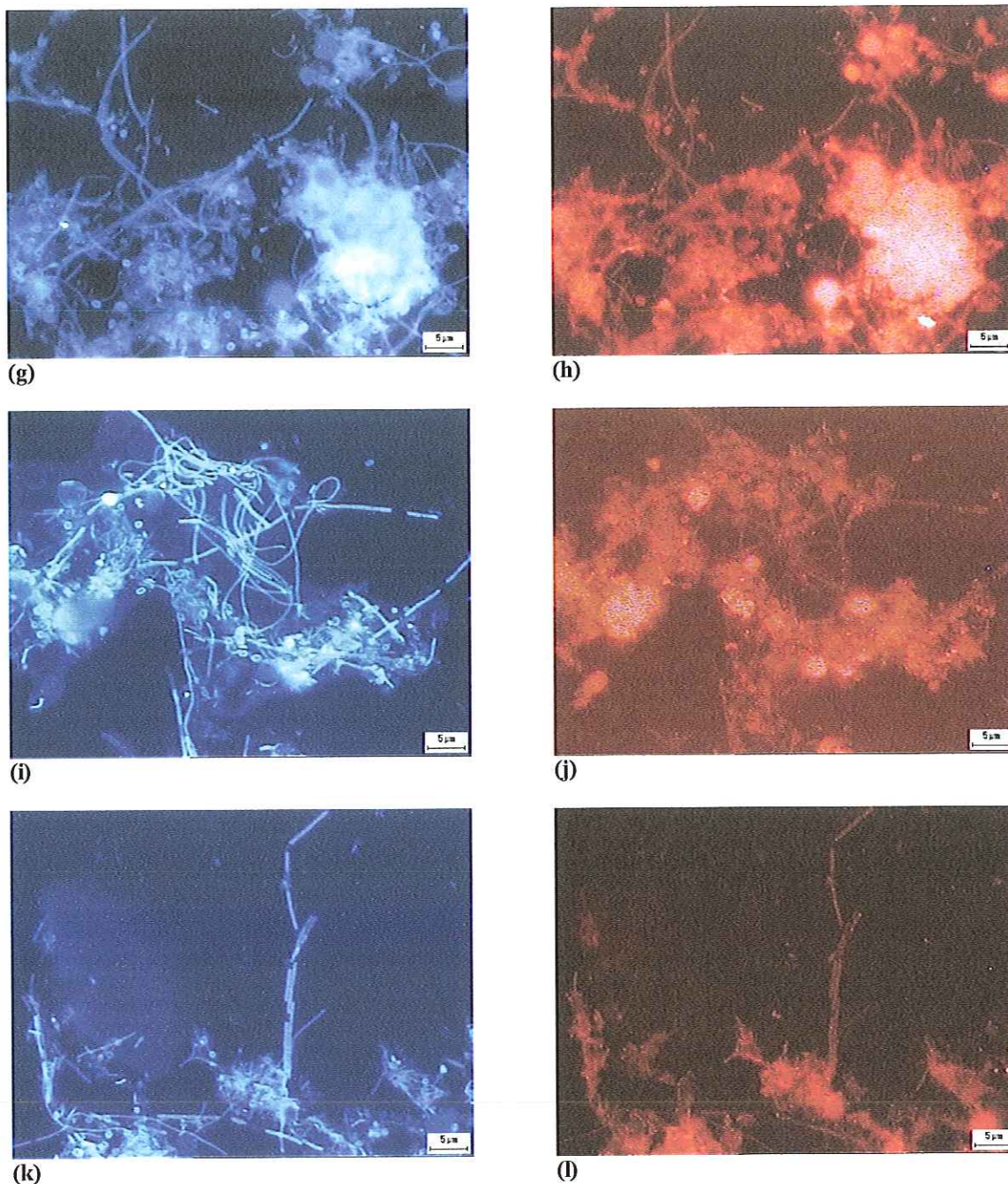


Figura 20. Hibridação de amostras do reator em batelada – acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos em cadeia hibridados com a sonda EUB338, (c) coloração com DAPI, (d) filamentos hibridados com a sonda EUB338, (e) coloração com DAPI, (f) filamento com extremidades arredondadas hibridado com sonda EUB338.



Continuação da Figura 20. Hibridação de amostras do reator em batelada – acetato de sódio e sulfato de sódio: (g) coloração com DAPI, (h) *Methanosaeta* sp. hibridada com sonda ARC915+MB1174, (i) coloração com DAPI, (j) *Methanosaeta* sp. hibridada com sonda ARC915+MB1174, (k) coloração com DAPI, (l) *Methanosaeta* sp. hibridada com sonda ARC915+MB1174.

Neste ensaio, os exames mostraram que arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e membros da Família *Methanobacteriaceae*, presentes no biofilme predominaram em relação às bactérias redutoras de sulfato (BRS). Os representantes predominantes desse último grupo foram *Desulfovibrio* sp. e *Desulfotomaculum* sp. e mostraram decréscimo no número de células no decorrer do tempo. Por outro lado, as bactérias oxidadoras predominaram com aumento no número de células detectadas pela sonda EUB338. Como mencionado anteriormente, esses bacilos também foram observados nos reatores em batelada com células planctônicas. Provavelmente, o bacilo oxidou acetato a dióxido de carbono e reduziu prótons a hidrogênio, os quais foram utilizados por organismos pertencentes a Família *Methanobacteriaceae*, levando à produção de metano. ZINDER & KOCH (1984) verificaram metabolismo semelhante em co-cultura termofílica sintrófica. A realização dos exames microscópicos e técnica de hibridação permitiu fazer inferências sobre o lodo termofílico imobilizado constituído por diferentes morfotipos e o significado ecológico da sua estrutura dentro das matrizes.

HATTORI *et al.* (2000) observaram bacilos com extremidades arredondadas, semelhantes aos descritos neste trabalho, caracterizando-os como nova bactéria oxidadora de acetato, denominada *Thermacetogenium phaeum*. Esses bacilos foram isolados de reator anaeróbio metanogênico termofílico (55°C), tratando água residuária de papel *kraft*. De acordo com os autores, esses bacilos oxidaram 40mM de acetato em co-cultura com bacilos metanogênicos hidrogenotróficos termofílicos. Em cultura pura, a linhagem cresceu acetogenicamente em vários alcoóis, ácidos orgânicos, compostos aromáticos metoxilados e alguns aminoácidos. Baseado nas particularidades fenotípicas e filogenéticas da linhagem isolada, os autores concluíram que esse microrganismo representa um novo e distinto táxon.

VAZOLLER (1995) propôs a existência de uma co-cultura formada por bacilos oxidadores de acetato e células metanogênicas obtidas de reator anaeróbio termofílico (55°C) tratando vinhaça. Segundo o autor, algumas bactérias redutoras do íon sulfato, em conjunto com metanogênicas hidrogenotróficas, utilizam substratos orgânicos como acetato e etanol. O ácido acético, sob condições termofílicas, não tem sido relatado como fonte orgânica para o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium*, mas como produto metabólico celular. No entanto, a degradação do acetato com produção de hidrogênio e dióxido de carbono é um aspecto do metabolismo de *Desulfotomaculum* sp. A morfologia dessas células, sob microscopia de contraste de fase, fluorescência e

microscopia de varredura confocal a laser (CLSM) revelou que *Desulfotomaculum* sp. e *Methanobacterium* sp. seriam os bacilos oxidadores de acetato e hidrogenotróficos, respectivamente.

A espécie *T. phaeum*, a linhagem termofílica oxidadora de acetato (ZINDER & KOCH, 1984; VAZOLLER, 1995) e mesofílica *Clostridium ultunense* (SCHNÜRER *et al.*, 1996) oxidam acetato na presença de organismos metanogênicos hidrogenotróficos. A espécie *C. ultunense* é filogeneticamente e quimiotaxonomicamente bem caracterizada. Porém as posições filogenéticas da linhagem oxidadora de acetato e *T. phaeum* não são conhecidas (HATTORI *et al.*, 2000).

HATTORI *et al.* (2000) isolaram dois bacilos morfologicamente distintos, um com endosporo terminal, não autofluorescente e filogeneticamente associado ao grupo Gram-positivo com baixo conteúdo de GC. O outro tipo morfológico, com autofluorescência, foi similar a *Methanobacterium* sp.. Na luz dessas observações, foi sugerido que a oxidação sintrófica do acetato, como descrito previamente por ZINDER & KOCH (1984) e VAZOLLER (1995) ocorreram no biofilme termofílico, tendo concomitante crescimento de BRS e arqueas metanogênicas. As BRS também podem estar envolvidas nesse processo.

Em reatores anaeróbios, o acetato não é a única fonte de energia disponível para os microrganismos. As BRS competem com as arqueas metanogênicas pelo hidrogênio quando o sulfato está presente em concentrações suficientes. As BRS crescem quimiolitotroficamente com H₂ como doador de elétrons e requerem acetato e CO₂ como fontes de carbono (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). Neste trabalho, as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas morfologicamente semelhantes a *Methanobacterium* sp, *Methanobrevibacter* sp. e células bacterianas semelhantes a *Desulfovibrio* sp. foram observadas. No entanto, entre o grupo das BRS, a morfologia predominante foi similar a *Desulfotomaculum* sp. Este último é capaz de oxidar completamente o acetato sob condições de redução de sulfato (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). Nesse estudo, a porcentagem total de BRS foi baixa e confirmada pela eficiência de remoção de sulfato de aproximadamente 6,7%.

No biofilme, o metabolismo de oxidação do acetato predominou com concomitante remoção de hidrogênio pelos bacilos metanogênicos hidrogenotróficos. A metanogênese e a sulfetogênese também ocorreu, porém em menores proporções.

Nos reatores com crescimento aderido, limitações de transferência de massa, adesão e colonização microbiana são fenômenos importantes que afetam o crescimento

dos organismos anaeróbios. As arqueas metanogênicas parecem ser capazes de crescer mais eficientemente do que as BRS em sistemas de crescimento aderido quando comparado com crescimento planctônico, na qual as considerações cinéticas e termodinâmicas são os mecanismos dominantes e reguladores do crescimento (RASKIN *et al*, 1996). Em nosso estudo, tanto no reator em batelada com células planctônicas quanto no reator com biofilme, foi verificado o predomínio das arqueas metanogênicas sobre as BRS. Exclusivamente no biofilme, destacou-se o crescimento preferencial dos organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* em relação ao Domínio *Archaea* e comportamento inverso para o crescimento com células planctônicas. Provavelmente além das limitações hidrodinâmicas do reator e condição nutricional de alimentação, as características do inóculo também foram importantes na avaliação da microbiota responsável pela degradação dos compostos durante a operação do sistema.

5.3.1.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).

A formação e evolução do biofilme anaeróbio termofílico, em espumas de poliuretano, foram acompanhadas ao longo do tempo, nos quatro reatores alimentados com acetato e sulfato. Amostragens foram realizadas com 24, 46, 70, 94, 118, 142 e 166 horas de operação.

A caracterização morfológica, juntamente com os resultados obtidos em microscopia eletrônica de varredura, permitiu caracterizar o processo de colonização inicial das matrizes de poliuretano em reatores diferenciais alimentados com acetato e sulfato.

Nessas condições, foram verificados três diferentes tipos de colonização microbiana. Inicialmente, as espumas foram colonizadas por bacilos com extremidades arredondadas e bacilos com extremidades afiladas. Com 118 horas de operação, verificou-se que células isoladas, agregados, microgrânulos e polímeros extracelulares estavam aderidos, nas matrizes de poliuretano. Com 142 e 166 horas de operação, observou-se morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos. No final da colonização, 190 horas de operação, além das morfologias anteriormente citadas muitos esporos estavam presentes no biofilme. As morfologias descritas estão apresentadas na Figura 21.

VARESCHE *et al.* (1997) e RIBEIRO (2001) estudando a colonização microbiana em reatores anaeróbios de leito fixo alimentados com glicose, sob condições

mesofílicas (30°C), verificaram comportamento semelhante na colonização microbiana com o mesmo tipo de suporte.

Portanto, os exames de MEV além de permitir a visualização dos arranjos celulares, confirmaram os mesmos tipos morfológicos observados na microscopia óptica.

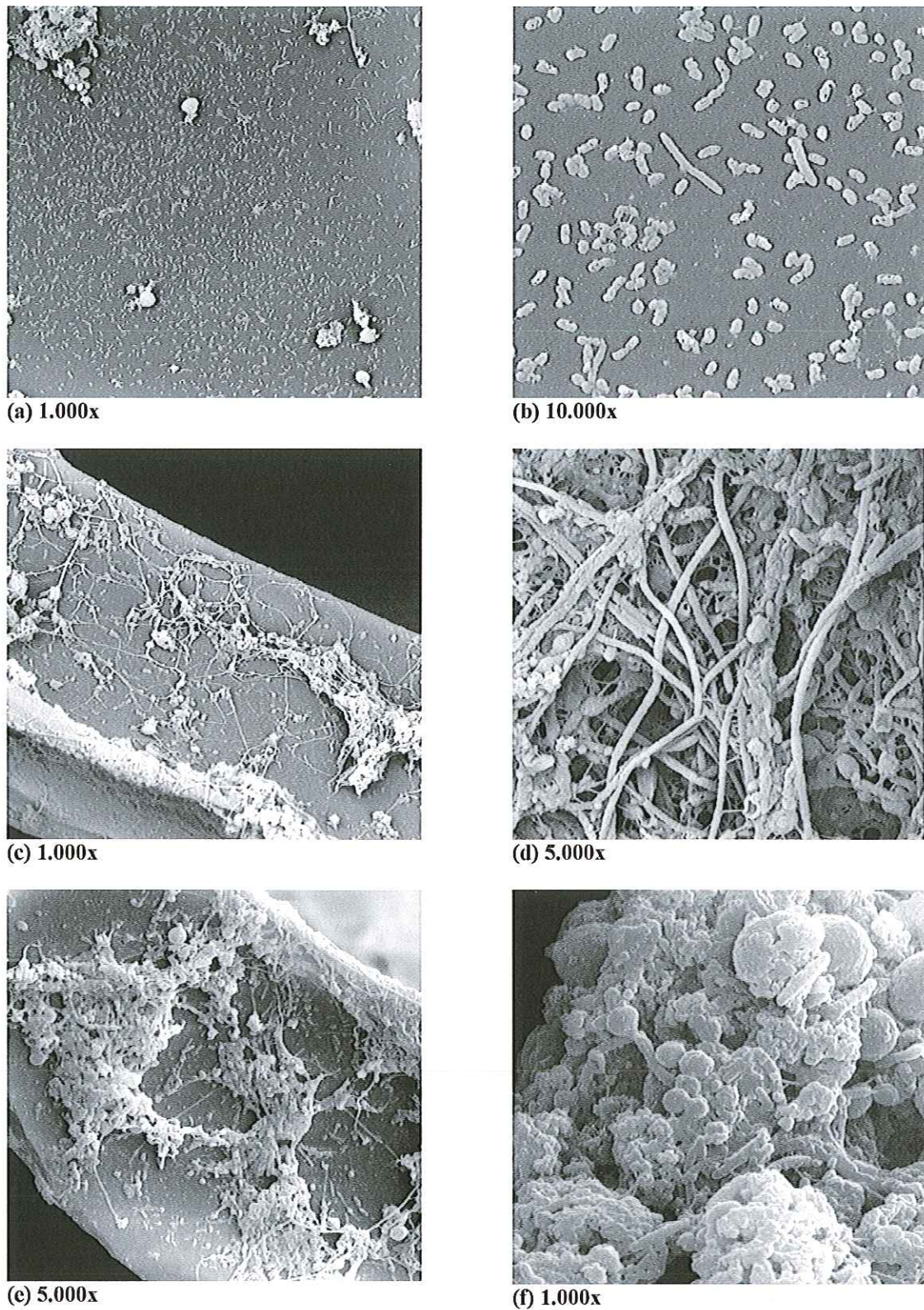
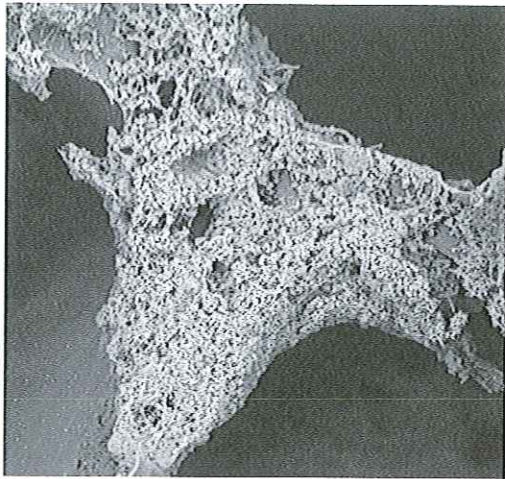
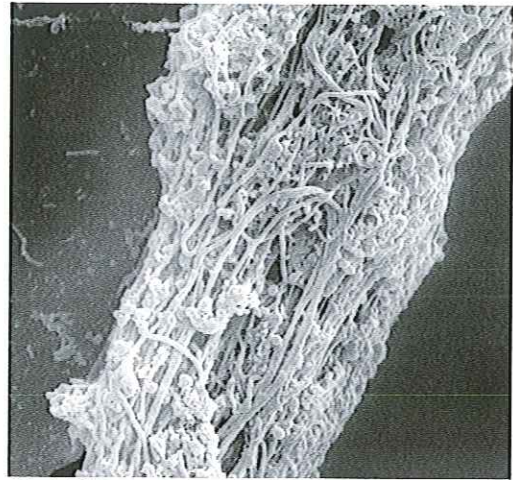


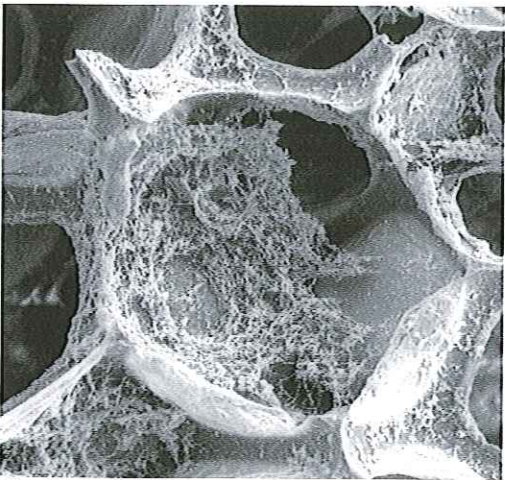
Figura 21. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo acetato de sódio e sulfato de sódio – (a) e (b) colonização inicial por bacilos, (c) células e polímeros extracelulares, (d) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos, (e) e (f) microgrânulos e agregados celulares.



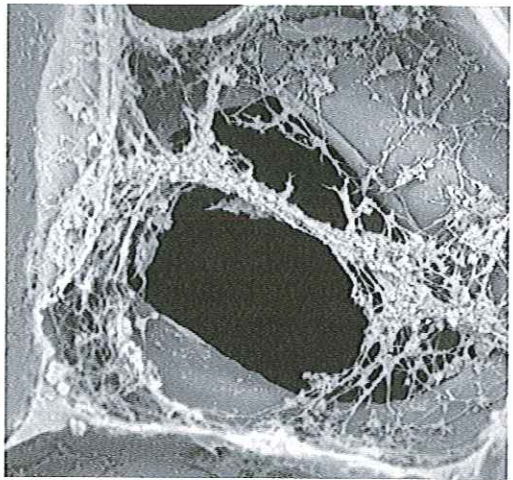
(g) 200x



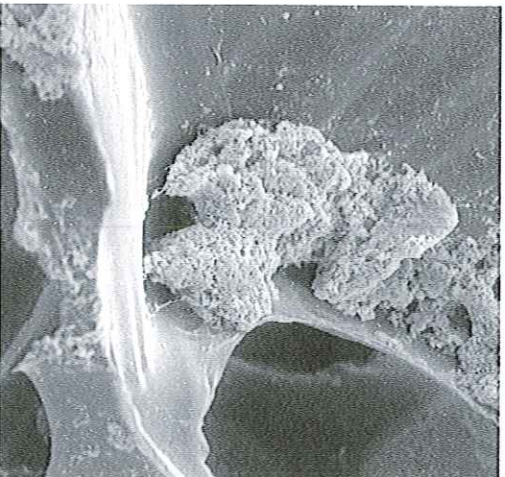
(h) 2.000x



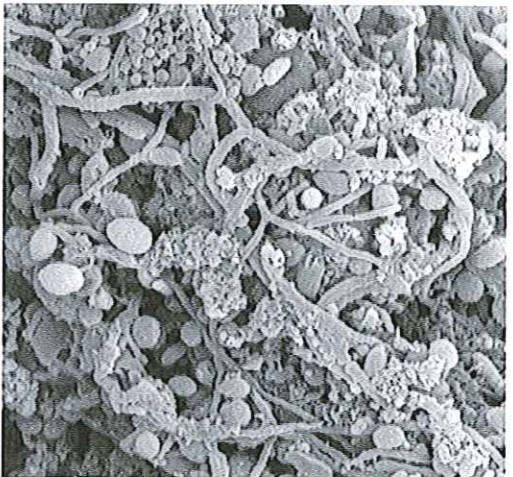
(i) 100x



(j) 500x



(k) 200x



(l) 5.000x

Continuação da Figura 21. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo acetato de sódio e sulfato de sódio – (g) agregados celulares, (h) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos, (i) agregados celulares, (j) organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e filamentos, (k) microgrânulos e agregados celulares, (l) agregados celulares.

5.3.2. REATORES ANAERÓBIOS ALIMENTADOS COM LACTATO E SULFATO

5.3.2.1. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO

Foram realizados ensaios com lactato de sódio e sulfato de sódio, em reatores em batelada e diferenciais, para verificar o consumo do substrato orgânico e fonte de enxofre. Ambos os sistemas foram alimentados com meio basal Zinder (ZINDER, 1984) suplementado com soluções estoques, descritas na Tabela 7, e operados sob condições anaeróbias, a 55°C. Os sistemas foram inoculados com 10% de biomassa termofílica proveniente do cultivo em condição específica, com produção máxima de metano de 5,9%, em 144 horas de operação.

Os reatores anaeróbios em batelada apresentaram 95,9% de eficiência de remoção de ácido láctico, em 55 horas de operação, para concentração inicial de 1511,9mg/L, com produção de ácido acético, constatada por cromatografia. A redução de sulfato foi de aproximadamente 52,2%, para concentração inicial de 1125,0mg/L, com produção de sulfeto total dissolvido de aproximadamente 66,1mg/L. Estequiometricamente a redução de 1125mg de sulfato produz 398,4mg/L de sulfeto. Logo, a redução de 52,2% de sulfato produziria 207,9mg/L de sulfeto total. Como mencionado anteriormente no item 5.3.1, a análise de sulfeto contemplou apenas a parte dissolvida no meio. Os valores de $SSV_{inicial}$ e SSV_{final} foram 1240,0mg/L e 140,0mg/L, respectivamente. A produção máxima de metano foi de aproximadamente 4,4% em 75 horas de operação. As variações das concentrações do substrato, em função do tempo, estão apresentadas na Figura 22.

Para concentrações iniciais de ácido láctico e sulfato iguais a 1511,9mg/L e 1125,0mg/L, respectivamente, a relação ácido láctico/sulfato foi de 1,3. Os resultados mostraram que para a faixa de pH estudada (7,0 e 8,0) e produção de sulfeto total dissolvido (66,1mg/L), as condições nutricionais favoreceram o metabolismo das bactérias redutoras do íon sulfato, ou seja, a sulfetogênese. WIDDEL (1998) afirma que as BRS degradam facilmente esse substrato orgânico, via redução de sulfato ou fermentação, pois o lactato é o doador de elétrons preferencial para a maioria dessas espécies. QATIBI *et al.* *apud* VAZOLLER (1995) mencionaram que na presença de sulfato, as BRS oxidaram preferencialmente o lactato, via redução de sulfato, com formação de acetato como produto final.

Os reatores anaeróbios diferenciais apresentaram 96,8% de eficiência de remoção do ácido láctico, em 43 horas de operação, para concentração inicial de 1627,7mg/L, com produção máxima de 684,2mg/L de ácido acético em 28,5 horas de operação. A redução de sulfato foi de aproximadamente 28,8% para concentração inicial de 1125,0mg/L. Os valores da variação da concentração do substrato, em função do tempo, estão apresentados na Figura 23.

A eficiência de remoção de DQO foi de aproximadamente 91,3% para concentração inicial de 1799,0mg/L. Ambas as relações DQO/sulfato ácido láctico/sulfato apresentaram valores iguais a 1,4. Neste mesmo trabalho, para a condição acetato de sódio mais sulfato de sódio, obteve-se valores iguais a 1,8 e 2,0 para as relações DQO/sulfato e ácido acético/sulfato, respectivamente. Os resultados obtidos sugeriram que o substrato orgânico lactato, na presença de sulfato, foi seletivo para a sulfetogênese.

Os resultados mostraram que a redução de sulfato foi mais favorável no reator em batelada. Provavelmente, o tipo de metabolismo celular foi determinado pelas condições de crescimento com ou sem suporte. Portanto, nos ensaios com lactato e sulfato a condição de crescimento celular, planctônica ou em biofilme, influenciou no desenvolvimento dos tipos morfológicos predominantes para as condições impostas, diferentemente do ocorrido no ensaio com acetato e sulfato. As análises de microscopia óptica e hibridação *in situ* (FISH) confirmaram esse comportamento.

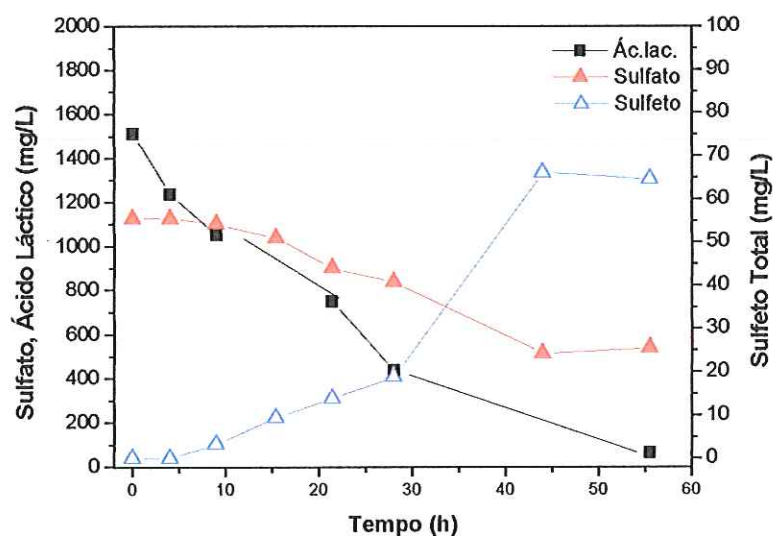


Figura 22. Reator em batelada: variação temporal das concentrações de sulfato, ácido láctico e sulfeto total dissolvido.

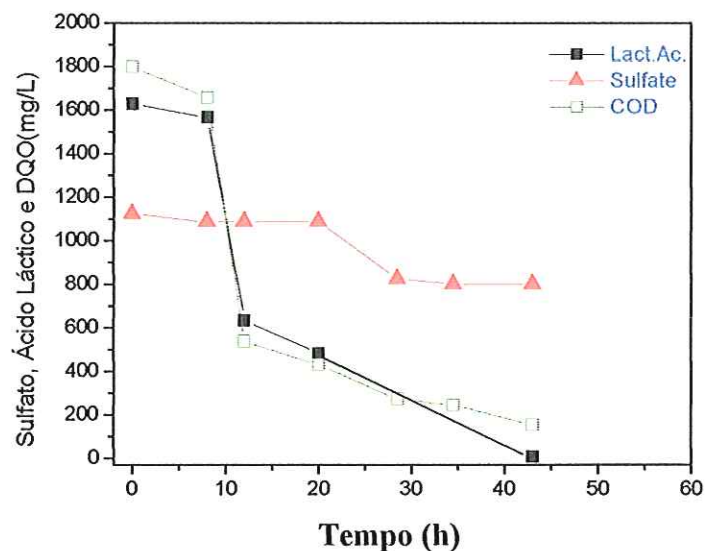


Figura 23. Reator diferencial: variação temporal das concentrações de sulfato, ácido láctico e DQO.

5.3.2.2. MAPEAMENTO MORFOLÓGICO

A seguir estão descritas as características das células planctônicas e do biofilme através de microscopia óptica de luz comum, contraste de fase, fluorescência, FISH e microscopia de varredura.

No reator em batelada, as células planctônicas foram examinadas após 55 horas de operação. Os exames microscópicos mostraram predomínio de bacilos com extremidades afiladas, semelhantes a *Desulfotomaculum* sp., presença de bacilos retos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp., bacilos com as extremidades arredondadas, esporos e raros bacilos curvos (Figura 24). Provavelmente, os bacilos semelhantes a *Desulfotomaculum* sp. oxidaram incompletamente o lactato a acetato, em sintrofismo com bacilos metanogênicos hidrogenotróficos e bactérias acetoclásticas. Comportamento distinto foi verificado por VAZOLLER (1995) em ensaios com lactato (20mM) e sulfato (10mM), com lodo termofílico de mesma origem. O autor relatou que o metabolismo incompleto da fonte orgânica, devido a formação de ácido acético, sugeriu a seleção de bactérias termófilas redutoras do íon sulfato semelhantes à *Desulfotomaculum* sp. e *Desulfobulbus* sp. Porém nessas condições, verificou-se o crescimento de culturas metanogênicas destacando a presença notável de sarcinas. As arqueas metanogênicas termófilas em formato de sarcinas são acetoclásticas e seu crescimento foi favorecido pelo o ácido acético formado.

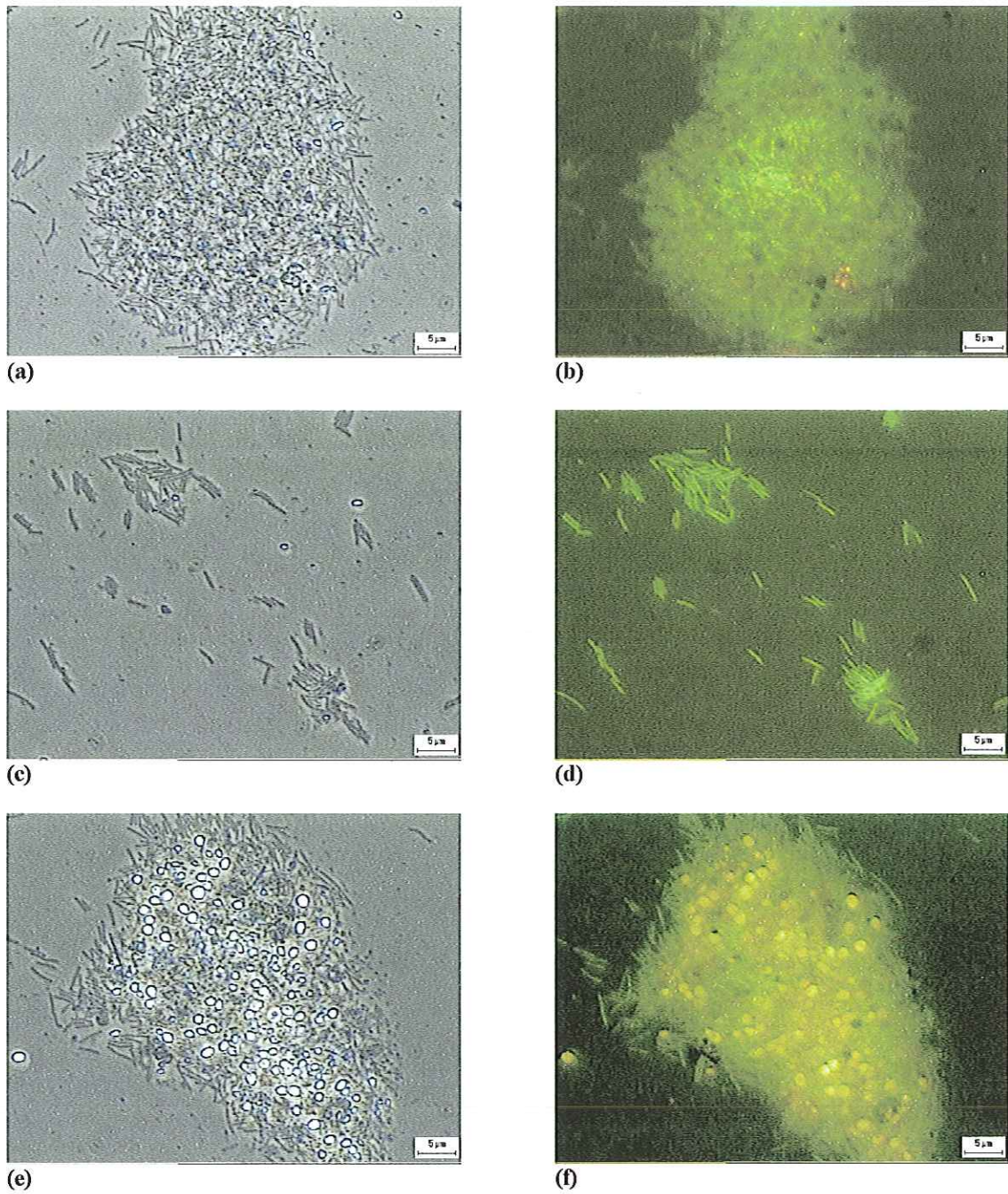


Figura 24. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no reator em batelada alimentado com lactato de sódio e sulfato de sódio: (a), (b), (c), (d), (e) e (f) bacilos retos metanogênicos.

No reator diferencial foi acompanhado o desenvolvimento dos tipos morfológicos, em função do tempo, durante 43 horas de operação. Na Tabela 21 estão apresentadas as ocorrências e morfologias dos microrganismos presentes no biofilme durante 8, 12, 20, 28,5, 34,5 e 43 horas. As morfologias observadas no biofilme foram semelhantes às descritas para o reator em batelada, porém com diferente ocorrência. No biofilme observou-se o predomínio de bacilos com extremidades afiladas semelhantes a *Desulfotomaculum*, bacilos retos com extremidades arredondadas, cistos de sarcinas, outros esporos, raros bacilos curvos e bacilos retos fluorescentes (Figura 25). É importante salientar que os bacilos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. foram observados com maior frequência no frasco de alimentação do sistema. Portanto, no biofilme os resultados indicaram predomínio de células semelhantes a *Desulfotomaculum* sp.

Os resultados obtidos nos exames microscópicos foram confirmados pelo FISH.

Tabela 21. Morfologias dos microrganismos presentes nos reatores diferenciais alimentados com lactato de sódio e sulfato de sódio em função do tempo.

MORFOLOGIAS	TEMPO (H)					
	8	12	20	28,5	34,5	43
ARQUEAS METANOGÊNICAS						
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	+	+	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Cistos de sarcinas	++	++	+++	+++	-	-
Bacilos fluorescentes	++++	++	++	++	-	-
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS						
Bacilos com extremidades afiladas	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Bacilos com extremidades arredondadas	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Bacilos curvos	+	++	++	++	+	+
Bacilos em cadeia	-	+++	-	-	-	-
Cocos	-	+	-	-	-	-
Espirilos	-	-	-	-	-	-
Esporos	+	++	++	+++	++	++
Filamentos	-	-	-	-	-	-

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados.

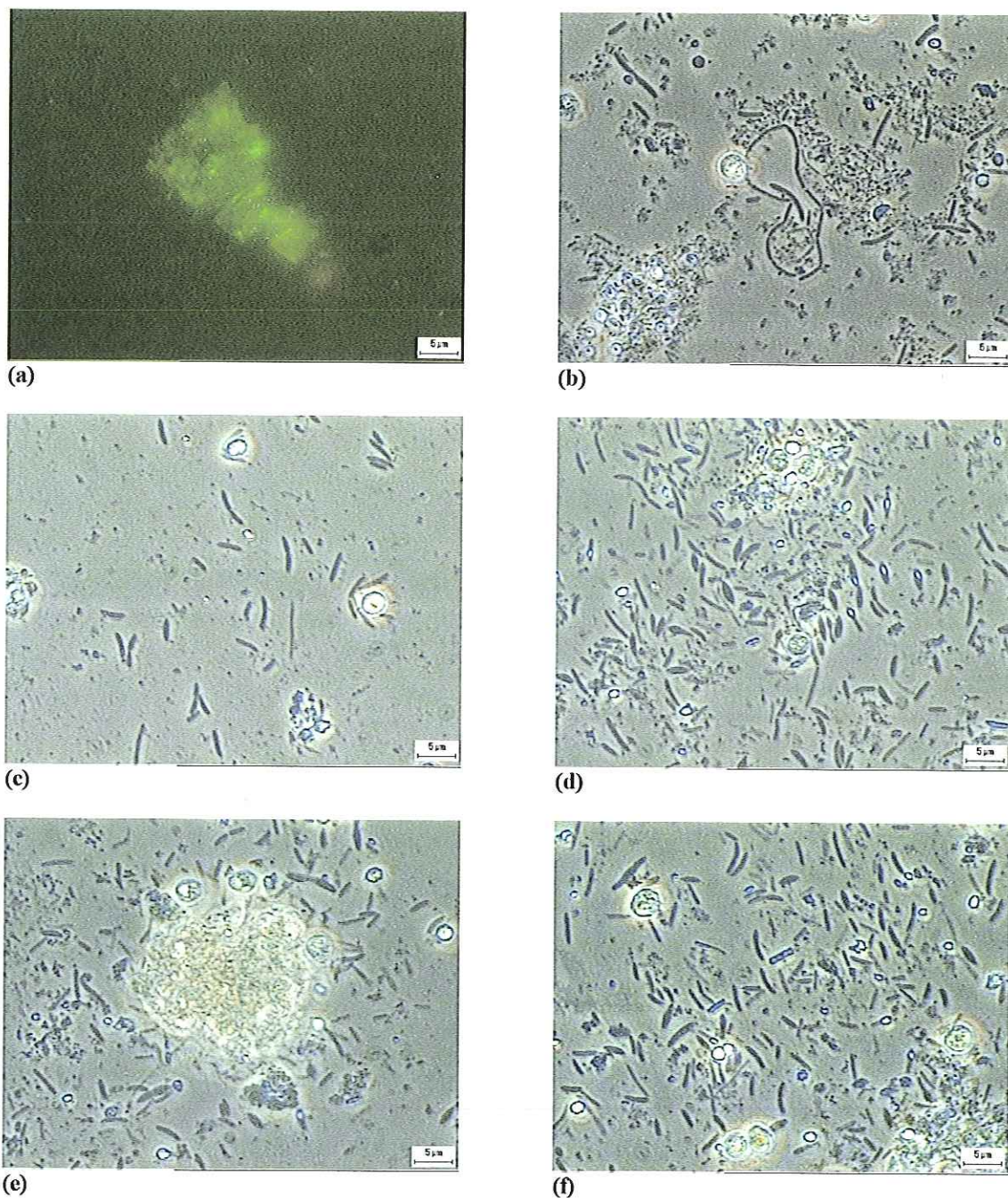


Figura 25. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no reator diferencial alimentado com lactato de sódio e sulfato de sódio: **(a)** bacilos retos fluorescentes, **(b)** bacilos em cadeia, **(c)** bacilos com extremidades afiladas aos pares, **(d)** bacilos com esporo terminal, **(e)** organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp.; **(f)** bacilos com extremidades afiladas.

5.3.2.3. CONCENTRAÇÃO CELULAR

No início e final de operação, dos reatores em batelada, foram realizadas contagens microbianas, utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). A Tabela 22 apresenta as concentrações celulares obtidas nos ensaios do NMP_{inicial}.

Tabela 22. Números estimados de microorganismos anaeróbios totais e produtores de metano obtidos através da técnica do NMP com lactato de sódio e sulfato de sódio.

CONCENTRAÇÃO (ORGANISMOS/ML)		
ORGANISMOS	INICIAL	FINAL
Anaeróbios Totais	$3,0 \times 10^{11}$	$9,0 \times 10^{12}$
Arqueas Metanogênicas	$4,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$

Para verificar as morfologias presentes nos ensaios de NMP, inicial e final, foram realizados exames de microscopia óptica de luz comum, contraste de fase e fluorescência.

No ensaio de NMP_{inicial}, observou-se o predomínio de bacilos fluorescentes hidrogenotróficos semelhantes a *Methanobacterium* sp., bacilos com extremidades arredondadas e bacilos curvos não fluorescentes. Foi verificada também a presença de bacilos com esporos terminais e bacilos com extremidades afiladas. Segundo WIDDEL (1988) essas últimas morfologias podem pertencer ao gênero *Desulfotomaculum*, pois são organismos que crescem utilizando lactato e sulfato como fontes energéticas. A ocorrência e morfologias presentes no ensaio de NMP_{inicial} estão apresentadas na Tabela 23 e Figura 26, respectivamente.

Neste ensaio, provavelmente os bacilos curvos foram favorecidos pela presença de sulfato. HANSEN *et al.* (1999) observaram bacilos curvos, semelhantes aos descritos nesse trabalho, caracterizando-os como bactéria redutora de sulfato, denominada *Thermodesulfovibrio* sp. linhagem R1Ha3, a qual foi isolada de reator anaeróbio termofílico (55°C). Esses organismos cresceram em meio mineral com lactato de sódio (25mM) e sulfato de sódio (20mM). Os autores comentaram que no reator termofílico, a partir do qual a linhagem R1Ha3 foi isolada, houve produção de metano e observada a

presença de bacilos hidrogenotróficos. Os autores sugeriram que as BRS competiram com as arqueas metanogênicas pelos substratos disponíveis, incluindo o hidrogênio, amostras provenientes de termas com temperatura de 55°C, especialmente quando o sulfato tornou-se limitante devido à intensa degradação da matéria orgânica.

Neste trabalho, nas amostras de NMP, provavelmente os bacilos semelhantes a *Methanobacterium* sp. foram favorecidos pela formação de hidrogênio durante a oxidação do lactato. Estes organismos metanogênicos são capazes de se desenvolver rapidamente em meio mineral e são os únicos a utilizar o monóxido de carbono como única fonte de carbono para seu crescimento, extraindo os elétrons desse gás pela ação da enzima monóxido de carbono desidrogenase, na presença de hidrogênio (VAZOLLER, 1995). TOUZEL *et al.* (1988) isolaram e caracterizaram um organismo metanogênico termofílico capaz de utilizar hidrogênio e dióxido de carbono ou formiato, denominado *Methanobacterium* FTF, a partir de digestor anaeróbio termofílico (55°C) em escala de bancada.

Tabela 23. Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP_{inicial} para lactato e sulfato.

MORFOLOGIAS	DILUIÇÕES									
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
ARQUEAS METANOGÊNICAS										
<i>Methanosarcina</i> sp	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cistos de sarcinas	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
Bacilos fluorescentes	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS										
Bacilos com extremidades afiladas	+	+	+	+++	+++	+++	++	+	-	-
Bacilos com extremidades arredondadas	+	++	+++	+++	++++	++++	++	+	-	-
Bacilos curvos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	+	+
Bacilos em cadeia	-	++	++	++	++	+	-	-	-	-
Cocos	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Espirilos	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Esporos	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-
Filamentos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não observados

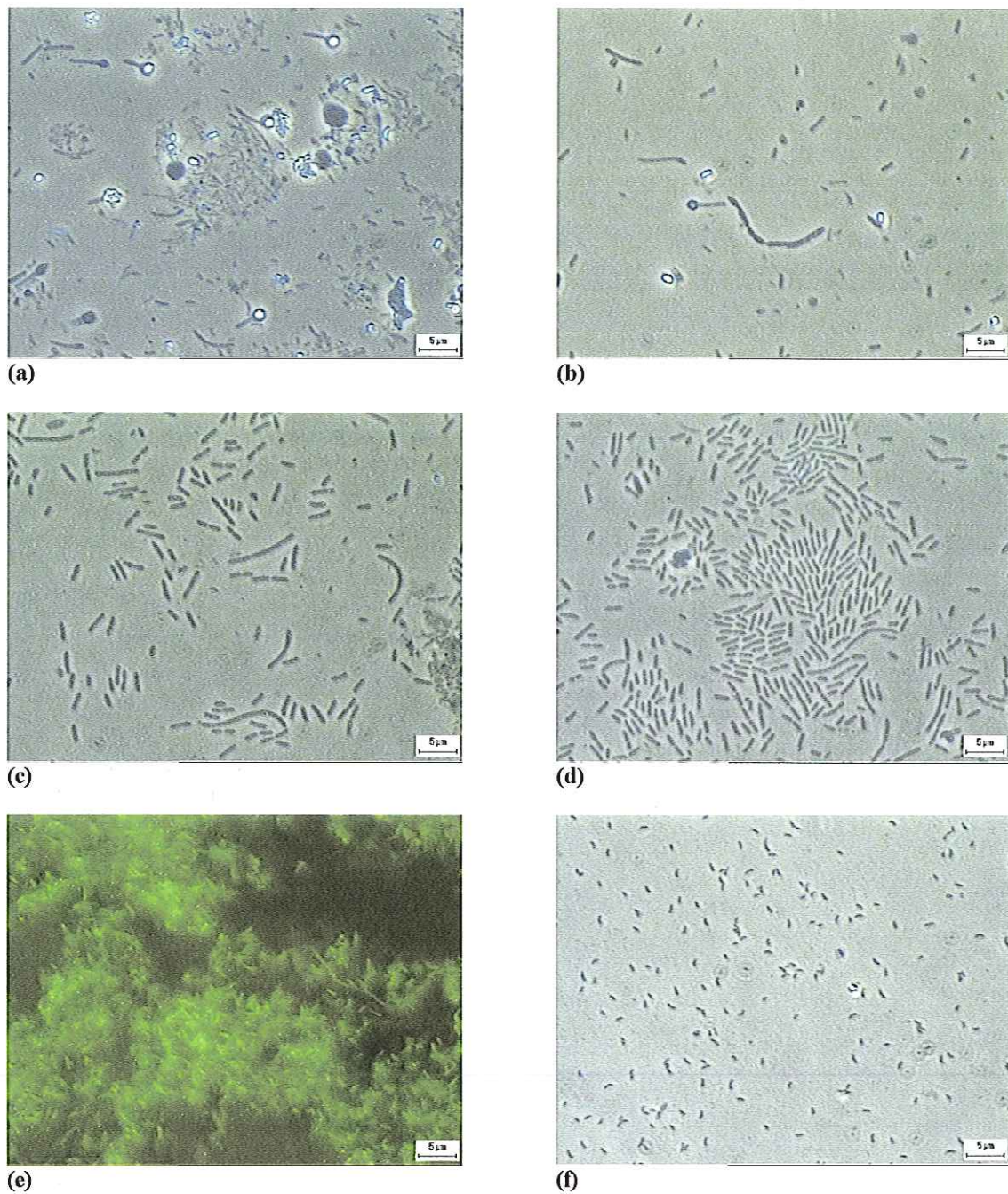


Figura 26. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência no ensaio de $NMP_{inicial}$ contendo lactato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos com esporos terminais e (b) bacilos em cadeia – diluição 10^{-4} , (c) e (d) bacilos com extremidades arredondadas – diluição 10^{-5} , (e) bacilos retos metanogênicos – diluição 10^{-6} , (f) bacilos curvos – diluição 10^{-7} .

No ensaio de NMP_{final} , para as mesmas condições, obteve-se concentrações iguais a $9,0 \times 10^{12}$ org/mL e $8,0 \times 10^2$ org/mL, respectivamente, para os organismos anaeróbios totais e metanogênicos. Pelos exames microscópicos verificou-se o predomínio de bacilos curvos e a presença de bacilos retos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. Os bacilos com extremidades arredondadas e bacilos com extremidades afiladas foram observados com pouca frequência (Tabela 24 e Figura 27).

VAZOLLER (1995), em ensaios de NMP realizados a 55°C, com lactato de sódio (20mM), observou interação sintrófica entre BRS acetogênicas e arqueas metanogênicas, durante a degradação do substrato orgânico. O autor verificou crescimento para ambos os microrganismos da ordem de 10^9 org/mL.

VARESCHE *et al.* (2000) realizaram contagens microbianas com o mesmo lodo termofílico proveniente de reator UASB com lactato de sódio (20mM) e sulfato de sódio (10mM), como fontes energéticas. Os autores obtiveram concentrações iguais a $3,5 \times 10^5$ org/mL e $5,0 \times 10^4$ org/mL para os microrganismos anaeróbios totais e produtores de metano, respectivamente. Os autores verificaram os mesmos tipos morfológicos presentes neste trabalho, ou seja, o predomínio de bacilos curvos e retos não fluorescentes, provavelmente relacionados às bactérias redutoras de sulfato, e a presença de bacilos delgados fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp.. É importante lembrar que os autores realizaram a contagem após o enriquecimento do inóculo, com vários substratos orgânicos, semelhante ao descrito na Tabela 7. Neste trabalho a biomassa anaeróbia proveniente do enriquecimento, com vários substratos orgânicos, foi utilizada como inóculo para crescimento com lactato e sulfato de sódio. A biomassa desenvolvida nessa última condição foi utilizada como inóculo para a quantificação microbiana através do $NMP_{inicial}$ e ensaios em reatores em batelada e diferenciais, nas mesmas condições nutricionais. Assim como para o ensaio com acetato e sulfato, essa série de enriquecimentos favoreceu principalmente o crescimento de bactérias anaeróbias, apresentando novamente, o dobro do valor encontrado por VARESCHE *et al.* (2000). Porém, o valor encontrado da concentração obtida para as arqueas metanogênicas foi de $4,0 \times 10^2$ org/mL, ou seja, a metade do valor encontrado pelos autores acima citados.

Nos ensaios de $NMP_{inicial}$ e NMP_{final} , os exames microscópicos indicaram que as BRS semelhantes a *Desulfovibrio* sp. e *Desulfotomaculum* sp. atuaram como bactérias acetogênicas, produtoras de hidrogênio e dióxido de carbono, em crescimento sintrófico

com os bacilos metanogênicos hidrogenotróficos semelhantes a *Methanobacterium* sp., mantendo os valores de pH adequados no sistema.

Tabela 24. Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP_{final} para lactato e sulfato.

MORFOLOGIAS	DILUIÇÕES							
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰
ARQUEAS METANOGÊNICAS								
<i>Methanosarcina</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-
Cistos de sarcinas	+	-	-	-	-	-	-	-
Bacilos fluorescentes	++	++++	++	+	-	-	-	-
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS								
Bacilos com extremidades afiladas	+	+	++	++	++	++	++	+
Bacilos com extremidades arredondadas	+	+	++	++	++	++	++	++
Bacilos curvos	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+
Bacilos em cadeia	-	-	-	-	-	-	-	-
Cocos	-	-	-	-	-	-	+	+
Espirilos	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	++	++	+	+	+	+	+	+
Filamentos	-	-	-	-	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não observados.

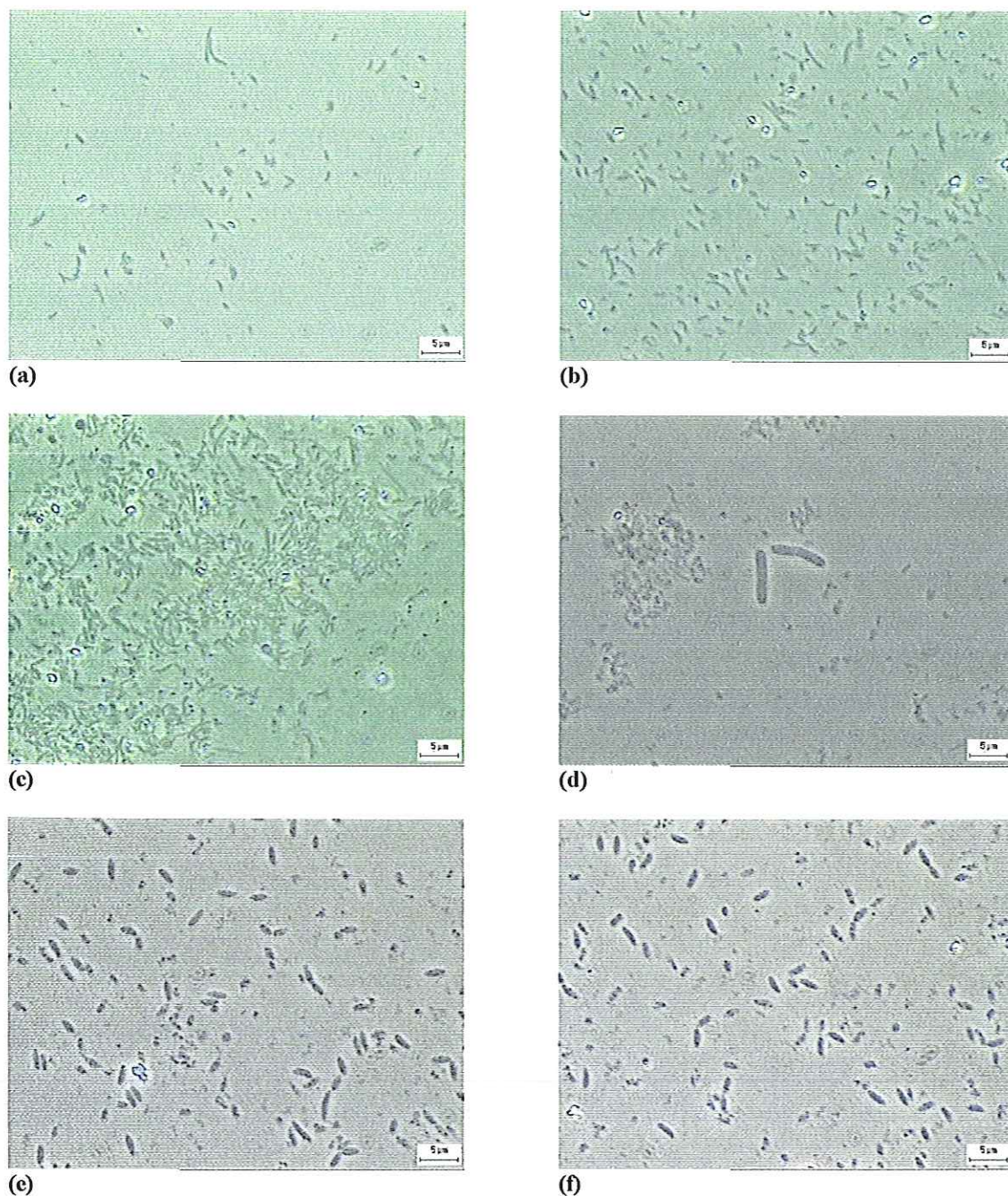


Figura 27. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase no ensaio de NMP_{final} contendo lactato de sódio e sulfato de sódio: (a) bacilos curvos – diluição 10^{-1} , (b) e (c) bacilos com extremidades arredondadas – diluição 10^{-2} , (d) bacilos com extremidades arredondadas – diluição 10^{-8} , (e) e (f) bacilos com pontuações e extremidades afiladas – diluição 10^{-10} .

5.3.2.4. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

As amostras, dos reatores em batelada e diferenciais, foram hibridadas com sondas de oligonucleotídeos específicos ao Domínio *Bacteria* e para o grupo geral das BRS (SRB385) da subdivisão delta de *Protobacteria*. Porém, não foram realizadas quantificações dos organismos pertencentes ao Domínio *Archaea*, devido à baixa concentração dessas células nas amostras. É importante lembrar que neste ensaio, com lactato e sulfato, foi verificada a presença de bacilos fluorescentes, cistos de sarcinas e baixa produção de metano. De acordo com AMANN *et al.* (1995) o FISH apresenta limite de detecção celular, ou seja, células em concentrações inferiores a 10^4 org/mL não são detectadas por essa técnica. No presente trabalho, os resultados obtidos pelo NMP, revelaram que a concentração das arqueas metanogênicas foi da ordem de 10^2 org/mL.

Assim como no ensaio com o substrato orgânico acetato e sulfato, as amostras desse experimento também foram submetidas a sete ciclos de congelamento-descongelamento (-80 a 60°C) (SEKIGUCHI *et al.*, 1999), com o objetivo de aumentar a permeabilidade da parede celular para a realização da técnica de FISH.

As amostras de células planctônicas e do biofilme, no tempo zero (T_0), não foram quantificadas, pois além da grande quantidade de sulfeto precipitado, as células estavam aderidas às partículas inorgânicas ou polímeros, dificultando a quantificação das mesmas. Com o intuito de separar as células, as amostras foram submetidas à agitação em vórtex com detergente NONINDET40 e pérolas de vidro. No entanto, esse procedimento não surtiu efeito, então as amostras foram submetidas a ultrassom por 20 minutos, porém as células continuaram agregadas. Por esse motivo, no tempo zero (T_0), não foi possível quantificar as amostras de células planctônicas e do biofilme provenientes dos reatores em batelada e diferencial, respectivamente.

Para o reator em batelada, a composição microbiana relacionada com o Domínio *Bacteria*, apresentou valores de 82,6% (E.P.=2,6%), 80,8% (E.P.=1,5%), 80,3% (E.P.=1,7%) e 80,7% (E.P.=2,0%) em 9, 21,4, 28 e 44 horas de operação, respectivamente. O predomínio de células bacterianas neste Domínio foram bacilos com extremidades afiladas. A composição microbiana detectada com a sonda SRB385 foi de 66,4% (E.P.=2,3%), 56,3% (E.P.=7,1%), 66,0% (E.P.=5,6%) e 67,4% (E.P.=2,4) durante 9, 21,4, 28 e 44 horas de operação, respectivamente, correspondendo a redução de sulfato com predomínio de bacilos com extremidades afiladas e bacilos curvos. Os

valores e as morfologias obtidas estão apresentadas nas Figuras 28 e 29, respectivamente, e no Anexo 7. Os organismos metanogênicos presentes nesse ensaio foram bacilos retos fluorescentes, porém os mesmos não foram quantificados para essa condição como mencionado anteriormente. Contudo, foram estimadas as porcentagens dos organismos metanogênicos, pois de acordo com RASKIN *et al.* (1994) a soma das porcentagens de células hibridizadas com ARC915 e EUB338 deve ser igual a 100%. Os valores das porcentagens estimadas para as arqueas metanogênicas foram iguais a 17,4%, 19,2%, 19,7% e 19,3%.

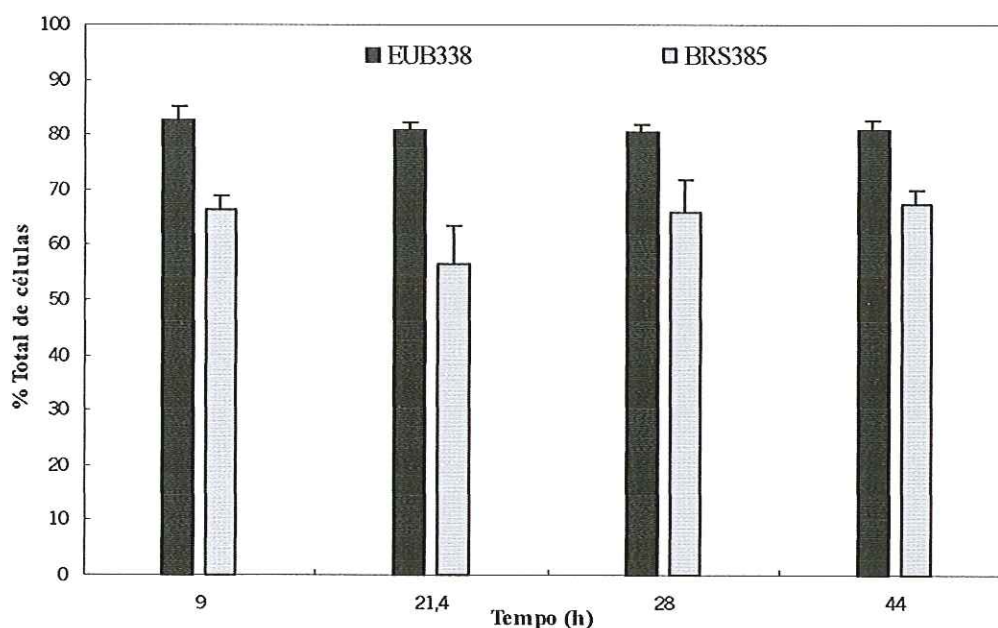


Figura 28. Composição da comunidade microbiana determinada pela técnica de FISH, em função do tempo, para células planctônicas. Abundância relativa de células pertencentes ao Domínio *Bactéria* e grupo geral de BRS. A porcentagem de células pertencentes ao grupo das BRS foi estimada baseando-se nas características morfológicas das células e nos valores obtidos com sonda (SRB385) específica para as BRS Gram-negativas. Os valores da abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro padrão.

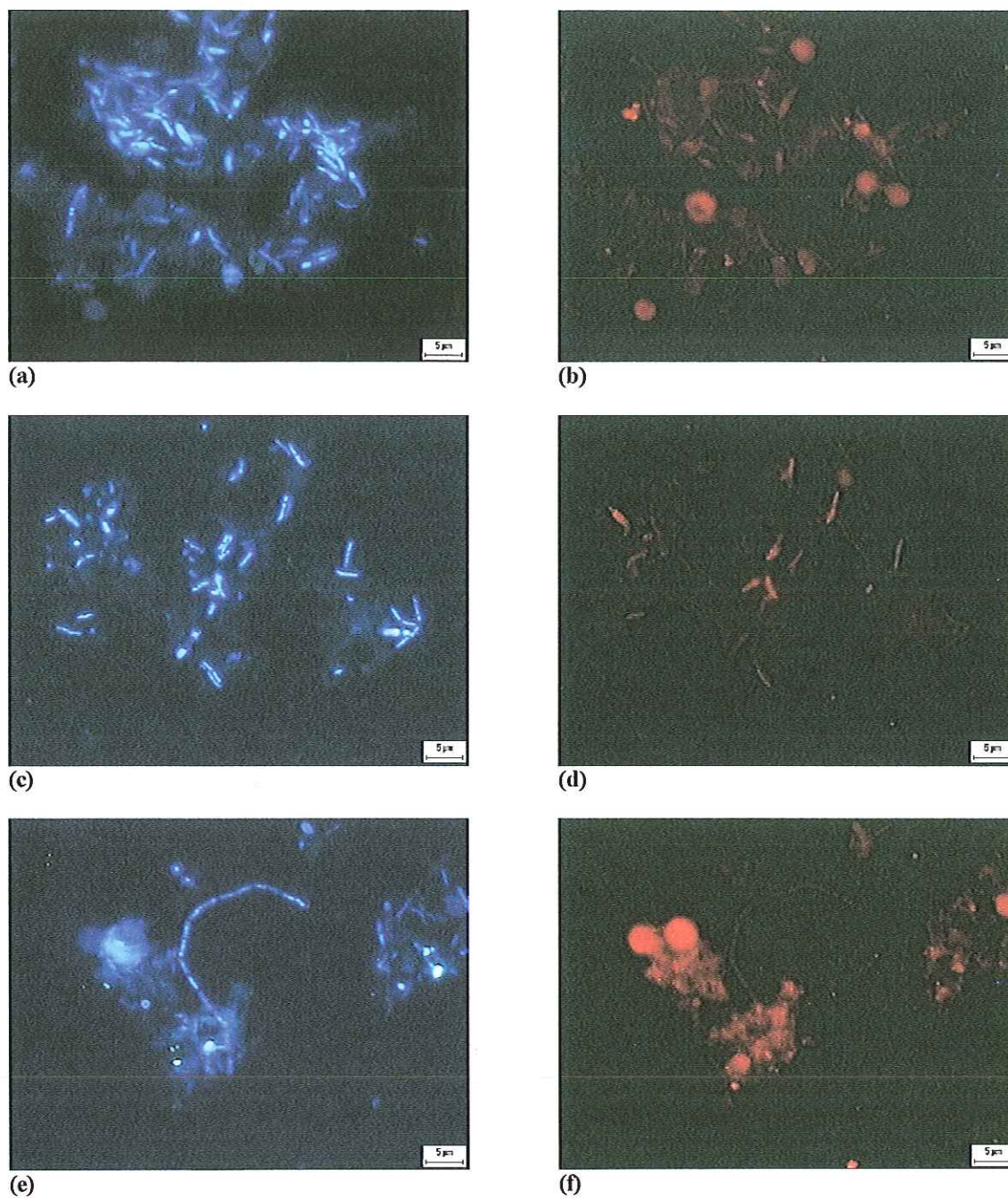
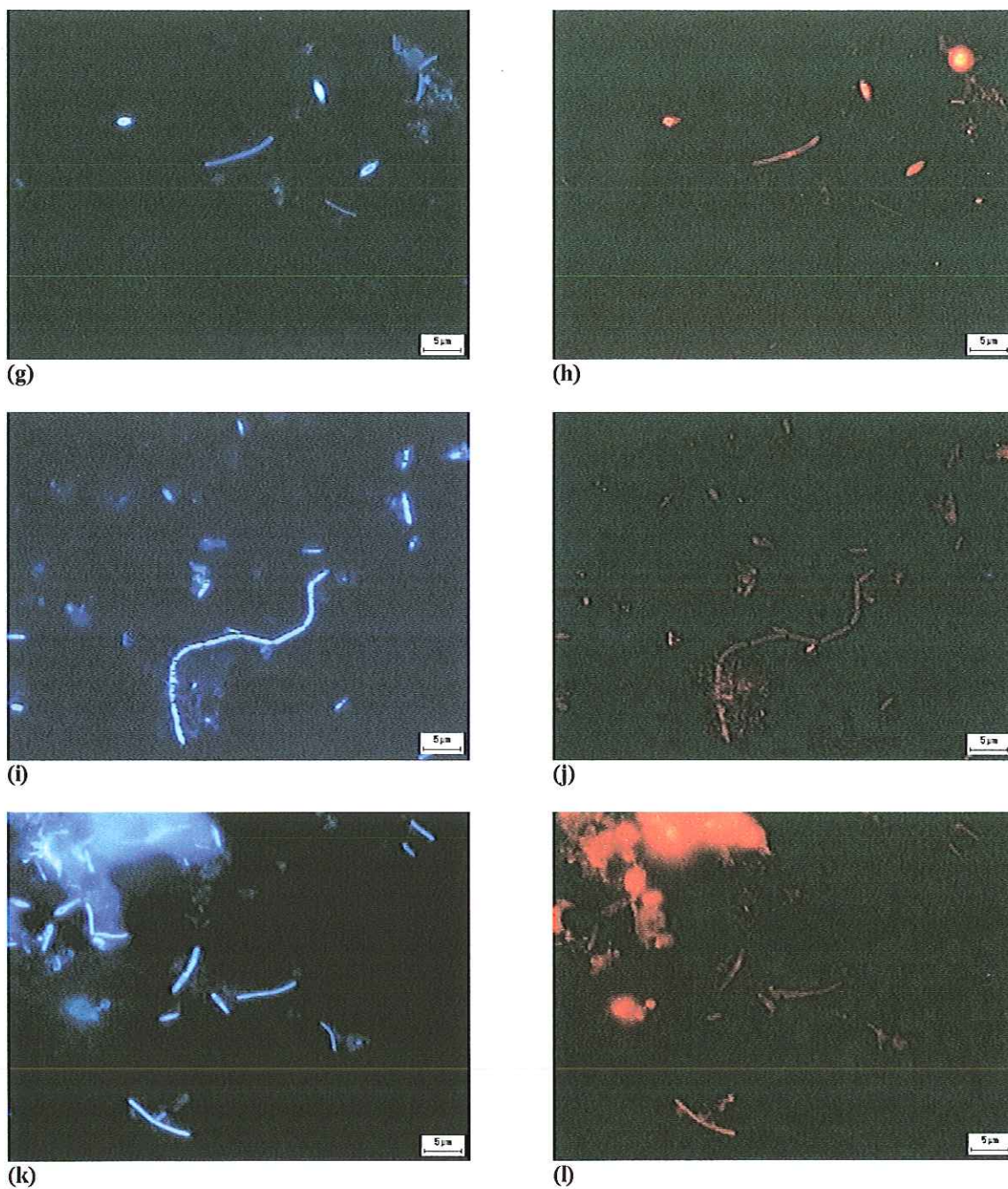


Figura 29. Hibridação de amostras do reator em batelada – lactato de sódio e sulfato de sódio: **(a)** coloração com DAPI; **(b)** bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda EUB338, **(c)** coloração com DAPI, **(d)** bacilos com extremidades arredondas hibridados com a sonda EUB338, **(e)** coloração com DAPI, **(f)** bacilos em cadeia hibridados com a sonda EUB338.



Continuação da Figura 29. Hibridação de amostras do reator em batelada – lactato de sódio e sulfato de sódio: **(g)** coloração com DAPI, **(h)** bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda SRB385, **(i)** coloração com DAPI, **(j)** bacilos em cadeia hibridados com a sonda SRB385, **(k)** coloração com DAPI, **(l)** bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda SRB385.

Para o reator diferencial, a composição microbiana verificada no biofilme, foi de 68,6% (E.P.= 4,1%), 86,2% (E.P.=1,5%), 88,9% (E.P.=1,3%) e 86,3% (E.P.=3,1%) em 20, 28,5, 34,5 e 43 horas de operação, respectivamente para o Domínio *Bacteria*. Durante o mesmo período, a composição microbiana detectada com a sonda SRB385 foi de 65,5% (E.P.=1,0%), 81,7% (E.P.=1,2%), 82,9% (E.P.=1,2%) e 79,1% (E.P.=1,6%). Os organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* presentes nesse ensaio, ou seja, os bacilos retos fluorescentes, não foram quantificados nos biofilme pelos mesmos motivos descritos anteriormente. Porém, assim como no ensaio com reator em batelada, a porcentagem total dos organismos metanogênicos foi estimada de acordo com RASKIN *et al.* (1994). Os valores das porcentagens estimadas para as arqueas metanogênicas foram iguais a 31,4%, 13,8%, 11,1% e 13,7% em 20, 28,5, 34,5 e 43 horas de operação. Os valores e as morfologias obtidas na hibridação *in situ* estão apresentados nas Figuras 30 e 31, respectivamente, e no Anexo 8.

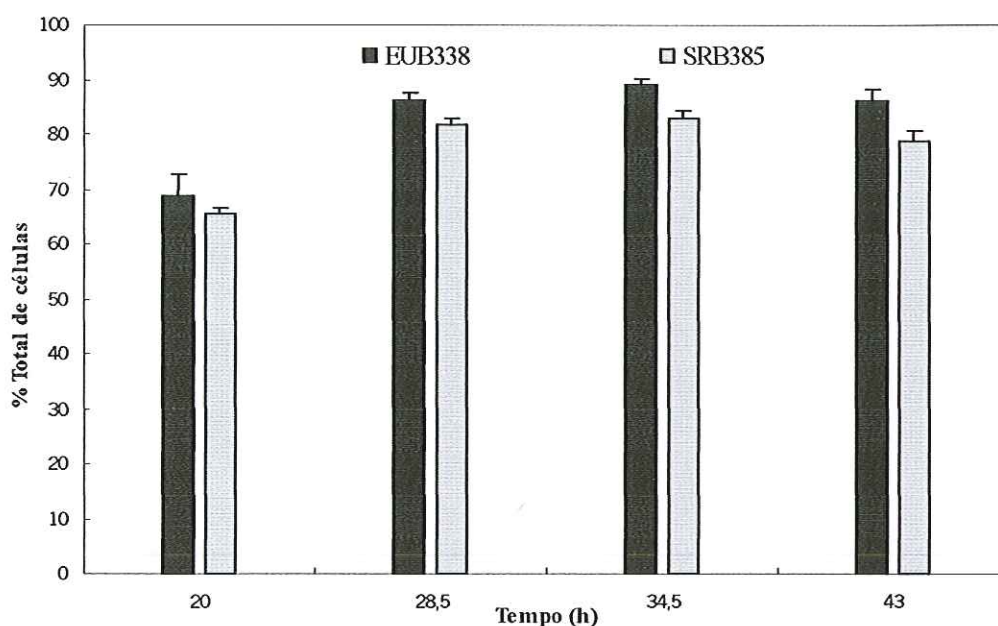


Figura 30. Composição da comunidade microbiana determinada pela técnica de FISH, em função do tempo, para células do biofilme. Abundância relativa de células pertencentes ao Domínio *Bactéria* e grupo geral de BRS. A porcentagem de células pertencentes ao grupo das BRS foi estimada baseando-se nas características morfológicas das células e nos valores obtidos com sonda (SRB385) específica para as BRS Gram-negativas. Os valores da abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro padrão.

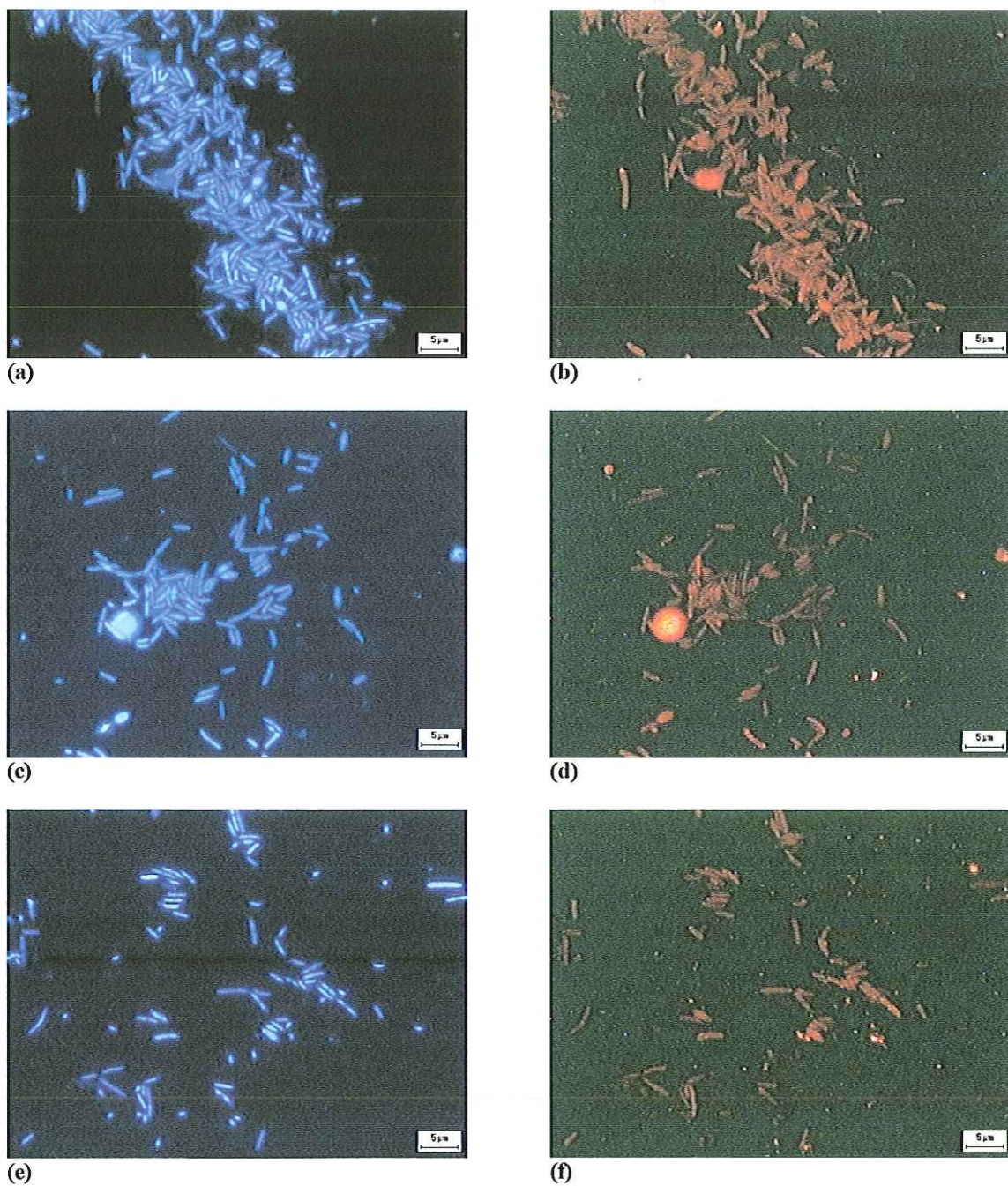


Figura 31. Hibridação de amostras do reator diferencial – lactato de sódio e sulfato de sódio: **(a)** coloração com DAPI, **(b)** bacilos com extremidades arredondadas e afiladas hibridados com a sonda EUB338, **(c)** coloração com DAPI, **(d)** bacilos em cadeia hibridados com a sonda SRB385, **(e)** coloração com DAPI, **(f)** bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda SRB385.

Nos reatores em batelada, assim como nos reatores diferenciais, o enriquecimento com vários substratos orgânicos e os subseqüentes cultivos do inóculo com lactato e sulfato, resultou na seleção de bacilos livres, com extremidades afiladas, formadores de esporos, bacilos com extremidades arredondadas, bacilos curvos e bacilos fluorescentes. As características dessas morfologias, aliadas ao metabolismo incompleto da fonte orgânica devido à formação de ácido acético, sugeriram a seleção de uma bactéria redutora do íon sulfato semelhante ao gênero *Desulfotomaculum*, um bacilo oxidador de acetato e um bacilo metanogênico hidrogenotrófico, crescendo em sintrofia, sob condições termofílicas (55°C).

5.3.2.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A formação e evolução do biofilme anaeróbio termofílico, em espumas de poliuretano, foram acompanhadas ao longo do tempo, nos quatro reatores alimentados com lactato e sulfato. Amostragens foram realizadas com 4, 9, 15,4, 21,4, 28, 44 e 55 horas de operação.

A caracterização morfológica juntamente com os resultados obtidos em microscopia eletrônica de varredura, permitiu caracterizar o processo de colonização inicial das matrizes de poliuretano em reatores diferenciais alimentados com lactato e sulfato.

Nessas condições, foram verificados dois tipos de colonização microbiana. Inicialmente, as espumas foram colonizadas por bacilos com extremidades afiladas e esporos. Com 21,4 horas de operação, verificou-se que os bacilos com extremidades afiladas estavam aderidos ao suporte, por polímeros extracelulares. Com 21,4 e 44 horas de operação, foram observados bacilos com extremidade afilada, bacilos em cadeia e esporos aderidos de forma dispersa na espuma, além de agregados celulares. Finalmente, com 55 horas de operação, foram visualizados apenas agregados celulares. As morfologias descritas podem ser observadas na Figura 32.

Os morfotipos presentes neste ensaio, verificados através de MEV, foram diferentes daqueles observados para o ensaio com acetato e sulfato.

VARESCHE *et al.* (1997) e RIBEIRO (2001) estudando colonização microbiana em reatores anaeróbios de leito fixo alimentados com glicose, sob condições mesofílicas (30°C), verificaram semelhante comportamento de colonização microbiana em matrizes de poliuretano.

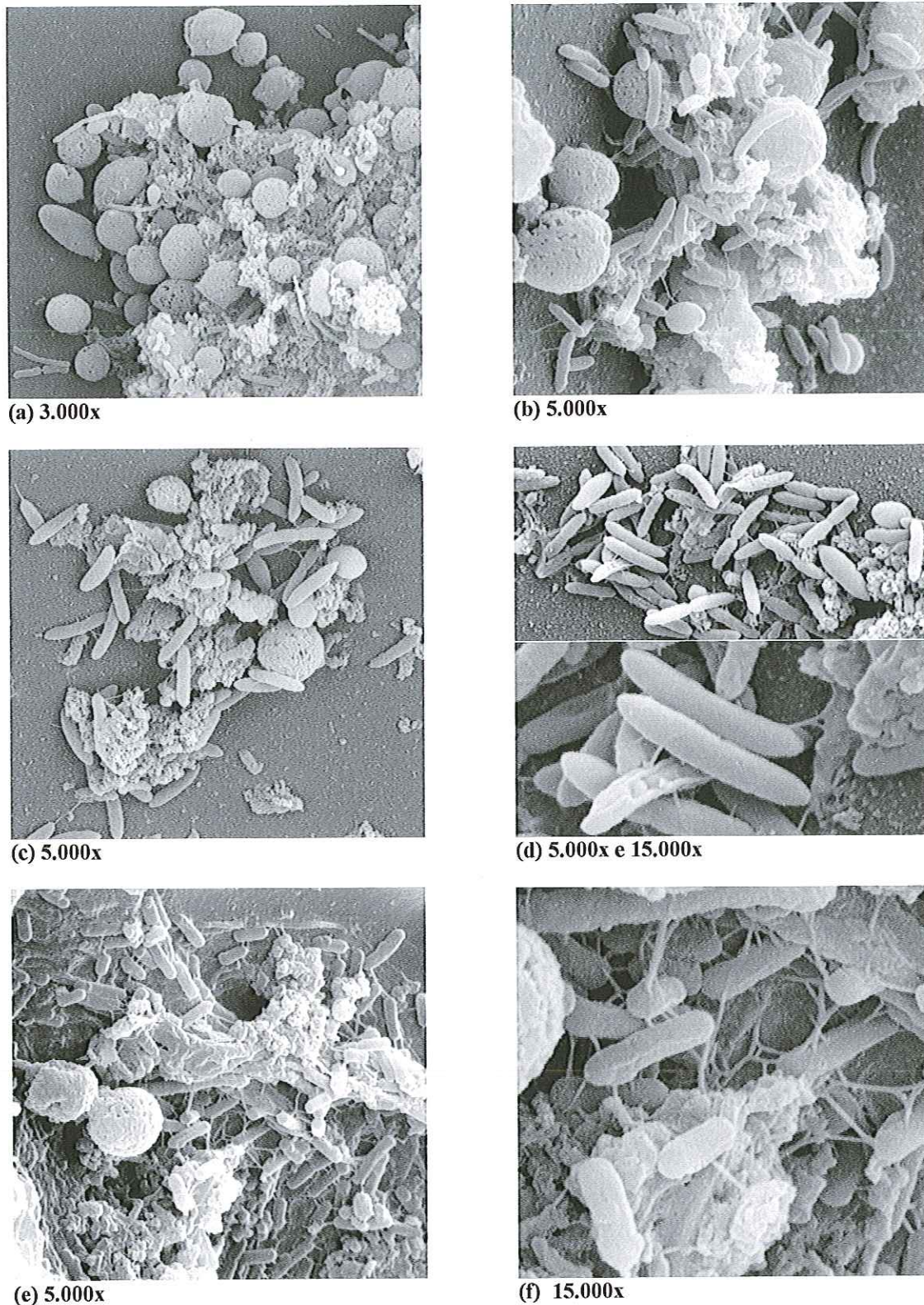
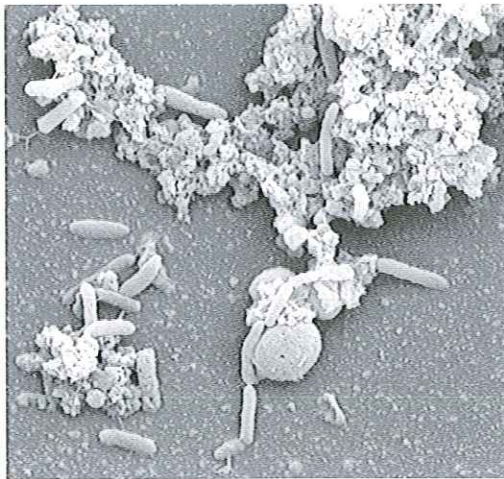
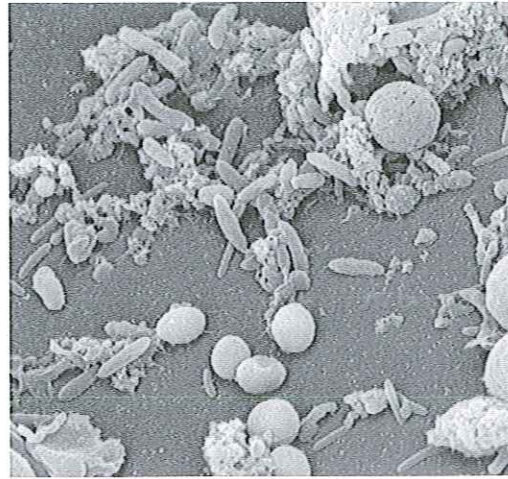


Figura 32. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo lactato de sódio e sulfato de sódio – (a) agregados celulares, (b) bacilos com extremidades arredondadas, (c) e (d) bacilos com extremidades arredondadas e afiladas, (e) agregados celulares, (f) bacilos com extremidades arredondadas e polímeros extra-celulares.



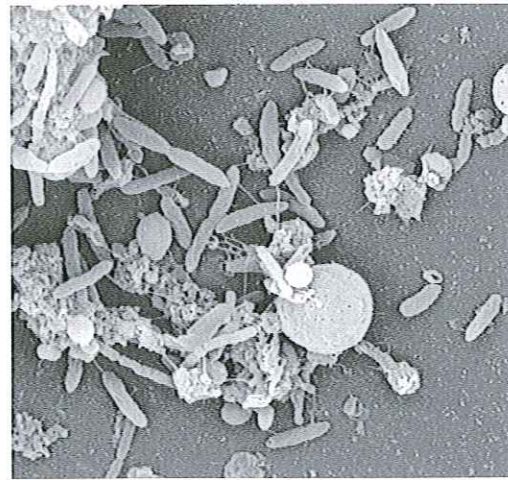
(g)



(h)



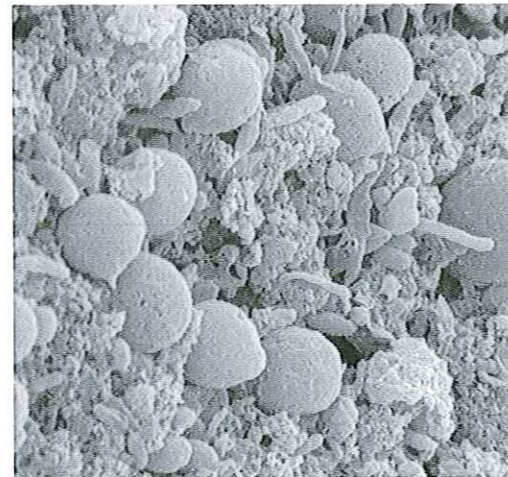
(i)



(j)



(k)



(l)

Continuação da Figura 32. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo lactato de sódio e sulfato de sódio – (g) bacilos em cadeia, (h) bacilos com extremidades afiladas, (i) agregados celulares, (j) bacilos com extremidades afiladas, (k) microgrânulos e agregados celulares, (l) agregados celulares.

5.3.3. REATORES ANAERÓBIOS ALIMENTADOS COM PROPIONATO DE SÓDIO E SULFATO DE SÓDIO

5.3.3.1. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO

Foram realizados ensaios com propionato de sódio e sulfato de sódio, em reatores em batelada e diferenciais, para verificar o consumo do substrato orgânico e da fonte de enxofre. Ambos os sistemas operaram em condições iguais aos experimentos descritos anteriormente. Ou seja, foram alimentados com meio basal Zinder (ZINDER, 1984) suplementado com as soluções descritas na Tabela (capítulo material e Métodos), sob condições anaeróbias, a $55\pm 1^\circ\text{C}$. Estes sistemas foram inoculados com 20% de biomassa termofílica, proveniente do cultivo de enriquecimento (Figura 9c) e obtida na fase exponencial de crescimento, com 527 horas de operação, atingindo produção máxima de metano de 72,4%.

Os reatores anaeróbios em batelada não removeram ácido propiônico e sulfato, durante 147,8 horas de operação. Neste mesmo período não houve produção de metano. Os valores de $\text{SSV}_{\text{inicial}}$ e $\text{SSV}_{\text{final}}$ foram 5873,0mg/L e 1329,6mg/L, respectivamente. Foi verificada concentração de 2,7mg/L de sulfeto, correspondente a adição da solução redutora de sulfeto de sódio. Esse valor manteve-se praticamente constante durante todo o período experimental. É importante salientar que, durante o ensaio, os valores de sulfato e ácido propiônico aumentaram ligeiramente, em relação às concentrações iniciais (Figura 33). Provavelmente, devido a endogenia celular, levando a um acréscimo nos valores desses compostos. No final do experimento, os reatores apresentaram coloração verde escuro, indicando possível morte das células.

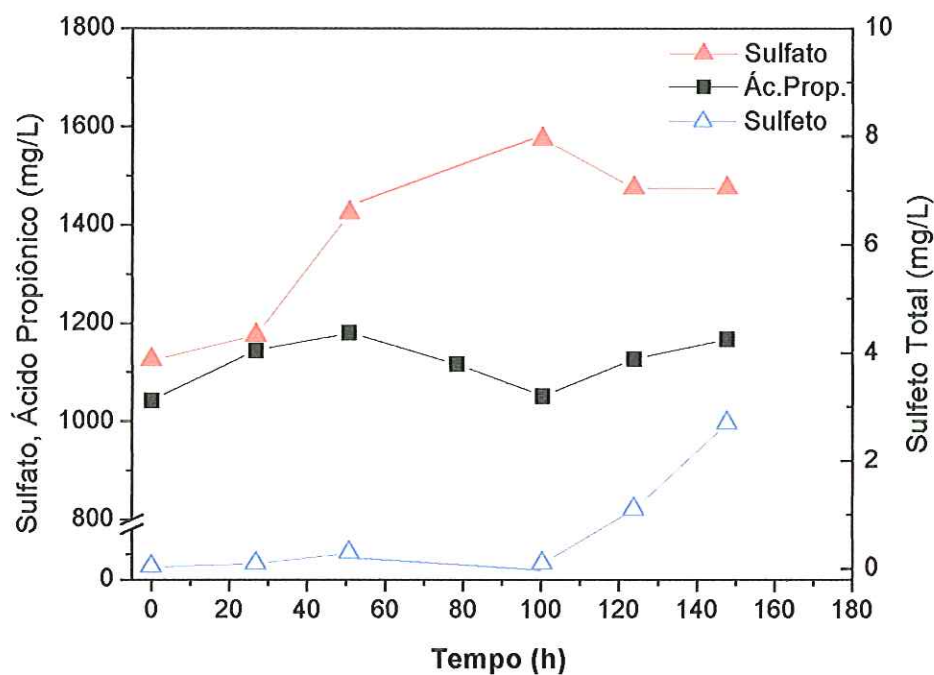


Figura 33. Variação temporal das concentrações de sulfato, ácido propiônico e sulfeto total dissolvido.

Os reatores anaeróbios diferenciais operaram, em faixa de pH entre 7,0 e 8,0, e apresentaram 99,5% de eficiência de remoção do ácido propiônico, para concentração inicial de 1175,0mg/L, em 151,5 horas de operação. Análises cromatográficas revelaram a presença de ácido acético, ácido isobutírico e ácido isovalérico, porém estes não foram quantificados. A eficiência de remoção da DQO foi de aproximadamente 87,1%, para concentração inicial de 1955,0mg/L. Porém, neste ensaio, não houve remoção de sulfato. A relação DQO/sulfato foi de 1,7. Os valores da variação da concentração dos substratos, em função do tempo, estão apresentados na Figura 34 e Anexo 10. Ao contrário do observado nos reatores em batelada, o substrato orgânico foi utilizado eficientemente pelos microrganismos.

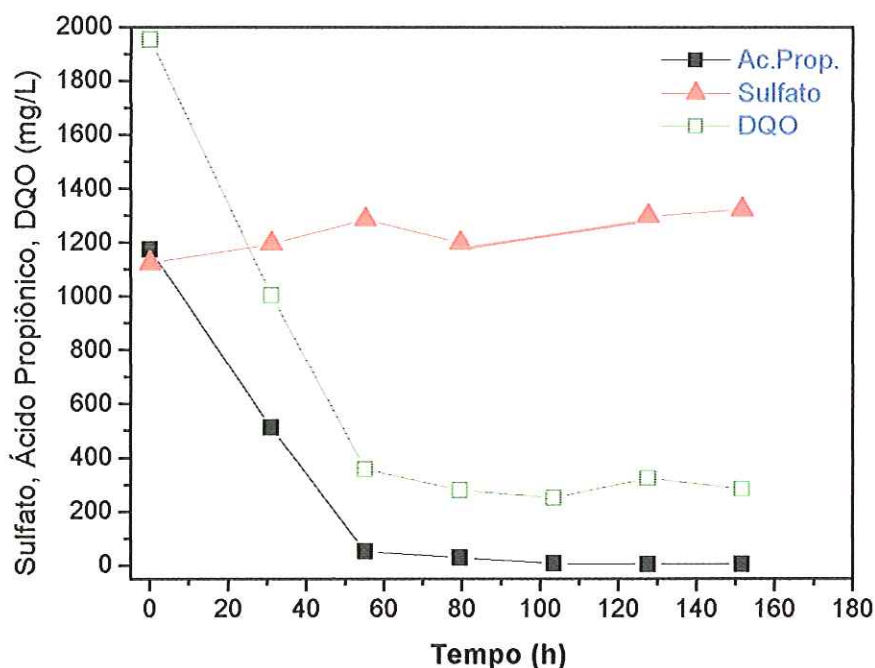


Figura 34. Reatores diferenciais de leito fixo: variação temporal das concentrações de sulfato, ácido propiônico e DQO.

Portanto, pelos resultados obtidos, com propionato mais sulfato, foram observados comportamentos distintos entre os reatores anaeróbios. De acordo com UBEROI & BHATTACHARYA (1995), a oxidação do propionato, via redução de sulfato, é termodinamicamente favorável. Contudo, o propionato pode ser utilizado por bactérias acetogênicas, se o hidrogênio formado for retirado, continuamente do sistema, por organismos hidrogenotróficos. No reatores em batelada, com células planctônicas, não houve consumo do substrato orgânico e fonte de enxofre. Após 147,8 horas de operação, o lodo apresentou coloração esverdeada. Segundo VAZOLLER (1995), tal característica pode estar relacionada com o declínio da atividade microbiana e posterior morte celular.

Nos experimentos, com reatores em batelada, foram utilizados volumes de inóculo iguais a 100 e 200mL, provenientes da cultura enriquecida. Nas duas condições avaliadas não foram obtidas respostas de degradação do propionato, metanogênese ou sulfetogênese. De acordo com STAMS *et al.* (1992), o crescimento microbiano de culturas enriquecidas de lodo granulado, a 55°C, foi possível mediante a adição de 5 a 10% de metanogênicas hidrogenotróficas.

Nos experimentos com reatores diferenciais, com biofilme, foi observada a degradação do propionato, com produção de ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono. Provavelmente, ocorreu sinergismo entre os organismos aderidos ao suporte. Segundo SPEECE (1996), esta cooperação é devida à redução da distância para a transferência de produtos metabólicos, favorecida pela imobilização da biomassa. Além disso, tais condições favorecem a retenção celular e minimizam o efeito negativo de variações na temperatura, pH, produtos metabólicos e substâncias tóxicas (LETTINGA, 1995; LAZAROVA & MANEM, 1995; WATNICK & KOLTER, 2000). Outra consideração importante, verificada por WIEGANT (1986), indicou que a degradação do propionato pode ocorrer em determinadas zonas do reator, onde menores quantidades de hidrogênio estejam disponíveis.

Especificamente neste trabalho os resultados obtidos com os ensaios de NMP revelaram maiores concentrações de arqueas metanogênicas acetoclásticas, da ordem de 10^4 org/mL, em relação às metanogênicas hidrogenotróficas com valores da ordem de 10^2 org/mL. Portanto, nos reatores em batelada, mesmo com maior volume de inóculo, não houve crescimento concomitante de organismos degradadores de propionato e/ou metanogênicas e BRS hidrogenotróficas. Contudo, deve-se destacar que, nos ensaios de NMP com propionato e sulfato foram observadas bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas. Entre as primeiras foi observado o predomínio de bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais, semelhantes a *Syntrophobacter* sp., bacilos com pontuações e extremidades arredondadas e bacilos curvos, semelhantes a *Desulfovibrio* sp.. As arqueas metanogênicas foram representadas, principalmente, por bacilos fluorescentes e acetoclásticas semelhantes a *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. Esse comportamento foi verificado, principalmente, no ensaio de NMP_{inicial}. No entanto, no NMP_{final} não foram observadas, em nenhuma diluição, arqueas metanogênicas acetoclásticas. Provavelmente, na primeira condição, estiveram presentes organismos sintróficos, ou seja, os degradadores de propionato, metanogênicos acetoclásticos e os hidrogenotróficos, representados por metanogênicas e BRS. Contudo, de acordo com STAMS *et al.* (1992), sob tais condições, as velocidades de crescimento de metanogênicas hidrogenotróficas atingiram maiores valores, quando metanogênicas acetoclásticas estiveram presentes no meio de cultivo. WALLRABENSTEIN *et al.* (1995) verificaram que as oxidadoras de ácidos voláteis *Syntrophobacter wolinii*, linhagem MPOB, *Syntrophus buswellii*, *Syntrophus gentianae* e *Syntrophus* linhagem KoProp1 foram obtidas somente através de séries de diluições

com propionato. Neste trabalho as diferenças marcantes entre os reatores em batelada e a metodologia do NMP, foram relacionadas a agitação de 150rpm e purificação pelas diluições, respectivamente.

Especificamente nos reatores diferenciais também foi verificado crescimento no frasco de alimentação. Ou seja, predomínio de bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais, semelhantes a *Syntrophobacter* sp., bacilos com pontuações e extremidades arredondadas e bacilos metanogênicos hidrogenotróficos, semelhantes a *Methanobacterium* sp. No entanto, na espuma foram observadas as mesmas morfologias, mencionadas anteriormente, mais a presença de bacilos curvos, semelhantes a *Desulfovibrio* sp., provavelmente relacionados com BRS hidrogenotróficas. As duas primeiras morfologias foram relacionadas com as bactérias oxidadoras de propionato. Embora, na presença de sulfato, dependeram do par sintrófico metanogênico ou BRS hidrogenotróficos, para fermentar anaerobiamente o substrato orgânico. A literatura destaca o isolamento de *Syntrophobacter* sp., capazes de crescer em reatores metanogênicos, em elevadas concentrações (WALLRABENSTEIN *et al.*, 1995; HARMSSEN *et al.*, 1998; OUDE ELFERINK *et al.*, 1998). No entanto, sua presença e seu papel em reatores sulfetogênicos não estão claros. A respiração anaeróbia, via redução de sulfato, foi observada somente em culturas puras (WALLRABENSTEIN *et al.*, 1995).

Neste trabalho, os resultados obtidos com os ensaios de NMP revelaram maiores concentrações de arqueas metanogênicas acetoclásticas, da ordem de 10^4 org/mL, em relação às metanogênicas hidrogenotróficas, com valores da ordem de 10^2 org/mL. Portanto, nos reatores em batelada, mesmo com maior volume de inóculo, não houve crescimento concomitante de organismos degradadores de propionato e/ou metanogênicas e BRS hidrogenotróficas.

Por outro lado, os resultados obtidos nos reatores diferenciais, mostraram que as relações sintróficas entre os organismos permitiram a manutenção de baixas pressões parciais de hidrogênio, concomitante a degradação do propionato e metanogênese.

5.3.3.2. MAPEAMENTO MORFOLÓGICO

Durante o período de 147,8 horas de operação, do reator em batelada, verificou-se o predomínio total de bacilos esporulados, cistos de sarcinas e outros esporos. Bacilos retos fluorescentes e bacilos com pontuações e extremidades arredondadas

foram observados com pouca frequência. Pelos resultados obtidos, verificou-se que as condições não favoreceram o crescimento microbiano nesse sistema. Isto justifica a não remoção do substrato orgânico e sulfato nos reatores em batelada.

De acordo com van LIER *et al.* (1993), por razões termodinâmicas, o propionato pode ser degradado se o acetato e, principalmente, o hidrogênio foram efetivamente removidos do sistema por organismos acetoclásticos e metanogênicos hidrogenotróficos, respectivamente. No entanto, os autores afirmaram que, a 55°C, a oxidação anaeróbia do propionato pode se inibida pela presença de outros ácidos orgânicos voláteis, como o acético e butírico, e pH.

Porém, VAZOLLER (1995), utilizando lodo de mesma procedência obteve resultados diferentes dos obtidos neste trabalho. Realizando ensaios de isolamento com células planctônicas com propionato de sódio e sulfato de sódio, o autor isolou uma BRS Gram-negativa, degradadora de ácido propiônico, com tempo de geração igual a 38 horas. Análises cromatográficas indicaram que a degradação do ácido propiônico resultava na formação de ácido acético e traços de ácido butírico. Pelos resultados obtidos, o autor sugeriu que o organismo isolado pertencia ao gênero *Desulfotomaculum*.

Nos reatores diferenciais de leito fixo, acompanhou-se o desenvolvimento dos tipos morfológicos presentes no biofilme, em função do tempo, durante 151,5 horas de operação. As morfologias dos microrganismos encontrados durante os tempos 0 (T₀), 31, 55, 79,5, 103,5, 127,5 e 151,5 horas de operação estão apresentadas na Tabela 25.

No biofilme foi observado o predomínio de bacilos com pontuações e extremidades arredondadas e cistos de sarcinas, presença de bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais, bacilos retos fluorescentes e outros esporos. Bacilos curvos foram observados com pouca frequência. É importante ressaltar que metanogênicas acetoclásticas, semelhantes a *Methanosaeta* sp., foram observadas no biofilme durante os períodos de 127,5 e 151,5 horas de operação.

Tabela 25. Ocorrência das morfologias observadas no biofilme do reator diferencial alimentado com propionato de sódio e sulfato de sódio.

MORFOLOGIAS	TEMPO (H)						
	0	31	55	79,5	103,5	127,5	151,5
ARQUEAS METANOGÊNICAS							
<i>Methanosarcina</i> sp	+	-	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp	-	-	-	-	+	+++	+++
Cistos de sarcinas	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Bacilos fluorescentes	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS							
Bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais	++	++	++	++	+++	+++	++
Bacilos com pontuações e extremidades arredondadas	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++
Bacilos curvos	+	+	+	+	+	+	+
Bacilos em cadeia	-	-	-	-	-	-	-
Cocos	-	-	-	-	-	-	-
Espirilos	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Filamentos	-	-	-	-	-	-	-

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados.

5.3.3.3. CONCENTRAÇÃO CELULAR

Nos reatores em batelada foram realizadas contagens microbianas, no início e final de operação, utilizando a técnica do Número Mais Provável (NMP) (Tabela 26).

Tabela 26. Números estimados de microorganismos anaeróbios totais e produtores de metano obtidos através da técnica do NMP com propionato de sódio e sulfato de sódio.

ORGANISMOS	ORGANISMOS / ML	
	NMP INICIAL	NMP FINAL
Anaeróbios Totais	$3,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
Organismos Metanogênicos	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$

Exames de microscopia óptica de luz comum, contraste de fase e fluorescência revelaram o predomínio de bacilos com as extremidades afiladas ligeiramente ovais semelhantes a *Syntrophobacter* sp., bacilos curvos e esporos; a presença de bacilos com pontuações e extremidades arredondadas, organismos metanogênicos semelhantes a *Methanosarcina* sp. e bacilos fluorescentes semelhantes a *Methanobacterium* sp. Raramente foram observados filamentos, bacilos semelhantes a *Methanosaeta* sp, cistos de sarcinas e bacilos em cadeia (Figura 35). A Tabela 27 apresenta as concentrações celulares obtidas no ensaio do NMP inicial.

Tabela 27. Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP_{inicial} para propionato de sódio e sulfato de sódio

MORFOLOGIAS	DILUIÇÕES						
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
ARQUEAS METANOGÊNICAS							
<i>Methanosarcina</i> sp	+++	+++	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp	+	+	-	-	-	-	-
Cistos de sarcinas	++	+	-	-	-	-	-
Bacilos fluorescentes	+++	+++	-	-	-	-	-
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS							
Bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais	++++	++++	++++	+++	+++	++	-
Bacilos com pontuações e extremidades arredondadas	+	+	+	+++	++++	+++	+
Bacilos curvos	+++	+++	++++	++++	++	+	-
Bacilos em cadeia	-	+	+	+	-	-	-
Cocos	-	-	-	-	-	-	-
Espirilos	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++
Filamentos	+	+	-	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não encontrados.

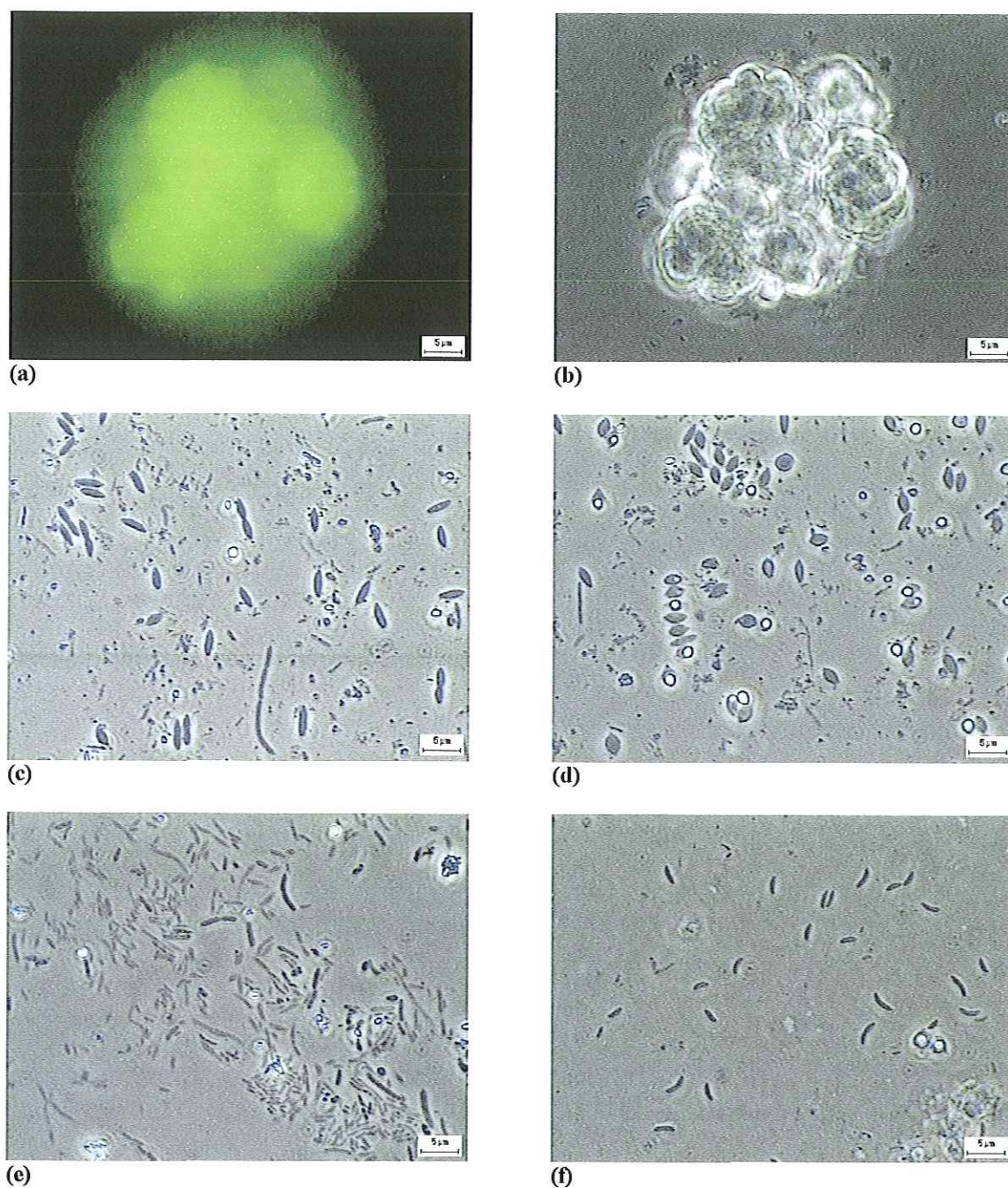


Figura 35. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência na técnica NMP_{inicial} contendo propionato de sódio e sulfato de sódio: (a) e (b) organismos semelhantes a *Methanosarcina* – diluição 10^{-1} , (c) bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais e bacilos em cadeia – diluição 10^{-2} , (d) bacilos com extremidades afiladas esporulando – diluição 10^{-2} , (e) bacilos com pontuações e extremidades arredondadas – diluição 10^{-5} , (f) bacilos curvos – diluição 10^{-7} .

Para o ensaio do NMP_{final}, realizado nas mesmas condições anteriores descritas, obteve-se valores das concentrações de organismos anaeróbios totais e metanogênicos iguais a $1,3 \times 10^8$ e $3,0 \times 10^3$ org/mL, respectivamente. Através do exames microscópicos, verificou-se o predomínio de bacilos com extremidades afiladas e bacilos curvos, a presença de bacilos com extremidades arredondadas e esporos. Bacilos em cadeia, bacilos fluorescentes e cistos de sarcinas foram observados com pouca frequência. A ocorrência e as morfologias observadas nesse ensaio estão apresentadas na Tabela 28 e Figura 36, respectivamente.

Tabela 28. Ocorrência das morfologias observadas no ensaio de NMP_{final} para propionato de sódio e sulfato de sódio

MORFOLOGIAS	DILUIÇÕES						
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
ARQUEAS METANOGÊNICAS							
<i>Methanosarcina</i> sp	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp	-	-	-	-	-	-	-
Cistos de sarcinas	++	++	-	-	-	-	-
Bacilos fluorescentes	++	++	-	-	-	-	-
Bacilos curvos fluorescentes	-	-	-	-	-	-	-
BACTÉRIAS	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
Bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais	+	+	+	++	++	+++	+++
Bacilos com pontuações e extremidades arredondadas	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
Bacilos curvos	++	++	+	-	-	-	-
Bacilos em cadeia	-	-	-	-	-	-	-
Cocos	-	-	-	-	-	-	-
Espirilos	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Esporos	-	-	-	-	-	-	-
Filamentos	-	-	-	-	-	-	-

(++++) predominantes; (+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (-) não encontrados.

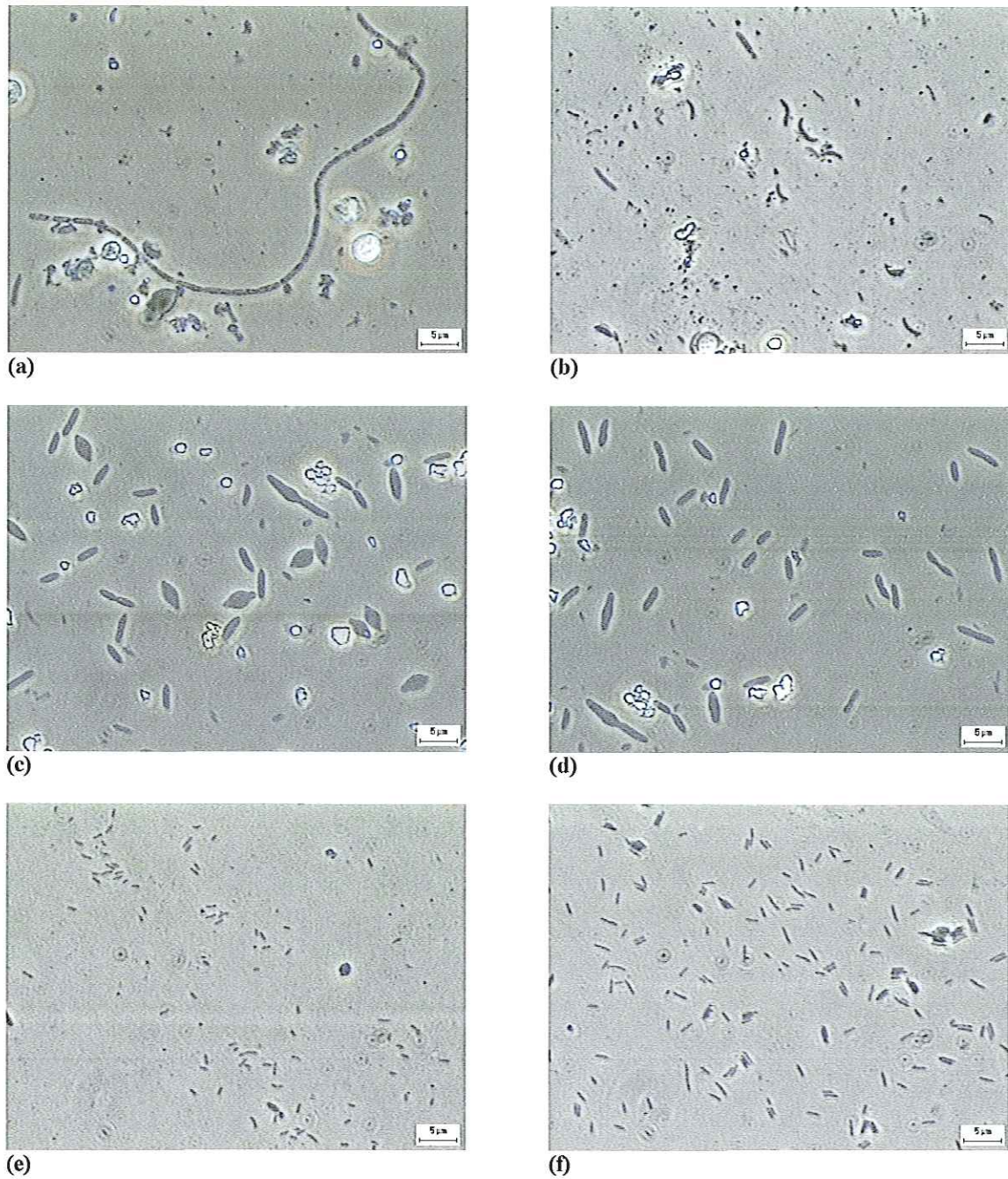


Figura 36. Morfologias celulares observadas em microscopia óptica de contraste de fase na técnica NMP_{final} contendo propionato de sódio e sulfato de sódio: **(a)** bacilos em cadeia e **(b)** bacilos curvos – diluição 10^{-1} , **(c)** bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais e **(d)** bacilos com pontuações e extremidades arredondadas – diluição 10^{-5} , **(e)** bacilos curvos – diluição 10^{-5} , **(f)** bacilos com pontuações e extremidades arredondadas – diluição 10^{-6} .

VARESCHE *et al.* (2000) realizaram ensaios de NMP, a 55°C, com propionato de sódio (20mM) na ausência e presença de sulfato (10mM). Para a primeira condição, os autores obtiveram valores iguais a $1,4 \times 10^3$ org/mL, para anaeróbios totais e arqueas metanogênicas, destacando o predomínio de bacilos curvos não fluorescentes e a presença de sarcinas e bacilos fluorescentes. Para a segunda condição, na presença de sulfato, os autores obtiveram valores iguais a $9,0 \times 10^4$ e $1,7 \times 10^3$ org/mL para anaeróbios totais e organismos metanogênicos, respectivamente. Nesta condição foi verificado predomínio quase total de bacilos longos não fluorescentes, porém observou-se a presença de alguns bacilos fluorescentes. Os autores concluíram, que os bacilos não fluorescentes, presentes nas duas condições, provavelmente foram relacionados com bactérias redutoras do íon sulfato semelhantes a *Desulfovibrio* sp. e *Desulfotomaculum* sp.

Neste trabalho, o valor da concentração de anaeróbios totais foi o dobro daquela observada por VARESCHE *et al.* (2000). Porém, em ambos os trabalhos foram obtidos valores semelhantes para as arqueas metanogênicas, ou seja, a concentração desses organismos foi da ordem de 10^3 org/mL.

Assim como para os ensaios com acetato de sódio e lactato de sódio, na presença de sulfato, essa série de enriquecimentos favoreceu principalmente o crescimento de bactérias anaeróbias.

Pelos resultados obtidos, verificou-se morfologias semelhantes dos organismos anaeróbios totais e metanogênicos nos ensaios de $NMP_{inicial}$ e NMP_{final} . De acordo com WIDDEL (1998) o propionato pode ser oxidado por co-cultura de bactérias acetogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas. Pelos resultados obtidos, nos ensaios de NMP e exames microscópicos, pode-se inferir que o substrato orgânico foi degradado em sintrofia. Provavelmente, a cultura foi constituída por oxidadoras de propionato e organismos metanogênicos e redutores de sulfato hidrogenotróficos. Entre as primeiras, foi observado o predomínio de bacilos com extremidades afiladas ligeiramente ovais semelhantes a *Syntrophobacter* sp., bacilos com pontuações e extremidades arredondadas e bacilos curvos, semelhantes a *Desulfovibrio* sp. As arqueas metanogênicas foram representadas, principalmente, por bacilos fluorescentes e acetoclásticas semelhantes a *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.. esse comportamento foi verificado, principalmente, no ensaio do $NMP_{inicial}$. No entanto, no NMP_{final} não foram observadas, em nenhuma diluição, arqueas metanogênicas acetoclásticas. Provavelmente, na primeira condição, estiveram presentes organismos

sintróficos, ou seja, os degradadores de propionato, metanogênicos acetoclásticos e os hidrogenotróficos, representados por metanogênicas e BRS. Contudo, de acordo com STAMS *et al.* (1992), sob tais condições, as velocidades de crescimento de metanogênicas hidrogenotróficas podem atingir maiores valores, quando metanogênicas acetoclásticas estiverem presentes no meio de cultivo. WALLRABENSTEIN *et al.* (1995) verificaram que as oxidadoras de ácidos voláteis *Syntrophobacter wolinii*, linhagem MPOB, *Syntrophus buswelli*, *Syntrophus gentianae* e *Syntrophus*, linhagem KoProp1, foram obtidas somente através de séries de diluições com propionato. No presente trabalho, as diferenças marcantes, entre os reatores em batelada e a metodologia do NMP, foram relacionadas com a agitação de 150rpm e purificação pelas diluições, respectivamente.

5.3.3.4. HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

As amostras de células planctônicas e do biofilme, foram submetidas a técnica de hibridação fluorescente *in situ*, apenas para verificar os morfotipos presentes nas mesmas. Essa decisão foi tomada porque as células encontravam-se aderidas às partículas inorgânicas e polímeros, dificultando a caracterização e quantificação das mesmas. No entanto, tentou-se realizar a separação das células através da agitação em vórtex, com detergente NONINDET-40 e pérolas de vidro, e sonicação em ultrassom, por 20 minutos. Contudo, as células permaneceram agregadas. Por esse motivo, optou-se em utilizar a técnica do FISH, com sondas específicas para os Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338) e para o grupo geral das BRS (SRB385), apenas para verificar os tipos morfológicos presentes nas amostras, dos reatores em batelada e diferenciais. As morfologias hibridadas com as sondas, anteriormente citadas, estão apresentadas na Figura 37. Foi observado que os bacilos apresentaram sinal com a sonda EUB338, morfologias semelhantes bacilos com extremidades arredondadas mostraram sinal positivo com SRB385 e cistos de sarcinas coraram com a sonda ARC915.

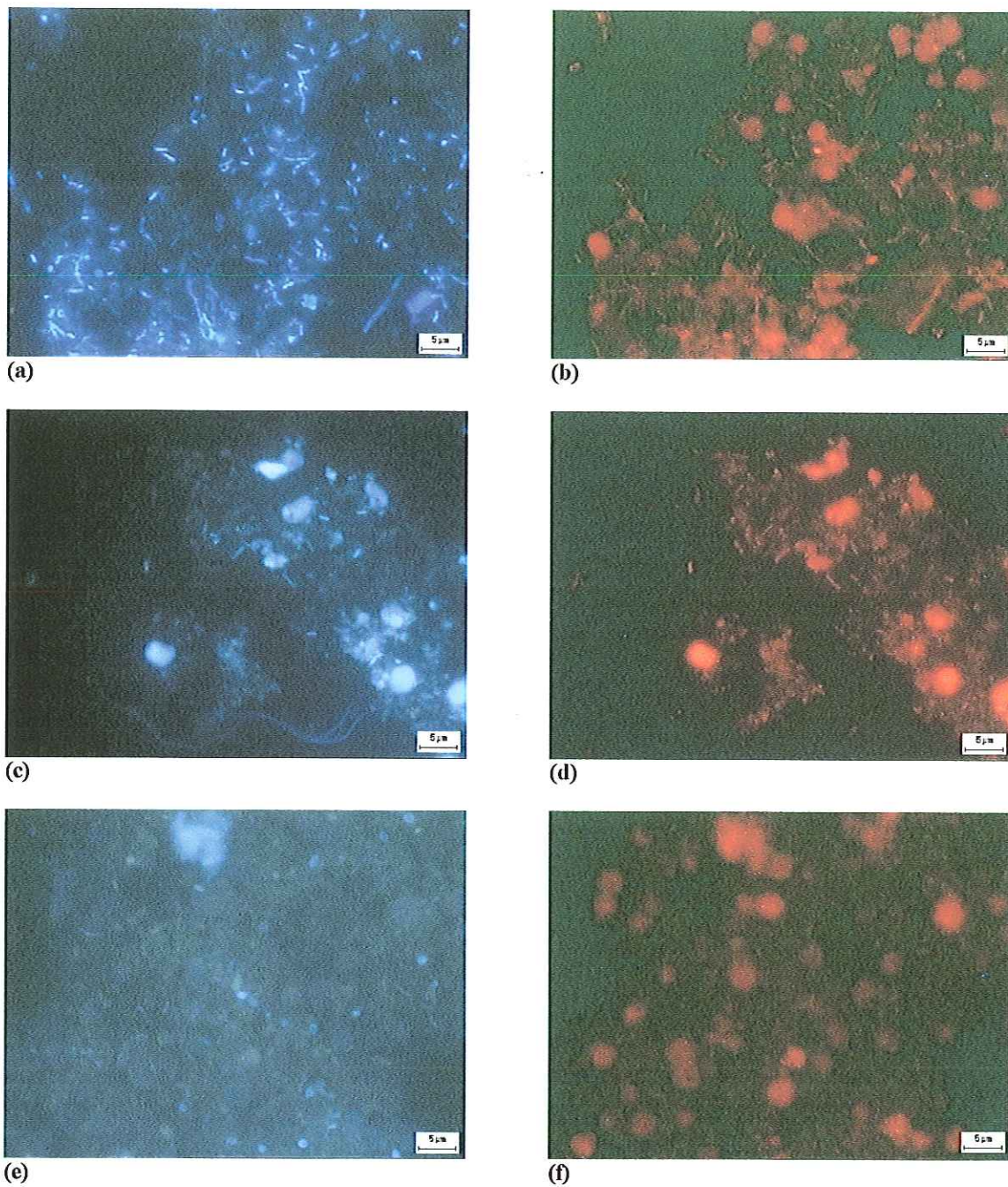


Figura 37. Hibridação de amostras do reator em batelada – acetato de sódio e sulfato de sódio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda EUB338, (c) coloração com DAPI, (d) bacilos com extremidades arredondadas hibridados com a sonda SRB385, (e) coloração com DAPI, (f) *Methanosarcina* sp. hibridada com a sonda ARC915.

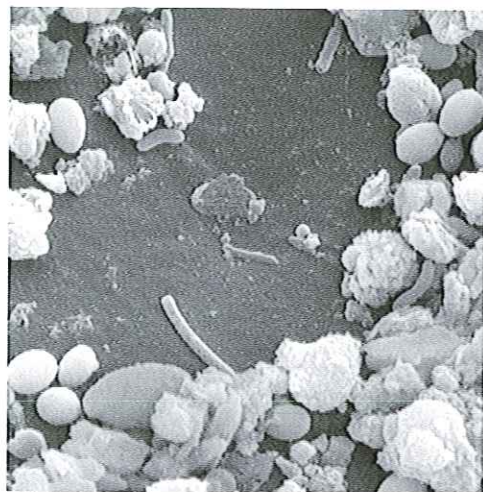
5.3.3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A formação e evolução do biofilme anaeróbio termofílico, em espumas de poliuretano, foram acompanhadas ao longo do tempo, nos quatro reatores alimentados com propionato e sulfato. Amostragens foram realizadas com 31, 55, 79,5, 103,5, 127,5 e 151,5 horas de operação.

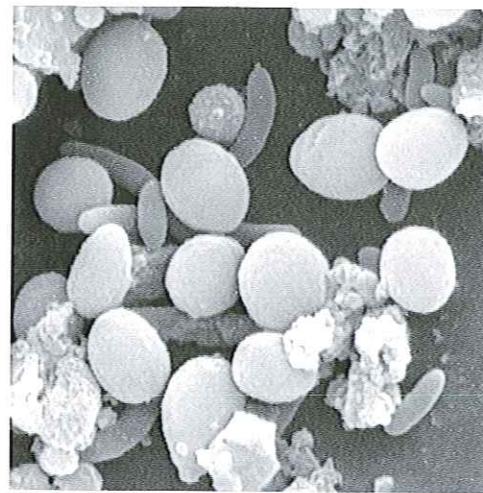
A caracterização morfológica, juntamente com os resultados obtidos em microscopia eletrônica de varredura, permitiu caracterizar o processo de colonização inicial das matrizes de poliuretano em reatores diferenciais alimentados com propionato e sulfato.

Sob tais condições, verificou-se apenas um tipo de colonização microbiana. Inicialmente, com 31 e 55 horas de operação, bacilos com extremidades afiladas, bacilos com extremidades arredondadas, alguns bacilos curvos e esporos formaram agrupamentos celulares. Com 21,4 horas de operação, verificou-se que os bacilos com extremidades afiladas estavam aderidos ao suporte, por polímeros extracelulares. Com 21,4 e 44 horas de operação, foram observados bacilos com extremidade afilada, bacilos em cadeia e esporos aderidos de maneira dispersa na espuma, além de agregados celulares. Finalmente, com 55 horas de operação, foram visualizados apenas agregados celulares. As morfologias observadas estão apresentadas na Figura 38.

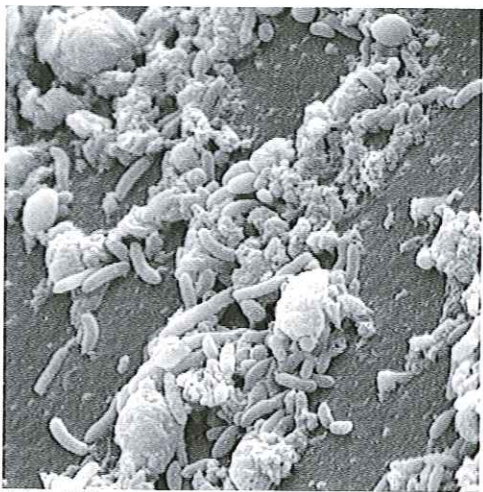
Os morfotipos presentes neste ensaio, verificados através de MEV, foram diferentes daqueles observados para o ensaio com acetato e sulfato.



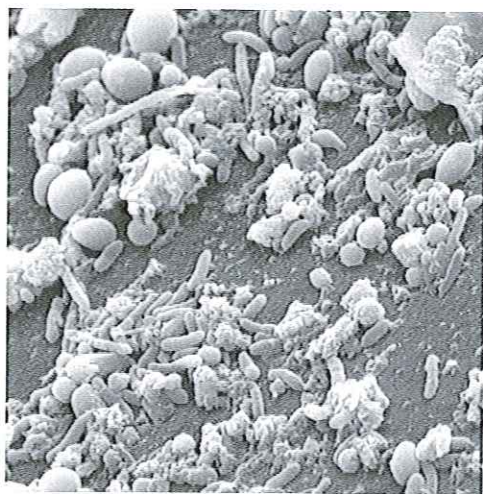
(a) 5.000x



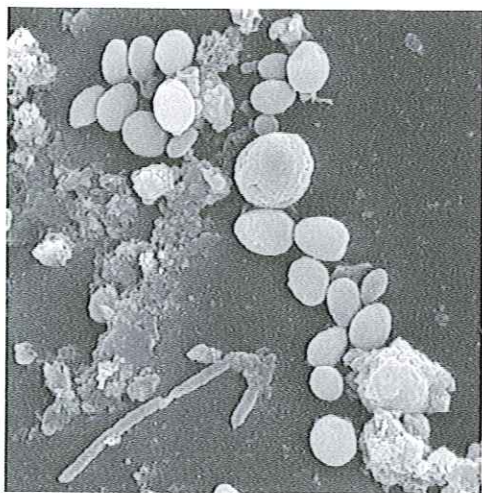
(b) 10.000x



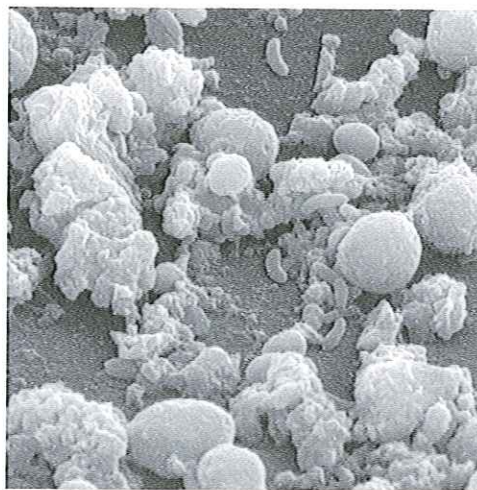
(c) 5.000x



(d) 5.000x

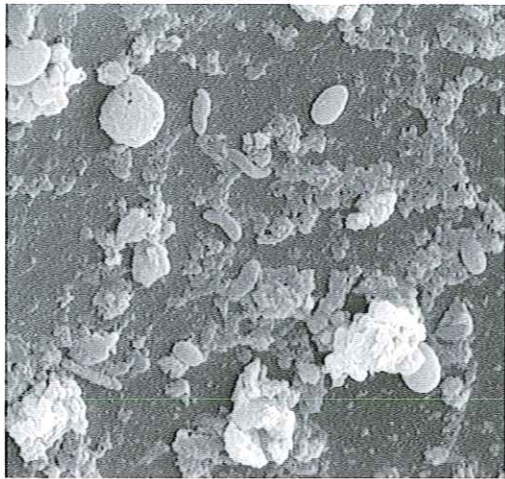


(e) 5.000x

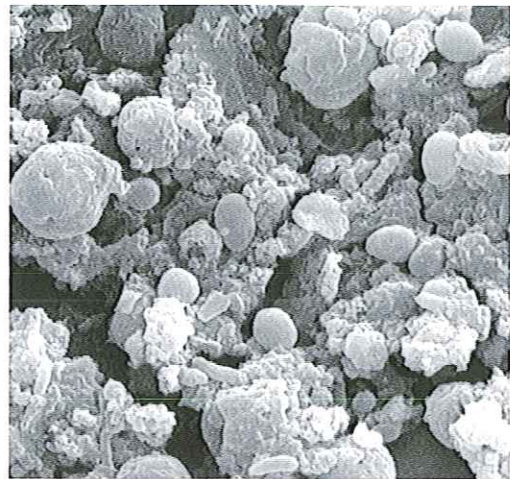


(f) 5.000x

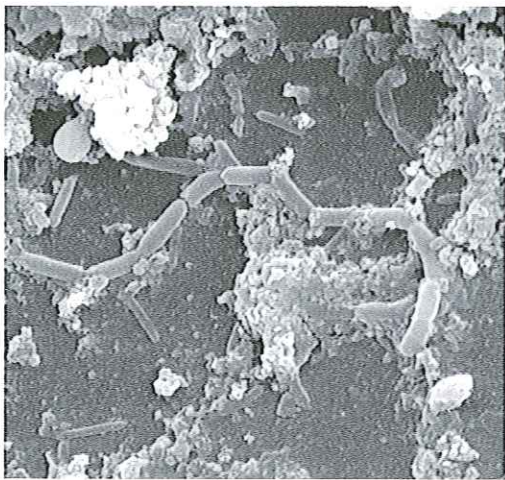
Figura 38. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo propionato de sódio e sulfato de sódio – (a) célula semelhante a *Methanosaeta* sp., (b) bacilos com extremidades afiladas, (c) e (d) agregados celulares, (e) bacilo em cadeia, (f) bacilos curvos.



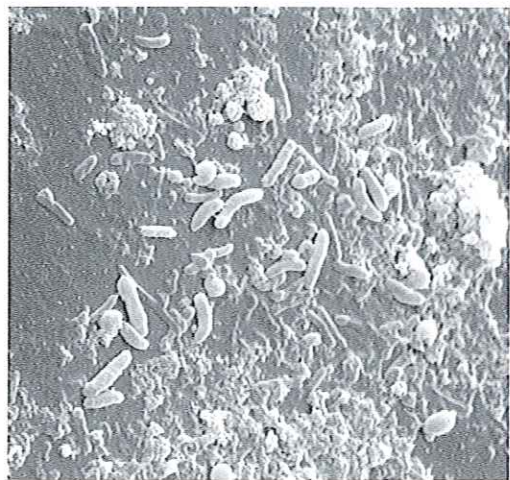
(g)



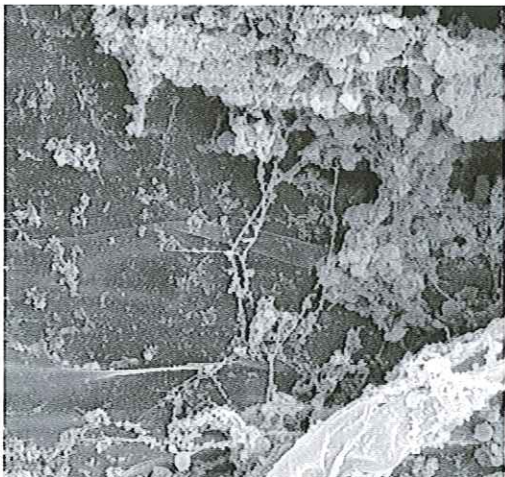
(h)



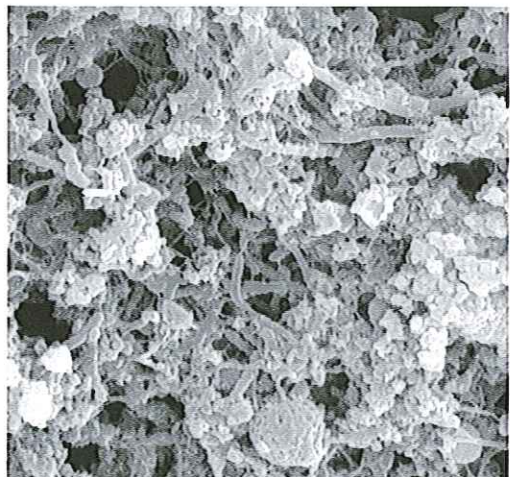
(i)



(j)



(k)



(l)

Continuação da Figura 38. Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) no reator diferencial contendo propionato de sódio e sulfato de sódio – (g) e (h) agregados celulares, (i) bacilos em cadeia, (j) bacilos curvos, (k) microgrânulos, (l) agregados celulares.

6. CONCLUSÕES

CONCLUSÃO GERAL

O tipo de crescimento celular, planctônico ou aderido, e os substratos orgânicos, na presença de sulfato, foram seletivos para o desenvolvimento de bactérias anaeróbias utilizadoras de acetato, lactato e propionato, bactérias redutoras do íon sulfato e arqueas metanogênicas.

CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

CONDIÇÃO NUTRICIONAL: ACETATO DE SÓDIO E SULFATO DE SÓDIO

- No reator em batelada, verificou-se certo equilíbrio entre metanogênese, sulfetogênese e oxidação do acetato. No reator diferencial ocorreu principalmente a metanogênese e a oxidação do acetato;
- Os resultados do FISH mostraram que nos reatores em batelada, houve predomínio de arqueas metanogênicas em relação às bactérias anaeróbias utilizadoras de acetato, lactato e propionato e redutoras do íon sulfato. No reator diferencial verificou-se comportamento inverso, ou seja, concentrações maiores de bactérias anaeróbias;
- Nos reatores em batelada houve predomínio de *Methanosarcina* sp., bacilos fluorescentes, bacilos oxidadores de acetato e *Desulfotomaculum* sp. Nos reatores em batelada houve predomínio de *Methanosaeta* sp. e bacilos oxidadores de acetato.



CONDIÇÃO NUTRICIONAL: LACTATO DE SÓDIO E SULFATO DE SÓDIO

- Nos reatores em batelada e diferenciais, o principal tipo de metabolismo foi a sulfetogênese;
- Os resultados do FISH, em ambos os reatores, mostraram que a maior proporção de bactérias anaeróbias foram relacionadas com as BRS;
- Em ambos os sistemas houve o predomínio de células semelhantes a *Desulfotomaculum* sp. e bacilos metanogênicos hidrogenotróficos.

CONDIÇÃO NUTRICIONAL: PROPIONATO DE SÓDIO E SULFATO DE SÓDIO

- Nos reatores em batelada, não houve degradação do substrato orgânico estudado e da fonte de enxofre. Nos reatores diferenciais ocorreu fermentação do substrato orgânico por culturas sintróficas;
- Nessa condição, a presença de material precipitado, partículas inorgânicas e polímeros extracelulares interferiram na quantificação celular pela técnica do FISH;
- No reator diferencial predominaram as bactérias oxidadoras sintróficas de propionato, bacilos metanogênicos fluorescentes e BRS hidrogenotróficas;

QUANTIFICAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO NMP.

- A contagem das células microbianas, nas condições estudadas, revelou maior crescimento de bactérias anaeróbias utilizadoras de lactato de sódio e sulfato de sódio ($10^{11} - 10^{12}$), seguidas das utilizadoras de acetato de sódio e sulfato de sódio ($10^{10} - 10^{11}$) e propionato de sódio e sulfato de sódio ($10^7 - 10^8$). Em relação as arqueas metanogênicas, as maiores concentrações celulares foram encontradas com acetato de sódio (10^4), seguidas das células em propionato de sódio (10^3) e lactato de sódio (10^2), na presença de sulfato, respectivamente.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Quantificar as BRS Gram-positivas, as oxidadoras de acetato e as oxidadoras de propionato, com sondas específicas pela técnica de FISH;
- Isolar, caracterizar nutricional e filogeneticamente as bactérias oxidadoras de acetato e as sintróficas oxidadoras de propionato.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, D.S. (1998). *Desnitrificação e caracterização filogenética das bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas no hipolímio do lago Kizaki, Japão*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ALVES, M.M.; PEREIRA, M.A.; NOVAIS, J.M.; POLANCO, F.F.; MOTA, M. (1999). A new device to select microcarriers for biomass immobilization: application to an anaerobic consortium. *Water Environment Research*, 71: 209 – 217.
- AMANN, R.I.; BINDER, B.G.; OLSON, R.J.; CHRISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-target oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, 56:1919 – 1925.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143 – 169.
- AMANN, R.I.; STROMLEY, J.; DEVEREUX, R.; KEY, R.; STAHL, D.A. (1992). Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 58: 614 – 623.
- APHA, AWWA, WPCF (1995). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 16^a ed., American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, USA.
- ARAÚJO, J.C. (1994). *Acompanhamento da evolução do biofilme e caracterização química e biológica em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário sintético*.

- Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ARAÚJO, J.C. (2001). *Biofilmes anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação in situ com sondas fluorescentes*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- BAK, A.F.; WIDDEL, F. (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Applied Environmental Microbiology*, 156: 5 – 14.
- BALCH, W.E.; FOX, G.E.; MAGRUM, L.F. WOESE, C.R.; WOLFE, R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiology Review*, 43: 260 - 296.
- BANAT, I.M; NEDWELL, D.B. (1983). Mechanisms of turnover of C₂-C₄ fatty acids in high-sulphate and low-sulphate anaerobic sediments. *FEMS Microbiology Letters*, 17: 107 – 110.
- BLAUT, M. (1994). *Metabolism of methanogens*. Antonie von Leeuwenhock, 66: 187 – 208.
- BROSIUS, J.; DULL, T.L.; SLEETER, D.D.; NOLLER, H.F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal Molecular Biology*, 48: 107 – 127.
- BUISMAN, C.J.N.; IJSPEERT, P.; HOL, A.; JANSSEN, A.J.H.; TEN HAGEN, R.; LETTINGA, G. (1990). Optimization of sulphur production in a biotechnological sulphide removing reactor. *Biotechnology. Bioengineering*, 35: 813 - 828.
- CADAVID, D.L.E. (1997). *Avaliação do efeito da relação DQO/Sulfato no desempenho do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) tratando substrato sintético*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R.F. (1999). *Biodiversidade do Estado de São Paulo: Microrganismos & Vírus*. São Paulo: FAPESP, p. 3 – 23.
- CASTRO, H.F.; WILLIAMS, N.H.; OGRAM, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 1 – 9.
- CHERNICHARO, C.A.L. (1997). *Reatores anaeróbios*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 5: 23 – 77.
- CHOI, E.; RIM, J.M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Science Technology*, 23: 1259.

- COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P. (1994). *Anaerobic treatment of sulfate-containing waste streams*. Department of Microbiology University College, Galway, Republic of Ireland.
- DEVEREUX, R.; KANE, M.D.; WILFREY, J.; STAHL, D.A. (1992). Genus and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Systematic Applied Microbiology*, 15 : 601 – 609.
- DODDEMA, H.J.; VOGELS, G.D. (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied Environmental Microbiology*, 36: 752 - 754.
- DUBOURGUIER, H.C.; BUISSON, M.N.; TISSIER, J.P.; PRENSIER G.; ALBAGNAC, G. (1987). *Structural characteristics and metabolic activities of granular anaerobic sludge on a mixed difined substrate*. In: Granular anaerobic sludge; Microbiology and technology, Proceedings of the GASTMAT - workshop. Pudoc, Netherlands, 78 - 86.
- EHLINGER, F.; AUDIC, J.M.; FAUP, G.M. (1987). Relationship between the concentration of acetate in the feed and the composition of a biofilm in an anaerobics filter. *Environmental Technology Letters*, 8: 197 - 207.
- FATIBELLO, S.H.S.A. (2001). *Avaliação da atividade microbiana anaeróbia de sedimento lacustre e de lodos de um biodigestor anaeróbio termofílico na degradação de tricloroetileno (TCE)*. Dissertação de Mestrado. Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada. EESC. Universidade de São Paulo.
- FIEBIG, K.; GOTTSCHALCK, G. (1983). Methanogenesis from choline by a coculture of *Desulfovibrio* sp. and *Methanosarcina barkeri*. *Applied Environmental Microbiology*, 45: 161 – 168
- FLETCHER, M. (1977). The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal Microbiology*, 23: 1 - 6.
- FURUZAKI, S.; NISHIO, N.; NAGAI, S. (1990). Kinetics of the methanogenic fermentation of acetate. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 3158 – 3163.
- FYNN, G.H.; WHITMORE, T.N. (1984). Retention of methanogens in colonized reticulated polyurethane foam biomass support particle. *Biotechnology Letters*, 6: 81 – 86.
- GIJZEN, H.J.; SCHOENMAKERS, T.J.M., CAERTELING, C.G.M.; VOGELS, G.D. (1988). Anaerobic degradation of papermill sludge in a two-fase digester containig rumen microorganisms and polyurethane foam. *Biotechnology Letters*, 10: 61 – 66.

- GUPTA, A.; FLORA, J.R.V; GUPTA, M.; SAYLES, G.D.; SUIDAN, M.T. (1994). Methanogenesis and sulfate reduction in chemostats - I. Kinetic studies and experiments. *Water Research*, 28: 781 - 793.
- HAHN, D.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; AKKERMANS, A.D.L.; SCHLEIFER, K.H. (1992). Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA target, fluorescent labeled oligonucleotides. *Journal Genetic Microbiology*, 38: 879 - 887.
- HANSEN, A.T. (1994). *Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes*. Antonie van Leeuwenhoek, 66: 165 - 185.
- HANSEN, J.S.; WESTERMANN, P. AHRING, B.K. (1999). Kinetics of sulfate and hydrogen uptake by the thermophilic sulfate-reducing bacteria *Thermodesulfobacterium* sp. strain JSP and *Thermodesulfovibrio* sp strain R1Ha3. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 1304 - 1307.
- HARMSSEN, H.J.M.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M.; WILLEN, M. (1996b). Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 2163 - 2168.
- HARMSSEN, H.J.M.; KENGEN, H.M.P; AKKERMANS, A.D.L. (1996a). Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by *in situ* hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 1656 - 1663.
- HARMSSEN, H.J.M.; KUIJK, B.; PLUGGE, C.M.; AKKERMANS, A.D.L.; De VOS, W. M.; STAMS, A.J.M. (1998). *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. *International Journal Systematic Bacteriology*, 48: 1383 - 1387.
- HATTORI, S.; KAMAGATA, Y.; HANADA, S. (2000). *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 50: 1601 - 1609.
- HUYSMAN, P.; MEENEM, P. van; ASSCHE, P. van; VERSTRAET, W. (1993). Factors affecting the colonization of non porous and porous packing material in model upflow methane reactors. *Biotechnology Letters*, 5 : 643 - 648.

- JETTEN, M.S.M.; STAMS, A.J.M.; ZEHNDER, A.J.B. (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenu* and *Methanosarcina* sp. *FEMS Microbiology Review*, 88: 181 – 198.
- JONES, W.J.; WAGLE, D.P.; WHITMAN, W.B. (1987). Methanogens and the diversity of Archaeobacteria. *Microbiological Reviews*, 51: 135 – 177.
- KATO, M.T.; ANDRADE, C.O.; CHERNICHARO, C.A.L.; FORESTI, E.; CYBIS, L.F. (1999). *Configurações de reatores anaeróbios*. In: Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro, PROSAB, 3: 53 – 99.
- KAMAGATA, Y.; MIKAMI, E. (1991). Isolation and characterization of a novel thermophilic *Methanosaeta* strain. *International Journal Systematic Bacteriology*, 41: 191 – 196.
- KARHADKAR, P.P. (1987). Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Water Research*, 21: 1061 – 1066.
- KOSTER, I.W.; RIZEMA, A.; VEGT, A.L.; LETTINGA, G (1986). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH-levels. *Water Research*, 20: 1561 – 1567.
- LAANBROEK, H.J.; ABEE, T. VOOGD, I.L. (1982). Alcohol conversions by *Desulfobulbus propionicus* in the presence and absence of sulfate and hydrogen. *Archives Microbiology*, 133, 178 – 184.
- LAANBROEK, H.J.; GEERLIGS, H.J.; SIJTSMA, L.; VELDKAMP, H. (1984). Competition for sulphate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 47: 329 – 334.
- LAANBROEK, H.J.; PFENNIG, N. (1981). Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Archives Microbiology*, 128: 330- 335.
- LAZAROVA, V.; MANEM, J. (1995). Biofilm characterization an activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29: 2227 - 2245.
- LETTINGA, G.; LENS, P.N.L.; VISSER, A.; JANSSEN, A.J.H. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Environmental Science Technology*, 28: 41 - 88.
- LOWE, S.E.; MAHENDRA, K.J.; ZEIKUS, J.G. (1993). Biology, ecology and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiology Review*, 57: 451 – 496.

- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms*. 8ª Ed. New Jersey, Prentice-Hall. p: 606 – 768.
- MADIGAN, M.T.; BROCK, T.D. (1997). *Cell biology*. In: *Biology of microorganisms*. 5a. ed., New Jersey, Prentice Hall, EUA. 986 p.
- MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; LILBURN, T.G.; PARKER, J.; SAXMAN, P.R.; TIEDJE, J. M. (2000). The RDP (Ribosomal database Project) continues. *Nucleic Acid Research*, 28: 173 – 174.
- MANZ (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Protobacteria: problems and solutions. *Systematic Applied Microbiology*, 15: 593 – 600.
- MANZ, W.; EISENBRECHER, M.; NEU, R.; SZEWZYK, U. (1988). Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*, 25: 43 – 61.
- MARSHALL, C.; FRENZEL, P.; CYPIONKA, H. (1993). Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Archives Microbiology*, 159: 168 – 173.
- McCARTNEY, D.M.; OLESZKIEWICZ, J.A. (1991). Sulfide inhibition anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Research*, 25: 203 - 209.
- McCARTNEY, D.M.; OLESZKIEWICZ, J.A. (1993). Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD: sulfate ratio and climation. *Water Environmental Research*, 65: 655 - 664.
- McINERNEY, J.M; BRYANT, M.P. (1981). Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Metahmosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 346 – 354.
- MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. (1985). *Methanosphaera stadtmanii* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives Microbiology*, 141: 116 – 122.
- MORAES, E.M.; ADORNO, A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2000). *Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos*. VI Oficina e Seminário Latino Americano de Digestão Anaeróbia, Recife, volume II: 235 – 238.

- NATION, J.L. (1983). A new method using hexamethyldisilane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Staining Technology*, 58: 347 – 351.
- OKABE, S.; YASUDA, T.; WATANABE, Y. (1997). Uptake and release of inert fluorescence particles by mixed population biofilms. *Biotechnology Bioengineering*, 53: 459 – 469.
- OLLIVIER, B. CAUMETTE, P. GARCIA, J.L.; MAH, R.A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiological Reviews*, 58: 27 – 38.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H., VISSER, A.; HULSHOFF, L. W.; STAMS, A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Review*, 15: 119 – 136.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VORSTMAN, W.J.C.; SOPJES, A.; STAMS, A.J.M. (1998). Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale reactor treating papermill wastewater. *Microbiology Ecology*, 27: 185 – 194.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; MAAS, R.N.; HARMSSEN, H.J.M.; STAMS, A.J.M. (1995). *Desulfohabdus amnigenus* gen. nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge. *Archives Microbiology*, 164: 119 – 124.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; RINIA, H.A.; BRUINS, M.E.; de Vos, W.M.; STAMS, A.J.M. (1997). Detection and quantification of *Desulforhabdus amnigenus* in anaerobic granular sludge by dot blot hybridization and PCR amplification. *Journal Applied Microbiology*, 83 : 102 – 110.
- PIKUTA, E.; LYSENKO, A.; SUZINA, N.; OSIPOV, G.; KUZNETSOV, B.; TOUROVA, T.; AKIMENKO, V.; LAURINAVICHIOUS, B. (2000). *Desulfotomaculum alkaliphilum* sp. nov., a new alkaliphic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 50: 25 – 33.
- PLAS, C.; HARANT, H.; DANNER, H.; JELINEK, E.; WIMMER, K.; HOLUBAR, P. & BRAUN, R. (1992). Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colorless sulphur bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 36 : 817 – 822.
- POSTGATE, J.R. (1979). *The sulphate-reducing bacteria*. Cambridge University Press. 145p.
- POSTGATE, J.R. (1984). *The sulfate-reducing bacteria*. 2nd ed. Cambridge University press. Cambridge.

- POULSEN, L.K.; BALLARD, G.; STAHL, D.A. (1993). Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of a single cells in young and stablished biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 1354 – 1360.
- QATIBI, A.I.; BORIES, A.; GARCIA, J.L. (1991). Sulfate reduction and glycerol degradation by a mixed microbial culture. *Current Microbiology*, 22: 47 –52.
- RAMSING, N.B.; FOSSING, H.; FERDELMAN, T.G.; ANDERSEN, F.; THAMDRUP, B. (1996). Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 1391 – 1404.
- RASKIN, L.; POUSEN, L.K.; NOGUERA, D.R.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994b). Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 1241 – 1248.
- RASKIN, L.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D. A. (1996) Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 3847 – 3857.
- RASKIN, L.; STROMLEY, J.M.; RITTMAN, B. E.; STAHL, D.A. (1994a). Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 1232 – 1240.
- RIBEIRO, R. (2001). *Influência do tipo de substrato na dinâmica de formação do biofilme em matrizes de espumas de poliuretano*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- ROUXHET, P.G.; MOZES, N. (1990). Physical chemistry of the interface between attached microorganisms and their support. *Water Science Technolology*, 22: 1- 16.
- SANTEGOEDS, C.; DAMGAARD, L.R.; HESSELINK, G.; ZOPFI, J.; LENS, P.; MUYSER, G.; de BEER, D. (1999). Distribution of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensor and molecular analyses. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 4618 – 4629.
- SANTEGOEDS, C.; FERDELMAN, T.G.; MUYSER. (1998). Structural and functional of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 3731 – 3739.
- SCHAUDER, R.; KRÖGER, A. (1993). Bacterial sulphur respiration. *Archives Microbiology*, 159: 491 - 497.

- SCHNURER, A.; HOUWEN, F.P.; SVENSSON, B.H. (1994). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration. *Archives Microbiology*, 162: 70 – 74.
- SCHNÜRER, A.; SCHINCK, B; SVENSSON, B.H. (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International Journal Systematic Bacteriology*, 46: 1145-1152.
- SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. (1999). Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-target oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 1280 – 1288.
- SHREVE, G.S.; OLSEN, R.H.; VOGEL, T.M. (1991). Development of pure culture biofilms of *P. putida* on solid supports. *Biotechnology Bioengineering*, 37: 512 - 518.
- SILVA, A.J. (1999). *Remoção de sulfato de água residuária industrial utilizando reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- SOWERS, K.R. (1995). *Methanogenic Archaea: an overview*. In: SOWERS, K. R.; SCHREIER, H. J. (eds.). *Archaea – a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p: 3 – 13.
- SPEECE, R.E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archea Press. Nashville. Tennessee. 393 p.
- SPEITEL, G.E; Di GIANO, F.A. (1987). Biofilm shearing under dynamic conditions. *Journal Environmental Engineering*, 113: 464 - 475.
- STAHL, D.A.; AMANN, R.I. (1991). *Development and application of nucleic acid probes*. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. eds., *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, v. 8. John Wiley & Sons, Ltd., London, England p. 207 – 248.
- STAMS, A.J.M.; HANSEN, T.A. SKYRING, G.W. (1985). Utilization of amino acids as energy substrats by two marine *Desulfovibrio* strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 11 – 15.
- STAMS, A.J.M.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H. (1997). Understanding and advancing wastewater treatment. *Curr. Opin. Biotechnology*, 8: 328 - 334.
- STAMS, A.J.M. (1994). *Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments*. *Antonie Leeuwenhoek*. 66 : 271 – 294.

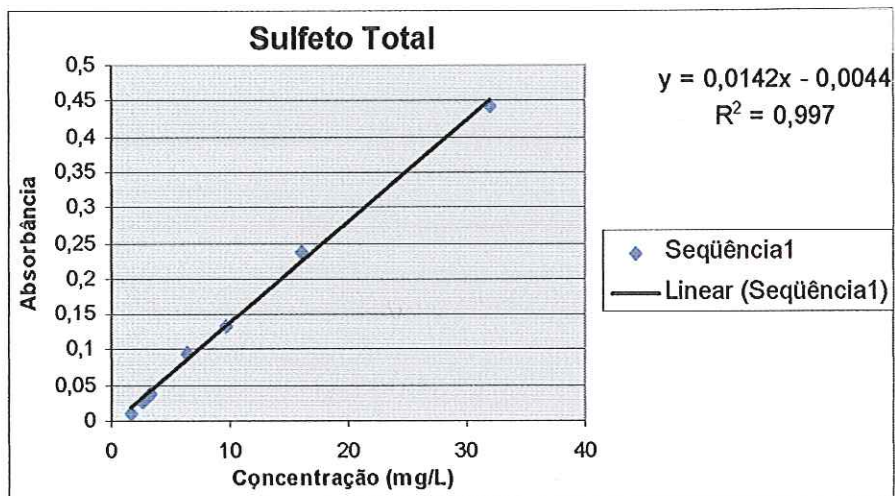
- STAMS, A.J.M.; HANSEN, T.A.; SKYRING, G.W. (1995). Utilization of amino acids as energy substrats by two marine *Desulfovibrio* strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 11 – 15.
- TANAKA, K. (1992). Anaerobic oxidation of 1,5-pentanediol, 2-butanol, and 2-propanol by a newly isolated sulfate-reducer. *Journal Ferment. Bioengineering*, 73: 362 – 365.
- TEHL, M. (2001). *Avaliação do uso de reator anaeróbio horizontal de leito fixo no tratamento de vinhaça sob condições termofílicas*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- TOMMASO, G. (1999). *Estrutura, caracterização e cinética de lodo aneróbio, imobilizado em espumas de poliuretano, tratando substrato sintético contendo proteína como única fonte de carbono*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- TOUZEL, J.P.; PRENSIER, G.; ROUSTAN, J.L.; THOMAS, I.; DUBOURGUIER, H.C.; ALBAGNAC, G. (1988). Description of a new strain of *Methanotrix soehngenii* and rejection of *Methanotrix concilii* as a synonym of *Methanotrix soehngenii*. *International. Journal Systematic Bacteriology*, 38: 30 – 36.
- TOUZEL, J.P.; PETROFF, D.; ALBAGNAC, G. (1985). Isolation and characterization of a new termophilic *Methanosarcina*, the strain CHTI 55. *Systematic Applied Microbiology*, 6: 66 – 71.
- TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*, 16: 241 – 245.
- TRAORE, A.S.; FARDEAU, M.L.; HATCHIKIAN, C.E.; Le GALL, J.; BELAICH, J.P. (1983). Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkerii*: interespecies hydrogen transfer in batch and continuous cultures. *Applied Environmental Microbiology*, 46: 1152 – 1156.
- VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. (1997). Microbial colonization of polyurethane from matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 48: 534 – 538.
- VARESCHE, M.B.; FATIBELLO, S.H.; VAZOLLER, R.F. (2000). *Quantificação da biomassa de um biorreator anaeróbio termofílico utilizando a técnica do NMP com diferentes substratos orgânicos e sulfato*. VI Oficina e Seminário Latino Americano de Digestão Anaeróbia, Recife, volume II: 97 – 100.

- VAZOLLER, R.F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operando com vinhaça sob condições termofílicas*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VISSER A.; BEEKSMA, I.; VAN DER ZEE, F.; STAMS, A.J.M.; LETTINGA, G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Applied Microbiology Biotechnology*, 40: 549 - 556
- VISSER, A.; Y. GAO; LETTINGA, G. (1992). Anaerobic treatment of synthetic sulfate-containing wastewater under thermophilic conditions. *Water Science Technology*, 25: 193 – 202.
- VOORDOUW, G. (1995). Minireview: the genus *Desulfovibrio* – the centennial. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 2813 – 2819.
- WALLRABENSTEIN, C.; HAUSCHILD, C.; SCHINK, B. (1995). *Syntrophobacter pfennigii* sp. nov., new syntrophically propionate-oxidizing anaerobe growing in pure culture with propionate and sulfate. *Archives Microbiology*, 164: 364 – 352.
- WASSERFALEN, A.; NOLLING, J.; PFISTER, P.; REEVE, J.; de MACARIO, E. C. (2000). Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* com. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. . *International Journal Systematic Bacteriology*, 50: 43 – 53.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182: 2675 – 2679.
- WIDDEL, F. (1992). *The genus Desulfotomaculum*. In: *The Prokariotes*. 2nd ed. Springer Verlag. New York., p. 1792 – 1799.
- WIDDEL, F. (1998). *Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria*. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. Ed. Alexander J.B. ZEHNDER, John Wiley & Sons, Inc., EUA, 469 - 586.
- WIDDEL, F.; BAK, F. (1992). *Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria*. In: *The Prokariotes. Handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* (Balows, A.; Truper, H. G., Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.H.). 2nd Ed. pp 3352 – 3378. Springer-Verlag, New York.
- WIDDEL, F.; HANSEN, T. A. (1992). *The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria*. In: *The Prokariotes*. 2nd ed. Springer Verlag. New York., p. 583 – 624.

- WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1981). Studies of dissimilatory sulfate reducing-bacteria that decompose fatty acids I. Isolation of a new sulfate reducing-bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Archives Microbiology*, 129: 395 – 400.
- WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1982). Studies of dissimilatory sulfate reducing-bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Archives Microbiology*, 131: 360 – 365.
- WIDDEL, F.; PFENNIG, N. (1984). *Dissimilatory sulfate or sulfur reducing bacteria*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed(s) KRIEG, N. R.; HOLT, J. G., 1: 663 – 679.
- WOESE, C.R.; GUPTA, R.; HAHN, C.M.; ZILLIG, W.; TU, J. (1984). The phylogenetic relationship of three sulfur dependent archaeobacteria. *Systematic Applied Microbiology*, 5: 97 – 105.
- WU, W-M; HICKEY, R.F.; ZEIKUS, J.G. (1991). Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater. Role of sulfate-reducing bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 57 : 3438 - 3449.
- WU, W-M; JAIN, M.; CONWAY de MACARIO, E.; THIELE, J.H.; ZEIKUS, J.G. (1992). Microbiol composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Applied Microbiology Biotechnology*, 38 : 282 - 290.
- ZAIAT, M. (1996). *Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias*. São Carlos. Tese Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. (1996). Cell wash out and external mass transfer resistance in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Water Research*, 30: 2435 – 2439.
- ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; FORESTI, E. (1997). Spatial and temporal variations in monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Water Research*, 31: 1760 – 1766.
- ZEHNDER, A.J.B.; INGVORSEN, K.; MARTI, T. (1982). *Microbiology of methane bacteria*. In: HUGHES *et al.* (eds). *Anaerobic Digestion*, 1981. Elsevier Biomedical Press B. V., p: 45 – 68.

- ZELLNER, G.; DIEKMANN, H.; AUSTERMANN-HAUN, U.; BAUMGARTEN, G.; SEYFRIED, C-F. (1993). Biofilm formation on polypropylene during start-up of anaerobic fixed-bed reactors. *Biofouling*, 6 : 345 - 361
- ZHAO, Y.; ZHANG, H.; BOONE, D.R.; MAH, A.R. (1986). Isolation and characterization of a fast-growing, thermophilic *Methanobacterium* species. *Applied Environmental Microbiology*, 52 (5): 1227 – 1229.
- ZHILINA, T.N.; ILARIONOV, S.A. (1984). Characteristics of formate-assimilating
- ZINDER S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester. *Methanotrix* sp. as an important acetoclastic methanogen. *Applied Environmental Microbiology*, 47: 796 – 807.
- ZINDER, S.H. (1993). *Physiological ecology of methanogens*. In: Ferry, J. G. Ed. Chapman & Hall, New York. p: 128 – 206.
- ZINDER, S.H. (1994). Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane. *ASM News*, 50: 264 –268.
- ZINDER, S.H.; KOCH, M. (1994). Non acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic co-culture. *Archives Microbiology*, 138: 263 – 272.

Anexo 1 - Curva de calibração para Sulfeto Total



Anexo 2 - Acetato e Sulfato – Produção de metano.

Tempo (h)	Produção de metano (%)		
	Reator 1	Reator 2	Média
0	0	0	0
15,6	10,2	10,3	10,2
40,3	16,2	15,2	15,7
111,0	28,0	30,1	29,0
137,6	37,5	33,5	35,5
161,0	46,7	42,2	44,5
185,0	54,8	51,8	53,3
209,8	64,5	61,1	62,8
281,5	70,9	72,8	71,9
305,3	66,8	65,7	66,3
328,8	65,4	63,7	64,6
375,8	63,9	62,1	63,0
447,3	62,8	60,7	61,7
473,5	61,7	59,4	60,5
500,6	61,4	58,7	60,0

Anexo 3 - Acetato e Sulfato – Produção de metano (%).

Tempo (h)	Reator 1 Acetato/Sulfato (vitamina BRS)	Reator 2 Acetato (vitamina Dubougluier)	Média	Reator 3 Acetato/Sulfato (vitamina Dubougluier)	Média
0	0	0	0	0	0
24,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
48,0	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
73,2	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7
96,6	1,0	1,1	1,3	1,0	0,9
120,3	1,5	1,8	2,0	1,2	1,2
144,9	2,1	2,7	3,0	1,6	1,6
169,5	2,6	3,4	3,9	1,8	2,0
192,3	3,2	4,5	5,1	2,0	2,5
218,1	4,0	6,1	7,0	2,5	3,2
241,6	4,6	7,7	8,9	2,9	3,0
264,1	4,6	9,9	11,5	3,6	4,6
293,3	4,7	13,7	15,7	4,7	5,8
312,8	4,5	16,6	18,7	5,1	6,4
336,8	4,6	21,6	23,5	6,3	7,9
360,5	4,6	27,1	28,7	7,8	9,4
386,2	4,5	33,6	34,5	10,1	11,5

Tempo (h)	Reator 1 Acetato/Sulfato (vitamina BRS)		Reator 2 Acetato (vitamina Dubouquier)		Média	Reator 3 Acetato/Sulfato (vitamina Dubouquier)		Média
410,8	4,7	38,9	38,8	38,8	38,8	12,1	13,4	12,8
431,0	4,6	43,6	41,8	41,8	42,7	14,2	15,4	14,8
461,0		46,5	44,1	44,1	45,3	15,6	17,7	16,7
507,1		52,6	49,0	49,0	50,8	19,5	23,0	21,3
529,8		51,9	51,2	51,2	51,6	22,2	26,1	24,2
552,8		52,9	53,7	53,7	53,3	25,0	29,2	27,1
576,4		53,1	54,5	54,5	53,8	28,0	32,7	30,4
600,7		51,1	54,3	54,3	52,7	31,6	35,6	33,6
626,5		52,8	56,6	56,6	54,7	35,3	39,4	37,4
649,8		49,9	56,8	56,8	53,4	38,9	42,6	40,8
674,2		52,6	57,7	57,7	55,2	43,1	44,9	44,0
696,3		51,2	58,2	58,2	54,7	46,4	46,8	46,6
722,2		51,0	59,1	59,1	55,1	49,3	48,9	49,1
746,3		51,2	59,6	59,6	55,4	51,9	50,1	51,0
768,7		44,2	59,4	59,4	51,8	53,2	50,6	51,9

Anexo 4 - Acetato e Sulfato – Produção de metano.

Tempo (h)	Produção de metano (%)		
	Reator 1	Reator 2	Média
0	0	0	0
24,7	0	0,1	0,1
46,9	0,3	0,3	0,3
71,3	0,7	0,8	0,7
99,1	1,0	0,9	1,0
127,6	2,1	2,0	2,0
147,3	3,5	3,2	3,3
171,9	6,1	4,4	5,3
190,1	8,5	5,6	7,0
214,1	11,8	7,1	9,4
245,3	15,9	9,4	12,7
261,8	23,3	18,6	20,9
288,4	22,9	23,9	23,4
310,5	26,7	29,5	28,1
333,8	30,7	37,1	33,9
358,8	32,7	40,9	36,8
386,8	36,8	44,4	40,6
404,7	39,2	44,7	41,9
456,7	40,1	39,1	39,6
479,2	43,5	42,8	43,1
504,8	44,9	43,5	44,2
527,3	44,5	42,1	43,3
551,1	43,8	38,2	41,0
575,4	43,3	38,0	40,7
607,8	43,7	37,1	40,4

Anexo 5 – Valores obtidos na hidridação *in situ* com acetato e sulfato em reatores em batelada

Tempo (h)	EUB338		SRB385 % rel. a EUB		ARC915+MB1174		BRS385
							Média Total
0	41,03326	5,112897	21,72073	4,302469	52,95073	3,215093	52,93444
48	37,74029	7,865487	16,08496	4,832027	60,14873	3,600402	42,62014
192	38,72406	3,932015	12,10219	4,178279	57,74386	4,212733	31,25239
384	40,67435	3,886089	9,640845	3,548164	67,61897	4,562896	23,70252
528	41,54401	3,847862	13,35115	3,610636	51,51792	3,371934	32,13737

Anexo 6 – Valores obtidos na hidridação *in situ* com acetato e sulfato em reatores diferenciais

Tempo (h)	EUB338		SRB385 % rel. a EUB		ARC915+MB1174		BRS385
							Média Total
0	57,07755	4,2405391	21,70971	2,884228	45,52547	3,843103	38,03546
24	56,13901	3,3538495	23,74525	3,865472	37,38724	3,537569	42,29724
72	60,89025	3,0099181	12,83602	1,95976	37,95709	2,38383	21,08058
120	65,85443	3,5363456	14,09726	2,314476	32,24934	2,168591	21,40669
168	69,08354	3,9381905	12,16972	2,517911	30,30619	2,962059	17,61595

Anexo 7 – Valores obtidos na hidridação *in situ* com lactato e sulfato em reatores em batelada

Tempo (h)	EUB338		SRB385 % rel. a EUB		BRS385
					Média Total
9	82,63245	2,672735	66,44179	2,372748	80,40641
21,4	80,83313	1,543501	56,35952	7,122486	69,7233
28	80,32027	1,738694	66,03163	5,680973	82,21043
44	80,71634	2,058746	67,38821	2,476616	83,4877

Anexo 8 – Valores obtidos na hidridação *in situ* com lactato e sulfato em reatores diferenciais

Tempo (h)	EUB338		SRB385 % rel. a EUB		BRS385
					Média Total
20	68,59873	4,154827	65,47814	1,031512	95,45095
28,5	86,2496	1,566584	81,70932	1,262138	94,73588
34,5	88,94057	1,262138	82,90388	1,291872	93,21267
43	86,31647	1,869172	79,07677	1,631261	91,61261