Campus de São Carlos

AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO
DO NÚMERO E ATIVIDADE DE MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS
PROCARBANTES EM AMOSTRAS DE BIORREATORES OPERADOS
PARA A ESTABILIZAÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS
PADRONIZADOS.

REGIANE CRISTINA CORRÊA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. ROSANA FILOMENA VAZOLLER

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
USP/SÃO PAULO**

*AValiação DE PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DO
NÚMERO E ATIVIDADE DE MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS
PROCARIONTES EM AMOSTRAS DE BIORREACTORES OPERADOS
PARA A ESTABILIZAÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS
PADRONIZADOS*

REGIANE CRISTINA CORRÊA

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de São Carlos da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em Hidráulica
e Saneamento.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. ROSANA FILOMENA VAZOLLER

São Carlos
1999

Class.	TESE-EESC
Curr.	1599
Tombo	0103/00

5/5 1084728

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

C824a

Corrêa, Regiane Cristina

Avaliação de procedimentos para determinação do número e atividade de microrganismos anaeróbios procariontes em amostras de biorreatores operados para a estabilização de resíduos sólidos urbanos padronizados / Regiane Cristina Corrêa. -- São Carlos, 1999.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1999.

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Rosana Filomena Vazoller.

1. Bactérias celulolíticas. 2. Resíduo sólido. 3. NMP.
I. Título.

Dedico este trabalho...

*Ao meu querido marido, companheiro e eterno
amor Paulinho, pelo constante incentivo e
inspiração...pela força e paciência...caminhando junto em
todos os momentos...*

*Aos nossos queridos filhos, Lucas, Carolina e
Paula, a maior fonte para a vida...por estarem sempre por
perto e me esperando, pela alegria proporcionada ...e
simplesmente, por existirem... nosso infinito e maior
amor...
e ao meu enteado Daniel*

*Aos meus queridos Pais Heyde e Juarez, pelo infinito amor
dedicado, pelos ensinamentos e consolidação da nossa
educação e caráter, sempre nos incentivando ao
conhecimento... o meu
MUITO OBRIGADA!!! ...A todos...*

*Não é um pequeno Deus
de finas mãos, de alma eleita
Como todo poeta é o que aceita
dores alheias quais penares seus*

*Não é aquele que se deita
A gozar raros himeneus
Mas o que de espinhos seus
traz à vida a flor perfeita.*

Paulo Gustavo Chiosi Campana (meu querido cunhado)

in memoriam.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rosana Filomena Vozoller, por acreditar em "nosso" trabalho, incentivando e possibilitando-me crescer, aprender e enriquecer o conhecimento. Muito obrigada!!!

À Prof^a. Dr^a Viviana Maria Zanta Baldochi pela orientação, incentivo e inestimável contribuição... Pela dedicação e empenho no desenvolvimento deste trabalho... Muito obrigada!

À Dr^a Maria Bernadete Varesche por todos os ensinamentos no laboratório e imprescindível colaboração neste trabalho... Por exigir o aprendizado seguro...e pela amizade.

À Engenheira Deíza M. C. L. Pinto por permitir a utilização do seu Resíduo Sólido Urbano Doméstico padrão, imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho, pela ajuda, ensinamentos e amizade.

Ao Professor Titular Eugênio Foresti pela valiosa contribuição e grande "visão anaeróbia".

À nossa Professora "Mãe" Bete Moraes pela inestimável ajuda nos cálculos em química, sempre muito prestativa e principalmente, pela sua amizade!

À Beth Baraldi, Silvana e Isabel (Bel, admiro muito a sua força e coragem!) pela força no laboratório e pela valiosa amizade, muito obrigada! E a todos que passaram pelo lab. dividindo espaço, conhecimento e amizade. A menina Angélica por permitir-me ampliar a rede de aprendizado.

A Eloísa e Janja pelo apoio técnico, pela ajuda e atenção, e é claro, pela amizade

A Juliana pela amizade, pelos ensinamentos na utilização do microscópio e pela hibridização de uma amostra de arqueas metanogênicas hidrogenotróficas do meu NMP.

Ao Cido pelo auxílio técnico prestado, sempre alerta! E pela amizade.

A todos os companheiros do Laboratório de Processos Anaeróbios (atual Laboratório de Processos Biológicos – enfim, o reconhecimento pela contribuição biológica) pela agradável companhia, tornando o ambiente de trabalho deveras bom! Gica, Didi, Ivana, Lida, Miki, Marcus, Nélia, Márcia, enfim, todos.

A Nélia Callado pela valiosa contribuição nas discussões a cerca do processo de biodegradação, pelo lodo granulado cedido, e pela amizade.

A Patrícia Louzada Torres pela amizade e por ter cedido o lodo granulado utilizado na Fase II deste trabalho, sem o qual os resultados poderiam ter sido muito diferentes.

Ao Professor Dr. Fazal pelo apoio e incentivo.

Ao amigo Sérgio Larizatti pelas fotos dos biorreatores.

A todos os amigos que passaram pela minha vida de mestrandia, Gica, Alê, Déa, Inês, Sil, Kátia, Fazolo, Ricardo, enfim, todos...

Ao pessoal da secretaria e recepção do Departamento SHS, Pavi, Sá e Rose pela atenção e gentileza sempre!

Ao pessoal da informática do IQSC pelo apoio técnico.

Ao CNPQ pela concessão da Bolsa de Mestrado e a Fapesp pelo financiamento do projeto.

Aqui, registro meu agradecimento especial aos familiares, que sempre acreditaram em meu trabalho e incentivaram-me: meus queridos irmãos, cunhados e sobrinhos, à madrastra Itália, e aos meus sogros (Vilma e Sérgio), por estarem sempre por perto! À Bete por cuidar da minha casa e dos filhotes, com carinho e paciência, enquanto precisei trabalhar.

E aos lindos bebês dos amigos que vieram à vida neste período tão importante.

SUMÁRIO

<i>SUMÁRIO</i>	<i>i</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>ii</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>vii</i>
<i>LISTA DE SÍMBOLOS</i>	<i>ix</i>
<i>RESUMO</i>	<i>x</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xi</i>
<i>1. INTRODUÇÃO</i>	<i>1</i>
<i>2. OBJETIVOS</i>	<i>6</i>
2.1 Objetivos gerais.....	6
2.2 Objetivos específicos	6
<i>3. REVISÃO DA LITERATURA</i>	<i>7</i>
3.1. Procedimentos e métodos para manipulação e identificação de microrganismos anaeróbios estritos	7
3.2 Preparação de amostras para enumeração de microrganismos.	13
3.3 Avaliação quantitativa de bactérias anaeróbias estritas pelo método do NMP - ênfase às bactérias fermentativas hidrolíticas/celulolíticas e às arqueas metanogênicas.	16
3.4 Biotratamento anaeróbio de resíduos sólidos domésticos - ênfase ao aterro sanitário.....	21
3.4.1 Aspectos termodinâmicos da biodigestão anaeróbia	24
3.4.2 Fatores ambientais importantes no processo de biodigestão anaeróbia	26
3.5 Aspectos da microbiologia da biodigestão anaeróbia de resíduos sólidos	27
3.5.1 Bactérias celulolíticas e arqueas metanogênicas em sistemas de tratamento anaeróbio de resíduos sólidos.....	32
<i>4. MATERIAIS E MÉTODOS</i>	<i>36</i>

4.1 Preparo do Resíduo Sólido Urbano Domiciliar Padrão da fase I	38
4.1.1 Composição do RSUDp	38
4.1.2 Coleta e preparação do Resíduo Sólido Urbano Domiciliar padrão (RSUDp).....	39
4.2 Preparação, operação e monitoramento dos biorreatores da fase I.....	39
4.3 Testes para avaliação do tratamento prévio mais adequado para avaliação	
quantitativa de células bacterianas das amostras de resíduos sólidos.....	40
4.3.1 Método adaptado de BARLAZ et al. (1989a, b)	41
4.3.2 Método adaptado de VILLAS-BÔAS (1990).....	41
4.3.3 Método do ultra-som adaptado de MÜNCH et al. (1997) e JORAND et al. (1995).	42
4.3.4 Avaliação quantitativa dos grupos microbianos celulolítico e metanogênico para os testes de	
adequação do método de tratamento prévio de amostras de resíduos sólidos – Método do NMP.	43
4.4 Preparação, operação e monitoramento dos biorreatores da fase II	45
4.4.1 Operação e monitoramento dos biorreatores da fase II.....	47
4.4.1.1 Alimentação dos biorreatores	47
4.4.1.2 Reinoculação dos biorreatores.....	47
4.4.1.3 Tamponamento dos biorreatores	48
4.4.1.4 Análises cromatográficas da produção de Metano e Dióxido de Carbono	48
4.4.1.5 Análise de Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis.....	48
4.4.1.6 Exames Microscópicos.....	49
4.4.1.7 Análise de ácidos orgânicos voláteis	49
4.4.1.8 Medidas dos valores de pH.....	50
4.5 Procedimentos para a avaliação quantitativa de grupos microbianos presentes	
nos biorreatores da fase II.....	50
4.5.1 Procedimentos para o tratamento das amostras de resíduos sólidos com ultra-som.	51
4.5.2 Procedimentos para análise quantitativa de bactérias celulolíticas	52
4.5.3 Análise quantitativa de bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas acetoclásticas e	
hidrogenotróficas.....	53
4.6 Composição e procedimentos para preparação de meios de cultura e soluções... 54	
4.7 Procedimentos para verificação dos tipos de arqueas metanogênicas através da	
aplicação de sondas de hibridização.....	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 Valores do biogás medidos nos biorreatores da fase I.	67
5.1.1 Avaliação dos três diferentes tratamentos das amostras de resíduos sólidos	72
5.2 Avaliação da decomposição anaeróbia nos biorreatores da fase II.....	86

5.2.1. Composição do biogás metano e dióxido de carbono nos biorreatores da fase II.....	87
5.2.2. Avaliação de outros parâmetros físico-químicos dos biorreatores da fase II.....	95
5.2.3. Caracterização morfológica dos tipos microbianos observados nos biorreatores 1 e 2 da fase II.	107
5.2.4 Resultados das leituras positivas do NMP dos frascos contendo celulose em pó para bactérias celulolíticas presentes no biorreator 1 da fase II.....	117
5.2.5 Resultados das leituras do NMP de bactérias acetogênicas e de arqueas metanogênicas presentes no biorreator 2 da fase II.....	134
5.2.5.1 Verificação dos tipos de arqueas metanogênicas através da aplicação de sondas de hibridização.	158
6. CONCLUSÕES.....	161
7. RECOMENDAÇÕES.....	164
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de energia livre de elétrons	9
Figura 2: Representação gráfica das relação da pressão parcial de hidrogênio e ΔG° com as respirações acetogênicas e inorgânicas.(1) ácido propiônico a acetato;(2) ácido butírico a acetato;(3) etanol a acetato; (4) ácido láctico a acetato; (5) respiração acetogênica de bicarbonato; (6) respiração metanogênica de bicarbonato; (7) respiração de sulfeto a sulfato; (8) respiração de sulfeto a sulfeto; (9) metanogênese do acetato; (10) oxidação de acetato pelas BRS. As concentrações são: acetato 25mM; ácidos propiônico, butírico, láctico e etanol 10mM; sulfato e sulfeto 5mM; bicarbonato 20mM; metano 0,7 atm. (FONTE: HARPER & POHLAND, 1986 apud FORESTI, 1994)	26
Figura 3: Principais reações na decomposição de polímeros complexos no processo biológico anaeróbio (Fonte: adaptado de PALMISANO & BARLAZ, 1996)	30
Figura 4: Esquema do processamento das diluições pela técnica do NMP	44
Figura 5: Biorreator contendo RSUDp inoculado com percolado (a)na fase inicial após a inoculação; (b)na fase final.....	46
Figura 6: Biorreator submetido a atmosfera de N_2/CO_2	51
Figura 7: Procedimentos do emprego do ultra-som.....	52
Figura 8:Evolução da composição do biogás, em porcentagem, do biorreator 1 da fase I.....	69
Figura 9: Evolução da composição do biogás, em porcentagem, do biorreator 2 da fase I.....	69
Figura 10:Evolução da composição do biogás, em porcentagem, do biorreator 3 da fase I	69
Figura 11: Representação gráfica dos valores de metano(mmoles) obtidos nos tubos de ensaio das leituras positivas do método de BARLAZ et al. (1989 a e b)	78
Figura 12: Representação gráfica dos valores de metano obtidos nos tubos de ensaio – Método de VILLAS-BÔAS (1990).....	79
Figura 13: Representação gráfica dos valores de metano obtidos nos tubos de ensaio – Método do ultra-som (MÜNCH et al., 1997 e JORAND et al., 1995).	80
Figura 14: Representação gráfica dos valores de metano obtidos nos tubos de ensaio das leituras positivas do NMP, nos três métodos estudados.	82
Figura 15: Fotomicrografias das morfologias celulares das três diferentes metodologias nos frascos de leitura do NMP na diluição 10^{-1} (a)BARLAZ; (b)VILLAS-BÔAS; (c)Ultra-som.	84
Figura 16: Representação gráfica da composição dos gases metano e dióxido de carbono ao longo do período de operação do biorreator 1 da fase II. = indica os pontos de abertura para retirada de amostra.	92
Figura 17: Representação gráfica dos valores da concentração de metano no biorreator 1 da fase II.	92
Figura 18: Representação gráfica da composição dos gases metano e dióxido de carbono ao longo do período de operação do biorreator 2 da fase II. = indica os pontos de aberturas do biorreator.....	94
Figura 19: Representação gráfica dos valores da concentração de metano no biorreator 2 da fase II.	95
Figura 20: Representação gráfica do conteúdo de Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis no biorreator 1 da fase II.....	99
Figura 21: Representação gráfica do conteúdo de Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis no biorreator 2 da fase II.....	99
Figura 22: Representação gráfica dos valores de alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade a ácidos voláteis no biorreator 1 da fase II.	101
Figura 23: Representação gráfica dos valores de alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade a ácidos voláteis no biorreator 2 da fase II.	101
Figura 24: Representação gráfica dos valores de pH do biorreator 1 da fase II ao longo do tempo de operação do sistema.....	102
Figura 25: Representação gráfica dos valores de pH do biorreator 2 da fase II ao longo do tempo de operação do sistema.....	102
Figura 26: Composição de ácidos voláteis no biorreator 1 após 115 dias.....	104
Figura 27: Composição de ácidos voláteis no biorreator 2 após 120.....	105

Figura 28: Fotomicrografias do biorreator 1 com 115 dias de incubação (a) bacilos, cocos e esporos; (b), (d), (e) e (f) bacilos, bacilos delgados, cocos, bacilos com acúmulo de grânulos nas extremidades e bacilos com esporos; (f) bacilos aderidos à fibra de celulose; (b), (c) e (e) estruturas semelhantes à sarcinas.....	110
Figura 29: Fotomicrografias do biorreator 1 com 115 dias de incubação (g) semelhantes a actinomicetos; (k) e (h) bacilos curvos, bacilos, bacilos com acúmulos de grânulos nas extremidades e cocos; (i) e (j) cocobacilos duplos fluorescentes; (l) cocobacilos duplos em contraste de fase, cocos e bacilos.....	111
Figura 30: Fotomicrografias do biorreator 2 com 125 dias de incubação (a) bacilos e cocos; (b) semelhantes à sarcina; (c) bacilos; (d) cocos, bacilos e bacilos delgados.....	112
Figura 31: Fotomicrografias do biorreator 1 com 144 dias (a), (c) e (e) sarcinas (<i>Methanosarcina</i> sp) contraste de fase; (b), (d), e (f) sarcinas fluorescentes.....	113
Figura 32: Fotomicrografias do biorreator 2 com 153 dias de incubação (a) e (d) sarcina fluorescente; (b) bacilos fluorescentes; (c) sarcinas contraste de fase; (e) cocos fluorescentes; (f) sarcinas, cocos e bacilos fluorescentes.....	114
Figura 33: Fotomicrografias biorreator 1 com 170 dias de incubação (a) e (c) semelhantes à sarcinas contraste de fase; (b), (d) e (f) semelhantes à sarcinas fluorescentes; (e) cocos e bacilos em contraste de fase.....	115
Figura 34: Fotomicrografias biorreator 2 com 179 dias de incubação (a) e (b) estruturas semelhantes à cistos de sarcinas (c) (d) (e) e (f) semelhantes à sarcinas fluorescentes.....	116
Figura 35: Representação gráfica dos resultados das contagens pelo NMP de celulolíticas no biorreator 1 (amostras A e B) após 30 e 60 dias de incubação, comparados com a produção de metano(%)......	122
Figura 36: Representação gráfica dos resultados das contagens pelo NMP de metanogênicas no biorreator 1 (amostras A e B) após 30 e 60 dias de incubação, nos frascos contendo pó de celulose, comparados com a produção de metano (%)......	123
Figura 37: Fases da decomposição de resíduos sólidos urbanos em reator de bancada com recirculação de percolado.....	124
Figura 38: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP para celulolíticas (a) 2ª amostra na diluição 10^{-1} presença de bacilos esporulados, semelhantes aos microrganismos do grupo dos clostrídios; (b) e (c) 3ª amostra, 40°C, diluição 10^{-1} cocos e bacilos; (d) e (e) 3ª amostra, 10^{-2} cocos e bacilos; (f) 3ª amostra, 10^{-3} bacilos;.....	131
Figura 39: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP para celulolíticas (g) e (h) 3ª amostra, 35°C, diluição 10^{-1} , sarcinas; (i) 3ª amostra, 35°C, diluição 10^{-1} , cocos e bacilos; (j) 3ª amostra, 35°C, diluição 10^{-2} , cocos e bacilos; (k) 3ª amostra, 35°C, diluição 10^{-3} , bacilos; (l) estrutura fluorescente com morfologia não designada.....	132
Figura 40: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP para celulolíticas (6ª amostra) na diluição 10^{-1} (a) e (b) cocos agrupados fluorescentes; (c) e (e) Estruturas semelhantes a cistos de sarcina em contraste de fase; (d) e (f) estruturas semelhantes a cistos de sarcina em fluorescência.....	133
Figura 41: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo acetato. 1ª amostra NMP diluição 10^{-1} , (a) cocos fluorescentes, (b) e (c) e sarcinas; 2ª amostra (60 dias incubação), (d) bacilos com esporo, (e) cocos e filamentos fluorescentes, (f) cocos e filamentos contraste de fase.....	146
Figura 42: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo acetato. 3ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (30 dias incub.), (g) cocos fluorescentes e estruturas semelhantes a cistos de sarcinas, (h) semelhantes a cistos de sarcina; (i) com 60 dias de incubação, cocos agrupados fluorescentes; 4ª amostra (dil. 10^{-1}) com 60 dias de incubação, (j) sarcinas fluorescentes, (k) cocos agrupados fluorescentes.....	147
Figura 43: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo atmosfera de H_2/CO_2 . 1ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (30 dias incub.), (a) bacilos longos contraste de fase (eram fluorescentes, mas não tem registro), (b) feixe de filamentos, (c) filamentos. (d) e (e) diluição 10^{-2} , bacilos e filamentos; (f) 60 dias, bacilos.....	148
Figura 44: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo atmosfera de H_2/CO_2 . 1ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (60 dias de incubação), (g) e (h) bacilos fluorescentes, (i) filamentos; 2ª amostra diluição 10^{-2} (30 dias incubação), (j) bacilos fluorescentes, (k) filamentos, (l) 10^{-1} bacilos fluorescentes.....	149

Figura 45: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo atmosfera de H_2/CO_2 . (m) 2 ^a amostra NMP dil. 10^{-1} , (30 dias), bacilos fluorescentes; (n) 60 dias de incubação 10^{-1} , bacilos fluorescentes; (o) diluição 10^{-2} , bacilos; 3 ^a amostra, 60 dias de incubação (diluição) 10^{-1} , (p) semelhantes à sarcinas, (q) diluição 10^{-2} , bacilos.	150
Figura 46: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo metanol. 3 ^a amostra NMP diluição 10^{-1} , (60 dias), (a) cocos fluorescentes, (b) semelhantes à sarcinas, (c) e (d) semelhantes a <i>Methanosarcina</i> sp.	151
Figura 47: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo butirato. 2 ^a amostra NMP diluição 10^{-1} , (30 dias), (b) e (f) bacilos com acúmulo de grânulos nas extremidades; (c) semelhantes a <i>Methanosarcina</i> sp; (d) cocobacilos; (e) cocos fluorescentes agrupados.	152
Figura 48: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo butirato. 3 ^a amostra NMP dil. 10^{-1} , (30 dias incub.), (a) e (b) cocos fluorescentes; (i) e (j) cistos de sarcina; (k) e (l) 60 dias de incubação, cocos fluorescentes.	153
Figura 49: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo butirato. (m) e (n) 4 ^a amostra NMP dil. 10^{-2} , (30 dias incub.), grânulo metanogênico em contraste de fase em fluorescência.	154
Figura 50: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo propionato. 1 ^a amostra NMP dil. 10^{-1} , (a) sarcinas (30 dias incub.), (b) 2 ^a amostra, sarcinas (60 dias de incubação).	154
Figura 51: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP sem fonte de carbono. 1 ^a amostra NMP dil. 10^{-1} , (a) cocos agrupados fluorescentes, (b) bacilos com acúmulo de grânulos nas extremidades; (c) 2 ^a amostra diluição 10^{-1} , cocos fluorescentes aglomerados	155
Figura 52: Bactérias que hibridizaram com a sonda fluorescente, morfologia semelhante a <i>Methanobacterium</i> sp.	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores obtidos por GIAJ-LEVRA (1991) na quantificação de bactérias anaeróbias celulíticas pelo método do NMP de dez inóculos diferentes	18
Tabela 2: Variação de energia livre padrão de algumas reações importantes no processo de biodigestão anaeróbia	25
Tabela 3: Microrganismos anaeróbios celulíticos e metanogênicos presentes na biodegradação de resíduos sólidos e ambientes diversos.....	34
Tabela 4: Fases I e II e ensaios realizados.	37
Tabela 5: Composição do Resíduo Sólido Urbano Domiciliar Padrão	38
Tabela 6: Procedimentos para leitura dos frascos de NMP.....	45
Tabela 7: Procedimentos utilizados na preparação do meio basal ZINDER.....	56
Tabela 8: Procedimentos utilizados na preparação da solução traço de metais.....	57
Tabela 9: Procedimentos utilizados na preparação da solução de Resazurina	57
Tabela 10: Procedimentos utilizados na preparação da solução de bicarbonato de sódio 10%.....	58
Tabela 11: Procedimentos utilizados na preparação da solução redutora de sulfeto de sódio 5%.....	58
Tabela 12: Procedimentos utilizados na preparação da solução de solubilização	59
Tabela 13: Procedimentos para a preparação da solução de tampão fosfato 23,7mM e pH 7,2.....	59
Tabela 14: Procedimentos utilizados na preparação da solução anaeróbia de diluição	60
Tabela 15: Preparação da solução de acetato de sódio 2M.....	60
Tabela 16: Preparação da solução de butirato de sódio 2M.....	61
Tabela 17: Preparação da solução de propionato de sódio 2M	61
Tabela 18.: Preparação da solução de Metanol 2M.....	62
Tabela 19: Procedimentos utilizados na preparação da solução de vitaminas	62
Tabela 20: Composição do meio de cultura ZINDER completo.....	63
Tabela 21. Valores da composição de biogás nos biorreatores da fase I	68
Tabela 22: Valores obtidos do NMP para os grupos microbianos celulítico e metanogênico.....	73
Tabela 23: Valores de metano nos tubos de NMP - Método de BARLAZ et al. (1989 a e b).....	78
Tabela 24: Valores de metano nos tubos de NMP - Método de VILLAS-BÔAS(1990)	79
Tabela 25: Valores de metano nos tubos de NMP - Método do ultra-som	80
Tabela 26: Tipos morfológicos observados, sob exame de contraste de fase, nos tubos da diluição 10^{-1} do NMP de cada procedimento estudado.	83
Tabela 27: Valores da composição de biogás e da concentração de metano no biorreator 1 da fase II	90
Tabela 28: Valores da composição e concentração de metano no biorreator 2 da fase II	93
Tabela 29: Condições de operação e valores dos parâmetros analisados no Biorreator 1 da fase II....	96
Tabela 30: Condições de operação e valores dos parâmetros analisados no Biorreator 2 da fase II....	97
Tabela 31: Concentrações de ácidos voláteis nos biorreatores 1 e 2 da fase II.	103
Tabela 32: Morfologias predominantes nos biorreatores na fase II.....	108

Tabela 33: Resultados da leitura dos frascos positivos contendo celulose em pó e estimativa do número de bactérias celulolíticas e de células procarióticas do grupo metanogênico presentes no biorreator 1.	121
Tabela 34: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras I (retiradas do biorreator 1 com 29 dias de incubação)	125
Tabela 35: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras II (retiradas do biorreator com 49 dias de incubação)	125
Tabela 36: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras III A, B e C (retiradas do biorreator 1 com 72 dias de incubação). Respostas dos tubos de NMP incubados sob temperaturas diferentes A e B = 35°C e C = 40°C	126
Tabela 37: Morfologias visualizadas nas diluições de NMP das amostras IV (94 dias)	127
Tabela 38: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras V (115 dias) .	127
Tabela 39 : Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras VI (144 dias)	127
Tabela 40: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras VII (170 dias).....	128
Tabela 41: Morfologias predominantes nas amostras de contagens de celulolíticas	129
Tabela 42: Leituras dos frascos contendo acetato como fonte de carbono.....	134
Tabela 43 Estimativas de células procarióticas do grupo metanogênico	134
Tabela 44: Leituras positivas dos frascos contendo distintas fontes de carbono, com hidrogênio e apenas com meio mineral.....	135
Tabela 45: Leituras positivas dos frascos contendo distintas fontes de carbono, com hidrogênio e apenas com meio mineral.....	136
Tabela 46: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo acetato como fonte de carbono no biorreator 2.....	140
Tabela 47: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo atmosfera de H ₂ /CO ₂ como fonte de carbono no biorreator 2	141
Tabela 48: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo metanol como fonte de carbono no biorreator 2.....	142
Tabela 49: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo butirato como fonte de carbono no biorreator 2.....	142
Tabela 50: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo propionato como fonte de carbono no biorreator 2	143
Tabela 51: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP sem fonte de carbono no biorreator 2.....	144
Tabela 52: Morfologias predominantes visualizadas nos frascos de leitura de NMP para arqueas metanogênicas.	156
Tabela 53: Morfologias predominantes visualizadas nos frascos de leitura de NMP para bactérias acetogênicas	157
Tabela 54: Morfologias predominantes visualizadas nos frascos controle de leitura de NMP.....	158

LISTA DE SÍMBOLOS

BCYT – Basal, carbonato, extrato de levedura – Yeast, tripticase

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato

DAFA- (digestor anaeróbio de fluxo ascendente)

F₄₂₀ - Co-enzima Fator 420

IBGE – Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NMP – Número Mais Provável

pE - Atividade de elétrons

RS – Resíduo sólido

RSUDp – Resíduo sólido urbano domiciliar padrão

ST - Sólidos totais

STV – Sólidos totais voláteis

UASB – Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (DAFA)

UFC – Unidades formadoras de colônia

RESUMO

CORRÊA, R.C. (1999). AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO E ATIVIDADE DE MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS PROCARIONTES EM AMOSTRAS DE BIORREATORES OPERADOS PARA A ESTABILIZAÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS PADRONIZADOS. São Carlos, 173p. Dissertação de Mestrado. EESC-USP.

Foram estudados três procedimentos para o tratamento prévio de amostras provenientes de três sistemas de biodigestão anaeróbia operados com resíduos sólidos urbanos padronizados (RSUDp), com o fim de promover o desprendimento de células microbianas de fibras e outros materiais, e com isso obter um inóculo mais homogêneo para contagens celulares. Os tratamentos foram os seguintes: (a) suspensão de amostras em tampão fosfato e processamento em liquidificador; (b) homogeneização mecânica e manual de amostras em solução mineral anaeróbia; (c) amostras submetidas a banho de ultra-som. O método do Número Mais Provável (NMP) foi utilizado para avaliar o número de bactérias celulolíticas e arqueas metanogênicas, em meio mineral contendo celulose em pó. Não foram constatadas diferenças entre os três tratamentos empregados, considerando-se os valores encontrados para ambos os grupos, da ordem de 10^2 células/mL. O tratamento com ultra-som foi escolhido para outras determinações em função da simplicidade quanto à manipulação. Assim, foram operados dois biorreatores anaeróbios com RSUDp para avaliação da reprodutibilidade dos valores das amostras após tratamento com ultra-som, para a determinação do número de microrganismos (celulolíticos, acetogênicos e metanogênicos) e avaliação da atividade microbiana anaeróbia na degradação do RSUDp. Os resultados das contagens de bactérias celulolíticas e arqueas metanogênicas pelo método do NMP em meio contendo celulose não foram superiores a 10^3 células/mL, e as réplicas foram bastante semelhantes. O aumento do número do grupo metanogênico pôde ser correlacionado com o aumento dos teores de metano no biorreator amostrado. As contagens de organismos acetogênicos e metanogênicos em meio mineral com fontes específicas revelou valores até 10^3 células/mL. Os tipos morfológicos predominantes nos exames microscópicos dos sistemas de biodigestão foram bacilos curvos, retos, sarcinas e cistos de sarcinas e as amostras dos tubos de contagem mostraram para celulolíticas, bacilos, cocos e sarcinas, para acetogênicas bacilos, bacilos espessos, cocos e cistos de sarcinas e para as arqueas metanogênicas bacilos fluorescentes e sarcinas. A evolução do processo de biodigestão anaeróbia nos dois últimos sistemas operados mostrou-se bastante próxima a proposta por BARLAZ et al. (1989b), em que o número de bactérias celulolíticas e de arqueas metanogênicas aumenta na fase considerada metânica acelerada. O conteúdo de sólidos totais diminuiu em 50% ao longo do processo e os teores de ácidos orgânicos voláteis diminuíram de 27,5 para 8,79g de ác. acético/L.

Palavras chaves: bactérias celulolíticas anaeróbias, arqueas metanogênicas, biodigestão anaeróbia, resíduos sólidos, NMP, ultra-som.

ABSTRACT

Three different treatments were applied to samples from three anaerobic biodigestion systems operated with standardized municipal solid waste to promote the release of microbial cells adhered to fibers and other materials, resulting in a more homogeneous inoculum to cellular counting. The following treatments were applied to the samples: a) suspension in phosphate buffer followed by blending; b) mechanical and hand homogenization in anaerobic mineral solution; c) sonication in ultrasound bath. The Most Probable Number (MPN) technique was employed to evaluate the populations of cellulolytic bacteria and methanogenic Archaea, in mineral medium containing powdered cellulose. The populations of both groups of microorganisms were close to 10^2 cells/mL independently of the treatment applied to release the cells and no clear distinction among them could be made concerning their efficiencies. In view of this fact the ultrasound treatment was employed in all other determinations due to its simple execution. Two anaerobic bioreactors operated with standardized municipal solid waste were monitored to evaluate the reliability of sonication as a procedure for cell release, to determine microorganism populations (cellulolytic, acetogenic bacteria and methanogenic Archaea) and to evaluate the microbial anaerobic activity concerning the biodegradation of the standardized municipal solid waste. Cellulolytic bacteria and methanogenic Archaea had similar populations (lower than 10^3 cells/mL) as well as acetogenic and methanogenic microorganisms (up to 10^3 cells/mL). The increase in the methanogenic population could be directly related to the increase of methane production in the studied reactor. The morphological types which predominate in the microscopic examinations of the biodigestion systems were curved and straight rods and sarcina. The tubes for MPN countings showed the presence of rods, coccus and sarcina for cellulolytic bacteria; rods, tick rods, coccus and sarcina for acetogenic bacteria and fluorescent rods and sarcina for methanogenic Archaea. The evolution of the anaerobic biodigestion process in the latter two monitored systems was very similar to the one proposed by BARLAZ et al. (1989b) where the number of cellulolytic bacteria and methanogenic Archaea increase during the accelerated methane phase. The total content of solids decreased 50% during the process and the volatile acidity decreased from 27,5g acetic acid/L to 8,79g acetic acid/L.

Keywords: anaerobic cellulolytic bacteria; methanogenic Archaea; anaerobic biodigestion; solid waste; MPN; ultrasound

1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas geram resíduos sólidos, líquidos e gasosos, tanto na manufatura, como no consumo de produtos, que acabam excedendo a capacidade de assimilação pelo meio ambiente. Portanto, há a necessidade de minimizarmos a geração de resíduos, controlar a emissão de resíduos perigosos, recuperar fontes de energia, dispor os resíduos de forma a proteger a saúde humana e diminuir a degradação ambiental. O destino correto a ser dado a esses resíduos é um problema que necessita ser resolvido, tendo em vista que o ambiente não poderá recebê-los por muito mais tempo. Entre as alternativas existentes para os resíduos sólidos encontram-se: o aterro sanitário, a redução/reutilização/reciclagem, a compostagem, a incineração, a pirólise e os processos de biodigestão anaeróbia.

Dados do IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) de 1992, indicaram que em 1991, o Brasil produziu 250 mil toneladas/dia de resíduos. Cerca de 76% dos resíduos foram depositados a céu aberto ou em “lixões”, do restante, 13% foram dispostos em aterros que recebem algum tipo de controle, como por exemplo cobertura periódica, 10% foram dispostos em aterros sanitários, 0,9% foram tratados em usinas de compostagem e 0,1% foram incinerados. Aproximadamente 90 mil toneladas de resíduos gerados foram de origem domiciliar, destes, 21% não foram coletados e portanto, destinados clandestinamente em terrenos baldios, encostas e córregos (LEITE, 1997).

Segundo VAZOLLER (1995a), o aumento das necessidades e anseios da sociedade moderna industrializada tem resultado no aumento de materiais descartados na forma de esgotos e lixo. Sendo assim, soluções de baixo custo e

efetivas contra as conseqüências do acúmulo de materiais indesejáveis podem empregar a ação microbiana. A Biotecnologia aplicada ao saneamento ambiental possibilita a utilização de métodos de tratamento de resíduos através da atividade biológica aeróbia e anaeróbia. Assim, o biotratamento de resíduos líquidos e sólidos resulta na estabilização dos compostos orgânicos pelo catabolismo energético, viabilizando a despoluição ambiental (VAZOLLER, 1996). Os processos tecnológicos de tratamento de águas residuárias e de resíduos sólidos são muito necessários, sobretudo para a melhor utilização do espaço ambiental e dos recursos naturais, bem como para a manutenção da qualidade de vida.

O avanço tecnológico dos biorreatores destinados a estabilização de resíduos orgânicos ocorreu, principalmente, em relação ao tratamento de águas residuárias VAZOLLER (1995a; 1996). Segundo PALMISANO & BARLAZ (1996), os estudos tecnológicos e fundamentais sobre a decomposição de resíduos sólidos urbanos são insuficientes, considerando-se a abundância dos resíduos gerados.

Sem dúvida, a enorme quantidade de resíduos sólidos urbanos diariamente produzida é um dos maiores problemas ambientais, pois para a sua disposição há a necessidade de locais e áreas muitas vezes inviáveis. As soluções práticas podem incluir o uso de processos biológicos como os aterros sanitários, a forma mais comum para a disposição e tratamento de resíduos sólidos urbanos (GOMES, 1995; RHYNER et al., 1995; VAZOLLER, 1995a), com as vantagens do confinamento e estabilização do resíduo, e a compostagem, processo esse que gera um produto a ser utilizado como condicionador de solos na agricultura, mas que necessita de muito espaço para o seu preparo. A incineração, um processo não biológico, emprega a queima do resíduo à alta temperatura, resultando na diminuição crucial do volume do resíduo e obrigando à existência de sistemas que controlem a geração de gases e partículas poluentes na atmosfera. Uma breve análise, sustenta a observação de que a Biotecnologia ambiental deverá se desenvolver no sentido de possibilitar a utilização de microrganismos mais eficientes na hidrólise e estabilização dos resíduos sólidos (VAZOLLER, 1996).

Processos de tratamentos biológicos são mais atraentes à população do que os físico-químicos. A razão dessa afirmação é atribuída ao fato da atividade biológica confinada em reatores ser semelhante àquela presente na natureza (RHYNER et al., 1995), e portanto, menos agressiva ao meio. As transformações biológicas que ocorrem no ambiente são muito lentas, e muito provavelmente, as condições existentes para uma eficiente biodegradação não sejam as mais adequadas. A função da Biotecnologia, portanto, é estudar e implementar as melhores condições para o crescimento microbiano nos biorreatores (VAZOLLER, 1996).

O processo biológico anaeróbio predomina no aterro de resíduos, e é semelhante ao processo bastante conhecido dos biodigestores anaeróbios de tratamento de resíduos líquidos. É, portanto, de grande importância conhecer os processos microbianos aeróbios e anaeróbios que ocorrem nos aterros sanitários, para possibilitar o melhor controle do processo, como também para potencializar a exploração de aterros como biorreatores (JONES¹ et al. apud GOMES, 1995).

A estimativa numérica da população viável e a caracterização dos grupos microbianos presentes nos sistemas de tratamento de resíduos, através do consumo de uma fonte específica nutricional em um meio de cultivo adequado e de métodos de contagem celular confiáveis, como o Número Mais Provável (NMP), possibilitam o conhecimento do comportamento dos microrganismos na degradação de diferentes compostos orgânicos. O método do NMP é comumente empregado para avaliar a população microbiana de sistemas biológicos operados para o tratamento de resíduos sólidos (BARLAZ et al., 1989 a e b; GIAJ-LEVRA, 1991; GOMES, 1995; PALMISANO, 1995).

Os poucos trabalhos existentes sobre os procedimentos de contagens de microrganismos em resíduos sólidos oriundos de algum tipo de tratamento biológico, geralmente baseiam-se nas adaptações descritas para a avaliação quantitativa de microrganismos presentes em águas residuárias, encontradas no STANDARD

¹ JONES, K.L.; REES, J.F. & GRAINGER, J.M. (1983) Methane generation and microbial activity in a domestic refuse landfill site. *Eur.J.Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 18:242-245.

METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998). Amostras de sistemas de tratamento de águas residuárias são, na maioria das vezes, homogêneas, facilitando a diluição das mesmas e o emprego de diferentes métodos de contagem. Contudo, amostras de resíduos sólidos são de difícil preparação, pois sua composição é bastante heterogênea e constituída por sólidos de diferentes características.

A preparação prévia de amostras sólidas a serem submetidas à contagem em meios de cultivo específicos é de grande importância. BARLAZ et al. (1989a), por exemplo, desenvolveram e compararam diversas técnicas de preparo de amostras sólidas provenientes de biorreatores anaeróbios, para a avaliação de culturas anaeróbias celulolíticas.

Na presente Dissertação de Mestrado, foi realizado um estudo sobre três diferentes técnicas para o tratamento prévio de amostras de resíduos sólidos a serem avaliadas quantitativamente através do método do NMP. As amostras empregadas nos experimentos foram provenientes de biorreatores anaeróbios, operados sob condições descontínuas de alimentação para a degradação anaeróbia de resíduos sólidos urbanos domésticos. Os resíduos estudados foram padronizados em relação à sua composição (PINTO², 1998). As técnicas testadas foram baseadas nas orientações de BARLAZ (1989) e de VILLAS-BÔAS (1990), que empregaram, respectivamente, procedimentos mecânicos e manuais para o desprendimento das células microbianas em amostras de resíduos sólidos. O terceiro procedimento foi adaptado dos trabalhos de MÜNCH et al. (1997) e JORAND et al. (1995), que utilizaram ondas de ultra-som para a desintegração de flocos biológicos de lodos ativados. O critério adotado para a determinação da melhor técnica foi baseado no maior valor de NMP obtido através de um dos tratamentos e a facilidade prática no preparo rápido das amostras.

² (PINTO, D.M.C.L. 1998). (USP Escola de Engenharia de São Carlos. Departamento de Hidráulica e Saneamento - Laboratório de Processos Anaeróbios) / Trabalho de Doutorado em andamento.

Após a definição de uma técnica de preparo das amostras sólidas, o método do NMP foi então rotineiramente utilizado para avaliar: a) a reprodutibilidade do método do ultra-som; b) os grupos de microrganismos atuantes na degradação anaeróbia metanogênica de amostras de biorreatores operados em escala de laboratório. Esses sistemas foram operados sob condições próximas aos sistemas da etapa do estudo de tratamento prévio das amostras.

A escolha do método do NMP foi feita por se tratar de uma técnica simples e bastante utilizada na avaliação de células em sistemas de tratamento anaeróbio de resíduos sólidos (BARLAZ et al., 1989a e b; GIAJ-LEVRA, 1991; GOMES, 1995), como anteriormente indicado. Os grupos microbianos estudados foram bactérias celulolíticas, acetogênicas e as arqueas metanogênicas, por constituírem os principais grupos atuantes na biodegradação anaeróbia de resíduos sólidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Determinar o número de células procarióticas celulolíticas, acetogênicas e metanogênicas em amostras de resíduos sólidos, oriundas de biorreatores anaeróbios operados em escala de laboratório, através do método do Número Mais Provável;
- Analisar as condições do processo anaeróbio de degradação dos resíduos sólidos nos biorreatores, a partir dos valores quantitativos dos grupos microbianos presentes nas amostras estudadas.

2.2 Objetivos específicos

- Testar três diferentes procedimentos de preparação prévia das amostras de resíduos sólidos a serem submetidas ao método do Número Mais Provável para avaliação quantitativa dos microrganismos anaeróbios e definir o mais adequado;
- Avaliar os valores de contagem microbiana a fim de certificar a qualidade do procedimento escolhido para a preparação prévia de amostras;
- Definir os procedimentos mais adequados para a leitura dos tubos (ocorrência ou não do crescimento celular) pelo método do Número Mais Provável;
- Aplicar os métodos de tratamento prévio de amostras e o NMP para o monitoramento de microrganismos anaeróbios em biorreatores anaeróbios.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Procedimentos e métodos para manipulação e identificação de microrganismos anaeróbios estritos

De acordo com LJUNGDAHL & WIEGEL (1986), muitos microrganismos anaeróbios necessitam de condições estritamente anaeróbias. Assim, a manipulação para o preparo de meios de cultivo, soluções e inoculação das células requer procedimentos eficientes para a remoção do oxigênio do meio, bem como dos gases a serem empregados em substituição à atmosfera que contém oxigênio. Vários métodos foram descritos para a manipulação de microrganismos anaeróbios estritos visando a manutenção do ambiente anaeróbio. HUNGATE (1950; 1969), precursor da maioria dos cientistas na área, descreveu métodos adequados ao cultivo sistemático e seguro de microrganismos anaeróbios estritos, como o conhecido “Método do roll-tube”, que posteriormente sofreu modificações por BRYANT (1972).

Um sistema constando de um tubo com saídas para introdução de gases nos frascos de cultivo de microrganismos anaeróbios, precedido por uma coluna de cobre aquecida para a remoção de traços de oxigênio presentes nos gases e tubos de condução, desenvolvido por BALCH et al. (1979), tem-se mostrado bastante eficaz na manutenção das condições anaeróbias. O equipamento permite a manutenção da atmosfera anaeróbia durante a preparação de meios de cultivo e soluções, bem como na distribuição dos mesmos. Os gases utilizados no cultivo de anaeróbios são o dióxido de carbono, o hidrogênio, o nitrogênio ou a mistura destes, segundo as necessidades de cultivo dos microrganismos. De acordo com HUNGATE (1969), a

remoção do oxigênio através da coluna de cobre aquecida nem sempre é totalmente obtida, sendo necessário acrescentar agentes redutores no meio para a obtenção de um baixo potencial de oxi-redução. Como exemplo de agentes redutores, pode-se citar o sulfeto de sódio, o tioglicolato de sódio e o sulfeto de hidrogênio, e como indicadores de potencial de oxi-redução utiliza-se, em geral, a resazurina.

ZEHNDER & STUMM (1988) apontam alguns elementos (C, H, N, O, S, Fe e Mn) que participam predominantemente de processos naturais de oxi-redução. A sequência das reações de oxi-redução calculadas para o pH 7,0 são indicadas na Figura 1, nos quais os agentes oxidantes mais energéticos encontram-se no topo e, na base os redutores mais energéticos. A Figura 1 pode ser interpretada como um diagrama do nível de energia livre, em que a ordenada mede a energia requerida para transferir elétrons de um nível energético para outro, expressa em kcal ou kJ por mol de elétrons, eV por mol e unidades de p_e (atividade de elétrons). Baixos valores de p_e indicam que a solução tem tendência a doar elétrons, enquanto que valores altos prevalecem as reações oxidativas.

Uma reação de oxi-redução envolve a liberação ou consumo de prótons, assim o potencial de oxi-redução aumenta quando o valor do pH é baixo e diminui quando o pH é alto. Portanto, o potencial de oxi-redução pode aumentar durante a fermentação de compostos orgânicos, pois, em geral, os produtos formados são ácidos (LJUNGDAHL & WIEGEL, 1986).

Segundo McINERNEY & BRYANT (1981), os organismos metanogênicos desenvolvem-se num ambiente em que o potencial de oxi-redução é aproximadamente -300mV. Portanto, as culturas anaeróbias estritas necessitam de condições que visem a eliminação dos agentes oxidantes, principalmente o oxigênio (VAZOLLER, 1986).

Figura 1: Diagrama de energia livre de elétrons

(FONTE adaptado de ZEHNDER & STUMM, 1988 apud FORESTI, 1994)

De acordo com NOVAES (1986), o conhecimento das necessidades nutricionais, ambientais e características básicas dos microrganismos em estudo é de grande importância. As metanogênicas podem utilizar os substratos acetato, formiato, hidrogênio e dióxido de carbono, entre outros. O crescimento microbiano ocorre, em geral, em meios de cultura que contenham amônia, sulfeto ou cisteína, como fonte de nitrogênio e enxofre, e fontes de carbono como acetato, hidrogênio, dióxido de carbono e formiato. Segundo GOMES, 1995, deve-se suprir os meios de cultura com fontes de carbono e energia para a realização de contagens e identificação de microrganismos. As culturas microbianas devem ser incubadas sob condições ideais de temperatura e o seu crescimento pode ser observado pelo aparecimento de colônias, turvação do meio, consumo do substrato e produção de biogás. Podendo-se monitorar a produção de biogás com análises cromatográficas.

A síntese de alguns procedimentos para manutenção de anaerobiose em trabalhos de pesquisa realizados no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia da USP de São Carlos, nos quais foram avaliados o número de microrganismos e identificados alguns gêneros microbianos presentes em amostras de resíduos sólidos, está apresentada a seguir.

VILLAS-BÔAS (1990) realizou contagens de bactérias anaeróbias hidrolítico-fermentativas pelo método do “roll-tube” em amostras de resíduos sólidos e percolado provenientes de dois aterros sanitários experimentais, operados pelo grupo de pesquisas em resíduos sólidos do Departamento de Hidráulica e Saneamento. A manutenção da anaerobiose foi de acordo com HUNGATE (1969) e VAZOLLER (1989), em que os frascos foram manipulados sob atmosfera gasosa como nitrogênio e dióxido de carbono, porém não são pressurizados. Os valores de bactérias hidrolítico-fermentativas obtidos foram na faixa de 10^5 a 10^8 UFC/g RS seco (Unidade Formadora de Colônia), e os dois gêneros encontrados foram *Megasphaera* e *Selenomonas*. As características das culturas foram estudadas através do exame da morfologia celular e testes de crescimento em meio contendo substratos orgânicos específicos. A análise dos principais produtos de fermentação dos isolados também auxiliou na caracterização dos gêneros.

GIAJ-LEVRA (1991) procurou adequar procedimentos de contagem de bactérias anaeróbias celulolíticas pelo método do NMP, baseado em indicações da literatura especializada. Avaliou quatro meios de cultura diferentes, escolhidos de acordo com a facilidade de preparo e das condições nutricionais. Da mesma forma que VILLAS BÔAS (1990), a manutenção de anaerobiose baseou-se em HUNGATE (1969), VAZOLLER (1990) e DUBOURGUIER (1987). O meio de cultura que apresentou as melhores condições de crescimento foi o BCYT (Basal, Carbonato, extrato de levedura -Yeast, Trypticase) em um menor tempo de incubação. Amostras de diferentes procedências foram analisadas empregando-se o meio BCYT, tais como fluido de rúmen mantido em um biodigestor de mistura completa, fluido de rúmen de matadouro, sedimento da represa Billings, lodo de esgoto de biodigestor de lodo,

lodo de biodigestor de manta de lodo, solo de jardim, chorume de aterro sanitário, lodo de lagoa de estabilização e lodo de lagoa anaeróbia. Os valores de NMP obtidos serão discutidos nesse texto, posteriormente.

BADRA (1993) isolou e caracterizou células metanogênicas provenientes de um dos aterros sanitários experimentais do Departamento de Hidráulica e Saneamento / EESC-USP. Utilizando o meio de cultura BCYT (GIAJ-LEVRA, 1991) e as fontes de carbono formiato de sódio, acetato de sódio e metanol, isolou, respectivamente, culturas metanogênicas semelhantes aos gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanosarcina*. As características morfo-fisiológicas das culturas foram obtidas através do exame microscópico, coloração das células pelo método de Gram e teste com KOH (hidróxido de potássio), e pelo cultivo em diferentes substratos orgânicos. Os procedimentos para a manutenção de anaerobiose foram adaptados de MILLER & WOLIN (1974) e BALCH et al. (1979).

GOMES (1995) contou e selecionou bactérias anaeróbias celulolíticas presentes no chorume produzido no antigo depósito de lixo do município de São Carlos através do método do NMP, utilizando o meio de cultura BCYT e 5g/L de celulose em pó e empregou procedimentos para a manutenção de anaerobiose adaptados, como citados anteriormente. Tais procedimentos encontram-se descritos por VAZOLLER (1995), nos quais se destaca a utilização de um sistema de “distribuição simultânea de gases” (denominação dada no Laboratório de Processos Biológicos). GOMES (1995) concluiu que o uso de diluições decimais seriadas para a seleção de bactérias celulolíticas foi muito adequado, assim para o NMP. Sob microscopia, constatou a presença de bactérias com morfologia de bacilos e sarcinas fluorescentes, o que indicou grupos metanogênicos provavelmente pertencentes ao gênero *Methanosarcina*. Nesse trabalho foram também estudadas as velocidades de crescimento das culturas anaeróbias celulolíticas, através de determinações de proteína, revelando velocidades de crescimento da ordem de 0,06 a 0,75mg S.A.B./Lh.

A avaliação de uma metodologia para obtenção de fungos anaeróbios celulolíticos provenientes de rúmen bovino e de amostras de aterro sanitário foi realizada por PESSIN (1997). Em ensaios de enriquecimento e isolamento do conteúdo ruminal bovino, verificou o desenvolvimento de estruturas de fungos anaeróbios, semelhantes ao gênero *Neocallismatix* sp e nos ensaios realizados em amostras de resíduos aterrados não foi detectado o crescimento de fungos anaeróbios.

Uma característica das células metanogênicas é particularmente interessante para a avaliação da presença desse grupo de microrganismos em qualquer estudo sobre degradação anaeróbia de compostos orgânicos. O exame microscópico sob luz ultravioleta (UV) de amostras de lodos anaeróbios pode revelar rapidamente a presença das metanogênicas, pois a luz incidente, em um fundo escuro, possibilita a fluorescência das células. Certas substâncias absorvem a energia das ondas ultravioletas e emitem-na em ondas de maior comprimento (TORTORA et al. 1982; MADIGAN et al., 1997; PELCZAR et al., 1980). Os microrganismos metanogênicos contém um composto fluorescente sob luz UV, a co-enzima F₄₂₀, um transportador de hidrogênio, que não tem sido encontrado em outros organismos. A presença deste composto F₄₂₀ facilita a observação deste grupo de microrganismos em microscopia de fluorescência (GOTTSCALK, 1979). De acordo com ZINDER³ apud VAZOLLER (1995), um único grupo de metanogênicas pertencente ao gênero *Methanosaeta* sp (*Methanotherix* sp) não apresenta autofluorescência devido à baixa quantidade da co-enzima F₄₂₀, no entanto, as características morfológicas são inerentes a este grupo.

³ ZINDER, S.H. (1992) Physiological ecology methanogens. In: Methanogens: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics. 112p.

3.2 Preparação de amostras para enumeração de microrganismos.

3.2.1 *Método de BARLAZ et al. (1989a) – Utilização de aparelho liquidificador e espremedura manual*

BARLAZ et al. (1989a) avaliaram seis técnicas de desprendimento de células para formação de inóculos de amostras de resíduos sólidos a serem utilizados nas contagens pelo NMP. Na primeira técnica, denominada de espremedura manual, um inóculo foi formado adicionando-se um litro de tampão fosfato a 200g de resíduo úmido, resultando em um conteúdo de umidade de 95% (m/m). Com essa umidade a liquefação foi facilitada (uso de liquidificador por 90s), o líquido foi liberado com espremedura manual do resíduo, coletado em frasco sob atmosfera de nitrogênio e utilizado como inóculo. Na segunda técnica, após o procedimento indicado acima, o resíduo da primeira extração foi submetido a três extrações consecutivas em tampão e os extratos líquidos foram combinados e comparados com o obtido na primeira técnica. Na terceira técnica, o resíduo foi submetido ao mesmo procedimento da primeira técnica sem a espremedura manual, e o resíduo liquefeito (líquido mais particulado) foi utilizado como inóculo. Nas quarta, quinta e sexta técnicas, do resíduo resfriado por seis horas foram constituídos três inóculos adicionais: *i*) inóculo líquido de uma espremedura manual; *ii*) inóculo líquido de quatro espremeduras manuais; *iii*) inóculo líquido mais o particulado. Após a obtenção dos resultados semelhantes de contagens pelo NMP, os autores optaram pela técnica mais simples, neste caso, a primeira técnica. BARLAZ et al. (1989b) realizaram contagens de grupos bacterianos em resíduos sólidos urbanos utilizando a técnica de preparo de formação de inóculo indicada anteriormente.

Em 1996, QIAN & BARLAZ, realizaram contagens de bactérias celulolíticas, hemicelulolíticas e acetogênicas e de arqueas metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas presentes em grama, folhas, resíduo alimentar, galhos, resíduo sólido e cobertura de solo de aterro, na tentativa de identificar qual fonte introduz os grupos tróficos no resíduo aterrado. Os resultados indicaram que o resíduo de jardim foi o maior carreador dos grupos tróficos (10^9 células/g de peso seco) necessários

para a decomposição dos resíduos aterrados, enquanto que a cobertura de solo foi o menor (10^3 células/g de peso seco).

3.2.2 *Método de VILLAS-BÔAS (1990) – Utilização de agitação mecânica e manual*

Nas contagens de bactérias anaeróbias hidrolítico-fermentativas realizadas por VILLAS-BÔAS (1990), a técnica de preparo prévio das amostras sólidas sob condições anaeróbias, foi adicionar uma solução para solubilização das amostras em frasco contendo pérolas de vidro, submetidos a agitação em placa magnética por 30 minutos a 300 rpm. Após esse procedimento, uma alíquota era transferida para um frasco de volume bem menor, contendo pérolas de vidro de diâmetro menor àquelas utilizadas inicialmente, e a amostra era agitada manualmente em ângulo de 45° , por 30 minutos. A amostra era então diluída para as contagens em “roll-tube”. A autora concluiu que o procedimento utilizado foi adequado para a obtenção de amostras homogêneas. Os resultados das contagens para bactérias hidrolítico-fermentativas nos aterros 1 e 2 foram, respectivamente, de $3,97 \times 10^5$ a $8,45 \times 10^7$ UFC/g de resíduo seco e de $3,64 \times 10^5$ a $1,67 \times 10^8$ UFC/g de resíduo seco. A boa qualidade da técnica de preparo pôde ser observada pelos baixos valores dos desvios padrões das diluições em triplicatas.

3.2.3 *Tratamento com ultra-som*

O tratamento com ultra-som, ou sonicação, de meios líquidos e suspensões é adequado para promover a lise celular, desprender células aderidas a substratos sólidos, formar micelas e vesículas e também encontra aplicações específicas em química, constituindo a sonoquímica (MASON, 1986). O banho de ultra-som (banho de limpeza) constitui-se por uma cuba metálica preenchida com líquido, geralmente água, no interior do qual radiação ultra-som é propagada a partir de sonotrodos embutidos abaixo da cuba. Para utilizar a técnica do banho de ultra-som o líquido ou suspensão deve ser colocado em recipiente adequado (em geral de vidro) e então, imerso no banho. Neste caso a potência da irradiação liberada no meio não pode ser precisamente conhecida e controlada, pois parte da energia é dissipada durante sua

propagação através da água até o interior do recipiente. A reprodução e a comparação de resultados dependem da observação de certos cuidados, tais como o uso dos mesmos recipientes, preenchidos sempre com o mesmo volume de líquido ou suspensão, os quais devem ser imersos no banho até, aproximadamente, a mesma profundidade. Se o tratamento for prolongado, dependendo do volume da cuba e da amostra contida no recipiente, a água do banho é aquecida e também pode afetar a reprodução e a comparação dos resultados. Outra dificuldade está ligada à existência de equipamentos no mercado que operam em frequências diferentes ou com cubas de diferentes volumes. O tratamento de ultra-som pode empregar sonotrodos de ligas metálicas, os quais são mergulhados diretamente no meio a ser irradiado e liberam energia de frequência fixa e potência nominal regulável. Neste caso a dissipação de energia é muito menor, permitindo que a severidade e a duração do tratamento sejam controladas com muito mais rigor e que, em função do volume e densidade do líquido a ser tratado, o tratamento seja otimizado com respeito ao efeito desejado. Em adição à existência de equipamentos que operam à diferentes frequências e às dificuldades associadas ao controle da temperatura durante o tratamento, neste caso também pode ocorrer a contaminação do meio com partículas metálicas liberadas por corrosão dos sonotrodos devido ao seu uso prolongado. Uma técnica que associa as principais vantagens das duas previamente mencionadas é aquela que emprega o sonotrodo em copo ("cup horn"). Neste caso o acessório denominado sonotrodo em copo, que é colocado em lugar do sonotrodo de liga metálica e disposto verticalmente para cima, é o recipiente que contém o meio a ser tratado. Desse modo a dissipação de energia é pequena e não há contato direto da amostra com partes metálicas e sua conseqüente contaminação pois o sonotrodo em copo é fabricado em material inerte. A principal limitação ao uso dessa última técnica está associada ao pequeno volume de meio que pode ser tratado de cada vez.

Dispersão utilizando tratamento de ultra-som têm sido adotadas para a contagem de agregados de células bacterianas por muitos autores (BANKS & WALKER, 1977; HUGHES & STAFFORD, 1976; WILLIAMS et al., 1970, 1971)⁴

⁴ BANKS, C.J.; WALKER, I. (1977). Sonication of activated sludge flocs and the recovery of their bacteria on solid media. *J. Gen. Microbiol.*, 98: 363-368.

apud JORAND et al. (1995). JORAND et al. (1995) utilizaram o tratamento de ultra-som com sonotrodo metálico para otimizar a dispersão de flocos biológicos de lodos ativados, a fim de avaliar a complexidade desse tipo de organização celular. Concluíram que o tratamento com sonicação a 37W e 60s foi o mais adequado para promover a dispersão dos flocos de lodo ativado concomitante à minimização da ocorrência de lise celular.

MÜNCH et al. (1997) também utilizaram o tratamento de amostras com ultra-som de sonotrodo metálico (de alta intensidade por 30s na regulação 5 de potência) para quantificar a biomassa bacteriana de quatro diferentes origens: - sistema biológico industrial de tratamento para remoção de nutrientes; - planta piloto de lodos ativados; - amostras da primeira fase de um sistema de laboratório de tratamento anaeróbio de duas fases; - sistema de laboratório operado sob condições descontínuas de alimentação. Foi utilizado um aparelho Vibracell Sonicator (Branson, 250). Os resultados mostraram que a sonicação com sonotrodo metálico imerso no meio a ser tratado é o método mais adequado para dispersar os flocos do lodo ativado. Também ressalta que é um dos métodos que provoca menos problemas no que tange à ruptura de células.

3.3 Avaliação quantitativa de bactérias anaeróbias estritas pelo método do NMP - ênfase às bactérias fermentativas hidrolíticas/celulolíticas e às arqueas metanogênicas.

Um método de contagem ideal que permite avaliar o número dos microrganismos presentes numa amostra e estimar a proporção viável metabolicamente ativa é o método do Número Mais Provável (JONES apud GIAJ-LEVRA, 1991). A viabilidade de microrganismos numa amostra é verificada testando-se sua capacidade de crescer e se dividir. O NMP permite estimar a densidade da população empregando-se diferentes meios de cultivo, analisando-se o

HUGHES, D.E.; STAFFORD, D.A.(1976) The microbiology of the activated-sludge process. *Crit.Rev envir.Control*, 7:233-257
 WILLIAMS, A.R.; STAFFORD, D.A.; CALLELY,A.G.;HUGHES, D.E.(1970). Ultrasonic dispersal of activated sludge flocs. *J.Appl. Bact.*, 33:656-663.

crescimento celular microbiano através da leitura da turvação do meio, reação colorimétrica, degradação de um composto orgânico sólido (como fita de papel de celulose) e determinação de produtos metabólicos no meio, como gases, ácidos e álcoois (VAZOLLER, 1995). O NMP é também denominado método de diluição definitivo ou simplesmente método das diluições (COCHRAN, 1950; ALEXANDER, 1982).

Segundo ATLAS & BARTHA (1981), o método do NMP pode ser utilizado para estimar a população total ou um grupo específico de microrganismos em uma amostra. Podem ser utilizadas de três a dez réplicas por diluição, em que a leitura do crescimento celular em cada frasco é realizada, e o conjunto de respostas positivas ou negativas, será considerado para o cálculo estimativo do número de organismos na amostra. O método não procura quantificar o número de microrganismos presentes nas diluições positivas. O método do NMP é rápido, permite combinações para culturas específicas com amostra de diferentes origens e não elimina possíveis interações microbianas em pequenos flocos. Considerando um aspecto do metabolismo celular, pode-se avaliar quantitativamente algum grupo específico de microrganismo. Este método tem sido utilizado para determinar o número de coliformes e estreptococos fecais e totais em amostras de água. Nas contagens os tubos considerados positivos apresentam turvação e/ou produção de gás.

DUBOURGUIER⁵ apud GIAJ-LEVRA (1991) definiu o NMP como um método muito simples para quantificar anaeróbios em um sistema, apesar de necessitar de elevados tempos de incubação. A facilidade de inoculação dos frascos ou tubos de ensaio, contendo meios de cultura, é um aspecto positivo do método. A leitura dos resultados pode necessitar exames microscópicos e análises cromatográficas.

WILLIAMS, A.R.; FORSTER, C.F.; HUGHES, D.E. (1971) Using the ultrasonic technique in the enumeration of activated sludge bacteria. *Effluent Wat. Treat. J.* 11:83-86.

⁵ DUBOURGUIER, H.C. (1988). Cursos de ecologia da digestão anaeróbia e bioquímica da digestão anaeróbia. São Paulo, CETESB. 149 p.

ALEXANDER (1982) utilizou o método do NMP para contar o número de indivíduos em populações microbianas de solo, concluindo que as respostas do método são bastante confiáveis e precisas com a utilização de um maior número de réplicas. Isso permite a avaliação da reprodutibilidade dos valores obtidos. A composição do meio de cultura e as condições de crescimento devem favorecer o desenvolvimento do microrganismo em questão.

BATTERSBY⁶ et al. apud SAKAMOTO (1996) utilizaram a método do NMP para a contagem de bactérias redutoras do íon sulfato presentes em amostras de consórcios microbianos. Para reduzir o meio de cultura foram empregadas bactérias heterótrofas da espécie *Pseudomonas putida*. Os frascos com resultados positivos obtiveram uma coloração escura. A coloração escura foi resultante de reações químicas que ocorreram, como o consumo do oxigênio e a redução de sulfato (formação de sulfeto e sulfito = coloração escura), sendo assim esta é uma forma de leitura, pois indica que no meio há a presença de BRS, pois houve a redução de sulfato.

Os estudos realizados por GIAJ-LEVRA (1991) para quantificar bactérias anaeróbias celulolíticas pelo método do NMP utilizando dez inóculos diferentes, incluindo chorume, lodo e solo (anteriormente citado), mostrou que os valores obtidos foram bastante confiáveis e encontram-se na Tabela 1. As diluições do NMP foram realizadas em quintuplicata, e a leitura dos frascos foi feita pela visualização da degradação da fita de celulose, colocada no frasco de modo a manter 5g/L de celulose total. O aparecimento de coloração amarela nas fitas de celulose (pontos amarelos) também era considerada leitura positiva.

Tabela 1: Valores obtidos por GIAJ-LEVRA (1991) na quantificação de bactérias anaeróbias celulolíticas pelo método do NMP de dez inóculos diferentes

⁶BATTERSBY, N.S.; STEWART, D.J.; SHARMA, A.P. (1985) A simple most probable number method for the enumeration of sulphate-reducing bacteria in biocide containing waters. *Journal of Applied Bacteriology*, n58, p.425-429.

Amostras	Números obtidos (células/mL)
chorume	$7,5 \times 10^4 - 4,3 \times 10^5$
solo	$4,3 \times 10^5 - 4,3 \times 10^6$
fluido de rúmen proveniente de matadouro	$2,1 \times 10^7 - 4,3 \times 10^7$
fluido de rúmen proveniente de digestor	$3,9 \times 10^9 - 1,5 \times 10^{10}$
lodo de esgoto em digestão	$2,3 \times 10^5 - 1,5 \times 10^7$
provenientes de DAFA tratando esgoto	$1,0 \times 10^5 - 9,3 \times 10^5$
provenientes de DAFA tratando vinhaça	$4,3 \times 10^5 - 9,3 \times 10^6$
amostras de lagoa de estabilização	$4,3 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$
lagoa anaeróbia	$9,3 \times 10^5 - 4,3 \times 10^6$
sedimento de represa	$4,3 \times 10^5 - 1,5 \times 10^7$

BARLAZ et al. (1989a) avaliaram seis diferentes técnicas de preparo de amostras sólidas, triturando o resíduo sólido urbano para desprendimento dos microrganismos anaeróbios da matéria sólida, o inóculo líquido resultante foi submetido à contagem pelo método do NMP para estimar o número de bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas. Obtiveram resultados das contagens entre $0,7$ e $12,7 \times 10^4$ cel./g de ST, nas seis diferentes técnicas de preparo de amostra, indicando que todas foram efetivas no desprendimento de células do resíduo. Os autores optaram pela técnica mais simples quanto à manipulação e assumiram que a metodologia poderia ser utilizada em outros grupos microbianos.

BARLAZ et al. (1989b), após terem definido a técnica de preparo da amostra sólida, estudaram em amostras de aterro sanitário simulado em escala de laboratório, as populações anaeróbias de celulolíticas, acetogênicas e metanogênicas e as características químicas (pH, produção de metano acumulada e composição de gases) da degradação do resíduo sólido. Realizaram contagem de celulolíticas, acetogênicas e metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas e os resultados obtidos foram de $2,4 - 5,9$ (log de células/g de peso seco), de $2,0 - 7,6$ (log de células/g de peso seco) e $2,2 - 8,7$ (log de células/g de peso seco), respectivamente. Essas simulações de

aterro eram desmanteladas semanalmente para realizações de análises químicas e microbianas.

VAZOLLER (1995b) avaliou um ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo operado à temperatura $56 \pm 1^\circ\text{C}$, com vinhaça e inoculado com lodo de esgoto e estrume bovino; realizou enriquecimentos do lodo granulado com os meios BCYT e ZINDER e fontes orgânicas, observou-os em microscopia comum, de contraste de fase e de fluorescência. Avaliou quantitativamente pelo método do NMP, grupos bacterianos anaeróbios termófilos metanogênicos e não-metanogênicos, utilizando meio ZINDER e fontes de carbono específicas; isolou e caracterizou culturas metanogênicas e não-metanogênicas; realizou ensaios cinéticos determinando a velocidade de crescimento e tempos de geração das culturas de bactérias isoladas. O número de bactérias não metanogênicas e metanogênicas, nas distintas fontes de carbono foram respectivamente, em meio contendo glicerol de $10^6 - 10^8$ células/mL e $10^6 - 10^7$ células/mL; em lactato de sódio de 10^9 células/mL nos dois grupos; em succinato de sódio de 10^3 células/mL em ambos os grupos; e em acetato de sódio de 10^9 células/mL e de $10^7 - 10^8$ células/mL.

O NMP foi utilizado no trabalho de GOMES (1995) para quantificar bactérias anaeróbias celulolíticas do chorume provenientes de resíduos sólidos urbanos a céu aberto, obtendo resultados na faixa de $2,3 \times 10^4$ células/mL (cerca de 10^5 bactérias/g de ST), e estiveram de acordo com os encontrados na literatura, como os de BARLAZ et al. (1989a) que obtiveram 10^4 bactérias/g Resíduo Seco.

SAKAMOTO (1996) estudou o comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo granulado anaeróbio metanogênico, submetido a crescente adições de sulfato, e propôs uma leitura para a contagem de bactérias redutoras do íon sulfato pelo método do NMP, com fitas de papel filtro e placas de microtitulação detectando o sulfeto pela presença de uma coloração marrom escura. Os resultados obtidos nas contagens pelo NMP foram de 4,36 a 12,18 (log de células/mL) para as

bactérias redutoras de sulfato (BRS) e de 6,08 a 7,97 (log de células/mL) para as metanogênicas.

GROTENHUIS et al. (1991) estudaram a composição bacteriológica e a ultra-estrutura do lodo granulado metanogênico mesófilo de um reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) tratando resíduo de indústria de açúcar. Observou, aplicando o NMP com meio de cultura contendo propionato como fonte de carbono, que as espécies hidrogenotróficas e acetoclásticas mais abundantes foram *Methanobrevibacter arboriphilicus* e *Methanothrix soehgenii*.

A realização de um estudo comparativo por PASSIG (1997), sobre a degradação de compostos orgânicos em biofilmes formados em meio de suporte e grânulos desenvolvidos em um filtro biológico, e empregando o NMP para a contagem de bactérias presentes revelou que, após 30 dias de inoculação, os grânulos e flocos formados no interior do reator foram mais ativos que o biofilme aderido no material suporte e a média de valores obtidos foram, respectivamente, de $7,5 \pm 1,3$ e $6,10 \pm 1,4$ Log(NMP/mL).

3.4 Biotratamento anaeróbio de resíduos sólidos domésticos - ênfase ao aterro sanitário

Segundo VIEIRA (1984)⁷ apud VILLAS BÔAS (1990), no aterro sanitário ocorre a decomposição da matéria orgânica por microrganismos pouco conhecidos, que produzem metano e outros gases, processo denominado de digestão anaeróbia, sendo similares aos do ambiente natural, como sedimentos de rios, lagos e oceanos, pântanos, solos e trato digestivo de ruminantes.

⁷ VIEIRA, S.M.M.(1984). Tratamento de esgotos por digestores anaeróbios de fluxo ascendente. Revista DAE, 44:322-328.

Em 1985, POHLAND & HARPER⁸, apud VILLAS BÔAS (Op. cit.), propuseram um modelo de decomposição anaeróbia, em fases para um aterro sanitário, a partir de um estudo realizado em escala piloto de aterro sanitário acelerado pela recirculação do percolado, obtido na segunda fase.

Fase I - Fase lag ou de ajustamento inicial, em que o resíduo é colocado e o aterro é fechado;

Fase II - Transição, em que a umidade excede a capacidade de campo no sistema, ocorrendo a formação de percolado com concomitante diminuição do oxigênio, seguindo-se o desaparecimento dos microrganismos aeróbios e o surgimento dos anaeróbios, e portanto, ocorrência de metabolismos com outros aceptores de elétrons como nitrato e sulfato, geração de dióxido de carbono, presença de ácidos orgânicos voláteis no percolado, e estabelecimento de um ambiente redutor;

Fase III - Formação de ácidos, no qual predominam os ácidos orgânicos voláteis resultantes da hidrólise e fermentação contínua dos constituintes do resíduo e percolado, verificando-se a diminuição do pH, mobilização e possível complexão dos metais, liberação de nitrogênio e fósforo, utilização desses nutrientes para o crescimento da biomassa, detecção de hidrogênio cuja presença pode afetar a natureza e os tipos dos produtos intermediários formados no sistema;

Fase IV - Fermentação a metano, em que os produtos intermediários são convertidos a metano, o pH está próximo ao neutro, o potencial de oxi-redução apresenta valores muito negativos, os nutrientes continuam a ser consumidos e a complexão e precipitação de metais mantém-se, o conteúdo de matéria orgânica diminui com respectivo aumento da produção de gás;

⁸ POHLAND, J.G.; HARPER, S.R. (1985) Critical reviews and summary of leachate and gas production from landfills. Atlanta, Georgia Institute of Technology, School of Civil Engineering, 165p.

Fase V - maturação final, em que verifica-se a estabilização dos constituintes orgânicos disponíveis no resíduo sólido e percolado pela atividade biológica, limitação de nutrientes, valores não mensuráveis de produção de gás, reaparecimento lento de substâncias oxidadas e de oxigênio, com consequente aumento do potencial de oxi-redução, bioconversão lenta da matéria orgânica, com provável produção de ácidos húmicos capazes de se ligarem a metais pesados.

Um outro trabalho de pesquisa realizado por ROBINSON (1986) apresentou o aterro sanitário como um projeto de confinamento de resíduos sólidos, em que são lentamente degradados por microrganismos até a estabilização completa de compostos orgânicos. O autor propôs três fases distintas de decomposição dentro do aterro, sendo a primeira fase aeróbia, em que os resíduos sólidos sofrem a reação rapidamente com o oxigênio e formam dióxido de carbono e água, acompanhado do aumento da temperatura e crescimento dos microrganismos. Nessa fase, parte do dióxido de carbono pode se dissolver na água e formar ácidos fracos que atuam sobre minerais. A equação 1 mostra, simplificadamente a decomposição aeróbia:

Após o consumo do oxigênio, seguem-se dois estágios de decomposição anaeróbia, em que moléculas orgânicas complexas são quebradas em moléculas simples como hidrogênio, amônia, dióxido de carbono e ácidos inorgânicos. A equação 2 exemplifica a decomposição da matéria orgânica a ácidos orgânicos, na ausência de oxigênio:

Resíduos sólidos complexos são degradados, inicialmente, por microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, seguidos dos anaeróbios estritos. No terceiro estágio, os microrganismos metanogênicos formam metano a partir de dióxido de carbono, hidrogênio, bem como de ácido acético. A produção de metano a partir do ácido acético pode ser demonstrada na equação 3:

O metano produzido pelas células metanogênicas pode ficar acumulado no sistema, e bactérias aeróbias metilótrofas podem utilizar parte do metano produzido, porém, a maior parte é dissipada para a atmosfera. Segundo MADIGAN et al. (1997), a quantidade estimada dissipada de metano, proveniente de aterro sanitário, para a atmosfera é de 5×10^{12} - 70×10^{12} g/ano.

3.4.1 Aspectos termodinâmicos da biodigestão anaeróbia

Nos reatores anaeróbios ocorre uma série de reações químicas, nas quais os microrganismos degradam moléculas e os seus produtos serão utilizados por outros grupos. Para a ocorrência natural dessas reações é necessário que alguns fatores sejam favoráveis, como por exemplo a pressão parcial de hidrogênio, e o encadeamento de reações favoreça o processo global.

As reações termodinâmicas em reatores anaeróbios serão aqui analisadas através da variação de energia livre padrão, ou seja, considerando-se o pH 7,0 e 1 atm. A Tabela 2 ilustra a variação de energia livre padrão de algumas reações importantes no processo de biodigestão anaeróbia.

A Tabela 2 mostra que as reações acetogênicas são desfavoráveis em condições padrões. No entanto, para a formação de metano as reações são favoráveis, as archeas metanogênicas necessitam de acetato, favorecendo a ocorrência das reações anteriores e que o equilíbrio das reações acetogênicas seja deslocado para a direita, através da remoção de hidrogênio do meio por bactérias consumidoras de hidrogênio (ZEIKUS et al., 1975 apud SPEECE, 1983; ZEHNDER, 1988; FORESTI, 1994).

Tabela 2: Variação de energia livre padrão de algumas reações importantes no processo de biodigestão anaeróbia.

Equação	ΔG° (kJ/reação)
Acetogênicas produtoras de H_2	
$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 9,6
$CH_3CH_2COO^- + 3 H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 3H_2 + HCO_3^-$	+ 76,1
$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2 H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 48,1
$C_7H_5O_2 + 7 H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + 3H^+ + 3H_2 + HCO_3^-$	+ 53
Metanogênica utilizadora de H_2	
$4H_2 + HCO_3^- \rightarrow CH_4 + 3 H_2O$	- 135,6
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	- 130,4
Metanogênica acetoclástica	
$4HCOO^- + 4H^+ \rightarrow CH_4 + 3 CO_2 + 2 H_2O$	- 119,5
$4CH_3COH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2 H_2O$	- 103

FONTE: Modificado de ZEHNDER (1988)

O efeito da pressão parcial de hidrogênio na variação de energia livre padrão pode favorecer a ocorrência de algumas reações desfavoráveis, tais como, a oxidação de ácido butírico torna-se favorável à pressão parcial de hidrogênio menor ou igual a 10^{-3} atm.; a formação de acetato a partir de ácido propiônico torna-se termodinamicamente favorável à pressão parcial de hidrogênio menor que 10^{-4} atm.; à pressão parcial de hidrogênio próxima de 1 atm., as reações de oxidação de etanol e lactato são inibidas; a respiração metanogênica do bicarbonato é mais favorável que a metanogênese a partir de acetato à pressão parcial de hidrogênio acima de 10^{-4} atm. (FORESTI, 1994). De acordo com SPEECE (1983) a ação das metanogênicas utilizadoras de hidrogênio mantém a pressão parcial de hidrogênio extremamente baixas, propiciando que ácidos voláteis de cadeia longa como o propiônico e o butírico não fiquem acumulados no sistema. Este processo ocorre eficientemente em direção à produção de metano. Este fenômeno denominado transferência de hidrogênio interespecie é extremamente importante para a biotecnologia anaeróbia. A Figura 2 mostra a relação da variação de energia livre padrão com a pressão parcial de hidrogênio.

Figura 2: Representação gráfica das relação da pressão parcial de hidrogênio e ΔG^0 com as respirações acetogênicas e inorgânicas. (1) ácido propiônico a acetato; (2) ácido butírico a acetato; (3) etanol a acetato; (4) ácido láctico a acetato; (5) respiração acetogênica de bicarbonato; (6) respiração metanogênica de bicarbonato; (7) respiração de sulfeto a sulfato; (8) respiração de sulfeto a sulfato; (9) metanogênese do acetato; (10) oxidação de acetato pelas BRS. As concentrações são: acetato 25mM; ácidos propiônico, butírico, láctico e etanol 10mM; sulfato e sulfeto 5mM; bicarbonato 20mM; metano 0,7 atm. (FONTE: HARPER & POHLAND, 1986 apud FORESTI, 1994)

3.4.2 Fatores ambientais importantes no processo de biodigestão anaeróbia

De acordo com RHYNER et al. (1995), o tratamento biológico de resíduos sólidos é realizado através de processos nos quais participam microrganismos que degradam ou modificam a matéria orgânica de forma controlada. Esses microrganismos são sensíveis às mudanças nas condições ambientais, tais como, temperatura, pH, concentração de oxigênio, presença de compostos tóxicos.

Com relação aos fatores ambientais determinantes no processo de biodigestão anaeróbia, os mais importantes são temperatura, valores de pH, potencial de oxidação-redução e substrato. DIAZ et al. (1993) descrevem esses fatores essenciais na manutenção do processo de biodigestão anaeróbia. A temperatura influencia diretamente a taxa de digestão, manifestada na produção de gás e conversão de ácidos voláteis. Com o aumento da temperatura de 38 a 42°C ocorre um aumento da produção de gás e volatilização da matéria orgânica. Acima destes valores, até 45°C ocorre gradualmente, um declínio da produção de gás, sendo interrompido até a ocorrência de uma possível adaptação alcançando valores acima de 50°C. Portanto, a cultura pode ser adaptada, de termotolerante torna-se termofílica. Para que isso ocorra há a necessidade de existir culturas que tenham esta capacidade.

As metanogênicas são mais sensíveis às alterações ambientais (pH, temperatura e presença de compostos tóxicos) do que as hidrolíticas e acetogênicas. A tolerância de valores de pH para as metanogênicas encontra-se na faixa de 6,5 a 7,5, já para os outros grupos está entre 4,5 a 7,5. As metanogênicas são sensíveis à exposição ao oxigênio, inibindo o seu crescimento, (BRUMMELER, 1993; DIAZ et al., 1993).

Em análises realizadas por BRUMMELER (1993), utilizando bicarbonato de sódio (NaHCO_3) para controle de pH em reatores anaeróbios com sistemas "Dry digestion" tratando a fração orgânica de resíduos sólidos municipais, os melhores resultados que obteve foi com a adição de 0,06Kg NaHCO_3 /Kg de ST. Em experimentos realizados analisando diferentes temperaturas (14-20°C; 35-40°C; 55°C), os melhores resultados de produção de metano foram a 40°C, concluiu que a produção de metano é mais afetada pela temperatura do que pela formação de ácidos.

3.5 Aspectos da microbiologia da biodigestão anaeróbia de resíduos sólidos

Numa revisão feita por BARLAZ et al. (1990), os estudos iniciais sobre microbiologia de aterro sanitário foram direcionados para a contagem de bactérias

fecais e patogênicas, avaliando-se os problemas relacionados ao resíduo e ao chorume produzido no aterro. Contagem de fungos, de bactérias anaeróbias heterotróficas, de celulolíticas, proteolíticas, redutoras de sulfato, atividade metanogênica, medida da atividade enzimática, estudos da população metanogênica utilizadora de hidrogênio e dióxido de carbono e de acetato foram realizados posteriormente.

De acordo com PALMISANO & BARLAZ (1996), a composição do resíduo é muito heterogênea, podendo variar com o clima, sazonalmente, fatores sócio-econômicos e com o tipo de disposição dos resíduos. Sendo que, esta heterogeneidade na composição cria dificuldades para a obtenção de amostras representativas. Além disso, cada amostra de resíduo constitui uma ampla faixa de moléculas orgânicas, e isso influencia na composição microbiana, em outras palavras, causa o aparecimento de uma variedade de espécies nos grupos microbianos anaeróbios encontrados nos resíduos sólidos. RHYNER et al. (1995) comentaram que alguns compostos contendo nitrogênio e enxofre são encontrados em muitos resíduos, sendo convertidos à amônia e sulfato na degradação anaeróbia por grupos microbianos peculiares, como no último caso, bactérias fotossintetizantes anaeróbias descritas por VARESCHE (1997).

As comunidades microbiológicas em aterros e biodigestores anaeróbios incluem bactérias hidrolíticas e fermentativas, acetogênicas e redutoras de sulfato; arqueas metanogênicas; protozoários (PALMISANO & BARLAZ, Op.cit.). Os fungos e bactérias aeróbias podem ser encontrados na etapa inicial, principalmente na degradação de material celulósico (VAZOLLER, 1995). De acordo com MADIGAN (1997), também podem ser evidenciados determinados protozoários. FINLAY & FENCHEL (1991) comentaram a existência de protozoários associados a organismos produtores de metano em aterros sanitários e discutiram sobre a necessidade de evidenciar a importância desses organismos no processo biológico que ocorre nesses ecossistemas artificiais.

Geralmente, os fungos requerem substratos orgânicos como fonte de energia, encontrando-se espécies capazes de degradar moléculas complexas como as de lignocelulose, o maior componente da madeira e de resíduos de papel. Geralmente, são de grande importância na degradação de resíduos sólidos, mas não possuem o mesmo significado para o tratamento de águas residuárias, RHYNER et al. (1995).

O processo biológico anaeróbio envolve várias etapas na decomposição de complexos orgânicos e lignocelulósicos a metano e dióxido de carbono, como mostra a Figura 3. Vários grupos de microrganismos estão envolvidos nessas reações de despolimerização, acidogênese fermentativa, acetogênese, homoacetogênese e metanogênese (ZINDER, 1993)⁹ apud PALMISANO & BARLAZ, 1996. Para uma fermentação balanceada há necessidade de um consórcio microbiano para que haja a oxidação de substratos e remoção de ácidos inibidores, de elétrons e de hidrogênio para a formação de metano.

A primeira etapa da digestão anaeróbia de resíduos sólidos urbanos é fundamental, a despolimerização de macromoléculas em moléculas menores. Na literatura, esta etapa é denominada hidrólise, mas de acordo com DIAZ et al. (1993) e PALMISANO & BARLAZ (1996) é uma etapa da despolimerização, sendo caracterizada pela produção de enzimas extracelulares pelos microrganismos. Os substratos convertidos são assimilados e metabolizados pelas células microbianas após a ação enzimática. Bactérias hidrolíticas são responsáveis pela despolimerização destes polímeros orgânicos e fermentação a ácidos orgânicos, álcoois e substratos metanogênicos. Em biodigestores anaeróbios contendo resíduos sólidos urbanos somente 50% da matéria orgânica, medida em sólidos voláteis, são despolimerizadas. Essa é uma etapa lenta e muitas vezes, limitante do processo.

⁹ZINDER, S.H. (1993). Physiological ecology methanogens, in J.G. Ferry (Ed.) , *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry, and Genetics*. Chapman and Hall, New York, pp. 128-206

Figura 3: Principais reações na decomposição de polímeros complexos no processo biológico anaeróbico (Fonte: adaptado de PALMISANO & BARLAZ, 1996)

Em experimentos de laboratório, BARLAZ et al. (1989b) descreveram o processo biológico num aterro sanitário em escala piloto, com reciclo de percolado, em quatro fases, não muito distintas de POHLAND & HARPER¹⁰, apud VILLAS BÔAS (Op. cit.): - aeróbia; - anaeróbia ácida; - produção de metano acelerada; - produção de metano desacelerada. Na fase aeróbia, o oxigênio e o nitrato foram consumidos e os açúcares oxidados a dióxido de carbono e água. Na fase anaeróbia ácida, somente atividade anaeróbia foi observada, na qual verificou-se o acúmulo de ácidos carboxílicos devido à oxidação de uma parte dos açúcares presentes na fase aeróbia, e diminuição do pH de 7,5 para a faixa de 5,7 a 6,2. A hidrólise de celulose e hemicelulose não foi muito efetiva nesta fase, mas constatou-se uma alta concentração de dióxido de carbono. Na fase 3, denominada de produção acelerada de metano verificou-se um aumento considerável na produção desse gás, atingindo a

¹⁰ POHLAND, J.G.; HARPER, S.R. (1985) Critical reviews and summary of leachate and gas production from landfills. Atlanta, Georgia Institute of Technology, School of Civil Engineering, 165p.

maior taxa de sua produção. Observou-se também um decréscimo da concentração de ácido carboxílico e um aumento do valor do pH de 6,2 para 7,9, com concomitante evolução no número da população de bactérias acetogênicas e metanogênicas, estas últimas responsáveis pelo grande consumo de acetato e hidrogênio. Na fase 4, produção desacelerada de metano, ocorreu a diminuição da produção de metano e o pH atingiu valores acima de 8,0. Verificou-se a quantidade máxima de sólidos decompostos.

No Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP têm sido desenvolvidos estudos nas áreas fundamentais e de tecnologia de aterros sanitários e de biorreatores anaeróbios como solução para os resíduos sólidos urbanos. Podendo ser citados os trabalhos de VILLAS-BÔAS (1990), GIAJ-LEVRA (1991), BADRA (1993), GOMES (1995), CATELLI (1996), LEITE (1997), e BALDOCHI (1997).

BALDOCHI (1997) estudou o percolado proveniente da digestão anaeróbia da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos, avaliando qualitativamente e quantitativamente os ácidos voláteis e solventes orgânicos em reatores com e sem inoculação e também avaliou a eficiência da digestão anaeróbia. Foram construídos dois biorreatores de 236L, sendo que em um deles foi adicionado água para se obter a umidade de saturação e no outro foi acrescido percolado proveniente de aterro sanitário com idade de oito anos, em fase metanogênica e foi neutralizado para garantir condições ambientais e aumentar a atividade bacteriana. Realizou ensaios biológicos em reatores menores de 350mL e de 1000mL para avaliar o potencial de biodegradabilidade. Em frascos semelhantes conduziu ensaios de enriquecimento utilizando diferentes fontes de carbono e determinou a atividade metanogênica das amostras. Foram examinadas as morfologias celulares, sendo os principais tipos morfológicos encontrados no biorreator inoculado semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp e bacilos não fluorescentes. Nos biorreatores inoculados verificaram-se maiores atividades metanogênicas para os ácido acético e butírico. No biorreator não inoculado as maiores atividades metanogênicas foram na presença dos álcoois butanol e metanol. A matéria orgânica presente no biorreator inoculado

obteve uma redução de 75,6% da DQO e no biorreator não inoculado foi de somente 38%.

3.5.1 Bactérias celulolíticas e arqueas metanogênicas em sistemas de tratamento anaeróbio de resíduos sólidos

A conversão da matéria orgânica complexa como, por exemplo, a celulose a metano e dióxido de carbono acontece pela interação entre culturas microbianas. A formação de metano ocorre a partir da degradação de moléculas complexas, nos quais vários tipos de microrganismos participam do processo, os intermediários metabólicos de um grupo microbiano podem servir de substrato a outros grupos, caracterizando uma relação denominada sintrófica (FENCHEL & FINLAY, 1995; SCHINK, 1997). A Tabela 3 contém alguns exemplos de microrganismos anaeróbios presentes em resíduos sólidos, lodo de esgoto, rúmen e ambiente natural, os substratos preferenciais utilizados e os tipos morfológicos característicos dos grupos apresentados (BERGEY'S, 1989). As arqueas metanogênicas apresentadas na Tabela 3, identificadas com a utilização de sondas genéticas, foram isoladas por RASKIN et al. (1994)¹¹ apud PALMISANO & BARLAZ(1996), em digestores contendo resíduo sólido urbano ou lodo de esgoto, e os tipos morfológicos estão de acordo com o Manual BERGEY'S (1989).

Os microrganismos celulolíticos são de grande importância em alguns processos industriais de fermentação, bem como em digestores anaeróbios nas relações sintróficas com as metanogênicas na conversão de material lignocelulósicos em biogás. Ocupam uma variedade de habitats, alguns vivem livres no ambiente convertendo materiais celulósicos, outros vivem associados a animais celulolíticos, no intestino de cupins e de ruminantes BAYER et al. (1996).

¹¹ RASKIN, L.; POULSE, L.K.; NOGUERA, D.R.; RITMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994) Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Envir. Microbiol.* 60:1241-1248.

A celulose representa a maior fonte renovável de matéria orgânica do planeta, é um polímero de glicose muito estável. A adesão de bactérias celulolíticas à fibras de celulose é o primeiro acontecimento do processo de degradação. Há uma estrutura na superfície da célula, o celulosoma, composta por complexos protéicos e consiste em diferentes subunidades enzimáticas, com um potencial catalítico para uma eficiente solubilização de componentes celulósicos recalcitrantes (BAYER et al., 1996). A hidrólise da celulose é uma etapa limitante do processo (SHARMA & HOBSON, 1985)¹² apud CAILLIEZ (1993).

A capacidade de degradação da celulose é característica de uma ampla diversidade de fungos e bactérias aeróbios, anaeróbios facultativos e estritamente anaeróbios. Muitas bactérias anaeróbias celulolíticas têm sido descritas por vários autores em diferentes ambientes, tais como no intestino humano, rúmen bovino, solo, sedimento marinho, sedimento de rios e lagos e em decomposição vegetal (KHAN & PATEL, 1988; CAILLIEZ et al., 1993; FELIX & LJUNGDAHL, 1993; BÉGUIN & AUBERT, 1994; GOMES, 1995; BAYER et al., 1996).

¹² (SHARMA, V.K.; HOBSON, P.N. (1985). Isolation and cellulolytic activities of bacteria from a cattle waste anaerobic digester and the properties of some *Clostridium* species. *Agric. Wastes*, 14: 173-196.

Tabela 3: Microrganismos anaeróbios celulolíticos e metanogênicos presentes na biodegradação de resíduos sólidos e ambientes diversos

Microrganismos celulolíticos	Habitat	Morfologia
<i>Fibrobacter</i>	Rúmen	Bacilos
<i>Bacteroides</i>	Rúmen	Bacilos retos e curvos
<i>Acetivibrio</i>	Lodo de esgoto	Bacilos retos a curvos, simples, pares ou cadeias
<i>Butyrivibrio</i>	Rúmen e fezes humanas	Bacilos curvos simples ou em cadeia
<i>Ruminococcus</i>	Rúmen	Cocos, diplococos e em cadeia
<i>Clostridium</i>	Rúmen	Bacilos formadores de esporos
Microrganismos metanogênicos	Substrato	
<i>Methanobacterium</i>	H ₂ /CO ₂ ou formiato	Bacilos curtos, longos, curvos e retos e filamentosos (fluorescentes)
<i>Methanobrevibacter</i>	H ₂ /CO ₂ ou formiato	Bacilos curtos (fluorescentes)
<i>Methanosphaera</i>	H ₂ e metanol	Cocos (fluorescentes)
<i>Methanococcus</i>	H ₂ /CO ₂ ou formiato, metanol, acetato, metilaminas, piruvato + CO ₂	Cocos irregulares (fluorescentes)
<i>Methanosaeta</i> *(RSU)	acetato	Bacilos formadores de filamentos longos, fechados em bainha
Methanosarcinaceae *(RSU)		

<i>Methanosarcina</i> *(RSU)	H ₂ /CO ₂ , metanol, acetato, metilaminas	Cocos agrupados (sarcinas fluorescentes)
<i>Methanospirillum</i>	H ₂ /CO ₂ ou formiato	Bacilos curvos e filamentos ondulantes (fluorescentes)
<i>Methanogenium</i> *(RSU)	H ₂ /CO ₂ ou formiato	Cocos irregulares, simples ou aos pares (fluorescentes)
Methanococcales *(RSU)	H ₂ /CO ₂ ou formiato	Cocos irregulares (fluorescentes)
Methanobacteriales *(RSU)	H ₂ /CO ₂ ou formiato, H ₂ /CO ₂ e formiato	Bacilos curtos, em forma de lança, cocos e filamentos (fluorescentes)
<i>Methanomicrobium</i>	H ₂ /CO ₂ ou formiato	Bacilos móveis, curtos, curvos ou retos (fluorescentes)

FONTE: Modificada de MARTY(1984)¹³ apud BALDOCHI (1997), de MADIGAN (1997) e de ZEHNDER (1988);*FONTE: RASKIN (1994) apud PALMISANO & BARLAZ(1996) *em digestores com RSU e as sondas utilizadas; Manual BERGEY'S (1989).

¹³ MARTY, B. (1984). Microbiology of anaerobic digestion. In: Anaerobic digestion of the sewage, sludge and organic agricultural waste. Edites by Bruce A.M., Kouzeli-Katsiri, A., Newman, P.J.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento deste capítulo realizar-se-á em etapas, com uma introdução sumária e uma descrição pormenorizada de cada uma das etapas deste trabalho de pesquisa.

Previamente à obtenção das amostras de resíduos sólidos a serem utilizadas na montagem dos biorreatores do presente estudo, acompanhou-se a caracterização dos resíduos sólidos urbanos domiciliares (RSUD) de São Carlos (Estado de São Paulo), coletados em determinadas áreas do município. Esse levantamento foi feito pelo Grupo de Pesquisadores sobre resíduos sólidos, do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, com a finalidade de caracterizar a matéria prima para a preparação de um resíduo sólido urbano domiciliar padrão (RSUDp), empregado em diferentes experimentos pelo referido grupo (PINTO, 1998).

Os experimentos realizados nessa Dissertação de Mestrado compreenderam:

- Preparação do RSUDp
- Montagem e operação de três biorreatores (fase I) de volume igual a 2,0L, para o tratamento anaeróbio de RSUDp, inoculados com lodo granulado anaeróbio em digestão, proveniente de um biorreator UASB (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) operado para o tratamento de águas residuárias de indústria de papel e celulose (CALLADO, 1998)¹⁴
- Realização de testes para avaliação de três métodos (ultra-som, agitação mecânica e manual, agitação mecânica por liquidificador) que indicassem o

¹⁴ CALLADO, N.H. (1998). (USP Escola de Engenharia de São Carlos. Departamento de Hidráulica e Saneamento - Laboratório de Processos Anaeróbios) / Trabalho de Doutorado em andamento.

tratamento mais adequado de amostras de RSUDp em digestão, retiradas dos biorreatores anaeróbios, a serem submetidas a análise estimativa do Número Mais Provável (NMP) de bactérias celulolíticas e de células procarióticas do grupo metanogênico;

- Montagem e operação de dois biorreatores (fase II) de volume igual a 2,0L, para o tratamento anaeróbio de RSUDp, inoculados com percolado oriundo de um biorreator de volume igual a 236L, operado em batelada para a estabilização de resíduos sólidos eminentemente doméstico (BALDOCHI, 1997). Os biorreatores foram reinoculados com lodo granulado proveniente de um biorreator tratando esgoto sanitário inoculado com lodo granulado de UASB operado para o tratamento de águas residuárias de indústria de alimentos (TORRES, 1998)¹⁵ e percolado (BALDOCHI, 1997);
- Realização de contagens pelo método estimativo do NMP de bactérias celulolíticas em um dos biorreatores (biorreator I);
- Realização de contagens pelo método estimativo do NMP de bactérias acetogênicas e de células procarióticas do grupo metanogênico em um dos biorreatores (biorreator II).

A Tabela 4 relaciona as fases I e II, e indica os ensaios realizados em cada fase.

Tabela 4: Fases I e II e ensaios realizados.

FASES		ENSAIOS
Fase I	☐	Preparo do resíduo sólido urbano domiciliar padrão(RSUDp)
	☐	Preparo e operação dos biorreatores da fase I
	☐	Procedimentos para determinação de metodologia para tratamento de amostras de RSUDp utilizando-se o método de contagem do NMP
Fase II	☐	Inoculação e reinoculação dos biorreatores da fase II
	☐	Operação dos biorreatores
	☐	Análises quantitativas de grupos microbianos nos biorreatores I e II

¹⁷ TORRES, P.T. (1998). (USP Escola de Engenharia de São Carlos. Departamento de Hidráulica e Saneamento - Laboratório de Processos Anaeróbios) / Trabalho de Doutorado em andamento.

4.1 Preparo do Resíduo Sólido Urbano Domiciliar Padrão da fase I

4.1.1 Composição do RSUDp

PINTO (1998) estabeleceu os critérios para a definição da composição física do RSUDp, após análise dos resíduos previamente coletados e estudados em áreas do município de São Carlos. A composição do RSUDp está relacionada na Tabela 5. Esse resíduo foi utilizado nos ensaios com os biorreatores para obtenção das amostras de resíduos sólidos a serem estudadas por método quantitativo do NMP.

Tabela 5: Composição do Resíduo Sólido Urbano Domiciliar Padrão

COMPOSIÇÃO	% dos componentes do RSUDp
Casca/bagaço Laranja	17,85
Casca Banana	3,80
Pedaços Tomate	4,55
Casca Melancia	3,80
Casca Batata crua	5,50
Casca/pedaços Cebola	2,36
Casca Abobrinha crua	1,57
Casca/pedaços Mandioca crua	1,57
Casca/pedaços Batata cozida	1,35
Pedaços Mandioca cozida	2,71
Alface	3,85
Repolho	1,92
Couve-flor	1,45
Pão	2,92
Pele/pedaços frango cru	1,27
Pedaços carne boi crua	0,80
Café	3,50
Folhas Secas	9,18
Folhas Verdes	1,62
Queijo	0,38
Arroz	11,19
Feijão	4,70
Macarrão	2,19
Osso de Frango	1,79
Papel úmido	5,04
Casca de ovo	3,16

Fonte: adaptado de PINTO (1998)

4.1.2 Coleta e preparação do Resíduo Sólido Urbano Domiciliar padrão (RSUDp)

O RSUDp foi obtido diretamente das residências e armazenado sob refrigeração até o momento de sua utilização. Resíduos de varrição (folhas verdes e secas) foram coletados na rua e também diretamente de árvores, mantendo-se um padrão do tipo de folhagem. Para a manipulação do RSUDp empregaram-se pinças, facas, espátulas, cadinho, tábuas apoio (cozinha), bacias e baldes plásticos e papel toalha. A pesagem do material foi feita em balanças analíticas de precisão. Os resíduos secos e úmidos foram pesados separadamente, e em quantidade excedente a necessária, pois durante o processo de trituração dos mesmos são perdidas quantidades de resíduos da ordem de 20%.

A trituração foi o procedimento empregado para reduzir o tamanho das partículas de RSUDp, a fim de facilitar o processo biológico anaeróbio. O aparelho triturador (marca JF Máquinas Agrícolas, modelo JF2) foi um desintegrador/picador, com rotação de 4.500 rpm e peneiras adequadas para elementos secos e úmidos. O resíduo foi colocado aos poucos no triturador, primeiramente os elementos úmidos e depois os secos. O resíduo triturado foi recolhido em balde recoberto com saco plástico a fim de diminuir a perda dos componentes. A homogeneização do resíduo foi feita manualmente, utilizando-se luvas cirúrgicas, num recipiente plástico. Amostras foram recolhidas para determinação do conteúdo de sólidos totais e totais voláteis.

4.2 Preparação, operação e monitoramento dos biorreatores da fase I

Os biorreatores da fase I foram operados para fornecer as amostras para os testes de tratamento das amostras de resíduos sólidos para contagens (item 4.3). Os frascos reatores foram de 2,0L (marca Duran Schott), montados em triplicata e operados em sistema descontínuo de alimentação com 500g de RSUDp e 500mL de lodo granulado anaeróbio (CALLADO, 1998) em digestão (suspensão em meio de reação), proveniente de um reator UASB utilizado para o tratamento de águas

residuárias de indústria de papel e celulose. O lodo granulado anaeróbio foi empregado como inóculo. Os frascos reatores foram fechados com tampa de borracha e rosca plástica, sob condições anaeróbias promovidas pela introdução de gás nitrogênio 100%. A incubação dos reatores foi estática, em câmara com temperatura controlada a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$.

A análise dos gases produzidos pela atividade bacteriana nos biorreatores foi feita utilizando-se uma seringa de 1mL para a retirada de 0,5mL de gás do biorreator e em seguida injetando-se esta alíquota em cromatógrafo a gás da marca Gow-Mac Instrument CO, série 150, modelo 69-152; com coluna Poropak-Q (comprimento 2,0m) e temperatura de 75°C , o gás de arraste foi hidrogênio superseco e corrente 150mA (VAZOLLER, 1995; SAKAMOTO, 1996). A composição do biogás na atmosfera dos frascos de reação foi determinada, expressa em porcentagem. Valores de metano, em mmoles, foram medidos considerando-se uma curva de calibração encontrada no Anexo A, a variação de pressão foi considerada de acordo com a variação da CNTP (MANUAL DE CROMATOGRAFIA, 1996)¹⁶.

O tamponamento do sistema foi feito após 30 dias, acrescentando-se ao meio 0,06g de NaHCO_3 por quilo de $\text{ST}_{\text{inicial}}$ (sólido total inicial) do resíduo, segundo BRUMMELER (1993). Os biorreatores eram abertos sob atmosfera de nitrogênio 100% quando da adição do bicarbonato de sódio.

4.3 Testes para avaliação do tratamento prévio mais adequado para avaliação quantitativa de células bacterianas das amostras de resíduos sólidos

Para o estudo das amostras de resíduos sólidos houve a necessidade de desprender as células bacterianas das partículas inertes ou provocar a desagregação das células aderidas entre si e às partículas de sólidos, buscando-se uma amostra mais homogênea para as diluições decimais seriadas. Três métodos foram testados, baseados na literatura (BARLAZ et al., 1989a e b; VILLAS-BÔAS, 1990; MÜNCH

et al., 1997; JORAND et al., 1995). Retirou-se amostra do biorreator 1 para o estudo da metodologia de BARLAZ et al. (1989a e b), do biorreator 2 para o método de VILLAS-BÔAS (1990) e do biorreator 3 para o método do ultra-som, baseado em MÜNCH et al., 1997; JORAND et al. (1995).

4.3.1 Método adaptado de BARLAZ et al. (1989a, b)

Uma amostra de 50g do biorreator 1, coletada após 65 dias de operação, e colocada em 250mL de solução tampão fosfato 23,7mM e pH 7,2, descrita na Tabela 13, contida em frasco de 500mL (Duran Schott). A amostra tamponada foi então transferida para a jarra de um liquidificador (volume de 1500mL), marca Arno—modelo LIR-H 300W, e submetida a agitação por 90 segundos sob atmosfera ambiente. O material foi então peneirado utilizando-se uma peneira plástica de malha fina (diâmetro 1mm), com a ajuda das mãos cobertas por luvas, e colocado em um frasco de 500mL (Duran Schott), sob atmosfera de nitrogênio (30%) e dióxido de carbono (70%), promovida através de um fluxo, durante 20 minutos. Nesse período, acrescentou-se 13,1mL de solução redutora de sulfeto de sódio 5%, de acordo com a Tabela 11. Uma alíquota de 1mL foi então processada segundo a técnica do NMP (SAKAMOTO, 1996).

4.3.2 Método adaptado de VILLAS-BÔAS (1990)

A um volume de 250mL de solução mineral para solubilização da amostra, descritas na Tabela 12, segundo VILLAS-BÔAS (1990), foram acrescentadas 50g de amostras do biorreator 2, coletadas após 60 dias de operação do reator. O frasco de 500mL (Duran Schott) contendo um imã e 60g de pérolas de vidro, foi colocado sobre uma placa magnética, a fim de promover agitação de 300rpm por 30 minutos.

¹⁶ MANUAL DE CROMATOGRAFIA (1996). Laboratório de Processos biológicos – Depto. De Hidráulica e Saneamento – EESC/USP – SP.

A atmosfera do frasco foi substituída após a homogeneização da amostra, através da introdução de um fluxo gasoso, por 20 minutos, de nitrogênio (30%) e dióxido de carbono (70%).

O frasco foi então fechado com tampa de borracha e rosca plástica, e com o uso de seringa acrescentou-se ao homogeneizado 13,1mL de solução redutora de sulfeto de sódio 5%. Uma alíquota de 15mL foi então transferida para um frasco de antibiótico, previamente esterilizado, contendo 18g de pérolas de vidro sob atmosfera de nitrogênio (30%) e dióxido de carbono (70%). A amostra foi agitada manualmente por 30 minutos, em ângulo de 45° e, em seguida, 1mL da amostra foi processado segundo a técnica do NMP (SAKAMOTO, 1996).

4.3.3 Método do ultra-som adaptado de MÜNCH et al. (1997) e JORAND et al. (1995).

Para a definição do melhor tempo de exposição do resíduo às ondas de ultra-som visando uma adequada liberação das células, sem que houvesse destruição das mesmas, foram feitos ensaios submetendo-se as amostras a diferentes tempos de exposição: 1 minuto, 3 , 5, 10 e 15 minutos. Após a exposição nos tempos estipulados, as amostras foram observadas sob microscopia de contraste de fase em aumento de 1250 vezes.

Feita a comparação das características das células expostas ao ultra-som nos 5 diferentes tempos, determinou-se o tempo de 10 minutos como o mais adequado. As amostras foram colocadas em 250mL de solução tampão fosfato 23,7mM e pH 7,2, descrita na Tabela 13, contida em frasco Duran Schott de 500mL e mantidas em banho de gelo, pois a temperatura aumentava durante a exposição às ondas de ultra-som.

Uma amostra de 50g coletada após 60 dias de operação do reator foi adicionada a 250mL de solução tampão fosfato, descrita na Tabela 13, contida em um frasco (Duran Schott) de 500mL. A amostra foi colocada em um aparelho de

ultra-som (modelo/marca Thorton-T7) por 10 minutos, em banho de gelo a 5°C e atmosfera de 100% nitrogênio. Ao término do tempo de exposição, a temperatura subiu para 9°C. A atmosfera foi substituída pela introdução no frasco, por 20 minutos, da mistura gasosa de nitrogênio (30%) e dióxido de carbono (70%). O frasco foi fechado com tampa de borracha e rosca plástica, com o uso de uma seringa acrescentou-se ao homogeneizado 13,1mL de solução redutora de sulfeto de sódio 5% e agitou-se manualmente por 1 minuto. Uma alíquota de 1mL foi então processada segundo a técnica do NMP (SAKAMOTO, 1996).

4.3.4 Avaliação quantitativa dos grupos microbianos celulolítico e metanogênico para os testes de adequação do método de tratamento prévio de amostras de resíduos sólidos – Método do NMP.

Para a enumeração das populações de bactérias celulolíticas foram feitas cinco réplicas para o NMP de cada diluição de 10^{-1} a 10^{-7} , previamente realizadas em solução anaeróbia de diluição (Tabela 14), sob condição de anaerobiose estrita (GOMES, 1995), e inoculadas de acordo com o procedimento esquematizado na Figura 4, em meio de cultura ZINDER (ZINDER & KOCH, 1984) descrito na Tabela 7. Foram empregados frascos de antibiótico de 30mL, contendo como fonte de carbono 0,05g de celulose em pó em 8,7mL de meio ZINDER. Após a realização da troca de atmosfera de nitrogênio 100% para atmosfera de nitrogênio 70% e de dióxido de carbono 30% (MANUAL SOBRE TÉCNICAS LABORATORIAIS ADOTADAS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA)¹⁷, adicionaram-se as soluções estoques nas alíquotas de 0,1mL de bicarbonato de sódio 10% (Tabela 10), 0,1mL de solução de vitaminas (Tabela 19) e 0,1mL da solução redutora de sulfeto de sódio 5%, a fim de perfazer o volume final de 9mL de meio de cultivo. Após o processamento da técnica do NMP, procedimentos esquematizados na Figura 4, os frascos foram armazenados em estufa bacteriológica a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, e a leitura do crescimento foi feita após 30 dias de incubação.

¹⁷ Manual sobre Técnicas Laboratoriais adotadas no Laboratório de Microbiologia (1996). VARESCHE, M.B.; VAZOLLER, R.F.; PASSIG, F.H.; PRATES, K.V.M.C.; LARIZATTI, S.F.; SILVA, S.Q. Laboratório de Processos Anaeróbios – Depto. de Hidráulica e Saneamento – EESC/USP – SP. (Não publicado).

As leituras dos tubos foram feitas considerando-se os critérios relacionados na Tabela 6: observação da presença de turvação e coloração amarelada, determinação de metano por cromatografia gasosa em cromatógrafo a gás (marca Gow-Mac Instrument); - exame microscópico sob contraste de fase e fluorescência (aparelho da marca Olympus BHT). Para as fotomicrografias realizadas durante a observação das morfologias celulares foram utilizados filmes da Kodak ou Fujifilm - ASA 100 e 400. O material coletado a ser observado sob microscopia de contraste de fase foi colocado em lâmina, contendo um filme de ágar a 2% e recoberto por lamínula, e na microscopia de fluorescência a amostra foi colocada diretamente na lâmina e recoberta por lamínula.

Figura 4: Esquema do processamento das diluições pela técnica do NMP

Tabela 6: Procedimentos para leitura dos frascos de NMP

Grupos microbianos	Aspectos do meio de cultivo	Presença de biogás	Exame microscópico
Celulolítico	Coloração amarela e turvação	-	Morfologia celular
Acetogênico	Turvação	-	Morfologia celular
Metanogênico	Turvação	Metano	Morfologia celular e presença de fluorescência

(-) – não é considerada

Para calcular a estimativa da densidade bacteriana foi utilizada a Tabela 9221.IV e a fórmula para cálculo do NMP da página 9-51 do STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998), encontrada na Tabela A1 e na Figura A1 no ANEXO A.

4.4 Preparação, operação e monitoramento dos biorreatores da fase II

O Resíduo Sólido Urbano Padrão foi preparado e processado de acordo com PINTO¹ (1998), como anteriormente observado no item 4.1. Contudo, foi realizada uma modificação, como indicada a seguir, pela pesquisadora: os resíduos foram submetidos à condição semelhante encontrada nas residências, isto é, foram mantidos durante dois dias em uma sala fechada e protegidos com uma tela plástica, simulando uma fase de decomposição aeróbia, indicada como inicial por alguns autores (POLHAND & HARPER, 1985; ROBINSON, 1986; BARLAZ, 1989). Ao término deste tempo o resíduo foi empregado para a preparação dos biorreatores da fase II.

Foram montados dois biorreatores em frascos de 2L (Duran Schott), denominados reatores 1 e 2. As condições de operação foram dependentes da resposta dos sistemas ao longo do tempo de incubação, bem como, inicialmente, os reatores sofreram alimentações. O conteúdo dos sistemas foi 500g de RSUDp (PINTO, 1998) e 500mL de percolado proveniente de um biorreator operado em

sistema “dry fermentation” (BALDOCHI, 1997). Na Figura 5 pode ser visualizado um dos biorreatores em fase inicial do processo.

A mistura foi homogeneizada com bastão de vidro e submetida a atmosfera de 70% nitrogênio e 30 % dióxido de carbono por 20 minutos. O sistema de reação foi fechado com tampa de borracha e rosca plástica. Os reatores foram incubados em cabine com temperatura controlada, inicialmente a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após 52 dias de incubação, baseados em trabalhos de BARLAZ (1995), a temperatura foi alterada para 40°C . Os frascos reatores eram homogeneizados manualmente duas vezes ao dia.

Figura 5: Biorreator contendo RSUDp inoculado com percolado (a) na fase inicial após a inoculação; (b) na fase final

4.4.1 Operação e monitoramento dos biorreatores da fase II

A operação dos biorreatores da fase II que constituíram o banco das amostras para os estudos quantitativos celulares após determinação do tratamento prévio dos resíduos sólidos, foi diferente dos biorreatores da fase I. Os itens 4.4.1.1 a 4.4.1.3 relacionam os procedimentos de operação dos dois sistemas. As análises realizadas para o acompanhamento dos biorreatores estão indicadas nos itens 4.4.1.4 a 4.4.1.8. As amostras para a realização das análises de acompanhamento dos sistemas foram retiradas sob fluxo de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30%).

4.4.1.1 Alimentação dos biorreatores

Após a primeira e a segunda análise quantitativa de bactérias nos reatores, foram acrescentadas porções de 54,64g de RSUDp mantidos previamente congelados e 45,36mL de água Milli-Q. O tamponamento foi feito com 1,2g de bicarbonato de sódio. O procedimento de alimentação, repondo-se a quantidade de resíduo retirado, foi feito para simular um sistema próximo ao semi- contínuo.

4.4.1.2 Reinoculação dos biorreatores

Após a análise do perfil de produção de gases com 52 dias de funcionamento, os biorreatores foram reinoculados, acrescentando-se 100mL de lodo granulado anaeróbico em digestão (foi macerado, utilizando-se 50g de pérolas de vidro em um frasco contendo 250mL de lodo granulado, submetido a atmosfera de 100% nitrogênio por 10 minutos e, após, agitou-se manualmente por 30 minutos), proveniente de um reator UASB tratando águas residuárias de indústria alimentos (TORRES, 1998)³ e 250mL de percolado proveniente de um biorreator operado em batelada e escala de laboratório (BALDOCHI, 1997). A mistura foi homogeneizada com bastão de vidro e submetida a atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30 %) por 20 minutos. A partir daí não foi feita a reposição do resíduo retirado,

configurando-se o funcionamento sob condições descontínuas nos biorreatores operados para promover a degradação anaeróbia.

4.4.1.3 Tamponamento dos biorreatores

O tamponamento dos biorreatores, quando necessário, deu-se pela introdução de 0,06g de NaHCO_3 por quilo de $\text{ST}_{\text{inicial}}$ do resíduo, segundo BRUMMELER (1993). Os biorreatores eram abertos sob atmosfera de 30% nitrogênio e 70% dióxido de carbono quando da adição de bicarbonato de sódio, e o fluxo era mantido por 20 minutos.

4.4.1.4 Análises cromatográficas da produção de Metano e Dióxido de Carbono

Os biorreatores foram monitorados por cromatografia, condições semelhantes ao item 4.2, com uma frequência mínima de duas coletas por semana, para a verificação da produção de biogás, metano e dióxido de carbono, produzidos pela atividade microbiana.

4.4.1.5 Análise de Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis

Foram retiradas aproximadamente 25g das amostras iniciais e a cada abertura dos reatores para análise de Sólidos Totais (105°C – 24horas) e Sólidos Totais Voláteis (600°C – 2horas), de acordo com STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998).

4.4.1.6 Exames Microscópicos

Exames microscópicos foram feitos a cada abertura dos reatores, empregando-se microscopia de contraste de fase e fluorescência em aparelho Olympus BHT munido de um sistema de câmera de vídeo Optronics, acoplado a um computador para observação da imagem em um programa Image-Pro plus, versão 3.0 para Windows. Nos exames de microscopia de fase as amostras eram diluídas em água Milli-Q e colocadas em lâminas contendo um filme de ágar a 2% e recobertas por lamínula, técnica descrita pela DSM (1991)¹⁸ apud VAZOLLER (1995). Os exames de fluorescência eram feitos diretamente, acrescentando-se a amostra na lâmina e cobrindo-as com lamínula. As amostras eram observadas sob microscopia, procurando-se percorrer o maior número de campos possíveis e as fotomicrografias eram gravadas no computador. Não foram realizadas medidas precisas do tamanho das células, apenas acrescentou-se a escala para estimar as medidas.

4.4.1.7 Análise de ácidos orgânicos voláteis

Após a quinta retirada de amostra para análise quantitativa de microrganismos, foram feitas titulações de ácidos voláteis para determinação de alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade a ácidos voláteis (método DILALO & ALBERTSON, 1961, modificado por RIPLEY et al., 1986). Retirou-se 50 mL da fração líquida do conteúdo dos biorreatores.

Os ácidos voláteis foram também determinados através de análises cromatográficas, cromatógrafo a gás Hewlett Packard HP 6890-GC System, com injetor “split/splitless” e detector de ionização de chama; coluna HP – Innowax, comprimento de 30m, diâmetro interno de 0,25mm e espessura do filme de 0,25µm. Um volume conhecido de amostra era transferido para um microdestilador acidificado e aquecido. O destilado era recebido em solução de NaOH e, após

¹⁸ DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH – DSM (1991). Curso: Scientific services of culture collections – The DSM experience. Fundação Tropical de Pesquisa “André Tosello”, Campinas, SP.

resfriamento, diluído em balão volumétrico de 10mL. Aliquotas de 2,0mL do destilado foram adicionadas a 1,0g de NaCl, 70 μ L de solução de ácido crotônico 700mg/L, 0,175mL de solução de H₂SO₄ 1M e 0,6mL de éter etílico e sofreram agitação em agitador de tubos (Vortex) por um minuto. Injetou-se 1 μ L da solução etérea utilizada para extrair os ácidos voláteis de amostra destilada, segundo MORAES, (1998)¹⁹. A temperatura de trabalho no injetor foi de 250°C, razão de split 1:20; no detector 300°C, fluxo de ar sintético 300mL/min., fluxo de H₂ 30mL/min., fluxo de gás auxiliar (N₂) 33mL/min. e inicial de 100°C por 3 minutos, aumentando 5°C por minuto até a atingir a temperatura de 180°C, permanecendo por 5 minutos nesta temperatura e fluxo de gás de arraste (H₂) na coluna 2,0mL/min..

4.4.1.8 Medidas dos valores de pH

O valor aproximado de pH ($\pm 0,5$ unidade de pH) no interior dos biorreatores foi aferido inicialmente, com fita de papel indicador Carlo Erba, mergulhando-a na mistura em suspensão dentro do reator. Decorridos 90 dias foi coletada uma amostra do resíduo em biodigestão anaeróbia, colocada em um béquer de vidro e o pH foi medido imediatamente utilizando-se um potenciômetro, e ainda, após 100 dias o pH foi medido diretamente no reator, inserindo-se o eletrodo dentro do reator.

4.5 Procedimentos para a avaliação quantitativa de grupos microbianos presentes nos biorreatores da fase II

As análises quantitativas dos grupos microbianos pelo método do NMP, foram feitas com um intervalo de 20 a 30 dias. Foram realizadas sete retiradas de amostras, processadas em duplicata, e submetidas a diluições decimais seriadas para estimativa do número de bactérias celulolíticas no biorreator 1. Da mesma forma, foram retiradas do biorreator 2, quatro amostras para a contagem de bactérias

¹⁹ MORAES, E. (1998). Trabalho em andamento no Laboratório de Processos Biológicos – Depto. de Hidráulica e Saneamento – EESC/USP-SP (Não publicado)

acetogênicas e cinco para a contagem do grupo metanogênico. Após as retiradas de amostras, os biorreatores eram submetidos a atmosfera de 70% de nitrogênio e 30% de dióxido de carbono, durante 20 minutos, como apresentando na Figura 6.

Figura 6: Biorreator submetido a atmosfera de N_2/CO_2 .

4.5.1 Procedimentos para o tratamento das amostras de resíduos sólidos com ultra-som.

Foi utilizado o método do ultra-som para o tratamento prévio das amostra de RSUDp em biodigestão. As amostras foram pesadas em balança de precisão, 50 g cada, e colocadas em um frasco Duran Schott (500mL) contendo 250mL de solução tampão fosfato (Tabela 13), sob fluxo de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30%). A amostra foi colocada no aparelho de ultra-som, em banho de gelo a 5°C, sob fluxo de N_2/CO_2 (30:70%) por 10 minutos, como mostra a Figura 7., o sistema foi fechado com tampa de borracha e rosca plástica. Colocou-se, com uma seringa esterilizada,

13,1mL da solução redutora de sulfeto de sódio e agitou-se manualmente o frasco por um minuto. Após este tratamento, a amostra foi submetida a técnica do NMP.

Figura 7: Procedimentos do emprego do ultra-som.

4.5.2 Procedimentos para análise quantitativa de bactérias celulolíticas

Foram retiradas sete amostras do biorreator 1, processadas em duplicata, em intervalos de 20 a 30 dias para a análise quantitativa pelo método do NMP (quintuplicata). As amostras foram tratadas de acordo com os procedimentos apresentados no item 4.6.1., e então diluídas. Os procedimentos para a diluição das amostras e processamento das mesmas foram os mesmos apresentados no item 4.3.4 desse capítulo, bem como a Figura 4 os ilustra novamente.

Salienta-se que, os frascos da primeira amostra analisada foram inicialmente incubados em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após a segunda retirada de

amostras, a temperatura estudada foi de 40°C. As leituras foram feitas após 30 e 60 dias de incubação (critérios da Tabela 6).

Os exames microscópicos foram feitos sob contraste de fase e fluorescência, e o material coletado foi depositado em lâmina recoberta por uma fina película de ágar, solução a 2%, DSM (1991) apud VAZOLLER(1995), e recoberto por lamínula. Para estimar a densidade bacteriana foi utilizada a Tabela 9221.IV do STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998), apresentada no ANEXO A.

4.5.3 Análise quantitativa de bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas

Foram retiradas amostras do reator 2, processadas em duplicata, em intervalos de 20 a 30 dias para a análise quantitativa pelo método do NMP (triplicata). As amostras foram tratadas de acordo com os procedimentos apresentados no item 4.6.1., e então, diluídas.

Para a enumeração das populações de bactérias acetogênicas e do grupo metanogênico foram feitas cinco réplicas para o NMP de cada diluição de 10^{-1} a 10^{-7} , previamente realizadas em solução anaeróbia de diluição (Tabela 14), sob condição de anaerobiose estrita (GOMES, 1995), e inoculadas de acordo com o procedimento esquematizado na Figura 4, em meio de cultura ZINDER (ZINDER & KOCH, 1984) descrito na Tabela 7. Foram estudadas diferentes fontes de carbono para a enumeração de cada grupo microbiano, a saber, butirato de sódio, para a enumeração das populações de bactérias acetogênicas utilizadoras de butirato; propionato de sódio, para a enumeração de bactérias acetogênicas utilizadoras de propionato; acetato de sódio, para a enumeração do grupo metanogênico acetoclástico; atmosfera de H_2/CO_2 (1atm.), para a enumeração grupo metanogênico hidrogenotrófico; metanol, para a enumeração grupo metanogênico utilizador de álcoois, em geral também acetoclástico. Os frascos controle foram feitos sem fonte de carbono.

Foram empregados frascos de antibiótico de 30mL, contendo um volume determinado de meio de cultivo ZINDER, o qual, após a realização da troca de atmosfera de nitrogênio 100% para nitrogênio (70%) e de dióxido de carbono (30%), adicionou-se as soluções estoques, 0,1mL de bicarbonato de sódio 10% (Tabela 10), 0,1mL de solução de vitaminas (Tabela 19) e 0,1mL da solução redutora de sulfeto de sódio 5%, a fim de perfazer o volume final de 9mL de meio de cultivo. As alíquotas de 1mL, utilizadas durante a inoculação dos frascos de diluição e para determinação do NMP, eram transferidas utilizando-se seringas estéreis de 1mL e agulhas de calibre 40x12, lavadas previamente com atmosfera de nitrogênio 100 %, sob condições anaeróbias estritas, como anteriormente indicado.

Após o processamento da técnica do NMP, procedimentos esquematizados na Figura 4, os frascos da primeira amostra retirada para contagens de acetogênicas e metanogênicas do reator 2 foram incubados em estufa bacteriológica a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, as demais amostras foram incubadas a 40°C . A leitura do crescimento foi feita após 30 e 60 dias de incubação, segundo os critérios da Tabela 5. Os exames microscópicos foram realizados segundo os procedimentos descritos em 4.6.2. Para estimar a densidade bacteriana foi utilizada a Tabela 9221.IV do STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998), apresentada no ANEXO A.

4.6 Composição e procedimentos para preparação de meios de cultura e soluções

O meio de cultura ZINDER completo (Tabela 20) foi utilizado nas diluições da técnica do NMP e baseado em ZINDER & KOCH (1984), os procedimentos de preparo do meio de cultivo basal ZINDER e a composição do meio ZINDER completo encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 7 e 20.

As soluções traço de metais e resazurina 0,1% baseada em ZINDER & KOCH (1984), foram utilizadas na confecção do meio basal ZINDER e encontram-

se nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. As soluções complementares de bicarbonato de sódio 10% e redutora de sulfeto de sódio 5%, para o meio de cultura ZINDER completo encontram-se nas Tabelas 10 e 11, e foram baseadas em TOUZEL & ALBAGNAC²⁰ apud GOMES (1995).

A solução de solubilização apresentada na Tabela 12 foi utilizada para facilitar a homogeneização e desprendimento das células de amostras de resíduos sólidos, e foi adaptada por VILLAS-BÔAS (1990). A solução de tampão fosfato 23,7mM e pH 7,2, utilizada para a homogeneização e desprendimento de células da amostras de resíduos sólidos nas metodologias de BARLAZ et al. (1989 a e b) e do ultra-som, encontra-se na Tabela 13. A solução anaeróbia de diluição utilizada para realizar as diluições decimais seriadas pelo método do NMP está apresentada na Tabela 14, e foi baseada em GIAJ-LEVRA (1991) e GOMES (1995).

As soluções estoques que foram utilizadas como fonte de carbono nas contagens pelo NMP são: ácidos acético, butírico, propiônico e metanol, estão apresentadas nas Tabelas 15, 16, 17 e 18. As soluções dos ácidos foram preparadas com os sais de sódio correspondentes, ou seja, acetato de sódio, propionato de sódio e butirato de sódio.

A solução de vitamina foi acrescida ao meio basal ZINDER para complementá-lo, junto com as soluções complementares e a solução redutora, apresentada a seguir na Tabela 20.

²⁰ TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC₃. *FEMS Microbiol. Let.*, 16: 241-245.

Tabela 7: Procedimentos utilizados na preparação do meio basal ZINDER.

Meio de cultura basal ZINDER**Sais/Reagentes:**

água Milli-Q	1000mL
NH ₄ Cl	0,5g/L
KH ₂ PO ₄	0,4g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05g/L
Sol. Resazurina	1,0mL/L
Sol. Traço Metais	10,0mL/L

Vidraria:

(04) Béquers 50mL
 (04) Bastão de vidro
 (01) Erlenmeyer 2000mL
 (01) Proveta 1000mL
 Pipetas (02) 10mL e (01) 1mL
 (100) Frascos de antibiótico 30mL
 Tampas de borracha e lacres de alumínio

Equipamentos:

Sistema de distribuição de gases
 Autoclave
 Balança analítica
 Placa aquecedora
 Aparelho removedor de oxigênio
 Bomba de vácuo
 Lacrador para tampas

Procedimento:

♦ A água foi fervida no erlenmeyer e submetida à atmosfera de 100% nitrogênio até a temperatura atingir $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ♦ os reagentes foram pesados e adicionou-se metade da água ♦ O restante da água foi colocado e a mistura homogeneizada. ♦ Borbulhou-se N₂ na solução por 30 minutos. ♦ Foi distribuído o volume correto por frasco, sob fluxo de N₂ 100%. ♦ Os frascos foram tampados e lacrados sob fluxo do gás ♦ Esterilizados em autoclave por 120°C, 1atm e 20min. ♦ Armazenados à temperatura ambiente e ausência de luz. ♦ Antes da utilização do meio, a atmosfera de N₂ dos frascos foi substituída pela mistura gasosa de N₂/CO₂ (70 : 30 %)

Procedimento para a troca de atmosfera:

♦ Realizada sob condições de anaerobiose e assepsia, utilizando-se filtros “Sterile Acrodisc” e agulhas estéreis ♦ Retirava-se o nitrogênio com uma bomba de vácuo por 30 segundos e injetava-se a mistura de N₂/CO₂ (70:30%) por 30 segundos, proveniente do sistema de distribuição de gases ♦ O procedimento foi repetido por 3 vezes ♦ Após o término, despressurizava-se o frasco com uma agulha hipodérmica, igualando a atmosfera ambiente ♦ esterilizava-se a tampa com álcool e fogo ♦ adicionava-se as soluções estoques.

Fonte: Adaptado de ZINDER E KOCH (1984), GOMES (1995) e SAKAMOTO (1996)

Tabela 8: Procedimentos utilizados na preparação da solução traço de metais

Solução Traço de Metais	
Sais/Reagentes:	
Água Milli-Q	1000mL
NTA (ácido nitriloacético). $C_6H_9NO_6$	4,5g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,556g/L
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,086g/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,17g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,21g/L
H_3BO_3	0,19g/L
$NiCl_2$	0,02g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (Molibdato de sódio)	0,01g/L
Vidraria:	
(08) Béquer 50mL	
(08) Bastão de vidro	
Erlenmeyer 2000mL	
Proveta 1000mL	
(04) Frasco de soro 250mL	
Tampa de borracha e rosca de alumínio	
Equipamentos:	
Sistema de distribuição de gases	
Potenciômetro	
Autoclave	
Procedimento:	
♦ O NTA foi adicionado a 200mL de água. ♦ O pH corrigido para 6,5 com KOH 10M ♦ Os metais foram pesados e adicionados na ordem indicada acima ♦ Adicionou-se o restante da água ♦ Borbulhou-se N_2 (100%) na solução por 20 minutos ♦ Os frascos foram tampados e lacrados sob fluxo do gás ♦ Esterilizados em autoclave por 120°C, 1atm e 20min.. ♦ Armazenados em geladeira e ausência de luz	

Fonte: Adaptado de ZINDER E KOCH (1984), GOMES (1995) e SAKAMOTO (1996)

Tabela 9: Procedimentos utilizados na preparação da solução de Resazurina

Solução de resazurina	
Sais/Reagentes:	
Corante resazurina	0,1g
Água Milli-Q	100mL
Vidraria	
Erlenmeyer 200mL	
Béquer 50mL	
Bastão de vidro	
Frasco âmbar 150mL	
Equipamentos:	
Sistema distribuição de gases	
Procedimento:	
♦ O corante foi pesado e adicionado à água Milli-Q. ♦ Foi introduzido fluxo de nitrogênio (100%) por 10min. ♦ A solução foi distribuída em frasco âmbar. ♦ Esterilizada em autoclave ♦ Armazenada sob refrigeração	

Fonte: Adaptado de ZINDER E KOCH (1984), GOMES (1995) e SAKAMOTO (1996)

Tabela 10: Procedimentos utilizados na preparação da solução de bicarbonato de sódio 10%

Solução de bicarbonato de sódio 10%

Sais/Reagentes:

Água Milli-Q	100mL
Bicarbonato de sódio	10g

Vidraria:

Béquer 50mL
 Bastão de vidro
 Erlenmeyer 200mL
 Proveta 100mL
 Sistema Millipore de filtração
 10 Frascos de antibiótico 30mL

Equipamentos:

Sistema Distribuição de gases

Procedimento:

♦ O sal foi pesado e adicionado à água, previamente fervida ♦ Borbulhou-se N_2 com pipeta invertida por 20 minutos ♦ Filtrou-se a solução em Sistema Millipore, em ambiente estéril ♦ A solução foi distribuída em vidraria previamente esterilizada - frascos de antibiótico de 30mL sob fluxo de N_2 (100%) ♦ Os frascos foram lacrados e estocados à temperatura ambiente e ausência de luz.

Fonte: Adaptado de TOUZEL & ALBAGNAC (1983), GOMES (1995) e SAKAMOTO (1996)

Tabela 11: Procedimentos utilizados na preparação da solução redutora de sulfeto de sódio 5%

Solução redutora de sulfeto de sódio 5%

Sais/Reagentes:

Água Milli-Q	100mL
$Na_2S \cdot 9H_2O$	5g

Vidraria:

Béquer 50mL
 Bastão de vidro
 Papel absorvente, placa de Petri, espátula para quebrar os cristais
 Erlenmeyer 200mL
 Proveta 100mL
 Pipeta 10mL
 10 Frascos de antibiótico 30mL

Sistema Millipore

Equipamentos:

Sistema de distribuição de gases
 Potenciômetro

Procedimento:

♦ Os cristais foram lavados, secos e quebrados em papel de filtro ♦ Pesou-se 5g do sal e acrescentou-se em 100mL de água ♦ Borbulhou-se N_2 (100 %) por 20 minutos ♦ A solução foi filtrada em sistema Millipore, previamente esterilizado ♦ Distribuída em frascos de antibiótico, sob fluxo de N_2 (100%) ♦ Os frascos foram lacrados ♦ estocados à temperatura ambiente e ausência de luz.

Fonte: Adaptado TOUZEL & ALBAGNAC (1983), GOMES (1995) e SAKAMOTO (1996)

Tabela 12: Procedimentos utilizados na preparação da solução de solubilização

Solução de solubilização**Sais/Reagentes:**

Água Milli-Q	230mL
Solução de resazurina	0,25mL
Solução Na ₂ CO ₃ 8%	7,5mL
Solução redutora sulfeto de sódio 5%	13,1mL

Vidraria:

Erlenmeyer	500mL
Frasco Duran Schott	500mL
Pérolas de vidro	60g

Equipamentos:

Sistema distribuição de gases
Autoclave

Procedimento:

♦ A solução constituída por água Milli-Q e resazurina foi fervida por 1 minuto sob fluxo de CO₂ (400mL/min) em frasco Duran Schott, contendo 60g de pérolas de vidro ♦ fechado sob condições de anaerobiose e autoclavado por 20min., 120°C e 1atm. ♦ Após resfriamento, a solução de carbonato de sódio foi adicionada e homogeneizada ♦ Após o acréscimo do resíduo sólido e tratamento da amostra, acrescentou-se a solução redutora de sulfeto de sódio 5%.

Fonte: Adaptado de VILLAS-BÓAS (1990)

Tabela 13: Procedimentos para a preparação da solução de tampão fosfato 23,7mM e pH 7,2

Solução de Tampão fosfato**Sais/Reagentes:**

Água Milli-Q	1000 L
KH ₂ PO ₄	1,61g
K ₂ HPO ₄	2,07g

Vidraria:

Erlenmeyer	2000mL
Frasco Duran Schott (04)	500mL
Béquier (2)	50mL
Proveta	250mL

Equipamentos:

Balança analítica
Sistema distribuição de gases
Autoclave

Procedimento:

♦ Os reagentes foram pesados e adicionados em 1L de água Milli-Q, previamente fervida e resfriada ♦ acertou-se o pH para 7,2 ♦ foi introduzido nitrogênio 100% por 20 minutos ♦ a solução foi colocada nos frascos Duran Schott e fechados sob condições de anaerobiose e autoclavado por 20min., 120°C e 1atm. ♦ Após resfriamento, armazenados sob refrigeração

Fonte: Adaptado de BARLAZ et al. (1989 a e b)

Tabela 14: Procedimentos utilizados na preparação da solução anaeróbia de diluição

Solução anaeróbia de diluição**Sais/Reagentes:**

Água Milli-Q	1000mL
Solução de resazurina 0,1 %	2,0mL
KHCO ₃	3,98g
Tris (Hidroximetil aminometano)	6,6g

Vidraria:

(02) Béquer 50mL
 (02) Bastão de vidro
 Erlenmeyer 2000mL
 Proveta 1000mL
 01 Pipeta 10mL e 01 de 2mL
 100 Frascos de antibiótico 50mL

Equipamentos:

Sistema de distribuição de gases
 Potenciômetro
 Autoclave

Procedimento:

♦ A água destilada foi fervida em erlenmeyer ♦ Borbulhou-se N₂/CO₂ (70:30 %) na água até que a temperatura abaixasse para 40°C. ♦ Adicionou-se a solução de resazurina, KHCO₃ e o Tris ♦ o pH foi ajustado para 7,0 (adicionando KOH 3N). ♦ Distribuiu-se 8,8mL em cada frasco de antibiótico, sob atmosfera de N₂/CO₂. ♦ Os frascos foram armazenados à temperatura ambiente e abrigo da luz

Fonte: Adaptado de GIAJ-LEVRA (1991) e GOMES (1995)

Tabela 15: Preparação da solução de acetato de sódio 2M

Solução estoque de acetato de sódio 2M**Sais/Reagentes:**

CH ₃ COONa.3H ₂ O	54,43g
Água Milli-Q	200mL

Vidraria:

Béquer 100mL
 Balão volumétrico 200mL
 Bastão de vidro
 Erlenmeyer 1000mL
 Pipetas 10 e 5mL
 20 Frascos de antibiótico

Equipamentos:

Sistema distribuição de gases
 Autoclave

Procedimento:

♦ O sal foi pesado e dissolvido em água num béquer ♦ Aferiu-se o volume em balão volumétrico ♦ A solução foi transferida para erlenmeyer ♦ Borbulhou-se N₂ (100 %) por 20min. ♦ Foi colocado 10mL da solução nos frascos de antibiótico sob fluxo de N₂. ♦ Os frascos foram tampados e lacrados ♦ Colocados em autoclave por 20min., 1atm. e a 120°C. ♦ Armazenados à temperatura ambiente e abrigo da luz

Fonte: Adaptado de SAKAMOTO (1996)

Tabela 16: Preparação da solução de butirato de sódio 2M

Solução estoque de butirato de sódio 2M**Sais/Reagentes:**CH₃CH₂CH₂CO₂Na 44,03g

Água Milli-Q 200mL

Vidraria:

Béquer 100mL

Balão volumétrico 200mL

Bastão de vidro

Erlenmeyer 1000mL

Pipetas 10 e 5mL

20 Frascos de antibiótico

Equipamentos:

Sistema distribuição de gases

Autoclave

Procedimento:

♦ O sal foi pesado e dissolvido em água num béquer ♦ O volume foi aferido em balão volumétrico. ♦ a solução transferida para erlenmeyer ♦ Borbulhou-se N₂ (100 %) por 20min. ♦ Colocou-se 10mL da solução nos frascos de antibiótico sob fluxo de N₂. ♦ Os frascos foram tampados e lacrados ♦ Colocados em autoclave por 20min., 1atm. e a 120°C. Armazenados à temperatura ambiente e abrigo de luz.

Fonte: Adaptado de SAKAMOTO (1996)

Tabela 17: Preparação da solução de propionato de sódio 2M

Solução estoque de propionato de sódio 2M**Sais/Reagentes:**C₂H₅CO₂Na 38,424g

Água Milli-Q 200mL

Vidraria:

Béquer 100mL

Balão volumétrico 200mL

Bastão de vidro

Erlenmeyer 1000mL

Pipetas 10 e 5mL

20 Frascos de antibiótico

Equipamentos:

Sistema distribuição de gases

Autoclave

Procedimento:

♦ O sal foi pesado e dissolvido em água num béquer ♦ O volume foi aferido em balão volumétrico ♦ a solução transferida para erlenmeyer ♦ Borbulhou-se N₂ (100 %) por 20min. ♦ Colocou-se 10mL da solução nos frascos de antibiótico sob fluxo de N₂. ♦ Os frascos foram tampados e lacrados ♦ Colocados em autoclave por 20min., 1atm. e a 120°C. Armazenados à temperatura ambiente e abrigo de luz.

Fonte: Adaptado de SAKAMOTO (1996)

Tabela 18.: Preparação da solução de Metanol 2M

Solução estoque de Metanol 2M**Sais/Reagentes:**

Metanol absoluto	8,11mL
Água Milli-Q	200mL

Vidraria:

Erlenmeyer 1000mL
 Pipetas 10mL
 Seringas estéreis
 20 Frascos de antibiótico

Equipamentos:

Sistema distribuição de gases
 Autoclave

Procedimento:

♦ A água Milli-Q foi fervida e borbulhou-se Nitrogênio (100 %) até a temperatura abaixar para 40° C ♦ 10mL foram distribuídos em frascos de antibiótico sob fluxo de N₂ ♦ Os frascos foram tampados e lacrados ♦ Colocados em autoclave por 20min., 1atm. e a 120°C. ♦ Após resfriamento foi adicionado o metanol, com o auxílio de uma seringa esterilizadas e lavadas com N₂ ♦ Armazenados à temperatura ambiente e abrigo de luz.

Fonte: Adaptado de VAZOLLER (1995) e SAKAMOTO (1996)

Tabela 19: Procedimentos utilizados na preparação da solução de vitaminas

Solução de vitaminas**Sais/Reagentes:**

Água Milli-Q	1000mL
Biotina	0,002g
Ácido fólico	0,002g
Tiamina HCl	0,005g
Riboflavina	0,005g
Ácido nicotínico	0,005g
Pantatonato de cálcio	0,005g
Piridoxina.HCl	0,01g
Vitamina B ₁₂	0,0001g
Ácido Lipóico	0,005g

Vidraria:

(09) Béquer 50mL
 (09) Bastão de vidro
 Erlenmeyer 2000mL
 Proveta 1000mL
 Sistema Millipore
 100 Frascos de antibiótico 30mL

Equipamentos:

Sistema Distribuição de gases
 Autoclave

Procedimento:

♦ Os reagentes foram pesados e adicionados à água na ordem acima ♦ A solução foi filtrada em Sistema Millipore em ambiente estéril ♦ Distribuída em vidraria previamente esterilizada, frascos de antibiótico de 30mL, sob fluxo de N₂ (100%). ♦ Os frascos foram tampados e lacrados ♦ Estocados sob refrigeração e ao abrigo de luz..

Fonte: Adaptado de TOUZEL & ALBAGNAC (1983) e GOMES (1995)

O meio de cultura basal ZINDER deve ser acrescido das soluções referidas anteriormente, bem como das soluções de fontes de carbono. É denominado Meio ZINDER completo para o método de NMP, após a efetivação da troca de atmosfera de 100% de nitrogênio por atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30%), seguida das adições das soluções (de bicarbonato de sódio 10%, de vitaminas, fonte de carbono específica e redutora de sulfeto de sódio a 5%) nas alíquotas referidas na Tabela 19. O meio de cultura contendo celulose consistiu no meio basal ZINDER na quantidade de 8,7mL acrescido de 0,05g de pó de celulose, como descrito por GOMES (1995), foi utilizado para a avaliação de bactérias anaeróbias celulolíticas. As fontes de carbono ácidas foram avaliadas separadamente, acrescentando-se 0,2mL de cada fonte, separadamente, a 8,5mL de meio Basal ZINDER e as soluções para completá-lo.

Tabela 20: Composição do meio de cultura ZINDER completo

Meio ZINDER completo	
Meio basal ZINDER	8,5mL
Solução de Bicarbonato	0,1mL
Solução de Vitaminas	0,1mL
Fonte de carbono	0,2mL
Solução Redutora	0,1mL

4.7 Procedimentos para verificação dos tipos de arqueas metanogênicas através da aplicação de sondas de hibridização

ARAÚJO (1999) utilizou uma amostra proveniente de um frasco de leitura do NMP (diluição 10^{-1}) após 30 dias de incubação, contendo atmosfera H_2/CO_2 (4:1, 1 atm.) como fonte de carbono, para a realização de hibridização “in situ” com sondas fluorescentes MB 310 (específica para a ordem Methanobacteriales – dentro do domínio Archaea). A sonda utilizada foi SFMbac-0310-a-A-22 (RASKIN et al. a e b, 1994)²¹, marcada com rodamina e a sequência CTTGTCTCAGGTTCCATCTCCG.

²¹ a) RASKIN, L.; STROMLEY, J.M.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994). Group-specific 16S rRNA Hybridization Probes to Describe Natural Communities of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1232-1240.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados considerando-se o trabalho realizado em duas fases, a saber :

- (a) Fase I - refere-se a montagem dos três biorreatores operados sob condições descontínuas de alimentação, a fim de estabilizar o conteúdo orgânico do RSUDp, inoculados com lodo granulado proveniente de um biodigestor UASB em operação contínua para o estudo da degradação anaeróbia de águas residuárias de indústria de papel e celulose (CALLADO, 1998). Os biorreatores da fase I forneceram as amostras de resíduos sólidos para o estudo sobre o desprendimento das células microbianas do resíduo, previamente ao emprego das diluições e do método do NMP para avaliação quantitativa celular;
- (b) Fase II - montagem e operação dos dois biorreatores sob condições descontínuas de alimentação, a fim de estabilizar o conteúdo orgânico do RSUDp, inoculados com percolado oriundo de um sistema de tratamento de resíduos sólidos com baixo teor de umidade ("dry fermentation") e recirculação (BALDOCHI, 1997) e lodo granulado proveniente de um biodigestor operado com efluentes de indústria de alimentos (TORRES, 1998). Amostras desses dois sistemas foram avaliadas quantitativamente em relação aos grupos microbianos celulolíticos, acidogênicos, acetogênicos e metanogênicos acetoclásticos e hidrogenotróficos, empregando-se o procedimento mais adequado, definido na fase I para o tratamento prévio das amostras e, conseqüentemente, a contagem celular

b) RASKIN, L.; POUSEN, L.K.; NOGUERA, D.R.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994). Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1241-1248.

de resíduos sólidos.

As condições do processo de biodigestão anaeróbia nos biorreatores foram analisadas nas duas fases. No entanto, o acompanhamento sistemático da produção de biogás, dos valores de pH e da evolução de sólidos totais e sólidos totais voláteis, alcalinidade a ácidos voláteis e alcalinidade a bicarbonato, foi realizado nos reatores da fase II. Os sistemas da fase II sofreram reinoculação, a fim de acelerar a degradação da matéria orgânica.

É relevante comentar e discutir o acompanhamento e os procedimentos adotados para a preparação do RSUDp, como indicado no item 4.1 do capítulo Materiais e Métodos. Nas duas fases do presente trabalho, o RSUDp foi preparado de acordo com as orientações de PINTO (1998). Como anteriormente indicado, a autora estabeleceu os critérios para a definição da composição física do RSUDp, a partir de uma análise da composição da fração orgânica de resíduos previamente coletados em áreas determinadas do município de São Carlos. A autora formulou a composição do RSUDp avaliando cada componente dos rejeitos oriundos do consumo de alimentos, fundamentalmente, carnes, verduras, legumes e frutas, bem como folhas da vegetação do local considerado. As quantidades foram estabelecidas em porcentagem, segundo o predomínio de cada componente. Foram tomados cuidados em cada etapa da preparação do resíduo, a fim de possibilitar a repetição controlada desse preparo a cada experimento com o RSUDp. Os procedimentos de trituração foram adequados e permitiram o estabelecimento de um resíduo homogêneo em função do tamanho das partículas.

A heterogeneidade da composição de resíduos sólidos municipais é conhecida. PALMISANO & BARLAZ (1996), em uma revisão sobre decomposição de resíduos sólidos comentaram que é abundante a fração orgânica biodegradável nos resíduos sólidos municipais, indicando que a microbiologia é influenciada pela natureza dos compostos orgânicos. Assim, é muito importante compreender a composição dos resíduos que podem sofrer biodegradação, pois poderá influenciar na

escolha de determinados compostos orgânicos a serem estudados durante a prática da avaliação microbiana de amostras de resíduos sólidos.

Segundo a United States Environmental Protection Agency - USEPA²² (PALMISANO & BARLAZ, 1996), que publica há mais de 20 anos a composição de resíduos sólidos municipais desse país, é difícil estabelecer uma definição segura sobre o conteúdo padrão dos resíduos sólidos municipais, e que o mesmo depende de uma comunidade em particular. A USEPA relacionou que a fração biodegradável (papel, resíduos alimentícios e de jardinagem / vegetação local) a ser confinada em aterros sanitários nos Estados Unidos em 1993 era de aproximadamente 60% , e que 6,7% e 15,9% referiam-se, respectivamente, a frações de resíduos alimentícios e de jardinagem / vegetação local.

Os resíduos sólidos constituem-se em um nicho adequado para o desenvolvimento de microrganismos, e podem permitir a construção de uma comunidade microbiana de diversas espécies. Os resíduos podem servir como suporte para a colonização de bactérias, fungos e arqueas; com umidade e temperaturas adequadas o crescimento celular ocorre pela disponibilidade de compostos orgânicos e inorgânicos. Uma vez que a composição dos resíduos inclui papel, restos de alimentos e vegetação, possui portanto, substratos como celulose e hemicelulose, amido e proteína (JONES & GRAINGER, 1983; BARLAZ et al., 1990; PALMISANO et al., 1993; PALMISANO & BARLAZ, 1996). Os polissacarídeos predominam e a atividade de hidrólise e fermentação microbiana é essencial. Como pode ser observado na Tabela 5 do capítulo Materiais e Métodos, a fração de carboidratos e proteínas no RSUDp é elevada e, sob condições anaeróbias de degradação, permite a atividade de bactérias fermentativas hidrolíticas.

Os monômeros resultantes da hidrólise são fermentados e os produtos do metabolismo promovem o crescimento de outros grupos microbianos como organismos acetogênicos e metanogênicos. A ação das bactérias acetogênicas

²² USEPA (1994). Characterization of Municipal Solid Waste in the United States. EPA/530-R-94-042. U.S.Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

produzem os substratos mais específicos às arqueas metanogênicas, como já abordado no capítulo Revisão da Literatura do presente trabalho. Dessa forma, a escolha das fontes orgânicas estudadas na pesquisa experimental desenvolvida, celulose, ácidos orgânicos e gases como dióxido de carbono e hidrogênio, foi bastante adequada para “desenhar” o comportamento celular durante a degradação anaeróbia da RSUDp, sob condições não otimizadas, em escala de laboratório.

5.1 Valores do biogás medidos nos biorreatores da fase I.

Os valores percentuais da composição de biogás, metano e dióxido de carbono, nos três biorreatores operados na fase I, encontram-se na Tabela 21. As Figuras 8 a 10 ilustram a evolução da composição do biogás, em porcentagem, formado nos biorreatores ao longo de cerca de 50 dias de operação dos sistemas. A porcentagem de dióxido de carbono no biogás esteve inicialmente próxima a 90%, decrescendo ao final da incubação dos biorreatores. O teor do gás metano foi bastante baixo, não caracterizando a existência de atividade metanogênica nos sistemas. Os sistemas foram tamponados após 30 dias de operação. Muito provavelmente os valores de pH (que não foram determinados nessa data) estiveram abaixo da neutralidade. Decorridos 20 dias após o tamponamento, os valores de pH foram medidos e encontravam-se próximos a 5,3, indicando que os três biorreatores atingiram apenas a fase ácida. Na fase I, buscou-se apenas operar os três sistemas, a serem amostrados para o estudo dos procedimentos de preparação prévia dos resíduos sólidos, sem procurar otimizar as condições dos mesmos para a produção de metano, e em um tempo de incubação não superior a 65 dias.

Tabela 21. Valores da composição de biogás nos biorreatores da fase I

REATORES (FASE I)	Dias de operação	%CO₂	%Metano	%Nitrogênio
Reator 1	3	96,1	0	3,9
	7	89,6	0,5	9,9
	14	93,3	0	6,7
	44	83,1	2,1	14,8
	49	92,5	0	7,5
Reator 2	6	94,5	0,2	5,3
	13	98,3	0	1,7
	43	46,0	0,2	53,8
	48	48,8	0,1	51,1
Reator 3	10	97,1	0	2,9
	14	90,4	3,2	6,4
	33	30,6	0	69,4
	45	51,5	0,4	48,1

Figura 8: Evolução da composição do biogás, em porcentagem, do biorreator 1 da fase I

Figura 9: Evolução da composição do biogás, em porcentagem, do biorreator 2 da fase I

Figura 10: Evolução da composição do biogás, em porcentagem, do biorreator 3 da fase I

Os volumes de biogás foram medidos, aleatoriamente, através da variação da pressão interna dos sistemas e encontram-se na Tabela A2 do Anexo A. Os volumes determinados apenas mostraram o aumento da pressão interna, fundamentalmente do biorreator 1, que atingiu nos primeiros 15 dias de incubação volumes de até 2000mL. Os volumes determinados apenas uma vez para os outros sistemas, em períodos próximos de incubação, foram menores e iguais a 1450 e 700mL, respectivamente, para os biorreatores 2 e 3. O aumento da pressão interna dos sistemas apenas indicou a ocorrência de formação de biogás, e nesse caso, somente dióxido de carbono.

A operação dos três sistemas contendo RSUDp e inoculados com lodo granulado não macerado resultou em atividade de degradação com formação de dióxido de carbono. Não ocorreram, portanto, condições que permitissem a formação do biogás metano. A transferência de nutrientes no meio constituído das partículas do resíduo para os microrganismos presentes nos grânulos pode ter sido dificultada pela não maceração dos grânulos inoculados nos sistemas.

Quanto ao desenvolvimento do processo de biodegradação nos biorreatores, observou-se que a atividade microbiana ocorreu essencialmente na fase ácida, como anteriormente abordado, justificada pela presença de dióxido de carbono na atmosfera dos sistemas e os valores de pH, aproximadamente 5,3 (determinados em fita Carlo Erba). A aparência dos resíduos sólidos não foi muito diferente da fase de fechamento dos reatores, ao longo da operação dos sistemas. Contudo, nesse período observou-se a formação de um líquido amarelado, período esse em que a amostragem dos biorreatores foi realizada.

Cabe ressaltar que, de acordo com CALLADO (1998)¹, a amostra de grânulos fornecida para a inoculação dos biorreatores da fase I, coletada um mês antes da sua utilização neste trabalho, ficou armazenada em geladeira, podendo ter a sua atividade microbiana diminuída. Além disso, após ter utilizado este lodo em seu trabalho, a autora verificou baixa atividade metanogênica, além de exames microscópicos indicarem que os grânulos possuíam uma estrutura pouco comum, apresentavam cocos na sua parte externa e que no seu interior, não havia microrganismos. Tais

informações parecem corroborar com a conclusão sobre a baixa atividade microbiana dos biorreatores da fase I.

A fase ácida, etapa inicial na biodegradação anaeróbia, é caracterizada por valores baixos de pH. De acordo com MORMILE et al. (1996), o hidrogênio é um intermediário crítico na fermentação anaeróbia e o seu acúmulo, em aterros, pode ser indicativo de fermentação incompleta. A elevada concentração do gás hidrogênio e a depressão do pH resultam na diminuição da metanogênese. O pH ideal para a ação do grupo metanogênico é aproximadamente 7,0. Os valores encontrados nos biorreatores foram baixos, $\text{pH} \cong 5,3$, justificando a baixa produção de metano (Tabela 21). Em trabalhos de BALDOCHI(1997) e BRUNMELER(1993) foram evidenciados que os valores de pH próximos à neutralidade são adequados para a ação das arqueas metanogênicas.

Deve-se pontuar que algumas pesquisas realizadas sobre a degradação anaeróbia de resíduos sólidos preponderantemente constituídos por restos de alimentos, como indicado por CATELLI (1996), parecem resultar em um desequilíbrio entre o conteúdo de carbono e o de nitrogênio (relação C/N), dificultando a atividade microbiana e, por conseguinte, a metanogênese. Nessa pesquisa, buscou-se manter as condições nutricionais oriundas do RSUDp, e o conteúdo total de carbono e nitrogênio não foi determinado. Assim, a relação C/N pode não ter sido a ideal para as atividades microbianas, resultando em um desequilíbrio na ocorrência da metanogênese nos 65 dias de operação dos sistemas.

No entanto, como apontado por CATELLI (1996), rejeitos sólidos de indústrias de processamento de alimentos e de mercados podem ser estabilizados em longos períodos de incubação, sob condições anaeróbias e com produção de metano. O estudo sobre biorreatores anaeróbios operados em escala de laboratório com resíduos de restaurante (EESC/USP) também mostrou que, mantendo-se o $\text{pH} \cong 7,0$ e o conteúdo de sólidos totais da ordem de 2%, o processo anaeróbio para a estabilização da fração orgânica pôde ocorrer, mas o sistema não foi eficiente. O conteúdo de sólidos totais nos reatores foi baixo, em geral da ordem de 5 a 10%. De acordo com

REES²³ apud BRUNMELER (1993) o conteúdo de sólidos totais normalmente encontrado em aterros está na faixa de 20-60%. Nos trabalhos de BRUNMELER (1993), sobre a digestão anaeróbia da fração orgânica de resíduos sólidos municipais inoculados com lodo metanogênico, o conteúdo de 35% de umidade não foi eficiente, pois os compostos ácidos formados sobrecarregavam o sistema, com a conseqüente diminuição da produção de metano. De acordo com BUIVID et al.²⁴ apud KOMILIS et al. (1999), a umidade não contribui sozinha para o aumento da produção de metano, no entanto, o controle deste fator acrescido de nutrientes, lodo e tamponamento, aumentam a degradação. KOMILIS et al. (1999) notaram a importância do tipo de lodo utilizado, por exemplo, a mistura de resíduo sólido urbano acrescido de lodo proveniente de digestor anaeróbio de águas residuárias produziu três vezes mais metano do que a mistura de resíduo acrescido de lodo primário. BALDOCHI (1997) apresentou resultados sobre o conteúdo de sólidos e teor de umidade e sua influência nas velocidades de degradação dos sistemas. O experimento, baseado nos dados de BRUNMELER (1993), revelou que a introdução do percolado gerado no sistema de degradação da fração sólida orgânica de resíduos domésticos foi eficiente. Em outras palavras, o aumento da umidade e provavelmente, o aumento de microrganismos durante a recirculação foram muito adequados para o processo de fermentação de sólidos adotado, "Dry-fermentation". O pH do reator, no caso citado, foi controlado com bicarbonato de sódio.

5.1.1 Avaliação dos três diferentes tratamentos das amostras de resíduos sólidos

Os resultados da estimativa de células procarióticas dos grupos celulolítico e metanogênico pelo método do Número Mais Provável, obtidos nos testes dos diferentes procedimentos de preparação prévia das amostras de resíduos sólidos, encontram-se na Tabela 22. Nas Tabelas A.3 a A.5 do Anexo A são encontrados os resultados das leituras dos frascos. Os frascos contendo celulose em pó como fonte

²³ REES, J.F. (1980). Optimisation of methane production and refuse decomposition in landfills by temperature controll. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 30:458-465.

²⁴ BUIVID, M.G.; WISE, D.L.; BLANCHET, M.J.; REMEDIOS, E.J.; JENKINS, B.M. BOYD, W.F., PACEY, J.G. (1981). Fuel gas enhancement by controlled landfilling of municipal solid waste. *Resources and Conservation*, 6: 3-20.

de carbono, para a verificação do crescimento celulolítico, foram considerados positivos quando ocorreu o desenvolvimento de turvação do meio e presença de coloração amarelada sobre o pó de celulose. Para a análise da presença positiva das células procarióticas do grupo metanogênico, a leitura dos frascos foi considerada positiva após determinação de gás metano na atmosfera dos mesmos, segundo procedimentos indicados por GOMES (1995). Os valores foram calculados a partir da Tabela A.1, do ANEXO A, de leituras de até 5 conjuntos de tubos positivos e negativos do STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998).

Tabela 22: Valores obtidos do NMP para os grupos microbianos celulolítico e metanogênico.

Procedimentos	Grupo celulolítico	Grupo metanogênico
	NMP/mL	NMP/mL
BARLAZ et al. (1989a e b)	$2,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
VILLAS-BÔAS (1990)	$2,4 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$
JORAND et al. (1995) e	$2,4 \times 10^2$	$5,0 \times 10^1$
MÜNCH et al. (1997)		

Analisando-se os dados da Tabela 22, pode-se afirmar que não são constatadas diferenças nos valores de contagens de bactérias celulolíticas nos três procedimentos estudados, revelando-se portanto, bastante adequados para a homogeneização das amostras e contagem de bactérias celulolíticas. Porém, esses valores são baixos (na faixa de 10^2) comparados aos valores obtidos por BARLAZ et al. (1989a e b), na análise quantitativa de bactérias celulolíticas presentes em amostras de reatores com resíduos sólidos biodigeridos, porém sob condições metanogênicas e $\text{pH} \cong 7,0$, no intervalo de 10^4 a 10^5 células/mL. Esses trabalhos são considerados clássicos, pois são os únicos artigos publicados que, segundo BARLAZ (1996), relatam um estudo sobre procedimentos para a formação de inóculos de resíduos sólidos mais homogêneos. Neste trabalho, procurou liqüefazer a

amostra sólida em tampão fosfato, empregando-se um liquidificador, como descrito no capítulo Revisão da Literatura e adotado nessa pesquisa (item 4.3.1). No trabalho de BARLAZ et al. (1989a e b), o material liquefeito era ainda adicionalmente macerado manualmente, e então, utilizado como inóculo. Esse procedimento não foi realizado no presente trabalho, no entanto, o material liquefeito foi peneirado com a ajuda das mãos cobertas por luvas.

BARLAZ et al. (1989a) avaliaram seis diferentes técnicas de preparo de amostras sólidas, em amostras de biorreatores de 2L contendo resíduo sólido doméstico, proveniente de aterro, com recirculação do percolado tamponado. Procedimentos utilizados como a trituração do resíduo sólido em aparelho liquidificador para desprendimento dos microrganismos anaeróbios da matéria sólida, expremidos manualmente e peneirados, alternando o número de vezes que sofriam estes processos. O inóculo líquido resultante foi submetido ao método do NMP para estimar o número de bactérias celulolíticas, levando à obtenção de resultados semelhantes. Os resultados das contagens nas seis diferentes técnicas de preparo de amostra indicaram que todas foram efetivas no desprendimento de células do resíduo e os autores optaram pela técnica mais simples quanto à manipulação. A partir dos resultados obtidos, assumiram que a metodologia de preparo de amostras sólidas poderia ser utilizada em outros grupos microbianos, pois os grupos tróficos que provavelmente encontram-se aderidos a matéria particulada são as celulolíticas, podendo-se utilizar as técnicas de desprendimento de células do resíduo para outros grupos microbianos que participam da biodegradação anaeróbia em resíduos sólidos. O método do NMP foi empregado para a contagem de bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas, em três tubos por diluição, resultando em 10^4 - 10^5 cel/mL celulolíticas e de 10^7 cel/mL hemicelulolíticas, sendo que a leitura dos tubos foi feita considerando-se a leitura positiva dos frascos nas diluições utilizadas.

BARLAZ (1996) relatou ainda que o procedimento escolhido, o de liquefazer amostras sólidas utilizando liquidificador e maceração manual, foi baseado em inúmeros estudos realizados para contagem de bactérias celulolíticas de amostras originadas do rúmen de animais. Em geral, a quantidade empregada pelo autor era de

100g em peso seco do rejeito a ser liquefeito em tampão fosfato, em um liquidificador com volume de 4L. No presente trabalho, utilizou-se 50g de resíduo em peso úmido, ressuspensas em tampão fosfato (250mL), em um liquidificador de 1.500mL de volume útil. Essa técnica de preparo teve como aspecto positivo a formação de um inóculo mais homogêneo e líquido, porém como aspectos negativos de sua aplicação devem ser citados o excessivo tempo de exposição ao oxigênio e a possibilidade do volume da amostra exceder a capacidade da jarra do liquidificador.

Outros autores, PALMISANO et al. (1993b) estudaram métodos mais simples para a homogeneização de bactérias em amostras menores oriundas de aterros sanitários, por exemplo 10g de resíduos aterrados, e empregaram maceração mecânica do resíduo em tampão, por 1 minuto. WESTLAKE & ARCHER²⁵ apud BARLAZ (1996) estudaram a homogeneização de 1g de resíduo em diluente, apenas agitando-a em tubo de Hungate da marca Bellco, sob condições anaeróbias. Essas duas últimas técnicas se assemelham aos procedimentos de VILLAS-BOAS (1990) adotados no presente trabalho. A diferença contudo, está no uso de pérolas de vidro durante a homogeneização sob condições anaeróbias e o tempo de preparo. Nesta técnica, o tempo de preparo é mais longo (aproximadamente 1 hora) e a alíquota transferida para o frasco de antibiótico contendo pérolas de vidro, num volume bem menor, deve ser agitada manualmente (ângulo de 45°) por 30 minutos, o que pode dificultar sua reprodução, porém o tempo de exposição ao oxigênio é menor.

O método utilizado nessa pesquisa é adaptado de MÜNCH et al. (1997) e JORAND et al. (1995), em que o ultra-som foi utilizado para promover o desprendimento das células da amostra de resíduo, e a conseqüente homogeneização da amostra, foi escolhido em função da experiência dos autores que utilizaram sonicação para quantificar biomassa em águas residuárias e para desprendimento de células de flocos em lodos ativados, submetendo as amostras a vários tempos de exposição, verificando os mais eficazes no desprendimento sem a ocorrência de lise celular. A escolha do método do ultra-som no presente trabalho é justificada pela

²⁵ WESTLAKE,K;ARCHER,D.B.(1990). Fundamental studies on cellulose degradation in Landfills. ETSU B 1228. Energy Technology Support Unit, Department of Energy, Harwell Laboratory, England.

simplicidade quanto à manipulação, inovação e pouco tempo de exposição da amostra ao oxigênio.

Amostras líquidas originadas de sistemas de biodigestão anaeróbia de resíduos sólidos, aterros sanitários e/ou biorreatores, são facilmente homogeneizadas. Alguns trabalhos realizados com chorume para a determinação do número de bactérias celulolíticas através da técnica do NMP, resultaram em valores entre 10^4 e 10^5 células/mL, com ausência de tratamento prévio das amostras. As amostras de chorume foram retiradas de sistemas aterro sanitário experimental no.1 (EESC-USP/São Carlos - São Paulo) e depósito de lixo a céu aberto do município de São Carlos (São Paulo), respectivamente descritos por GIAJ-LEVRA (1991) e GOMES (1995).

Nos trabalhos de GIAJ-LEVRA (1991) e GOMES (1995), verificou-se a facilidade na homogeneização das células no líquido (chorume ou percolado) originado da hidrólise do resíduo sólido (etapa anaeróbia de hidrólise e fermentação – vide item 3.3 do capítulo Revisão da Literatura), ou em outras palavras, apenas o emprego da homogeneização manual antes das diluições. Isso reflete, na análise do presente trabalho, em que há uma porcentagem não especificada de células não aderidas às partículas sólidas, como fibras de celulose do resíduo, ou a organismos vivos maiores, como protozoários geralmente presentes em amostras de resíduos sólidos aterradas (PALMISANO & BARLAZ, 1996). É bastante provável que a liberação das bactérias celulolíticas de materiais inertes presentes nas amostras, após cada um dos tratamentos realizados, tenha ocorrido, e que qualquer material suporte tenha sido carregado de forma semelhante durante as diluições e inoculações.

Nas contagens realizadas, a fonte orgânica foi o pó de celulose, pois o objetivo era a determinação do número de bactérias celulolíticas nas amostras retiradas dos três biorreatores. A produção de gás metano foi praticamente inexistente nos três sistemas, como observado na Tabela 21. O metano foi dosado após 30 dias de incubação nos tubos de NMP para contagem de bactérias celulolíticas, procedimento utilizado para a leitura da presença de arqueas

metanogênicas, pois os produtos do metabolismo de culturas hidrolítico-fermentativas, no caso as celulolíticas, podem constituir-se como substratos energéticos para as células produtoras de metano, ou para um terceiro grupo denominado acetogênico, que então produziria esses substratos (item 3.3 do capítulo Revisão da Literatura). O grupo metanogênico foi detectado nas contagens, apesar dos sistemas não terem produzido metano, ou produzido em quantidades não mensuráveis pela técnica cromatográfica utilizada. Como anteriormente discutido, é provável que os sistemas de reação tenham acidificado durante o período de incubação considerado e, a metanogênese tenha sido prejudicada. Contudo, não se pode afirmar que as culturas metanogênicas tenham sido inibidas, na medida que os valores de células metanogênicas foram semelhantes ou uma ordem de grandeza inferior aos das bactérias celulolíticas.

As Tabelas 23 a 25 e as Figuras 11 a 13 reúnem as determinações de metano (mmoles) de cada diluição positiva do método do NMP. Os resultados ilustram os teores de metano mais acentuados nas menores diluições, em cada um dos três procedimentos estudados.

Comparando-se os valores de metano (mmoles) nos diferentes procedimentos nas Figuras 11 a 13, percebe-se que os procedimentos de BARLAZ e do ultra-som foram os que atingiram uma maior produção de biogás metano, resultante da atividade de arqueas metanogênicas. Podemos afirmar que estes métodos foram os mais efetivos, porém, a diferença entre os valores nos três procedimentos não foi muito grande. Contudo, quanto ao número de celulolíticas (Tabela 22), foram obtidos os mesmos valores nas três metodologias, entendendo que todas foram efetivas no tratamento das amostras.

Tabela 23: Valores de metano nos tubos de leitura do NMP do método de BARLAZ et al. (1989 a e b)

Frascos/Diluições	Metano (mmoles)
B 1*	0,001998
B 2*	0,002405
B 3*	0,002586
B 4*	0,001328
B 5*	0,001703
B1b**	0,000304
B2b**	0,000509
B3b**	0,00023
B4b**	0,000661
B5b**	0,0001

*(diluições 10^{-1}); **(diluições 10^{-2})

Figura 11: Representação gráfica dos valores de metano (mmoles) obtidos nos tubos de ensaio das leituras positivas do método de BARLAZ et al. (1989 a e b)

Tabela 24: Valores de metano nos tubos de leitura do NMP do método de VILLAS-BÔAS(1990)

Frascos/Diluições	Metano (mmoles)
VB 1*	0,00128
VB 2*	0,001
VB 3*	0,001006
VB 4*	0,001471
VB 5*	0,001352
VB1b**	0
VB2b**	0
VB3b**	0,000742
VB4b**	0,000375
VB5b**	0,000132

*(diluições 10^{-1}); **(diluições 10^{-2})

Figura 12: Representação gráfica dos valores de metano obtidos nos tubos de ensaio – Método de VILLAS-BÔAS (1990)

Tabela 25: Valores de metano nos tubos de leitura do NMP do método do ultra-som

Frascos/Diluições	Metano (mmoles/L)
Ult1*	0,001664
Ult2*	0,001887
Ult 3*	0,001538
Ult4*	0,000531
Ult 5*	0,001124
ult 1b**	0,000466
ult 2b**	0,000148
ult 3b**	0,0001
ult 4b**	0,0001
ult 5b**	0,0001

*(diluições 10^{-1}); ** (diluições 10^{-2})

Figura 13: Representação gráfica dos valores de metano obtidos nos tubos de ensaio – Método do ultra-som (MÜNCH et al., 1997 e JORAND et al., 1995).

Este estudo revelou que os três procedimentos resultaram em comportamentos semelhantes quanto à produção de metano, e os valores das arqueas metanogênicas foram superiores quando adotados os procedimentos de BARLAZ et al. (1989a e b) e VILLAS-BÔAS (1990), vide Tabela 22. A Figura 14 revela que os teores de metano nos tubos de NMP, cuja amostra foi previamente tratada pelo método de BARLAZ et al. (1989 a e b) foram ligeiramente superiores, no entanto, esses valores são bastante baixos, e os erros na técnica de determinação do metano podem influenciá-los.

Cabe salientar, que cada reator foi fonte para cada técnica estudada, e apesar de apresentarem comportamento relativamente semelhante (Tabela 21), não foi possível garantir a homogeneidade durante a amostragem.

As amostras retiradas dos biorreatores em datas diferentes, porém com o mesmo tempo de incubação (dias), foram utilizadas para a contagem de bactérias celulolíticas utilizando-se três diferentes técnicas de preparo de amostras, uma para cada biorreator. Os biorreatores foram submetidos ao mesmo tratamento, quanto à quantidade de RSUDp e inóculo colocados, ao tempo de incubação, ocorrência de tamponamento, retirada do excesso de gás produzido (evitando-se o perigo de explosão) e medida de biogás metano e dióxido de carbono. As amostras sólidas submetidas às técnicas de preparo para as subseqüentes diluições do NMP eram tratadas de diferentes formas: i) no método de BARLAZ et al. (1989a e b) a amostra era colocada em aparelho liquidificador, sem preocupação com a manutenção de anaerobiose (BARLAZ, 1995 afirma que a exposição de grupos anaeróbios estritos a atmosfera de oxigênio por um período de tempo pode não ser tão prejudicial), porém o líquido formado era de boa quantidade e homogêneo, facilitando as diluições seriadas; ii) o método de VILLAS-BÔAS foi efetivo na manutenção da anaerobiose, porém uma pequena alíquota da amostra era transferida para um frasco e utilizada para as diluições (diminuindo a representatividade da amostra); iii) no método do Ultra-som a amostra era submetida à atmosfera de N_2/CO_2 (70:30%) e num volume semelhante ao método de BARLAZ, garantindo uma boa representatividade da

amostra.

A Figura 14 mostra a comparação dos valores de metano nas atmosferas dos frascos das diluições positivas do NMP nos três diferentes métodos de tratamento de amostra sólidas.

Figura 14: Representação gráfica dos valores de metano obtidos nos tubos de ensaio das leituras positivas do NMP, nos três métodos estudados.

Um resultado importante nessa fase do trabalho, além da possibilidade de indicar um procedimento alternativo para o tratamento prévio das amostras, foi indicar a possibilidade de utilizar a celulose como única fonte de carbono e, assim, determinar o crescimento de dois grupos de microrganismos importantes na metanogênese dos resíduos. GOMES (1995) indicou essa alternativa, constatando uma diminuição no número de fontes orgânicas a serem testadas, o que facilita a rotina de contagem celular em trabalhos experimentais.

Outro aspecto relevante foi a avaliação da morfologia celular predominante em amostras retiradas dos tubos de ensaio do NMP. A Tabela 26 mostra o predomínio dos tipos morfológicos encontrados em cada conjunto originado de cada tratamento prévio das amostras. O exame microscópico foi realizado sob contraste de fase, e as diluições observadas foram 10^{-1} e 10^{-2} , sendo que, nesta última a presença de células era rara. O predomínio foi de bacilos delgados (Figura 15), bacilos menores, cocos e filamentos. Sob exame microscópico de fluorescência, os bacilos abundantes eram fluorescentes. Não foram encontradas diferenças nos tipos morfológicos nas amostras tratadas pelos três procedimentos.

Tabela 26: Tipos morfológicos observados, sob exame de contraste de fase, nos tubos da diluição 10^{-1} do NMP de cada procedimento estudado.

Tipos morfológicos	ULTRA-SOM	VILLAS-BÔAS	BARLAZ et al.
Bacilos delgados e pequenos	++++	++++	+++
Filamentos	++	+	+
Bacilos pequenos	+	++	++
Bacilos médios	+	+	++
Bacilos pequenos fluorescentes	+	+	+

(+ raras células; ++ poucas células; +++ muitas células)

A Figura 15 mostra as morfologias visualizadas nos frascos de leitura do NMP, nas três diferentes metodologias, na diluição de 10^{-1} , comparando-se e considerando que os diferentes campos de registro das fotomicrografias podem ter diferenças de amostragens, não há diferenças significativas nas morfologias.

Figura 15: Fotomicrografias das morfologias celulares das três diferentes metodologias nos frascos de leitura do NMP na diluição 10^{-1} (a)BARLAZ; (b)VILLAS-BÔAS; (c)Ultra-som.

Figura 15: Fotomicrografias das morfologias celulares das três diferentes metodologias nos frascos de leitura do NMP na diluição 10^{-1} (a)BARLAZ; (b)VILLAS-BÔAS; (c)Ultra-som.

São muitos os fatores que influenciam o tratamento das amostras para contagens. Sem dúvida, o mais importante deles é a adesão das células ao suporte que pode ser ao mesmo tempo seu substrato de crescimento, como a celulose. Os valores de números de bactérias celulolíticas encontrados podem ser considerados baixos, se comparados com outros sistemas em operação com resíduos sólidos, mas é muito difícil compará-los em função das características de preparação das amostras, dos meios de cultura utilizados e das condições de anaerobiose estrita empregadas. O método de BARLAZ et al. (1989 a e b) estudado nesse trabalho, foi aquele que permitiu um maior contato da atmosfera aeróbia com a amostra. Durante toda a liquefação da amostra não houve condições de anaerobiose, sequer atmosfera livre de oxigênio no “copo” do liquidificador. Contudo, resultou em valores de bactérias e arqueas bastante próximos aos dos outros procedimentos em que o cuidado em manter as condições de anaerobiose foi maior. A exposição ao oxigênio pode não ser prejudicial a todos os grupos de microrganismos, dependendo do grupo, tempo de exposição e condições nutricionais.

BARLAZ (1996) afirmou que devem existir esforços consistentes dos pesquisadores para minimizar a exposição dos resíduos sólidos ao oxigênio durante a amostragem em aterros e biodigestores anaeróbios, sua preparação para desprendimento das células, e que o grau de dificuldade é dependente do tipo de sólido. Assim, as técnicas para a preparação do inóculo para contagem devem ser adaptadas segundo o objetivo de cada trabalho. Na presente pesquisa, optou-se pelo método do ultra-som, pois somado a sua simplicidade e facilidade para a manutenção de uma atmosfera anaeróbia, as células foram desprendidas do resíduo e os conglomerados do tipo sarcina, liberados e seu tamanho diminuído, facilitando assim a transferência desses grupos morfológicos na diluição seriada do NMP. Nos trabalhos de JORAND et al. (1995) e de MÜNCH et al. (1997), a sonicação foi empregada para o desprendimento de células e quantificação, observando em diferentes tempos de exposição, havendo um limite para a não ocorrência de lise celular e diferença nos tamanhos dos conglomerados de células.

5.2 Avaliação da decomposição anaeróbia nos biorreatores da fase II

Na segunda fase desse trabalho, dois biorreatores (1 e 2) foram mantidos sob condições de operação diferentes daquelas empregadas para os biorreatores da fase I. Os biorreatores da fase II foram mantidos em operação como fonte de inóculo para o NMP para avaliar o grau de segurança em relação ao método de tratamento prévio da amostra sólida, o ultra-som. No Anexo A, nas Tabela A6 e A7 encontram-se as planilhas de acompanhamento dos biorreatores 1 e 2, respectivamente. A operação dos dois sistemas também possibilitou o acompanhamento da resposta do processo anaeróbio nas condições determinadas neste trabalho, e consequentemente, a avaliação quantitativa dos grupos microbianos (bactérias celulolíticas e acetogênicas e arqueas metanogênicas) possibilitou o monitoramento da atividade celular nos biorreatores. Em outras palavras, procurou-se relacionar alguns parâmetros de operação rotineira dos biorreatores anaeróbios com os resultados das contagens microbianas, possibilitando a análise do processo anaeróbio de decomposição do RSUDp nas condições estudadas.

As seguintes condições de operação dos sistemas possibilitaram a decomposição anaeróbia do RSUDp: como inóculo, utilizou-se percolado originado do reator com recirculação de percolado, operado e estudado de acordo com BALDOCHI (1997), com conteúdo inicial de ST foi de 20%; durante a operação dos sistemas foram adicionadas alíquotas de lodos biológicos anaeróbios granulados oriundos de um reator UASB operados segundo TORRES (1998), a umidade foi mantida em 80%. Ao longo da operação dos biorreatores 1 e 2 foram monitorados os conteúdos de ST e STV, alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade a ácidos voláteis, bem como a produção de metano e dióxido de carbono. A cada abertura dos reatores durante as amostragens para avaliação quantitativa dos grupos microbianos, o biogás na atmosfera era substituído pela mistura de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30%). Durante as amostragens, portanto, ocorria um declínio no valor real de metano devido à abertura dos sistemas. Contudo, as condições anteriores à abertura

de cada reator eram rapidamente alcançadas, verificadas através dos valores de metano determinados em seguida ao fechamento (Tabelas 27 e 28 e Figuras 16 a 19). O valor inicial do pH da mistura (RSUDp e percolado) foi igual a 6,0 e aumentou para 8,0 na fase considerada metânica acelerada (BARLAZ, 1989b). O valor do conteúdo inicial de ST na mistura dos biorreatores foi de 20% e os finais (após 170 dias de biodegradação anaeróbia) de 10% e 6,27%. As amostras eram retiradas dos biorreatores para a realização do NMP, após as alimentações e/ou adição de nova fonte de inóculo.

5.2.1. Composição do biogás metano e dióxido de carbono nos biorreatores da fase II

Os dois sistemas apresentaram, após dez dias de operação e agitação manual diária, apenas a presença de dióxido de carbono. Assim, não sendo verificada a produção de gás metano, supôs-se um provável declínio do pH, devido a acidificação do sistema, suposição essa baseada em trabalhos realizados sobre digestão anaeróbia de frações orgânicas de resíduo sólido em condições semelhantes de operação dos sistemas (CATELLI, 1996; BALDOCHI, 1997). Assim sendo, acrescentou-se 12 g de bicarbonato de sódio, como recomendado por BALDOCHI (1997), baseado em BRUMMELER (1993). Ao acrescentar o bicarbonato, com a finalidade de neutralizar o pH do meio que encontrava-se em 6,0 (determinado por fita de pH), os frascos foram mantidos sob atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30 %) por 20 minutos. As Tabelas 27 e 28 mostram a porcentagem dos gases metano e dióxido de carbono na atmosfera dos biorreatores 1 e 2, respectivamente, bem como os valores de concentração de metano durante aproximadamente 180 dias de operação, à temperatura de 40°C.

Após a correção do pH para 7,0 e decorridos 29 dias de operação dos sistemas, as porcentagens do gás metano na atmosfera dos frascos de reação atingiram 32% e 30% nos biorreatores 1 e 2, respectivamente. Nesse período, ocorreu a primeira retirada de amostra para as contagens de bactérias celulolíticas (biorreator 1). A segunda amostragem foi feita quando os dois sistemas atingiram

12,7% (biorreator 1) e 7,85% (biorreator 2) de metano, com 49 dias de operação. Os biorreatores foram alimentados após a primeira e a segunda retirada de amostra (alimentação com RSUDp) e as contagens do grupo metanogênico no biorreator 2 foram iniciadas a partir da 3ª amostragem. Decorridos 53 dias de incubação, quando a produção de metano era muito baixa e o pH $\cong$ 6, os biorreatores foram reinoculados e a temperatura de incubação foi alterada para 40°C. Segundo BARLAZ (1996), a temperatura ideal nos estudos em laboratório sobre a degradação anaeróbia de resíduos sólidos é próxima a 40°C, estimulando a metanogênese do processo.

As amostragens para a determinação dos valores de microrganismos foram retiradas considerando-se os valores de metano atingidos nos dois sistemas. Assim, a seguir, indicam-se os valores de metano à cada amostragem realizada e os respectivos tempos de incubação. Após 72 e 73 dias de incubação, os biorreatores 1 e 2 atingiram valores de metano de 57,8% e 63%, respectivamente, e foram retiradas amostras para contagem de bactérias celulolíticas (biorreator 1) e de arqueas metanogênicas acetoclásticas (biorreator 2). Na quarta amostragem, após 94 e 95 dias de operação e 35% e 17% de metano nos biorreatores 1 e 2, respectivamente, foram feitas contagens de celulolíticas (biorreator 1) e de acetogênicas e arqueas metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas (biorreator 2). Após 115 e 122 dias de incubação e 75% e 70% de metano em cada reator, 1 e 2 respectivamente, foram feitas contagens de celulolíticas em amostra do biorreator 1, e de bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas em amostras do biorreator 2. As últimas amostragens foram feitas com aproximadamente 145 e 170 dias de incubação, 65% e 50% de metano, respectivamente para os biorreatores 1 e 2, ambos com valores de pH aproximadamente 8,0, a avaliação de bactérias celulolíticas no biorreator 1 e bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas no biorreator 2. Após o 87º dia e 16% de metano, o biorreator 2 foi aberto para a verificação da alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade devida a ácidos voláteis. Após 115, 144 e 170 dias de incubação no biorreator 1 e após 122 e 147 dias no biorreator 2, foram realizadas análises de alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade devida a ácidos voláteis. As retiradas de amostras para o NMP estão indicadas nas Figuras 16 e 18, respectivamente para os biorreatores 1 e 2.

Após duas retiradas de amostras para o NMP, com a consecutiva alimentação dos biorreatores com RSUDp e água, na proporção indicada anteriormente em Materiais e Métodos, os valores de metano não ultrapassaram 12% e foram decaindo para valores não detectáveis nas condições empregadas em cromatografia. Os dois biorreatores foram reinoculados com 250mL de percolado e 100mL de lodo granulado em suspensão após 53 dias de incubação. Foram feitos exames microscópicos no lodo granulado e no percolado, observando-se bacilos delgados curtos, longos e filamentosos, bacilos e cocos fluorescentes no lodo granulado e no percolado foram observados muitos cocos fluorescentes e poucos bacilos.

Após a primeira e a segunda análise quantitativa de bactérias nos reatores foram acrescentadas porções de 54,64g de RSUDp, mantidos previamente congelados, e 45,36mL de água sistema Milli-Q e o tamponamento foi feito com 1,2g de bicarbonato de sódio. O procedimento de alimentação, repondo-se a quantidade de resíduo retirado, foi feito para simular um sistema próximo ao semicontínuo.

A partir da reinoculação, a porcentagem de gás metano nos biorreatores atingiu uma faixa de 60%, e mesmo com as aberturas para as retiradas de amostras, o metano manteve-se em valores de até 70%, indicando que o processo de biodegradação anaeróbia nos biorreatores estava ocorrendo ativamente, encontrando-se na fase de produção acelerada de metano (BARLAZ, 1989b). As Figuras 16 e 18 mostram o perfil do desenvolvimento da composição, em porcentagens, de gás metano e dióxido de carbono nos biorreatores 1 e 2, respectivamente.

As Figuras 17 e 19 mostram os valores da concentração de metano nos biorreatores 1 e 2, calculada a partir de uma curva de calibração que encontra-se no Anexo ^a

Tabela 27: Valores da composição de biogás e da concentração de metano no biorreator 1 da fase II .

DATA	Tempo incubação (dias)	%CH ₄	%CO ₂	METANO (moles/L)
17/Ago	0	-	-	-
19/Ago	2	-	83,55	-
21/Ago	4	-	99,07	-
24/Ago	7	-	96,33	-
27/Ago	10	-	-	-
31/Ago	14	5,40	64,73	0,00429
4/Set	18	32,39	56,96	0,018932
8/Set	22	33,4	58,12	0,045268
14/Set	28	32,4	62,6	0,046819
15/Set*	29	-	-	-
18/Set	32	2,30	50,64	0,001585
23/Set	37	8,02	66,55	0,004554
29/Set	43	10,01	68,42	0,006639
5/Out*	49	12,70	71,36	0,006494
8/Out	52	0,32	54,80	0,000398
9/Out ¹	53	-	-	-
10/Out	54	-	-	-
13/Out	57	16,24	71,12	0,011598
18/Out	62	26,73	67,59	0,020269
21/Out	65	28,87	63,25	0,020162
23/Out	67	38,95	59,06	0,027522
26/Out	70	51,56	47,50	0,030028
28/Out*	72	57,79	41,83	0,039293
29/Out	73	13,59	35,02	0,010513
2/Nov	77	62,66	33,50	0,045300
5/Nov	80	52,38	47,02	0,039900
6/Nov	81	27,14	72,53	0,009580
9/Nov	84	15,35	84,26	0,011637
10/Nov	85	15,98	83,50	0,012366
11/Nov	86	16,94	82,24	0,010905
12/Nov	87	17,65	81,79	0,013490
13/Nov	88	19,28	80,13	0,014849
16/Nov	91	24,48	74,76	0,016745
18/Nov	93	31,43	68,30	0,022293
19/Nov*	94	35,09	34,10	0,024283
20/Nov	95	06,73	33,80	0,004467
23/Nov	98	32,49	33,32	0,022997
24/Nov	99	40,92	33,63	0,030307
25/Nov	100	49,07	32,20	0,038417
27/Nov	102	62,16	27,29	0,037501
30/Nov	105	72,63	23,89	0,048627

2/Dez	107	74,06	23,71	0,042365
3/Dez	108	73,35	25,14	0,050272
4/Dez	109	72,88	25,78	0,044743
7/Dez	112	76,55	22,76	0,057263
10/Dez*	115	75,22	24,32	0,048758
11/Dez	116	11,29	34,62	0,008164
14/Dez	119	34,60	32,12	0,021565
17/Dez	122	45,73	32,99	0,029783
18/Dez	123	47,47	34,64	0,034251
21/Dez	126	53,04	33,73	0,041749
27/Dez	132	40,50	21,42	0,052307
4/Jan	140	61,08	23,26	0,044313
7/Jan	143	64,18	27,03	0,046800
8/Jan*	144	62,88	29,99	0,051817
11/Jan	147	19,29	34,83	0,011636
12/Jan	148	29,96	34,96	0,031422
14/Jan	150	37,84	34,70	0,056752
21/Jan	157	51,34	32,07	0,043895
26/Jan	162	54,90	32,76	0,042390
29/Jan	165	54,77	34,79	0,033285
3/Fev*	170	50,96	35,97	0,031871
8/Fev	175	5,9	36,12	0,004530
11/Fev	178	8,9	36,4	0,005622

(-)Indica que não foram obtidos valores de metano; (1)abertura para reinoculação;
 (*)retirada de amostra

Figura 16: Representação gráfica da composição dos gases metano e dióxido de carbono ao longo do período de operação do biorreator 1 da fase II. $\downarrow$ indica os pontos de abertura para retirada de amostra.

Figura 17: Representação gráfica dos valores da concentração de metano no biorreator 1 da fase II.

Tabela 28: Valores da composição e concentração de metano no biorreator 2 da fase II.

DATA	Tempo incubação (dias)	%CH ₄	%CO ₂	METANO (moles/L)
17/Ago	0	-	-	-
19/Ago	2	-	67,07	-
21/Ago	4	-	98,77	-
24/Ago	7	-	98,31	-
27/Ago	10	-	-	-
31/Ago	14	3,06	66,24	0,002500
4/Set	18	29,89	58,93	0,017280
8/Set	22	31,12	60,26	0,043924
14/Set	28	30,55	62,56	0,045047
15/Set*	29	-	-	-
18/Set	32	1,79	53,27	0,001237
23/Set	37	4,23	65,45	0,002562
29/Set	43	6,86	71,19	0,004664
6/Out*	50	7,85	73,11	0,004040
8/Out	52	0,23	47,77	0,000340
9/Out ¹	53	-	-	-
10/Out	54	-	-	-
13/Out	57	16,27	71,36	0,011936
18/Out	62	27,38	67,28	0,021204
21/Out	65	31,07	65,91	0,024322
23/Out	67	40,09	58,06	0,030536
26/Out	70	53,87	45,38	0,031504
28/Out	72	63,50	36,15	0,044068
29/Out*	73	63,12	36,50	0,044314
2/Nov	77	65,97	30,38	0,046200
5/Nov	80	50,82	48,57	0,036051
6/Nov	81	24,60	74,94	0,012096
9/Nov	84	16,69	82,97	0,012710
10/Nov	85	15,63	83,24	0,011951
11/Nov	86	16,35	83,12	0,011932
12/Nov ²	87	16,81	82,10	0,012163
13/Nov	88	01,86	35,86	0,001567
16/Nov	91	07,29	41,37	0,005275
18/Nov	93	12,24	45,53	0,008919
19/Nov	94	14,21	46,22	0,009474
20/Nov*	95	17,02	47,64	0,011826
23/Nov	98	12,08	36,06	0,009030
24/Nov	99	17,56	36,80	0,013647
25/Nov	100	23,33	36,74	0,018848
27/Nov	102	35,70	34,77	0,023100
30/Nov	105	53,27	29,71	0,037623
2/Dez	108	63,45	27,00	0,038984
3/Dez	109	67,86	25,54	0,045301

4/Dez	110	70,65	24,56	0,044372
7/Dez	113	75,98	21,77	0,055227
10/Dez	117	77,47	21,35	0,049723
11/Dez	118	75,77	23,29	0,043103
14/Dez*	121	75,70	23,69	0,050394
18/Dez	125	70,01	28,66	0,045619
21/Dez	128	11,79	34,06	0,009600
27/Dez	134	36,60	34,59	0,042624
4/Jan	142	54,34	32,11	0,037754
7/Jan	145	58,52	32,89	0,041231
11/Jan*	149	64,07	30,83	0,039612
12/Jan	150	61,34	29,54	0,048506
15/Jan	153	65,60	31,50	0,076279
21/Jan	159	27,78	32,20	0,022797
26/Jan	164	37,74	31,45	0,028634
29/Jan	167	39,51	33,73	0,033179
3/Fev	171	41,75	33,77	0,033771
8/Fev	176	43,22	35,47	0,037357
11/Fev	179	44,22	35,34	0,029292

(-) Indica que não foram obtidos valores de metano; (1)abertura para reinoculação;
(2)abertura para análise de ácidos; (*)retirada de amostra

Figura 18: Representação gráfica da composição dos gases metano e dióxido de carbono ao longo do período de operação do biorreator 2 da fase II. $\downarrow$ indica os pontos de aberturas do biorreator.

Figura 19: Representação gráfica dos valores da concentração de metano no biorreator 2 da fase II.

5.2.2. Avaliação de outros parâmetros físico-químicos dos biorreatores da fase II

A operação dos biorreatores foi semelhante nos dois sistemas, mantendo-se as amostragens em tempos de incubação bastante próximos. Amostras foram tomadas dos biorreatores 1 e 2 em períodos diferentes para análise de alcalinidade a bicarbonato e a ácidos voláteis, segundo DILALLO & ALBERTSON (1961) modificado por RIPLEY et al. (1986).

As Tabelas 29 e 30 apresentam os valores do conteúdo de ST e STV, pH, alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade a ácidos voláteis. Os valores iniciais e após as amostragens durante a incubação dos sistemas estão designados em relação ao período amostrado.

Tabela 29: Condições de operação e valores dos parâmetros analisados no Biorreator 1 da fase II.

Operação, amostragem e tempo de incubação	Alimentação	pH	ST (%)	STV (%)	Alc. A bicarb (g/L)	^a Ác. voláteis (g/L)
Início	500g RSUDp + 500mL percolado	-	20	-	-	-
Tamponamento 10 dias	12,0g bicarbonato de sódio	-	-	-	-	-
1ª amostra NMP 29 dias ⁰	54,64g RSUDp ¹ + 45,36mL água	-	-	-	-	-
2ª amostra NMP 49 dias ⁰	54,64g RSUDp ¹ + 45,36mL água	-	-	-	-	-
Reinoculação 53 dias	100mL lodo granulado + 250mL percolado	6,0 ²	15	10,95	-	-
3ª amostra NMP 72 dias	/	7,0 ²	17	12,50		
4ª amostra NMP 94 dias	/	7,3 ³	11,8	8,45		
5ª amostra NMP 115 dias ⁵	/	7,94 ⁴	11,6	8,10	25,25	11,0
6ª amostra NMP 144 dias	/	8,05 ⁴	10,7	6,8	27,8	7,7
7ª amostra NMP 170 dias	/	8,0 ⁴	10	6,27	30,5	8,36

(/) apenas retirada de amostra para contagens; (-) não determinado; (Alc.a bicarb) Alcalinidade a bicarbonato; (^a Ác. Voláteis) Alcalinidade devida a ácidos voláteis; (0) alimentação do biorreator; (1) mantido congelado; (2) pH determinado através de fita Carlo Erba; (3) pH determinado após retirada do sistema, utilizando potenciômetro; (4) pH determinado no sistema de reação, utilizando potenciômetro; (5) início da determinação de Alcalinidade a bicarbonato e devida a ácidos

Tabela 30: Condições de operação e valores dos parâmetros analisados no Biorreator 2 da fase II.

Operação, amostragem e tempo de incubação	Alimentação	pH	ST (%)	STV (%)	Alc. A bicarb (g/L)	^a ác. Voláteis (g/L)
Início	500g RSUDp + 500mL percolado	-	20	-	-	-
Tamponamento 10 dias	12,0g bicarbonato de sódio	-	-	-	-	-
Alimentação 29 dias	54,64g RSUDp ¹ +45,36mL água	-	-	-	-	-
Alimentação 49 dias	54,64g RSUDp ¹ +45,36mL água	-	-	-	-	-
Reinoculação 53 dias	100mL lodo granulado +250mL percolado	6,0 ²	15	10,95	-	-
1ª amostra NMP 73 dias	/	7,0 ²	15	10,61	-	-
Abertura ⁰ 87 dias	/	7,3 ³			25,5	27,5
2ª amostra NMP 95 dias	/	7,4 ³	11,0	7,59	-	-
3ª amostra NMP 122 dias	/	8,09 ⁴	11,6	8,2	27,87	9,6
6ª amostra NMP 147 dias	/	8,07 ⁴	9,5	5,8	34,83	8,79
5ª amostra NMP 179 dias	/	8,1 ⁴	10	6,1	-	-

(/) apenas retirada de amostra para contagens; (-) não determinado; (Alc. a bicarb) Alcalinidade a bicarbonato; (A. ác. voláteis) Alcalinidade devida a ácidos voláteis; (0) abertura para determinação de Alc. a bicarb. e A. ác. voláteis; (1) mantido congelado; (2) pH determinado através de fita Carlo Erba; (3) pH determinado após retirada do sistema, utilizando potenciômetro; (4) pH determinado no sistema de reação, utilizando potenciômetro.

A representação gráfica do conteúdo de ST e STV nos biorreatores 1 e 2 encontram-se nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Verifica-se que os conteúdos de Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis foram diminuindo gradualmente com a ocorrência da biodegradação anaeróbia, inicialmente os valores de ST estavam na faixa de 20% e atingiram 10% no final, após a retirada da última amostra, e os

percentuais de STV decorridos 53 dias foram de 11%, decrescendo para valores próximos a 6%.

Nos primeiros 53 dias de incubação houve um decréscimo do valor de ST de 25%, ou seja, o conteúdo inicial de 20% decresceu a um valor inferior a 15% neste tempo de incubação, pois 15% representa o conteúdo de ST no momento da introdução de lodo granulado proveniente de um reator UASB e percolado, nos dois sistemas. Este valor não foi alterado por mais 20 dias, após a “reinoculação” dos dois sistemas, que ocorreu, como anteriormente justificado (item 5.2.1), para introduzir biomassa ativa. Atribui-se essa remoção inicial de ST (cerca de 25%), a uma adequada atividade de hidrólise no início do processo, considerando-se as duas alimentações realizadas. Nesse período houve a produção de metano, porém de modo irregular como constatado nas Tabelas 27 e 28 e nas Figuras 16 a 18. Credita-se também a não ocorrência de metanogênese a um provável acúmulo de ácidos, pois o pH dos dois reatores encontravam-se em torno de 6,0 (determinados com fita). O tamponamento foi feito anterior às adições de alimentação, o que pode não ter sido eficiente ao longo do período de 53 dias de operação.

Após a adição de lodo granulado e percolado, durante a reinoculação, houve o acréscimo de microrganismos metanogênicos, verificado pela atividade de produção de metano (Tabelas 27 e 28 e Figuras 16 a 19). Decorridos 40 dias de incubação, a remoção de sólidos foi de aproximadamente 20%, e nos 80 dias finais a remoção foi inferior a 20%. Considerando-se que a remoção de sólidos nesta última fase de degradação foi um pouco menor que nos primeiros 53 dias, nos quais a hidrólise era maior, pode-se afirmar que durante o aumento da atividade metanogênica, houve uma diminuição da remoção de sólidos concomitante a diminuição da atividade hidrolítica, devido a ocorrência de boa parte da degradação da matéria orgânica. Essa resposta coincide com alguns dados da literatura (BARLAZ et al., 1989b), como pode ser observado na Figura 37 do item 5.2.3, quando os autores apresentam a caracterização da fase metânica acelerada devido ao valor da remoção de sólidos, como será posteriormente abordado (item 5.4.2).

As Figuras 20 e 21 mostram a representação gráfica do conteúdo de ST e STV, em porcentagem, nos biorreatores 1 e 2, respectivamente, durante as retiradas de amostras para o NMP.

Figura 20: Representação gráfica do conteúdo de Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis no biorreator 1 da fase II.

Figura 21: Representação gráfica do conteúdo de Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis no biorreator 2 da fase II.

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com os de BALDOCHI (1997) durante a operação de um biorreator anaeróbio alimentado com resíduos sólidos urbanos eminentemente domésticos com recirculação de percolado, pode-se observar que o perfil de ST e STV, bem como de alcalinidade a bicarbonato e a ácidos voláteis, em ambos os trabalhos, apresentaram um desenvolvimento muito semelhante. Ocorreu diminuição de sólidos totais e sólidos totais voláteis numa mesma velocidade e porcentagem, os valores de alcalinidade a ácidos voláteis diminuíram e de alcalinidade a bicarbonato aumentaram na fase final. Da mesma forma que pôde ser verificado a variação dos valores de pH, que estiveram na faixa de 6,0 a 8,0, observando-se nas Figuras 24 e 25.

Considerando-se, ainda, o trabalho de BARLAZ et al. (1989b) em relação a definição de fases da atividade microbiana de sistemas operados com resíduos sólidos, os valores de pH na fase inicial foram próximos a 6,0, caracterizando esta fase de anaeróbia ácida, e os valores de pH até 8,0 são típicos da fase de produção acelerada de metano.

As determinações de alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade devida a ácidos voláteis (Figuras 22 e 23) foram realizadas inicialmente, no biorreator 2 com 87 dias de incubação e a partir de 115 dias de incubação no biorreator 1. A alcalinidade a bicarbonato no biorreator 1 foi de 25,25g/L inicialmente, atingindo valores de 30,5g/L no final e a alcalinidade a ácidos voláteis foi de 11,0g/L no início até 8,36g/L no final. A alcalinidade a bicarbonato no biorreator 2 foi de 25,5g/L no início, atingindo valores finais de 34,83g/L e a alcalinidade a ácidos voláteis de 27,5g/L até 8,79g/L no final. Os valores obtidos foram muito semelhantes aos obtidos por BALDOCHI (1997) e também por LEITE (1997). No entanto, ambos os trabalhos determinaram os valores de Alcalinidade a bicarbonato e Alcalinidade a ácidos voláteis no percolado.

Figura 22: Representação gráfica dos valores de alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade a ácidos voláteis no biorreator 1 da fase II.

Figura 23: Representação gráfica dos valores de alcalinidade a bicarbonato e alcalinidade a ácidos voláteis no biorreator 2 da fase II.

Figura 24: Representação gráfica dos valores de pH do biorreator 1 da fase II ao longo do tempo de operação do sistema.

Figura 25: Representação gráfica dos valores de pH do biorreator 2 da fase II ao longo do tempo de operação do sistema.

As análises cromatográficas de ácidos voláteis foram feitas nos biorreatores. No 87^o dia, no biorreator 2, foi feita apenas uma análise qualitativa dos ácidos voláteis presentes, pois os valores não foram quantificados, verificou-se que todos os ácidos indicados na Tabela 31 estavam presentes. A partir de 115 dias de incubação, ou seja, após a quinta abertura para retirada de amostra para o NMP foram feitas análises quantitativas de ácidos voláteis e os valores determinados encontram-se na Tabela 31.

Tabela 31:Concentrações de ácidos voláteis nos biorreatores 1 e 2 da fase II.

Ácidos voláteis(g/L)	Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico	Capróico
Amostras							
1 (biorreator1)	3,89	4,30	1,42	1,80	1,20	0,89	1,43
2 (biorreator1)	5,08	5,50	1,26	*	1,16	0,33	*
3 (biorreator1)	4,75	7,01	1,40	*	0,90	*	*
1 (biorreator2)	1,38	3,53	1,18	2,23	1,16	0,75	1,18
2 (biorreator2)	4,90	3,64	0,345	*	0,743	*	*
3 (biorreator2)	4,72	6,50	1,44	*	0,51	*	0,47

(*) ácidos não detectados

A análise dos valores obtidos indica que os ácidos valérico, capróico e butírico foram observados nas primeiras amostras, no entanto, nas últimas amostras não estavam presentes, porém os ácidos acético e propiônico foram acumulando nos sistemas. Provavelmente, esses acúmulos podem se dar pelo baixo número de organismos utilizadores destes ácidos, ou por algum prejuízo nesta rota metabólica, ou ainda a pressão parcial de hidrogênio não estava adequada para que ocorresse a degradação destes ácidos. Os ácidos degradados podem ter sido utilizados pelos microrganismos que encontraram valores adequados da pressão parcial de hidrogênio para a sua atividade.

Durante as reações de degradação da glicólise algumas etapas resultam em uma sobrecarga de ácidos. Em algumas situações em que a produção de ácido acético

é muito grande, a taxa de produção das bactérias formadoras de ácidos é maior que a taxa de consumo das arqueas metanogênicas acetoclásticas, no entanto estas não perdem o controle da fermentação. Uma outra direção, em que as arqueas metanogênicas perdem o controle da fermentação e a pressão parcial de hidrogênio é diminuída pela transferência de hidrogênio para a produção de ácido propiônico, caracterizando uma sobrecarga deste ácido no meio, comprometendo seriamente o processo, pois o consumo de ácido propiônico pelas acetogênicas, que ocorre a baixas pressões de hidrogênio é dificultado pela termodinâmica das reações no sistema (FORESTI, 1994).

As Figuras 26 e 27 mostram a composição de ácidos voláteis, avaliados em cromatógrafo a gás, como descrito no capítulo 4 (Materiais e Métodos).

Figura 26: Composição de ácidos voláteis no biorreator 1 após 115 dias

Figura 27: Composição de ácidos voláteis no biorreator 2 após 120.

De acordo com as Figuras 26 e 27, os ácidos acético, propiônico e o butírico foram produzidos em maior quantidade, sendo que o butírico diminuiu substancialmente após 120 dias do processo. Os ácidos valérico e capróico, em menor quantidade e também diminuíram quantitativamente após essa data e, o isovalérico e o isobutírico estiveram estáveis, em valores mais baixos, no decorrer do processo, lembrando que as análises foram efetivadas após 115 dias de degradação.

BALDOCHI (1997), em análises cromatográficas de ácidos voláteis, obteve perfis semelhantes aos do presente trabalho, indicando que o acúmulo de ácido propiônico, por um período maior, pode ter sido devido a alta pressão parcial de hidrogênio, afetando a ação do grupo das acetogênicas utilizadoras deste ácido.

A hidrólise e fermentação foi efetiva e a metanogênese, favorecida pelos valores do pH ao redor de 8,0, corroborando com os resultados de BALDOCHI (1997), no entanto esta autora realizou a determinação dos ácidos voláteis no

percolado e não na mistura (resíduo e percolado) como no presente trabalho, mas os perfis dos resultados obtidos foram bastante semelhantes.

A produção dos ácidos finais pode ter ocorrido a partir da degradação dos ácidos butírico, valérico e do propiônico, bem como de álcoois não determinados. Ácido butírico é produto comum da hidrólise e fermentação da celulose (GOMES, 1995). A degradação do propiônico a acético é uma reação menos favorecida termodinamicamente. A pouca quantidade de ácido isovalérico, isobutírico e valérico ocorreu concomitante à alta produção de propiônico. O ácido valérico é precursor do propiônico, assim a sua diminuição pode ter contribuído para o aumento de propiônico. A baixa quantidade destes ácidos pode ser devida a maior quantidade de carboidratos (aproximadamente 85%) como amido e celulose e pouca de lipídios e proteínas.

De acordo com MORMILE et al. (1996), as reações de fermentação, na fase inicial do processo, são favoráveis energeticamente quando a concentração de H_2 encontra-se em 1 atm. O consumo de hidrogênio pelas arqueas metanogênicas ou outros grupos de microrganismos em relações sintróficas favorecem o equilíbrio das reações no sistema. A alta concentração de hidrogênio pode inibir a degradação de ácido propiônico. Quando ácidos orgânicos de cadeia longa, como o ácido propiônico ficam acumulados, a atividade hidrolítica e fermentativa é maior que a atividade acetogênica para a conversão de compostos intermediários a ácido acético e hidrogênio (PALMISANO & BARLAZ, 1996). No rúmen, a degradação de ácidos orgânicos de cadeia longa não ocorrem normalmente, pois o tempo de detenção no sistema é relativamente curto e o desenvolvimento das bactérias capazes de realizar a conversão destes ácidos é muito lento (ZEHNDER, 1988).

De acordo com BARLAZ et al. (1989b), as fases de biodegradação anaeróbia dos resíduos sólidos, como citadas anteriormente no item 3.5 da Revisão da literatura, encontram-se bem definidas, e no desenvolvimento da biodegradação dos biorreatores no presente trabalho. Na fase anaeróbia ácida houve um declínio nos valores de pH (ao redor de 6,0), devido ao acúmulo de ácidos carboxílicos

intermediários resultantes da fermentação de açúcares, os quais resultam da baixa atividade de consumo de ácidos pelas populações de bactérias acetogênicas e de arqueas metanogênicas, e a produção de metano foi baixa.

Posteriormente, ocorreu uma progressiva diminuição dos teores de dióxido de carbono e aumento do metano. Comparando-se os resultados do presente trabalho com aqueles de BARLAZ et al. (1989b), como pode ser observado na Figura 37 do item 5.2.3, em relação as fases de biodegradação anaeróbia, tem-se.

- A hidrólise de sólidos nesta fase pode ocorrer rapidamente, como pôde também ser verificada no presente trabalho, nas condições iniciais impostas e seguidas pelas duas alimentações, nessa etapa ocorreu a diminuição em 25% dos ST nos primeiros 53 dias;
- A fase de produção acelerada de metano ocorre com aumento significativo dos valores de metano. No presente trabalho, como pode ser observado nas Figuras 16 e 18, houve um aumento na porcentagem deste gás a partir do 75º até aproximadamente o 120º dia, bem como, dos valores de pH entre 7,0 e 8,0.
- A fase de produção de metano desacelerada é caracterizada pela diminuição da produção de metano e os valores de ácidos voláteis diminuem, pelo consumo dos ácidos pelas acetogênicas e metanogênicas. No presente trabalho, observa-se uma diminuição nos valores de metano, e como pode ser observado na Tabela 31 e nas Figuras 26 e 27, há uma diminuição dos valores de determinados ácidos voláteis.

5.2.3. Caracterização morfológica dos tipos microbianos observados nos biorreatores 1 e 2 da fase II.

Os exames microscópicos nos biorreatores da fase II foram realizadas no biorreator 1, com 115 dias de incubação e 75% de metano (Figura 28 e 29), com 144 dias de incubação e 63% de metano (Figura 31) e com 170 dias de incubação e 51% de metano (Figura 33); e no biorreator 2, com 125 dias de incubação e 75% de metano (Figura 30), com 153 dias de incubação e 65% de metano (Figura 32) e com

179 dias de incubação e 44% de metano (Figura 34). A Tabela 32 apresenta as morfologias predominantes nos biorreatores 1 e 2 da fase II a partir de 115 dias de incubação.

Tabela 32: Morfologias predominantes nos biorreatores na fase II.

Tempo de incubação	Morfologias predominantes
115 dias	Bacilos, cocos, bacilos curvos, bacilos delgados, sarcinas*, bacilos com esporos, bacilos com acúmulo de grânulos nas extremidades, cocobacilos duplos*
144 dias	Sarcinas*, cocos* e bacilos*
170 dias	Sarcinas* e estruturas semelhantes a cistos de sarcinas*

(*)observados também em fluorescência

As fotomicrografias selecionadas mostram alguns dos campos observados e a seleção das fotos procurou mostrar a variedade de tipos morfológicos encontrados em ambos os biorreatores.

A Figura 28 e 29 mostram as fotomicrografias do biorreator 1 da fase II com 115 dias de incubação e 75% de metano, na qual se observa a presença de uma ampla variedade de tipos morfológicos, como bacilos retos e curvos, cocos, bacilos com formação de esporos, bacilos delgados, bacilos com acúmulo de grânulos nas extremidades, sarcinas fluorescentes (as estruturas fluorescentes oriundas de sistemas anaeróbios, com morfologias de sarcinas são classificadas no gênero *Methanosarcina* sp), bacilos em pares ou em cadeia, estruturas semelhantes a actinomicetos e cocobacilos aos pares e fluorescentes. No biorreator 2, com 125 dias de incubação e 75% de metano, como mostra a Figura 30, foram observados bacilos delgados, cocos, bacilos retos, bacilos curvos e sarcinas. De acordo com a literatura, o predomínio de bacilos retos, curvos e delgados não fluorescentes é característico da fase hidrolítico-fermentativa, e as observações das amostras corroboram com os resultados de outros autores. Os tipos celulares hidrolítico-fermentativos podem ser

relacionados aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Butyrivibrio* e *Acetivibrio*, de acordo com o manual (KHAN & PATEL, 1988; BERGEY'S, 1989; CAILLIEZ et al., 1993; FELIX & LJUNGDAHL, 1993; BÉGUIN & AUBERT, 1994; GOMES, 1995; BAYER et al., 1996), mas somente sob microscopia não se pode afirmar a que gênero pertenciam as células observadas. A morfologia de sarcina e a de cocobacilos em pares fluorescentes, em conjunto com a porcentagem de metano puderam indicar que os biorreatores encontravam-se na fase de produção acelerada de metano (BARLAZ, 1989b). Os bacilos com acúmulo de grânulos nas pontas podem indicar a presença de bactérias redutoras de sulfato, geralmente apresentando células delgadas, no entanto sua morfologia pode variar conforme o estado nutricional. São um grupo de grande importância nos sistemas de biodegradação anaeróbia de resíduos sólidos, porém têm sido pouco estudadas.

A Figura 31 mostra as morfologias observadas no biorreator 1 com 144 dias de incubação e 63% de metano, foram observados bacilos fluorescentes e a predominância de diferentes morfologias de *Methanosarcina* sp. No biorreator 2, com 153 dias de incubação e 65% de metano, como mostram a Figura 32, observou-se, também a predominância de morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp, cocos e bacilos fluorescentes. Pode-se afirmar que os biorreatores encontravam-se na fase de produção acelerada de metano.

As análises microscópicas realizadas no biorreator 1 com 170 dias de incubação e 51% de metano, como mostra a Figura 33, e no biorreator 2 com 179 dias de incubação e 44% de metano (Figura 34), indicam a predominância da morfologia semelhantes a cistos de sarcina, de cocos fluorescentes e de *Methanosarcina* sp, podendo afirmar que os biorreatores ainda encontravam-se na fase de produção acelerada de metano, porém a diminuição dos valores de metano e a modificação na morfologia das sarcinas (como a presença de cistos e sarcinas menores), podem indicar que os biorreatores estavam entrando na fase de produção desacelerada de metano.

Figura 28: Fotomicrografias do biorreator 1 com 115 dias de incubação (a) bacilos, cocos e esporos; (b), (d), (e) e (f) bacilos, bacilos delgados, cocos, bacilos com acúmulo de grânulos²⁶ nas extremidades e bacilos com esporos; (f) bacilos aderidos à fibra de celulose; (b), (c) e (e) estruturas semelhantes à sarcinas

²⁶ Grânulos – acúmulo de substâncias internamente.

Figura 29: Fotomicrografias do biorreator 1 com 115 dias de incubação (g)semelhantes a actinomicetos; (k)e (h)bacilos curvos, bacilos, bacilos com acúmulos de grânulos nas extremidades e cocos; (i) e (j) cocobacilos duplos fluorescentes; (l)cocobacilos duplos em contraste de fase, cocos e bacilos

Figura 30: Fotomicrografias do biorreator 2 com 125 dias de incubação (a) bacilos e cocos; (b) semelhantes à sarcina; (c) bacilos; (d) cocos, bacilos e bacilos delgados.

Figura 31: Fotomicrografias do biorreator 1 com 144 dias (a), (c) e (e) sarcinas (*Methanosarcina* sp)²⁷ contraste de fase; (b), (d), e (f) sarcinas fluorescentes

²⁷ *Methanosarcina* sp – estruturas metanogênicas fluorescentes com morfologia de sarcinas são classificadas neste gênero

Figura 32: Fotomicrografias do biorreator 2 com 153 dias de incubação (a) e (d) sarcina fluorescente; (b) bacilos fluorescentes; (c) sarcinas contraste de fase; (e) cocos fluorescentes; (f) sarcinas, cocos e bacilos fluorescentes.

Figura 33: Fotomicrografias biorreator 1 com 170 dias de incubação (a) e (c) semelhantes à sarcinas contraste de fase; (b), (d) e (f) semelhantes à sarcinas fluorescentes; (e) cocos e bacilos em contraste de fase.

Figura 34: Fotomicrografias biorreator 2 com 179 dias de incubação (a) e (b) estruturas semelhantes à cistos de sarcinas (c) (d) (e) e (f) semelhantes à sarcinas fluorescentes.

5.2.4 Resultados das leituras positivas do NMP dos frascos contendo celulose em pó para bactérias celulolíticas presentes no biorreator 1 da fase II

As amostras para contagem de bactérias celulolíticas pelo método do NMP foram retiradas do biorreator 1, e as leituras foram feitas após 30 e 60 dias de incubação. No Anexo A, Tabelas A8 a A20, encontram-se as leituras realizadas. O meio de cultura destinado à contagem de bactérias celulolíticas também possibilita a contagem de arqueas metanogênicas, como anteriormente apresentado na Tabela 6 (item 4.1 do capítulo Materiais e Métodos).

A Tabela 33 mostra os resultados das leituras e os valores do NMP de bactérias celulolíticas e de arqueas metanogênicas. As amostras em duplicata foram denominadas A e B e cada amostragem foi sequencialmente indicada por algarismo romano. Para evidenciar os períodos de amostragens, deve-se observar a Tabela 29, e a produção de metano do biorreator 1, em cada amostragem, está apresentada no item 5.2.1, Tabelas 27 e 28, mas será comentada no parágrafo a seguir. Optou-se por não apresentar uma média dos valores de NMP calculados para as réplicas.

As primeiras amostras I A e I B foram retiradas quando o biorreator 1 estava com 29 dias de incubação e 32% de metano; as amostras II A e II B, com 49 dias de incubação e 12,7% de metano; a terceira amostragem, realizada em triplicata, após 72 dias de operação do sistema, foi obtida quando a porcentagem de metano encontrava-se em 57,8%, sendo que as amostras IIIA e IIIB foram incubadas à temperatura de 35°C e a amostra IIIC a 40°C; as amostras IV A e IVB foram retiradas com 94 dias de operação e 35% de metano; as amostras V A e VB foram retiradas do sistema após 115 dias e 75% de metano; as amostras VI A e VIB com 144 dias e 62,9% de metano; e as amostras VIIA e VIIB com 170 dias de incubação e 50,96% de metano. A partir da amostragem IV, a incubação foi feita apenas sob 40°C.

Como pode ser observado na Tabela 33 e na Figura 35, os valores obtidos nas contagens de celulolíticas pelo NMP estiveram entre de 1,2 a $8,0 \times 10^3$ células/mL,

considerando-se como tempo de incubação 60 dias. No entanto, com 30 dias de incubação a leitura dos tubos revelou valores não superiores a $1,5 \times 10^3$ células/mL. Não observou-se variação do número de celulolíticas no período anterior e durante a metanogênese do RSUDp, e mesmo após a inoculação do sistema com lodo oriundo de um sistema UASB. A não alteração sensível nos valores de NMP de celulolíticas não permitiu relacionar esses números com outro parâmetro analisado no biorreator 1 (Tabela 29), como por exemplo, os conteúdos de ST/STV que sofreram variações ao longo do tempo de amostragem.

Os valores das réplicas mostram que o procedimento do ultra-som escolhido para o desprendimento das células do resíduo sólido foi adequado, ou pelo menos, constituiu uma etapa uniforme para a manipulação das amostras. Como já abordado, nenhum tratamento estatístico foi aplicado para os valores obtidos, nem mesmo uma média dos valores do NMP, pois considerou-se o método das diluições seriadas decimais, realizado em quintuplicata, confiável para o estudo de réplicas de amostras, coletadas, preparadas e diluídas da mesma maneira.

Comparando-se os procedimentos do presente trabalho com os de BARLAZ et al. (1989a), que empregou o liquificador para o tratamento de amostra de resíduos sólidos, parece que as etapas de preparação com o ultra-som não prejudicam as células, a despeito dos valores de contagem de celulolíticas de BARLAZ et al. (1989b) terem sido superiores, da ordem de $2,75 \times 10^4$ células/mL. Porém, não se aplica a comparação de valores entre sistemas operados sob condições diferentes, mesmo que com resíduos sólidos de composição parecida. No experimento realizado pelos autores (BARLAZ et al., 1989b), aplicava-se a recirculação do percolato produzido no sistema.

GOMES (1995) ao realizar contagens de bactérias celulolíticas presentes no chorume produzido em locais de disposição de resíduos a céu aberto no Município de São Carlos, obteve o valor médio de $4,0 \times 10^5$ células/mL, utilizando a técnica de tratamento prévio das amostras segundo VILLAS-BOAS (1990), ou homogeneização mecânica das amostras.

As ordens de grandeza dos resultados do número de bactérias celulolíticas são diferentes em muitos trabalhos sobre biodegradação anaeróbia de resíduos sólidos, e é óbvia, pois é dependente da composição da matéria orgânica e outros componentes presentes nos resíduos, e que variam em relação a cada país, cidade, época do ano, bem como da classe sócio-econômica e os costumes de uma região. Além disso, os procedimentos para manutenção de anaerobiose e os meios de cultura utilizados nas contagens sempre apresentam alterações entre eles.

A Tabela 37 e Figura. 35 mostram o aumento das arqueas metanogênicas ao longo das amostragens, considerando-se as leituras realizadas a 30 e 60 dias de incubação. Esses valores são representativos para o processo, uma vez que ocorreu aumento na produção de metano ao longo dos tempos de incubação. Nota-se nas Tabelas 27 e 29 a relação entre o aumento da produção de metano e a reinoculação do sistema, ou seja, no 53º dia de incubação foi introduzido novo lodo biológico no reator e a resposta do aumento do metano deu-se ao longo dos primeiros 20 dias seguintes. Nesse período, o valor do pH ficou próximo a 7,0 e houve um aumento no conteúdo de ST e STV, como esperado devido a introdução de lodo no sistema. No entanto, os valores de arqueas metanogênicas foram baixos se compararmos com resultados de trabalhos experimentais que realizaram contagens de arqueas metanogênicas em resíduos sólidos do mesmo município, porém não padronizados como o trabalho de GOMES (1995), que utilizando meio de cultura e condições de leitura de incubação dos tubos de NMP similares e com 30 dias de incubação, determinou $2,3 \times 10^4$ células/mL de arqueas metanogênicas.

Analisando-se os números de bactérias celulolíticas (Tabela 33 e Figura 35) obtidos para as amostras IV (94 dias de incubação) e V (115 dias de incubação), verifica-se um ligeiro aumento nos valores do NMP, se a leitura após 60 dias de incubação for considerada. Nesse período, a atmosfera do biorreator 1 apresentou as maiores porcentagens de metano. Esses valores, à luz do perfil de desenvolvimento das populações celulolíticas e do aumento da produção de metano dos resultados experimentais de BARLAZ et al. (1989b), Figura 37 (unidades dos valores de células diferentes em ambos os trabalhos experimentais), podem revelar alguma semelhança

no comportamento das populações celulolíticas do presente trabalho na fase acelerada de produção de metano, ou seja, o número das bactérias celulolíticas aumentou na fase acelerada de produção de metano. Contudo, os valores de NMP das amostras VI A e VI B foram inferiores, mesmo na presença de teores de metano da mesma ordem das amostras IV e V, entre 35 e 70%.

Em praticamente todas as amostras, os valores de NMP de metanogênicas foram maiores após 60 dias de incubação. Nesse sentido, considerando os procedimentos adotados, tratamento da amostra, técnica de anaerobiose e meio de cultura contendo celulose, o tempo de incubação de 60 dias é o recomendado.

É relevante destacar que considerando todos os procedimentos eficientes, os valores de NMP não foram elevados, sendo o NMP das bactérias celulolíticas e as arqueas metanogênicas não foi superior a 10^3 células/mL. O desprendimento das células do material sólido, particularmente de fibras de celulose não é simples, e pesquisadores sugerem que os métodos químicos, como o emprego de enzimas, são mais indicados (BRISOU, 1995).

A alteração da temperatura de incubação para 40°C parece não ter afetado os resultados das leituras, provavelmente a faixa de temperatura para o bom desempenho das culturas mesófilas estudadas esteja entre 35 e 40°C.

Tabela 33: Resultados da leitura dos frascos positivos contendo celulose em pó e estimativa do número de bactérias celulolíticas e de células procarióticas do grupo metanogênico presentes no biorreator 1.

AMOSTRAS	celulolíticas (células/mL)				metanogênicas (células/mL)			
	30 dias		60 dias		30 dias		60 dias	
	leitura	estimativa	leitura	estimativa	leitura	estimativa	leitura	estimativa
Amostra I A	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	1 1 0	$2,0 \times 10^1$	1 4 0	$3,5 \times 10^1$
Amostra I B	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	0 2 0	$2,0 \times 10^1$	3 2 0	$7,0 \times 10^1$
Amostra II A	5 5 0	$1,5 \times 10^3$	5 5 1	$1,5 \times 10^3$	0 1 0	$2,0 \times 10^0$	2 3 1	$4,0 \times 10^1$
Amostra II B	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	0 0 0	$2,0 \times 10^0$	0 1 0	$< 2,0 \times 10^0$
Amostra IIIA	5 5 1	$1,5 \times 10^3$	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 4 1	$8,5 \times 10^2$	5 4 0	$6,5 \times 10^2$
Amostra IIIB	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 3 0	$4,0 \times 10^2$	5 4 0	$6,5 \times 10^2$
Amostra IIIC	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 1	$1,5 \times 10^3$	5 4 0	$6,5 \times 10^2$	5 5 1	$1,5 \times 10^3$
Amostra IVA	5 5 1	$1,5 \times 10^3$	5 5 4	$8,0 \times 10^3$	4 3 1	$1,65 \times 10^2$	4 4 4	$1,7 \times 10^3$
Amostra IVB	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 3	$4,5 \times 10^3$	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 3	$4,5 \times 10^3$
Amostra VA	5 5 1	$1,5 \times 10^3$	5 5 2	$2,5 \times 10^3$	5 5 1	$1,5 \times 10^3$	5 5 1	$1,5 \times 10^3$
Amostra V B	5 5 1	$1,5 \times 10^3$	5 5 3	$4,5 \times 10^3$	5 3 1	$5,5 \times 10^2$	5 4 3	$1,4 \times 10^3$
Amostra VIA	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 1 0	$1,5 \times 10^2$	4 1 0	$8,5 \times 10^1$
Amostra VIB	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	5 4 1	$8,5 \times 10^2$	3 0 0	$4,0 \times 10^1$
Amostra VIIA	-	-	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	-	-	2 2 0	$3,5 \times 10^1$
Amostra VIIB	-	-	5 5 0	$1,2 \times 10^3$	-	-	2 1 0	$4,5 \times 10^1$

(-) não foram realizadas leituras

As Figuras 35 e 36 representam a comparação dos valores de celulolíticas e de metanogênicas avaliados, em duplicata, ao longo do processo de biodegradação anaeróbia nos biorreatores 1 da fase II, obtidos através da técnica de estimativa de células do NMP, comparados com a porcentagem de metano na data de coleta para contagem. As leituras nos frascos de NMP foram realizadas após 30 e 60 dias de incubação. Os valores mais significativos foram nas leituras após 60 dias na amostra

IVA, com aproximadamente 90 dias de incubação e valores percentuais de metano na faixa de 35%.

Figura 35: Representação gráfica dos resultados das contagens pelo NMP de celulíticas no biorreator 1 (amostras A e B) após 30 e 60 dias de incubação, comparados com a produção de metano(%).

Figura 36: Representação gráfica dos resultados das contagens pelo NMP de metanogênicas no biorreator 1 (amostras A e B) após 30 e 60 dias de incubação, nos frascos contendo pó de celulose, comparados com a produção de metano (%).

Figura 36: Representação gráfica dos resultados das contagens pelo NMP de metanogênicas no biorreator 1 (amostras A e B) após 30 e 60 dias de incubação, nos frascos contendo pó de celulose, comparados com a produção de metano (%).

Figura 37: Fases da decomposição de resíduos sólidos urbanos em reator de bancada com recirculação de percolado.

Fonte: adaptado de BARLAZ et al. (1989b)

As morfologias observadas nas amostras com leitura positiva (presença de coloração amarelada e turvação do NMP) encontram-se descritas a seguir. Cada amostra foi analisada nos frascos em que houve crescimento após 30 e 60 dias de

A frequência dos tipos morfológicos observados nas réplicas das diluições encontra-se indicada nas Tabelas de 34 a 40, nas quais encontram-se indicados os períodos de amostragem para o exame microscópico, bem como o ensaio com duas temperaturas de incubação (amostra III).

Tabela 34: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras I (retiradas do biorreator 1 com 29 dias de incubação)

Morfologias visualizadas	Amostra A				Amostra B			
	30 dias		60 dias		30 dias		60 dias	
	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-1	-2
Cocos fluorescentes	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
Bacilos pequenos	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++

(+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros

Tabela 35: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras II (retiradas do biorreator com 49 dias de incubação)

Morfologias visualizadas	Amostra A					Amostra B				
	30 dias		60 dias			30 dias		60 dias		
	-1	-2	-1	-2	-3	-1	-2	-1	-2	-3
Bacilo delgado pequeno	+++	+++								
Filamentosos			++	++				++	++	
Cocos fluorescentes	+++	++	++			++		++		
Bacilos médios			++	++	++			+++	++	++
Bacilos delgados médios	+++	+++		++		++			++	
Bacilos médios espessos				++					++	
Bacilos em cadeia			++	++				++	++	

(+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros

Tabela 36: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras III A, B e C (retiradas do biorreator 1 com 72 dias de incubação). Respostas dos tubos de NMP incubados sob temperaturas diferentes A e B = 35°C e C = 40°C

Morfologias visualizadas	Amostra A						Amostra B						Amostra C					
	30 dias			60 dias			30 dias			60 dias			30 dias			60 dias		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
Estrutura semelhante a actinomicetos							++	++										
Bacilos (com acúmulo de grânulos nas extremidades)	++						+++	++	+				++	++	++			
Bacilo delgado pequeno	++	++	++				++	++					++	++	++		++	+
Filamentosas					++	+	++				++	+		++		++*		
Cocos		++		++*			++		+	++*			++	++		++*		
Sarcinas	+++															++		
Diplococos		+		++			++	++		++			++	++				
Bacilos médios	++	++		++*			++			++*			++	++	++	++*	++	
Bacilos pequenos gordos								++	++				++					
Bacilos médios gordos		+++		++*	++		+++	++	++*	++				++				
Bacilos delgados médios														++		++		
Bacilos longos espessos				++						++				++				
Bacilos longos							++	++					++	++	++			
Bacilos em cadeia							++						++					

(+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (*) observados também em fluorescência, () não foram observados

Tabela 37: Morfologias visualizadas nas diluições de NMP das amostras IV (94 dias)

Morfologias visualizadas	Amostra A						Amostra B					
	30 dias			60 dias			30 dias			60 dias		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
Bacilos delgado pequenos				++	++	++						++
Filamentosos	++	++		++			++	++		++	++	
Bacilos médios	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+++	++	++
Bacilos longos	++	++						++				
Sarcinas fluorescentes				++								

(+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes (+) raros; () não foram observados

Tabela 38: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras V (115 dias)

Morfologias visualizadas	Amostra A						Amostra B					
	30 dias			60 dias			30 dias			60 dias		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
Bacilos delgados pequen.	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++
Filamentosos						++						++
Cocos aglomerados				++						++		
Cocos fluorescentes				++						++		
Bacilos médios	++	++		++*	+++*	++*	++	++		++*	+++*	++*
Bacilos pequenos gordos	++			++			++			++		
Bacilos longos						++*						++*

(+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (*) observados também em fluorescência; () não foram observados

Tabela 39 : Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras VI (144 dias)

Morfologias visualizadas	Amostra A						Amostra B					
	30 dias			60 dias			30 dias			60 dias		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
Bacilo delgado pequeno	++	++		++	++		++	++	+	++	++	
Filamentosos	+											
Cocos aglomerados	++			++								
Cocos fluorescentes	++			++						++		
Bacilos médios	++*	++		++	++		++	++		++*	++	
Bacilos pequenos gordos	++						++			++		
Bacilos longos				++								

(+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (*) observados também em fluorescência, () não foram observados

Tabela 40: Morfologias bacterianas visualizadas nas diluições de NMP das amostras VII (170 dias)

Morfologias visualizadas	Amostra A						Amostra B					
	30 dias			60 dias			30 dias			60 dias		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
Bacilo delgado pequeno	++	++		++	++		++	++		++	++	
Cocos aglomerados				++						++		
Cocos fluorescentes				++						++		
Bacilos médios	++*	++		++	++*		++*	++		++	++*	
Bacilos delgados médios					++						++	
Bacilos longos					++						++	
Sarcinas fluorescentes	++			++			++			++		

(+++) freqüentes; (++) pouco freqüentes; (+) raros; (*) observados também em fluorescência, () não foram observados

Comparando-se os tipos morfológicos encontrados nos frascos de contagens de NMP pode-se verificar que ocorreram mudanças na composição microbiana do lodo no biorreator 1, com 30 e 60 dias de incubação das amostras. Inicialmente, foi verificado apenas a presença de cocos fluorescentes e bacilos pequenos, estes tipos celulares podem ter sido acrescentados através do percolado e estavam presente no início do processo de biodegradação anaeróbia. Na segunda amostragem havia também o predomínio de bacilos delgados médios, comuns da fase de hidrólise e fermentação (BERGEY, S, 1989; BARLAZ, 1990; GOMES, 1995). Na terceira amostragem, em que a porcentagem de metano no biorreator era de 57,8%, constatou-se a presença de bacilos espessos com acúmulo de grânulos nas extremidades, filamentosos, cocos e bacilos fluorescentes e sarcinas, podendo indicar que o biorreator encontrava-se nas fases acidogênica e metanogênica. Na quarta amostragem, na qual o valor de metano teve uma queda para 35%, a morfologia encontrada nos frascos de leitura estava modificada, com uma menor diversidade de células, bacilos filamentosos, médios e longos e sarcinas na amostra A, após 60 dias, podendo indicar que o biorreator teve uma modificação no seu desenvolvimento, provavelmente a entrada na fase de produção acelerada de metano. No entanto na quinta, sexta e sétima amostragens, houve a presença de bacilos e cocos fluorescentes, bem como de sarcinas fluorescentes, indicando que o biorreator encontrava-se na fase metanogênica acelerada.

A Tabela 41 mostra as morfologias predominantes nas amostras das contagens de celulolíticas, nas maiores diluições, no biorreator 1. Observa-se que as morfologias em fluorescência foram freqüentes quando a produção de metano aumentou. Após 72 dias de incubação, ocorreu o aparecimento de sarcinas fluorescentes e posteriormente, bacilos fluorescentes, organismos característicos da fase metanogênica (ZEHNDER, 1988; BARLAZ et al., 1990).

Tabela 41: Morfologias predominantes nas amostras de contagens de celulolíticas

Amostras/tempo de incubação biorreator 1	Morfologias predominantes	
	Contraste de fase	Fluorescência
Amostra I (29 dias)	bacilos	Cocos
Amostra II (49 dias)	bacilos, bacilos delgados, filamentosos e bacilos com esporos	Cocos
Amostra III (72 dias)	Bacilos com acúmulos de grânulos nas extremidades, bacilos delgados, bacilos espessos, bacilos longos e sarcinas	Sarcinas
Amostra IV (94 dias)	Bacilos delgados, filamentosos, bacilos longos e bacilos	Cocos e sarcinas
Amostra V (115 dias)	Cocos aglomerados, bacilos delgados e bacilos	Bacilos, cocos e bacilos longos
Amostra VI (144 dias)	Cocos aglomerados, bacilos delgados e bacilos	Cocos e bacilos
Amostra VII (170 dias)	Cocos aglomerados, bacilos delgados, bacilos longos e bacilos	Cocos, sarcinas, bacilos e cistos de sarcina

As Figuras 38, 39 e 40 mostram as fotomicrografias das morfologias celulares encontradas nos frascos de leitura positiva do NMP para celulolíticas e arqueas metanogênicas. Na primeira amostragem não foi possível a realização de fotomicrografias e a partir da segunda amostragem foram registradas as morfologias celulares. Observa-se que inicialmente ocorreu a presença predominante de bacilos, confirmando que o biorreator encontrava-se na fase hidrolítica e após a terceira amostragem, quando a produção de metano no biorreator estava aumentando, observou-se a presença de sarcinas, caracterizando a fase metânica.

Figura 38: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP para celulolíticas (a) 2ª amostra na diluição 10^{-1} presença de bacilos esporulados, semelhantes aos microrganismos do grupo dos clostrídios; (b) e (c) 3ª amostra, 40°C, diluição 10^{-1} cocos e bacilos; (d) e (e) 3ª amostra, 10^{-2} cocos e bacilos; (f) 3ª amostra, 10^{-3} bacilos;

Figura 39: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP para celulolíticas (g) e (h) 3 amostra, 35°C, diluição 10^{-1} , sarcinas; (i) 3 amostra, 35°C, diluição 10^{-1} , cocos e bacilos; (j) 3 amostra, 35°C, diluição 10^{-2} , cocos e bacilos; (k) 3 amostra, 35°C, diluição 10^{-3} , bacilos; (l) estrutura fluorescente com morfologia não designada.

Figura 40: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP para celulolíticas (6.a amostra) na diluição 10^{-1} (a) e (b) cocos agrupados fluorescentes; (c) e (e) Estruturas semelhantes a cistos de sarcina em contraste de fase; (d) e (f) estruturas semelhantes a cistos de sarcina em fluorescência.

5.2.5 Resultados das leituras do NMP de bactérias acetogênicas e de arqueas metanogênicas presentes no biorreator 2 da fase II

A Tabela 42 apresenta os resultados das leituras dos frascos contendo fonte de carbono acetato, cultivos realizados em duplicata para estimar o número de arqueas metanogênicas, incubados à temperatura de 40°C. Foi a primeira amostragem após a reinoculação do biorreator 2, no 73º dia de incubação e 63,1% de metano.

Tabela 42: Leituras dos frascos contendo acetato como fonte de carbono

Amostra	Turvação		Metano	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Amostra 1A	3 3 0	3 3 0	2 0 0	2 3 0
Amostra 1B	3 3 0	3 3 1	0 0 0	2 3 1

A Tabela 43 apresenta os resultados da estimativa de células metanogênicas da primeira amostragem, após o cálculo do NMP, utilizando-se a Tabela 9221.IV e a fórmula para cálculo do NMP da página 9-51 do STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998), encontrada na Tabela A1 e na Figura A1 no ANEXO A.

Tabela 43 Estimativas de células procarióticas do grupo metanogênico

Amostra	Turvação (NMP/mL)		Metano (NMP/mL)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Amostra 1A	8,5x10 ¹	8,5x10 ¹	2,0x10 ¹	6,0x10 ¹
Amostra 1B	8,5x10 ¹	1,0x10 ²	<1,0x10 ¹	7,0x10 ¹

A Tabela 44 apresenta os resultados das leituras dos frascos (turvação do meio e presença de gás metano) contendo as fontes de carbono acetato, propionato, butirato, atmosfera de H₂/CO₂ (4:1 e 1 atm.) em amostras realizadas para estimar o número de acetogênicas e arqueas metanogênicas no biorreator 2 à temperatura de 40°C. No Anexo A, nas Tabelas A.21 a A.29 encontram-se as leituras positivas dos frascos. Foram utilizados frascos controles sem fonte de carbono na segunda e

terceira amostragens e frascos contendo metanol como fonte de carbono após a quarta e a quinta amostragens. A segunda amostragem (Amostra 2) no biorreator 2 foi feita após 95 dias de incubação e com 17% de metano, cabe salientar que o biorreator foi aberto após 87 dias para a análise de alcalinidade a bicarbonato e a ácidos voláteis e para cromatografia de ácidos voláteis. A terceira amostragem (Amostra 3) foi feita com 122 dias e 75,7% de metano. A quarta amostragem (Amostra 4), com 147 dias e com 58,5% de metano e a quinta amostragem (Amostra 5) com 179 dias de incubação e 44,2% de metano.

Tabela 44: Leituras positivas dos frascos contendo distintas fontes de carbono, com hidrogênio e apenas com meio mineral

Fontes	Sem fonte		Propionato		Acetato		Butirato		H ₂ /CO ₂		Metanol	
Tempo de incubação	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Turvação												
Amostra 2	3 3 0	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	1
Amostra 3	3 3 0	3 3 1	3 3 0	3 3 0	3 3 0	3 3 0	3 3 2	3 3 3	3 3 1	3 3 3		
Amostra 4			3 3 0	3 3 0	3 3 0	3 3 3	3 3 3	3 3 3 1	3 3 3 3	3 3 3 3	3 3 0	3 3 0
Amostra 5				3 3 1		3 3 2		3 3 3 2		3 3 3 3		3 3 1
Metano												
Amostra 2	0 2 0	2 2 2	3 0 0	3 2 0	3 1 0	0 3 0	3 3 1	3 3 3	3 3 1	3 3 3 1		
Amostra 3	3 0 0	3 0 0	1 0 0	3 0 0	0 0 0	0 0 0	3 2 0	3 3 0	3 3 0	3 3 0		
Amostra 4			1 0 0	2 0 0	1 0 0	2 0 0	3 3 1	3 3 1	3 3 1	3 3 2	2 0 0	3 0 0
Amostra 5				3 1 0		3 2 0		3 3 2		3 3 1 2		3 0 0

A Tabela 45 apresenta os resultados da estimativa de células metanogênicas e acetogênicas após o cálculo da estimativa da densidade bacteriana utilizando-se a Tabela 9221.IV e a fórmula para cálculo do NMP da página 9-51 do STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998), encontrada, na Tabela A1 e na Figura A1 no ANEXO A.

Tabela 45: Leituras positivas dos frascos contendo distintas fontes de carbono, com hidrogênio e apenas com meio mineral.

Fontes	Sem fonte (Células/mL)		Propionato (Células/mL)		Acetato (Células/mL)		Butirato (Células/mL)		H ₂ /CO ₂ (Células/mL)		Metanol (Células/mL)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Tempo de incubação												
Turvação												
Amostra 2	8,5x10 ¹	1,4x10 ²	1,4x10 ²	1,4x10 ²	1,4x10 ²	1,4x10 ²	1,4x10 ²	1,4x10 ²	1,4x10 ²	1,2x10 ²		
Amostra 3	8,5x10 ¹	1,0x10 ²	8,5x10 ¹	8,5x10 ¹	8,5x10 ¹	8,5x10 ¹	1,2x10 ²	1,4x10 ²	1,0x10 ²	1,4x10 ²		
Amostra 4			8,5x10 ¹	8,5x10 ¹	8,5x10 ¹	1,4x10 ²	1,4x10 ²	1x10 ³	1,4x10 ³	1,4x10 ³	8,5x10 ¹	8,5x10 ¹
Amostra 5				1,0x10 ²		1,2x10 ²		1,2x10 ³		1,4x10 ³		1,0x10 ²
Metano												
Amostra 2	2x10 ¹	4,5x10 ¹	4x10 ¹	7x10 ¹	5,5x10 ¹	1,8x10 ¹	1,0x10 ²	1,4x10 ²	1,0x10 ²	1,2x10 ²		
Amostra 3	4x10 ¹	4x10 ¹	1x10 ¹	4x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	7x10 ¹	8,5x10 ¹	8,5x10 ¹	8,5x10 ¹		
Amostra 4			1x10 ¹	2x10 ¹	1x10 ¹	2x10 ¹	1,0x10 ²	1,0x10 ²	1,0x10 ²	1,2x10 ²	2x10 ¹	4x10 ¹
Amostra 5				5,5x10 ¹		7x10 ¹		1,2x10 ²		8,5x10 ²		4x10 ¹

Nas leituras das diluições do NMP observa-se crescimento em todas as fontes de carbono, através da turvação do meio. Análises cromatográficas para verificação da produção de metano confirmaram a presença de células metanogênicas. Os grupos que apresentaram valores mais elevados de NMP foram os das bactérias acetogênicas utilizadoras de butirato e o das arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, nos períodos amostrados de 147 e 179 dias de incubação do biorreator 2.

O crescimento do grupo de bactérias acetogênicas foi avaliado através de meio de cultura mineral acrescido das fontes orgânicas, adicionadas em separado, propionato de sódio e butirato de sódio. Na Tabela 45 observa-se que o número de utilizadoras de propionato no reator com 95 dias de incubação foi de $1,4 \times 10^2$ células/mL, após 122 e 147 dias de incubação, os valores foram de $8,5 \times 10^1$ células/mL, e aos 179 dias de incubação o valor foi de $1,0 \times 10^2$ células/mL. O número das bactérias que utilizam o butirato, aos 95 e 122 dias de incubação do reator foi de $1,4 \times 10^2$ células/mL, após 147 e 179 dias de incubação foi de $1,2 \times 10^3$ células/mL. Nesta fase, os valores da produção de metano no biorreator 2 estavam aumentando, e o aumento do NMP das células acetogênicas coincide com a maior atividade metanogênica (Tabela 28 e Figuras 18 e 19). Observa-se que não houve diferença no valores obtidos nas leituras com 30 e 60 dias de incubação para o NMP. Assim, recomenda-se que o tempo de 30 dias de incubação seja utilizado para a leitura de bactérias acetogênicas.

Comparando-se os valores de ácidos voláteis analisados sob cromatografia gasosa (Tabela 31) com os valores numéricos do NMP para as acetogênicas utilizadoras de butirato e de propionato, observa-se que o ácido butírico foi inicialmente verificado, não sendo detectado posteriormente no biorreator 2 (amostragem no 115º dia de incubação), e o ácido propiônico teve tendência a aumentar ao longo do experimento. Por sua vez, o número das bactérias utilizadoras de butirato foi superior em relação àquele obtido em propionato. Estes resultados colaboram para a evidência de grupos de bactérias foram ativas na degradação do butirato.

No caso das utilizadoras de propionato a estimativa do NMP atingiu valores mais baixos, bem como, pôde ser verificado o acúmulo do ácido propiônico no decorrer do processo de biodegradação anaeróbia nos biorreatores. Tratando-se de um ácido orgânico de cadeia longa, sua biodegradabilidade é menos favorável, assim como o crescimento das bactérias utilizadoras de propionato é mais lento (ZEHNDER, 1988). O mecanismo de transferência de hidrogênio interespecies deve estar bastante regulado para que haja a degradação de determinados ácidos orgânicos intermediários, pois o seu acúmulo pode ser devido a um desequilíbrio no processo de retirada de hidrogênio do meio. A conversão de ácidos intermediários é favorável termodinamicamente quando é baixa a concentração de hidrogênio, as bactérias acetogênicas realizam um importante papel na retirada de hidrogênio do meio, numa relação sintrófica, com microrganismos metanogênicos ou com as redutoras de sulfato (BARLAZ et al., 1989b).

Para as contagens de arqueas metanogênicas foram utilizadas as fontes de carbono, em diferentes frascos de diluições, acetato, metanol e atmosfera de H_2/CO_2 (4:1, 1 atm.), nos quais as leituras foram realizadas quanto à turvação do meio e análises cromatográficas da produção de metano. Foram realizadas, também, estimativas deste grupo microbiano nos frascos contendo butirato e propionato como fonte de carbono e sem fonte de carbono, quando da produção do biogás metano. Os resultados das estimativas numéricas pelo método do NMP encontram-se nas Tabelas 43 (com acetato como fonte de carbono) e 45 (para todas as fontes de carbono). Verifica-se que para as contagens diretas, ou seja, nos frascos contendo fonte específica para o crescimento de arqueas metanogênicas, o grupo que apresentou os maiores valores numéricos foram as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, nos frascos contendo atmosfera de H_2/CO_2 , tanto quanto à turvação como na análise cromatográfica. As condições para o desenvolvimento deste grupo foram as mais adequadas, provavelmente o metabolismo microbiano para a utilização de hidrogênio e dióxido de carbono foram os predominantes nos biorreatores em estudo. BARLAZ et al. (1989b) realizou contagens de arqueas metanogênicas, utilizando H_2/CO_2 e acetato como fonte de carbono e os resultados obtidos para as hidrogenotróficas foi maior que para as acetoclásticas. Como pode ser observado na Figura 37, o número

de metanogênicas foi maior que o de celulolíticas, diferentemente deste trabalho, os números de celulolíticas foram superiores as de arqueas metanogênicas.

O número de arqueas metanogênicas das contagens indiretas, ou seja, nos frascos contendo fontes não específicas a este grupo, foi maior nos frascos contendo butirato de sódio, provavelmente pela presença em maior número dos grupos microbianos capazes de degradarem este composto, convertendo-os em substratos para as arqueas metanogênicas.

Quanto à diferença numérica das leituras, no caso dos frascos contendo acetato e H_2/CO_2 , nos quais os valores em relação à turvação foram maiores que os da análise cromatográfica, pode-se dizer que havia a presença de um outro grupo microbiano capaz de degradar estes substratos (acetato ou hidrogênio), que não as metanogênicas, como por exemplo algum grupo de redutoras de sulfato (ZEHNDER, 1988), ou mesmo, valores de metano não passíveis de detecção pelo método adotado (Materiais e Métodos, item 4.2).

As leituras dos frascos de NMP são feitas após a observação de turvação dos frascos, análise cromatográfica e exame microscópico. A Tabela 46 mostra as morfologias celulares visualizadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo acetato, para a contagem de metanogênicas acetoclásticas. As Figuras 41 e 42 mostram as fotomicrografias das morfologias visualizadas nos frascos contendo acetato e encontram-se no final deste capítulo.

Tabela 46: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo acetato como fonte de carbono no biorreator 2

Amostras	METANOGENICAS ACETOCLÁSTICAS(Acetato)	
	30 dias	60 dias
Amostra A e B 10 ⁻¹ (73 dias)	-	Cocos *, bacilos *, bacilos finos, bacilos médios e sarcinas*
Amostra A e B 10 ⁻²	-	Bacilos* e bacilos filamentosos *
Amostra A e B 10 ⁻³	-	Raros bacilos
Amostra I 10 ⁻¹ (95 dias)	Cocos *, bacilos longos e médios	Sarcinas, bacilos e bacilos médios *
Amostra I 10 ⁻²	Poucos bacilos espessos médios e grandes e bacilos finos	Bacilos médios e pequenos não fluorescentes, cocos e filamentos*
Amostra II 10 ⁻¹ (122 dias)	Bacilos *, poucos cocos*, esporos, cocos agrupados*, pequenas sarcinas*, estruturas semelhantes a cistos de sarcinas	Raros cocos e bacilos
Amostra II 10 ⁻²	Bacilos médios, cocos*, bacilos*, sarcina	Bacilos pequenos, cocos*, bacilos com esporo
Amostra III 10 ⁻¹ (147 dias)	-	Cocos*, sarcinas*, bacilos não fluorescentes
Amostra III 10 ⁻²	-	Poucos bacilos médios e longos
Amostra IV 10 ⁻¹ (179 dias)	-	Cocos*, bacilos*, poucas sarcinas*, bacilos médios e longos espessos, bacilos finos, bacilos pequenos
Amostra IV 10 ⁻²	-	Bacilos médios, bacilos médios espessos, cocos*

(-) não foram realizadas observações

(*) observados sob fluorescência

A Tabela 47 mostra as morfologias celulares visualizadas nos frascos de NMP contendo atmosfera de H₂/CO₂, para a contagem de metanogênicas hidrogenotróficas no biorreator 2 da fase II. As Figuras 43 a 45 mostram as fotomicrografias das morfologias visualizadas nos frascos contendo atmosfera de H₂/CO₂.

Tabela 47: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo atmosfera de H_2/CO_2 como fonte de carbono no biorreator 2

Amostras	METANOGENICAS HIDROGENOTRÓFICAS(H_2/CO_2)	
	30 dias	60 dias
Amostra I 10^{-1}	Bacilos espessos curtos e médios, bacilos finos curtos*, bacilos finos e longos	Bacilos filamentosos, bacilos longos, bacilos médios*
Amostra I 10^{-2}	Bacilos em cadeia, bacilos longos	-
Amostra I 10^{-3}	Raros bacilos, bacilos finos médios* e longos*, bacilos espessos médios*	-
Amostra II 10^{-1}	Bacilos*	Muitos bacilos*, filamentosos*
Amostra II 10^{-2}	Bacilos, bacilos*	Bacilos pequenos e médios, filamentosos*
Amostra III 10^{-1}	-	Cocos*, bacilos longos*, poucas sarcinas*, poucos bacilos*, muitos filamentosos*
Amostra III 10^{-2}	-	Bacilos longos*, bacilos*, bacilos médios*
Amostra III 10^{-3}	-	Bacilos pequenos e médios
Amostra IV 10^{-1}	-	-
Amostra IV 10^{-2}	-	-

(*)observados sob fluorescência

(-) não foram realizadas observações

A Tabela 48 mostra as morfologias celulares visualizadas nos frascos de NMP contendo metanol como fonte de carbono, para a contagem de metanogênicas acetoclásticas no biorreator 2 da Fase II. A Figura 46 mostra as fotomicrografias das morfologias visualizadas nos frascos contendo metanol.

Tabela 48: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo metanol como fonte de carbono no biorreator 2

Amostras	METANOGENICAS ACETOCLÁSTICAS(Metanol)	
	30 dias	60 dias
Amostra III 10 ⁻¹	-	Bacilos médios, cocos*, sarcinas
Amostra III 10 ⁻²	-	Poucos bacilos
Amostra IV 10 ⁻¹	-	-
Amostra IV 10 ⁻²	-	-

(*)observados sob fluorescência

(-) não foram realizadas observações

A Tabela 49 apresenta a descrição morfológica visualizada nos frascos de NMP contendo butirato como fonte de carbono, para a contagem de acetogênicas no biorreator 2 da Fase II. As Figuras 47 a 49 mostra as fotomicrografias das morfologias visualizadas nos frascos contendo butirato.

Tabela 49: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo butirato como fonte de carbono no biorreator 2

Amostras	ACETOGENICAS (Butirato)	
	30 dias	60 dias
Amostra I 10 ⁻¹	Bacilos longos, filamentosos*, bacilos médios*, bacilos espessos, cocobacilos	Sarcinas*, cocos *, bacilos grandes espessos, bacilos médios, filamentosos enrolados*
Amostra I 10 ⁻²	Bacilos finos, bacilos médios espessos	Bacilos *, poucos bacilos espessos
Amostra I 10 ⁻³	-	-

Amostra II 10 ⁻¹	Sarcinas*, bacilos*, cocos aglomerados*, estruturas semelhantes a cistos de sarcina*	Bacilos, sarcinas*, bacilos móveis, cocos
Amostra II 10 ⁻²	Cocos*, bacilos pequenos e médios	Bacilos, cocos, estruturas semelhantes a cistos de sarcinas*
Amostra III 10 ⁻¹	-	Bacilos, bacilos*, sarcina*, cocos*
Amostra III 10 ⁻²	-	Bacilos, bacilos*, cocos*
Amostra III 10 ⁻³	-	Células ausentes
Amostra IV 10 ⁻¹	-	Bacilos médios espessos, bacilos pequenos, feixes de bacilos*
Amostra IV 10 ⁻²	-	Bacilos médios espessos

(*)observados sob fluorescência

(-) não foram realizadas observações

A Tabela 50 mostra as morfologias celulares visualizadas nos frascos de NMP contendo propionato como fonte de carbono, para a contagem de acetogênicas no biorreator 2 da fase II. A Figura 50 mostra as fotomicrografias das morfologias visualizadas nos frascos contendo propionato.

Tabela 50: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP contendo propionato como fonte de carbono no biorreator 2

Amostras	ACETOGENÍCAS (Propionato)	
	30 dias	60 dias
Amostra I 10 ⁻¹	Sarcinas*, bacilos médios, bacilos longos finos, poucos bacilos médios espessos*, cocobacilos*, estruturas semelhantes a cistos de sarcinas*	Filamentosos*, sarcinas*, bacilos grandes*, cocos*, estruturas semelhantes a cistos de sarcinas*
Amostra I 10 ⁻²	Células ausentes	Bacilos com esporo*, poucos bacilos pequenos e médios

Amostra II 10 ⁻¹	Estruturas grandes arredondadas*, cocos*, sarcinas*, bacilos, cocos aglomerados	Bacilos
Amostra II 10 ⁻²	Poucos bacilos	Poucos bacilos e filamentosos
Amostra III 10 ⁻¹	-	Bacilos, bacilos*, cocos*, sarcinas*
Amostra III 10 ⁻²	-	Poucos bacilos longos
Amostra IV 10 ⁻¹	-	Bacilos
Amostra IV 10 ⁻²	-	Poucos bacilos
(*)observados sob fluorescência (-) não foram feitas observações		

A Tabela 51 mostra as morfologias celulares visualizadas nos frascos de NMP sem fonte de carbono, para o controle das contagens no biorreator 2 da fase II. A Figura 51 mostra as fotomicrografias das morfologias visualizadas nos frascos sem fonte de carbono e encontram-se no final deste capítulo.

Tabela 51: Morfologias celulares visualizadas nas amostras de NMP sem fonte de carbono no biorreator 2

Amostras	SEM FONTE DE CARBONO	
	30 dias	60 dias
Amostra I 10 ⁻¹	Poucos bacilos*, poucos cocobacilos*, cocos grandes*	Bacilos pequenos espessos*, sarcinas*, cocos
Amostra I 10 ⁻²	Poucos cocos grandes*, sarcina*, bacilos	Bacilos espessos com acúmulo de grânulos nas extremidades, bacilos médios e pequenos, bacilos com esporos
Amostra II 10 ⁻¹	Bacilos, bacilos longos em cadeia, bacilos*, cocos agrupados*	Bacilos, cocos*
Amostra II 10 ⁻²	Poucos bacilos	Poucos bacilos
(*)observados sob fluorescência		

Os exames microscópicos foram de grande importância neste trabalho, pois através dos tipos morfológicos observados nos frascos do NMP contendo uma determinada fonte de carbono, pôde-se fazer menção aos possíveis gêneros que possuem as características morfológicas observadas e os substratos utilizados. E quanto à enumeração bacteriana é possível a confirmação, com o exame microscópico e os tipos morfológicos visualizados, dos grupos microbianos em estudo que cresceram utilizando a fonte de carbono adicionada ao meio de cultura.

Figura 41: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo acetato. 1ª amostra NMP diluição 10^{-1} , (a)cocos fluorescentes, (b) e (c) e sarcinas; 2ª amostra (60 dias incubação), (d)bacilos com esporo, (e)cocos e filamentos fluorescentes, (f)cocos e filamentos contraste de fase.

Figura 42: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo acetato. 3ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (30 dias incub.), (g)cocos fluorescentes e estruturas semelhantes a cistos de sarcinas, (h)semelhantes a cistos de sarcina; (i)com 60 dias de incubação, cocos agrupados fluorescentes; 4ª amostra (dil. 10^{-1}) com 60 dias de incubação, (j)sarcinas fluorescentes, (k)cocos agrupados fluorescentes

Figura 43: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo atmosfera de H_2/CO_2 . 1ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (30 dias incub.), (a) bacilos longos contraste de fase (eram fluorescentes, mas não tem registro), (b) feixe de filamentos, (c) filamentos. (d) e (e) diluição 10^{-2} , bacilos e filamentos; (f) 60 dias, bacilos.

Figura 44: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo atmosfera de H_2/CO_2 . 1ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (60 dias de incubação), (g) e (h) bacilos fluorescentes, (i) filamentosos; 2ª amostra diluição 10^{-2} (30 dias incubação), (j) bacilos fluorescentes, (k) filamentosos, (l) 10^{-1} bacilos fluorescentes.

Figura 45: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo atmosfera de H_2/CO_2 . (m) 2ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (30 dias) , bacilos fluorescentes; (n) 60 dias de incubação 10^{-1} , bacilos fluorescentes; (o) diluição 10^{-2} , bacilos; 3ª amostra, 60 dias de incubação (diluição) 10^{-1} , (p) semelhantes à sarcinas, (q) diluição 10^{-2} , bacilos.

Figura 46: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo metanol. 3ª amostra NMP diluição 10^{-1} , (60 dias), (a)cocos fluorescentes, (b)semelhantes à sarcinas, (c) e (d) semelhantes a *Methanosarcina* sp,

Figura 47: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo butirato. 2ª amostra NMP diluição 10^{-1} , (30 dias), (b) e (f) bacilos com acúmulo de grânulos nas extremidades; (c) semelhantes a *Methanosarcina* sp; (d) cocobacilos; (e) cocos fluorescentes agrupados.

Figura 48: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo butirato. 3ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (30 dias incub.), (a) e (b) cocos fluorescentes; (i) e (j) cistos de sarcina; (k) e (l) 60 dias de incubação, cocos fluorescentes.

Figura 49: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo butirato. (m) e (n) 4ª amostra NMP dil. 10^{-2} , (30 dias incub.), grânulo metanogênico em contraste de fase em fluorescência.

Figura 50: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP contendo propionato. 1ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (a) sarcinas (30 dias incub.), (b) 2ª amostra, sarcinas (60 dias de incubação).

Figura 51: Fotomicrografias das morfologias celulares observadas nos frascos de leitura positiva do NMP sem fonte de carbono. 1ª amostra NMP dil. 10^{-1} , (a)cocos agrupados fluorescentes, (b)bacilos com acúmulo de grânulos nas extremidades; (c)2ª amostra diluição 10^{-1} , cocos fluorescentes aglomerados

As morfologias predominantes nas análises microscópicas das leituras dos frascos de NMP contendo as diferentes fontes de carbono para a contagem de arqueas metanogênicas, encontram-se na Tabela 52. Para as contagens de acetogênicas nos frascos contendo butirato e propionato como fonte de carbono, encontram-se na Tabela 53. As morfologias observadas nos frascos sem fonte de carbono encontram-se na Tabela 54.

Tabela 52: Morfologias predominantes visualizadas nos frascos de leitura de NMP para arqueas metanogênicas.

Tempo de incubação	Acetato	H ₂ /CO ₂	Metanol
73 dias	Cocos*, bacilos*, sarcinas* e filamentosos*	-	-
95 dias	bacilos*, sarcinas* e filamentosos*	Bacilos, bacilos delgados, bacilos*, filamentosos* e bacilos longos	-
122 dias	Cocos*, bacilos*, sarcinas* e bacilos	Bacilos*, filamentosos*	-
147 dias	Cocos*, sarcinas* e bacilos	Cocos*, bacilos*, filamentosos*, bacilos longos e sarcina*	Cocos*, bacilos*, sarcinas*, estruturas semelhantes a cistos de sarcina* e bacilos
179 dias	Cocos*, bacilos*, bacilos longos, sarcinas*, bacilos espessos, estruturas semelhantes a cistos de sarcina e bacilos	-	-

(*) observados sob fluorescência;(-) não foi feita observação

As morfologias observadas semelhantes à sarcinas que cresceram em meio contendo acetato como fonte de carbono podem ser consideradas como *Methanosarcina* sp, pois as estruturas metanogênicas fluorescentes com morfologia de sarcinas são classificadas neste gênero (BERGEY'S, 1988). Os bacilos fluorescentes são metanogênicos utilizadores de acetato e podem pertencer a Família Methanomicrobiaceae. Os cocos fluorescentes observados podem pertencer ao gênero *Methanogenium* sp. Quanto às morfologias observadas em meio contendo H₂/CO₂ como fonte de carbono, os cocos que utilizam este substrato pertencem aos gêneros *Methanococcus* sp ou *Methanogenium* sp. As estruturas com morfologia de sarcina são classificadas no gênero *Methanosarcina* sp. Os bacilos foram as estruturas predominantes nas contagens com esta fonte de carbono e podem pertencer aos gêneros *Methanobacterium* sp, *Methanobrevibacter* sp ou *Methanomicrobium*

sp, de acordo com o manual BERGEY'S (1988). Os cocos que são utilizadores de um tipo de substrato específico, como o metanol, podem ser classificados pertencentes ao gênero *Methanococcoides* sp. BARLAZ et al. (1989b) citam os trabalhos de FIELDING & ARCHER (1986)²⁸, que enumeraram e isolaram arqueas metanogênicas de amostras de aterro sanitário e as classificaram quanto ao gênero, incluindo *Methanosarcina* sp, *Methanogenium* sp e *Methanobacterium* sp. BADRA (1993) isolou culturas metanogênicas, provenientes de amostras de aterro sanitário experimental, semelhantes aos gêneros *Methanobacterium* sp, *Methanobrevibacter* sp e *Methanosarcina* sp.

Tabela 53: Morfologias predominantes visualizadas nos frascos de leitura de NMP para bactérias acetogênicas

Tempo de incubação	Propionato	Butirato
95 dias	Sarcinas*, cocos*, bacilos espessos, filamentos enrolados, bacilos*, bacilos longos, filamentosos e cocobacilos*	Sarcinas*, bacilos, bacilos delgados longos, bacilos espessos*, cocobacilos*, bacilos com esporos, filamentosos, cocos* e estruturas semelhantes a cistos de sarcina
122 dias	Sarcinas*, bacilos*, cocos aglomerados*, estruturas semelhantes a cistos de sarcina*, bacilos, bacilos móveis e cocos	Estruturas semelhantes a cistos de sarcina, cocos*, sarcinas*, cocos aglomerados, filamentosos e bacilos
147 dias	Sarcinas*, cocos*, bacilos* e bacilos	Bacilos, bacilos*, cocos*, sarcinas* e bacilos longos
179 dias	Bacilos espessos, bacilos e feixes de bacilos*	-

(*) observados sob fluorescência; (-) não foi feita observação

²⁸ FIELDING, E.T.; ARCHER, D.B. (1986). Microbiology of landfill. Identification of methanogenic bacteria and their enumeration, in *Effluent Treatment and Disposal*, European Federation of Chemical Engineering, Ser. No. 53, Pergamon Press, Elmsford, NY, 331p.

Tabela 54: Morfologias predominantes visualizadas nos frascos controle de leitura de NMP

Tempo de incubação	Sem fonte de carbono
95 dias	Bacilos*, cocobacilos*, cocos grandes*, bacilos espessos*, sarcinas*, bacilos e bacilos com esporos
122 dias	Bacilos, bacilos longos em cadeia, bacilos*, cocos agrupados* e cocos*

As estruturas que apresentaram fluorescência (Tabela 53 e 54) são pertencentes ao grupo de arqueas metanogênicas portanto, somente as estruturas que não apresentaram fluorescência podem ser consideradas pertencentes aos grupos de utilizadoras de butirato ou de propionato. Entre eles encontram-se bacilos espessos, longos, filamentosos, delgados, bacilos móveis e bacilos médios. Os cocobacilos fluorescentes podem ser classificados como pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter* sp ou *Methanococcus* sp (BERGEY'S, 1988).

5.2.5.1 Verificação dos tipos de arqueas metanogênicas através da aplicação de sondas de hibridização.

Esse item apenas ilustra e complementa este trabalho, mas há ainda muito a fazer a respeito. A amostra utilizada por ARAÚJO (1999) era proveniente de um frasco de leitura de NMP contendo H_2/CO_2 como fonte de carbono e a semelhança com o gênero *Methanogenium* sp está de acordo com o substrato utilizado por este grupo de microrganismo. A aplicação de sondas de hibridização pode ser um adendo ao método de contagem do NMP, considerando-se que se pode atribuir o gênero do grupo microbiano presente.

ARAÚJO (1999) utilizou amostra de um frasco de NMP após 30 dias de incubação, contendo atmosfera H_2/CO_2 (4:1, 1 atm.), para a realização de hibridização “in situ” com sondas fluorescentes MB 310 (específica para a ordem Methanobacteriales – dentro do domínio Archaea), apresentando sinal positivo. As bactérias que hibridizaram (Figura 52) com a sonda fluorescente apresentaram morfologia semelhante a *Methanobacterium* sp. A sonda utilizada foi SFMbac-0310-a-A-22 (RASKIN et al. a e b, 1994)²⁹, marcada com rodamina, com a sequência CTTGTCTCAGGTTCCATCTCCG.

Figura 52: Bactérias que hibridizaram com a sonda fluorescente, morfologia semelhante a *Methanobacterium* sp.

²⁹ a) RASKIN, L.; STROMLEY, J.M.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994). Group-specific 16S rRNA Hybridization Probes to Describe Natural Communities of Methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1232-1240.

b) RASKIN, L.; POUSEN, L.K.; NOGUERA, D.R.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994). Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1241-1248.

De acordo com o Manual BERGEY'S (1989), o gênero *Methanobacterium* sp pertence a Ordem Methanobacteriales e à Família Methanobacteriaceae e encontra-se dentro do domínio Archaea. Suas características morfológicas podem ser bacilos curtos, longos ou filamentosos e são utilizadores de H_2/CO_2 .

6. CONCLUSÕES

Os resultados das contagens de bactérias celulolíticas nos biorreatores da fase I pelo método do NMP, para os três procedimentos empregados, foram muito semelhantes, tanto para os valores numéricos, como para os tipos morfológicos observados em exames microscópicos.

O método do ultra-som adaptado de MÚNCH et al. (1997) e de JORAND et al. (1995) foi o mais adequado quanto à simplicidade de manipulação, ao tempo de preparo e a não exposição da amostra ao oxigênio.

O acompanhamento dos biorreatores 1 e 2 da fase II proporcionou a verificação da ocorrência de biodigestão anaeróbia do RSUDp adicionado de percolado e lodo granulado, no decorrer da observação dos parâmetros como a produção de metano, que atingiram valores até 75%, os conteúdos de ST e STV diminuíram, os valores de pH aumentaram, os valores de alcalinidade a bicarbonato aumentaram e de alcalinidade a ácidos voláteis diminuíram.

Os resultados dos parâmetros estudados possibilitou delinear um perfil das fases de decomposição dos resíduos sólidos de acordo com BARLAZ et al. (1989b).

Os números do NMP para as bactérias celulolíticas e acetogênicas e arqueas metanogênicas foram menores que os valores encontrados na literatura, podendo atribuir o fato às diferenças na composição dos resíduos estudados e a outros fatores tão ou mais importantes como os meios de cultivo utilizados e a eficiência do tratamento prévio das amostras.

Nas contagens de arqueas metanogênicas ocorreu uma diferença entre o número observado nos frascos com turvação e na composição de metano, pode ser atribuído à presença de um outro grupo microbiano capaz de utilizar os substratos contidos nos frascos, como por exemplo, as bactérias redutoras de sulfato.

A composição de ácidos orgânicos voláteis variou no decorrer do processo, o ácido butírico foi verificado inicialmente e não foi detectado nas últimas análises, bem como o número de bactérias utilizadoras de butirato foi um dos mais altos nas contagens pelo NMP, concluindo que as bactérias utilizadoras de butirato estiveram presentes no processo de biodegradação.

Quanto ao número de bactérias utilizadoras de propionato, foi bem menor, bem como a quantidade deste ácido detectado em análises cromatográficas foi dos mais altos, a velocidade de crescimento deste grupo bacteriano é lenta (ZEHNDER, 1988), verificou-se que o acúmulo destes ácidos não proporcionou a ação dos microrganismos, pois a pressão parcial de hidrogênio deve ser muito baixa para que ocorra a degradação.

O número de bactérias celulolíticas foi baixo, ou seja menor que os valores encontrados em literatura (BARLAZ et al., 1989b; GOMES, 1995), podendo-se atribuir à diferença na composição do resíduo, no entanto o aumento do número de células foi verificado concomitante ao aumento da produção de metano, como pôde ser verificado nos trabalhos de BARLAZ et al. (1989b).

Os tipos morfológicos observados nos biorreatores estiveram de acordo com a evolução das fases de biodegradação anaeróbia evidenciadas, inicialmente predominaram bacilos retos, curvos e delgados não fluorescentes que são característicos da fase hidrolítico-fermentativa, podendo ser relacionados aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Butyrivibrio* e *Acetivibrio*. Na fase de produção acelerada de metano foi evidenciada a predominância de morfologia semelhante à sarcinas fluorescentes, que geralmente são associadas ao gênero *Methanosarcina* sp.

Os grupos avaliados pelo método do NMP nas distintas fontes de carbono foram comparados com as fases de biodegradação anaeróbia. O grupo de microrganismos metanogênicos que atingiram valores mais elevados foram as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas. Os tipos morfológicos observados nos frascos de contagem contendo atmosfera de H_2/CO_2 foram predominantemente bacilos fluorescentes. Na literatura encontra-se que os microrganismos que se encaixam nestas características são pertencentes aos gêneros *Methanobacterium* sp, *Methanobrevibacter* sp ou *Methanomicrobium* sp, de acordo com o manual BERGEY'S (1988).

As estruturas que apresentaram fluorescência são pertencentes ao grupo de arqueas metanogênicas, portanto somente as estruturas que não apresentaram fluorescência podem ser consideradas pertencentes aos grupos de utilizadoras de butirato ou de propionato. Entre eles encontram-se os bacilos espessos, longos, filamentosos, delgados, bacilos móveis e bacilos. Os cocobacilos fluorescentes podem ser classificados como pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter* sp ou *Methanococcus* sp (BERGEY'S, 1988).

7. RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se um estudo mais aprofundado sobre o tratamento com sonicação para o desprendimento de células de amostras de resíduos sólidos, utilizando-se diferentes equipamentos sob diferentes frequências.

O estudo de resíduos de diferentes composições é recomendado, utilizando-se inóculos diversificados para encontrar um modelo ideal de biodigestores anaeróbios para resíduos sólidos. Bem como, recomenda-se a utilização de diferentes meios de cultura.

As bactérias redutoras de sulfato são um grupo de grande importância na biodegradação de resíduos sólidos urbanos, porém são muito pouco estudados. Recomenda-se o estudo aprofundado das BRS nos sistemas de biodegradação anaeróbia de resíduos sólidos.

Recomenda-se a utilização de sondas de hibridização por terem grande importância nos trabalhos sobre biodegradação anaeróbia de resíduos sólidos, podendo contribuir significativamente para o avanço nesta área, colaborando na identificação dos microrganismos atuantes no processo, bem como na contagem.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. (1982). Most Probable Number Method for Microbial Populations cap.39, p.815-820, In: *Methods of Soil Analysis*, part 2., 2a.ed. Madison USA
- APHA (American Public Health Association).(1998). *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater* 20a.ed., Boston, Mass.
- ARAÚJO, J.C.(1999) Relatório no4, apresentado à FAPESP – Fevereiro/1999.
- ATLAS , R. S.; BARTHA, R. (1981). Determination of microbial, biomass and activities In: *Microbial ecology – fundamental and application*, p 81–132.
- BADRA, R. J. (1993). Isolamento e caracterização de bactérias metanogênicas de um aterro sanitário experimental. . São Carlos, 175p. Dissertação de Mestrado. EESC-USP.
- BALCH, W. E.; FOX, G.E.; MAGRUM, J.L.; WOESE, C.R.; WOLFE, R.S.(1979). Methanogens: Reevaluation of unique biological group. *Microbiology Reviews*, v.43 p. 260-296.
- BALDOCHI, V. M. Z. (1997). Resíduos Sólidos Urbanos: aspectos básicos das transformações de compostos orgânicos em sistemas anaeróbios mesofílicos com elevada concentração de sólidos. São Carlos, 136 p. Tese de Doutorado. EESC-USP.

- BARLAZ, M. A ; HAM, R. K.; SCHAEFER, D. M. (1989 a). Effects of Prechilling and Sequential Washing on Enumeration of Microorganisms from Refuse. *Applied and Enviromental Microbiology*, 55: 50-54.
- BARLAZ, M.A ; HAM, R.K.; SCHAEFER, D.M. (1989 b). Bacterial Population Development and Chemical Characteristics of Refuse Decomposition in a Simulated Sanitary Landfill. *Applied and Enviromental Microbiology*, 55: 55-65
- BARLAZ, M.A ; HAM, R.K.; SCHAEFER, D.M. (1990). Methane Production from Municipal Refuse: a Review of Enhancement techniques and microbial dynamics. *Critical Reviews in Enviromental Control*, 19: 557-585.
- BARLAZ, M.A. (1996). Microbial Studies of Landfills and Anaerobic Refuse Decomposition. In: *Manual of Environmental Microbiology*. AMS PRESS. Washington, D.C.. 541-557
- BAYER, E.A.; MORAG, E.; SHOHAM, Y.; TORMO, J.; LAMED, R.(1996) The Cellulosome: A cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In: *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. Wiley-Liss, Inc. p.155-182.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 25-28.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. (1989). 1^a ed. Eds. J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holf. Baltimore, Willians & Wilkins. Vol. 1. 964p.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. (1989). 1^a ed. Eds. J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holf. Baltimore, Willians & Wilkins. Vol. 2. 1599p.

- BRYANT, M. P. (1972) Comentary an the Hungate technique for culture of anaerobic Bacteria. *The american J. Clin. Nutr.*, 25: 1324-1328
- CAILLIEZ, C.; BENOIT, E. G.; PETITDEMANGE, H.; RAVAL, G. (1993). Solubization of cellulose by mesophilic cellulolytic clostridia isolated from a municipal solid-waste digester. *Biosource Technology*, 43: 77-83.
- CATELLI V.V. (1996). Digestão Anaeróbia de Resíduos Sólidos gerados em um Restaurante Universitário. São Carlos, 101p. Dissertação de Mestrado. EESC-USP.
- COCHRAN, W.G. (1950). Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". *Biometrics*, 6: 105-116.
- DIAZ, L.F.; SAVAGE, G.M.; EGGERTH, L.L.; GOLUEKE, C.G. (1993). Composting And Recycling Municipal Solid Waste. Lewis Publishers.. 296p.
- DILLALO, R.; ALBERTSON, O.E. (1961). Volatile Acids by Direct Titration. *Journal Wat. Poll. Control Fed.*, 33: 356-365.
- FELIX, R.C.; LJUNGDAHL, L.G. (1993). THE CELLULOSOME: The exocellular Organelle of *Clostridium*, *Annu. Ver. Microbiol.*, 47: 791-819.
- FENCHEL, T; FINLAY, B.J.(1991). Endosymbiotic Methanogenic Bacteria in Anaerobic Ciliates: Significance for the Growth Efficiency of the Host. *J. Protozool.*, 28: 18-22.
- FENCHEL, T; FINLAY, B.J.(1995). Ecology and Evolution in Anoxic Worlds. Oxford University Press Inc., New York.. 276 p.

- FORESTI, E.(1994). Fundamentos do processo de biodigestão anaeróbia. In: III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento anaerobio de aguas residuales", Montevideo – Uruguay, p97-110.
- GIAJ-LEVRA, L.A (1991). Estudo de metodologia de contagem para bactérias anaeróbias celulolíticas. São Carlos, 140 p. Dissertação de Mestrado. EESC-USP.
- GOMES, L.P. (1995). Avaliação da atividade bacteriana anaeróbia celulolítica do chorume originado em sistema de disposição de resíduos sólidos urbanos a céu aberto. São Carlos, 210p. Tese de Doutorado. EESC-USP.
- GOTTSCHALK, G.(1979) Bacterial Metabolism. By Springer-Verlag New York Inc. USA. 281p.
- GRIFFITHS, M. (1992). Biotechnology for a clean environment. Mike Griffiths Associates, The Pantilles, Ivy Lane, Woking, Inglaterra. 19 p.
- GROTENHUIS, J.T.C.; SMIT, M.; PLUGGE, C.M.; YUANSHENG, XU; VAN LAMMEREN, A A M.; STAMS, A J.M.; ZEHNDER, A J.B. (1991). Bacteriological Composition and Structure of Granular Sludge Adapted to Different Substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1942-1949.
- HUNGATE, R.E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Review*, 14: 1- 48.
- HUNGATE, R. E. (1969). A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods In Microbiology*, 3B: 117-132.
- JONES, K.L.; GRAINGER, J.M. (1983). The Application of Enzyme Activity Measurements to a Study of Factors Affecting Protein, Starch and Cellulose

- Fermentation in Domestic Refuse. *Eur. J. Applied Microbiology and Biotechnology*, 18: 181-185.
- JONES, J.G. (1996). Modern molecular techniques and environmental microbiology. In: *Molecular approaches to environmental microbiology*. Eds. R.W. Pickup & J.R. Saunders. 262p.
- JORAND, F.; ZARTARIAN, F.; THOMAS, F.; BLOCK, J.C.; BOTTERO, J.Y.; VILLEMIN, G.; URBAIN, V.; MANEM, J. (1995) Chemical and structural (2D) Linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research*, 19: 1639-1647.
- KHAN, A.W.; PATEL, G.B. (1988). Cellulose degradation by mesophilic anaerobic bacteria. In: *Mesophilic anaerobic bacteria*. p 355-375.
- KOMILIS, D.P.; HAM, R.K.; STEGMANN, R. (1999). The effect of landfill design and operation practices on waste degradation behavior: a review. *Waste management & Research*, 17: 20-26
- LEITE, V.D. (1997). Processo de tratamento anaeróbio de resíduos sólidos urbanos inoculados com lodo de esgoto industrial. São Carlos, 251p. Tese de Doutorado. EESC-USP.
- LEITE, W.C.A.(1997). Estudo da gestão de resíduos sólidos: uma proposta de modelo tomando a unidade de gerenciamento de recursos hídricos (UGRHI-5) como referência. São Carlos, 270 p. Tese de Doutorado. EESC-USP.
- LJUNGDAHL, L.G.; WIEGEL, J. (1986). Working with anaerobic bacteria. In: *MANUAL of industrial microbiology and biotechnology*, . Eds. A.L. Demain e N.A.Solomon, Washington, American Society Microbiology, p 84-96.

- MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (1997). *Biology of Microorganisms*. 8a.ed., Prentice Hall, 986 p.
- MALBURG Jr., L.M.; TAMBLYN LEE, J.M.; FORSBERG, C.W. (1992). Degradation of Cellulose and Hemicelluloses by Rumen Microorganisms. In: *Microbial Degrad. Of Natural Products*. VHC
- MASON, T.J. (1990). "Sonochemistry: The uses of ultrasound in Chemistry". *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK*. Cap. 9, p.117-124
- McINERNEY, M.J.; BRYANT, M.P. (1981). Review of methane fermentation fundamentals. In: *Fuel gas production from biomass*. Ed. D.L. Wise, West Palm Beach, p. 19-47
- MILLER, T.L., WOLIN, M.J. (1984). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology*, 27: 985-987.
- MORMILE, M.R.; GURIJALA, K.R.; ROBINSON, J.A.; McINERNEY, M.J.; SUFLITA, J.M.(1996). The Importance of Hydrogen in Landfill Fermentations. *Appl. and Envir. Microbiol.*,62: 1583-1588.
- NOVAES R. F. V. (1986). Microbiology of Anaerobic Digestion. *Wat. Sci. Tech.*, 18: 1-14.
- PALMISANO, A.C; SCHWAB, B.S.; MARUSCIK, D.A. (1993). Hydrolytic enzyme activity in landfilled refuse. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 828-832.
- PALMISANO, A.C.; BARLAZ, M.A. (1996). *Microbiology of Solid Waste*. CRC Press, Inc., 224p

- PASSIG, F.H. (1997). Estudo comparativo sobre a degradação de compostos orgânicos em biofilmes formados em meio suporte e grânulos desenvolvidos em um filtro biológico. São Carlos, 125 p. Dissertação de Mestrado. EESC-USP.
- PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E.C.S.(1980). Microbiologia (Volume I). 5ª ed. Ed. McGraw-Hill do Brasil. 565 p.
- PESSIN, N. (1997). Avaliação de uma metodologia para obtenção de fungos anaeróbios celulolíticos a partir de amostras provenientes de dois ecossistemas distintos: rúmen e aterro sanitário. São Carlos, 150 p. Dissertação de Mestrado. EESC-USP.
- QIAN, X; BARLAZ, M. A. A (1996). Enumeration of anaerobic refuse-decomposing micro-organisms on refuse constituents. *Waste Management & Research*, 14: 151-161.
- RHYNER, R.C.; SCHWARTZ, L.J.; WENGER, R.B.; KOHRELL, M. G. (1995). Waste Management and Resource Recovery. Lewis Publishers, Boca Raton, 524 p.
- RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. (1986). Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strenth Wastes. *Journal Wat. Poll. Control Fed.*, 58: 406-411.
- ROBINSON, W.D. (1986). The Solid Waste Handbook. A Pratical Guide. Wiley-Interscience, New York, 811 p.
- SAKAMOTO, I.K. (1996). Comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo granulado anaeróbio metanogênico submetido a adições crescentes de sulfato. São Carlos, 147 p. Dissertação de Mestrado. EESC-USP.
- SCHINK, B. (1997). Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 262-280.

- SPEECE, R.E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.*, 17: 416A-427A.
- Ten BRUMMELER, E.(1993) Dry Anaerobic Digestion of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste. Doctoral Thesis, Wageningen Agricultural University. Waningen, The Netherlands
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.;CASE, C.L.(1982). Microbiology. An Introduction. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. 772p.
- VARESCHE, M.B.A. (1997). Estudo com bactérias fototróficas anoxigênicas: enriquecimento, isolamento, caracterização nutricional e cinética de crescimento. São Carlos, 351p. Tese de Doutorado - EESC-USP.
- VAZOLLER, R.F. (1988). Manual técnico do curso de ecologia da digestão anaeróbia PADCT/CNPq/FINEP,CETESB – São Paulo, Junho.
- VAZOLLER, R.F. (1990). Estudos sobre isolamento, caracterização e crescimento de culturas puras de bactérias metanogênicas provenientes de biodigestores de lodo de esgoto. São Carlos, 145p. Dissertação de mestrado - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas –USP - São Paulo, SP.
- VAZOLLER, R.F. (1995). Microbiologia e Saneamento Ambiental. Em: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”□. Base de dados Tropical □, p.1-11-www.bdt.org.br
- VAZOLLER, R.F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, 259 p. Tese de Doutorado - EESC-USP.
- VAZOLLER, R. F. (1996). Evolução na aplicação da biotecnologia em processo industrial e em controle e monitoramento de efluentes, Seminário - ABTCP

- VILLAS BÔAS, D.M.F. (1990). Estudo da microbiota anaeróbia fermentativa em aterro sanitário. São Carlos, 157 p. Dissertação de mestrado - EESC-USP.
- v.MÜNCH, E.; POLLARD, P. C. (1997). Measuring bacterial biomass-COD in wastewater containing particulate matter. *Water Research*, 31: 2550-2556.
- ZEHNDER, A.J.B.; STUMM, W.(1988). Geochemistry and Biochemistry os Anaerobic Habitats. In: Biology of Anaerobic Microorganisms. Zehnder, A.J.B.(ed.). New York: Wiley Interscience, p1-38.
- ZINDER, S.H. ; KOCH, M. (1984). No-acetoclastic methanogenesis from acetate: oxidation By a thermophilic syntrophic coculture. *Archives Microbiology*, 138: 263-272.

ANEXO A

TABELA A 1: Combinações de tubos positivos para o cálculo da estimativa do NMP, quando 5 tubos são usados

Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper			Lower	Upper
0-0-0	<2	—	—	4-2-0	22	9.0	56
0-0-1	2	1.0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1.0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1.0	13	4-3-1	33	15	77
				4-4-0	34	16	80
				5-0-0	23	9.0	86
1-0-0	2	1.0	11	5-0-1	30	10	110
1-0-1	4	1.0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-0	4	1.0	15	5-1-0	30	10	120
1-1-1	6	2.0	18	5-1-1	50	20	150
1-2-0	6	2.0	18	5-1-2	60	30	180
				5-2-0	50	20	170
2-0-0	4	1.0	17	5-2-1	70	30	210
2-0-1	7	2.0	20	5-2-2	90	40	250
2-1-0	7	2.0	21	5-3-0	80	30	250
2-1-1	9	3.0	24	5-3-1	110	40	300
2-2-0	9	3.0	25	5-3-2	140	60	360
2-3-0	12	5.0	29				
				5-3-3	170	80	410
3-0-0	8	3.0	24	5-4-0	130	50	390
3-0-1	11	4.0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-0	11	4.0	29	5-4-2	220	100	580
3-1-1	14	6.0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-0	14	6.0	35	5-4-4	350	160	820
3-2-1	17	7.0	40				
				5-5-0	240	100	940
4-0-0	13	5.0	38	5-5-1	300	100	1300
4-0-1	17	7.0	45	5-5-2	500	200	2000
4-1-0	17	7.0	46	5-5-3	900	300	2900
4-1-1	21	9.0	55	5-5-4	1600	600	5300
4-1-2	26	12	63	5-5-5	≥1600	—	—

FONTE: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater

FIGURA A 1: Equação utilizada para o cálculo do NMP (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater

$$\text{NMP/100mL} = \frac{10}{\text{Maior volume testado nas diluições}}$$

TABELA A.2 Valores dos parâmetros estudados nos biorreatores da Fase I

REATORES 1a.FASE	DATA	Dias	%CO2	%Metano	área CO2	área Metano	Pressão	Volume gás
(30/março)								
Reator 1	1/Abr	2	-	-	-	-	58	900
Reator 1	2/Abr	3	96,1	0	591856	0	42	700
Reator 1	6/Abr	7	89,6	0,5	458864	2594	19	250
Reator 1	13/Abr	14	93,3	0	485954	0	10	170
Reator 1	13/Mai	44	83,1	2,1	446522	11573	-	-
Reator 1	18/Mai	49	92,5	0	401995	0	-	-
(31/março)								
Reator 2	1/Abr	1	-	-	-	-	119	1742
Reator 2	6/Abr	6	94,5	0,2	443902	1012	136	1450
Reator 2	13/Abr	13	98,3	0	557175	0	-	-
Reator 2	13/Mai	43	46,0	0,2	310386	1641	-	-
Reator 2	18/Mai	48	48,8	0,1	339389	968	-	-
(03/abril)								
Reator 3	13/Abr	10	97,1	0	6388182	0	-	-
Reator 3	17/Abr	14	90,4	3,2	262310	10521	43	700
Reator3	6/Mai	33	30,6	0	216467	0	-	-
Reator 3	18/Mai	45	51,5	0,4	405557	2984	-	-

Tabelas das leituras dos frascos de NMP dos biorreatores da fase I.

TABELA A.3: Leitura NMP- diluição decimal seriada 03/06/98 a 02/07/98 Método de BARLAZ et al. (1989)

[illegible]

TABELA A.4: Leitura NMP- diluição decimal seriada 26/05/98 a 26/06/98 Método de VILLAS-BÔAS (1990)

-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄
+ +	+ -	- -	- -	- -	- -	- -
+ +	+ -	- -	- -	- -	- -	- -
+ +	+ +	- -	- -	- -	- -	- -
+ +	+ +	- -	- -	- -	- -	- -
+ +	+ +	- -	- -	- -	- -	- -

Tabela A.5: Leitura NMP- diluição decimal seriada 27/05/98 a 27/06/98 do método do Ultra-som (1998)

[illegible]

TABELA A.6: parâmetros observados ao longo do processo de biodigestão no biorreator 1 (Fase II)

DATA	Tempo de incubação Aliment.	Tamponamento	Amostra	Inóculo	pH	%Metano	%CO ₂	PURGA	ST %	STV%	Al.ac.vol. g ac.ac/L	AT CaCO ₃ /L	Temperat.	ÁREA METANO	ÁREA CO ₂	MASSA METANO	Concentração
17/Ago	0	RSP	NÃO		Percolado			79	20				35			0,0001	0,0002
19/Ago	2						83,55	78							177456	0,0001	0,0002
21/Ago	4						99,07	59+56							639301	0,0001	0,0002
24/Ago	7						96,33	50							647911	0,0001	0,0002
27/Ago	10		12 g BIC.					24								0,0001	0,0002
31/Ago	14					5,40	64,73	56						40902	490549	0,002145	0,00429
04/Set	18					32,39	56,96	50						187321	329438	0,009466	0,018932
08/Set	22					33,4	58,12	13						450675	784030	0,022634	0,045268
14/Set	28					32,4	62,6	12						466185	900644	0,023409	0,046819
15/Set	29	54,64 g RSP	1,2 g BIC.	NMP 1a.	45,36 mL água			5								0,0001	0,0002
18/Set	32					2,30	50,64	24						13851	304239	0,000793	0,001585
23/Set	37					8,02	66,55	18+22						43544	361110	0,002277	0,004554
29/Set	43					10,01	68,42	12						64391	439999	0,00332	0,006639
05/Out	49	54,64 g RSP	1,2 g BIC.	NMP 2a.	45,36 mL água	12,70	71,36	9						62936	353702	0,003247	0,006494
08/Out	52					0,32	54,80	23						1979	335224	0,000199	0,000398
09/Out	53	Recuperação	100mL Lodo de esgoto + 250 mL percolado		~6,0 (fita)			28	15%	10,95%			40			0,0001	0,0002
10/Out	54							x					40			0,0001	0,0002
13/Out	57					16,24	71,12	21						113975	498998	0,005799	0,011598
18/Out	62					26,73	67,59	44						200694	507438	0,010135	0,020269
21/Out	65					28,87	63,25	14						199615	437321	0,010081	0,020162
23/Out	67					38,95	59,06	19						273220	414340	0,013761	0,027522
26/Out	70					51,56	47,50	37						298277	274771	0,015014	0,030028
28/Out	72			NMP 3a.	~7,0 (fita)	57,79	41,83	41	17%	12,50%				390932	282923	0,019647	0,039293
29/Out	73					13,59	35,02	12						103126	265691	0,005256	0,010513
02/Nov	77					62,66	33,50	50						450997	241129	0,02265	0,0453
05/Nov	80					52,38	47,02	65						396997	356342	0,01995	0,0399
06/Nov	81					27,14	72,53	43						93799	250670	0,00479	0,00958
09/Nov	84					15,35	84,26	74						114368	627965	0,005818	0,011637
10/Nov	85					15,98	83,50	14						121657	635671	0,006183	0,012366
11/Nov	86					16,94	82,24	12						107048	519760	0,005452	0,010905
12/Nov	87					17,65	81,79	6						132898	615962	0,006745	0,01349

13/Nov	88					19,28	80,13	8						146488	608588	0,007424	0,014849
16/Nov	91					24,48	74,76	15						165454	505337	0,008373	0,016745
18/Nov	93					31,43	68,30	6						220933	480030	0,011147	0,022293
19/Nov	94			NMP 4a.	7,3 (béquer)	35,09	34,10	9	12%	8,50%				240825	439914	0,012141	0,024283
20/Nov	95					06,73	33,80	4						42673	214293	0,002234	0,004467
23/Nov	98					32,49	33,32	22						227969	233750	0,011498	0,022997
24/Nov	99					40,92	33,63	9						301070	247423	0,015154	0,030307
25/Nov	100					49,07	32,20	9						382166	250826	0,019208	0,038417
27/Nov	102					62,16	27,29	24						373014	163786	0,018751	0,037501
30/Nov	105					72,63	23,89	37						484267	152632	0,024313	0,048627
02/Dez	107					74,06	23,71	26						421649	135023	0,021182	0,042365
03/Dez	108					73,35	25,14	15						500718	171612	0,025136	0,050272
04/Dez	109					72,88	25,78	15						445427	157591	0,022371	0,044743
07/Dez	112					76,55	22,76	30						570626	169646	0,028631	0,057263
10/Dez	115			NMP 5a.	7,94 (reator)	75,22	24,32	31	11,6%	8,1%	11,0	25,25		485584	156990	0,024379	0,048758
11/Dez	116					11,29	34,62	4						79643	216647	0,004082	0,008164
14/Dez	119					34,60	32,12	17						213649	198333	0,010782	0,021565
17/Dez	122					45,73	32,99	15						295831	213411	0,014892	0,029783
18/Dez	123					47,47	34,64	0(vaz.)						340511	248526	0,017126	0,034251
21/Dez	126			Troca tampa		53,04	33,73	8(troca tampa)						415491	264211	0,020875	0,041749
27/Dez	132					40,50	21,42	29						521074	275682	0,026154	0,052307
04/Jan	140					61,08	23,26	34						441133	165968	0,022157	0,044313
07/Jan	143					64,18	27,03	21						465998	196264	0,0234	0,0468
08/Jan	144			NMP 6a.	8,05 (reator)	62,88	29,99	6	10,7	6,8	7,7	27,8		516172	246634	0,025909	0,051817
11/Jan	147					19,29	34,83	7						114363	206450	0,005818	0,011636
12/Jan	148					29,96	34,96	5						312224	393691	0,015711	0,031422
14/Jan	150					37,84	34,70	9						565517	518607	0,028376	0,056752
21/Jan	157					51,34	32,07	12						436947	272978	0,021947	0,043895
26/Jan	162					54,90	32,76	12						421903	251770	0,021195	0,04239
29/Jan	165					54,77	34,79	5						330845	210159	0,016642	0,033285
03/Fev	170			NMP 7a.	8,0 (reator)	50,96	35,97	3	10	6,27	8,36	30,5		316710	222497	0,015936	0,031871
08/Fev	175					5,0	36,12							43295	265019	0,002265	0,00453
11/Fev	178					8,9	36,4							54222	220490	0,002811	0,005622

TABELA A7: parâmetros observados ao longo do processo de biodigestão no biorreator 2 (Fase II)

DATA	Tempo de incubação	Alimentaç	Tamponamento	Amostra	Inóculo	pH	%Metano	%CO ₂	PURGA	STV %	ST %	Al.ac.vol gacac/L	AT GCaCO ₃ /L	TEMPERATURA	ÁREA METANO	ÁREA CO ₂	MASSA METANO	Concentração
17/Ago	0	RSP	Não	Início	Percolado				20		20			35			0,0001	0,0002
19/Ago	2							67,07	29(vazam.)							96091	0,0001	0,0002
21/Ago	4							98,77	16+14							656128	0,0001	0,0002
24/Ago	7							98,31	2							588738	0,0001	0,0002
27/Ago	10		12 g Bic.														0,0001	0,0002
31/Ago	14						3,06	66,24	50						23003	497950	0,00125	0,0025
04/Set	18						29,89	58,93	56						170798	337702	0,00864	0,01728
08/Set	22						31,12	60,26	15						437241	846509	0,021962	0,043924
14/Set	28						30,55	62,56	9						448470	922784	0,022524	0,045047
15/Set	29	54,64gRSP	1,2g Bic.	amostra	45,36mL água				3								0,0001	0,0002
18/Set	32						1,79	53,27	22						10369	308717	0,000618	0,001237
23/Set	37						4,23	65,45	16+19						23615	364896	0,001281	0,002562
29/Set	43						6,86	71,19	11						44642	463256	0,002332	0,004664
06/Out	49	54,64gRSP	1,2g Bic.	amostra	45,36mL água		7,85	73,11	8						38404	357485	0,00202	0,00404
08/Out	52						0,23	47,77	18						1402	290857	0,00017	0,00034
09/Out	53	Recuperação	100mL Lodo de esgoto+ 250 mL percolado			~6 (fita)			27	15	10,95			40			0,0001	0,0002
10/Out	54																0,0001	0,0002
13/Out	57						16,27	71,36	23						117355	514696	0,005968	0,011936
18/Out	62						27,38	67,28	46						210039	516147	0,010602	0,021204
21/Out	65						31,07	65,91	14						241215	511708	0,012161	0,024322
23/Out	67						40,09	58,06	21						303359	439370	0,015268	0,030536
26/Out	70						53,87	45,38	45						313036	263724	0,015752	0,031504
28/Out	72						63,50	36,15	51						438678	249769	0,022034	0,044068
29/Out	73			NMP acet.		~7,0 (fita)	63,12	36,50	27	15	10,6				441143	253707	0,022157	0,044314
02/Nov	77						65,97	30,38	61						459996	211871	0,0231	0,0462
05/Nov	80						50,82	48,57	75						358514	342598	0,018026	0,036051
06/Nov	81						24,60	74,94	43						118960	362391	0,006048	0,012096
09/Nov	84						16,69	82,97	69						125096	621927	0,006355	0,01271
10/Nov	85						15,63	83,24	16						117507	625905	0,005975	0,011951

11/Nov	86					16,35	83,12		9					117319	596208	0,005966	0,011932
12/Nov	87	abertura para Alc. a bicarbon.			7.3 bequer	16,81	82,10		5			27,5	25,5	119630	584404	0,006082	0,012163
13/Nov	88					01,86	35,86		4					13668	263889	0,000783	0,001567
16/Nov	91					07,29	41,37		8					50753	288141	0,002638	0,005275
18/Nov	93					12,24	45,53		0					87191	324178	0,00446	0,008919
19/Nov	94					14,21	46,22		6					92743	301571	0,004737	0,009474
20/Nov	95		NMP		7.4 Bequer	17,02	47,64		2	11	7,59			116256	325213	0,005913	0,011826
23/Nov	98					12,08	36,06		9					88298	263575	0,004515	0,00903
24/Nov	99					17,56	36,80		3					134471	281751	0,006824	0,013647
25/Nov	100					23,33	36,74		4					186480	293692	0,009424	0,018848
27/Nov	102					35,70	34,77		12					228995	223150	0,01155	0,0231
30/Nov	105					53,27	29,71		24					374226	208741	0,018811	0,037623
02/Dez	107					63,45	27,00		20					387838	165081	0,019492	0,038984
03/Dez	108					67,86	25,54		14					451006	169733	0,02265	0,045301
04/Dez	109					70,65	24,56		15					441717	153599	0,022186	0,044372
07/Dez	112					75,98	21,77		34					550274	157691	0,027614	0,055227
10/Dez	115					77,47	21,35		28					495231	136460	0,024862	0,049723
11/Dez	116					75,77	23,29		19					429028	131906	0,021551	0,043103
14/Dez	119					75,70	23,69		16					501942	157105	0,025197	0,050394
18/Dez	122		NMP		8,09R	70,01	28,66	0(vazam.)	11,6	8,2	9,6	27,87		454188	185939	0,022809	0,045619
21/Dez	123					11,79	34,06	"						93995	271585	0,0048	0,0096
27/Dez	126					36,60	34,59		21					424244	400933	0,021312	0,042624
04/Jan	132					54,34	32,11		23					375543	221930	0,018877	0,037754
07/Jan	140					58,52	32,89		15					410314	230626	0,020616	0,041231
11/Jan	143					64,07	30,83		16					394122	189682	0,019806	0,039612
12/Jan	144					61,34	29,54		10					483057	233005	0,024253	0,048506
15/Jan	147		NMP			65,60	31,50		11	9,5	5,8	8,79	34,83	760788	365369	0,038139	0,076279
21/Jan	148					27,78	32,20		7					225970	261876	0,011399	0,022797
26/Jan	150					37,74	31,45		9					284336	236933	0,014317	0,028634
29/Jan	157					39,51	33,73		2					329789	281530	0,016589	0,033179
03/Fev	162					41,75	33,77		6					335706	271506	0,016885	0,033771
08/Fev	165					43,22	35,47							371570	304894	0,018679	0,037357
11/Fev	170				8,1	44,22	35,34		10	6,1				290923	232154	0,014646	0,029292

Tabela A.8: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 30 dias -15/09/98 – 15/10/98

Amostra A													
-1		-2		-3		-4		-5		-6		-7	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostra B													
-1		-2		-3		-4		-5		-6		-7	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela A.9: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 60 dias -15/09/98 – 15/11/98

[illegible]

Tabela A.10: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 05/10/98 - 30 dias – 05/11/98

Amostra A													
-1		-2		-3		-4		-5		-6		-7	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostra B													
-1		-2		-3		-4		-5		-6		-7	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela A.11: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 05/10/98 - 60 dias – 05/12/98

Amostra A													
-1		-2		-3		-4		-5		-6		-7	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostra B													
-1		-2		-3		-4		-5		-6		-7	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

O método do NMP abaixo foram feitos com temperaturas diferentes, nas amostras A e B = 35°C e C = 40°C

Tabela A.12: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 28/10/98 - 30 dias – 28/11/98

Amostra A											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Amostra B											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Amostra C											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela A.13: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 28/10/98 – 60 dias – 28/12/98

Amostra A											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Amostra B											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Amostra C											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela A.14: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 19/11/98 - 30 dias – 19/12/98

Amostra A											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Amostra B											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela A.15: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 19/11/98 - 60 dias – 19/01/99

Amostra A											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Amostra B											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela A.16: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 10/12/98 - 30 dias – 10/01/99

Amostra A											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Amostra B											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tabela A.17: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 10/12/98 - 60 dias – 10/02/99

Amostra A											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Amostra B											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tabela A.18: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 08/01/99 - 30 dias – 08/02/99

Amostra A											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostra B											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela A.19: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 08/01/99 - 60 dias – 08/03/99

Amostra A											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

pH = 7,0 pH = 7,0

Amostra B											
-1		-2		-3		-4		-5		-6	
Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄	Celulose	CH ₄
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

pH = 6,0 pH = 7,0

Tabela A.20: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 03/02/99 - 60 dias – 03/04/99
(não foram feitas as leituras e cromatografias em 30 dias, somente as microscopias...)

Amostra A							
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	
+	-	+	-	-	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-
Amostra B							
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	Celulose CH ₄	
+	+	+	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-

Resultados das leituras do NMP para células procarióticas do grupo metanogênico acetoclásticas e hidrogenotróficas e bactérias acetogênicas utilizadoras de butirato e propionato presentes nos biorreatores (Fase II)

Tabela A.21: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 29/10/98 - 30 dias – 29/11/98

Amostra A - fonte de carbono utilizada - Acetato							
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	
+	-	+	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-
Amostra B							
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	
+	-	+	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-

Tabela A.22: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 29/10/98 - 30 dias – 29/12/98

Amostra A							
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	
+	-	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-
Amostra B							
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	
+	+	+	+	-	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-

Tabela A.23: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 20/11/98 - 30 dias – 20/12/98

Amostra A – sem fonte de carbono							
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	
+	-	+	+	-	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-

Amostra B – Propionato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra C – Acetato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra D – Butirato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra E – atmosfera de H ₂ /CO ₂ como fonte de carbono						
1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-

Tabela A.24: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 20/11/98 - 60 dias – 20/01/99

Amostra A – sem fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra B – Propionato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra C – Acetato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	-	+	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-
Amostra D – Butirato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra E – Atmosfera de H ₂ /CO ₂ como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-

Tabela A.25: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 18/12/98 - 30 dias – 18/01/99

Amostra A – sem fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-
Amostra B – Propionato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-
Amostra C – Acetato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-
Amostra D – Butirato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-
Amostra E – atmosfera de H ₂ /CO ₂ como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-

Tabela A.26: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 18/12/98 - 60 dias – 18/02/99

Amostra A – sem fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra B – Propionato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-
Amostra C – Acetato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-
Amostra D – Butirato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra E – atmosfera de H ₂ /CO ₂ como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-

Tabela A.27: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 15/01/99 - 30 dias - 15/02/99

Amostra A – Metanol como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
Amostra B – Propionato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
Amostra C – Acetato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
Amostra D – Butirato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
Amostra E – atmosfera de H ₂ /CO ₂ como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+

Tabela A.28: Leitura NMP(diluição decimal seriada) 15/01/99 – 60 dias– 15/03/99

Amostra A – Metanol como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
pH = 6,5	pH = 7,0					
Amostra B – Propionato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
pH = 7,0	pH = 7,0					
Amostra C – Acetato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
pH = 7,0	pH = 7,0					
Amostra D – Butirato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
pH = 7,0	pH = 7,0	pH = 7,0				

Amostra E – atmosfera de H ₂ /CO ₂ como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-
pH = 7,0	pH = 7,0	pH = 6,5				

(valores aproximados de pH – medidos com fita...)

Tabela A.29: Leitura NMP-(diluição decimal seriada) 11/02/99 - 60 dias – 11/04/99

Amostra A – Metanol como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra B – Propionato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra C – Acetato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-
Amostra D – Butirato como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-
Amostra E – atmosfera de H ₂ /CO ₂ como fonte de carbono						
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄	Turvação CH ₄
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-

FIGURA A 2: Equação da curva de calibração para cálculo da concentração de metano

$$\text{Concentração de metano} = \frac{\text{área}_{CH_4} \times 0,00000005 + 0,0001}{0,5} \text{ moles/L}$$