

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 08 / 02 / 02

Ass.: *Guilherme*

**COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS
PRESENTES EM SISTEMAS DE LODOS ATIVADOS MODIFICADOS
PARA REMOÇÃO BIOLÓGICA DO FÓSFORO EM EXCESSO,
UTILIZANDO A TÉCNICA DE ELETROFORESE
EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE
(DGGE)**



ISABEL KIMIKO SAKAMOTO

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

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ROSANA FILOMENA VAZOLLER

DEDALUS - Acervo - EESC



31100036888

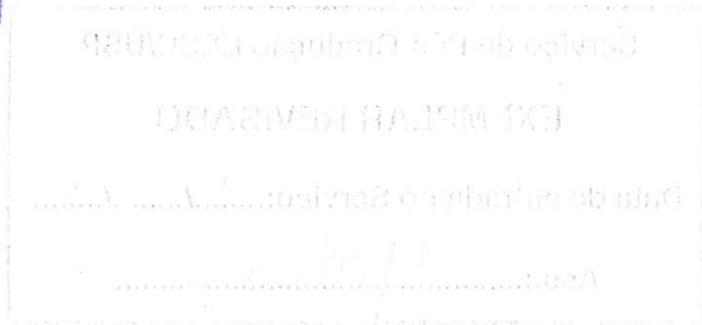
São Carlos
2001

Class. TESE - EESC

Cutt. 5044c

Tombo T0048/02

1232180



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

S158c Sakamoto, Isabel Kimiko
Comparação da estrutura de comunidades microbianas
presentes em sistemas de lodos ativados modificados para
remoção biológica do fósforo em excesso, utilizando a
técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante
(DGGE) / Isabel Kimiko Sakamoto. -- São Carlos, 2001.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São
Carlos-Universidade de São Paulo, 2001.

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller.

1. Lodos ativados. 2. Remoção biológica de fósforo,
estrutura microbiana, PCR-DGGE. 3. Processo EBPR.

I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

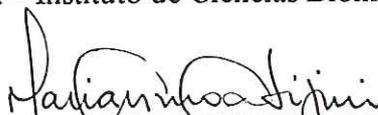
Candidata: Licenciada **ISABEL KIMIKO SAKAMOTO**

Tese defendida e julgada em 30-10-2001 perante a Comissão Julgadora:



Prof. Dra. **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Pesquisadora – Instituto de Ciências Biomédicas/USP)

APROVADA



Prof. Assoc. **MARIA DO CARMO CALIJURI**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADO



Prof. Tit. **PEDRO ALEM SOBRINHO**
(Escola Politécnica/USP)

APROVADA



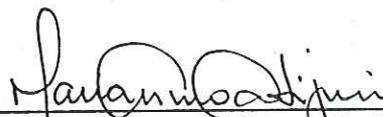
Prof. Dra. **VIVIAN HELENA PELLIZARI**
(Instituto de Ciências Biomédicas/USP)

APROVADA

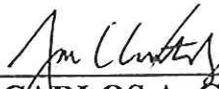


Doutor **GILSON PAULO MANFIO**
(Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”)

APROVADA



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



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

Dedico este trabalho ao meu pai Kazuo Sakamoto (in memoriam) e a minha mãe Hatumi Sakamoto, que ensinaram-me a enfrentar as dificuldades da vida com força e serenidade

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dr^ª. Rosana Filomena Vazoller pela orientação, apoio, confiança, incentivo e amizade, fundamentais na realização deste trabalho e, pela enorme colaboração (de 1993 até 2001), na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Takahashi Mino por ter recebido-me e orientado, durante a minha estadia na Universidade de Tokyo, e pelo constante apoio e dedicação no decorrer do trabalho experimental.

A JICA (Japan International Cooperation Agency), pelo amparo financeiro durante a minha estadia no Japão e pelo financiamento de todo trabalho experimental na Universidade de Tokyo.

Ao Doutorando Onuki pela dedicação no ensinamento da técnica utilizada no trabalho experimental e pelo constante apoio.

Aos Professores Doutores Satoh, Kurisu e Matsuo pela atenção dispensada.

Ao Professor Yashiro pelo constante incentivo e apoio no meu ingresso ao programa da Jica.

A Capes pela bolsa concedida por dois anos.

Ao Prof. Dr. Eugenio Foresti por ter aceitado ser meu orientador oficial no início do mestrado e do doutorado.

Aos amigos do programa da Jica, Akiko, Álvaro, Celina, Débora, Ery, Haruna, Mie, Nadja, Norio e Rosa, que proporcionaram-me uma estadia agradável no Japão.

Aos colegas da Universidade de Tokyo, que propiciaram-me um ambiente agradável durante o período que estive lá.

A Prof^ª Harumi pela amizade e importante contribuição na tradução das tabelas de dados em japonês.

A minha mãe, pai (*in memoriam*), irmã Helena, irmãos Arlei e Eduardo, pela compreensão nos momentos difíceis, constantes incentivos e apoio e o amor que dedicaram-me durante toda minha vida.

As queridas amigas Camila, Mércia, Rosana, Elisa pela amizade e apoio e a Luana e Dirlane pela amizade, apoio e auxílio na finalização da tese.

Ao amigo Válter pela amizade, apoio e incentivo, mesmo distante.

Aos funcionários da Jica pela atenção dispensada.

A Maria Angela, Prof^a. Dr^a. Bernadete pelo apoio e amizade e a Prof^a. Dr^a. Elizabeth Moraes pelo auxílio na revisão deste trabalho.

A minha prima Júlia pela amizade e constante incentivo na minha formação acadêmica.

Aos meus sobrinhos Guilherme e Juliana que proporcionaram-nos alegria, e aos cunhados Carlos e Cecília que incorporaram-se na família de forma harmoniosa.

Aos colegas, Flávia, Marisi, Cascia, Evandro e Fábio, pela convivência agradável.

As secretárias Sá e Pavi, pela atenção e disponibilidade dispensada.

A Rose pela amizade e atenção dispensada.

Aos Professores Doutores Pedro Além Sobrinho, Maria do Carmo Calijuri, Gilson Paulo Manfio e Vivian Helena Pellizari, pela participação na banca de defesa, contribuindo na finalização da tese.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Hidráulica e Saneamento que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE GLOSSÁRIO.....	xiii
LISTA DE SIGLAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1- Sistema convencional de lodos ativados.....	7
3.2- Sistemas de lodos ativados modificados para a ocorrência da remoção biológica de nitrogênio e de fósforo em excesso - EBPR	8
3.2.1- Reatores para remoção biológica de nitrogênio e fósforo em excesso.....	9
3.3- Fósforo para natureza e para a vida – Ciclo Biogeoquímico do P....	16
3.4- Fundamentos da remoção biológica do fosfato em excesso.....	18
3.4.1- Processo de remoção biológica do fósforo em excesso (EBPR).....	18
3.4.2- Modelos bioquímicos da remoção de fósforo.....	25
3.5- Microbiologia do sistema de lodos ativados – ênfase aos microrganismos envolvidos na remoção biológica do fosfato em excesso.....	33
3.5.1- Microrganismos envolvidos nos processos de remoção biológica do fosfato em excesso (EBPR).....	33
3.6- Métodos para o estudo microbiano de amostras complexas – ênfase na aplicação das técnicas de biologia molecular.....	43
3.7- Limitações do Método de Biologia Molecular.....	50
3.8- Cálculo para análise do perfil das bandas padrões do DGGE.....	51

4- MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1- Descrição da Estação Piloto - sistema de lodos ativados modificados – ETE Shibaura, Tóquio, Japão.....	53
4.2- Análises Físico-Químicas.....	56
4.3- Amostragens para a avaliação microbiana.....	56
4.3.1- Preservação das amostras.....	57
4.3.2- Estudo de padronização das condições para a análise do DGGE.....	58
4.3.3- Escolha da amostra de acordo com a relação de ácido nucléico e proteína, na análise do PCR-DGGE.....	59
4.3.4- Extração dos ácidos nucleicos.....	60
4.3.5- Amplificação do gene através da reação da cadeia polimerase (PCR).....	61
4.3.6- Agarose em gel eletroforético utilizada para avaliar o produto resultante da extração do ácido nucléico e da amplificação do gene por PCR.....	63
4.3.7- Separação dos fragmentos dos genes amplificados por PCR utilizando a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	64
4.3.8- Cálculo para a interpretação das bandas de DGGE.....	67
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1- Condições de operação dos três sistemas de lodos ativados estudados através dos parâmetros fornecidos pela ETE Shibaura...	68
5.2- Avaliação do desempenho dos três sistemas de lodos ativados estudados utilizando os parâmetros de monitoramento fornecidos pela ETE - Shibaura.....	73
5.3- Emprego da Técnica PCR/DGGE para análise da comunidade microbiana.....	95
5.3.1- Determinação dos conteúdos totais de ácidos nucleicos e de proteínas.....	96
5.3.2- Aplicação da Técnica PCR / DGGE para análise das comunidades microbianas.....	97

5.3.2.1-	Resultados da extração de DNA em géis de agarose.....	98
5.3.2.2-	Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica PCR-DGGE.....	99
6-	CONCLUSÕES.....	127
7-	CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES.....	130
8-	BIBLIOGRAFIA.....	133
	ANEXO A.....	139
	ANEXO B.....	147
	ANEXO C.....	152
	ANEXO D.....	154
	ANEXO E.....	156

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 3.1: Fluxograma típico de um sistema de lodos ativados convencional. Fonte: VON SPERLING (1997)..... 8
- FIGURA 3.2: Fluxograma do Sistema A2O, conhecido também como Phoredox de 3 estágios. Fonte: MARAIS et al. apud ALÉM SOBRINHO (1991)..... 10
- FIGURA 3.3: Fluxograma do sistema Bardenpho de 5 estágios (Phoredox). Fonte: BARNARD apud ALÉM SOBRINHO (1991)..... 11
- FIGURA 3.4: Fluxograma do Sistema UCT. Fonte: MARAIS et al. apud ALÉM SOBRINHO (1991)..... 12
- FIGURA 3.5: Fluxograma do Sistema UCT modificado. Fonte: SIEBRITZ et al. apud ALÉM SOBRINHO (1991)..... 13
- FIGURA 3.6: Fluxograma do Sistema de batelada. Fonte: VON SPERLING (1997)..... 13
- FIGURA 3.7: Ciclo do fósforo (Fonte: ODUM, 1988)..... 17
- FIGURA 3.8: Modelo bioquímico conceitual da utilização anaeróbia dos substratos orgânicos e suas conversões para PHA pelos PAOs. Fonte: MINO et al. (1997) e MINO et al. (1998)..... 28
- FIGURA 3.9: Esquema da operação combinada com as enzimas do ciclo de TCA e um caminho modificado via succinato-propionato capaz de oxidar o acetil-CoA para CO₂. Nesse esquema não estão apresentadas todas as etapas intermediárias. Fonte: HESSELMANN et al. (2000)..... 32
- FIGURA 3.10: Árvore filogenética apresentando as seis bandas dominantes seqüenciadas por NIELSEN et al (1999)..... 39
- FIGURA 3.11: Mecanismos de utilização e armazenamento do substrato em condições anaeróbias pelo lodo acumulador de glicogênio: (a) células acumuladoras de glicogênio; (b) formação de PHA a partir do ácido acético, através da utilização e do consumo de glicogênio; (c) formação de PHA e glicogênio a partir do açúcar utilizado; (d) formação de PHA a partir de açúcar e do ácido utilizados, e do glicogênio consumido (Fonte: LIU et al.,

	1996b).....	42
FIGURA 3.12:	As diferentes possibilidades para caracterizar as amostras ambientais através da análise comparativa de seqüências do RNAr. As setas em azul indicam os caminhos utilizados no presente trabalho para avaliar a estrutura da comunidade microbiana (adaptado de AMANN et al.,1995).....	47
FIGURA 4.1:	Esquema da planta piloto de lodos ativados situada na Estação Municipal de Tratamento de Águas Residuárias Shibaura, Tóquio, Japão.	54
FIGURA 4.2:	Esquema dos 3 sistemas de reação da estação piloto de lodos ativados modificada, apresentando as condições de operação dos compartimentos.	55
FIGURA 4.3:	Procedimento geral para a análise da estrutura da comunidade microbiana.....	60
FIGURA 4.4:	Esquema da amplificação do fragmento do DNAr por PCR. Fonte: MUZYER et al. (1993).....	62
FIGURA 5.1:	Representação gráfica dos índices pluviométrico (mm) no período de janeiro a maio de 2000.	72
FIGURA 5.2:	Representação gráfica dos valores da demanda bioquímica de oxigênio solúvel nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 1 realizado em 25/11/99 (AN compartimento anaeróbio; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).....	85
FIGURA 5.3:	Representação gráfica dos valores da demanda bioquímica de oxigênio solúvel nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 2 realizado em 15/02/00 (AN compartimento anaeróbio; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).....	85
FIGURA 5.4:	Representação gráfica dos valores da demanda bioquímica de oxigênio solúvel nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 3 realizado em 08/03/00 (AN compartimento anaeróbio; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).....	86
FIGURA 5.5:	Representação gráfica dos valores de fosfato total nos	

	compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 1 realizado em 25/11/99. (AN compartimento anaeróbio; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).....	87
FIGURA 5.6:	Representação gráfica dos valores de fosfato total nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 2 realizado em 15.02/00 (AN compartimento anaeróbio; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).....	87
FIGURA 5.7:	FIGURA 5.7: Representação gráfica dos valores de fosfato total nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 3 realizado em 08/03/00 (AN compartimento anaeróbio; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).....	88
FIGURA 5.8:	Representação gráfica dos valores de fósforo total no efluente tratado e no lodo em excesso (descartado) do sistema de reação 3, durante o mês de abril de 2000.	89
FIGURA 5.9:	Representação gráfica dos valores de fosfato no compartimento AN e no efluente tratado do sistema de reação 3, durante o mês de abril de 2000. (AN=anaeróbio).	89
FIGURA 5.10:	Representação gráfica na comparação dos valores de sólidos em suspensão presentes nos compartimentos anaeróbio e aeróbio, no sistema de reação 3 durante o mês de abril de 2000 (SS - Sólidos em suspensão; SSV = Sólidos voláteis em suspensão; a = aeróbio; an = anaeróbio).....	90
FIGURA 5.11:	Representação gráfica dos valores de concentração dos conteúdos totais de ácidos nucleicos e proteína, bem como da massa em gramas das amostras utilizadas na análise da estrutura da comunidade microbiana.	97
FIGURA 5.12:	Foto de gel de agarose 1% - Produto da extração dos ácidos nucleicos.....	98
FIGURA 5.13:	Gel de agarose 4% do produto de PCR.....	99

- FIGURA 5.14: Gel de DGGE das amostras de três sistemas diferente de lodos ativados (Legenda: AN: anaeróbio; AO: anóxico; AE: aeróbio).. 100
- FIGURA 5.15: Perfil das bandas do dgge, calculada a partir do coeficiente de similaridade entre os compartimentos do sistema de reação 1. (os números de 1 a 5 refere-se ao número dos compartimentos (figura 4.2); an, ao e ae, indica as condições; anaeróbia, anóxica e aeróbia submetidas pelos compartimentos. 102
- FIGURA 5.16: Representação gráfica do perfil das bandas do dgge, calculada a partir do coeficiente de similaridade entre os compartimentos dos sistemas de reação 1 e 2. (os números de 1 a 10 refere-se ao número dos compartimentos (figura 4.2); an, ao e ae, condições anaeróbia, anóxica e aeróbia que os compartimentos foram submetidos..... 103
- FIGURA 5.17: Representação gráfica do perfil das bandas do dgge, calculada a partir do coeficiente de similaridade entre o primeiro e o último compartimento dos sistemas de reação 1, 2 e 3. (os números de 1 a 13 refere-se ao número de compartimentos (figura 4.2); an, ao e ae, condições anaeróbia, anóxica e aeróbia que os compartimentos foram submetidas..... 104
- FIGURA 5.18: Representação gráfica do perfil das bandas de DGGE, calculada a partir do coeficiente de similaridade, entre os três sistemas de reação. (os números 1, 2 e 3 referem-se ao número do sistema de reação)..... 105
- FIGURA 5.19: Gel de DGGE das amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia nos três sistemas de reação (N=novembro; D=dezembro; J=janeiro; F=fevereiro; M=março)..... 107
- FIGURA 5.20: Representação gráfica do coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas mensalmente no último compartimento do sistema de reação 1 (1N=novembro; 2D=dezembro; 3J=janeiro; 4F=fevereiro; 5M=março)..... 108
- FIGURA 5.21: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas mensalmente no último compartimento do sistema de reação 2. (6N=novembro; 7D=dezembro; 8J=janeiro; 9F=fevereiro; 10M=março)..... 109
- FIGURA 5.22: Coeficiente de similaridade entres as bandas de DGGE das amostras coletadas mensalmente no último compartimentos do sistema de reação 3. (11N=novembro; 12D=dezembro; 13J=janeiro; 14F=fevereiro; 15M=março)..... 109

- FIGURA 5.23: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas mensalmente. (a) comparou-se amostras coletadas no mesmo período entre os sistemas de reação 1 e 2; (b) comparou-se amostras coletadas no mesmo período entre os sistemas de reação 2 e 3 (1R=sist. reação 1; 2R=sist. reação; 3R= sist. reação 3)..... 110
- FIGURA 5.24: Gel de DGGE das amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 1 (1a a 19a equivalem as amostras coletadas por 19 semanas)..... 112
- FIGURA 5.25: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE de amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 1 (1a a 19a referem-se as amostras coletadas por 19 semanas)..... 113
- FIGURA 5.26: Gel de DGGE das amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 2 (1b a 19b referem-se as amostras coletadas por 19 semanas)..... 114
- FIGURA 5.27: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE de amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 2 (1b a 19b referem-se as amostras coletadas por 19 semanas)..... 116
- FIGURA 5.28: Gel de DGGE das amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 3 (1c a 19c referem-se as amostras coletadas por 19 semanas)..... 117
- FIGURA 5.29: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE de amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 3 (1c a 19c referem-se as amostras coletadas por 19 semanas)..... 118
- FIGURA 5.30: Gel de DGGE das amostras coletadas diariamente, em seis dias consecutivos, nos sistemas de reação 1, 2 e 3 (1d a 6d referem-se as amostras coletadas no sist. reação 1; 7d a 12d referem-se as amostras coletadas no sist. reação 2; 13d a 18d referem-se as amostras coletadas no sist. reação 3)..... 120
- FIGURA 5.31: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas diariamente no último compartimento do sistema de reação 1. (1d a 6d referem-se aos seis dias consecutivos de coleta)..... 121
- FIGURA 5.32: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras

	coletadas diariamente no último compartimento do sistema de reação 2 (7d a 12d, referem-se aos seis dias consecutivos de coletas).....	121
FIGURA 5.33:	Coefficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas diariamente do sistema de reação 3. (13d a 18d referem-se aos seis dias consecutivos de coletas).....	122
FIGURA 5.34:	Coefficiente de similaridade das amostras coletadas diariamente no último compartimento dos três sistemas de reação. (a) comparou-se amostras coletadas nas mesmas datas nos sistemas de reação 1 e 2; (b) comparou-se amostras coletadas nos mesmos dias nos sistemas de reação 2 e 3 (1R a 18R referem-se as colunas comparadas).....	123
Figura 7.1:	Esquema da proposta para caracterização da estrutura da comunidade microbiana no processo EBPR (modificado de MINO et al., 2000).....	132
FIGURA A.1:	Teste utilizando gel desnaturante de DGGE na concentração de 35%-55% e 330 minutos de tempo de corrida.....	139
FIGURA A.2:	Teste utilizando gel desnaturante de DGGE na concentração de 30%-60% e 270 minutos de tempo de corrida.....	139
FIGURA A.3:	Teste dos números de ciclos de 25, 30 e 35, utilizando-se tempo de corrida de 330 minutos e concentração do gel de 30%-60% de gradiente desnaturante.....	140
FIGURA A.4:	Teste com diluições dos “templates” de 10, 20 e 30 vezes (amostras diferentes).....	140
FIGURA A.5:	Estrutura da comunidade microbiana dos três sistemas de reação estudados análise do DGGE.....	141
FIGURA A.6:	Ampliação do gel de DGGE das amostras dos 5 compartimentos do sistema de reação 1.....	141
FIGURA A.7:	Ampliação do gel de DGGE das amostras dos 5 compartimentos do sistema de reação 2.....	142
FIGURA A.8:	Ampliação do gel de DGGE das amostras dos três compartimentos do Sistema de reação 3.....	142
FIGURA A.9:	Perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia dos três sistemas de reação.....	143
FIGURA A.10:	Ampliação do perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia do sistema de reação 1.....	143

FIGURA A.11:	Ampliação do perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia do sistema de reação 2.....	144
FIGURA A.12:	Ampliação do perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia do sistema de reação 3.....	144
FIGURA A.13:	Perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas diariamente na última etapa aeróbia nos três sistemas de reação.....	145
FIGURA A.14:	Ampliação do perfil das bandas de DGGE, as amostras coletadas diariamente na última etapa aeróbia do sistema de reação 1.....	145
FIGURA A.15:	Ampliação o perfil das bandas de DGGE, as amostras coletadas diariamente na última etapa aeróbia do sistema de reação 2.....	146
FIGURA A.16:	Ampliação o perfil das bandas de DGGE, as amostras coletadas diariamente na última etapa aeróbia do sistema de reação 3.....	146

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1:	Vantagens e desvantagens do processo de remoção do fósforo e nitrogênio.....	15
TABELA 3.2:	Unidades monoméricas do polímero PHA.....	20
TABELA 3.3:	Relação entre acetato consumido e fósforo liberado no processo EBPR, sob anaerobiose.....	22
TABELA 3.4:	Estequiometria das reações de EBPR durante a fase anaeróbia....	31
TABELA 3.5:	Referências dos artigos relacionados ao isolamento da bactéria <i>Acinetobacter</i> sp em processos de remoção biológica de fósforo em excesso.....	34
TABELA 4.1:	Datas das amostragens na avaliação da estrutura da comunidade microbiana.....	57
TABELA 4.2:	Procedimento para o preparo da solução de PCR para uma amostra.....	62
TABELA 4.3:	Condições usadas na programação do aparelho para a amplificação dos fragmentos de ácidos nucleicos, por PCR.	63
TABELA 4.4:	Procedimentos para o preparo da solução do gel gradiente desnaturante.....	65
TABELA 5.1:	Condições de operação da estação piloto no dia 25 de Novembro de 1999.....	70
TABELA 5.2:	Condições de operação da estação piloto no dia 15 de Fevereiro de 2000.....	70
TABELA 5.3:	Condições de operação da estação piloto no dia 08 de Março de 2000.....	70
TABELA 5.4:	Condições de operação da estação piloto no dia 28 de abril de 2000.....	71
TABELA 5.5:	Condições de operação considerando o volume de descarte de lodo em excesso da estação piloto no dia 09 de maio de 2000.....	71
TABELA 5.6:	Condições de operação da estação piloto no dia 26 de maio de 2000.....	71

TABELA 5.7:	Perfil 1- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 1 – realizadas em 25/11/1999.....	74
TABELA 5.8:	Perfil 1- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 2- realizadas em 25/11/1999.....	75
TABELA 5.9:	Perfil 1- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 3 - realizadas em 25/11/1999.....	76
TABELA 5.10:	Perfil 2- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 1 – realizadas em 15/02/1999.....	77
TABELA 5.11:	Perfil 2- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do lodo de retorno e do monitoramento do sistema de reação 2 – realizadas em 15/02/1999.....	78
TABELA 5.12:	Perfil 2- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 3 – realizadas em 15/02/1999.....	79
TABELA 5.13:	Perfil 3- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do retorno e do monitoramento do sistema de reação 1 – realizadas em 08/03/2000.....	80
TABELA 5.14:	Perfil 3- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do retorno de lodo e do monitoramento do sistema de reação 2 - realizadas em 08/03/2000.....	81
TABELA 5.15:	Perfil 3- Valores das determinações físico-químicas da água bruta, do retorno de lodo e do monitoramento do sistema de reação 3 - realizadas em 08/03/2000.....	82
TABELA 5.16:	Valores das determinações físico-químicas dos compartimentos do sistema de reação 3 – realizadas no mês de abril de 2000.....	87
TABELA 5.17:	Valores dos ácidos orgânicos (mg/L) presentes na água bruta, no efluente e lodo do decantador primário do monitoramento realizado em de maio de 2000.....	92
TABELA 5.18:	Representação gráfica do perfil do DGGE (Figura 5.14) de todos os compartimentos de três sistemas de reação de lodos	

ativados.....	101
TABELA 5.19: Perfil da análise do DGGE, amostragem mensal (Figura 5.19)....	107
TABELA 5.20: Perfil da análise de DGGE, da amostragem semanal, do sistema de reação 1.....	112
TABELA 5.21: Perfil da análise de DGGE, da amostragem semanal, do sistema de reação 2 (Figura 5.26).....	115
TABELA 5.22: Perfil da análise de DGGE, da amostragem semanal, do sistema de reação 3 (Figura 5.28).....	117
TABELA 5.24: Perfil das bandas de DGGE, das amostras coletadas diariamente nos três sistemas de reação.....	120
TABELA B.1: Medidas da concentração de proteína e ácido nucleico dos “templates”, por espectrofotometro – Single Cell Module (BECKMAN DU ^R 530 - Life Science UV/Vis), utilizando o programa Warburg – Christian.....	148
TABELA B.2: Conteúdo em massa (g) do “pellet”/ amostra, medidas da concentração de proteínas e ácidos nucléicos presentes nos “templates”.....	150
TABELA C.1: Índice pluviométrico (mm) da Estação de Tratamento de Shibaura, Tokyo-Japão no período de janeiro a maio de 2000.....	153
TABELA D.1: Amostras coletadas no dia 25 de novembro de 1999, de todos os compartimentos dos três sistemas de reação e a condição que cada um foi submetida, os números são equivalentes as linhas da Figura 5.14.....	155
TABELA D.2: Datas das coletas da amostragem mensal e os números equivalentes as linhas da Figura 5.19.....	155
TABELA D.3: Datas e os números equivalentes as linhas da Figura 5.30, amostragem diária.....	155
TABELA D.4: Datas das coletas e os número são equivalentes as linhas das Figuras 5.24, 5.26 e 5.28, amostragem mensal.....	155
TABELA E.1: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos cinco compartimentos do sistema de reação 1, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).....	157
TABELA E.2: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs)	

	das bandas DGGE, encontradas nos cinco compartimentos do sistema de reação 2, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).....	157
TABELA E.3:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos três compartimentos do sistema de reação 3, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).....	157
TABELA E.4:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos cinco compartimentos do sistema de reação 1 e 2, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).....	157
TABELA E.5:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos compartimentos do sistema de reação 2 e 3, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).....	158
TABELA E.6:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no primeiro e último compartimento dos sistemas de reação 1, 2 e 3, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).....	158
TABELA E.7:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE encontradas nos três sistema de reação, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).....	158
TABELA E.8:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1, amostras mensais.....	158
TABELA E.9:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2, amostras mensais.....	159
TABELA E.10:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 3, amostras mensais.....	159
TABELA E.11:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1 e 2, amostras mensais.....	159
TABELA E.12:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs)	

	das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2 e 3, amostras mensais.....	159
TABELA E.13:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1, amostras semanais.....	160
TABELA E.14:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2, amostras semanais.....	160
TABELA E.15:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1, amostras semanais.....	161
TABELA E.16:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1, amostras diárias.....	161
TABELA E.17:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2, amostras diárias.....	161
TABELA E.18:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 3, amostras diárias.....	162
TABELA E.19:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1 e 2, amostras diárias.....	162
TABELA E.20:	Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2 e 3, amostras diárias.....	162

GLOSSÁRIO

Ácido nucleico: classe de molécula composta de nucleotídeos complexos (DNA e RNA);

ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) análise de restrição do DNA ribossomal amplificado

“Template” ou Molde: utilizada pela enzima como molde para síntese de novas moléculas;

“Primer”: funciona como iniciador da reação ou do alongamento da cadeia, ficando, em geral, covalentemente ligado ao produto;

Poliacrilamida: material usado na eletroforese em gel para separar misturas de macromoléculas;

Nucleotídeo: uma das unidades monoméricas a partir das quais os polímeros de DNA e RNA são formados, consistindo de uma base púrica ou pirimidíca, uma ribose e um grupo ácido fosfórico;

Oligonucleotídeo: uma sequência linear de até 20 nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster;

DNA (ácido desoxirribonucleotídeo) cadeia dupla de nucleotídeos ligados (tendo desoxirribose como açúcar);

DNAr: DNA ribossomal, qualquer região do DNA que codifica os componentes do RNA ribossomal;

FISH: fluorescente *in situ* hybridization – hibridização *in situ* com sondas fluorescentes;

PCR: *polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase; ou amplificação *in vitro* de um pedaço do DNA, resultando em várias cópias do fragmento alvo;

RDP: *Ribosomal Database Project*: Banco de dados contendo informações sobre espécies válidas dos domínios *Bacteria* e *Archaea* descritas, inclusive sequências de moléculas de RNAr.

RFLP: mapeamento por: técnica na qual os polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição são usados como loci de referência para o mapeamento em relação a genes conhecidos ou outros loci de RFLP.

Sonda: segmento definido de ácido nucléico que pode ser usado para identificar moléculas específicas de DNA portadoras de seqüência complementar, geralmente por auto-radiografia.

Gene: segmento de DNA, composto de uma região transcrita e uma seqüência reguladora, que torna possível a transcrição.

Genoma: todo complemento de material genético em um conjunto cromossômico ou um série completa de material genético, isto é, uma série completa de genes.

LISTA DE SIGLAS.

RNAr: RNA ribossomal

SDS: *sodium dodecyl sulfate*; dodecil sulfato de sódio.

PAOs: “polyphosphate accumulating organisms” - organismos acumuladores de fosfato;

GAOs: “glycogen accumulating organisms” - organismos acumuladores de glicogênio;

Poli-P: polifosfato;

EBPR: “enhanced biological phosphate removal” - remoção biológica do fósforo em excesso;

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético;

DGGE: “denaturing gradient gel electrophoresis” - eletroforese em gel de gradiente desnaturante;

UCT: “University of Cape Town”;

UASB: “upflow anaerobic sludge blanket”;

ATP: adenosina trifosfato

ADP: adenosina difosfato;

AMP: adenosina monofosfato;

TCA: ácido tricarbóxico;

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo;

CoA: coenzima A;

SRT: tempo de retenção dos sólidos;

HRT: tempo de retenção hidráulico;

RT: transcriptase reversa

PHB: polihidroxibutirato;

PHV: polihidroxivalerato;

PHA: polihidroxialcanato;

- pH:** potencial hidrogeniônico;
- DBO_T:** demanda bioquímica de oxigênio total;
- DBO_S:** demanda bioquímica de oxigênio solúvel;
- N-NH₄⁺:** concentração de nitrogênio na forma de íon amônio;
- N-NO₂⁻:** concentração de nitrogênio na forma de nitrito;
- N-NO₃⁻:** concentração de nitrogênio na forma de nitrato;
- N-NO_X:** concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito);
- P-PO₄:** concentração de fósforo na forma de fosfato;
- M-Alk:** alcalinidade
- kj-N:** NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal);
- P-T:** concentração de fósforo total;
- SS:** sólidos em suspensão;
- PO₄³⁻:** ortofosfato;

RESUMO

SAKAMOTO, I. K. Comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica do fósforo em excesso, utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). São Carlos, 2001. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

O excesso de nutrientes como nitrogênio e fósforo em efluentes de estação de tratamento de esgoto sanitário pode provocar a eutrofização nos corpos d'água receptoras. Esse processo gera efeitos negativos para a engenharia sanitária, dependendo do grau de qualidade e do uso de água requeridos. Para o abastecimento público, são exigidos métodos e processos de tratamentos avançados, quando a fonte hídrica está eutrofizada. Neste sentido, sistemas aeróbios de lodos ativados passaram a se destacar também como removedores de nutrientes por processos biológicos, após sofrerem algumas modificações operacionais. Um meio para otimizar o processo de remoção biológica do fósforo em excesso (EBPR) é promover condições ideais para o crescimento dos organismos acumuladores de fósforo. Esse trabalho teve como objetivo avaliar uma estação piloto de lodos ativados modificados, para a remoção de fósforo em excesso, utilizados no tratamento de esgoto sanitário, localizada na ETE da cidade de Tóquio – Japão. Essa estação piloto constituía-se de três sistemas de reação (1, 2 e 3), sendo que cada sistema era compartimentado e submetido às condições anaeróbia, anóxica e aeróbia. A avaliação dos três sistemas de reação, consistiu na verificação do desempenho deles com relação a DBO e fósforo e monitoramento da estrutura da comunidade microbiana, pela técnica da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). O desempenho em relação a DBOs (mg/L) nos três sistemas de reação, sempre foi superior a 90% e a eficiência da remoção do fósforo (%) na forma de fosfato ($P-PO_4$ – mg/L) foi superior, em geral, a 70%, considerando os valores de entrada das alimentações e saída no último compartimento dos três sistemas de reação. Verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana apresentou uma grande diversidade, devido aos números de bandas padrões encontradas nas amostras analisadas. Observou-se também uma grande similaridade da estrutura da comunidade microbiana nos sistemas estudados, possivelmente, relacionada ao mesmo afluente (esgoto sanitário) e ao mesmo tipo de recirculação interna e do lodo. As mudanças das estruturas das comunidades microbianas foram pequenas, diante das mudanças temporais e operacionais. No entanto, observou-se que o sistema foi menos eficiente (parâmetros de desempenho), frente a essas mudanças, o que pode estar mais relacionado à redução das atividades dos microrganismos do que com as estruturas microbianas.

Palavras-chave: sistemas de lodos ativados, remoção biológica de fósforo, estrutura microbiana, PCR-DGGE, processo de EBPR.

ABSTRACT

SAKAMOTO, I. K. Comparison of the microbial communities structure in systems of activated sludge modified for enhanced biological phosphorus removal by denaturing gradient gel electrophoresis technique (DGGE). São Carlos, 2001. Thesis (Doctorate) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP., Brazil.

The excess of nutrients such as nitrogen and phosphate in effluents of treatment plants for sanitary sewage can cause eutrophication in the receiving body of water. Given that process generates negative effects for the sanitary engineering depending on the degree of the quality and of the requested use of water. For the public provisioning, methods and processes of advanced treatments are demanded, when the water body is eutrophic. In this sense, aerobic systems of activated sludge have been expanded also to the processes of biological removal of nutrients after some operational modifications. By means of the optimization process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) will promote ideal conditions for the growth of polyphosphate accumulating organisms. This work had as its objective to evaluate a pilot station modified activated sludge, used for the treatment of sanitary sewage, but specifically for the enhanced phosphorus removal, located in the ETE of the city of Tokyo - Japan. These pilot station was constituted of three reaction systems (1, 2 and 3), and each system were composed of compartments and were submitted to anaerobic, anoxic and aerobic conditions. The evaluation of the three reaction systems, consisted of the verification of the performance of the systems with regard to BOD and phosphate which were monitored through microbial community's structure, for the biological phosphorus removal technique (DGGE). The performance in relation to the BOD_s (mg/L) in the three reaction systems was always above 90% and the efficiency of the removal of phosphorus (%) in the form of phosphate (P-PO₄ - mg/L) was in general better than 70%, considering the values of influent and effluent from the last compartment of the three reaction systems. It was verified that the microbial community structure presented a great diversity, due to the standard numbers of bands found in the analyzed samples. A great similarity of the microbial community structure was observed in the studied systems, possibly being related to the same influent (domestic sewage) and to the same type of intern recirculation and of the sludge. The changes of the microbial communities structures were small, before the temporary and operational changes. However, it was observed that the system was less efficient (performance parameters) front to those changes, what can be more related the reduction of the activities of the microorganisms than with the microbial structures.

Key words: activated sludge systems, biological phosphorus removal, microbial structure, PCR-DGGE, EBPR process.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e industrial vêm causando a deterioração da qualidade das águas devido à geração de inúmeros resíduos sólidos, líquidos e gasosos, principalmente nos centros urbanos, provocando, dessa forma, problemas relacionados à escassez dos recursos hídricos e estimulando a busca de soluções para as fontes potenciais de poluição.

Para o tratamento das águas residuárias, há uma variedade de processos biológicos, tais como: - sistemas aeróbios, por exemplo, lodos ativados (convencional), lagoa de estabilização, lagoa aerada, valo de oxidação; - sistemas anaeróbios, por exemplo, reator UASB, filtro biológico; - sistema de lodos ativados modificado para a remoção biológica de fosfato em excesso.

Segundo ALÉM SOBRINHO (1991), no Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, o tratamento do esgoto sanitário tem se limitado à remoção da matéria orgânica. Porém, normalmente, ainda permanecem no efluente das estações de tratamento alguns elementos, como fósforo e nitrogênio, que se constituem em nutrientes essenciais para o crescimento de organismos aquáticos.

O aumento da concentração de nutrientes em águas naturais, doce ou salina, decorrente de processos de intensificação do fornecimento de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo), acelera o crescimento de algas e de formas mais desenvolvidas de vegetais, com a conseqüente deterioração da qualidade das águas, em processo denominado de eutrofização. No caso de uma represa, por exemplo, níveis de fósforo total na faixa de 25 a 100 mg/m³ possibilitam a ocorrência desse processo (von SPERLING, 1997).

A eutrofização gera efeitos negativos no ambiente, como interferência no equilíbrio biológico natural e morte de organismos do meio aquático, receptor dos

nutrientes. Para a engenharia sanitária, dependendo do grau da qualidade e do uso de água, são requeridos métodos e processos de tratamentos avançados para o abastecimento público, quando a fonte hídrica está eutrofizada (SAMUDIO, 1999).

O processo de lodos ativados modificado para a remoção biológica do fósforo em excesso, passou a ser considerado uma alternativa adequada para evitar a eutrofização dos corpos d'água, receptores de lançamentos de esgotos de origem sanitária, no final da década de 1960. De acordo com MARAIS *et al. apud* ALÉM SOBRINHO (1991), o processo de lodos ativados modificado para remoção biológica de fósforo em excesso, constitui-se de uma simples modificação do processo convencional de lodos ativados, ou seja, a introdução de uma zona anaeróbia no início do sistema de tratamento, antes da zona aeróbia.

Ao longo dos anos, o processo de lodos ativados modificado recebeu a denominação de EBPR - "Enhanced Biological Phosphate Removal" (NIELSEN *et al.*, 1999). Esse processo é caracterizado, principalmente, pela circulação do lodo biológico dentro do sistema de lodos ativados, em compartimentos operados sob condições anaeróbias e aeróbias, com a introdução da água residuária afluyente no compartimento anaeróbio. Essa configuração anaeróbia-aeróbia seleciona organismos acumuladores de polifosfato (PAOs), geralmente aeróbios, que podem formar estruturas de reservas como polihidroxialcanato (PHA), polihidroxibutirato (PHB) e polifosfato (poli-P) para sobreviverem nessa condição de operação. Assim, na etapa anaeróbia, os PAOs utilizam substratos orgânicos como fontes de carbono e os armazenam na forma de PHA ou PHB, e como fonte de energia, usam o poli-P acumulado na fase aeróbia, com conseqüente liberação de ortofosfato. Na etapa aeróbia, os PAOs crescem através do metabolismo aeróbio e utilizam o ortofosfato do meio (água residuária) para recuperar o nível de poli-P durante a degradação celular de suas reservas de carbono, o PHA ou o PHB (WENTZEL *et al. apud* ALÉM SOBRINHO, 1991; HIRAIISHI & MORISHIMA, 1990; NAKAMURA *et al.*, 1991; JENKINS & TANDOI, 1991; LIU *et al.*, 1996c; MINO *et al.*, 1997 e 1998; SUDIANA *et al.*, 1998; HESSELMANN *et al.*, 2000).

Quando os PAOs são dominantes, o conteúdo de fósforo na biomassa do lodo é alto, devido a acumulação de poli-P. A operação dos sistemas de lodos ativados modificados retira a biomassa com alto conteúdo de fósforo, e assim é atingida a

EBPR. Por isso, o crescimento estável dos PAOs é essencial para a operação dos processos de EBPR.

JENKINS & TANDOI (1991) relataram, em sua revisão, que a bactéria *Acinetobacter sp* foi sempre considerada por muitos pesquisadores como a responsável primordial pela EBPR, em sistema de lodos ativados modificado, como também FUHS & CHEN; BRODISCH & JOYNER; BUCHAN; CLOETE *et al.*; SURESH *et al.*; CLOETE & STEYN; DUNCAN *et al.*; MOSTERT *et al. apud* JENKINS & TANDOI (1991). Nesses trabalhos, os autores basearam-se em análises das populações microbianas através de cultivo em placas, de NMP (Número Mais Provável) e de exames microscópicos.

Contudo, as técnicas tradicionais, como as citadas anteriormente, podem não representar a realidade da complexa comunidade microbiana em seu ambiente de origem, visto que esses métodos acabam sendo seletivos (AMANN *et al.*, 1995; SNAIDR *et al.*, 1997). Conseqüentemente, na última década, várias tentativas foram feitas para analisar a estrutura da comunidade microbiana de lodos ativados por métodos mais avançados (SNAIDR *et al.*, 1997). Dentre esses métodos, estão aqueles que empregam técnicas comuns à Biologia Molecular, que propiciaram um grande desenvolvimento nas mais diversas áreas biológicas, inclusive na microbiologia ambiental. Atualmente, é possível detectar e caracterizar bactérias em ambientes naturais e em reatores que tratam resíduos com maior facilidade e segurança. A técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), por exemplo, faz parte dessa gama de métodos, e permite monitorar as estruturas de uma comunidade microbiana em um meio, e compará-las entre si.

A proposta da presente tese de doutorado foi empregar a técnica do DGGE para analisar a estrutura da comunidade microbiana de uma estação piloto de lodos ativados modificada para remoção biológica do fósforo em excesso, localizada na Estação de Tratamento de Esgotos de Shibaura, Cidade de Tóquio, Japão.

No Japão, a remoção de fósforo, devida à existência de leis rigorosas para os níveis de nutrientes nos efluentes, é obrigatória e várias estações de tratamento de águas residuárias, utilizam o sistema EBPR (LIU *et al.*, 1996b).

A estação piloto estudada consistiu de três sistemas de reação operados em paralelo que diferiram entre si quanto ao número de compartimentos aeróbios e anaeróbios, e o tipo de alimentação. As coletas foram realizadas, inicialmente, em

todas as etapas dos três sistemas, possibilitando assim a comparação das estruturas microbianas. As demais amostragens foram feitas na última etapa, nos compartimentos aeróbios. As amostragens foram realizadas durante, aproximadamente, sete meses para a caracterização da diversidade das bactérias.

No Brasil, tem-se o conhecimento das pesquisas de ALÉM SOBRINHO (1991) e SAMUDIO (1999) sobre a remoção biológica de fósforo em excesso, em sistemas de lodos ativados modificados, alimentados, com esgotos sanitários. Outro ponto a salientar é a existência do sistema de tratamento Phoredox – da cidade de Brasília, no Distrito Federal, de importância inequívoca para a manutenção da qualidade das águas do Lago Paranoá. O sistema é operado há mais de 15 anos pela Companhia de Água e Esgoto de Brasília, CAESB, sendo o único em operação na América Latina, em escala industrial.

Em 1999, quando o presente trabalho foi proposto, estudos relacionados com a estrutura da comunidade microbiana em sistemas de lodos ativados utilizando-se a técnica DGGE eram inexistentes em nosso País. Por isso, optou-se em realizar o projeto na Universidade de Tóquio, que já vinha desenvolvendo trabalhos nessa área há algum tempo, inclusive com diferentes métodos avançados. Portanto, a parte experimental do presente doutorado foi realizada no Laboratório de Engenharia Ambiental Urbano da Universidade de Tóquio, coordenado pelo Prof. Dr. Mino Takahashi, e financiada pelo Programa JICA (Japan International Cooperation Agency).

2 - OBJETIVOS

Objetivo geral

⇒ Avaliar três sistemas diferentes de lodos ativados modificados para a remoção de fósforo em excesso e operados com esgotos sanitários sob diferentes condições, através da estrutura de suas comunidades bacterianas estudadas pela técnica da eletroforese em gel de gradiente desnaturante - DGGE.

Objetivos específicos

- ⇒ Apresentar valores dos parâmetros de desempenho e eficiência dos três sistemas de lodos ativados estudados;
- ⇒ Caracterizar e comparar a diversidade dos microrganismos em três sistemas de lodos ativados modificados, pela técnica do DGGE;
- ⇒ Verificar as alterações nas estruturas da comunidade microbiana no último compartimento, aeróbio, dos três sistemas, pela técnica do DGGE e compará-las ao longo do tempo;
- ⇒ Avaliar a eficiência da técnica DGGE para o monitoramento de comunidades microbianas em sistemas de lodos ativados modificados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

O tratamento de águas residuárias por sistemas de lodos ativados é um dos processos biotecnológicos mais importantes para o saneamento básico e ambiental. O processo envolve a produção de uma massa de microrganismos capaz de estabilizar resíduos líquidos orgânicos, sob condições, preferencialmente aeróbias.

Na década de 60, os sistemas aeróbios de lodos ativados passaram a se destacar também como removedores de nutrientes (nitrogênio e fósforo), após sofrerem algumas modificações operacionais (NIELSEN *et al*, 1999). A presença de compostos de nitrogênio e de fósforo em efluentes de estação de tratamento de esgoto, quando em concentrações elevadas resultam na eutrofização de corpos d'água receptores.

As conseqüências da eutrofização, como por exemplo a proliferação excessiva de algas, é negativa ao ambiente e, sob o ponto de vista da Engenharia Sanitária, altera a qualidade desejada para a água de abastecimento público. Nessas circunstâncias, provoca nas estações de tratamento de águas, grande quantidade de resíduos orgânicos, entupimento de filtros, toxicidade e alto consumo de cloro e, assim, maiores cuidados são necessários para a remoção de odores, cor, turbidez e principalmente das toxinas da água a ser reutilizada (SAMUDIO, 1999).

Segundo ALÉM SOBRINHO (1991) e WENTZEL *et al. apud* SAMUDIO (1999), a diminuição da concentração de fósforo em efluentes de estações de tratamento de águas residuárias evita a eutrofização do corpo aquático receptor, geralmente fonte de água para o abastecimento público. A baixa concentração de fósforo no ambiente pode limitar o crescimento de seres vivos. O nitrogênio, amplamente disponível na atmosfera, pode ser fixado por algumas espécies de bactérias e algas, que o transformam em nitrogênio assimilável para síntese celular de células procarióticas e eucarióticas. Os estudos em busca de soluções para o

lançamento em excesso de fósforo no ambiente aquático têm sido preferenciais, provavelmente devido à sua menor disponibilidade natural. O grande enfoque parece estar na compreensão da remoção do fósforo das águas residuárias por processos biológicos de lodos ativados modificados ou EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal).

3.1 - Sistema convencional de lodos ativados.

No sistema convencional de lodos ativados com fluxo contínuo, parte da matéria orgânica em suspensão dos esgotos é retirada no decantador primário. O tratamento primário integra o sistema convencional de tratamento pelo processo de lodos ativados, como apresentado no esquema da Figura 3.1 (von SPERLING, 1997).

O processo de lodos ativados pode ser definido como um sistema no qual uma massa biológica cresce e floclula, sendo continuamente recirculada e colocada em contato com a matéria orgânica do despejo líquido afluente ao sistema, na presença de oxigênio. Assim, formam-se consórcios mistos de microrganismos que transformam e removem a matéria orgânica presente nas águas residuárias (VILLAS BÔAS, 1999).

A idade do lodo (tempo de detenção celular) no sistema convencional é, usualmente, da ordem de 4 ou 8 dias, e o tempo de detenção hidráulico no reator é da ordem de 6 a 8 horas, para a estabilização de águas residuárias com teores de matéria orgânica equivalentes aos presentes nos esgotos sanitários. A biomassa excedente do sistema requer ainda uma outra etapa de estabilização, por conter um elevado teor de matéria orgânica armazenada nas células (von SPERLING, 1997).

No Brasil, os sistemas de lodos ativados são utilizados para tratar esgotos sanitários em Brasília e nos estados de São Paulo, e de Santa Catarina. Além disso, essa tecnologia é empregada para tratar os efluentes industriais de diversos setores, como alimentício, papel e celulose, petroquímico, siderúrgico, entre outros (VILLAS BÔAS, 1999).

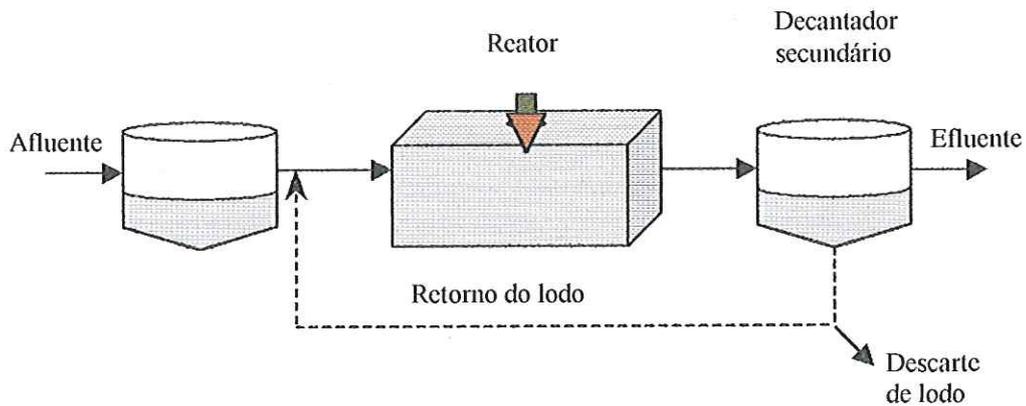


FIGURA 3.1: Fluxograma típico de um sistema de lodos ativados convencional.
Fonte: von SPERLING (1997).

3.2 - Sistemas de lodos ativados modificados para a ocorrência da remoção biológica de nitrogênio e de fósforo em excesso - EBPR.

A partir de uma extensa revisão bibliográfica realizada por ALÉM SOBRINHO (1991), verificou-se que a remoção de fósforo dos esgotos sanitários, em muitas circunstâncias, somente era possível pela utilização de processos físico-químicos aplicados ao tratamento primário e durante ou após o tratamento biológico secundário. Assim, os projetos de tratamento de esgotos sanitários que visam a remoção de elevados níveis de fósforo, até o final da década de 60, eram baseados em métodos químicos.

Os processos físico-químicos usuais para a remoção de fósforo são baseados na adição de produtos químicos, tais como sais de alumínio ou de ferro e cal hidratada. Em geral, são procedimentos adotados à montante da decantação primária ou dos efluentes da estação de tratamento (ALÉM SOBRINHO, 1991; von SPERLING, 1997).

3.2.1 – Reatores para remoção biológica de nitrogênio e fósforo em excesso.

ALÉM SOBRINHO (1991) comentou em sua revisão que, durante a década de 60, algumas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) norte-americanas apresentavam uma característica peculiar, a de remover uma maior quantidade de fósforo do meio do que a necessária para o metabolismo da massa celular presente nos sistemas de lodos ativados. Este fato desencadeou uma série intensiva de estudos sobre o possível controle da remoção de fósforos nos sistemas de lodos ativados, bem como para identificar os mecanismos envolvidos nessa remoção.

Segundo STENSEL (1991), o desenvolvimento do sistema de remoção biológica do fósforo envolveu uma seqüência de estudos abrangendo: (1) identificações das estações que apresentavam capacidade de remover fósforo e caracterização do lodo gerado no processo; (2) reconhecimento da necessidade de uma zona de contato anaeróbia anterior à zona aeróbia; (3) necessidade de excluir aceptores de elétrons contendo oxigênio livre ou acoplado na zona anaeróbia; (4) necessidade de um substrato simples na zona anaeróbia.

Em consequência dos estudos realizados, surgiram várias modificações no sistema convencional de lodos ativados, sendo as principais denominadas A^2O , Bardenpho de 5 estágios, UCT, UCT modificado e reatores de operação intermitente. A seguir, serão apresentadas algumas explicações dos sistemas citados (ALÉM SOBRINHO, 1991; METCALF& EDDY, 1991; von SPERLING, 1997).

♦ *Sistema A^2O ou Phoredox de 3 estágios*

O nome A^2O originou-se da alternância de etapas anaeróbio – anóxico - aeróbio, que constitui a linha de fluxo básica do processo. Em outros locais, essa variante tem sido denominada por Phoredox de 3 estágios (ALÉM SOBRINHO, 1991; METCALF& EDDY, 1991; von SPERLING, 1997). Nesse sistema, a remoção de nitrogênio ocorre, principalmente, através da recirculação interna da zona aeróbia para a zona anóxica. O esquema apresentado na Figura 3.2 ilustra essa condição. A alternância entre as condições anaeróbias e aeróbias, necessária para a remoção do

fósforo, é provocada pela recirculação do lodo na zona anaeróbia. O processo deve promover uma eficiente desnitrificação, a fim de evitar o retorno de nitrato à zona anaeróbia, o que desfavorece a remoção de fósforo.

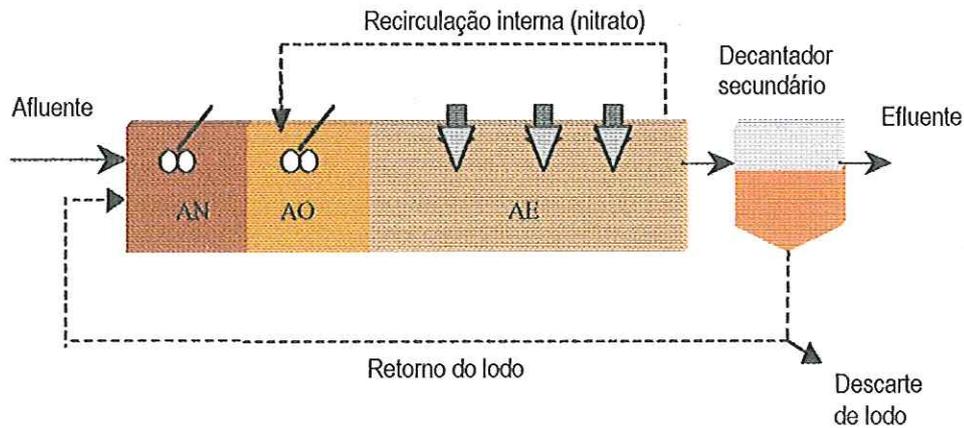


FIGURA 3.2: Fluxograma do Sistema A2O (ou Phoredox de 3 estágios).

Fonte: MARAIS *et al.* apud ALÉM SOBRINHO (1991).

♦ *Sistema Bardenpho de 5 estágios ou Phoredox de 5 estágios*

ALÉM SOBRINHO (1991) e SAMUDIO (1999) comentaram que esse sistema foi proposto por BARNARD por volta de 1976, e assemelhava-se ao sistema Bardenpho de quatro estágios, proposto, anteriormente pelo mesmo grupo. O sistema com quatro estágios compreende a ocorrência de pré-desnitrificação e pós-desnitrificação, além de uma zona de reaeração final. A eficiência de remoção de nitrogênio é bastante elevada, da ordem de 90% ou mais, uma vez que os nitratos são removidos em uma segunda zona anóxica.

Ao sistema Bardenpho de 5 estágios, acrescentou-se uma zona anaeróbia a montante da zona anóxica, para receber o lodo recirculado do decantador secundário e o esgoto afluente (Figura 3.3). Essa zona promove reações de fermentação, consumo dos substratos formados e liberação do fósforo por microrganismos

envolvidos com a EBPR. Em geral, nesse sistema, a idade do lodo é mais elevada, da ordem de 10 a 12 dias.

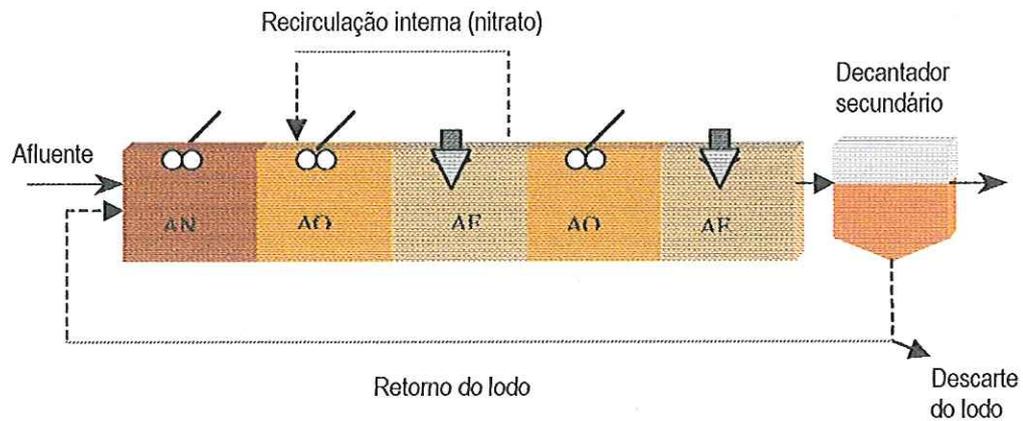


FIGURA 3.3: Fluxograma do sistema Bardenpho de 5 estágios (Phoredox).

Fonte: BARNARD *apud* ALÉM SOBRINHO (1991).

◆ *Sistema UCT (University of Cape Town)*

O processo UCT é constituído por três zonas, anaeróbia, anóxica e aeróbia. O principal aspecto que distingue o processo UCT dos demais é o fato da operação dos sistema evitar o retorno de nitrato à zona anaeróbia. Em função disso, a recirculação de lodo é direcionada à zona anóxica e não à zona anaeróbia (Figura 3.4). As recirculações internas compreendem, da zona anóxica para a anaeróbia e da zona aeróbia para a anóxica. Na zona anóxica ocorre a desnitrificação. O processo VIP (Virginia Initiative Plant) dos EUA é similar ao processo UCT (ALÉM SOBRINHO, 1991; METCALF & EDDY, 1991; von SPERLING, 1997).

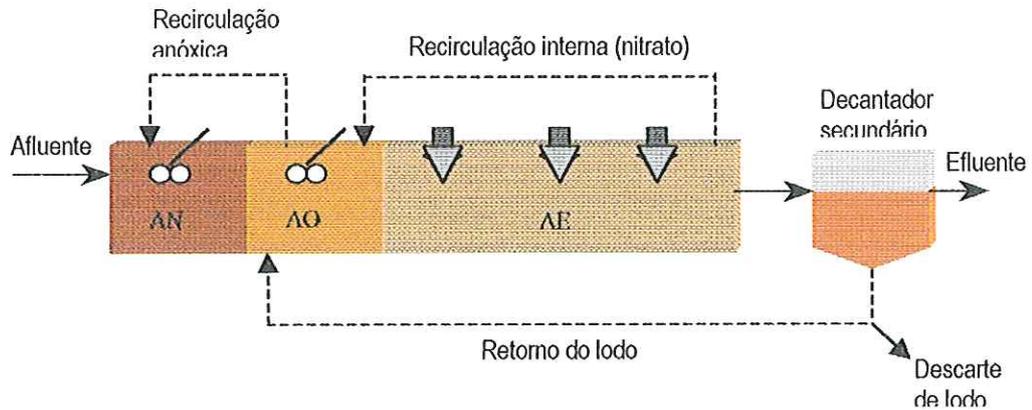


FIGURA 3.4: Fluxograma do Sistema UCT.

Fonte: MARAIS *et al.* *apud* ALÉM SOBRINHO

◆ Sistema UCT modificado

O processo UCT modificado divide a zona anóxica em duas partes. A primeira recebe o lodo de retorno e proporciona a recirculação da zona anóxica para a zona anaeróbica, sendo utilizada para reduzir nitrato da linha de recirculação de lodo. A segunda zona anóxica recebe a recirculação interna advinda da zona aeróbica, onde ocorre a maior parte da desnitrificação (Figura 3.5). Ao dividir a zona anóxica em duas partes, com recirculação do lodo da segunda, para a zona anaeróbica, evita-se que o nitrato prejudique o processo. Deve-se instalar o sistema de recirculação para a zona anaeróbica vindo de ambas as zonas anóxicas, de forma a possibilitar flexibilidade operacional do sistema, como no processo UCT ou UCT modificado (ALÉM SOBRINHO, 1991; METCALF& EDDY, 1991; von SPERLING, 1997).

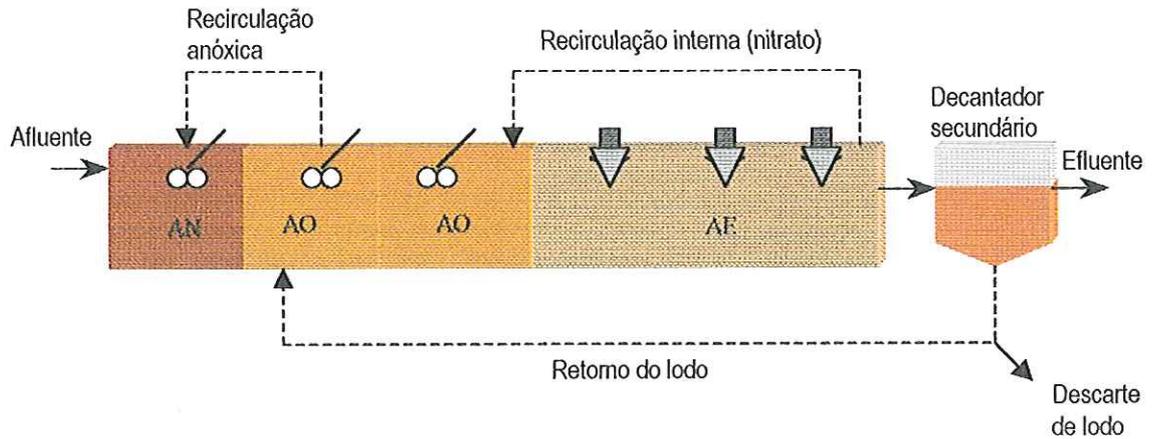


FIGURA 3.5: Fluxograma do Sistema UCT modificado.

Fonte: SIEBRITZ *et al.* apud ALÉM SOBRINHO (1991).

◆ *Reatores de operação intermitente (batelada)*

O sistema proposto é operado sob condições descontínuas (batelada), em reatores ou tanques, mantendo-se condições cíclicas. Cada ciclo é composto por uma seqüência de etapas de enchimento, reações sob condições anaeróbia, aeróbia e anóxica, sedimentação, esvaziamento e, eventualmente, de repouso (Figura 3.6). Dependendo do perfil da carga orgânica aplicada ao sistema, ao longo de um período, determina-se o número de tanques a serem operados paralelamente, cada um constituindo uma etapa distinta do ciclo.

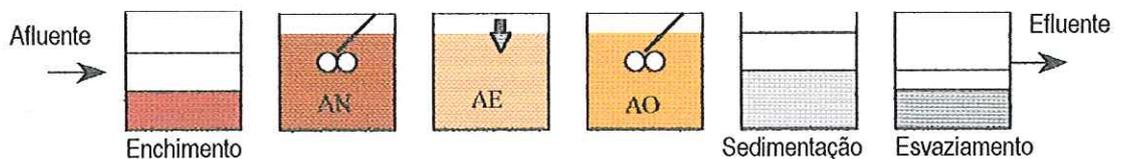


FIGURA 3.6: Fluxograma do Sistema de batelada.

Fonte: von SPERLING (1997).

Enquanto o sistema Phoredox de 5 estágios tem como objetivo uma desnitrificação eficiente, o que também induz a uma possibilidade de elevados níveis de remoção de fósforo, o sistema Phoredox de 3 estágios resulta em apenas uma

desnitrificação parcial, e portanto menos eficiência na remoção de fósforo, devido ao retorno de nitrato para o reator anaeróbio (ALÉM SOBRINHO, 1991).

O sistema UCT com três estágios procura eliminar nitrato em um reator anóxico, antes de retornar a biomassa para o reator anaeróbio, com o objetivo de garantir maior eficiência na liberação de fósforo no reator anaeróbio. Por sua vez, o sistema UCT modificado procura maior segurança quanto à desnitrificação e, conseqüentemente, evita a entrada de nitrato no reator anaeróbio (ALÉM SOBRINHO, 1991).

A Tabela 3.1 apresenta alguns comentários realizados por METCALF & EDDY (1991) sobre as vantagens e desvantagens das diferentes modificações realizadas no sistema convencional de lodos ativados para a ocorrência da remoção de fósforo e nitrogênio.

TABELA 3.1: Vantagens e desvantagens do processo de remoção do fósforo e nitrogênio.

Processos	Vantagens	Desvantagens
Sistema A ² O (Phoredox de 3 estágios)	- o lodo de descarte contém uma porcentagem relativamente alta de fósforo (3-5%) e pode ser utilizado como fertilizante; - apresenta melhor capacidade de desnitrificação do que o processo A/O, que possui estágios anaeróbios e aeróbios, projetado para desnitrificação e nitrificação	- o desempenho em condições de climas frio é instável; - mais complexo que o A/O (não possui recirculação interna)
Sistema Bardenpho de 5 estágios (Phoredox)	- a produção de lodo é a menor em relação aos demais sistemas de remoção biológica do fósforo; - o lodo de descarte contém uma porcentagem relativamente alta de fósforo e pode ser utilizado como fertilizante; - o nitrogênio total reduzido é menor em relação aos demais sistemas de remoção biológica do fósforo; - a alcalinidade é mantida no sistema, portanto, diminuindo e/ou eliminando a adição de substâncias químicas	- o gasto de energia é maior para a manutenção e recirculação interna de lodo; - incerta a necessidade de adição química; - o reator requer volume maior que o do processo A ² /O; - a capacidade do decantador primário na remoção do nitrogênio e fósforo é reduzida; - a relação de DBO/P é elevada; - o efeito da temperatura no desempenho do processo ainda não é conhecido
Sistema UCT (University of Cape Town) ou VIP	- a recirculação do nitrato para a zona anóxica reduz o requerimento de oxigênio e o consumo da alcalinidade; - a recirculação do efluente da zona anóxica para a zona anaeróbia reduz a carga de nitrato na zona aeróbia; - a remoção do fósforo ocorre depois de um ano de adaptação	- o gasto de energia é maior na manutenção e na recirculação interna; - em baixas temperaturas, diminui-se a remoção do nitrogênio
Sistema UCT modificado	- a recirculação para a zona anóxica elimina o nitrato e produz melhor remoção de fósforo na zona anaeróbia; - o volume do reator é um pouco menor que no processo Bardenpho	- o gasto de energia é maior na manutenção e na recirculação interna; - a necessidade da adição química é incerta; - a taxa de DBO/P é elevada; - o efeito da temperatura no desempenho do processo ainda não é conhecida
Reatores de operação intermitente (batelada)	- o processo é flexível na remoção de nitrogênio e fósforo; - o processo é de fácil operação; - não está sujeito a perda de sólidos biológicos	- apropriado apenas para um pequeno fluxo; - as unidades necessárias são iguais; - a qualidade do efluente depende da decantação

Fonte: METCALF& EDDY (1991).

3.3 - Fósforo para natureza e para a vida – Ciclo Biogeoquímico do fósforo.

O ciclo do fósforo é tipicamente sedimentar. As reservas de fósforo se constituem nas rochas fosfatadas originadas em remotas eras geológicas e que liberam, pouco a pouco, seus fósforos aos ecossistemas terrestres. O fósforo é um componente importante e necessário do protoplasma, tende a circular como fosfatos quando os compostos orgânicos desintegram-se, ficando, então, disponíveis às plantas. A Figura 3.7 mostra o ciclo biogeoquímico do fósforo -P (ODUM, 1988).

O fósforo inorgânico é absorvido pelos organismos autótrofos sob a forma de ortofosfato (PO_4^{3-}). Na maioria dos ecossistemas, as quantidades disponíveis de ortofosfato são muito baixas, seja no solo ou na água, e esse elemento é um fator limitante da produção biológica. Sua participação em processos fundamentais do metabolismo dos seres vivos pode ser exemplificada pelo armazenamento de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) e pela síntese da membrana celular que contém fosfolipídeos (ESTEVEES, 1988).

As principais condições que afetam o ciclo do fósforo nos ecossistemas são a sua absorção pelos vegetais, o consumo de vegetais pelos herbívoros, a excreção de fósforo pelos heterótrofos mais abundantes e sua remineralização pelos microrganismos procariontes, fungos e leveduras.

A decomposição microbiana da matéria orgânica libera o fósforo na forma de fosfato assimilável por seres autótrofos. Além disso, uma parte é arrastada pelas águas de escoamento para o mar, o que permite o desenvolvimento dos organismos aquáticos, e outra parte se perde nos sedimentos profundos (ESTEVEES, 1988).

A erosão acelerada e o processamento das rochas fosfatadas pelas indústrias de fertilizantes vêm ocasionando grandes perdas desse mineral para os sedimentos oceânicos profundos. Nos locais onde ocorrem ressurgências das águas oceânicas, esse nutriente volta a fertilizar o ciclo continental através dos excrementos das aves (guano) e da biodegradação dos seres aquáticos (ODUM, 1988).

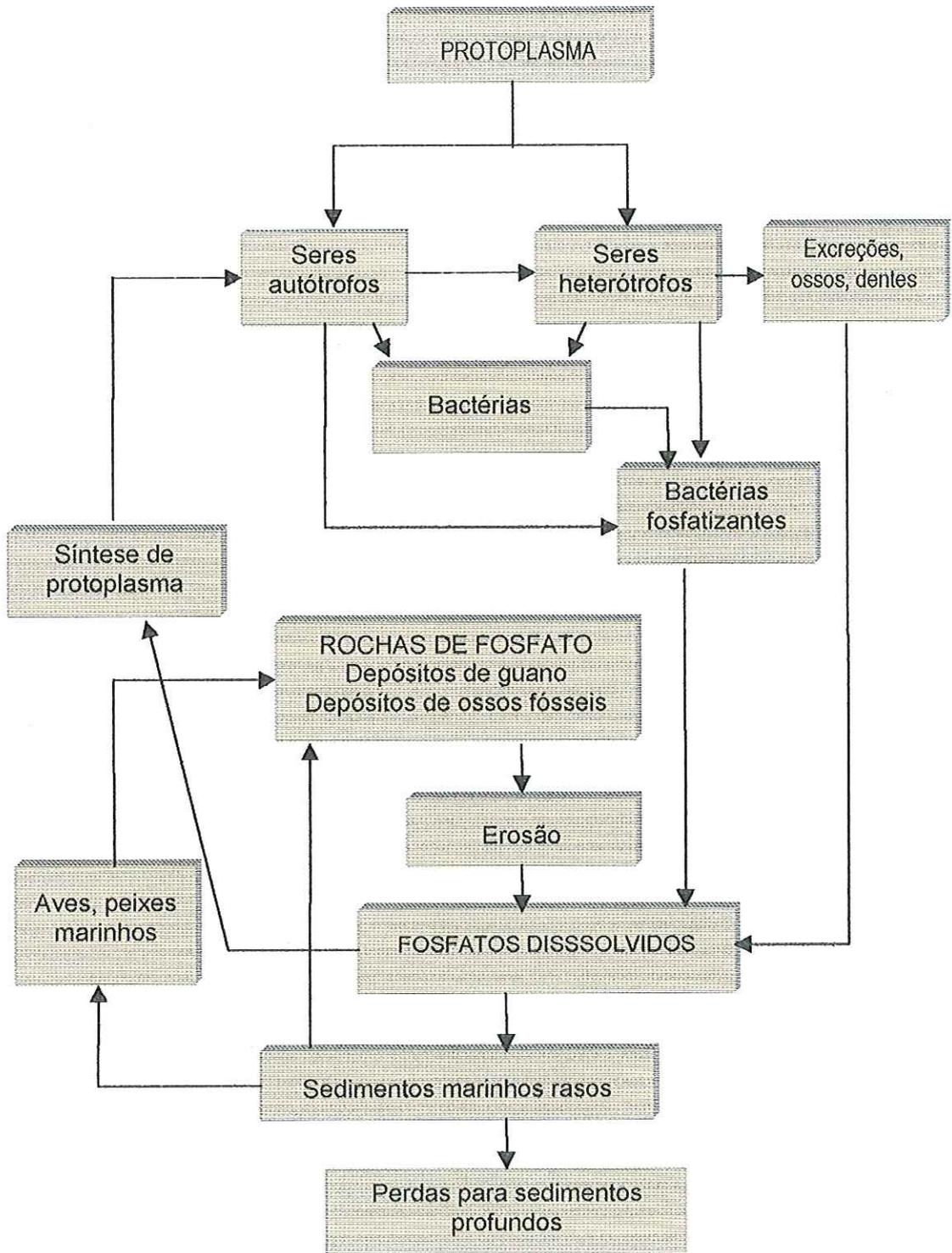


FIGURA 3.7: Ciclo do fósforo (Fonte: ODUM, 1988)

3.4 - Fundamentos da remoção biológica do fosfato em excesso.

No esgoto doméstico, o fósforo apresenta-se na forma de fosfatos ligados à matéria orgânica ou nas formas inorgânicas de ortofosfato e polifosfato. A forma predominante é o HPO_4^{2-} . Os ortofosfatos são os mais simples e incluem PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- e H_3PO_4 que estão disponíveis para o metabolismo biológico. Os polifosfatos apresentam dois ou mais átomos de fósforo e são considerados moléculas mais complexas e podem ser convertidas a ortofosfatos pelo mecanismo de hidrólise (HENZE, 1997). O fósforo orgânico através de processos de tratamento de esgotos pode ser convertido a ortofosfato através da biodegradação da matéria orgânica (von SPERLING, 1997; HENZE, 1997).

Os fosfatos suspensos são normalmente orgânicos, mas podem incluir também ortofosfatos precipitados quimicamente e polifosfatos ligados biologicamente (HENZE, 1997).

As fontes e as quantidades de fósforo nos esgotos são variadas e influenciadas pela presença de despejos industriais, cargas não pontuais e pelos detergentes. von SPERLING (1997) comentou que o detergente é o responsável pela metade da quantidade de fósforo nos esgotos domiciliares, na forma de fosfato. No esgoto bruto, a contribuição de fósforo está na faixa de 1,0 a 4,5 g/hab.dia. O valor padrão de fósforo total nos corpos d'água classes 1, 2 e 3 é de 0,025 mgP/L e o de lançamento não é estipulado pela Resolução CONAMA número 20, 18/06/86 (von SPERLING, 1997).

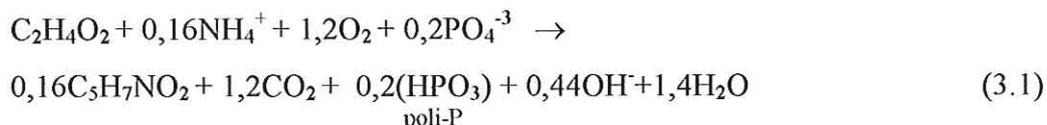
3.4.1 – Processo de remoção biológica do fósforo em excesso (EBPR).

O processo de EBPR é caracterizado principalmente pela circulação de lodos entre as etapas anaeróbia e aeróbia e pela introdução da água residuária na etapa anaeróbia, como anteriormente revisado no item 3.2.1. A configuração que emprega as etapas anaeróbia e aeróbia é responsável pela seleção dos microrganismos que acumulam poli-P através da captura de um alto conteúdo de fósforo do meio. A eficiência na remoção de fosfato é obtida com a retirada do lodo em excesso do sistema (MINO *et al.*, 1998).

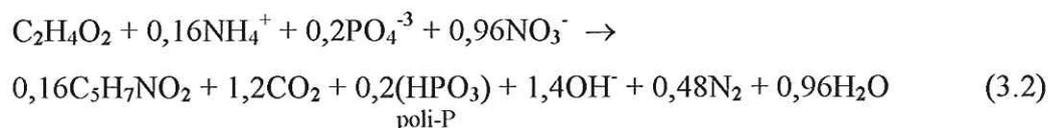
De acordo com HENZE (1997), a remoção de fósforo em excesso é um processo cíclico, através do qual os microrganismos acumulam e liberam fosfatos.

A seguir, serão apresentadas algumas reações dos fosfatos nas diferentes etapas do processo EBPR, aeróbia, anaeróbia e anóxica.

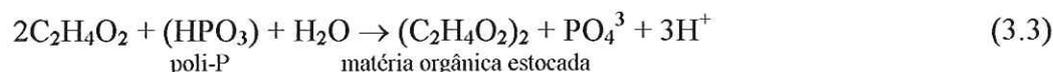
As reações de acumulação de polifosfato sob condições aeróbias podem ser representadas pela Equação 3.1.



As reações de acumulação de polifosfato sob condições anóxicas são baseadas na mesma hipótese anterior, e a reação pode ser representada de acordo com a Equação 3.2.



A degradação de polifosfato sob condições anaeróbias pode ser descrita de uma maneira simplificada, como na Equação 3.3.



Do ponto de vista metabólico, os organismos acumuladores de fosfatos (PAOs) são caracterizados, principalmente, pelas suas capacidades anaeróbias de utilizar e estocar os substratos orgânicos, retirando energia da hidrólise de poli-P armazenado, sem consumir qualquer acceptor final de elétrons.

Segundo MUNCH & KOCH, RABINOWITZ *et al.*, BARNARD e WENTZEL *et al. apud* MINO *et al.* (1998), os PAOs preferem os ácidos graxos de cadeia curta, como acético e o propiônico, e por isso é fundamental a ocorrência de fermentação, na zona anaeróbia, dos compostos presentes no afluente do sistema.

ARUN *et al.* (1988) e SATOH *et al.* (1996) verificaram que uma grande quantidade de matéria orgânica, incluindo ácidos carboxílicos, açúcares e aminoácidos, era utilizada por lodos ricos em PAOs, sob condições anaeróbias.

A importância de outras fontes diferentes de ácidos graxos de cadeia curta na proliferação dos PAOs ainda não está esclarecida. FUKASE *et al. apud* MINO *et al.*

(1998) comentaram que células presentes em um lodo EBPR consumiram glicose e armazenaram-na sob a forma de glicogênio na fase aeróbia e a liberação de fósforo foi observada na fase anaeróbia.

Quando os substratos orgânicos são utilizados anaerobiamente, normalmente são convertidos e armazenados como polihidroxibutirato (PHB). Na pesquisa de BUCHAN *apud* MINO *et al.* (1998), PHB foi considerado como o principal polímero armazenado pelas células na fase anaeróbia do processo de EBPR, constatado por exame microscópico após a coloração específica.

Segundo SATOH *et al.* (1999), os polímeros 3-hidroxibutirato e poli 3-hidroxibutirato (PHB) foram descobertos em meados de 1920. A descoberta de polihidroxialcanoato (PHA) contendo 3-hidroxialcanoatos e 3-hidroxibutirato (3HB) ocorreu em 1974. Polímeros isolados de lodos ativados continham 3-HB e 3-hidroxivalerato como componentes principais, e 3-hidroxihexanoato e, possivelmente, 3-hidroxiheptanoato como componentes menos abundantes (SATOH *et al.*, 1999). Atualmente, o polímero que desempenha um importante papel em processo de lodos ativados anaeróbio-aeróbio, é denominado de polihidroxialcanoato (PHA).

De acordo com SATOH *et al.* (1999), o polihidroxialcanoato é o polímero que desempenha importante papel nos sistemas de lodos ativados. As unidades monoméricas do PHA estão mostradas na Tabela 3.2. O acúmulo de PHA sob condições anaeróbias é uma estratégia adotada pelos PAOs para sobreviverem durante a alternância de condições impostas no processo, ou seja, anaeróbio-aeróbio.

O armazenamento celular de PHA e PHB é formada a partir do consumo de substratos orgânicos sob condições anaeróbias e a energia utilizada é o poli-P, que por sua vez é estocada em condições aeróbias (COMEAU *et al.*, 1986).

TABELA 3.2: Unidades monoméricas do polímero PHA.

Unidades	3-hidroxibutirato (3HB)	3-hidroxivalerato (3HV)	3-hidroxi-2- metilbutirato (3H3MB)	3-hidroxi-2- metilvalerato (3H2MV)
Precursores	1 acetil-CoA	1 acetil-CoA 1 propionil-CoA	1 acetil-CoA 1 propionil-CoA	1 propionil-CoA

Fonte: modificada de MINO *et al.* (1998).

SATOH *et al.* (1998) verificaram, através de experimentos com lodos contendo PAOs e alimentados com ácido glutâmico sob anaerobiose, que o consumo da fonte orgânica ocorria sem nenhuma liberação de íons amônio no meio de cultivo. O resultado indicou que o ácido glutâmico era convertido a compostos nitrogenados estocados intracelularmente, sugerindo de que a conversão do ácido glutâmico resultava na formação de um certo tipo de polipeptídeo estocado intracelularmente.

As relações entre acetato consumido e fósforo liberado no processo EBPR são diferentes entre experimentos semelhantes, como mostrado Tabela 3.3. Essa variação indica que a dependência do poli-P como fonte de energia é função do balanço entre a produção e o consumo de energia na célula. Nas primeiras pesquisas de EBPR, o poli-P foi considerado a única fonte de energia para os PAOs, sob condições anaeróbias. Atualmente, é também aceito que a utilização do glicogênio armazenado proporciona energia para os PAOs durante o consumo de substrato sob anaerobiose (MINO *et al.*, 1998).

LIU *et al.* (1996c) verificaram que a relação de fósforo:carbono igual a 20:100, resultava no acúmulo de elevado conteúdo de poli-P e utilização rápida do acetato pelos PAOs. Entretanto, quando a quantidade de fósforo foi reduzida para uma relação 2:100, ocorreu diminuição do conteúdo de poli-P nos organismos.

TABELA 3.3: Relação entre acetato consumido e fósforo liberado no processo EBPR, sob anaerobiose.

Referências	Conteúdo de P (mg P/gSST)	Liberação de P / Consumo Acetato (moles P/moles C)
FUKASE <i>et al.</i> , 1982	7,6-8,1	0,45
ARVIN & KRISTENSEN, 1985	-	0,62-0,74
FUKASE <i>et al.</i> , 1985	2,1 9,4	0 0,42
WENTZEL <i>et al.</i> , 1986	-	0,24
COMEAU <i>et al.</i> , 1987	4,1	0,7-0,8
MINO <i>et al.</i> , 1987	3,3 6,5	0,15 0,39
ARUN <i>et al.</i> , 1988	4,3-4,5	0,21-0,39
WENTZEL <i>et al.</i> , 1988	14,4-15,6	0,52-0,57
SATOH <i>et al.</i> , 1992	6,3-7,1	0,44
CECH & HARTMAN, 1993	9,6	0,4
LIU <i>et al.</i> , 1994	< 2,0	0
SMOLDERS <i>et al.</i> , 1994	7,0-7,5	0,52-1,52
MATSUO, 1994	3,0 9,4	0 0,55
LIU <i>et al.</i> , 1996	8,0 12,0	0,30-0,73 0,50-0,88
BRDJANOVIC <i>et al.</i> , 1997	-	0,35-0,50

Fonte: MINO *et al.* (1998).

Segundo MINO *et al.* (1998), os processos que consomem energia sob condições anaeróbias incluem o transporte de substratos pela célula, a conversão intracelular de substratos para PHA e a manutenção celular através de respiração endógena.

SMOLDERS *et al.* (1994) ressaltaram que o transporte de acetato para o interior da célula pode ser influenciado pelo pH, ou seja, valores baixos de pH podem resultar em uma baixa relação entre liberação de fósforo e consumo de acetato. Os autores não sugeriram um valor de pH ideal para utilização do substrato orgânico.

Posteriormente, LIU *et al.* (1996c) determinaram o efeito do pH sobre o metabolismo anaeróbio, mostrando que maior velocidade de utilização do acetato pelos PAOs ocorria em valores de pH próximos a 6,8. O pH pode ser um fator que afeta o balanço energético da utilização de substrato por PAOs em anaerobiose (SMOLDERS *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1996c).

Segundo LIU *et al.* (1996c) as bactérias envolvidas no processo EBPR podem ser classificadas em três grupos, baseados no uso das fontes de carbono, de energia, e de redutores equivalentes [NAD (P)H]: O primeiro grupo usa poli-P somente como fonte de energia para utilizar um ácido simples semelhante ao acetato e armazenar o polihidroxibutirato (PHB); NAD (P)H é necessário para a síntese do PHB que é derivado da assimilação do acetato através do ciclo incompleto do ácido tricarbóxico (TCA) (WENTZEL *et al. apud* LIU *et al.*, 1996b). Para o segundo grupo, o NAD (P)H necessário para a síntese do PHB do acetato é derivado da degradação do glicogênio celular, através da glicólise (WENTZEL *et al. apud* LIU *et al.*, 1996b). O terceiro grupo é representado por bactéria do grupo NM-1 isolado do processo EBPR. Essa bactéria utiliza o poli-P para abastecer o ATP na utilização e armazenamento da glicose como poliglicose, sob condições anaeróbias, e subsequentemente usa a poliglicose armazenada para utilizar o Pi e acumular o poli-P sob condições aeróbias (NAKAMURA *et al.*, 1991).

Existem dois caminhos que podem ser usados na conversão de glicogênio para piruvato, o de Embden-Meyerhof-Parnas (EM – via glicolítica), que produz 3 moles de ATP por mol de unidade de glicose degradada; e o caminho de Entner-Doudoroff (ED), que produz 2 moles. MAURER *et al.* (1997) utilizaram glicogênio com ¹³C marcado e verificaram que os átomos de carbono 3 e 4 do glicogênio são convertidos em carbono 4 no PHB, indicando que o glicogênio é metabolizado pelo caminho ED. Baseado nesse resultado, os autores (MAURER *et al.* 1997) consideraram que o caminho ED é o preferido pelos PAOs na utilização do glicogênio em anaerobiose.

LIU *et al. apud* LIU *et al.* (1996b) verificaram, em sistemas de lodos ativados anaeróbio-aeróbio com pouco poli-P, a utilização de acetato, o consumo de glicogênio e a acumulação do PHA, sob condições anaeróbias, indicando que o glicogênio pode ter sido a fonte de energia.

Na fase aeróbia, os PAOs crescem utilizando PHA armazenado durante a anaerobiose, utilizando-o como fontes de energia e de carbono para recuperar os níveis de glicogênio e de poli-P. Conseqüentemente, o glicogênio intracelular e o poli-P aumentam com a utilização do ortofosfato solúvel pelos PAOs.

SMOLDERS *et al.* *apud* MINO *et al.* (1998) estimaram o valor do rendimento dos PAOs em 13% abaixo da biomassa heterótrofa comum, ou seja, aparentemente os PAOs desperdiçam energia durante o metabolismo. A rápida utilização de substratos na fase anaeróbia é importante para os PAOs sobreviverem no processo de EBPR. Sabe-se que esse metabolismo é devido à presença do glicogênio e do poli-P. Por isso, a recuperação de poli-P e de glicogênio em níveis suficientes durante a fase aeróbia são fatores muito importantes para a manutenção dos PAOs no processo.

A partir de informações dos trabalhos citados, pode-se concluir que os PAOs sob condições anaeróbias, utilizam poli-P e glicogênio como fonte de energia e substrato orgânico como acetato, para formar PHA e PHB.

Como PHA é um polímero mais reduzido que o acetato, para sintetizá-lo é necessário de um potencial redutor. Segundo MINO *et al.* (1998), existem dois caminhos usados para gerar o potencial redox: - a oxidação parcial do acetato a CO₂, sob condições anaeróbias, através do ciclo do TCA, gera um potencial redox na forma de NADH, proposto em 1986 por COMEAU *et al.* (1986) e WENTZEL *et al.* *apud* MINO *et al.* (1998); e a degradação anaeróbia do glicogênio (armazenado intracelularmente) a acetyl-CoA e sua oxidação parcial a CO₂ gera o potencial redox na síntese de PHA, proposto em 1987 por MINO *et al.* *apud* MINO *et al.* (1998).

Apesar das evidências experimentais (BORDACS & CHIESA; SATOH *et al.*; SMOLDERS *et al.*; PEREIRA *et al.*, *apud* MINO *et al.* (1998) a favor do modelo de MINO, a possibilidade do funcionamento parcial do ciclo TCA não pode ser excluída (MINO *et al.*, 1998). PEREIRA *et al.* *apud* MINO *et al.* (1998) incubou acetato com ¹³C marcado em um lodo enriquecido de PAOs, sob condições anaeróbias (sem nitrato ou nitrito), e observou que uma pequena fração do carbono marcado do acetato foi liberado como CO₂. Baseados na consideração do balanço redox, concluíram que o potencial oxi-redução gerado na degradação do glicogênio observado foi insuficiente na produção de PHA. Essas informações indicam que uma

pequena fração de acetato é metabolizado através do ciclo TCA sob condições anaeróbias suprindo uma pequena parte (30%) do potencial oxi-redução para a formação do PHA.

3.4.2 – Modelos bioquímicos da remoção de fósforo.

Modelo bioquímico para a utilização dos substratos orgânicos e do fósforo, segundo WENTZEL.

WENTZEL *et al. apud* SAMUDIO (1999) propuseram um modelo bioquímico que foi fundamental para os estudos subseqüentes da remoção biológica de fósforo em sistemas de lodos ativados. Nesse modelo apresentam-se as etapas da síntese e degradação de PHB e de poli-P estudadas e descritas a seguir.

Síntese do PHB

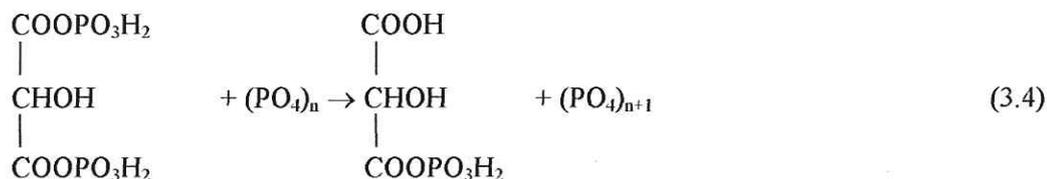
Foi verificado que a síntese de PHB pode ocorrer através da ativação de acetato para acetil-CoA, originando o composto acetoacetil-CoA, que é reduzido a hidroxibutiril-CoA, posteriormente polimerizado a PHB. O PHB serve como um estoque de prótons, elétrons e de carbono orgânico celular, portanto, a síntese de PHB é estimulada por valores elevados da relação NADH/NAD ou NADPH/NADP e pela alta concentração de acetil-CoA no citoplasma celular. A via de síntese de PHB pode ser inibida pela alta concentração de HSCoA (Coenzima A).

Degradação do PHB

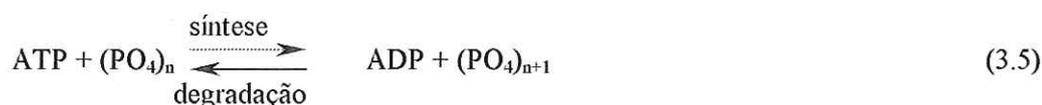
Foi verificado que a degradação de PHB dá-se através da sua hidrólise a β -hidroxibutirato, que é oxidado a aceto-acetato. Esse, por sua vez, ativa a acetoacetil-CoA formando duas moléculas de acetil-CoA. O controle dessa via de degradação dá-se pela inibição enzimática (enzima NAD- β -hidroxibutirato desidrogenase) durante a oxidação do ácido acético a aceto-acetato, provocada pela alta concentração de piruvato ou elevada relação de NADH/NAD (WENTZEL *et al apud* SAMUDIO, 1999).

Síntese do poli-P

Foram observadas duas vias metabólicas para a síntese de poli-P. A primeira, com ocorrência através da fosforilação de poli-P pelo 1,3 difosfoglicerato, como mostrado na reação 3.4:



A segunda via metabólica de síntese de poli-P foi descrita pela ocorrência da fosforilação de poli-P pelo ATP, como apresentado na reação 3.5:



A síntese de poli-P é inibida por baixos valores da relação ATP/ADP.

Degradação do poli-P.

O estudo sobre a degradação de poli-P revelou que a mesma ocorre através de três de reações, sendo a primeira a reação 3.5 inversa. A inibição dessa via dá-se por valores altos da relação ATP/ADP. A segunda via é a hidrólise de poli-P que libera fosfato livre, catalisado pela enzima polifosfatase, como mostrado na reação 3.6. Essa via metabólica é inibida pela alta concentração de fosfato celular. A terceira, é a via da fosforilação do AMP por poli-P, como apresentado na reação 3.7.



Modelo bioquímico para a utilização dos substratos orgânicos e do fósforo, segundo MINO.

De acordo com MINO *et al.* (1997 e 1998), o glicogênio armazenado nas células proporciona o equilíbrio da oxi-redução intracelular. A conversão do glicogênio para acetil-CoA e CO₂ gera um potencial redutor (metabolismo 1), enquanto que a conversão para propionil-CoA, pela via succinato-propionato, consome o potencial redutor, ou seja, os elétrons.

Os PAOs utilizam acetato e o convertem em poli-hidroxibutirato (PHB) sob condições anaeróbias. A conversão de acetil-CoA para PHB requer um potencial redutor, que é expresso por equivalentes de [H] na Figura 3.8. A conversão do glicogênio para dióxido de carbono e acetil-CoA, através da via glicolítica, gera esse potencial redutor na forma de NADH, utilizado na redução de acetil-CoA para PHB. Nesse caso, o NADH produzido na glicólise é consumido na síntese de PHB mantendo-se assim o equilíbrio no meio. A reação de glicólise via acetil-CoA para PHB ou PHA, em geral, funciona como um mecanismo para produzir um redutor necessário para a utilização de acetato, sob condições anaeróbias (MINO *et al.*, 1997 e 1998).

SATOH *et al.* (1992) mostraram que o lactato foi utilizado sob anaerobiose por um lodo contendo PAOs. Quantias significativas de 3-hidroxisvalerato (3HV) foram encontradas no PHA produzido. Uma unidade de 3HV de PHA é feita de uma molécula de acetil-CoA e uma molécula de propionil-CoA, sugerindo que deve haver um outro mecanismo específico para a produção do composto propionil-CoA.

São conhecidas duas vias para a conversão parcial do piruvato para propionil-CoA, a succinato-propionato e a da glicólise (SATOH *et al.*, 1992 e LIU *et al. apud* MINO *et al.*, 1998). Se o piruvato for metabolizado pelo caminho do succinato-propionato, o potencial redutor é consumido, confirmando assim a necessidade de degradação do glicogênio para suprir essa condição. Ocorrendo essas reações, o glicogênio é metabolizado a PHA, via propionil-CoA (MINO *et al.*, 1997 e 1998).

Através dessas reações, glicogênio pode ser metabolizado a PHA, via propionil-CoA. O principal papel das reações de glicogênio via propionil-CoA para PHA pode ser o consumo do potencial redutor (metabolismo 2). Se compostos

redutores são usados como substratos, sua conversão para PHA pode produzir um potencial redutor (MINO *et al.*, 1997 e 1998).

Combinando a degradação de glicogênio para suprir o potencial redutor, com a produção de acetil-CoA e a via succinato-propionato para o consumo dos elétrons com produção de propionil-CoA, foi desenvolvido um modelo bioquímico por MINO *et al.* (1997), para a utilização das várias fontes de carbono pelos PAOs sob anaerobiose. O conceito global do modelo bioquímico está mostrado no diagrama da Figura 3.8.

O substrato orgânico externo pode ser metabolizado a PHA, via propionil-CoA e/ou acetil-CoA, com o consumo de energia e do potencial redox (metabolismo 3). De acordo com MINO *et al.* (1997 e 1998), no processo anaeróbio-aeróbio os PAOs utilizam uma grande variedade de substratos orgânicos sob condições anaeróbias, sem perturbar o equilíbrio de oxi-redução celular. O glicogênio armazenado pode ser um regulador desse equilíbrio, desde que gere ou consuma elétrons. A energia necessária para utilizar os substratos orgânicos pode ser suprida através da degradação do poli-P.

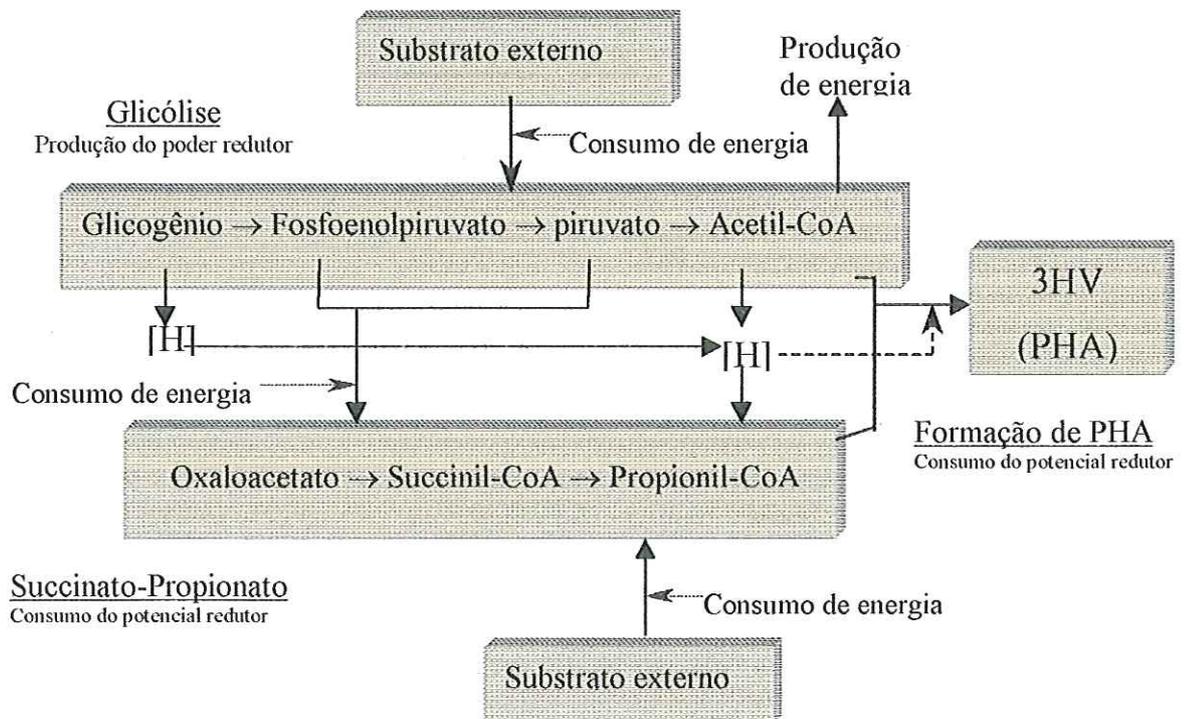
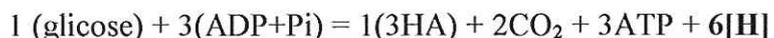


FIGURA 3.8: Modelo bioquímico conceitual da utilização anaeróbia dos substratos orgânicos e suas conversões para PHA pelos PAOs. Fonte: MINO *et al.* (1997) e MINO *et al.* (1998).

Em resumo, a estequiometria das reações metabólicas realizadas pelos PAOs, sob anaerobiose, estão apresentadas a seguir, de acordo MINO *et al.* (1997):

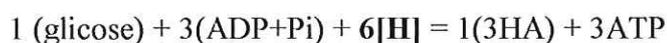
Metabolismo 1:

Conversão do glicogênio via acetil-CoA para PHA, gerando potencial redutor.



Metabolismo 2:

Conversão do glicogênio via propionil-CoA para PHA, consumindo potencial redutor



Metabolismo 3:

Utilizadores dos substratos orgânicos externos e suas conversões para PHA



Modelo bioquímico para a utilização de substratos orgânicos de fósforo, segundo HESSELMANN.

HESSELMANN *et al.* (2000) propuseram um modelo bioquímico para explicar o balanço de carbono, os potenciais de oxi-redução e de energia para a utilização dos substratos orgânicos e utilização de fósforo como organizado na Tabela 3.4. Alguns aspectos serão considerados a seguir.

Ativação e utilização do acetato consumido.

Verificou-se que a célula não necessita de energia para consumir o acetato (A1, Tabela 3.4). A ativação de acetato é realizada principalmente pela acetil-CoA sintetase (A2, Tabela 3.4). Esse resultado foi contrário a todos os apresentados nos modelos até então publicados, que afirmavam que a acetatoquinase era a enzima de ativação (COMEU *et al.*, 1986; SMOLDERS *et al.*, 1994; MINO *et al.*, 1997; WENTZEL *et al. apud* HESSELMANN *et al.*, 2000). O modelo de HESSELMANN *et al.* (2000) foi proposto com base em trabalhos experimentais.

Nessa direção, foi constatado que o acetil-CoA é dimerizado para acetoacetil-CoA, reduzido para 3-hidroxiacetyl-CoA através de NAD(P)Hs e polimerizado a

PHB (A3, Tabela 3.4). O mesmo caminho foi proposto para a formação de polihidroxivalerato (PHV) a partir de propionil e de acetil-CoA.

Utilização de glicogênio

Baseados nos resultados de medidas de ^{13}C -NMR, após alimentação com acetato marcado ^{13}C , foi observado que o glicogênio é degradado via Entner-Doudoroff, com geração de 2 moles de ATP por glicogênio convertido a piruvato. Algumas moléculas de glicogênio foram transformadas em PHB (G1, Tabela 3.4) e PHV (G2, Tabela 3.4). Acredita-se que todos os PHV são formados a partir do glicogênio. Além disso, observou-se que o glicogênio transformado em PHB não suplementou, suficientemente, com equivalentes redutores para a formação de PHB a partir de acetato (33% do requerimento). Uma parte do glicogênio é oxidada a CO_2 via ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA), para gerar hidrogênio [H] (G3, Tabela 3.4).

Utilização de poli-P e de pirofosfato

Observou-se que P liberado produziu 1 mol de ATP pela hidrólise de fósforo residual (P1, Tabela 3.4). Para permitir o fluxo completo de P_i na forma de MgHPO_4 , há dependência de um refluxo de K^+ na célula. Nesse caminho, o fluxo de cátions é neutro e 0,33 moles de ATP são ganhos com cada fósforo liberado da célula (P2, Tabela 3.4). A atividade da enzima transferase $\text{PP}_i\text{:PEP:AMP}$ foi verificada e observou-se que alguns PP_i da ativação de acetato foram usados para regenerar o ATP a partir de AMP (P3, Tabela 3.4). A utilização de PP_i é limitada pela disponibilidade de fosfoenolpiruvato gerado pela glicólise. Termodinamicamente, é possível produzir 2/3 de ATP por PP_i hidrolizado (P4, Tabela 3.4).

TABELA 3.4: Estequiometria das reações de EBPR durante a fase anaeróbia.

Reações		[H]	ATP equ ^a
A1 (acetato consumido)	4,21 [(IIAc) _{fora} → (HAc) _{dentro}]	-	-
A2 (ativação do acetato)	4,21 [HAc + ATP + HS-CoA → Acetil-S-CoA + H ₂ O + AMP + PPi]	-	-8,42
A3 (acetil-CoA para PHB)	4,21 [Acetil-S-CoA + [H] → 0,5PHB + HS-CoA]	-4,21	-
G1 (glicogênio para PHB)	0,24 [Glicogênio + 2ADP + 2Pi → PHB + 2CO ₂ + 2 ^A TP + 6[H]]	1,41	0,47
G2 (glicogênio para PHV)	0,49 [Glicogênio + 2ADP + 2Pi → PHV + CO ₂ + 2 ^A TP]	-	0,98
G3 (glicogênio para CO ₂)	0,12 [Glicogênio + 4ADP + 4Pi → 6CO ₂ + 24[H] + 4 ^A TP]	2,80	0,47
P1 (ATP do poli-P)	3,11 [Poli-P _n + AMP → poli-P _{n-1} + ADP] ^b	-	3,11
P2 (ATP do fluxo de Pi)	3,11 [(HPO ₄ ²⁻) _{dentro} + 1/3ADP + 1/3Pi → (HPO ₄ ²⁻) _{fora} + 1/3ATP]	-	1,04
P3 (ATP do PPi)	0,84 [PPi + PEP + AMP → Pi + piruvato + ATP]	-	0,84
P4 (ATP do PPi)	3,36 [PPi + 2/3ADP → 4/3Pi + 2/3ATP]	-	2,25
Total	4,21 HAc + 0,84glicogênio + 3,11Poli-P _n → 2,34PHB + 0,49PHV + 3,11Poli-P _{n-1} + 3,11Pi + 1,66CO ₂	Σ 0	Σ 0,73

Fonte: HESSELMANN *et al.* (2000); ^aATP equivalente: 1ATP → 1AMP = 2ATP_{equ.};

^bO ADP formado pode ser transformado para ATP por adenilatoquinase

Legenda: HAc, ácido acético; ATP, trifosfato de adenosina; PPi, pirofosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; Pi, ortofosfato; Poli-P, polifosfato; PHB e PHV, hidroxibutirato e valerato; ADP, difosfato de adenosina;

HESSELMANN *et al.* (2000) propuseram também um ciclo incompleto do TCA para explicar a geração de equivalentes redutores, cujos transportadores de elétrons seriam gerados por esse ciclo incompleto. A Figura 3.9 apresenta o ciclo parcial do TCA sob condições anaeróbias. O succinil-CoA acumulado é incorporado no PHV via succinato-propionato modificada, sendo o oxaloacetato reabastecido pela reação entre metilmalonil-CoA e piruvato. Os diferentes mecanismos entre o ciclo de TCA total e o parcial não mudam a estequiometria global mostrada na Tabela 3.4. No modelo proposto, o ciclo do TCA total e o caminho modificado via succinato-propionato acontecem separadamente (HESSELMANN *et al.* (2000).

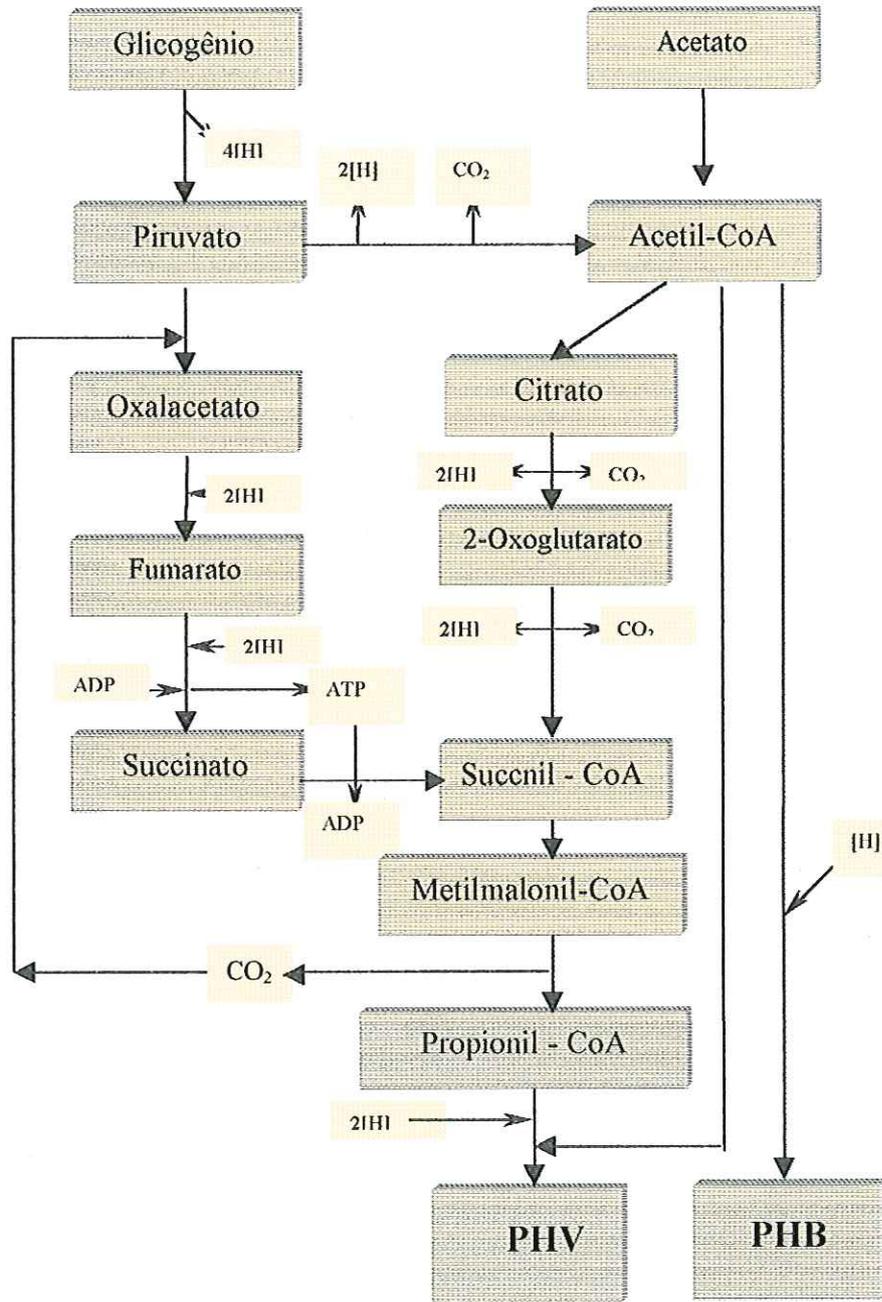


FIGURA 3.9: Esquema da operação combinada com as enzimas do ciclo de TCA e um caminho modificificado via succinato-propionato capaz de oxidar o acetil-CoA para CO₂. Nesse esquema não estão apresentadas todas as etapas intermediárias. Fonte: HESSELMANN et al. (2000).

3.5- Microbiologia do sistema de lodos ativados – ênfase aos microrganismos envolvidos na remoção biológica do fosfato em excesso.

Os microrganismos mais freqüentemente encontrados no sistema convencional de lodos ativados são representantes de bactérias, fungos, protozoários e micrometazoários. Os protozoários e micrometazoários podem ser agrupados em ciliados livre-natantes, pedunculados, flagelados, rotíferos, nematóides e anelídeos, respectivamente. Esses organismos são considerados indicadores das condições de depuração do sistema de tratamento (VAZOLLER,1989). O processo de lodos ativados apresenta também uma grande variedade de bactérias heterotróficas, como os grupos pertencentes a *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Citromonas sp.*, *Zooglea sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, entre outros gêneros que formam a microestrutura do floco, importante organização celular para o sistema de reação. Organismos filamentosos, tais como *Nocardia sp.*, *Sphaerothilus natans*, *Microthrix parvicella*, *Thiothrix sp.*, entre outras, compõem a macroestrutura do floco desenvolvido nos lodos ativados (VILLAS BÔAS, 1999).

3.5.1 - Microrganismos envolvidos nos processos de remoção biológica do fosfato em excesso (EBPR).

Para melhorar a eficiência da remoção de fósforo pela EBPR, pesquisadores dedicaram-se ao estudo sobre a diversidade microbiana envolvida no processo da remoção desse nutriente (JENKINS & TANDOI, 1991).

No início da década de 80, acreditava-se que a espécie do gênero *Acinetobacter sp* eram responsáveis pelo processo da remoção biológica de fósforo, devido ao seu predomínio em cultivos feitos para o isolamento dos tipos celulares. A Tabela 3.1, apresentada por JENKINS & TANDOI (1991), mostra alguns resultados sobre a verificação desse tipo celular em lodos, através de métodos tradicionais de cultivo. Em geral, deve-se recordar que os métodos clássicos podem isolar e identificar apenas bactérias cultiváveis nos meios artificiais empregados, sob

condições definidas. Assim, é provável que somente uma pequena porção de bactérias presentes no sistema estudado se desenvolva artificialmente.

Os estudos anteriormente citados (Tabela 3.5) revelaram que em muitos casos, as características principais dos isolados mostravam capacidade em realizar o metabolismo para o consumo de acetato e sua conversão para PHA, bem como seu armazenamento, na dependência da hidrólise de poli-P e conseqüente liberação de ortofosfato no meio, sob condições anaeróbias (JENKINS & TANDOI, 1991).

TABELA 3.5 – Referências dos artigos relacionados ao isolamento da bactéria *Acinetobacter sp* em processos de remoção biológica de fósforo em excesso.

Referências	Escala da estação.	Tipos de bactérias
FUHS & CHEN (1975)	Real	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
DEINEMA <i>et al.</i> (1980)	Piloto	<i>Acinetobacter sp.</i>
BRODISCH & JOYNER (1983)	Laboratório e Real	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Moraxela sp.</i>
BUCHAN (1983)	Laboratório e Real	<i>Acinetobacter sp.</i>
FLORENZ & HARTEMANN (1984)	Piloto	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
BRODISCH (1985)	Laboratório	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
CLOETE <i>et al.</i> (1985)	Real	<i>Acinetobacter sp.</i>
LÖTTER (1985)	Real	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i>
BECCARI <i>et al.</i> (1985)	Piloto	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i>
MENGANCK <i>et al.</i> (1985)	Laboratório	<i>Acinetobacter calcoaticus</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i>
SURESH <i>et al.</i> (1985)	Real	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i>
CLOETE & STEYN (1987)	Real	<i>Acinetobacter sp.</i>
DUNCAN <i>et al.</i> (1987)	Piloto	<i>Acinetobacter sp.</i>
MOSTERT <i>et al.</i> (1989)	Laboratório	<i>Acinetobacter sp.</i>

Fonte: JENKINS & TANDOI (1991)

MINO *et al.* (1998) demonstraram que o gênero *Acinetobacter sp.* não era o principal responsável pela EBPR, como afirmado durante anos. A partir das evidências experimentais consultadas, os autores relacionaram:

- (a) a aplicação da técnica de anticorpo fluorescente para avaliar a presença de *Acinetobacter sp* revelou (CLOET & STEYN, 1988) que o número desse gênero no processo EBPR estudado era menor que 10% do número total de

- bactérias, assim, o gênero bacteriano referido não poderia responder pelo metabolismo de EBPR constatado no sistema pesquisado;
- (b) os tipos de quinonas respiratórias dominantes nas PAOs de lodos enriquecidos foram a quinona-8 (Q-8) e menaquinona-8 (H4) (MK-8 (H4)); considerando que o gênero *Acinetobacter sp* apresentam Q-9, não se pode afirmar a ação predominante do gênero na EBPR (HIRAISHI *et al.*, 1989; HIRAISHI & MORISHIMA, 1990); [quinonas são constituintes da cadeia respiratória responsáveis pelo transporte de elétrons; o tipo de quinona pode ser específico a uma espécie, dessa forma, pela análise do perfil de quinona de uma comunidade microbiana é possível identificar as populações dominantes];
 - (c) a substância poliamina diaminopropana (DAP), usada como um biomarcador para avaliar a presença da *Acinetobacter sp.* em diferentes amostras, revelou que estações de EBPR que eliminavam fosfato eficientemente não apresentavam quase nenhuma quantidade de DAP;
 - (d) a aplicação de uma sonda de oligonucleotídeo com RNAr 16S marcado, específica para uma espécie de *Acinetobacter spp.*, mostrou que essa espécie consistia de menos que 10% do número total de bactérias presentes no lodo, ou seja, não era dominante nos processos de EBPR estudados (WAGNER *et al.*, 1994; BOND *et al.*, 1995).

As características morfológicas dos PAOs foram descritas primeiramente por FUHS e CHEN *apud* MINO *et al.* (1998), baseadas nos exames microscópicos de lodos enriquecidos por PAOs. As observações revelaram a presença de bacilos imóveis ou cocos, ambos gram-positivos, normalmente agrupados, com coloração positiva para PHB, a coloração de Neisser foi positiva para grânulos no interior da célula (WAGNER *et al.*, 1994; LIU, 1996c).

MINO *et al.* (1998) consideraram importante o isolamento de PAOs, pois a partir das culturas puras, puderam obter informações significativas sobre os aspectos microbianos e bioquímicos do processo EBPR. Além disso, recomendaram alguns aspectos para facilitar a obtenção e caracterização de PAOs, tais como:

- (a) com relação ao tempo de incubação – uma vez que o crescimento dos PAOs pode ser relativamente lento, deve-se proporcionar um tempo de incubação suficiente a fim de permitir o desenvolvimento dos microrganismos. Através de métodos tradicionais como a formação de colônias em placa de Petri em meio específico, o isolamento das culturas microbianas pode ser obtido entre 1 a 3 semanas;
- (b) com relação às atividades enzimáticas, sugeriram que as enzimas que agem sobre o substrato em anaerobiose e em conjunto com a utilização de poli-P celular podem ser induzidas, sendo que a alternância das condições anaeróbia / aeróbia é necessária para induzir o metabolismo de EBPR no isolamento das PAOs;
- (c) com relação a métodos de cultivos, recomendaram várias técnicas seletivas, por exemplo, se o objetivo for obter bactérias gram-positivas com elevado conteúdo de G+C, o tratamento com uma base pode ser aplicado para diminuir o crescimento de bactérias gram-negativas, desse modo, as bactérias gram-positivas, que possuem células com paredes mais espessas e menos sensíveis a um álcali que as bactérias gram-negativas, podem crescer preferencialmente;
- (d) com relação às condições de oxi-redução, a presença simultânea de fosfato e de fontes de carbono, têm efeitos negativos na utilização do fósforo sob condições aeróbias ou anóxicas, assim, as fontes de carbono disponíveis sob essas condições são usadas, principalmente, na formação de PHA; somente quando as fontes externas de carbono estão esgotadas, ocorre a utilização do fósforo; isto implica que as presenças simultâneas das fontes de carbono e de um acceptor final de elétrons (oxigênio, nitrato ou nitrito) devem ser evitadas.

Dos aspectos abordados, é preciso ter em mente que o tempo de crescimento das culturas que estimulam a EBPR é lento, e as enzimas responsáveis são induzidas pelas condições operacionais do sistema.

Como as características ecológicas e as interações microbianas do processo EBPR foram pouco investigadas, as limitadas informações disponíveis incluem: - a presença de bactérias fermentativas no sistema EBPR são benéficas para os PAOs,

uma vez que produzem ácidos graxos de cadeia curta (BRODISCH E JOYNER *apud* MINO *et al.*, 1998); - a existência de um modelo conceitual sobre as relações ecológicas entre redutoras de sulfato, oxidadoras de sulfato, desnitrificadores e PAOs, como proposto por YAMAMOTO-IKEMOTO *et al. apud* MINO *et al.* (1998). Finalmente, para o isolamento das PAOs pode ser importante considerar as relações interespecies, ou seja, os aspectos ecológicos das relações simbióticas ou competitivas entre PAOs e outras espécies.

Alguns PAOs são capazes de utilizar nitrato como acceptor de elétrons, sob condições anóxicas, em ausência de oxigênio livre. Nessas condições, os PAOs executam o mesmo metabolismo quando submetidos às condições aeróbias, isto é, a recuperação dos níveis do glicogênio intracelular e de poli-P, consumindo ao mesmo tempo, PHA armazenado e o ortofosfato externo. Porém, a eficiência calculada da produção de energia na presença do nitrato, expressa em termos de moles ATP/moles NADH é menor que 40% em relação ao metabolismo respiratório aeróbio (MINO *et al.*, 1998).

Shod
M
Sultra

NAKAMURA *et al.* (1991) isolaram uma bactéria acumuladora de poli-P de um processo EBPR em escala de laboratório e denominaram-na de *Microtholmus phosphovorius* cepa NM-1. Essa bactéria acumulou poli-P sob condições aeróbias, utilizando fontes de carbono como glicose e casaminoácidos, mas não acetato.

UBUKATA & TAKII (1994), ao obterem uma cultura de bactéria semelhante à anteriormente descrita por NAKAMURA *et al.* (1991), verificaram que a célula exibia atividade metabólica na utilização e acúmulo de poli-P somente após a alternância de condições, anaeróbia e aeróbia, imposta ao cultivo das células. Essa resposta denotou a existência de um sistema enzimático induzido para o metabolismo de poli-P.

WAGNER *et al.* (1994) observaram que o grupo NM-1 por eles estudado, constituía-se de células fisiologicamente similares aos PAOs, sendo bactérias gram-positivas com um elevado conteúdo de G+C, de acordo com a técnica de hibridação *in situ* (FISH). Segundo MINO *et al.* (1998), esse grupo não pode ser considerado predominante nos processos de EBPR, pois não converte acetato para PHA sob condições anaeróbias, e contém quinona do tipo Q-9. Como já observado (HIRAISHI

& MORISHITA, 1990), lodos ricos em PAOs contêm quinonas dos tipos Q-8 ou MK-8 (H4).

WAGNER *et al.* (1994) empregaram sondas de oligonucleotídeos específicas para o gênero *Acinetobacter* sp., para os grupos filogenéticos da subclasse alfa, beta e gama da classe *Proteobacteria*, para o grupo *Cytophaga-Flavobacterium* e para bactérias Gram-positivas com alto conteúdo de G+C. Verificaram que os membros da classe *Proteobacteria* pertencente a subclasse beta e a bactéria gram-positiva com alto conteúdo de G+C foram dominantes, enquanto que a *Acinetobacter* spp. constituiu-se menos que 10% das bactérias totais, como já mencionado.

BOND *et al.* (1995) utilizaram análise filogenética de 97 e 92 clones parcialmente seqüenciados obtidos de lodos removedores ou não de fósforo. Nos dois lodos, o grupo de bactérias predominante foi pertencente à subclasse beta de *Proteobacteria*, particularmente o grupo *Rhodocyclus*. Esse foi o maior representante da comunidade que removeu fósforo do meio, sugerindo que esse grupo pode ter um papel específico no processo de EBPR. Os outros grupos mais freqüentes foram representados pela subclasse alfa de *Proteobacteria*, grupo planctomiceto, e grupos *Flexibacter- Cytophaga- Bacteroides*. A elevada ocorrência da subclasse beta do grupo *Proteobacteria* também foi confirmada por WAGNER *et al.* (1994).

As técnicas da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (CHEN, 1999) e do RFLP (LIU *et al.*, 1997) revelaram que o conteúdo de 16S extraído do DNAr de lodo EBPR, continha vários fragmentos de DNA diferentes, implicando que no lodo não ocorre o predomínio de apenas um grupo de bactéria, mas sim de alguns grupos bacterianos.

SNAIDR *et al.* (1997), através da identificação *in situ*, mostraram que a presença da subclasse beta de *Proteobacteria* era maior que a subclasse alfa e gama desse grupo, sendo que o gênero *Arcobacter* sp. representava 4% na amostra de lodo ativado estudada.

NIELSEN *et al.* (1999) analisaram a diversidade microbiana de um reator alimentado com acetato e níveis alto de fosfato (razão de peso P/C, 8:100), porém sem atividade da remoção de fósforo biológico. Através da análise PCR / DGGE observaram mais de 11 bandas e as 6 mais dominantes foram isoladas e

seqüenciadas. Na análise filogenética do 16S RNAr, parcialmente seqüenciada, encontraram um grupo pertencente à subclasse alfa (*Magnetospirillum magnetotacticum*) e um outro pertencente à subclasse gama (*Legionella pneumophila*) de *Proteobacteria*, além de quatro tipos novos pertencentes à subclasse gama de *Proteobacteria*, mostrados na Figura 3.10.

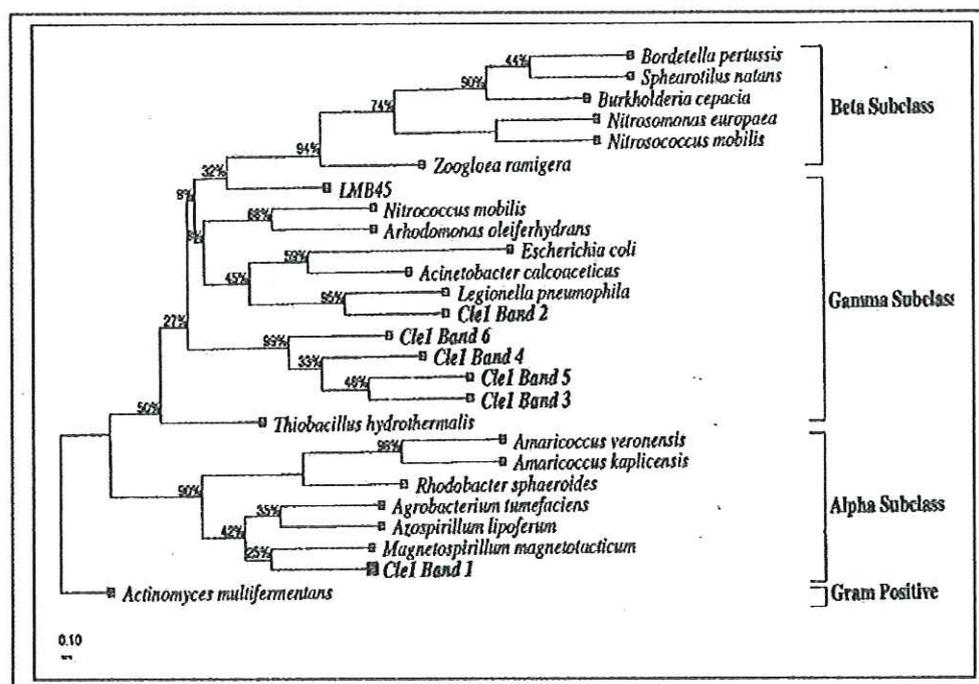


FIGURA 3.10: Árvore filogenética apresentando as seis bandas dominantes seqüenciadas por NIELSEN *et al* (1999).

LIN *et al.* (2000) estudaram a relação entre a atividade da remoção de fósforo e concentração de quinona, e características da estrutura da comunidade bacteriana e a dinâmica da população em sistema de lodo ativado (reatores seqüenciado em batelada) em escala de laboratório e verificaram que: - a atividade da remoção de fósforo em excesso foi acompanhado por um aumento de ubiquinona-9 contida no lodo ativado; - a relação entre a atividade da remoção de fósforo e conteúdos de ubiquinonas Q-9 e Q-8 do lodo ativado foi independente da matéria orgânica e o tempo de reação. Porém, a correlação entre atividade da remoção de fósforo e menaquinona variou para os diferentes substratos orgânicos (acetato de sódio, glicose, polipeptona, e extrato de levedura mais glicose) ocorrendo diferenças significantes entre o efeito de cada substrato orgânico; - a capacidade de remoção de

fósforo em excesso do lodo ativado não foi devida ao aumento na capacidade de remoção de fósforo pelos PAOs, mas sim ao aumento em suas populações.

MATSUO & KURISU (2000) avaliaram a estrutura da comunidade microbiana de 14 amostras de lodos ativados provenientes das estações de tratamento de águas residuárias do Japão, utilizando seis sondas de oligonucleotídeo através da técnica de hibridização *in situ* (FISH) e verificaram que os grupos alfa e beta de *Proteobacteria* foram predominantes em quase todas as amostras. O grupo gama de *Proteobacteria* estava presente em número menor, como verificado anteriormente por WAGNER *et al.* (1994).

A partir das informações disponíveis, pode se dizer que os PAOs são constituídos de vários grupos de organismos diferentes, com as seguintes características: - células com formato de bastonetes pequenos e cocos freqüentemente agrupados; - a coloração de Neisser é positiva; - presença de grânulos intracelular de poli-P e PHA ou PHB (SATOHI *et al.*, 1992; SUDIANA *et al.*, 1998; MINO *et al.*, 1998); - presença de quinona Q-8 ou MK-8 (H₄) (HIRASHI *et al.*, 1989; HIRASHI & MORISHIMA, 1990); - grupos de bactérias gram-positivas com elevado conteúdo de G+C, pertencente à subclasse beta de *Proteobacteria* (WAGNER *et al.*, 1994; BOND *et al.*, 1995); - sob metabolismo anaeróbio utiliza acetato e o converte a PHA ou PHB, acompanhado pela degradação do poli-P e de glicogênio, e liberação do ortofosfato; - sob metabolismo aeróbio / anóxico converte internamente PHA ou PHB em glicogênio, acumula poli-P e cresce na ausência de uma fonte de carbono externa, cuja presença pode, inclusive inibir a utilização de fosfato (MINO *et al.*, 1998).

Sistemas em escala de laboratório, podem ter a EBPR inativada. Em tais casos, predomina um tipo particular de organismos que utiliza o substrato orgânico na fase anaeróbia sem liberar P, indicando o não envolvimento de poli-P no metabolismo anaeróbio (BOND *et al.*, 1995 e LIU *et al.*, 1996b).

CECH & HARTMAN (1993) encontraram um grupo dominante no reator EBPR alimentado com glicose, onde a remoção de fósforo não ocorria, e os denominou de organismos acumuladores de glicogênio (GAOs). Os GAOs são organismos Gram-positivos, com formato similar ao das sarcinas, ocorre em grupos e diferencia-se dos PAOs porque a coloração de Neisser é positiva na parede celular.

O metabolismo dos GAOs é aparentemente muito similar ao dos PAOs, com exceção ao envolvimento de poli-P como fonte de energia sob condições anaeróbias. A diferença está no fato de que o glicogênio armazenado nos GAOs pode supri-los energeticamente (CECH & HARTMAN, 1993; MINO *et al.*, 1998).

No processo, os GAOs podem desempenhar a tarefa de reduzir a matéria orgânica solúvel e disponível sob condições anaeróbias, após a diminuição do estoque de energia do poli-P dos PAOs ou após a redução da atividade EBPR (LIU *et al.*, 1996).

LIU *et al.* (1996b) ilustraram a formação de carbono e o mecanismo de armazenamento de substratos pelos GAOs, mostrados na Figura 3.11. A célula constantemente armazena glicogênio intracelularmente (aproximadamente 25% a 50% de sua biomassa) antes de utilizar o substrato orgânico simples. LIU *et al.* (1996b) sugeriram que o glicogênio pode ser o regulador na utilização da fonte de energia. E essa fonte de energia na utilização do acetato pode ser proveniente do glicogênio (interno) ou da glicose (externo), mas a preferência é pelo uso da glicose por ser um composto menos complexo.

Aparentemente, os PAOs e os GAOs apresentam caminhos funcionais semelhantes, pois armazenam PHA sob condições anaeróbias. Como mencionado, a maior diferença está na fonte de energia. Além disso, o metabolismo do glicogênio dos GAOs é muito mais complexo e menos eficiente que o metabolismo de poli-P dos PAOs. De fato, a utilização do acetato é mais rápida por lodos ricos em PAOs do que os lodos ricos em GAOs. As informações disponíveis indicam que não existe nenhuma razão para os GAOs serem dominantes aos PAOS.

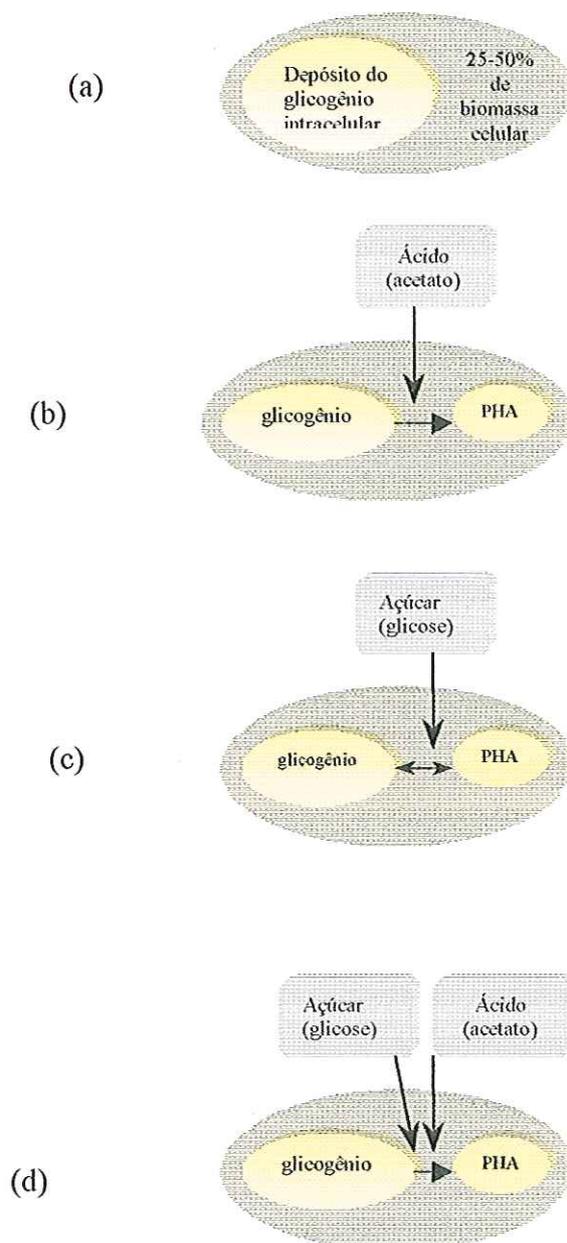


FIGURA 3.11: Mecanismos de utilização e armazenamento do substrato em condições anaeróbicas pelo lodo acumulador de glicogênio: (a) células acumuladoras de glicogênio; (b) formação de PHA a partir do ácido acético, através da utilização e do consumo de glicogênio; (c) formação de PHA e glicogênio a partir do açúcar utilizado; (d) formação de PHA a partir de açúcar e do ácido utilizados, e do glicogênio consumido (Fonte: LIU *et al.*, 1996b).

Apesar da inexistência de condições definidas para a proliferação dos GAOs, têm sido relatadas algumas razões para a proliferação dos GAOs, tais como: a presença de glicose nas águas residuárias (CECH & HARTMAN, 1993), o SRT e HRT longo (FUKASE *et al.*, 1985) e a limitação de fósforo na alimentação (LIU *et al.*, 1996b).

Segundo VAN LOOSDRECHT & HEIJNEN (1997), os microrganismos capazes de armazenar rapidamente seus substratos energéticos, consumindo-os de um modo equilibrado têm uma vantagem competitiva sobre aqueles microrganismos que não armazenam substratos.

3.6 – Métodos para o estudo microbiano de amostras complexas – ênfase na aplicação das técnicas de biologia molecular.

Numerosos estudos baseados no cultivo de microrganismos presentes em sistemas de lodos ativados foram realizados para isolar e identificar os tipos bacterianos. No entanto, como já afirmado, as técnicas tradicionais podem interferir na compreensão verdadeira da composição e estrutura de uma comunidade microbiana. Conseqüentemente, na última década, várias tentativas têm sido feitas para analisar a estrutura da comunidade microbiana de amostras de lodos ativados por práticas mais avançadas, como a detecção através de métodos moleculares (SNAIDR *et al.* 1997; AMANN *et al.* 1995).

A maioria das técnicas moleculares inicia-se com a extração dos ácidos nucleicos, DNA e RNA da comunidade microbiana (Figura 3.12). O DNA bacteriano extraído é amplificado pela reação de cadeia polimerase (PCR). O RNA pode ser amplificado usando a RT-PCR, através do qual o RNA é inicialmente transcrito dentro do DNAc pela enzima transcriptase reversa (RT), e depois amplificado pela PCR. Em ambos os casos, o resultado será uma mistura de fragmentos de DNA de membros de comunidades diferentes (MUYZER *et al.*, 1995).

Segundo AMANN *et al.* (1995), as perspectivas futuras para as técnicas de biologia molecular são as seguintes: (a) com o seqüenciamento de DNAr e RNAr os microbiologistas terão a possibilidade de identificar, isolar e caracterizar novos organismos, com respeito a estudos de filogenia e fisiologia. (b) poderá auxiliar no

cultivo de bactérias não cultiváveis; (c) os microrganismos poderão ser estudados em seus nichos, possibilitando correlações entre a composição da comunidade, a relação espacial de membros diferentes e o funcionamento das populações. Essas informações serão importantes para o entendimento das relações simbióticas e também para o entendimento da maioria dos ciclos biogeoquímicos.

As primeiras análises para caracterizar amostras ambientais por esses métodos foram realizadas com o emprego da extração da molécula RNAr 5S, pertencente a várias amostras de diferentes comunidades. No entanto, as informações contidas nas moléculas RNAr 5S, com aproximadamente 120 nucleotídeos, são limitadas devido ao pequeno tamanho da molécula. O RNAr 16S apresenta em torno de 1500 nucleotídeos e o RNAr 23S tem cerca de 3000 nucleotídeos, gerando informações mais adequadas à análise filogenética. A molécula mais utilizada atualmente é a do gene RNAr 16S, inclusive centenas de suas seqüências têm sido determinadas e armazenadas em bases de dados (AMANN *et al.*, 1995).

MUYZER *et al.* (1995) consideraram, em princípio, que todo gene pode ser usado como um marcador molecular. No entanto, o gene RNAr tem algumas vantagens: (a) estão presentes em todos os organismos conhecidos; (b) apresentam regiões conservativas e variáveis, que tornam possível verificar em geral como sítio específico para sondas ou "primers" para PCR; (c) apresentam seqüências com informações suficientes para serem usadas como marcadores filogenéticos; (d) é uma macromolécula celular dominante; (e) os genes não são transferidos horizontalmente entre as espécies. Além disso, o gene RNAr 16S pode ser sequenciado de outro gene RNA ou DNA ribossomal, embora o número das moléculas RNAr 16S seja maior durante o crescimento celular do que o gene correspondente DNAr. Atualmente, é mais comum sequenciar as regiões conservativas do DNAr (CHEN, 1999).

A adaptação da reação da cadeia polimerase - PCR nos estudos de microbiologia ambiental aumentaram as chances em detectar genótipos de menor abundância em uma mistura complexa de DNA. A PCR tem sido usada para detectar os microrganismos em diversos ambientes, inclusive é possível sequenciar o gene RNAr 16S de espécies presentes em uma população mista, sem a necessidade de isolar culturas (CHEN, 1999).

A tecnologia do PCR, de acordo com BOWMAN & SAYLER (1996) possibilitou a derivação de várias técnicas, como o uso de fase sólida do PCR, através da qual as seqüências escolhidas são imobilizadas em um filtro e depois amplificadas. A vantagem desse procedimento é que essas seqüências podem ser amplificadas várias vezes, com a remoção do “primer” entre as ampliações, através da lavagem a altas temperaturas, a amplificação do DNA por impressão digital (DAF) e pela técnica DNA polimórfica amplificado ao acaso (RAPD). Essa técnica utiliza vários “primers” para amplificar as amostras de DNA aleatoriamente; após a eletroforese várias bandas são observadas, com as características de uma impressão digital. A PCR foi adaptada também para análise direta de amostras de DNA ambientais usando o DGGE (Figura 3.12).

As técnicas em Biologia Molecular oferecem novas oportunidades para análises da estrutura e da composição da comunidade microbiana. Em particular, a variação da seqüência do RNAr tem sido usada para inferir a relação filogenética entre os microrganismos e as sondas de nucleotídeos específicas para a detecção da taxa microbiana em ambientes naturais. Estas técnicas têm sido aplicadas também para determinar a diversidade genética da comunidade microbiana e identificar vários microrganismos não cultiváveis em laboratório (MUYZER *et al.* 1993; AMANN *et al.* 1995).

A caracterização molecular da comunidade microbiana pode ser realizada por diversas rotas ou técnicas, conforme o esquema mostrado na Figura 3.12. Recentemente, a microautoradiografia foi executada juntamente com hibridação *in situ* com RNAr de sonda com oligonucleotídeo para estudar as funções fisiológicas *in situ* de certos microrganismos (NIELSEN *et al.*, 1999).

A Figura 3.12 apresenta alguns caminhos que podem ser usados para identificar ou caracterizar a comunidade microbiana num determinado ambiente, através do método da biologia molecular. A extração dos ácidos nucleicos, pode ser realizada a partir de amostras de células cultivadas ou não cultivadas, esta última utilizada no presente trabalho. Após extração, os ácidos nucleicos são amplificados diretamente pelo PCR ou passam por uma transcrição dentro do DNAr, pela enzima transcriptase reversa (RT), antes de serem amplificados pelos PCR. A partir da amplificação dos ácidos nucleicos para avaliar a comunidade microbiana podem ser

utilizadas três técnicas: - a do DGGE, usada neste trabalho, devido à facilidade que oferece na comparação entre diversas estruturas de comunidades microbianas e que será explicada em detalhes posteriormente; - a do T-RFLP, em que os produtos de DNAr amplificados são digeridos com uma enzima de restrição, com quatro pares de bases identificadas e os produtos amplificados são marcados com corante fluorescente em um dos terminais; - e a da clonagem, em que o 16S DNAr individual é separado dos outros e colocado em uma célula hospedeira de tipo específico, como por exemplo, a *Escherichia coli*, e que passa a ser conhecido como um “clone”. Para a identificação as técnicas do DGGE e da clonagem, exigem a realização de seqüenciamento, seguida por uma análise comparativa com a Base de Dados, enquanto com a técnica do T-RFLP, pode resultar em identificação direta.

As rotas indicadas pelas setas tracejadas na Figura 3.12, indicam as hibridizações *in situ*. Esta técnica necessita de sondas de oligonucleotídeos específicos, o que dificulta sua aplicação, devido à inexistência de sondas específicas para todas as bactérias.

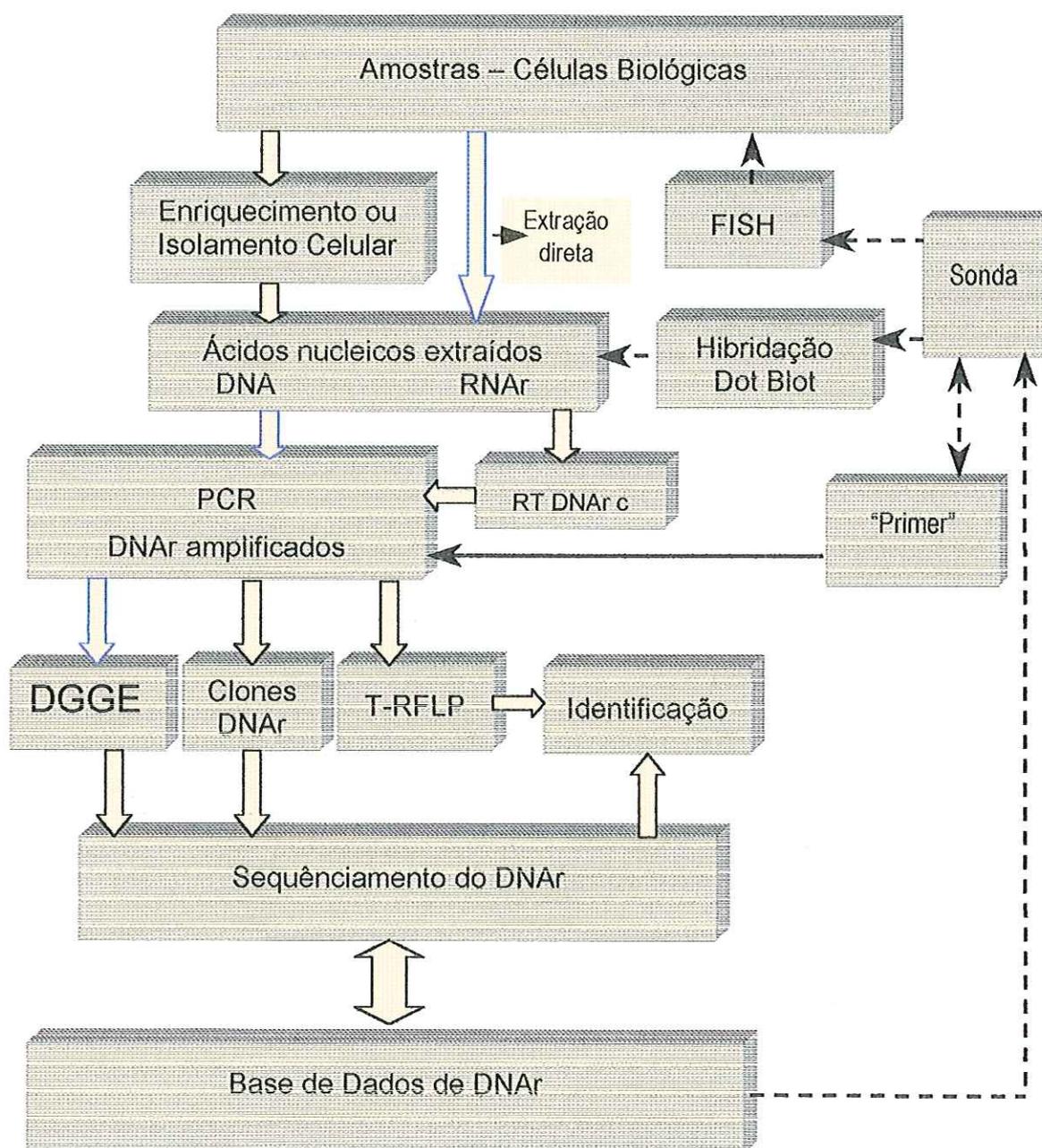


FIGURA 3.12: As diferentes possibilidades para caracterizar as amostras ambientais através da análise comparativa de seqüências do rRNA. As setas em azul indicam os caminhos utilizados no presente trabalho para avaliar a estrutura da comunidade microbiana (adaptado de AMANN *et al.*, 1995).

A técnica do DGGE consiste na separação dos fragmentos do DNA de mesmo comprimento, mas com seqüências diferentes. A separação está baseada no decréscimo da mobilidade eletroforética da dupla hélice da molécula DNA

parcialmente fundida no gel poliacrilamida contendo gradiente linear de desnaturantes (mistura de uréia e formamida) (MUYZER *et al.*, 1993).

A desnaturação parcial causa a migração pela metade a uma única posição, formando uma discreta banda no gel. A banda individual pode ser cortada para realizar o seqüenciamento dos nucleotídeos. Cada banda pode representar uma população microbiana (FERRIS *et al.*, 1996).

A técnica do DGGE segundo CHEN (1999); FERRIS & WARD (1997); FERRIS *et al.* (1996); MUYZER *et al.* (1993); MUYZER & RAMSING (1995) permite: (a) estimar a diversidade bacteriana, inclusive os grupos não cultiváveis; (b) analisar a composição e diversidade genética, sem a necessidade do cultivo individual; (c) identificar a bactéria e verificar o perfil da estrutura da comunidade bacteriana complexa no ambiente; (d) informar a estrutura da comunidade; (e) comparar um grande número de amostras no mesmo gel, facilitando assim a análise.

MUYZER *et al.* (1993) utilizaram fragmento do RNAr amplificado pela PCR e separado pelo DGGE para verificar o perfil das populações microbianas complexas em amostras de sedimentos marinhos e biofilmes obtidos em reatores de estação de águas residuárias. Na análise do DGGE obtiveram acima de 10 bandas diferentes, resultado que indica a presença de diferentes comunidades microbianas. Através da análise do DGGE é possível identificar constituintes que representam 1 % da população microbiana total.

FERRIS *et al.* (1996) amplificaram por PCR e separaram por DGGE o gene RNAr 16S fragmentado, para analisar a distribuição das populações microbianas em regiões com diferentes temperaturas (48 °C -72 °C). Amostras coletadas em locais com mesma temperatura, a análise do DGGE revelou perfil semelhante das bandas no gel, indicando a presença de populações bacterianas similares. Entretanto, a análise das amostras coletadas em locais com temperaturas diferentes revelou diversidade variável. A partir do seqüenciamento de bandas individuais foram verificadas as presenças de duas populações de cianobactérias e uma de bactérias verdes não sulfurosas

No trabalho seguinte, FERRIS & WARD (1997) utilizaram o DGGE para avaliar a distribuição da população bacteriana, ao longo de um gradiente termal, por um período de um ano. Verificaram que a distribuição espacial das populações

bacterianas foram definidas de acordo com a temperatura e observaram também que as variações termais provocaram uma leve mudança nas populações.

FERRIS *et al.* (1997) realizaram estudo com o objetivo de explicar os eventos de sucessão e perturbação de uma comunidade microbiana através do DGGE. Os resultados mostraram que após a remoção de camadas de cianobactérias, ocorreu a formação de uma nova camada de populações microbianas diferentes das anteriores cultivadas em conjunto com os organismos fotossintetizantes.

NIELSEN *et al.* (1999) utilizaram fragmentos de DNA amplificados por PCR e separados por DGGE para analisar a diversidade microbiana de um lodo proveniente de um reator EBPR. Encontraram onze tipos diferentes de seqüências, sendo seis predominantes.

CHEN (1999), aplicando PCR e DGGE para analisar o perfil de uma população microbiana em processos EBPR, encontrou dois fragmentos de seqüências dominantes. A partir de análise filogenética comparativa sugeriu que um deles pertencia ao grupo bacteriano *Cytophaga*. Os outros fragmentos encontrados estavam associados à subclasse beta de *Proteobacteria*. Também observou que esses fragmentos predominavam durante o período de remoção de fósforo.

A técnica do DGGE e o RFLP revelaram que o DNAr 16s extraído do lodo EBPR continha vários e diferentes fragmentos de DNA, implicando que no lodo não predominava apenas um grupo de bactéria (BRDJANOVIC *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1997b; LIU *et al.*, 1997).

MINO *et al.* (2000) monitoraram a estrutura da comunidade bacteriana do processo EBPR usando DGGE e observaram que a estrutura da comunidade microbiana era complexa devido à presença de inúmeras bandas. Durante uma análise semanal completa, a estrutura da comunidade bacteriana presente foi muito similar, mas após um mês de operação do sistema, as amostras diferiram significativamente.

A aplicação da técnica do DGGE no monitoramento das comunidades microbianas em geral tem sido considerada promissora por muitos pesquisadores (MUYZER *et al.*, 1993; FERRIS *et al.*, 1996; FERRIS & WARD, 1997; NIELSEN *et al.*, 1999; CHEN, 1999; MINO *et al.*, 2000). No entanto, trabalhos relacionados

com as comunidades bacterianas presentes, principalmente em processos EBPR ainda são escassos.

Apesar das vantagens e eficiência da metodologia molecular, é preciso lembrar que para realizar um estudo metabólico, fisiológico será necessário empregar técnicas tradicionais de cultivo e isolamento. Inclusive, para aumentar o banco de dados das seqüências genômicas.

3.7 - Limitações do Método de Biologia Molecular

Embora as técnicas de Biologia Molecular apresentem bons resultados para a análise de comunidades microbianas complexas, MUYZER & RAMSING (1995) comentaram que ainda existem alguns problemas a serem superados. É necessário que a técnica para extração dos ácidos nucleicos, seja confiável e reprodutível para que a real diversidade genética em ambientes naturais, possa ser determinada.

A amplificação através do PCR, apesar de ser o método mais adequado para que a seqüência do RNAr da comunidade microbiana ou de culturas puras possam ser obtidas, pode apresentar problemas quando aplicada em comunidades microbianas complexas, como citado por WINTZINGERODE *et al.* (1997). Os problemas comuns da técnica de PCR são apresentadas a seguir: (a) inibição da amplificação pelo PCR devido à presença de contaminantes co-extraídos com o DNA - por exemplo, substâncias húmicas podem dificultar a atividade da enzima polimerase; (b) amplificação diferencial - o "template" de uma comunidade complexa constitui-se de uma mistura de moléculas homólogas. Para obter uma amplificação eficiente é necessário que essas moléculas sejam igualmente acessíveis na hidratação com o "primer". Um exemplo de amplificação diferencial é a variação da composição de G+C do "primer", pois gene contendo elevado G+C é mais difícil de ser desnaturado, diferenciando-se assim dos genes com baixo G+C. (c) formação de artefatos nos produtos do PCR, é um risco potencial nas análises da microbiota complexa, sugerindo a existência de organismos que não existem em amostras naturais, o artefato mais relatado é a formação de "chimeras" entre duas moléculas homólogas diferentes. AMANN *et al.* (1995), citaram esse problema como a maior



dificuldade em recuperar a seqüência do DNA durante a amplificação do gene pelo PCR.

Na separação dos fragmentos dos genes por DGGE, é necessário realizar um estudo de padronização, para encontrar as melhores condições para as amostras em estudo, como por exemplo, o tempo de corrida e a concentração do gradiente desnaturante do gel, proporcionando assim uma melhor separação das bandas.

3.8 – Cálculo para análise do perfil das bandas padrões do DGGE.

CURTIS *et al.* (1998) usaram a análise de grupo da matriz de similaridade de Jaccard para comparar o perfil das bandas padrões de DGGE de diferentes estações de lodos ativados utilizados no tratamento de águas residuárias. O dedrograma foi construído unindo dois pontos, neste agrupamento a maioria eram de locais semelhantes. Estes foram combinados pela sucessão dos agrupamentos de todos os locais semelhantes.

GILLAN *et al.* (1998) utilizaram um método mais fácil para analisar os perfis das bandas padrões do DGGE das amostras de biofilmes presentes sobre os bivalves. O biofilme foi comparado entre eles e com os outros usando duas amostras. O cálculo do coeficiente de similaridade C_s (equação 1) foi realizado pela seguinte equação:

$$C_s = 2J / (a+b) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

a = o número de bandas do DGGE no biofilme 1;

b = o número de bandas do DGGE no biofilme 2;

J = o número de bandas comuns do DGGE.

Dois perfis de DGGE idêntica tem o valor de C_s de 100%, e dois perfis completamente diferente tem o valor de C_s de 0%. No entanto, esta equação não considera a intensidade das bandas de DGGE como um fator variável.

KURISU *et al.* (2000) utilizaram o índice de dissimilaridade (equação 2) que considera a intensidade das bandas para compará-las entre si. A intensidade das bandas fluorescentes foi quantificada usando o ImagequaNT ferramenta produzida

com o Fluorimager 595, em que a taxa da intensidade da banda e a soma da intensidade de todas as bandas nas amostras, foram definidas como “intensidade relativa das bandas”. Bandas que possuíam a mesma localização em diferentes amostras, foram consideradas com mesma seqüência. No cálculo do coeficiente de dissimilaridade KURISU *et al.* (2000) adaptaram a equação de HIRASHI *et al.*, para a análise da banda padrão de DGGE, e realizou-se conforme a equação (2):

$$D(i,j) = 1/2 \sum |x_{ik} - x_{jk}| \quad (2)$$

Onde :

$$\sum x_{ik} = \sum x_{jk} = 1$$

x_{ik} ; x_{jk} são relativas as intensidade das bandas k , nas amostras i e j respectivamente.

Se um banda aparecer somente em uma amostra, a intensidade relativa da outra banda é considerada como zero.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Descrição da Estação Piloto - sistema de lodos ativados modificados – ETE Shibaura, Tóquio, Japão.

O sistema modificado de lodos ativados da estação piloto para remoção biológica do fósforo, estudada no presente trabalho, tem a capacidade de tratar efluentes municipais com uma vazão de até 24 m³/d, com um tempo de detenção hidráulico de 12h e de retenção de sólidos entre 8,04 d a 10,73 d. A água residuária doméstica era proveniente de áreas comercial e residencial, próximas à estação de tratamento municipal de águas residuárias de Tóquio- Japão.

A Figura 4.1 mostra um esquema da planta piloto de lodos ativados, onde pode-se observar a disposição dos três sistemas de reação em paralelo e o número de compartimentos de cada um. Além disso, indica a localização dos decantadores primário e secundário. A estação piloto consistiu de 3 sistemas de reação operados em paralelo, individualmente, esquematizados na Figura 4.2, cujas diferenças foram:

- Sistema de reação 1 - consistiu de 5 compartimentos, cada um submetido às seguintes etapas sequenciais:- anaeróbia (an); - anóxica (ao); - aeróbia (ae); - anóxica (ao); - aeróbia (ae). A alimentação foi escalonada, com efluente do decantador primário sendo introduzido em dois compartimentos, o anaeróbio e no primeiro aeróbio. Lodo proveniente do decantador primário era também introduzido no compartimento anaeróbio. O retorno do lodo do decantador secundário era feito no compartimento anaeróbio, e uma parte do conteúdo do segundo compartimento aeróbio era recirculado para o primeiro compartimento anóxico (Figura 4.2);
- Sistema de reação 2 – consistiu de 5 compartimentos intercalados, submetidos às mesmas condições que o sistema de reação 1. A alimentação era escalonada, com

o mesmo efluente do decantador primário como do sistema de reação 1, porém sem a introdução de lodo proveniente do decantador primário. O retorno do lodo do decantador secundário e a recirculação interna eram realizados da mesma forma que no sistema de reação 1;

- Sistema de reação 3 – consistiu de 3 compartimentos intercalados, com as seguintes condições: - anaeróbia; - anóxica; - aeróbia. A alimentação era feita apenas com efluente do decantador primário no compartimento anaeróbio. O retorno do lodo do decantador secundário era realizado no compartimento anaeróbio, e parte do conteúdo do compartimento aeróbio era recirculado para o compartimento anóxico (Figura 4.2).

Os compartimentos sob condições anaeróbias e anóxicas eram de mistura completa; na etapa aeróbia, a mistura foi realizada por aeração difusa.

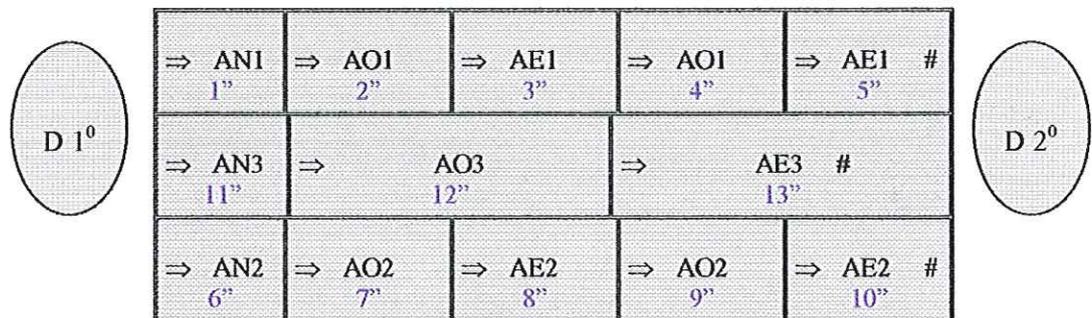


FIGURA 4.1: Esquema da planta piloto de lodos ativados modificados para EBPR situada na Estação Municipal de Tratamento de Águas Residuárias de Tóquio, Japão. (AN anaeróbio; AO anóxico; AE aeróbio; 1 sistema de reação 1; 2 sistema de reação 2; 3 sistema de reação 3; # ponto de coleta ; D 1^o - decantador primário; D 2^o - decantador secundário; os números de 1'' a 13'' referem-se aos números dos compartimentos).

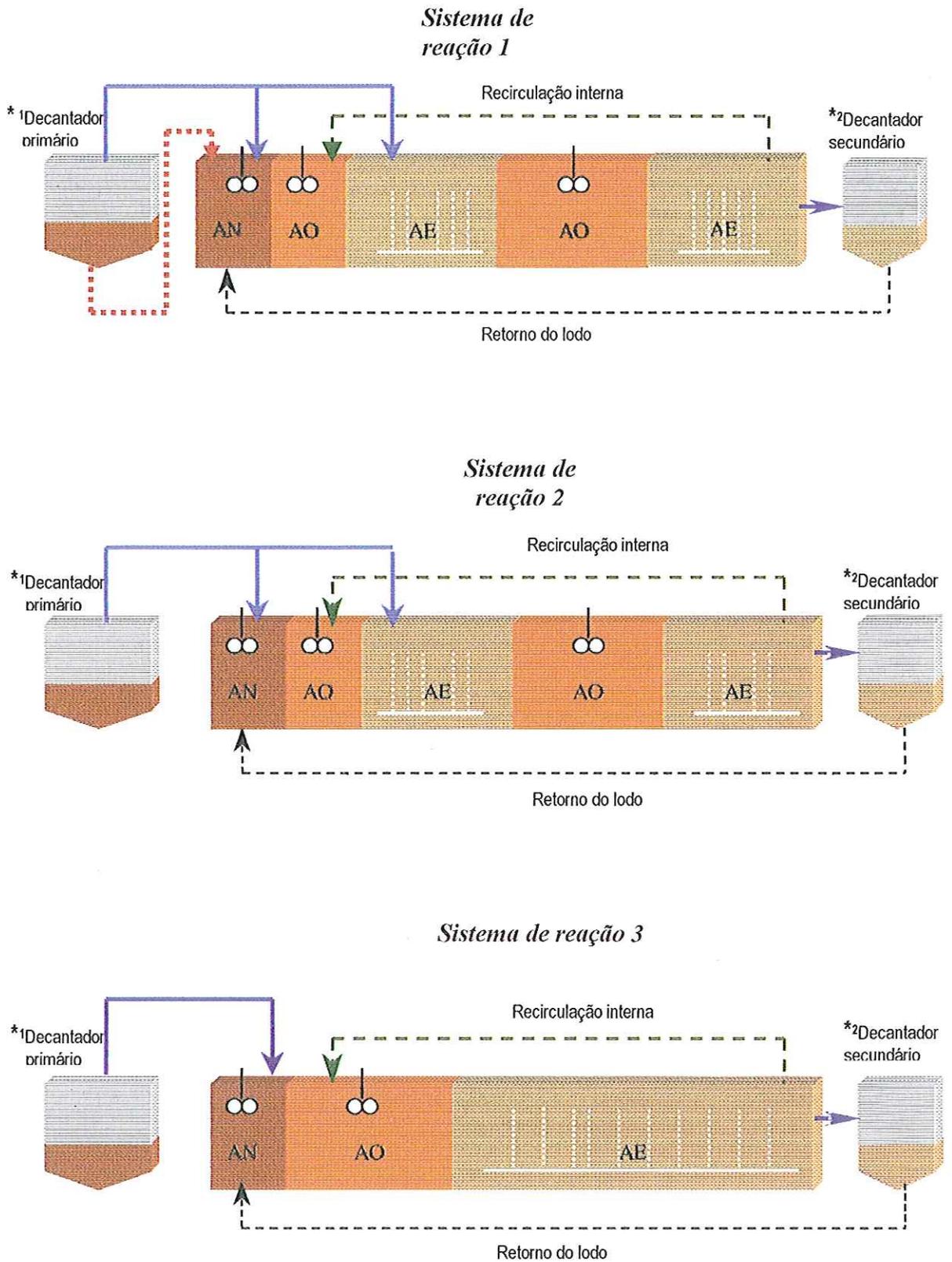


FIGURA 4.2: Esquema dos 3 sistemas de reação da estação piloto de lodos ativados modificada, apresentando as condições de operação dos compartimentos.
 Legenda: AN anaeróbio; AO anóxico; AE aeróbio; *¹ mesmo decantador primário nos três sistemas de reação; *² mesmo decantador secundário nos três sistemas de reação.

4.2 - Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas para a caracterização do afluyente (água bruta) e do monitoramento dos sistemas de lodos ativados foram realizadas pela equipe de operação da Estação Municipal de Tratamento de Águas Residuárias de Shibaura, da Cidade de Tóquio, Japão. Os resultados foram gentilmente cedidos para compor a presente tese de doutorado. Os procedimentos utilizados seguiram o APHA (1995) e os protocolos da própria estação de tratamento. Os parâmetros analisados foram pH; DBO_T , DBO_S , N-NH_4^+ , N-NO_2 , N-NO_3 , N-NO_x , P-PO_4^{3-} , M-Alk, N- Kj, P_T , SS e níveis de ácido acético. As águas de entrada nos sistemas denominadas águas brutas 1, 2 e 3 corresponderam às alimentações efetuadas durante a operação dos sistemas. No capítulo Resultados e Discussão estão apresentadas as formas de alimentação de cada sistema de reação.

4.3 – Amostragens para a avaliação microbiana

Na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana, a primeira coleta das amostras foi realizada, em todas as etapas dos 3 sistemas de reação, no dia 25 de novembro de 1999. As coletas seguintes foram feitas na última etapa aeróbia (Figuras 4.1 e 4.2) dos sistemas de reação.

Para a verificação de uma possível alteração na estrutura da comunidade microbiana, foram utilizadas amostras coletadas na última etapa aeróbia, realizadas diariamente, semanalmente e mensalmente, de acordo com a Tabela 4.1, sendo que a diária foi referente às temperaturas mais frias do ano, no mês de fevereiro.

A temperatura ambiente nos dias das coletas das amostras foram: - no outono, de 12 °C a 17 °C; - no inverno de 7 °C a 15 °C; - na primavera de 18 °C a 24 °C.

A Tabela 4.1 apresenta as datas e as estações do ano em que foram realizadas as coletas das amostras, para a avaliação da estrutura da comunidade microbiana presente no sistema de lodos ativados modificados.

TABELA 4.1: Datas das amostragens na avaliação da estrutura da comunidade microbiana.

Mês	Dia	Estação do ano
Novembro de 1999	25 (Perfil 1)	Outono
Dezembro de 1999	02, 09, 15, 22, 28 (Perfil A)	Outono e Inverno
Janeiro de 2000	07, 13 (Perfil B)	Inverno
Fevereiro de 2000	04, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29 (Perfil 2)	Inverno
Março de 2000	01, 02, 03, 30 (Perfil 3)	Inverno e Primavera
Abril de 2000	12, 20, 27 (Perfil C)	Primavera
Mai de 2000	01, 08, 11 (Perfil D)	Primavera

Perfil 1 - referente a condição dos compartimentos dos 3 sistemas de reação na época da coleta;

Perfil 2 e 3 - referente a condição dos 3 sistemas de reação na época da coleta;

Perfil A, B, C e D – não foi determinado.

As amostras foram coletadas superficialmente e estavam em constante mistura provocada pela aeração difusa. Devido à profundidade do tanque, utilizou-se um frasco de plástico de aproximadamente um litro para auxiliar na coleta das amostras. Essas eram transferidas para tubos de centrífuga de ± 35 mL e transportados em isopor mantido refrigerado com gelo até o laboratório. A duração do percurso era de aproximadamente uma hora e trinta minutos.

No laboratório, as amostras foram lavadas e preservadas de acordo com KURISU & ONUKI (1999) e CHEN (1999). O procedimento será descrito a seguir.

4.3.1 - Preservação das amostras

As amostras de lodos ativados foram lavadas de acordo com o procedimento descrito a seguir:

- 1- Adicionou-se 1,0 mL da amostra nos tubos de centrífuga ($\pm 2,0$ mL), previamente esterilizados;
- 2- Centrifugou-se os tubos com as amostras por 5 minutos a 15000 rpm; (TOMY MX-150 High Speed Refrigerated – Micro Centrifuge).
- 3- Retirou-se o sobrenadante com auxílio de uma pipeta automática;
- 4- Adicionou-se 1 mL de solução tampão TE (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA – pH 8,0);

- 5- Ressuspendeu-se o pellet sob agitação manual, com movimento de ± 45 graus;
- 6- Centrifugou-se novamente por 5 minutos a 15000 rpm; (TOMY MX-150 High Speed Refrigerated – Micro Centrifuge).
- 7- Retirou-se o sobrenadante;
- 8- Armazenou-se o “pellet” a -20°C

4.3.2 - Estudo de padronização das condições para a análise do DGGE.

O estudo de padronização foi realizado para encontrar as melhores condições para análise através de DGGE, da amostra em estudo, e consistiu nos seguintes:

- a) tempo de “corrida” e concentração do gel para DGGE - testou-se o tempo de 270 minutos com gel na concentração de 30%-60% de gradiente desnaturante, 330 minutos com gel na concentração de 35%-55% e optou-se pelo tempo de corrida de 330 minutos, por proporcionar melhor separação das bandas, como pode ser visto na Figura A-1 (no anexo A). A concentração de 30%-60%, escolhida, agrupava melhor as bandas, facilitando assim a visualização da estrutura da comunidade microbiana, como mostra a Figura A-2 (no anexo A).
- b) número de ciclos, na amplificação do gene – testou-se ciclos de 25, 30 e 35, utilizando-se tempo de corrida de 330 minutos e concentração do gel de 30%-60% de gradiente desnaturante a fim de encontrar aquele que resultaria em bons resultados com a técnica de DGGE. Escolheu-se o ciclo de 35, que conferiu melhor nitidez às bandas, como apresentado na Figura A-3 (no anexo A).
- c) diluições das amostras (ácido nucleico + proteína + impurezas) – as amostras foram submetidas as três diluições de 10, 20 e 30 vezes. Com esse teste verificou-se resultados semelhantes, ou seja, não foi possível detectar nenhuma diferença entre as diluições, como mostra a Figura A-4 (anexo A).

A partir desse estudo de padronização, para as análises das amostras, foram utilizadas as seguintes condições: “tempo de corrida” do gel: 330 minutos; concentrações das solução de gel de gradiente desnaturante: 30% e 60 %; número de ciclos para amplificação do gene: 35; diluições das “amostras”: 30 vezes.

4.3.3 - Escolha da amostra de acordo com a relação de ácido nucleico e proteína, na análise do PCR-DGGE.

As amostras coletadas foram separadas por centrifugação (5 minutos), em triplicatas, lavadas, e armazenadas a -20°C . Após o armazenamento por 1 semana, realizou-se a extração do ácido nucleico e mediu-se as concentrações de proteína e de ácido nucleico, por espectrofotometria (Single Cell Module BECKMAN DU^R 530 - Life Science UV/Vis), utilizando-se o programa Warburg-Christian, em $3\ \mu\text{l}$ do produto da extração do ácido nucleico acrescidos de $87\ \mu\text{l}$ de água Milli-Q, ou seja, em volumes totais sempre iguais a $90\ \mu\text{l}$.

Inicialmente, as concentrações de proteína e de ácido nucleico foram determinadas em triplicata, mas a partir da amostra 33, passou-se a analisar apenas uma amostra. Medidas das concentrações de proteína e de ácido nucleico foram realizadas em todas as amostras utilizadas na análise de PCR/DGGE. Para um melhor entendimento das relações entre essas medidas podem ser observados exemplos na Tabela B-2 (no anexo B). As massas das amostras (“pellets”) foram obtidas em gramas – úmido.

A importância dessa determinação prévia é que, a partir da relação da taxa do comprimento de onda de 260 a 280nm, foram escolhidas amostras que apresentavam relações proteína/ácido nucleico entre 1,80 - 2,00. Essa faixa, segundo ONUKI (comunicação pessoal, 1999) resultava em melhor análise de PCR/DGGE.

As etapas experimentais na análise da estrutura da comunidade microbiana utilizando a técnica do PCR/DGGE estão apresentadas na Figura 4.3, na forma de diagrama. Em seguida são apresentados os procedimentos de cada etapa. Os métodos para a extração dos ácidos nucleicos foram realizadas conforme ZHU *et al.* (1993), e a amplificação do gene por PCR, o teste em agarose gel eletroforético e a separação do fragmento do ácido nucleico por DGGE foram feitos de acordo com MUYZER *et al* (1993); LIU *et al* (1997); KURISU & ONUKI (1999).

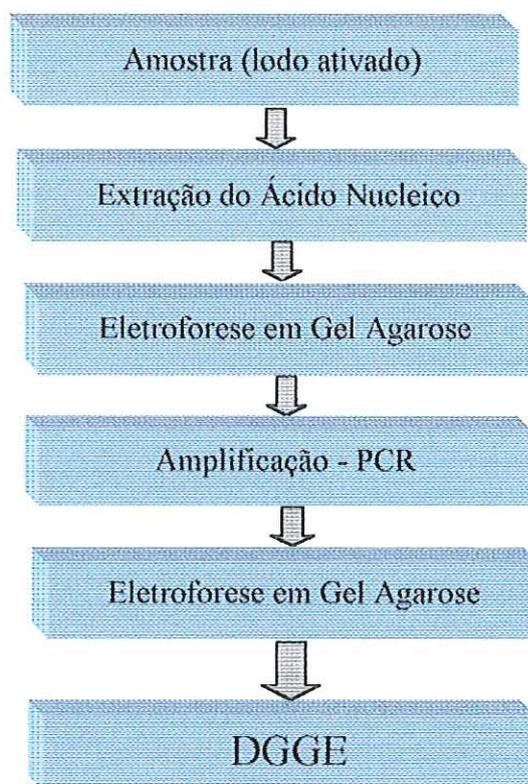


FIGURA 4.3: Procedimento geral para a análise da estrutura da comunidade microbiana.

4.3.4 - Extração dos ácidos nucleicos

O procedimento para a extração do ácido nucleico, será apresentado em itens a seguir:

1. Pesou-se alíquotas entre 0,010 a 0,050g de amostra em tubos de centrifuga (2,0 mL);
2. Adicionou-se os seguintes reagentes e homogeneizou-se após cada adição:
 - 250 µl tampão de extração (100 mM Tris/HCl; 40 mM EDTA – pH 9);
 - 50 µl de 10 % dodecil sulfato de sódio (SDS);
 - 150 µl de cloreto de benzila*;
3. Incubou-se a 50⁰C, por 30 minutos, em banho-maria, com agitação;
4. Homogeneizou-se de 3 em 3 minutos, manualmente, com movimentos de ± 45 graus;

5. Adicionou-se 150 µl de solução 3M acetato de sódio (NaOAc – pH 5,2) e homogeneizou-se;
6. Incubou-se em gelo por 15 minutos;
7. Centrifugou-se a 15000 rpm, a 4^oC, por 10 minutos (TOMY MX-150 High Speed Refrigerated – Micro Centrifuge).
8. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo “eppendorf” (1,7 mL);
9. Ao sobrenadante adicionou-se ≅ 400 µl de álcool isopropílico, para precipitar o DNA;
10. Centrifugou-se a 15000 rpm, a 4^oC, por 10 minutos (TOMY MX-150 High Speed Refrigerated – Micro Centrifuge).
11. Descartou-se o sobrenadante;
12. Enxaguou-se o “pellet” adicionando-se 1,0 mL de etanol a 70%;
13. Centrifugou-se a 15000 rpm, a 4^oC, por 2 minutos (TOMY MX-150 High Speed Refrigerated – Micro Centrifuge).
14. Removeu-se todo o sobrenadante;
15. Secou-se o pellet no refrigerador a vácuo, por 3 minutos;
16. Adicionou-se 100 µl de tampão TE, para dissolver o pellet;
17. Armazenou-se no freezer a –20^oC.

Verificou-se o resultado da extração do DNA, através do teste de agarose, descrito no item 4.6.

* Reagente tóxico – utilizou-se luvas, e a manipulação foi feita dentro de capela.

4.3.5 - Amplificação do gene através da reação da cadeia polimerase (PCR).

Utilizou-se o “primer” complementar para a região conservativa na amplificação do fragmento de 193bp do DNAr correspondente aos nucleotídeos 341 a 534 na sequência *E.coli* (MUZYER *et al.*, 1993). A sequência do nucleotídeo primer “forward”, é específico para Eubacteria (357f; 5’CCTACGGGAGGCAGCAG-3’), no final do 5’constitui-se de um grampo (clamp) GC de 40pb (357fGC; 5’CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG 3’) para estabilizar no procedimento da fusão do fragmento de DNA ((MUZYER *et al.*,

1993). A seqüência universal foi usado o “primer” reversa (518r; 5’ATTACCGCGGCTGCTGG 3’). O tamanho total do fragmento com o grampo é de 233-bp. A Figura 4.4 apresenta um esquema da amplificação da região do DNAr amplificado por PCR, considerando-se a posição 341 e 534 como “primer” 1 e 2, e o grampo (clamp) como “primer” 3.

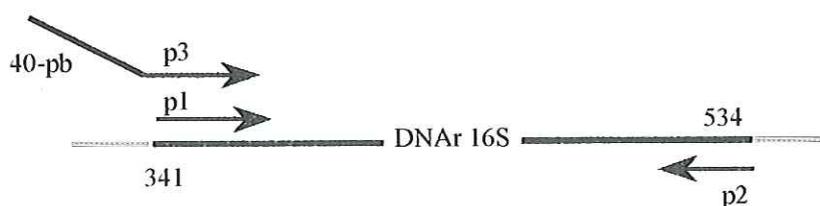


FIGURA 4.4: Esquema da amplificação do fragmento do DNAr por PCR.

Fonte: MUZYER *et al.* (1993).

O procedimento para a amplificação de genes será apresentado nos itens a seguir:

- 1- O procedimento para o preparo da mistura de PCR para uma amostra está apresentada na Tabela 4.2.

TABELA 4.2: Procedimento para o preparo da solução de PCR para uma amostra.

Nº de Amostra	dH ₂ O	10 x Tampão PCR (1,5mM MgCl ₂)	DNTP (2mMcada)	Primer forward (100 pmol/l)	Primer reverse (100 pmol/l)	AmpliTaq Gold kit (5 U/µl)
1	78,1µL	10µL	10µL	0,2µL	0,2µL	0,5µL

- no preparo da solução usou-se tubos eppendorf (0,2 mL: 0,5 mL ou 1,5 mL);
- adicionou-se as soluções de volumes maiores (exceto a enzima – Taq polimerase),
- após cada adição de uma solução, misturou-se com auxílio de micropipeta,
- adicionou-se Taq polimerase,

Observação: o volume preparado de solução de PCR foi o adequado à quantidade de amostra

- 2- Usou-se controles positivo e negativo;
- 3- Transferiu-se 99 µL da solução de PCR para tubos eppendorf de 0,20 mL;

- 4- Adicionou-se 1,0 μ L da solução de ácidos nucleicos, misturou-se com auxílio de micropipeta;
- 5- Colocou-se os tubos no termociclador (Gene Amp. 9600 – PCR system) para a amplificação;
- 6- As condições de amplificação dos genes estão mostradas na Tabela 4.3.

TABELA 4.3: Condições usadas na programação do aparelho para a amplificação dos fragmentos de ácidos nucleicos, por PCR.

Desnaturação	Nº de ciclos	Anelamento	Alongamento	Final do alongamento
95°C 10 minutos	35	94°C 30 segundos	53°C 30 Segundos	72°C 10 Segundos

4.3.6 - Agarose em gel eletroforético utilizada para avaliar o produto resultante da extração do ácido nucleico e da amplificação do gene por PCR.

Essa etapa experimental tem por objetivo verificar se a técnica de extração do ácido nucleico e a amplificação, estão sendo eficazes. O procedimento experimental é o mesmo, diferindo apenas na concentração de agarose e no marcador, ou seja, para verificar o produto do ácido nucleico, a concentração de agarose é de 1% e o marcador é λ Hind III fragment, enquanto que para avaliar o produto da amplificação por PCR a concentração de agarose é de 4% e o marcador utilizado é ϕ K 174 HAE III digest. O procedimento dessa etapa experimental será apresentado a seguir, em itens:

- 1- Preparou-se as soluções 1% ou 4%, de agarose mais solução tampão TAE X 1;
- 2- Preparou-se a “bandeja,” colando fita crepe dos lados;
- 3- Despejou-se o gel na “bandeja” em seguida colocou-se o “pente”, para formar as cavidades (poços);
- 4- Esperou-se 30 minutos para o gel solidificar;
- 5- Retirou-se o “pente” e a fita crepe;

- 6- Preparou-se a amostra no parafilme usando 5,0 µL de extrato de ácido nucleico ou produto do PCR com 1,0 µL de loading dye;
- 7- Misturou-se bem a amostra com auxílio de uma pipeta automática;
- 8- Transferiu-se as amostras nas “cavidades” do gel;
- 9- Colocou-se a bandeja no aparelho (Mini-sub-cell GT-Bio Rad) e submergiu-se em tampão TAE X 1;
- 10- Utilizou-se o aparelho (Mini-sub-cell GT-Bio Rad) com programação de 100 V constante; por 15 ou 20 minutos;
- 11- Transferiu-se o gel numa vasilha com brometo de etídio* com auxílio de uma espátula e deixou-se por 15 minutos;
- 12- Lavou-se o gel em outra vasilha, com água Milli-Q, por 5 minutos;
- 13- Colocou-se na câmara de transiluminador UV;
- 14- Observou-se sob exposição a 254 nm UV.
- 15- Imprimiu-se o resultado ou copiou-se em disquete.

Observação: * Brometo de etídio é uma substância cancerígena, assim o reagente foi manipulado sempre com luva e muito cuidado.

4.3.7 - Separação dos fragmentos dos genes amplificados por PCR utilizando a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

Essa análise tem por objetivo separar os fragmentos do ácido nucleico amplificado por PCR. A separação desses fragmentos é de acordo com o grau de desnaturação, ou seja, se há uma desnaturação parcial ocorre a formação de uma banda localizada no meio do gel (MUYZER *et al.*, 1993). Como marcadores (controles positivos), foram utilizados *Acinetobacter calcoaceticus* (A.c.) ; *Cytophaga aquatilis* (C.c.); *Escherichia coli* (E.c.); *Ralstonia eutropha* (R.e.). O controle negativo foi feito apenas com a solução sem marcadores. O procedimento dessa análise é apresentado a seguir, em itens:

- 1- Preparou-se a solução do gel na concentração desejada. No presente trabalho, utilizaram-se soluções de concentrações 0%, 30% e 60%, preparadas de acordo com a Tabela 4.8.

- Dissolveu-se a uréia nos reagentes líquidos e completou-se o volume até 100mL. com água Milli-Q
- Filtrou-se a solução usando-se uma membrana de porosidade de 0,2µm;
- Antes de utilizar as soluções, retirou-se o gás usando-se um respirador com agitação conectado a bomba de vácuo por 5 minutos.

TABELA 4.4: Procedimentos para o preparo da solução do gel gradiente desnaturante.

Concentração do gel – DGGE (%)	0%	30%	60%
40% de gel de acrilamida (mL)	20	20	20
Solução de 50 x TAE (mL)	2	2	2
Formamida (mL)	0	12	24
Uréia (g)	0	12,6	25,2

- 2- Preparou-se o “sanduíche” com o kit de placas de vidro e suporte;
 - 3- Preparou-se os três géis, utilizando-se a solução preparada de acordo com a Tabela 4.4, do seguinte modo:
 - em *tubos de centrífuga de 15 mL, adicionou-se 14 mL da solução de 60%, 100 µL de solução corante (azul de metileno); 100 µL de 10% APS; 10 µL de temed**.
 - em *tubos de centrífuga de 15 mL, adicionou-se 14 mL da solução de 30%; 100 µL de 10% APS; e 10 µL de temed**.
 - em *tubos de centrífuga de 15 mL, adicionou-se 3 mL da solução de 0%; 20 µL de 10% APS; e 2 µL de temed**.
- Obs: *Os tubos de centrífuga com as soluções, foram mantidos em gelo, enquanto é realizado a preparação dos géis.
- **O temed era adicionado por último, pois este reagente provocava a solidificação do gel, por isso, depois de sua adição o gel foi usado imediatamente.
- 4- Transferiu-se os géis (30% e 60%) simultaneamente para o “sanduíche” de placas de vidro, com auxílio de duas seringas presas ao aparelho injetor;

- 5- Após 10 minutos, colocou-se uma placa semelhante a um pente, para formar as cavidades. Em seguida, adicionou-se a solução do gel 0%;
- 6- Aguardou-se no mínimo 1 hora ou uma noite, preferencialmente, para os géis solidificarem;
- 7- Preparou-se a “câmara eletroforética” adicionando-se 140 mL de 50 X TAE e completou-se para 7 litros, com água Milli-Q;
- 8- Colocou-se para aquecer a solução à temperatura de 65%, no entanto, na “corrida” utilizou-se a temperatura constante de 60 °C;
- 9- Quando a temperatura da “câmara eletroforética” atingiu os 65 °C; transferiu-se o “sanduíche” para essa câmara;
- 10- Retirou-se o “pente” e lavou-se as “poços ou cavidades” formadas pelo “pente” no gel, com solução tampão, utilizando-se micropipeta;
- 11- Preparou-se as amostras, misturando-se 20µL de amostra (“template”) com 4µL de 6 x loading dye;
- 12- Transferiu-se a mistura (amostra+corante) para as “poços ou cavidades” do gel;
- 13- Ligou-se a bomba de agitação e conectou-se nos eletrodos, a voltagem de 130V;
- 14- O tempo de “corrida”, depende de cada pesquisa (\pm 300 minutos), no presente trabalho utilizou-se 330 minutos;
- 15- Transferiu-se o gel das placas de vidro para a bandeja própria do aparelho FluoImager;
- 16- Adicionou-se a solução de *Vistra green (diluída 10.000 vezes), aguardou-se por 15 minutos;
- 17- Secou-se o excesso com papel absorvente;
- 18- Colocou-se a bandeja no FluoImager 595, conectado em um computador com “scanner”;
- 19- Fez-se a leitura no computador, utilizando-se um programa de análise de imagem.

*Vistra green - substância cancerígena – manipulou-se sempre com muito cuidado e com luvas.

4.3.8 - Cálculo para a interpretação das bandas de DGGE.

Na comparação das bandas padrões de DGGE, utilizou-se a equação conforme GILLAN *et al.* (1998). Esta equação, calcula o coeficiente de similaridade entre duas amostras e considera o número de bandas do DGGE de cada amostra e o número de bandas em comum presentes nessas amostras. A equação para o cálculo do coeficiente de similaridade-C_s é como segue:

$$C_s = 2J / (a+b) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

a - número de bandas do DGGE na amostra 1

b - número de bandas do DGGE na amostra 2

J - número de bandas do DGGE comuns.

Quando dois perfis de DGGE são idênticos o valor do coeficiente de similaridade é de 100%, e quando são completamente diferentes o valor é de 0%. Esta equação não considera a intensidade das bandas de DGGE como um fator variável.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos três sistemas de lodos ativados modificados para o processo EBPR apresentados no item 4, realizou-se a avaliação das condições de operação e do desempenho dos três sistemas. Na análise da comunidade microbiana presente em tais sistemas empregou-se a técnica do PCR /DGGE.

5.1 - Condições de operação dos três sistemas de lodos ativados estudados através dos parâmetros fornecidos pela ETE Shibaúra.

De acordo com o número de compartimentos e com as condições de operação, os sistemas de reação 1 e 2 (Figura 4.2) da estação piloto são semelhantes ao Bardenpho de 5 estágios. Lembrando que nessa configuração o primeiro estágio anaeróbio tem por objetivo possibilitar reações de fermentação, através do consumo do substrato orgânico do afluente e a ocorrência da liberação do fósforo para o meio; a primeira zona anóxica (segundo estágio) vem promover a desnitrificação onde o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso; em seguida, o afluente passa pelo primeiro estágio aeróbio que permite a ocorrência da nitrificação e do consumo de fósforo; a segunda zona anóxica possibilita novamente a desnitrificação; o estágio final, também aeróbio, impede a liberação de fósforo do lodo.

As diferenças dos sistemas 1 e 2 em relação ao Bardenpho de 5 estágios são a forma de alimentação escalonada (Figura 4.2), no caso do sistema de reação 1, existe a introdução de lodo proveniente do decantador primário na zona anaeróbia. Essa

configuração visou aumentar a biomassa no sistema e diminuir a quantidade de lodo do decantador primário.

O sistema de reação 3 (Figura 4.2) assemelhava-se marcadamente ao sistema Phoredox de 3 estágios ou sistema A²O, no qual a remoção do nitrogênio ocorre principalmente através da recirculação interna da zona aeróbia para a zona anóxica (Figura 3.2). A alternância entre as condições anaeróbias e aeróbias, necessária para a remoção do fósforo, é alcançada por meio da recirculação do lodo, a qual é direcionada para a zona anaeróbia. Neste sistema de reação existe a necessidade de uma elevada eficiência de desnitrificação, pois o retorno de nitratos à zona anaeróbia deve ser evitado para não desfavorecer a remoção biológica de fósforo.

Algumas condições operacionais dos sistemas de lodos ativados 1, 2 e 3, durante o período de amostragem para a análise da comunidade microbiana através da técnica PCR/DGGE estão apresentadas nas Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3, e são referentes ao período de novembro de 1999, fevereiro e março de 2000. As condições mostram principalmente a operação em relação ao reciclo de lodo nos sistemas piloto, sob um tempo de retenção hidráulica (HRT) de 12h.

As Tabelas 5.4, 5.5 e 5.6 mostram outros parâmetros de operação dos sistemas de lodos ativados para o período de abril e maio de 2000, cabendo salientar algumas alterações nas condições de operação dos sistemas, designadas por período. No dia 08 de maio de 2000 deu-se o início de entrada de lodo do decantador primário no tanque anaeróbio, com uma vazão de 10L/h. No dia 09 de maio de 2000 ocorreu alteração no volume de descarte de lodo em excesso, como mostrado na Tabela 5.5. No dia 23 de maio foi feita a substituição da bomba e do local de captação do afluente bruto. Assim, as condições de operação da estação piloto foram alteradas no dia 26 de maio de 2000, segundo as informações apresentadas na Tabela 5.6. No dia 29 de maio de 2000, o afluente bruto apresentou coloração escura, bem diferente daquela anteriormente utilizada, tal fato tem causa desconhecida.

TABELA 5.1: Condições de operação da estação piloto no dia 25 de Novembro de 1999.

Condições	Sistema de reação 1	Sistema de reação 2	Sistema de reação 3
Razão do sistema	05:05	05:05	-
HRT (h)	12	12	12
A-SRT (d)	5,88	10,5	10,5
Índice de recirculação	0,7	0,7	2,0
Índice de retorno	0,5	0,5	0,5
Descarte do lodo em excesso (m ³ /d)	1,26	0,7	0,67

Legenda: Razão de operação do sistema = alimentação em dois períodos; A-SRT = idade do lodo; índice de recirculação = quantidade de lodo e meio que recircula no sistema; índice de retorno = quantidade de lodo e meio que retorna do decantador secundário ao sistema; descarte do lodo em excesso = quantidade de lodo descartada do sistema; (-) = sem alimentação em dois períodos.

TABELA 5.2: Condições de operação da estação piloto no dia 15 de Fevereiro de 2000.

Condições	Sistema de reação 1	Sistema de reação 2	Sistema de reação 3
Razão do sistema	05:05	05:05	-
HRT (h)	12	12	12
A-SRT (d)	10,94	10,02	10,02
Índice de recirculação	0,3	0,3	2,1
Índice de retorno	0,5	0,5	0,5
Descarte do lodo em excesso (m ³ /d)	0,7	0,77	0,7

Legenda: Razão de operação do sistema = alimentação em dois períodos; A-SRT = idade do lodo; índice de recirculação = quantidade de lodo e meio que recircula no sistema; índice de retorno = quantidade de lodo e meio que retorna do decantador secundário ao sistema; descarte do lodo em excesso = quantidade de lodo descartada do sistema; (-) = sem alimentação em dois períodos.

TABELA 5.3: Condições de operação da estação piloto no dia 08 de Março de 2000.

Condições	Sistema de reação 1	Sistema de reação 2	Sistema de reação 3
Razão do sistema	05:05	05:05	-
HRT (h)	12	10	12
A-SRT (d)	9,59	8,2	9,12
Índice de recirculação	0,7	0,7	1,5
Índice de retorno	0,5	0,5	0,5
Descarte do lodo em excesso (m ³ /d)	0,77	0,9	0,77

Legenda: Razão de operação do sistema = alimentação em dois períodos; A-SRT = idade do lodo; índice de recirculação = quantidade de lodo e meio que recircula no sistema; índice de retorno = quantidade de lodo e meio que retorna do decantador secundário ao sistema; descarte do lodo em excesso = quantidade de lodo descartada do sistema; (-) = sem alimentação em dois períodos.

TABELA 5.4: Condições de operação da estação piloto no dia 28 de abril de 2000.

Parâmetros	Sistema de reação 1	Sistema de reação 2	Sistema de reação 3
HRT (h)	12	12	12
Índice de recirculação	0,7	0,7	1,5
Índice do retorno	0,5	0,5	0,5
Descarte do lodo em excesso (m ³ /d)	0,77	0,77	0,70
A-SRT (d)	9,59	9,59	10,02
Temperatura da água bruta (°C)	12,2	12,2	11,5
Volume de água tratada (m ³ /d)	24	24	24
OD no tanque de aeração ¹ (mg/L)	1,5		

Legenda: índice de recirculação = quantidade de lodo e meio que recircula no sistema para ocorrência da nitrificação; A-SRT = idade do lodo; HRT= Tempo de retenção hidráulica; índice de retorno = quantidade de lodo e meio que retorna do decantador secundário ao sistema; descarte do lodo em excesso = quantidade de lodo descartada do sistema; OD= oxigênio dissolvido, ¹operação controlada; (-) = não realizada.

TABELA 5.5: Condições de operação considerando o volume de descarte de lodo em excesso da estação piloto no dia 09 de maio de 2000.

Parâmetros	Sistema de reação 1	Sistema de reação 2	Sistema de reação 3
HRT (h)	12	12	12
Descarte do lodo em excesso (m ³ /d)	0,69	0,69	0,65
A-SRT (idade do lodo - dias)	10,73	10,73	10,8
Temperatura da água (°C)	10,4	10,4	10,3

Legenda: A-SRT = idade do lodo; descarte do lodo em excesso = quantidade de lodo descartada do sistema.

TABELA 5.6: Condições de operação da estação piloto no dia 26 de maio de 2000.

Parâmetros	Sistema de reação 1	Sistema de reação 2	Sistema de reação 3
Índice de recirculação	0,7	0,7	1,5
Índice do retorno	0,5	0,5	0,5
Remoção teórica de N (%)	77,3	77,3	66,7
Descarte de lodo e excesso (m ³ /d)	0,92	0,92	0,87
A-SRT (idade do lodo) (dias)	8,04	8,04	8,04
Temperatura da água (°C)	15	15	15
Entrada do lodo bruto (vazão - l/h)	10	-	-
Volume de água tratada (m ³ /d)	24	24	24
HRT (h)	12	12	12
OD no tanque de aeração ¹ (mg/L)	1,5		

Legenda: A-SRT = idade do lodo; HRT= Tempo de retenção hidráulica; índice de recirculação = quantidade de lodo e meio que recircula no sistema para ocorrência de nitrificação; índice de retorno = quantidade de lodo e meio que retorna do decantador secundário ao sistema; remoção teórica de N em % = estimativa da remoção de nitrogênio do sistema; descarte do lodo em excesso = quantidade de lodo descartada do sistema; entrada do lodo bruto= quantidade de lodo que entra no sistema do decantador primário; OD = oxigênio dissolvido, ¹operação controlada; (-) = não realizada.

As modificações ocorridas nos três sistemas durante o período de operação foram feitas segundo a resposta dos sistemas às condições de operação.

A evolução do índice pluviométrico da ETE Shibaura está mostrada na Figura 5.1 (os valores estão mostrados na Tabela C-1, no anexo C). Pode-se observar que o período de chuvas mais acentuado esteve entre março e abril de 2000.

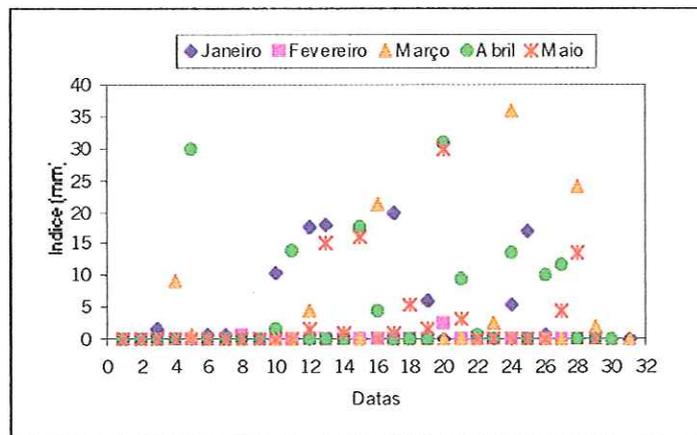


FIGURA 5.1: Representação gráfica dos índices pluviométricos (mm) no período de janeiro a maio de 2000.

O índice pluviométrico sugere um período de chuvas mais intenso nos meses de abril e março e o menos intenso em fevereiro, que corresponderam a alguns períodos de coleta.

No período mais seco que ocorreu no mês de fevereiro (Figura 5.1), verificou-se que houve uma alteração na operação dos sistemas, com relação ao índice de recirculação que foi menor (Tabela 5.2).

5.2 - Avaliação do desempenho dos três sistemas de lodos ativados estudados utilizando os parâmetros de monitoramento fornecidos pela ETE - Shibaura.

Os resultados das determinações físico-químicas para a caracterização do afluente (água residuária ou bruta) e dos valores de amostras retiradas dos diferentes compartimentos de cada sistema de reação que compõe a estação piloto estudada estão apresentados nas Tabelas 5.7 a 5.17. Os valores físico-químicos da entrada no sistema anaeróbio e do retorno de lodo também foram monitorados para cada sistema de reação. A Tabela 5.17 mostra o acompanhamento do sistema de reação 3 durante a maioria dos dias do mês de Abril, período chuvoso. A composição da água bruta de alimentação e as condições de alimentação foram semelhantes àquelas dos sistemas de reação anteriores.

A estação piloto está ilustrado nas Figuras 4.1 e 4.2, do capítulo Material e Métodos, em que se visualizam os compartimentos de cada sistema de reação. Cabe salientar que os valores apresentados da sessão dos dados foram fornecidos e monitorados pela ETE - Shibaura, permitindo a compreensão das condições dos sistemas biológicos estudados na análise da comunidade microbiana pela técnica PCR/DGGE. A composição do afluente nos compartimentos de cada sistema de reação (sistemas de reações 1, 2 e 3) foram as mesmas. A numeração dos afluentes 1 e 2 indica a entrada de alimentação nos sistemas (razão de alimentação do sistema, Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3) em dois períodos diferentes do mesmo dia, bem como nos compartimentos indicados na Figura 4.2 do capítulo Material e Métodos, sistemas de reação 1 e 2. Os perfis físico-químicos dos três sistemas de reação foram determinados em períodos distintos (Novembro, Fevereiro e Março). Esses três perfis apresentam características físico-químicos da água bruta, do lodo do decantador secundário que retorna ao sistema e dos compartimentos dos sistemas de reação (1, 2 e 3). A Tabela 5.16 apresenta um perfil específico para o mês de Abril, do sistema de reação 3. Este perfil mostra as determinações físico-químicas do tanque anaeróbio e aeróbio, do efluente tratado, do lodo em excesso que é descartado do sistema e do lodo do decantador secundário que retorna ao sistema.

TABELA 5.7: Perfil 1- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 1 - realizadas em 25/11/1999.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	Afluente 2	AE-1	AO-2	AE-2
Horário	9:00	9:00	10:00	10:00	10:35	12:20	12:20	14:00	15:30
pH	7,29	6,83	7,07	6,73	6,97	7,27	6,75	7,04	6,72
DBO _T (mg/L)	150,60	-	-	-	-	111,00	-	-	-
DBO _S (mg/L)	34,60	0,99	4,86	1,68	2,28	27,80	0,90	1,38	1,65
N-NH ₄ (mg/L)	21,12	ND	11,46	ND	6,95	22,10	ND	5,63	ND
N-NO ₂ (mg/L)	ND	0,18	ND	0,24	0,07	ND	0,17	0,43	0,24
N-NO ₃ (mg/L)	ND	4,66	ND	5,38	0,21	ND	6,65	0,52	5,32
N-NO _x (mg/L)	ND	4,84	ND	5,62	0,28	ND	6,82	0,95	5,56
P-PO ₄ (mg/L)	7,28	0,50	10,20	1,28	7,15	2,46	2,52	2,04	0,86
M-Alk (mg/L)	157,46	58,92	121,96	58,72	101,84	159,56	58,32	92,58	60,78
Kj-N (mg/L)	28,00	327,60	-	-	-	28,28	-	-	138,60
P-T (mg/L)	8,76	123,40	-	-	-	3,95	-	-	50,06
SS (mg/L)	-	3953	-	-	-	-	-	-	1467
Ácido Acético (mg/L)	24,24	-	-	-	-	12,39	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x⁻: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) análise realizada no último compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

TABELA 5.8: Perfil 1- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 2- realizadas em 25/11/1999.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	Afluente 2	AE-1	AO-2	AE-2
Horário	9:00	9:00	10:00	10:00	10:35	-	12:20	14:00	15:30
pH	7,29	6,79	7,11	6,90	7,00	-	6,76	7,03	6,75
DBO _T (mg/L)	150,60	-	-	-	-	-	-	-	-
DBO _S (mg/L)	34,60	1,26	4,80	1,08	2,04	-	1,14	1,35	0,93
N-NH ₄ (mg/L)	21,12	ND	11,35	ND	7,12	-	ND	5,72	ND
N-NO ₂ (mg/L)	ND	0,17	ND	0,06	0,05	-	0,09	0,35	0,06
N-NO ₃ (mg/L)	ND	4,52	ND	5,60	0,17	-	6,83	0,24	5,88
N-NO _x (mg/L)	ND	4,69	ND	5,66	0,22	-	6,92	0,59	5,94
P-PO ₄ (mg/L)	7,28	1,10	10,96	1,98	7,01	-	3,43	2,78	1,55
M-Alk (mg/L)	157,46	58,74	122,60	58,40	101,48	-	56,64	93,96	59,40
Kj-N (mg/L)	28,00	386,40	-	-	-	-	-	-	159,60
P-T (mg/L)	8,76	135,70	-	-	-	-	-	-	65,05
SS (mg/L)	-	4863	-	-	-	-	-	-	2060
Ácido Acético (mg/L)	24,24	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x⁻: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) análise realizada no último compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

TABELA 5.9: Perfil 1- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 3 - realizadas em 25/11/1999.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	AE-2
Horário	9:00	9:00	9:40	9:40	10:50	12:50
PH	7,29	6,83	6,99	6,68	6,99	6,82
DBO _T (mg/L)	150,60	-	-	-	-	-
DBO _S (mg/L)	34,60	1,20	3,84	0,45	2,52	0,72
N-NH ₄ (mg/L)	21,12	ND	9,92	ND	6,26	ND
N-NO ₂ (mg/L)	ND	0,11	ND	ND	0,05	ND
N-NO ₃ (mg/L)	ND	4,18	ND	6,47	0,30	6,19
N-NO _x (mg/L)	ND	4,29	ND	6,47	0,35	6,19
P-PO ₄ (mg/L)	7,28	0,18	7,06	0,57	4,20	0,29
M-Alk (mg/L)	157,46	58,88	114,44	55,66	97,82	59,74
Kj-N (mg/L)	28,00	414,40	-	-	-	170,80
P-T (mg/L)	8,76	186,40	-	-	-	75,19
SS (mg/L)	-	5723	-	-	-	2292
Ácido Acético (mg/L)	24,24	-	-	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = Sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) primeira análise realizada no compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

TABELA 5.10: Perfil 2- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 1 – realizadas em 15/02/2000.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	Afluente 2	AE-1	AO-2	AE-2
Horário	15:00	15:00	15:50	15:50	16:30	18:20	18:20	20:00	21:40
pH	7,20	6,66	7,06	6,64	6,93	7,29	6,50	6,86	6,55
DBO _T (mg/L)	238,80	-	-	-	-	222,00	-	-	-
DBO _S (mg/L)	24,00	1,20	3,00	1,98	3,36	22,50	1,95	3,30	1,56
N-NH ₄ (mg/L)	23,43	0,18	12,45	0,10	10,15	24,83	0,09	7,06	0,28
N-NO ₂ (mg/L)	ND	0,29	ND	0,10	ND	ND	ND	0,43	0,13
N-NO ₃ (mg/L)	ND	8,71	ND	10,24	0,33	ND	10,67	4,18	11,03
N-NO _x (mg/L)	ND	9,00	ND	10,34	0,33	ND	10,67	4,61	11,16
P-PO ₄ (mg/L)	8,82	6,70	7,89	7,10	8,16	12,29	7,44	8,73	8,68
M-Alk (mg/L)	161,28	48,04	120,82	46,06	109,14	160,32	44,92	88,00	43,20
Kj-N (mg/L)	34,08	664,70	-	-	-	33,40	-	-	247,80
P-T (mg/L)	15,82	266,89	-	-	-	17,72	-	-	99,30
SS (mg/L)	-	8385	-	-	-	-	-	-	2785
Ácido Acético (mg/L)	5,53	-	-	-	-	ND	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = Sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) análise realizada no último compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

TABELA 5.11: Perfil 2- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do lodo de retorno e do monitoramento do sistema de reação 2 – realizadas em 15/02/2000.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	Afluente 2	AE-1	AO-2	AE-2
Horário	15:00	15:00	15:50	15:50	16:20	18:10	18:10	19:30	21:00
pH	7,20	6,70	6,98	6,65	6,96	7,33	6,60	6,87	6,58
DBO _T (mg/L)	238,80	-	-	-	-	212,40	-	-	-
DBO _S (mg/L)	24,00	3,57	3,36	2,04	4,05	12	0,90	1,95	0,90
N-NH ₄ (mg/L)	23,43	0,71	7,89	0,12	8,89	24,87	0,08	6,76	0,21
N-NO ₂ (mg/L)	ND	0,21	ND	0,12	ND	ND	ND	ND	ND
N-NO ₃ (mg/L)	ND	6,31	ND	9,03	ND	ND	9,82	3,50	9,84
N-NO _x (mg/L)	ND	6,52	ND	9,15	ND	ND	9,82	3,50	9,84
P-PO ₄ (mg/L)	8,82	7,02	7,73	7,00	8,02	11,88	7,56	8,74	8,46
M-Alk (mg/L)	161,28	60,98	116,52	50,90	111,72	162,36	49,54	91,38	48,36
Kj-N (mg/L)	34,08	826,00	-	-	-	34,16	-	-	269,64
P-T (mg/L)	15,82	278,17	-	-	-	16,25	-	-	110,56
SS (mg/L)	-	10150	-	-	-	-	-	-	3206
Ácido Acético (mg/L)	5,53	-	-	-	-	ND	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = Sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) análise realizada no último compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

TABELA 5.12: Perfil 2- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do retorno do lodo e do monitoramento do sistema de reação 3 – realizadas em 15/02/2000.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	AE-2
Horário	15:00	15:00	15:30	15:30	16:30	18:10
pH	7,20	6,60	6,90	6,66	6,89	6,62
DBO _T (mg/L)	238,80	-	-	-	-	-
DBO _S (mg/L)	24,00	1,95	2,85	1,20	2,40	0,84
N-NH ₄ (mg/L)	23,43	0,25	10,28	0,05	5,93	0,06
N-NO ₂ (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N-NO ₃ (mg/L)	ND	7,48	ND	10,17	4,16	10,50
N-NO _x (mg/L)	ND	7,48	2,16	10,17	4,16	10,50
P-PO ₄ (mg/L)	8,82	5,58	10,43	5,53	6,54	6,03
M-Alk (mg/L)	161,28	56,74	108,94	17,30	86,40	45,00
Kj-N (mg/L)	34,08	796,30	-	-	-	264,04
P-T (mg/L)	15,82	362,81	-	-	-	121,47
SS (mg/L)	-	9485	-	-	-	3193
Ácido Acético (mg/L)	5,53	-	-	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x⁻: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = Sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) primeira análise realizada no compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

TABELA 5.13: Perfil 3- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do retorno e do monitoramento do sistema de reação 1 – realizadas em 08/03/2000.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	Afluente 2	AE-1	AO-2	AE-2
Horário	9:00	9:00	10:00	10:00	10:30	12:20	12:20	14:00	15:30
pH	7,35	6,66	7,00	6,71	6,93	7,16	6,60	6,88	6,68
DBO _T (mg/L)	191,63	-	-	-	-	222,00	-	-	-
DBO _S (mg/L)	39,60	1,67	11,55	2,01	4,68	37,20	1,44	2,93	1,49
N-NH ₄ (mg/L)	28,31	0,22	14,48	0,11	8,88	29,76	0,06	7,11	0,11
N-NO ₂ (mg/L)	ND	0,28	ND	0,14	ND	ND	0,10	0,24	0,15
N-NO ₃ (mg/L)	ND	3,99	ND	6,38	0,11	ND	7,79	1,81	6,54
N-NO _x (mg/L)	ND	4,27	ND	6,52	0,11	ND	7,89	2,05	6,69
P-PO ₄ (mg/L)	11,41	2,74	11,58	3,44	8,39	12,35	4,33	6,26	4,46
M-Alk (mg/L)	168,72	58,06	126,24	53,34	113,67	168,92	48,06	91,54	51,10
Kj-N (mg/L)	37,24	756,00	-	-	-	36,82	-	-	250,60
P-T (mg/L)	14,90	293,32	-	-	-	16,26	-	-	97,32
SS (mg/L)	-	9410	-	-	-	-	-	-	2888
Ácido Acético (mg/L)	8,25	-	-	-	-	7,01	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x⁻: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = Sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) análise realizada no último compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

TABELA 5.14: Perfil 3- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do retorno de lodo e do monitoramento do sistema de reação 2 - realizadas em 08/03/2000.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	Afluente 2	AE-1	AO-2	AE-2
Horário	9:00	9:00	9:50	9:50	10:20	11:50	11:50	13:10	14:30
pH	7,35	6,71	6,99	6,69	6,91	7,13	6,63	6,85	6,60
DBO _T (mg/L)	191,63	-	-	-	-	217,13	-	-	-
DBO _S (mg/L)	39,60	2,28	13,23	1,77	4,08	37,4	1,44	2,63	1,25
N-NH ₄ (mg/L)	28,31	0,21	12,11	0,07	8,78	24,46	0,05	6,69	0,10
N-NO ₂ (mg/L)	ND	0,08	ND	0,15	ND	ND	0,12	0,08	0,16
N-NO ₃ (mg/L)	ND	3,58	ND	6,18	0,11	ND	7,88	1,08	6,60
N-NO _x (mg/L)	ND	3,66	ND	6,33	0,11	ND	8,00	1,16	6,76
P-PO ₄ (mg/L)	11,41	2,78	11,04	3,37	7,15	11,87	4,24	5,75	4,39
M-Alk (mg/L)	168,72	60,16	123,74	53,80	102,54	171,24	49,22	90,38	51,98
Kj-N (mg/L)	37,24	781,20	-	-	-	37,88	-	-	262,60
P-T (mg/L)	14,90	254,33	-	-	-	15,81	-	-	95,05
SS (mg/L)	-	9380	-	-	-	-	-	-	3063
Ácido Acético (mg/L)	8,25	-	-	-	-	3,52	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x⁻: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = Sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) análise realizada no último compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

TABELA 5.15: Perfil 3- Valores das determinações físico-químicas do afluente, do retorno de lodo e do monitoramento do sistema de reação 3 - realizadas em 08/03/2000.

Parâmetros	Afluente 1	Retorno de lodo	AN	*AE2-1	AO-1	AE-2
Horário	9:00	9:00	9:40	9:40	11:00	13:20
pH	7,35	6,63	7,05	6,70	6,93	6,61
DBO _T (mg/L)	191,63	-	-	-	-	-
DBO _S (mg/L)	39,60	2,04	7,38	1,97	4,73	1,34
N-NH ₄ (mg/L)	28,31	0,19	13,65	0,06	9,83	0,04
N-NO ₂ (mg/L)	ND	0,12	ND	0,12	ND	0,08
N-NO ₃ (mg/L)	ND	6,35	ND	8,61	0,17	8,25
N-NO _x (mg/L)	ND	6,47	ND	8,73	0,17	8,33
P-PO ₄ (mg/L)	11,41	2,46	8,36	2,56	6,28	2,84
M-Alk (mg/L)	168,72	53,02	116,50	45,12	104,24	45,94
Kj-N (mg/L)	37,24	733,60	-	-	-	243,60
P-T (mg/L)	14,90	234,89	-	-	-	99,84
SS (mg/L)	-	8515	-	-	-	2870
Ácido Acético (mg/L)	8,25	-	-	-	-	-

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂⁻ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SS = Sólidos em suspensão; (-) = não realizado; Os valores do retorno de lodo indicam a entrada no compartimento AN; (*) primeira análise realizada no compartimento aeróbio, após introdução do afluente 1.

Tabela 5.16: Valores das determinações físico-químicas dos compartimentos do sistema de reação 3 – realizadas no mês de abril de 2000.

Dia	Tanque anaeróbio			Tanque aeróbio		Efluente tratado														Lodo em excesso		Lodo de reciclo	
	P-PO ₄ (mg/L)	SS (mg/L)	SSV (mg/L)	SS (mg/L)	SSV (mg/L)	pH	DBO _T (mg/L)	DBO _S (mg/L)	DQO _T (mg/L)	DQO _S (mg/L)	SS (mg/L)	Kj-N (mg/L)	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	P-T (mg/L)	P-PO ₄ (mg/L)	M-alk (mg/L)	Kj-N (mg/L)	P-T (mg/L)	SS (mg/L)	SSV (mg/L)	
4	4,59	2583	2068	2240	1920	6,85	10,25	2,84	26,5	11,9	66	4,9	0,28	0,29	-	2,08	0,63	52,86	200,2	71,96	-	-	
5	5,49	2388	1920	2380	1053	6,77	7,11	1,52	12,43	10,06	9,5	3,08	0,11	0,23	11,45	2,09	0,36	63,5	-	-	-	-	
6	7,14	2328	1938	2270	1893	6,64	10,61	1,7	13,85	9,12	14	3,5	0,11	0,1	5,15	1,58	1,25	48,4	194,6	65,31	7573	6293	
7	8,7	2185	1950	2218	1853	6,54	11,06	0,71	14,4	9,63	13,5	2,66	0,08	0,22	2,35	2,11	1,8	41,2	-	-	-	-	
11	3,14	2150	1808	2158	1823	6,80	16,68	3,06	17,88	13,00	16,00	2,35	0,29	0,35	-	8,46	7,81	47,70	192,08	65,82	-	-	
12	5,94	2313	1950	2165	1828	6,76	15,51	2,66	18,08	11,57	14,80	2,27	0,20	0,26	-	4,80	4,24	48,04	-	-	-	-	
13	7,42	2200	1815	2208	1858	6,78	15,00	3,48	17,88	12,60	12,40	2,52	0,26	0,33	8,23	4,28	3,94	51,48	198,24	58,88	6640	5220	
14	7,00	2180	1808	2273	1918	6,82	14,16	2,10	17,40	12,43	13,40	2,39	0,17	0,32	8,27	2,46	2,10	47,38	-	-	-	-	
18	4,07	2368	1958	2340	1918	6,67	13,38	1,64	13,57	9,63	12,33	2,52	0,11	0,33	7,37	1,86	1,33	42,78	194,60	67,20	-	-	
19	5,48	2205	1828	2303	1873	6,65	12,57	1,61	14,14	10,73	9,00	2,46	0,16	0,33	7,88	1,58	1,20	42,18	-	-	-	-	
20	8,07	2330	1940	2310	1918	6,72	11,43	1,20	14,86	10,63	7,00	2,72	0,14	0,31	7,69	1,45	1,03	42,46	193,20	62,49	6270	4995	
21	2,10	2175	1808	2293	1905	6,53	10,68	1,29	12,29	9,25	14,00	2,52	0,11	0,08	5,71	0,76	0,40	39,18	-	-	-	-	
25	4,00	2153	1760	2093	1718	6,67	13,95	2,72	15,97	11,17	14,50	3,08	0,28	0,21	8,09	6,21	5,03	46,38	176,40	68,82	-	-	
26	6,61	2116	1769	2177	1817	6,62	14,70	1,29	15,57	9,94	16,50	2,66	0,15	0,28	7,82	4,19	3,67	38,00	-	-	-	-	
27	0,17	2020	1620	2148	1721	6,64	11,30	1,31	15,83	10,43	25,33	2,52	0,23	0,19	8,54	2,51	2,21	47,44	168,00	59,34	5736	4604	
28	3,93	2706	2215	2122	1753	6,62	10,84	1,05	15,12	9,63	18,67	1,96	0,23	0,18	7,00	1,88	1,56	35,88	-	-	-	-	

Legenda: pH: potencial hidrogeniônico; DBO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DBO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; DQO_T: demanda química de oxigênio total; DQO_S: demanda química de oxigênio solúvel; N-NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de íon amônio; N-NO₂⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrito; N-NO₃⁻: concentração de nitrogênio na forma de nitrato; N-NO_x: concentração de N na forma de NO₃ (nitrato) e de NO₂ (nitrito); P-PO₄: concentração de fósforo na forma de fosfato; M-Alk = alcalinidade; kj-N = NTK: nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio orgânico + nitrogênio amoniacal); P-T: concentração de fósforo total; SSV= Sólidos voláteis em suspensão; SS: sólidos em suspensão; (-) não determinado.

Observou-se o metabolismo da remoção de fosfatos (Tabelas 5.7, 5.8, 5.9, 5.13, 5.14 e 5.15) no período analisado, considerando-se os valores iniciais desse composto e os apresentados no retorno de lodo nos próprios sistemas a exceção do período que caracterizou o perfil 2 (Tabelas 5.10, 5.11 e 5.12), já comentado. A Tabela 5.16 apresenta as determinações físico-químicas do sistema de reação 3, realizado no período mais chuvoso referente ao mês de abril de 2000, com exceção dos dias 11 e 12, 25 e 27, observa-se também a ocorrência da remoção de fosfatos no efluente tratado.

Para auxiliar na compreensão do processo EBPR, dos três sistemas de reações, foi realizada representação gráfica dos perfis físico-químicos, mais especificamente da demanda bioquímica de oxigênio e do fósforo na forma de fosfato.

Nos gráficos não serão representadas as primeiras determinações (DBO_5 e PO_4) realizadas no último compartimento aeróbio, referente a coluna AE2-1 das Tabelas 5.7 a 5.15. Para melhor visualizar o decaimento da demanda bioquímica de oxigênio e do fósforo na forma de fosfato ao longo dos compartimentos (anaeróbio, anóxico e aeróbio) de cada sistema de reação, como pode-se observar a seguir.

As Figuras 5.2 a 5.4 apresentam os valores quantitativos da demanda bioquímica de oxigênio solúvel nos compartimentos de cada sistema de reação 1, 2 e 3 ao longo dos três períodos estudados (perfis 1, 2 e 3), lembrando que o sistema de reação 3 é formado de três compartimentos, assim a interrupção na linha amarela das Figuras 5.2 a 5.7 são referentes aos compartimentos aeróbio e anóxico ausente nesse sistema, como pode ser observado na Figura 4.2.

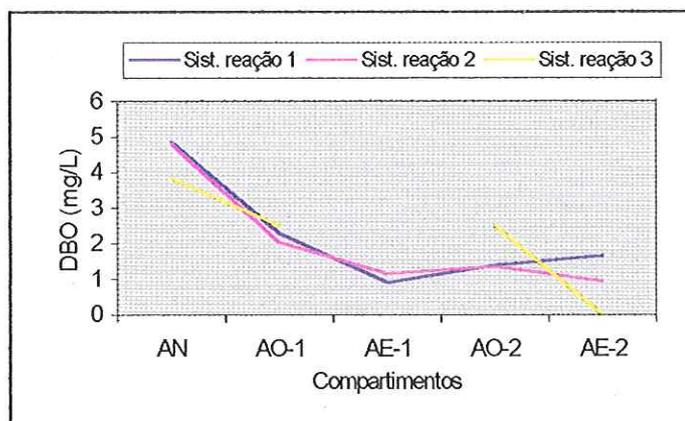


FIGURA 5.2: Representação gráfica dos valores da demanda bioquímica de oxigênio solúvel nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 1 realizado em 25/11/99 (AN compartimento anaeróbio; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).

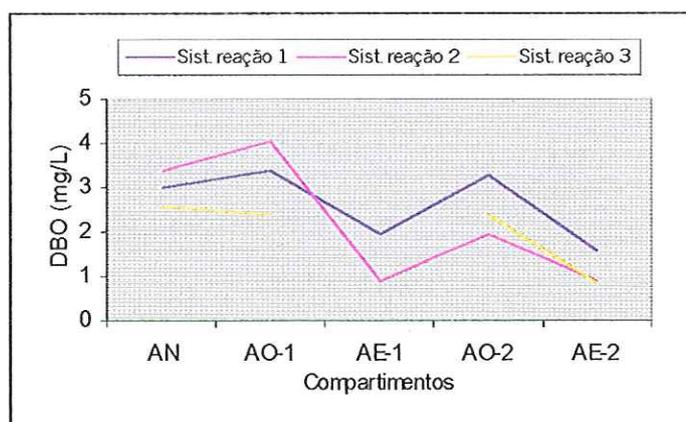


FIGURA 5.3: Representação gráfica dos valores da demanda bioquímica de oxigênio solúvel nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 2 realizado em 15/02/00 (AN compartimento anaeróbio; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).

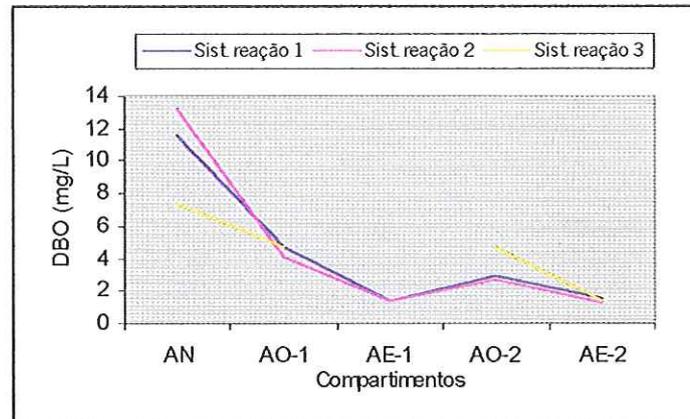


FIGURA 5.4: Representação gráfica dos valores da demanda bioquímica de oxigênio solúvel nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 3 realizado em 08/03/00 (AN compartimento anaeróbico; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbio; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbio).

Verificou-se que houve remoção de DBOs, devido aos valores maiores de DBO solúvel no primeiro compartimento dos sistemas de reação 1, 2 e 3, diminuindo nos seguinte estágios (anóxico e aeróbio), aumentando um pouco nos compartimentos anóxicos, e reduzindo na última etapa aeróbia, como pode ser visto nas Figuras 5.2, 5.3 e 5.4. O sistema de reação 3 operados com valores de DBO solúvel mais baixo que os outros dois sistemas, mostrou-se eficiente, apesar de possuir dois compartimentos (aeróbio e anóxico) a menos.

As Figuras 5.5 a 5.7 apresentam os valores quantitativos do fosfato total nos compartimentos de cada sistema de reação 1, 2 e 3 ao longo dos três períodos estudados (perfis 1, 2 e 3), ressaltando que o sistema de reação 3 constitui-se de dois compartimentos a menos (anóxico e aeróbio), na representação gráfica é marcada por uma interrupção.

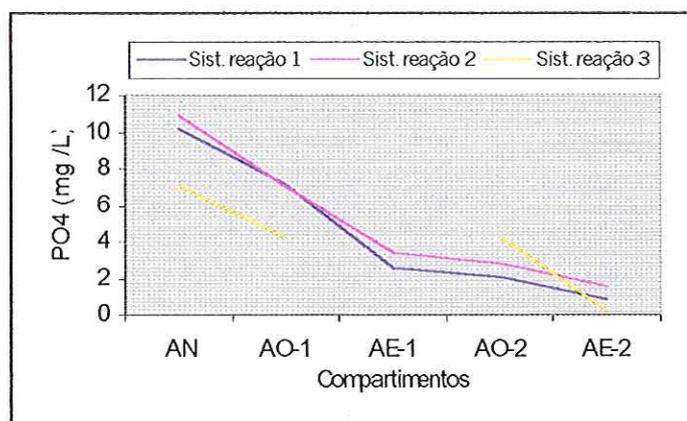


FIGURA 5.5: Representação gráfica dos valores de fosfato total nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 1 realizado em 25/11/99. (AN compartimento anaeróbico; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbico; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbico).

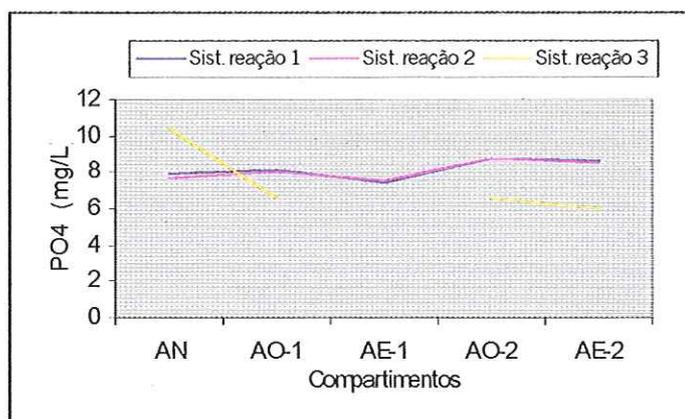


FIGURA 5.6: Representação gráfica dos valores de fosfato total nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 2 realizado em 15.02/00 (AN compartimento anaeróbico; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbico; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbico).

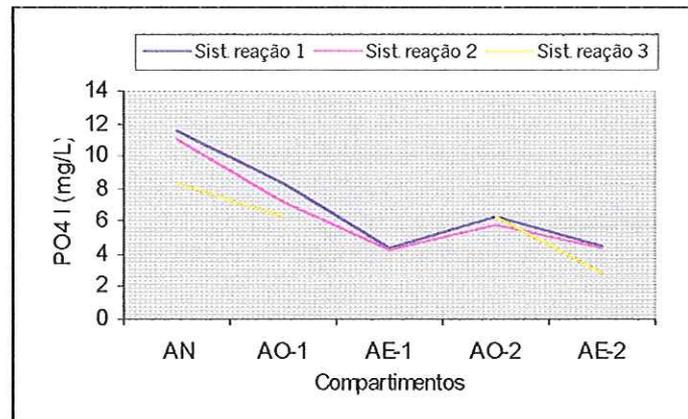


FIGURA 5.7: Representação gráfica dos valores de fosfato total nos compartimentos dos sistemas de reação 1, 2 e 3. Perfil 3 realizado em 08/03/00 (AN compartimento anaeróbico; AO-1 primeiro compartimento anóxico; AE-1 primeiro compartimento aeróbico; AO-2 segundo compartimento anóxico; AE-2 segundo compartimento aeróbico).

A partir das Figuras 5.5, 5.6 e 5.7 verificou-se que houve remoção de fosfatos nos perfis 1 e 3 nos três sistemas de reação. No perfil 2 observou-se uma pequena remoção de fosfato apenas no sistema de reação 3.

Os resultados mostram que os dois sistemas de reação 1 e 2 que apresentam características semelhantes ao sistema Bardenpho 5 estágios e o sistema de reação 3 que se assemelha ao Phoredox, removeram fosfatos presentes na Afluente, e nos compartimentos anaeróbios ocorreu a liberação de fosfatos, indicando presença de PAOs, pois como visto no item 3, esses organismos usam o polifosfato (poli-P) como fonte de energia e liberam o ortofosfato no meio para utilizar os substratos orgânicos e armazenam na forma PHA ou PHB (JENKINS & TANDOI, 1991; LIU *et al.*, 1996; MINO *et al.*, 1997 e 1998; SUDIANA *et al.*, 1998).

As Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 mostram os valores dos mesmos parâmetros no sistema de reação 3 durante o mês de abril de 2000. Além disso, apresentam os valores de fósforo total e dos teores de sólidos em suspensão no mesmo sistema de reação.

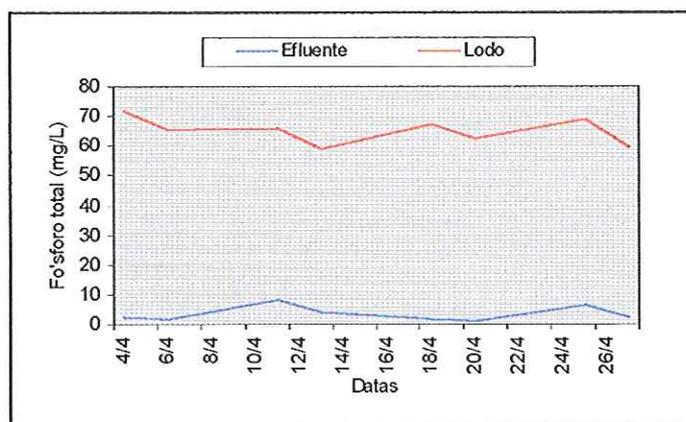


FIGURA 5.8: Representação gráfica na comparação dos valores de fósforo total presentes no efluente tratado e no lodo em excesso (descartado) do sistema de reação 3, durante o mês de abril de 2000.

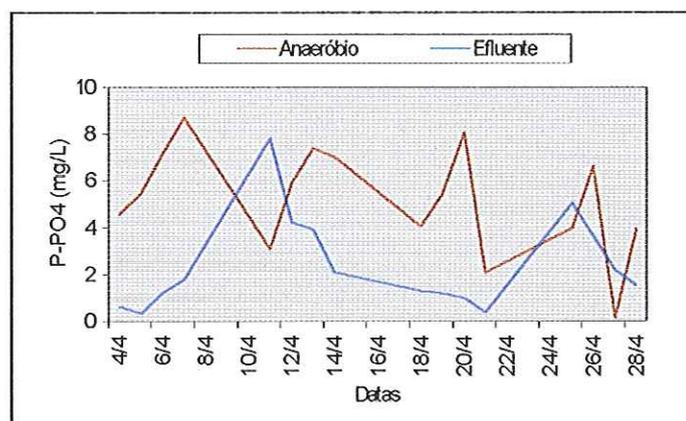


FIGURA 5.9: Representação gráfica na comparação dos valores de fosfatos presentes, no compartimento anaeróbico e no efluente tratado, no sistema de reação 3, durante o mês de abril de 2000.

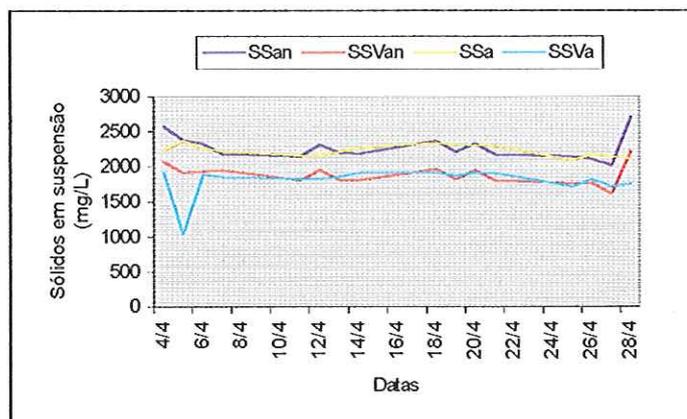
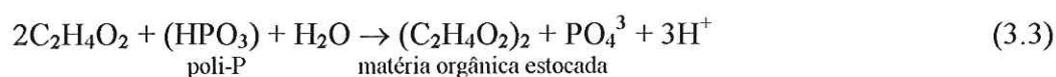


FIGURA 5.10: Representação gráfica na comparação dos valores de sólidos em suspensão presentes nos compartimentos anaeróbio e aeróbio, no sistema de reação 3 durante o mês de abril de 2000 (SS - Sólidos em suspensão; SSV = Sólidos voláteis em suspensão; a = aeróbio; an = anaeróbio).

A Figura 5.8 mostrou que os valores de fósforo total no efluente tratado é baixo, enquanto que no lodo em excesso a concentração é elevada, indicando a presença de microrganismos que acumulam poli-P. Quando os PAOs são dominantes o conteúdo de fósforo na biomassa do lodo é alto, devido a acumulação de poli-P. Inclusive na operação dos sistemas de lodos ativados modificados, a EBPR é atingida quando se retira a biomassa com alto conteúdo de fósforo do sistema. Por isso, o crescimento estável dos PAOs é essencial para a operação dos processos EBPR (MINO *et al.*, 1998). A exceção de uma fase operacional, cujos valores dos parâmetros estão apresentados no perfil 2.

A existência de maiores concentrações de fosfatos na zona anaeróbia foi também verificada (Tabelas 5.7, 5.8, 5.9, 5.13, 5.14 e 5.15 e Figuras 5.5 e 5.7), como postulado por HENZE (1997) através da reação (3.3) apresentada no capítulo Revisão da Literatura.



Como comentado, os organismos acumuladores de fosfatos (PAOs) são caracterizados, principalmente, pela sua capacidade anaeróbia em utilizar os substratos orgânicos e estocá-los usando a energia da hidrólise do poli-P armazenado, sem consumir qualquer aceptor final de elétrons. Assim, os ácidos orgânicos originados pela fermentação (principalmente os de cadeia curta) suprem as vias metabólicas dos PAOs sob condições anaeróbias. Portanto, a presença de fosfatos na zona anaeróbia dos sistemas estudados pode ser relacionada à esse metabolismo. O desaparecimento do fósforo/fosfato nos compartimentos aeróbios é atestado (Tabelas 5.7, 5.8, 5.9, 5.13, 5.14 e 5.15 e Figuras 5.5 e 5.7), assim como um aumento nos compartimentos anóxicos, em que a diminuição do nitrato foi também observada (Tabelas 5.7, 5.8, 5.9, 5.13, 5.14 e 5.15).

A Tabela 5.17 mostra os valores de ácidos orgânicos determinados em amostras das águas brutas, dos efluentes e dos lodos do decantador primário durante o mês de maio de 2000. São valores dosados fora do período dos perfis dos sistemas de reação, e os valores do afluente bruto correspondem à fração líquida e sólida na entrada do decantador primário. Os valores determinados para a Afluente correspondem a alimentação dos sistemas de reação (vazão de entrada).

TABELA 5.17: Valores dos ácidos orgânicos (mg/L) presentes no afluente, no efluente e lodo do decantador primário do monitoramento realizado em maio de 2000.

Dias	Afluente bruto		Efluente do decantador primário		Composição da Afluente		Lodo do decantador primário	
	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Acético	Ác. Propiônico
1	ND	ND	10,2	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	16,4	ND	20,2	ND	29,7	ND	59,4	8,1
10	31,2	ND	32,2	ND	22,7	ND	83,9	26,3
11	30,7	ND	36,5	ND	29,4	ND	110,2	47,4
12	32,2	ND	39,8	ND	31,4	ND	115,3	43,2
15	6,2	ND	19,5	ND	ND	ND	6,1	9,9
16	13,6	ND	21,8	ND	2,6	ND	140,9	44,7
17	25,0	ND	30,6	ND	17,9	ND	118,9	31,8
18	10,8	ND	ND	ND	21,5	ND	ND	ND
19	22,8	ND	21,7	ND	17,3	ND	100,3	31,4
22	11,5	ND	15,9	ND	ND	ND	67,0	9,3
23	22,9	ND	26,4	ND	11,3	ND	83,5	23,1
24	20,8	ND	25,0	ND	19,2	ND	87,4	25,7
25	27,7	ND	33,9	ND	23,0	ND	107,9	33,1
26	30,6	ND	36,8	ND	26,3	ND	156,5	71,4
29	24,8	ND	26,6	ND	ND	ND	49,9	4,7
30	37,7	ND	43,2	ND	26,6	ND	93,8	11,0
31	34,0	ND	40,9	ND	27,9	ND	116,3	41,7

(ND) – não determinado

Os valores de ácidos orgânicos de cadeia curta estão apresentados, a título ilustrativo, já que correspondem ao período final das coletas realizadas nesse trabalho, na Tabela 5.17, destacando-se a composição presente no afluente. Não são concentrações elevadas, mas usuais de águas residuárias de origem doméstica. O lodo do decantador primário que foi utilizado na alimentação do sistema de reação 1 durante a última etapa de coleta de amostras contém quantidades maiores dos ácidos orgânicos,

provavelmente devido às maiores quantidades de matéria orgânica passível de hidrólise e fermentação sob condições anaeróbias. No aflente bruto da ETE sempre esteve presente ácidos orgânicos de cadeia curta, e o ácido acético nas fontes de alimentação dos sistemas no período considerado.

É importante salientar que os modelos descritos para a utilização do ácido acético apresentados na revisão da literatura, mostram que os ácidos orgânicos de cadeia curta são formados por bactérias fermentativas a partir de substratos orgânicos complexos e são convertidos pelos PAOs em PHB, PHA e PHV. KORTSTEE *et al.* (2000) comentaram que existe uma razão molar entre conteúdo de fósforo inorgânico no meio em relação ao conteúdo de acetato que facilita a promoção da síntese dos grânulos de reserva intracelular.

Os valores de DBO_{total} e DBO_{solúvel}, respectivamente apresentados nas Tabelas 5.7 a 5.15 e Figuras 5.2 a 5.4, mostram o conteúdo baixo de matéria orgânica em geral característico de resíduos líquidos de origem doméstica (ALÊM SOBRINHO, 1991; SPEECE, 1996). Os valores ao longo dos compartimentos revelam a degradação de uma parcela na fase aeróbia, ocorrendo sempre um aumento na fase anóxica. Na fase aeróbia o desaparecimento dos compostos fosfatados foi também observado, como indicado por outros pesquisadores (MINO *et al.*, 1998), fase na qual a síntese dos compostos energéticos ocorre pelo consumo do fosfato no meio.

A relação fósforo:carbono apresentada por LIU *et al.* (1996) igual a 20:100 (igual a 0,2) que favorece o acúmulo de elevado conteúdo de poli-P celular pelos PAOs. No caso de sistemas EPBR, pode ser analisada em relação aos teores determinados no presente trabalho de P-total:DBO_{solúvel} (considerando a medida indireta de determinação de parte do conteúdo de carbono no sistema, e da alimentação inicial de cada período), cerca 0,25 (perfil 1), em seqüência 0,66 (perfil 2), 0,38 (perfil 3). Verifica-se, que a relação utilizada durante o período de operação do perfil 2 foi mais elevada, o que poderia justificar a não remoção de fosfatos verificada nos três sistemas monitorados em fevereiro de 2000.

A avaliação dos três sistemas de reação, sistemas de reação 1, 2 e 3 para remoção biológica do fósforo em excesso, revelou que as condições operacionais foram bastante

próximas no período considerado, de novembro de 1999 a maio de 2000. Destaca-se o fato de que a recirculação interna (remoção de nitrato) no sistema de reação 3 sempre foi maior, do compartimento aeróbio para o anóxico. Como já observado, a remoção de fosfato se deu no primeiro e terceiro período, sendo semelhante (Figuras 5.5 e 5.7). No segundo período, a remoção de fosfatos não foi verificada (Figura 5.6), isso talvez esteja relacionada a redução da recirculação nos três sistemas, a mudança na idade e no descarte de lodo do sistema de reação 1 (Tabela 5.3), em relação ao período anterior (Tabela 5.2). O aumento da recirculação imposta no período subsequente pode ter favorecido o retorno à remoção biológica do fósforo, como constada na Tabela 5.4.

No mês de abril (Tabela 5.16) pode-se notar que a remoção de fosfato variou ao longo dos dias para o sistema de reação 3, mesmo que os valores obtidos na data de 28 de abril de 2000 não tenham revelado diferenças em relação ao período anterior (Tabelas 5.3 e 5.4 – sistema de reação 3). No entanto, os valores de fosfato nas datas 11 e 12, 25 e 27 foram elevados no efluente tratado, o que pode ser devido a alguma particularidade operacional não identificada durante a coleta dos dados na ETE-Shibaura ou a vazão de recirculação interna.

As Figuras 5.8 a 5.10 (Tabela 5.16) ilustram os valores do conteúdo de fósforo total, fosfato e sólidos no sistema 3. A remoção de fosfatos, como indicado anteriormente, foi instável em alguns períodos, não podendo ser relacionada à variação do conteúdo de sólidos voláteis no meio de reação.

A análise dos dados cedidos pela ETE-Shibaura procurou revelar a ocorrência da remoção biológica de fosfatos nos sistemas de reação 1, 2 e 3 durante o período amostrado para avaliação da comunidade microbiana através da técnica do PCR/DGGE. No entanto, deve-se comentar que o desempenho em relação a DBOs (mg/L) nos três perfis realizados nos três sistemas de reação, sempre foi superior a 90%, considerando todas as entradas de alimentação e a saída no último compartimento aeróbio. Vale ressaltar também que os dados são referentes aos meses de novembro de 1999, fevereiro e março de 2000. No mês de fevereiro de 2000, os três sistemas de reação apresentaram menor eficiência, e o mês de março de 2000 a eficiência na remoção dos sistemas foi otimizada. Observou-se que a eficiência da remoção do fósforo (%) na forma de fosfato

(P-PO₄ – mg/L) também foi eficiente, considerando os valores de entrada das alimentações e saída no último compartimento dos três sistemas de reação, sendo superior, em geral, a 70%.

Os valores de pH dos sistemas sempre esteve próximo a neutralidade, favorecendo a ação microbiana pretendida, como também discutido por LIU *et al.* (1996c), que determinaram um efeito deletério do pH sobre o metabolismo anaeróbio, mostrando que maior velocidade de utilização do acetato pelos PAOs ocorria em valores de pH próximos a 6,8.

Os resultados também apontam que o conteúdo de nitratos foi removido nos compartimentos anóxicos nos sistemas estudados, nos períodos analisados, destacando a importância da recirculação interna da mistura líquida dos compartimentos aeróbios para os anóxicos.

A qualidade do efluente tratado reportada na Tabela 5.16 para o sistema de reação 3 no mês de abril, sistema esse semelhante ao Phoredox pode ser comparada a outros sistemas de reação semelhantes, em que observa-se uma quantidade elevada de fósforo total no lodo em excesso descartado. Segundo KORTSTEE *et al.* (2000), em geral, o conteúdo máximo de fósforo no lodo para uma grande maioria de plantas EBPR varia entre 35 a 180 mg/L de fósforo por g de lodo (peso seco).

SAMUDIO (1999) verificou eficiência da ordem de 70% na remoção biológica de fósforo e na remoção de matéria orgânica superior a 90% operados com esgotos sanitários, em um sistema de tratamento piloto, com processo de lodos ativados operado por batelada.

5.3 - Emprego da Técnica PCR/DGGE para análise da comunidade microbiana

Para a análise da comunidade microbiana, utilizando a técnica de PCR/DGGE primeiramente realiza-se a avaliação da relação entre as quantidades de ácidos nucleicos, proteínas e biomassa (“pellet”) presente em cada amostra (item 4.4.3). Tais relações

permitem a obtenção de melhores resultados na etapa de amplificação das amostras para a análise de PCR/DGGE a serem discutidos a seguir.

5.3.1 - Determinação dos conteúdos totais de ácidos nucleicos e de proteínas.

Para um melhor entendimento das relações entre o peso úmido do “pellet” e os ácidos nucleicos e proteínas encontradas em cada amostra estas são representadas graficamente na Figura 5.11. A caracterização das amostras em gramas do “pellet” utilizado para a extração do ácido nucleico, bem como as medidas da concentração de proteínas e ácidos nucleicos presentes nas amostras pode ser visto na Tabela C.1 (no anexo C). Especifica-se também o local e as datas de coleta de cada amostra estudada através da análise da estrutura da comunidade microbiana. A Figura 5.11 mostra a representação gráfica dos valores de concentração dos conteúdos totais de ácidos nucleicos, proteínas e massa em gramas das amostras referidas.

A concentração de proteína nas amostras (produto da extração composto de ácidos nucleicos + proteínas + impurezas) foi proporcional e maior do que a de ácido nucleico (Figura 5.11). Inicialmente o peso úmido do “pellet” variou de 0,012 a 0,066 gramas e a partir da amostra 33 ficou na faixa de 0,018 e 0,32g.

Verificou-se que o aumento da massa em gramas da amostra não foi proporcional a concentração dos conteúdos de proteínas e ácidos nucleicos nas amostras. Assim, optou-se em utilizar o peso úmido do “pellet” próximo a 0,020g, para análise do DGGE, pois este valor poderia diminuir a concentração de substâncias desconhecidas, uma vez que as amostras utilizadas consistiam de diferentes comunidades microbianas em meio complexo.

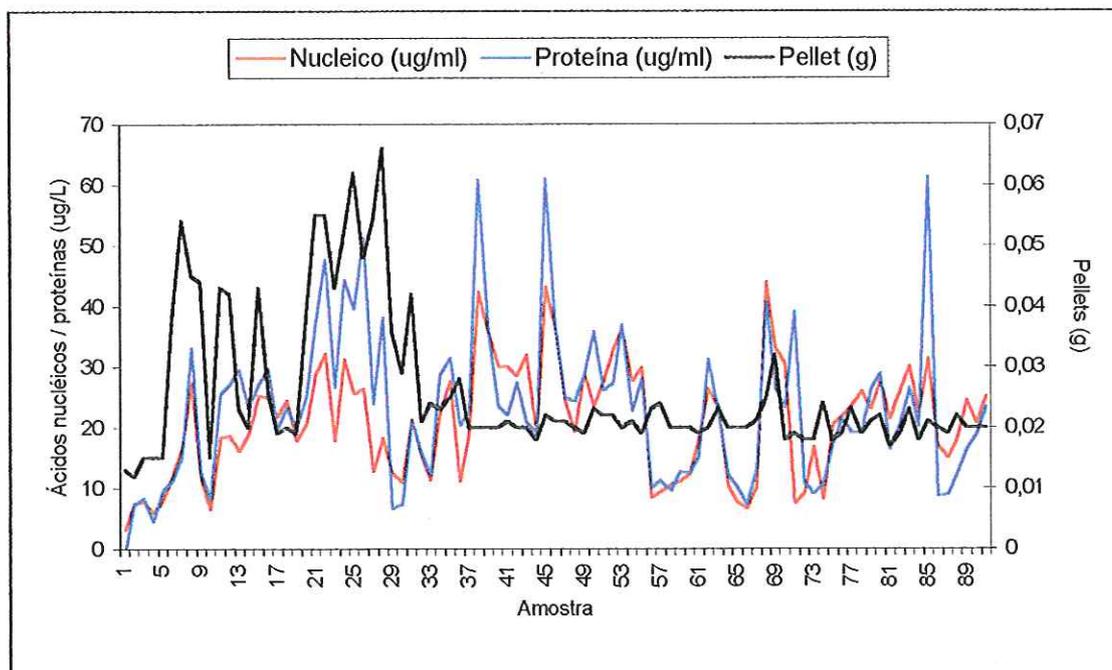


FIGURA 5.11: Representação gráfica dos valores de concentração dos conteúdos totais de ácidos nucleicos e proteína, bem como da massa em gramas das amostras utilizadas na análise da estrutura da comunidade microbiana.

Este procedimento visou encontrar amostras com relação de proteína e ácidos nucleicos entre 1,8-2,0, pois estes eram adequadas na análise de PCR/DGGE.

5.3.2 - Aplicação da Técnica PCR / DGGE para análise das comunidades microbianas

Os resultados apresentados neste item referem-se as análises de PCR/DGGE realizadas com as amostras coletadas nos períodos analisados dos sistemas de reação para a remoção biológica de fósforo. O objetivo maior foi promover a comparação e a avaliação das estruturas e da dinâmica das comunidades bacterianas presentes nos sistemas de reação, verificando uma possível alteração que pudesse ocorrer diariamente, semanalmente e mensalmente na estrutura da comunidade microbiana em função das condições de operação para a remoção de fósforo. Os resultados e discussões sobre a

efetividade da técnica de extração dos ácidos nucleicos, o teste de agarose e o produto da amplificação por PCR e a análise de DGGE serão mostrados nos itens a seguir, considerando as amostras de todos os compartimentos, e amostragens mensais, semanais e diárias do último compartimento aeróbio, que compõem os sistemas.

5.3.2.1 - Resultados da extração de DNA em géis de agarose

Para verificar se a extração dos “templates” foi adequada, as amostras foram previamente avaliadas em gel de agarose 1%. A Figura 5.12 ilustra um dos resultados em gel de agarose, revelando que a extração do material genético foi adequada. O produto da reação de PCR foi também avaliado em gel agarose 4% . Verifica-se que a amplificação dos fragmentos dos ácidos nucleicos, exemplificada na Figura 5.13, foi obtido com sucesso.

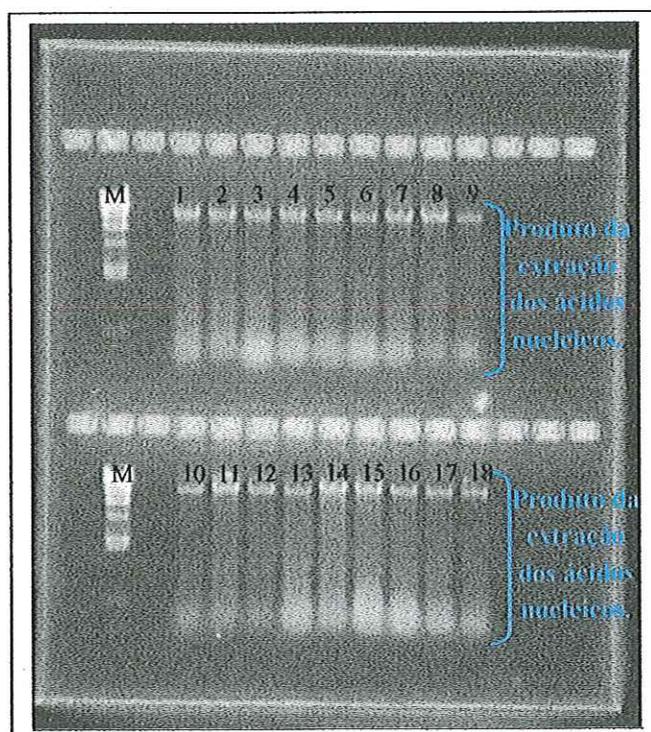


FIGURA 5.12: Foto de gel de agarose 1% - Produto da extração dos ácidos nucleicos.

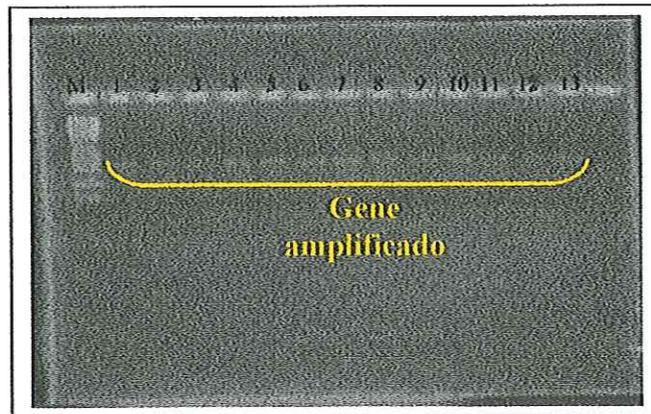


FIGURA 5.13: Gel de agarose 4% do produto de PCR.

5.3.2.2- Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica PCR-DGGE

Neste estudo os resultados da análise do PCR-DGGE mostraram que a separação padrão dos fragmentos dos ácidos nucleicos tiveram diferentes mobilidades, ou seja, ocorrendo a formação de várias bandas, indicando a presença de diversos grupos microbianos.

Iniciou-se a discussão avaliando os grupos microbianos nos compartimentos dos três sistemas de lodos ativados modificados. Em seguida verificou se ocorreu as alterações na estrutura da comunidade bacteriana e comparou-se entre si, ao longo do tempo de operação, utilizando amostras mensais, semanais e diárias, coletadas na última etapa aeróbia.

As especificações de cada linha referente a data de coleta da amostra e o número do sistema de reação estão apresentados nas Tabelas D.1, D.2, D.3 e D.4 (no anexo D).

Para melhor visualização das bandas presentes nos géis de DGGE apresentados neste item, realizou-se algumas ampliações que são mostrados nas Figuras A.5 a A.16 (no anexo A).

Dados referentes aos cálculos dos coeficientes de similaridades utilizados nas representações gráficas estão apresentados nas Tabelas E.1 a E.20 (no anexo E).

➤ Avaliação dos grupos microbianos nos 3 sistemas de reação compartimentados

Devido a dificuldades encontradas na comparação das bandas padrões dos géis de DGGE realizados com amostras mensais e diárias, resolveu-se pela utilização de marcadores como controle positivo. Para tanto as culturas adotadas como marcadores foram *Acinetobacter calcoaceticus* (A.c.), *Cytophaga aquatilis* (C.a.), *Escherichia coli* (E.c.) e *Ralstonia eutropha* (R.e), visto que, essas espécies já haviam sido encontradas no processo de EBPR (WAGNER *et al.*, 1994; BOND *et al.*, 1995).

Na avaliação da estrutura da comunidade microbiana submetidas as condições anaeróbia, anóxica e aeróbia, dos sistemas de reação 1, 2 e 3, utilizando o gel de DGGE da Figura 5.14, realizou-se a representação gráfica da Tabela 5.19, para melhor visualização do perfil das bandas. Em seguida, usou-se a equação do coeficiente de similaridade para comparar os compartimentos de cada sistema individualmente, como mostrado na Figura 5.15, utilizando o número de bandas encontradas nos compartimentos do sistema de reação 1. O coeficiente de similaridade entre os compartimentos dos sistemas de reação 2 e 3 foram iguais, ou seja de 100%, por isso não foram apresentados os gráficos destes perfis.

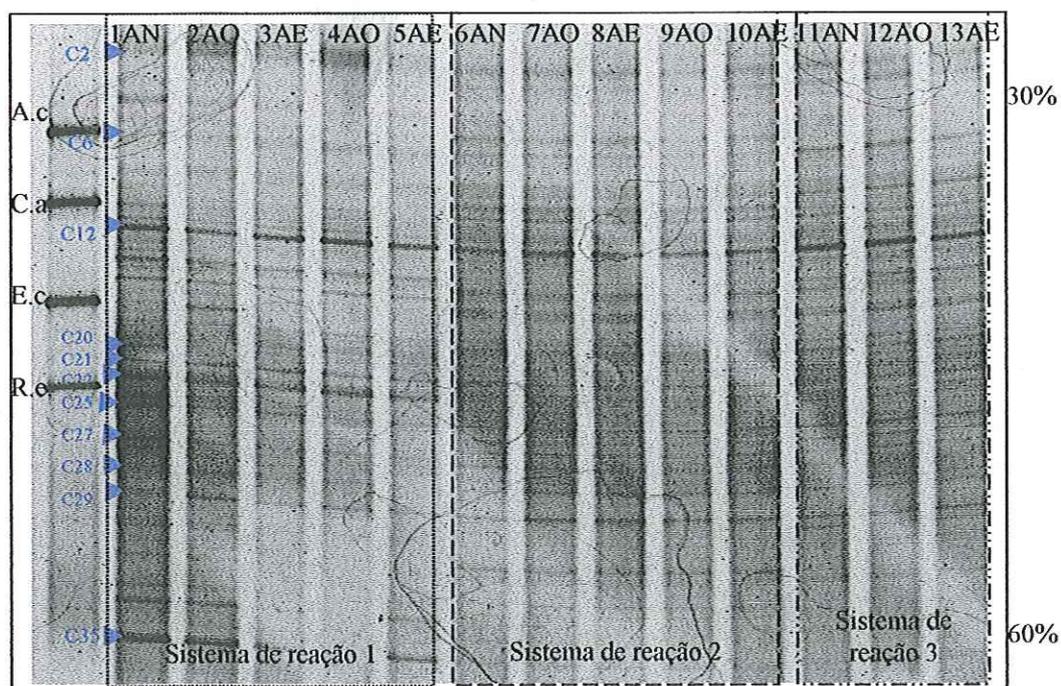


FIGURA 5.14- Gel de DGGE das amostras de três sistemas diferentes de lodos ativados modificados para EBPR (AN: anaeróbio; AO: anóxico; AE: aeróbio).

TABELA 5.18: Representação gráfica do perfil do DGGE (Figura 5.14) de todos os compartimentos de três sistemas de reação de lodos ativados.

N	M	Sistema de reação 1					Sistema de reação 2					Sistema de reação 3			H
		1AN	2AO	3AE	4AO	5AE	6AN	7AO	8AE	9AO	10AE	11AN	12AO	13AE	
1		■	■	■	■	■									05
C2		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
3							■	■	■	■	■	■	■	■	08
4		■	■	■	■	■									05
5							■	■	■	■	■				05
C6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
7												■	■	■	03
9							■	■	■	■	■				05
10							■	■	■	■	■	■	■	■	08
11	■	■	■	■	■	■									05
C12		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
13		■	■	■	■	■						■	■	■	08
14		■				■	■	■	■	■	■	■	■	■	10
15		■	■	■	■	■									05
16							■	■	■	■	■	■	■	■	08
17	■		■												01
18							■	■	■	■	■	■	■	■	08
19							■	■	■	■	■				05
C20		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
C21		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
C22		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
23	■														0
24		■	■	■	■	■									05
C25		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
26							■	■	■	■	■	■	■	■	08
C27		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
C28		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
C29		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
30												■	■	■	03
31		■	■	■	■	■						■	■	■	08
32							■	■	■	■	■				05
33		■	■				■	■	■	■	■	■	■	■	10
34		■	■	■	■	■									05
C35		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
V	4	21	21	19	19	20	22	22	22	22	22	22	22	22	

Legenda: N= posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna, sem levar em consideração as bandas dos marcadores (marcas negras representam as bandas).

Na análise do DGGE (Figura 5.14 e Tabela 5.18) observou-se onze bandas similares, indicadas por C2, C6, C12, C20, C21, C22, C25, C27, C28, C29 e C35, que persistiram nos compartimentos submetidos às condições diferentes (anaeróbia, anóxica e aeróbia) dos três sistemas de reação 1, 2 e 3, sugerindo a existência de onze populações em comuns, nesses três sistemas.

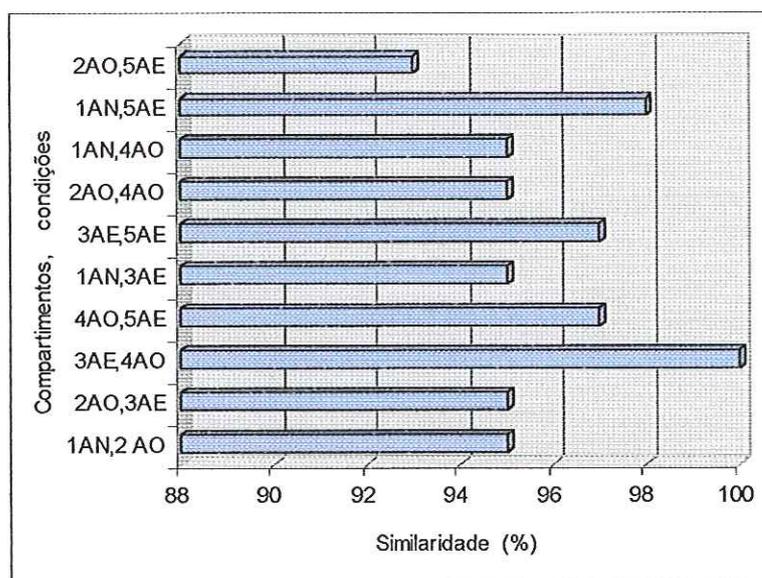


FIGURA 5.15: Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE, entre os compartimentos do sistema de reação 1, a partir do cálculo do coeficiente de similaridade (os números de 1 a 5 referem-se ao número dos compartimentos (Figura 4.1); AN, AO e AE, indicam as condições; anaeróbia, anóxica e aeróbia submetidas pelos compartimentos).

Na Figura 5.15 verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana entre os compartimentos 3 (anaeróbio) e 4 (aeróbio) do sistema de reação 1 possuiu 100% de similaridade, enquanto os compartimentos 2 (anóxico) e o 5 (aeróbio) apresentaram um coeficiente de similaridade menor (93%). O coeficiente de similaridade para os demais compartimentos ficou em torno de 95%. Esses valores, indicam a existência de algumas populações diferentes, com exceção dos compartimentos representados no gel de DGGE pelos números 3 e 4.

O coeficiente de similaridade entre os compartimentos dos sistemas de reação 2 e 3 foram de 100%, sugerindo que as populações mostraram-se similares, possivelmente esteja relacionado ao mesmo tipo de afluente e as condições operacionais próximas.

A Figura 5.16 mostra a comparação das bandas do DGGE calculada a partir do coeficiente de similaridade entre os compartimentos dos sistemas de reação 1 e 2, visando avaliar a similaridade e a variação da estrutura da comunidade microbiana desses sistemas de reação por constituir-se de número igual de compartimentos e estarem submetidos às mesmas condições de alimentação do tipo escalonada,

diferindo no afluente, pois o sistema de reação 1 recebeu parte do lodo do decantador primário.

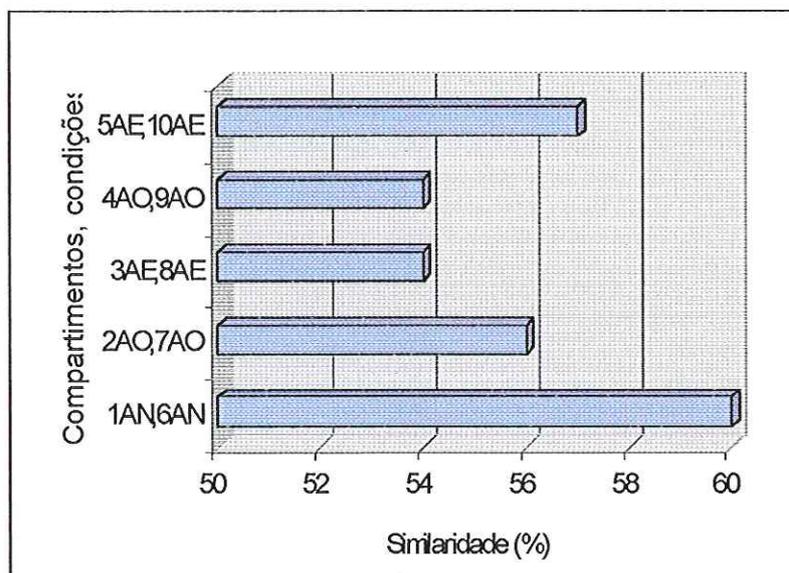


FIGURA 5.16: Representação gráfica da comparação das bandas de DGGE, entre os compartimentos dos sistemas de reação 1 e 2, a partir do cálculo do coeficiente de similaridade (os números de 1 a 10 referem-se ao número dos compartimentos (Figura 4.1); AN, AO e AE, condições anaeróbia, anóxica e aeróbia que os compartimentos foram submetidos).

A Figura 5.16, mostra o coeficiente de similaridade realizada entre os compartimentos dos sistemas de reação 1 e 2. Verificou-se que os compartimentos anaeróbios (colunas 1 e 6) possuíram maior coeficiente de similaridade (60%) e os compartimentos aeróbio (colunas 3 e 8) e anóxico (colunas 4 e 9) apresentaram o menor coeficiente de similaridade (54%). Indicando que no início dos sistemas de reação 1 e 2 a estrutura da comunidade microbiana apresentaram maior similaridade. Lembrando que no estágio anaeróbio há ocorrência de fermentação. E os PAOs utilizam os substratos orgânicos e armazenam como PHB ou PHA, e usam como fonte de energia a hidrólise do poli-P.

O coeficiente de similaridade entre todos os compartimentos dos sistemas de reação 2 e 3 mostrou-se constante (82%). Por essa razão, não se realizou a representação gráfica. Esse resultado indicou a existência de populações semelhantes (82%) e diferentes (18%) nesses sistemas. A variação da estrutura da comunidade

microbiana pode estar relacionada a diferença da configuração, ou seja ao número de compartimentos (cinco e três).

Verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana dos sistemas de reação 2 e 3 apresentou similaridade maior que os sistemas 1 e 2, apesar desses últimos possuírem o mesmo número de compartimentos. A similaridade da estrutura da comunidade microbiana, possivelmente, esteja relacionada com a idade de lodo no sistema e a quantidade do lodo de descarte (Tabela 5.1), visto que estes foram semelhantes nos sistemas de reação 2 e 3, diferindo do sistema 1.

A Figura 5.17 apresenta a comparação das bandas do DGGE, entre o primeiro e o último compartimento dos sistemas de reação 1, 2 e 3, a partir do cálculo do coeficiente de similaridade, pois esses compartimentos foram submetidos às mesmas condições (anaeróbia e aeróbia).

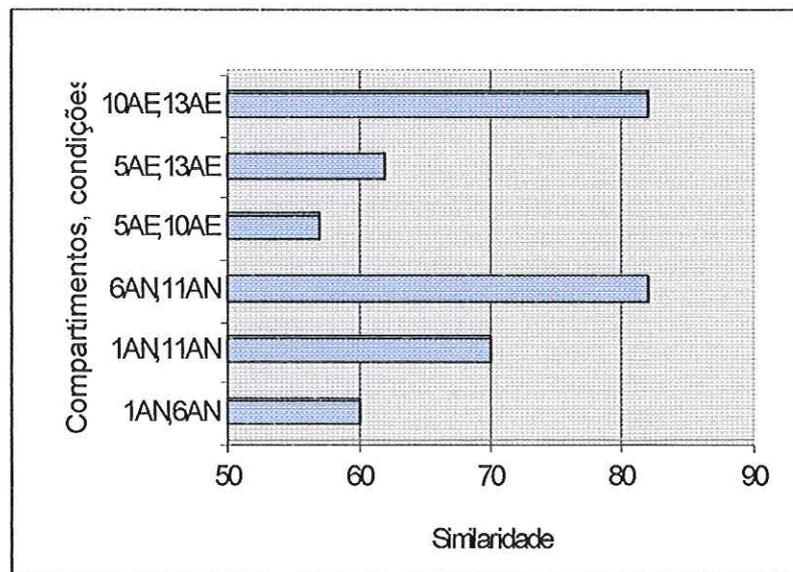


FIGURA 5.17: Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE, entre o primeiro e o último compartimento dos sistemas de reação 1, 2 e 3, a partir do cálculo do coeficiente de similaridade (os números 1, 5, 6, 10, 11 e 13 referem-se ao número do compartimento (Figura 4.1); AN e AE, condições anaeróbia, anóxica e aeróbia que os compartimentos foram submetidos).

Verifica-se na Figura 5.17 que a estrutura da comunidade microbiana dos compartimentos anaeróbio e o aeróbio dos sistemas de reação 2 e 3 apresentaram maior similaridade (82%) entre si em relação aos sistemas de reação 1 e 2. O menor coeficiente de similaridade (57%) foi observado no último compartimento aeróbio

dos sistemas 1 e 2. Comparando o primeiro e o último compartimento (anaeróbio e aeróbio) dos três sistemas com as determinações físico-químicas do perfil 1 (Tabelas 5.7, 5.8 e 5.9), verificou-se que os sistemas de reação 2 e 3 apresentaram valores mais próximos, principalmente, para sólidos em suspensão, e no mesmo período o tempo de detenção também foi igual (Tabela 5.1), sugerindo dessa forma que a semelhança da estrutura da comunidade microbiana, esteja relacionada com o tipo de operação e não com os números de compartimentos.

A Figura 5.18 apresenta a comparação dos três sistemas de reação, a partir do coeficiente de similaridade entre os sistemas 1 e 2; 1 e 3; 2 e 3.

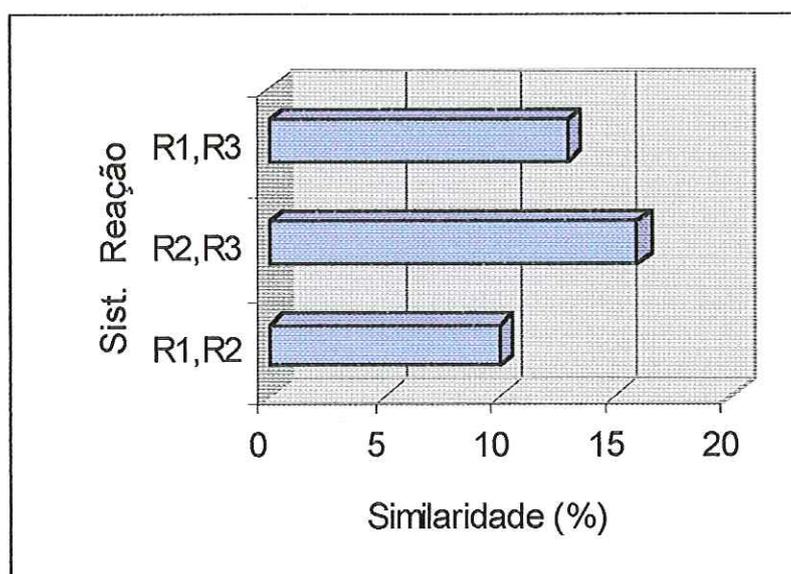


FIGURA 5.18: Representação gráfica da comparação das bandas de DGGE, entre os três sistemas de reação, a partir do cálculo do coeficiente de similaridade. (os números R1, R2 e R3 referem-se ao número do sistema de reação).

A partir da análise do DGGE, em todos os compartimentos dos três sistemas de reação (Figura 5.18), verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana apresenta uma grande diversidade e o coeficiente de similaridade dos sistemas de reação diferiram entre si. Como mostrado na Figura 5.18, os sistemas de reação 2 e 3 apresentaram maior similaridade (16%) entre si do que os sistemas de reação 1 e 2 (10%), possivelmente esteja relacionada ao tempo de detenção do sistema de reação 1 que foi abaixo dos sistemas 2 e 3 (Tabela 5.1), além disso, o sistema de reação 1

recebe parte do lodo do decantador primário, como já mencionado, diferindo assim um pouco no tipo de afluente.

Segundo MATSUO *et al.* (2000) a semelhança da estrutura da comunidade microbiana presente nesses sistemas esta relacionada com a similaridade do afluente que é predominante de esgoto sanitário e também porque de maneira geral apresentam condições operacionais semelhantes.

Os resultados das análises do DGGE a seguir referem-se as amostras coletadas na última etapa aeróbia dos três sistemas de reação. Foram agrupadas no mesmo gel amostras mensais, semanais e diárias, com intuito de facilitar a avaliação e a comparação das estruturas da comunidade microbiana no decorrer do tempo.

➤ ***Comparação da estrutura da comunidade microbiana nos três sistemas de reação - amostragens mensais.***

Os resultados das análises do DGGE a seguir referem-se as amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia dos três sistemas de reação, estas foram agrupadas no mesmo gel, com intuito de facilitar a avaliação e a comparação das estruturas da comunidade microbiana no decorrer do tempo.

A Figura 5.19 apresenta a estrutura da comunidade microbiana de amostras coletadas mensalmente no último compartimento aeróbio dos três sistemas de reação, realizadas através da análise de PCR/DGGE. A Tabela 5.20 mostra a representação gráfica das bandas presente no gel de DGGE referente a Figura 5.19. As Figuras 5.20; 5.21 e 5.22 indicam a comparação das estruturas das comunidades microbianas presentes nos sistemas de reação 1, 2 e 3 em intervalos de um mês, a partir do coeficiente de similaridade.

O perfil das bandas de DGGE apresentado na Figura 5.19 e na Tabela 5.19 mostraram que cinco populações indicadas por M5, M7, M13, M21, M32, persistiram nos sistemas de reação 1, 2 e 3, num período de 5 meses (novembro de 1999 a março de 2000). Verificou-se também o surgimento e desaparecimento de algumas bandas no decorrer do tempo.

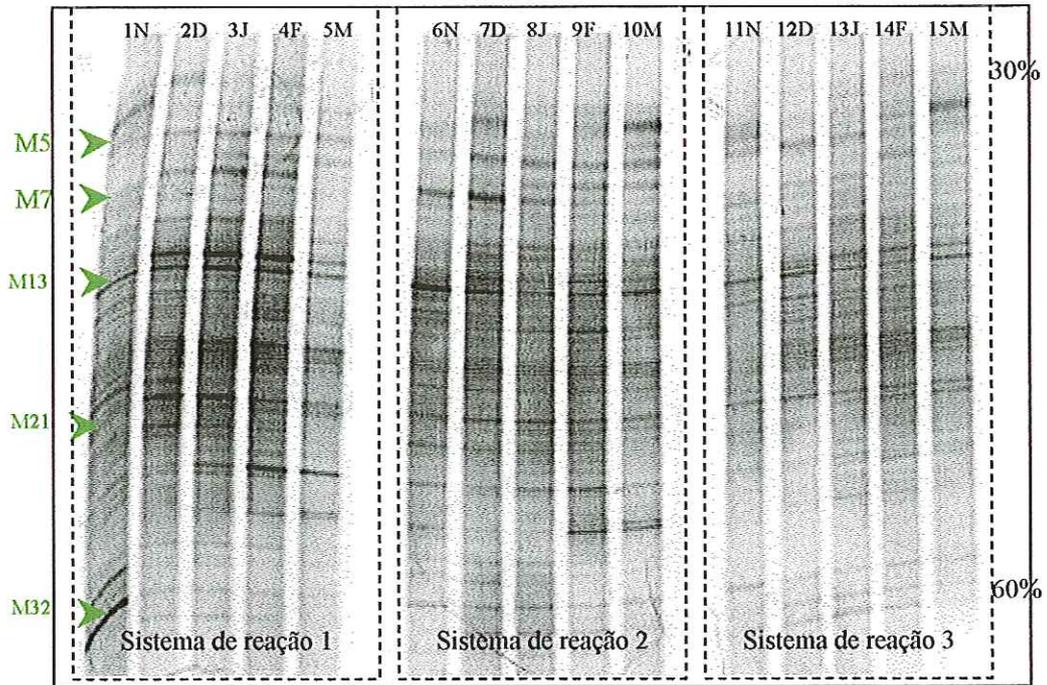


FIGURA 5.19: Gel de DGGE das amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia nos três sistemas de reação (N=novembro; D=dezembro; J=janeiro; F=fevereiro; M=março).

TABELA 5.19: Perfil da análise do DGGE, amostragem mensal (Figura 5.19).

N	Sistema de reação 1					Sistema de reação 2					Sistema de reação 3					H
	1N	2D	3J	4F	5M	6N	7D	8J	9F	10M	11N	12D	13J	14F	15M	
1	■	■		■			■	■	■	■						07
2	■			■	■				■							06
3						■				■		■				05
4											■		■	■	■	03
M5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15
6	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	11
M7	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15
8				■		■										12
9			■	■		■					■	■	■	■	■	08
10	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	14
11					■		■	■	■	■			■	■	■	08
12	■	■		■				■	■	■	■		■	■	■	13
M13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15
14	■	■	■	■		■	■	■			■	■	■	■		12
15	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						10
16	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	14
17		■	■		■						■	■	■	■	■	08
18	■	■	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
19	■	■	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
20	■	■	■													03
M21	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15
22		■	■	■	■			■	■	■	■		■	■	■	11
23									■	■						02
24	■	■	■	■							■	■		■	■	06
25	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■		■	■		12
26		■	■	■		■	■	■			■	■	■	■	■	11
27									■				■	■	■	03
28					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		10
29	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						10
30	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						10
31	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						07
M32	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15
33											■	■	■	■	■	12
34							■	■	■	■	■	■	■	■	■	08
V	20	23	25	24	18	22	24	25	24	25	22	18	21	24	22	

Legenda: N= posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna, sem levar em consideração as bandas dos marcadores.

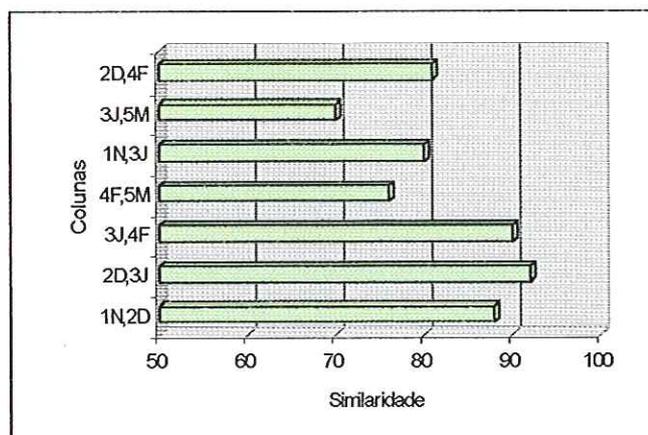


FIGURA 5.20: Representação gráfica do coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas mensalmente no último compartimento do sistema de reação 1 (1N=novembro; 2D=dezembro; 3J=janeiro; 4F=fevereiro; 5M=março).

A partir do coeficiente de similaridade das bandas de DGGE que comparou as amostras mensais do sistema de reação 1, verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana apresentou maior similaridade entre os meses de dezembro (coluna 2D) e janeiro (coluna 3J), que foi de 92% e menor similaridade entre os meses de fevereiro (coluna 4F) e março (coluna 5M), com valor de 76%. No entanto, quando se comparou o intervalo de dois meses, o menor coeficiente de similaridade ocorreu entre janeiro (coluna 3J) e março (coluna 5M), tendo sido de 70%, como pode ser visto na Figura 5.20. O baixo valor do coeficiente de similaridade, sugerindo uma mudança na estrutura da comunidade microbiana, no mês de fevereiro de 2000, possivelmente esteja relacionada a diminuição do índice de recirculação (Tabela 5.2), ao período de seca que poderia ter aumentado a relação dos teores de $P_{total}:DBO_{solúvel}$ (0,66), prejudicando assim a atividade dos PAOs na remoção de fosfatos do meio como verificado na Figura 5.6. O tempo de detenção de sólidos também foi alterado de 5,88 dias para 10,50 dias (Tabela 5.1).

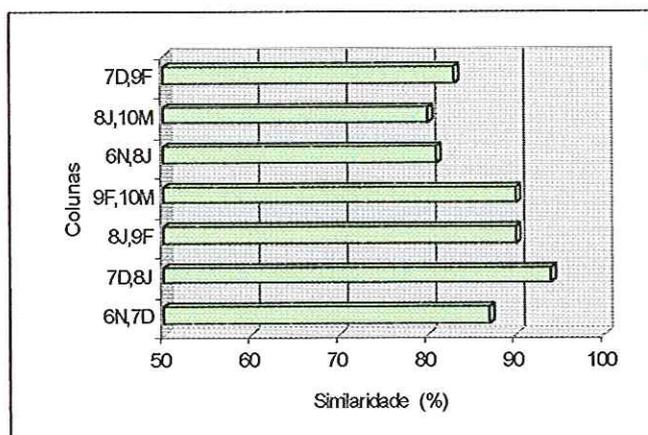


FIGURA 5.21: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas mensalmente no último compartimento do sistema de reação 2. (6N=novembro; 7D=dezembro; 8J=janeiro; 9F=fevereiro; 10M=março).

Como apresentado na Figura 5.21, o sistema de reação 2 apresentou maior coeficiente de similaridade entre os meses de dezembro (coluna 7D) e janeiro (coluna 8J) com valor de 94%, e o menor nos meses de novembro (coluna 6N) e dezembro (coluna 7D) que foi de 87%. Quando comparou-se períodos de dois meses o coeficiente de similaridade mais baixo ocorreu, entre janeiro (coluna 8J) e março (coluna 10M) com valor de 80%. Verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana do sistema de reação 2, apresentou maior coeficiente de similaridade do que o sistema 1, possivelmente, porque este sistema não sofreu alteração no tempo de detenção de sólidos.

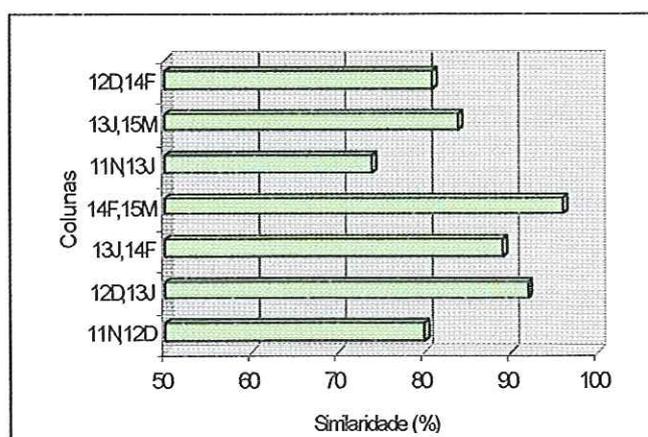


FIGURA 5.22: Coeficiente de similaridade entres as bandas de DGGE das amostras coletadas mensalmente no último compartimentos do sistema de reação 3. (11N=novembro; 12D=dezembro; 13J=janeiro; 14F=fevereiro; 15M=março).

A estrutura da comunidade microbiana mostrou maior similaridade no sistema de reação 3, entre os meses de fevereiro (coluna 14F) e março (coluna 15M) com valor de 96% e o menor coeficiente de similaridade ocorreu nos meses de novembro (coluna 11N) e dezembro (coluna 12D) que foi de 80%. Porém, quando comparou-se os intervalos de dois meses, o menor coeficiente de similaridade ocorreu entre novembro (coluna 11N) e janeiro (coluna 13J) como apresentado na Figura 5.22. Os coeficientes de similaridade do sistema de reação 3, comportou-se diferente dos outros dois sistemas, possivelmente porque a operação realizada também foi diferente, durante o período de amostragens que foi de novembro de 1999 a março de 2000. Neste sistema, o índice de recirculação foi maior (53% a 85%), em relação aos sistemas de reação 1 e 2 (Tabelas 5.1 a 5.6), e esse índice não foi alterado em fevereiro como ocorreu com os outros dois sistema de reação.

Os dados apresentados nas Figuras 5.20, 5.21 e 5.22 indicam que de um mês para outro ocorreu uma variação temporal na estrutura da comunidade microbiana, podendo estar relacionada mais a alteração de operação da estação piloto e o período de seca, do que com a temperatura. FERRIS & WARD (1997) observaram que a distribuição espacial das populações bacterianas foi definida de acordo com o gradiente térmico. No entanto, CHEN (1999) constatou que a variação da temperatura não foi significativa para a estrutura microbiana, quando comparou amostras de sistema de lodos ativados convencional com o sistema EBPR observou uma grande diferença nas estruturas microbianas.

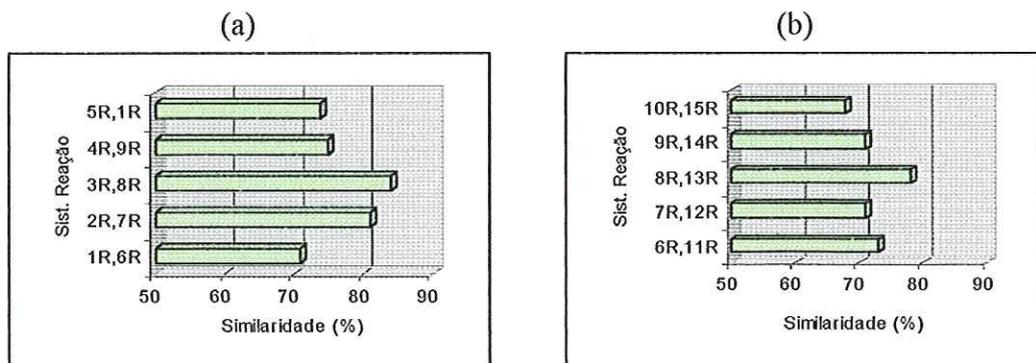


FIGURA 5.23: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas mensalmente. (a) comparou-se amostras coletadas no mesmo período entre os sistemas de reação 1 e 2; (b) comparou-se amostras coletadas no mesmo período entre os sistemas de reação 2 e 3 (1R=sist. reação 1; 2R=sist. reação; 3R= sist. reação 3).

A Figura 5.23a apresenta o coeficiente de similaridade entre amostras coletadas no último compartimento aeróbio dos sistemas de reação 1 e 2. Verificou-se que o coeficiente de similaridade foi maior em janeiro (84%), e o menor em novembro com 70% de similaridade, possivelmente esteja relacionado ao baixo tempo de detenção dos sólidos (Tabela 5.1) no sistema de reação 1 (Tabela 5.2).

O coeficiente de similaridade dos sistemas de reação (2 e 3), observou-se que o maior coeficiente de similaridade (78%) foi no mês de janeiro, coincidindo com a comparação anterior (sistemas de reação 1 e 2), e o menor coeficiente ocorreu no mês de março com valor de 68%, podendo estar relacionada a mudança do índice de recirculação interna que foi aumentado no sistema de reação 2. Lembrando que o sistema de reação 3 foi sempre operado com índice de recirculação superior aos dos sistemas 1 e 2. A partir das Figuras 5.23a e 5.23b verificou-se que a estrutura das comunidades microbianas entre os sistemas de reação 1 e 2 apresentaram maior similaridade, possivelmente, porque o tipo de operação foram próximos.

Ressaltando que no último compartimento aeróbio dos três sistemas de reação, ocorre o crescimento dos PAOs, utilização de PHA como fonte de energia e de carbono na recuperação dos níveis de glicogênio e de poli-P (LIU *et al.*, 1996d).

➤ ***Comparação da estrutura da comunidade microbiana nos três sistemas de reação - amostragens semanais.***

A Figura 5.24 mostra as estruturas das comunidades microbianas presentes no último compartimento do sistemas de reação 1 no intervalo de uma semana. Na Tabela 5.20 pode ser visto a representação do perfil das bandas de DGGE de amostras coletadas durante 19 semanas, do sistema de reação 1. A Figura 5.25 apresenta a comparação dessas amostras pelo cálculo do coeficiente de similaridade presentes no sistema de reação 1.

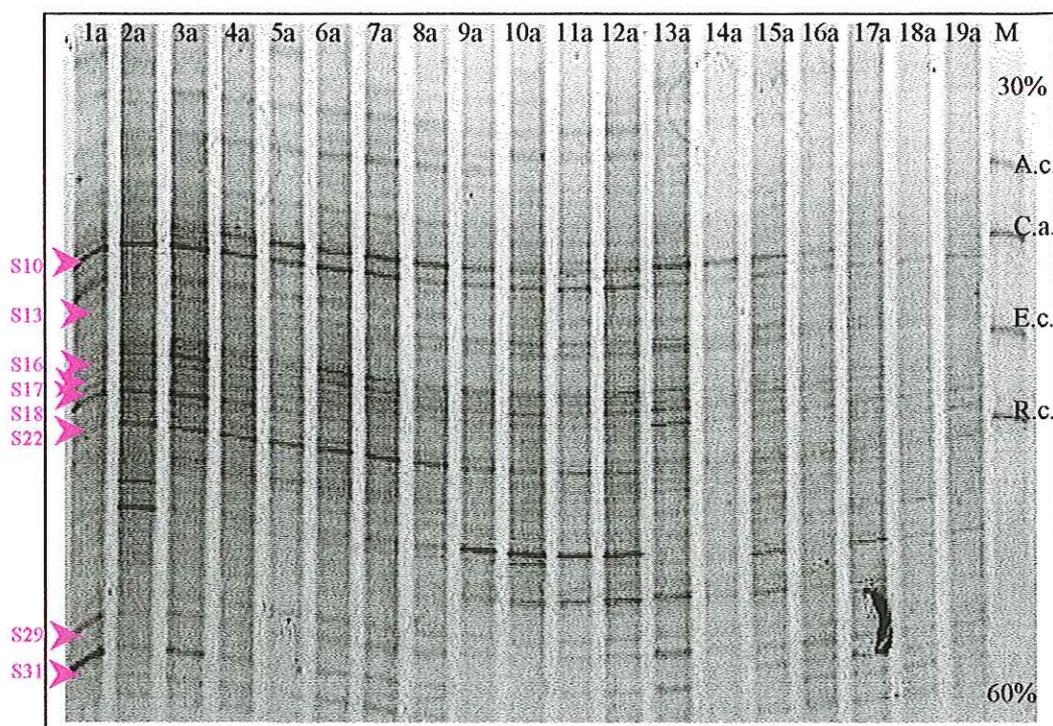


FIGURA 5.24: Gel de DGGE das amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 1 (1a a 19a equivalem as amostras coletadas por 19 semanas).

TABELA 5.20: Perfil das bandas na análise do DGGE, com amostragens semanais, do sistema de reação 1.

N	M	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	11a	12a	13a	14a	15a	16a	17a	18a	19a	H	
1		■			■	■															03	
2								■	■	■	■	■	■	■								07
3		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		17
4																						08
5		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								13
6	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	14
7		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■			■	■	■	17
8			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					■	■	■	08
9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	17
S10		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
11		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	17
12			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
S13		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
14					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								05
15	■																					0
16			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	14
S17		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
S18		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
S19		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
20		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	14
21	■																					0
22			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	03
S23		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
24		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
25											■	■	■		■	■	■					06
26		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	09
27		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15
28										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	11
29		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
S30		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
31															■	■	■	■	■	■	■	06
S32		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
33		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	17
34			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
V	4	20	25	25	25	23	25	25	24	24	25	27	26	22	19	20	19	21	16	19		

Legenda: N= posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna, sem levar em consideração as bandas dos marcadores.

A partir da análise de DGGE, observou-se que oito bandas indicadas por S10, S13, S16, S17, S18, S22, S29 e S31 (Figura 5.24 e Tabela 5.20), indicando presença de bandas similares que persistiram durante 19 semanas. Verificou-se também o surgimento e desaparecimento de algumas bandas.

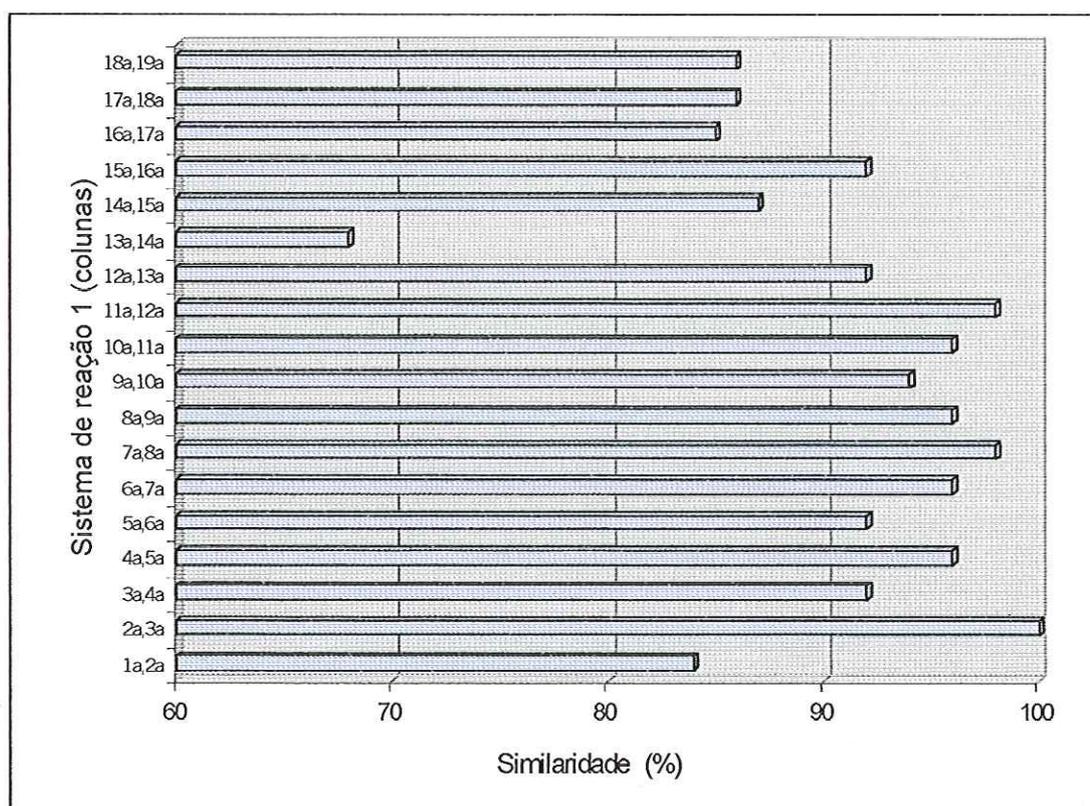


FIGURA 5.25: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE de amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 1 (1a a 19a referem-se as amostras coletadas por 19 semanas).

O coeficiente de similaridade apresentado na Figura 5.25 do sistema de reação 1, verificou-se que a maioria apresentaram alta similaridade, com valor superior a 90% referente as amostras coletadas no início de dezembro até o final de março, além das últimas semanas de abril (coluna 15s e 16s), com exceção das colunas 13s e 14s, referente a última semana de março e segunda semana de abril que foi de 68%.

A partir desses dados, verificou-se que as estruturas das comunidades microbianas não sofreram mudanças significativas com as alterações de temperatura ambiente entre a faixa de 7°C a 24 °C, estando de acordo com o trabalho de CHEN (1999), que analisou amostras de lodos ativados localizadas em regiões muito fria,

(Hokkaido), amena (Tokyo) e quente (Okinawa), e verificou que não teve grande variações, no entanto, observou que algumas amostras de mesma região apresentavam mais bandas em comum.

O gel de DGGE (Figura 5.26) mostra as estruturas das comunidades microbianas presentes no último compartimento do sistemas de reação 2 no intervalo de uma semana (19 amostras). Na Tabela 5.21 pode ser visto a representação do perfil das bandas de DGGE de amostras coletadas no período de 19 semanas, no sistema de reação 2. A Figura 5.27 apresenta a comparação dessas amostras pelo calculo do coeficiente de similaridade presentes no sistema de reação 2.

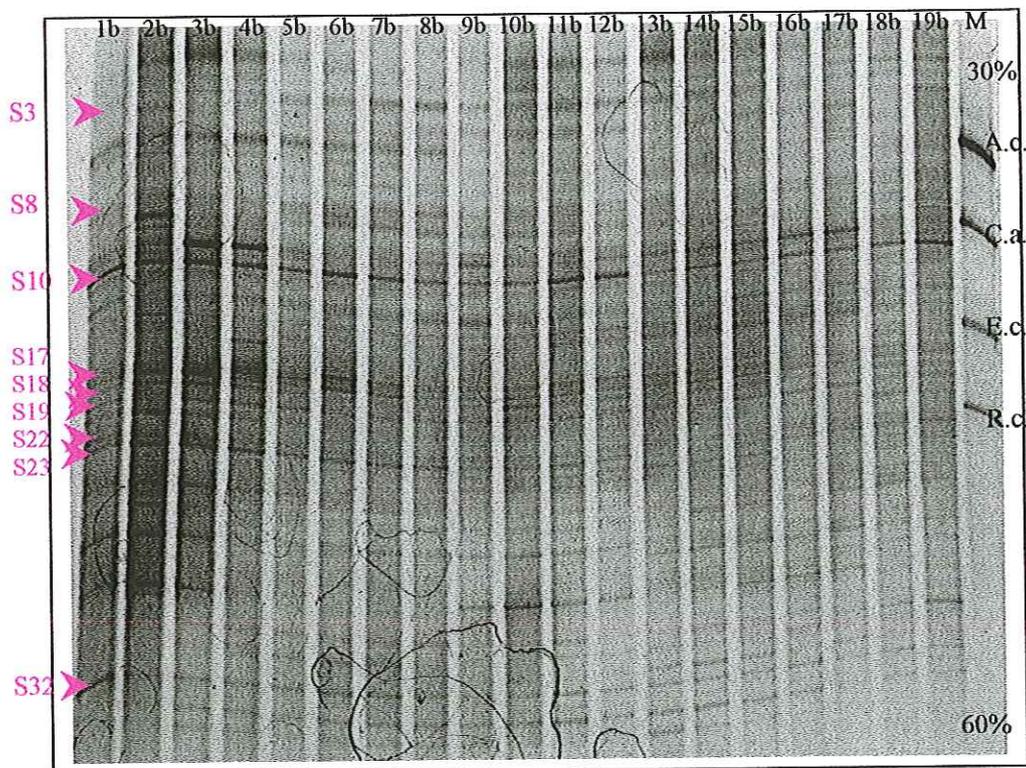


FIGURA 5.26: Gel de DGGE das amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 2 (1b a 19b referem-se as amostras coletadas por 19 semanas).

TABELA 5.21: Perfil das bandas na análise do DGGE, com amostragens semanais, do sistema de reação 2 (Figura 5.26).

N	M	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b	10b	11b	12b	13b	14b	15b	16b	17b	18b	19b	H	
1			■	■	■	■					■	■	■	■	■	■					10	
2			■	■	■	■					■	■	■	■	■	■			■	■	■	11
S3		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
4			■	■	■	■			■	■	■	■	■	■	■	■						13
5			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						11
6	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	16
7			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						12
S8		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
9	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	16
S10		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
11			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	17
12																			■	■	■	03
13			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	17
14			■	■	■	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15
15	■					■																02
16			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
S17		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
S18		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
S19		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
20			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	14
21	■																					0
S22		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
S23		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
24																				■	■	11
25			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	11
26			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
27																					■	06
28			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
29			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	17
30						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	05
31											■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	09
S32		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19
33			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
34			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
V	4	22	27	26	27	24	21	25	25	24	27	27	24	24	24	25	22	25	21	21		

Legenda: N= posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna, sem levar em consideração as bandas dos marcadores.

A partir da análise de DGGE, observou-se que nove bandas indicadas por S3, S8, S10, S17, S18, S19, S22, S23 e S32 (Figura 5.26 e Tabela 21) sugerindo que essas populações eram similares e persistiram por 19 semanas. Verificou-se também o surgimento e o desaparecimento de algumas bandas no decorrer do tempo.

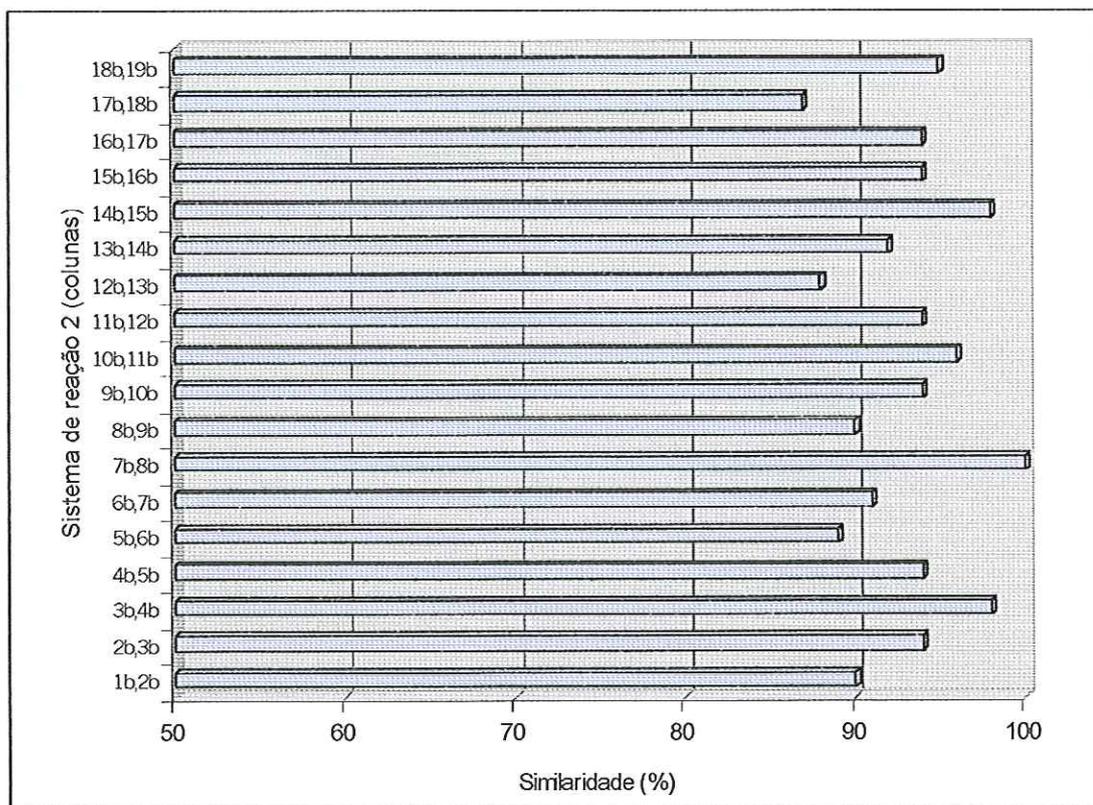


FIGURA 5.27: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE de amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 2 (1b a 19b referem-se às amostras coletadas por 19 semanas).

No caso do sistema de reação 2, a maioria dos valores do coeficiente de similaridade foi de 90%, enquanto o menor foi de 87% entre as colunas 17b e 18b referente às semanas do mês de maio. Verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana apresentou maior coeficiente de similaridade que o sistema de reação 1, possivelmente, porque o sistema de reação 2 foi operado com menos alteração que o sistema 1, além de não receber o lodo do decantador primário.

A Figura 5.28 apresenta as estruturas das comunidades microbianas presentes no último compartimento dos sistemas de reação 3 no intervalo de uma semana. Na Tabela 5.22 mostra a representação do perfil das bandas de DGGE de amostras coletadas em 19 semanas, no sistema de reação 3. Na Figura 5.29 pode ser visto a comparação dessas amostras pelo cálculo do coeficiente de similaridade presentes no sistema de reação 3.

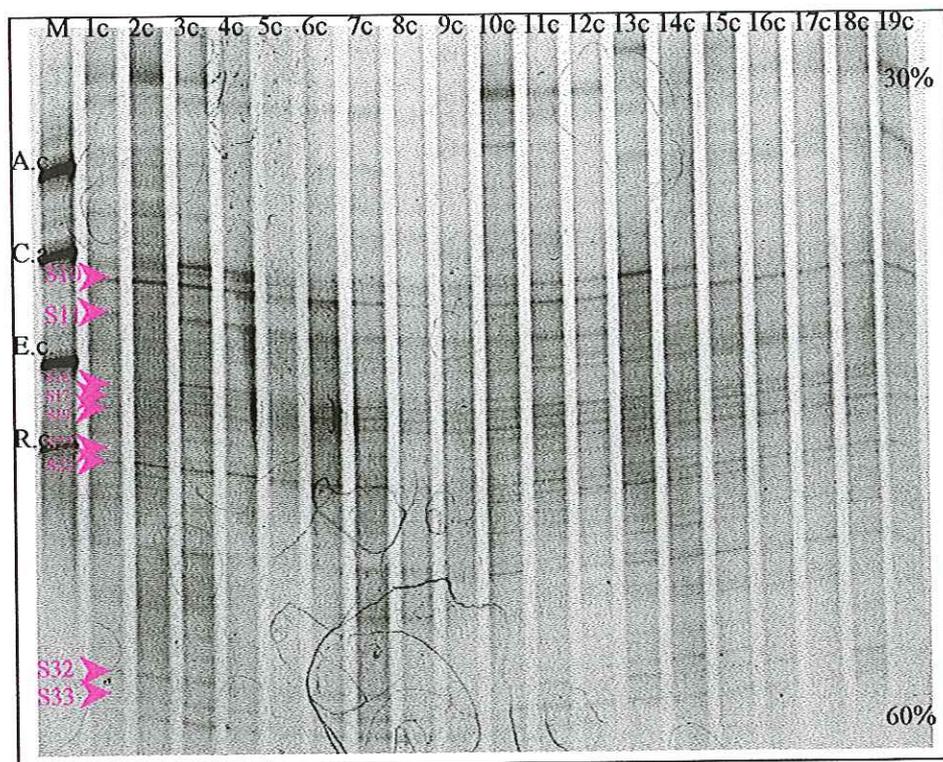


FIGURA 5.28: Gel de DGGE das amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 3 (1c a 19c referem-se as amostras coletadas por 19 semanas).

TABELA 5.22: Perfil das bandas na análise do DGGE, das amostragens semanais, do sistema de reação 3 (Figura 5.28).

N	M	1c	2c	3c	4c	5c	6c	7c	8c	9c	10c	11c	12c	13c	14c	15c	16c	17c	18c	19c	H	
1																						01
2																						11
3																						13
4																						04
5																						11
6																						09
7																						09
8																						02
9																						17
S10																						19
S11																						19
12																						18
13																						18
14																						0
15																						05
S16																						19
S17																						19
18																						16
S19																						19
20																						16
21																						0
S22																						19
S23																						19
24																						12
25																						02
26																						05
27																						14
28																						16
29																						09
30																						12
31																						11
S32																						19
S33																						19
34																						10
V	4	22	26	25	20	18	20	21	21	24	25	24	26	25	23	20	17	17	20	18		

Legenda: N= posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna, sem levar em consideração as bandas dos marcadores.

A partir da análise de DGGE, verificou-se que nove bandas indicadas por S10, S11, S16, S17, S19, S22, S23, S32 e S33 (Figura 5.28 e Tabela 22) estavam presentes em 19 semanas.

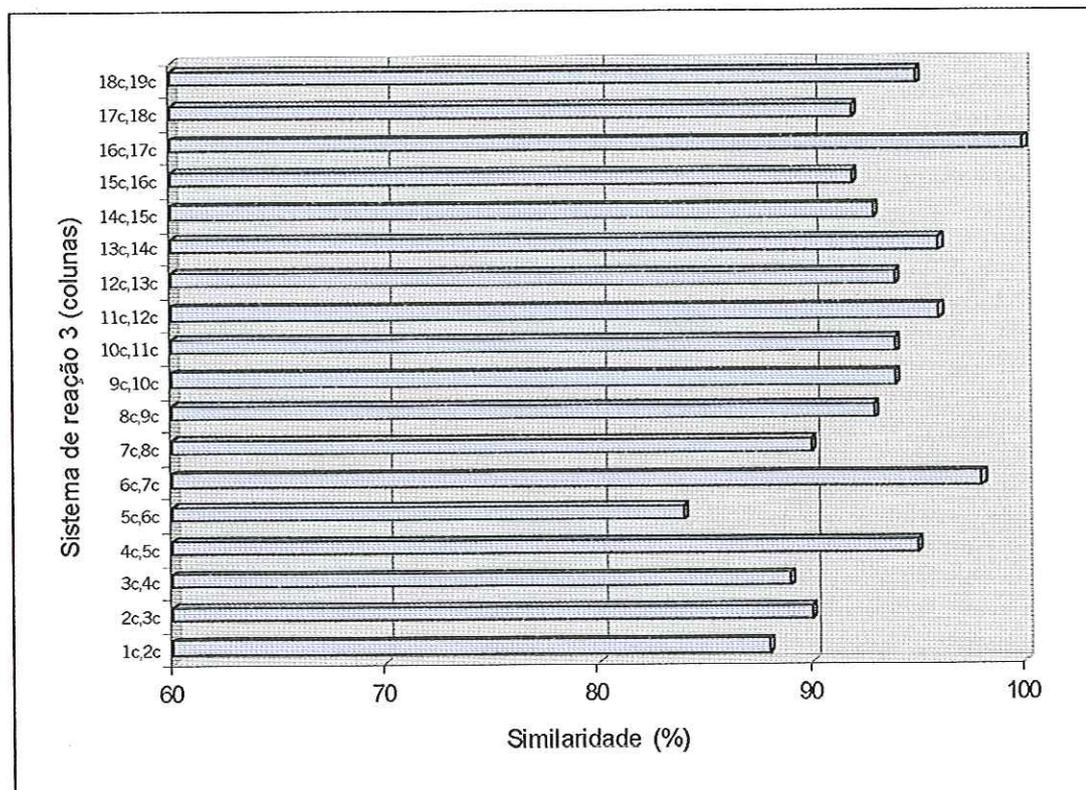


FIGURA 5.29: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE de amostras coletadas semanalmente no último compartimento do sistema de reação 3 (1c a 19c referem-se às amostras coletadas por 19 semanas).

No caso do sistema de reação 3, a estrutura da comunidade microbiana apresentou o coeficiente de similaridade acima de 90% na maioria das comparações como pode-se visto na Figura 5.29, e o menor foi de 84% quando comparou-se as colunas 5c e 6c referente às semanas de dezembro.

A partir dos resultados obtidos pela técnica do DGGE com amostras coletadas semanalmente por um período de 19 semanas, no último compartimento aeróbio dos sistemas de reação 1, 2 e 3, verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana é complexa, ou seja apresenta uma grande diversidade, e ocorreu pouca variação ao longo do tempo. É possível observar que a variação da estrutura da comunidade microbiana foi maior quando comparado entre os três sistemas de reação.

CHEN (1999) observou também que amostras de lodos ativados em 15 estação de tratamento de águas residuárias localizada no norte ao sul do Japão apresentou uma estrutura complexa, representado pelo número de bandas do DGGE. A partir da análise do DGGE do presente trabalho e de CHEN (1999) pode-se concluir que a comunidade microbiana submetido a mesma configuração no tratamento de águas residuárias, tende possuir maior número de bactérias em comuns.

➤ *Comparação da estrutura da comunidade microbiana nos três sistemas de reação - amostragens diárias.*

A Figura 5.30 apresenta o perfil das bandas da análise de DGGE, da amostragem diária. A Tabela 5.23 refere-se a representação gráfica equivalentes as bandas presentes no gel de DGGE. As Figuras 5.31, 5.32 e 5.33 indicam os coeficientes de similaridades entre os dias de coletas, realizadas nos sistemas de reação 1, 2 e 3. Na Figura 5.34 comparou-se amostras coletadas na mesma data, entre sistemas de reação 1 e 2; 2 e 3, com objetivo de verificar qual deles apresentou maior similaridade, pois os sistemas de reação 1 e 2 apresentaram os mesmos números de compartimentos, mas afluente diferente, enquanto, os sistemas de reação 2 e 3 constituíram de diferentes números de compartimentos e afluentes iguais, como mencionado anteriormente.

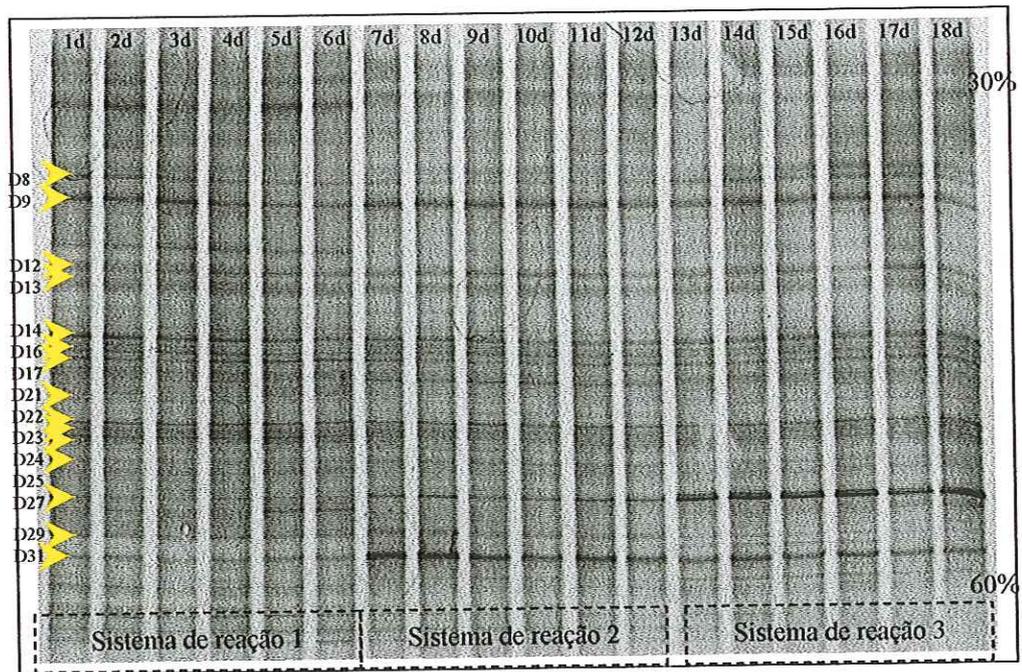


FIGURA 5.30: Gel de DGGE das amostras coletadas diariamente, em seis dias consecutivos, nos sistemas de reação 1, 2 e 3 (1d a 6d referem-se as amostras coletadas no sist. reação 1; 7d a 12d referem-se as amostras coletadas no sist. reação 2; 13d a 18d referem-se as amostras coletadas no sist. reação 3).

TABELA 5.24: Perfil das bandas de DGGE, das amostras coletadas diariamente, em seis dias consecutivos, nos três sistemas de reação.

N	Sistema de reação 1						Sistema de reação 2						Sistema de reação 3						H
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	
1	■	■	■	■	■	■													08
2							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
3	■	■	■	■	■	■													12
4							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	06
5	■	■	■	■	■	■													12
6							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	06
7		■	■	■	■	■													07
D8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
D9	■	■	■	■	■	■													18
10							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
11	■	■	■	■	■	■													06
D12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
D13	■	■	■	■	■	■													18
D14	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
15	■	■	■	■	■	■													13
D16	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
D17	■	■	■	■	■	■													18
18	■	■	■	■	■	■													12
19							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
20	■	■	■	■	■	■													12
D21	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
D22	■	■	■	■	■	■													18
D23	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
D24	■	■	■	■	■	■													18
D25	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
26	■	■	■	■	■	■													12
D27	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
28	■	■	■	■	■	■													06
D29	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
30							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
D31	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18
32							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12
33	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	14
34	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	16
V	28	29	28	27	27	27	27	27	27	27	26	26	25	25	24	24	24	24	

Legenda: N= posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna, sem levar em consideração as bandas dos marcadores.

O perfil das bandas na análise de DGGE mostrado na Figura 5.30 observou-se um grande número de populações similares num total de 15, indicadas por D8, D9, D12, D13, D14, D16, D17, D21, D22, D23, D24, D25, D29 e D31, presentes nos três sistemas de reação no período de 22 a 29 de fevereiro de 2000.

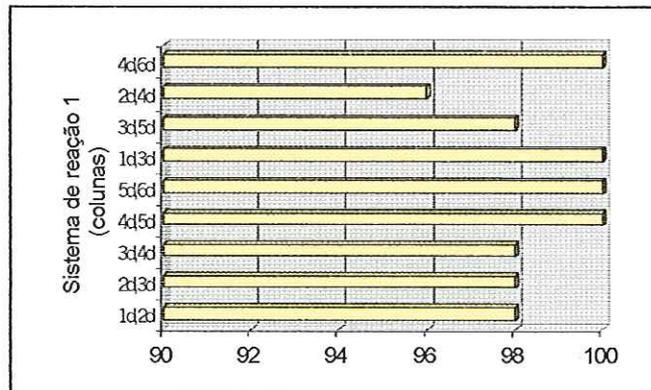


FIGURA 5.31: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas diariamente no último compartimento do sistema de reação 1. (1d a 6d referem-se aos seis dias consecutivos de coleta)

O coeficiente de similaridade calculada a partir do perfil das bandas de DGGE apresentaram três valores, os maiores de 100%, os médios de 98% e o menor de 96%. Esta análise mostrou a existência de várias bandas (“populações”) similares presentes no sistema de reação 1.

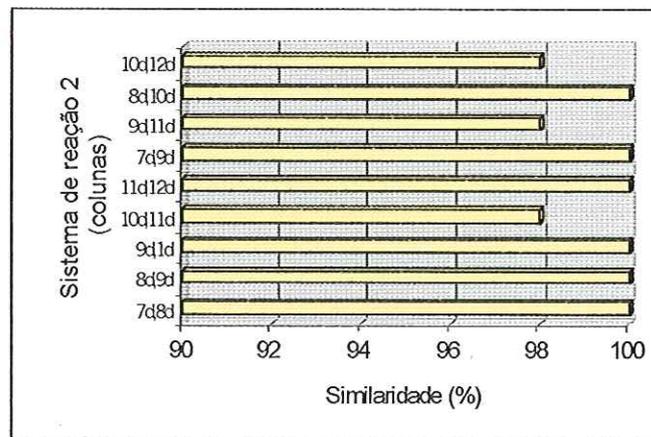


FIGURA 5.32: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas diariamente no último compartimento do sistema de reação 2 (7d a 12d, referem-se aos seis dias consecutivos de coletas).

No caso do sistema de reação 2, a estrutura da comunidade microbiana apresentou dois valores no cálculo do coeficiente de similaridade, sendo que os maiores foi de 100% e os menores de 98% como mostrado na Figura 5.32. Isso indicou que no período de 22 a 29 de fevereiro de 2000, as bandas também eram similares.

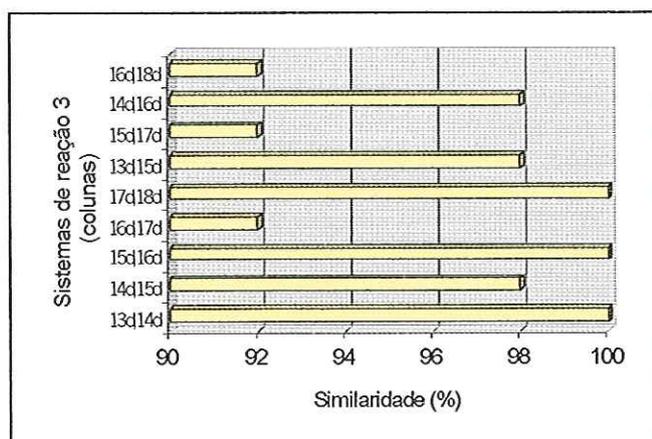


FIGURA 5.33: Coeficiente de similaridade das bandas de DGGE das amostras coletadas diariamente do sistema de reação 3. (13d a 18d referem-se aos seis dias consecutivos de coletas).

O coeficiente de similaridade calculada a partir do perfil das bandas de DGGE, apresentou três valores o maior foi de 100%, o médio de 98% e menor de 92%, como pode ser visto na Figura 5.33. Indicando que a estrutura da comunidade microbiana apresentaram mudanças insignificativas.

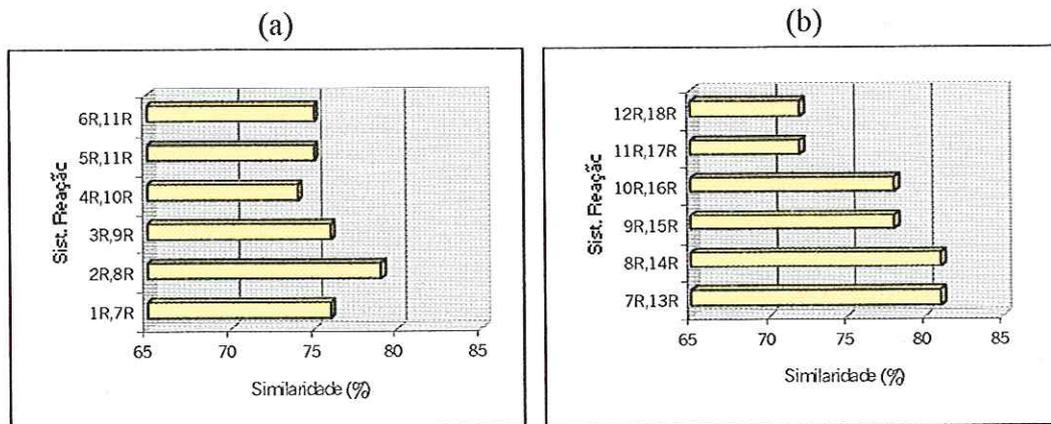


FIGURA 5.34: Coeficiente de similaridade das amostras coletadas diariamente no último compartimento dos três sistemas de reação. (a) comparou-se amostras coletadas nas mesmas datas nos sistemas de reação 1 e 2; (b) comparou-se amostras coletadas nos mesmos dias nos sistemas de reação 2 e 3 (1R a 18R referem-se as colunas comparadas).

Na comparação da estrutura da comunidade microbiana calculada a partir dos coeficientes de similaridade, entre os sistemas de reação 1 e 2 (Figura 5.34a), observou-se que o coeficiente maior foi de 79%, os médios de 75 e 76% e o menor de 74%. A Figura 5.34b, mostra a comparação entre os sistemas de reação 2 e 3 e o maior coeficiente de similaridade foi de 81%, o médio de 78% e o menor de 72%.

Observou-se que os sistemas de reação 2 e 3 (Figuras 34b) apresentaram maior similaridade, do que os sistemas de reação 1 e 2. A maior similaridade entre os sistemas 2 e 3, possivelmente esteja relacionado ao mesmo tempo de detenção de sólidos usados anteriormente (Tabela 5.2) e ao mesmo tipo de afluente. Observou-se também que as determinações físico-químicos entre os sistemas de reação 2 e 3 foram mais parecido do que entre os sistemas de reação 1 e 2.

Verificou-se que as amostras diárias coletadas no mês de fevereiro, apesar da temperatura ser mais baixa do ano, da remoção demanda bioquímica de oxigênio solúvel e do fosfato total não terem ocorrido (Figura 5.3 e 5.6) as estruturas da comunidade microbiana não apresentaram grandes mudanças, indicando que os microrganismos permaneceram no sistema, mas diminuíram suas atividades.

A partir da análise do DGGE apresentada nas Figuras 5.30 e dos cálculos dos coeficientes de similaridades mostrados nas Figuras 5.31, 5.32 e 5.33, com amostras

coletadas diariamente, observou-se uma pequena diferença nas estruturas das comunidades microbianas presentes nos três sistemas de reação.

Na análise das três amostragens realizadas nos três sistemas de reação, foi verificado que o coeficiente de similaridade nas amostragens mensais, ficaram entre 68% a 92% no sistema de reação 1; e 87% a 94% no sistema de reação 2; e 74% a 96% no sistema de reação 3. Nas amostragens semanais o coeficiente de similaridade ficou entre 68% a 100% no sistema de reação 1; 87% a 100% no sistema de reação 2; e de 84% a 100% no sistema de reação 3. Enquanto nas amostragens diárias o coeficiente de similaridade esteve entre 96% ou 100% no sistema de reação 1, e 98% a 100% no sistema de reação 2, e 92% a 100% no sistema de reação 3.

A grande similaridade nas estruturas das comunidades microbianas presentes nos três sistemas de lodos ativados modificados para EPBR, pode estar relacionada, ao mesmo afluente (esgoto sanitário) e a mesmo tipo de recirculação interna (último compartimento aeróbio para o primeiro compartimento anóxico) além da mesma recirculação do lodo, já que o decantador secundário era o mesmo (Figura 4.2).

Os três sistemas de reação, apresentaram bandas similares nas amostragens. Na amostragem mensal foram encontradas 5 bandas, na amostragem diárias obteve-se 15 bandas semelhantes. Na amostragem semanal encontraram-se 8 bandas similares nos sistemas de reação 1 e 3 e 9 bandas no sistema de reação 2. Verificando dessa forma que em análise prolongada como a mensal, há ocorrência de menos bandas em comum como já mencionado, e nas diárias os números de bandas em comum são maiores. Sugerindo que pode existir substituição de algumas populações no decorrer do tempo, estando de acordo com o trabalho de MINO *et al.* (2000) que monitoraram a estrutura da comunidade bacteriana do processo EBPR, usando DGGE. Os autores (MINO *et al.*, 2000) verificaram que a estrutura da comunidade microbiana era complexa devido a presença de muitas bandas, e observaram que no período de uma semana a estrutura da comunidade bacteriana eram similares enquanto que depois de um mês diferiram significativamente.

A estabilidade funcional não implica na estabilidade da comunidade, mas sua dinâmica pode ser desenvolvida em um ecossistema simples e o grande número e a diversidade de populações menores provavelmente contribuam significativamente nesse processo (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999).

O desempenho estável implica no equilíbrio entre produção e consumo de metabólicos ao longo da cadeia trófica, conseqüentemente a substituição de uma população de um nível trófico necessita de um outra semelhante, para manter o equilíbrio. As mudanças na população seriam causadas pela variação, em particular, dos metabólicos, bem como das suas velocidades de produção e consumo (FERRIS *et al.*, 1997).

Segundo PELCZAR (1981) as interações genoma-ambiente podem ser agrupadas em: a) genoma “fixo” (modificações temporárias a nível fisiológica ou fenotípica) em um ambiente variável, neste caso, os microrganismos devem ser capazes de se adaptarem a essas variações (temperatura, pH, tipo e quantidade de nutrientes disponíveis e outros) para conseguir sobreviver; b) genoma variável em um ambiente fixo, neste caso, as variações são devidas mutações (espontâneas ou induzidas), transdução, transformação e conjugação enquanto, os fatores externos permanecem constantes; c) genoma variável em um ambiente variável, é uma medida da adaptabilidade do sistema genético. Os mecanismos de modificações do genoma são os mesmos citados anteriormente. Estes exemplos de adaptação microbiana às circunstâncias ambientais servem para ilustrar o papel central da capacidade genética dos microrganismos quanto à sua adaptação e à sua sobrevivência.

A partir das análises do DGGE com amostras mensais, semanais e diárias realizadas nos três sistemas diferentes de lodos ativados modificados para EPBR, verificou-se que as mudanças das estruturas das comunidades microbianas foram pequenas, diante das alterações temporais e operacionais. No entanto, o sistema foi menos eficiência, de acordo com os parâmetros de desempenho, frente a essas variações (Tabela 5.2), isso possivelmente esteja relacionado a redução das atividades e não das estruturas dessas comunidades microbianas.

A diversidade e a dinâmica dos microrganismos são tais que, com freqüência, podem produzir alterações no meio ambiente. As primeiras modificações ocorrem nas transformações do substrato, seguida pela diminuição de nutrientes com produção de compostos mais reduzidos. Assim, os microrganismos que participam do primeiro nível de modificações podem elaborar substâncias inadequadas para o segundo nível de modificações, mas quando uma outra espécie conseguem utilizá-los, sucede a substituição das anteriores. (PELCZAR, 1981).

Na análise de DGGE das amostras realizadas nos três sistemas de reação (1, 2 e 3) observou-se também o aparecimento e desaparecimento de algumas bandas padrões, sugerindo a substituição de algumas populações, isso possivelmente esteja relacionada as modificações do meio, provocadas pelas mudanças de operação.

Com o desenvolvimento desta pesquisa, observou-se a importância em analisar a estrutura e a dinâmica da comunidade microbiana no tratamento biológico das águas residuárias. O amplo conhecimento dos microrganismos presentes nos tratamentos biológicos, poderão fornecer subsídios para auxiliar na partida e no monitoramento dos sistemas. Assim, quanto maior o número de informações a respeito dos grupos microbianos envolvidos nos processos, em conjunto com os dados físico-químicos, maior será o controle na operação dos sistemas de tratamento.

6. CONCLUSÕES

Na avaliação de três sistemas de lodos ativados modificados para a remoção de fósforo em excesso, utilizados no tratamento de esgotos sanitários, foi possível realizar algumas conclusões referentes ao desempenho desses sistemas, e ao monitoramento da estrutura da comunidade microbiana, a partir dos dados apresentados, e pela técnica da eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE:

⇒ Com relação aos dados (cedidos pela ETE) dos parâmetros de desempenho dos três sistemas de reação, referentes aos meses de novembro de 1999, fevereiro e março de 2000, verificou-se que

- ♦ Os sistemas de reação 1 e 2, que apresentam características semelhantes ao sistema Bardenpho 5 estágios, e o sistema de reação 3 semelhante ao Phoredox, removeram fosfatos presentes na água bruta, sendo que, nos compartimentos anaeróbios ocorreu a liberação de fosfatos, indicando presença de PAOs;
- ♦ Houve remoção de DBOs, visto que no primeiro compartimento dos sistemas de reação 1, 2 e 3, seus valores apresentavam-se maiores, e nos estágios seguintes (anóxico e aeróbio) apresentaram valores menores, tendo um leve aumento no compartimento anóxico, e reduzindo novamente na última etapa aeróbia (Figuras 5.2, 5.3 e 5.4)
- ♦ Os três sistemas de reação 1, 2 e 3, apresentaram condições operacionais próximas no período considerado, de novembro de 1999 a maio de 2000, destacando-se o fato de que a recirculação interna de lodo, do compartimento aeróbio para o anóxico, no sistema de reação 3 sempre foi maior do que a recirculação de lodo dos sistemas 1 e 2;

- ◆ A remoção de fosfato nos três sistemas se deu nos meses de novembro de 1999 e março de 2000 (Figuras 5.5 e 5.7). No mês de fevereiro de 2000, a remoção de fosfatos não foi significativa (Figura 5.6), período no qual a vazão de recirculação interna nos sistemas foi alterada, ocorrendo redução da recirculação interna (Tabela 5.2), em relação ao período anterior (Tabela 5.1), mas essa diminuição na remoção de fosfato, pode estar relacionada também a redução de DBOs (Perfil 2 – Tabela 10 a 12) no afluente, o que poderia explicar a redução da atividade desses microrganismos.
 - ◆ o desempenho em relação a DBOs (mg/L) nos três perfis realizados nos três sistemas de reação, sempre foi superior a 90%, e a remoção do fósforo na forma de fosfato (P-PO₄ – mg/L), foi superior, em geral, a 70%, considerando os valores de entrada das alimentações e saída no último compartimento aeróbio dos três sistemas de reação. No mês de fevereiro de 2000, esses três sistemas apresentaram menor eficiência, e no mês de março de 2000 a remoção dos sistemas foi otimizada, talvez devido ao aumento de DBOs no afluente em março.
 - ◆ Nos sistemas, os valores de pH próximo a neutralidade foi mantida, favorecendo a ação microbiana, já que conforme discutido vários autores, existe um efeito deletério do pH sobre o metabolismo anaeróbio, mostrando que a maior velocidade de utilização do acetato pelos PAOs ocorria em valores de pH próximos a 6,8.
- ⇒ Com relação às estruturas das comunidades microbianas presentes nos compartimentos, submetidos às condições anaeróbias, anóxica e aeróbio, dos três sistemas de reação conclui-se que:
- ◆ A estrutura da comunidade microbiana dos sistemas de reação 2 e 3 apresentou similaridade maior que os sistemas 1 e 2, apesar desses últimos possuírem o mesmo número de compartimentos. Essa similaridade foi verificada pelo

coeficiente de similaridade, realizada a partir do perfil das bandas de DGGE. A similaridade da estrutura da comunidade microbiana, possivelmente, esteja relacionada com a idade de lodo no sistema, a quantidade do lodo de descarte, e ao tipo do afluente (no sistema 1 era introduzido lodo do decantador primário), visto que estes foram semelhantes nos sistemas de reação 2 e 3, diferindo do sistema 1.

- ◆ Os sistemas de reação 1, 2 e 3 apresentaram onze bandas de DGGE em comum, indicando a presença de “populações” semelhantes nos três sistemas mesmo diferindo quanto ao número de compartimentos (5 e 3), ao índice de recirculação e a idade do lodo em cada sistema (Tabela 5.1). A presença dessas bandas similares, devem estarem relacionadas ao mesmo tipo de recirculação interna (do último compartimento aeróbio para o primeiro compartimento anóxico) e a mesma recirculação do lodo, já que o decantador secundário era o mesmo para os três sistemas.
- ◆ Analisando os três sistemas de reação individualmente, verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana apresentava uma grande diversidade, ou seja era complexa, devido ao grande número de bandas mostrados no gel de DGGE (Figura 5.14). No entanto, havia muitas populações similares nos compartimentos de cada sistema de reação, apesar de terem sido submetidos às condições diferentes (anaeróbia, anóxica e aeróbia).

⇒ Com relação à estrutura da comunidade microbiana presente no último compartimento, aeróbio dos três sistemas de reação conclui-se que:

- ◆ A estrutura da comunidade microbiana apresentou grande diversidade e a sua mudança ocorreu lentamente, ao longo do tempo, diante de algumas alterações ambientais ou operacionais como, temperatura, índice de recirculação, tempo de detenção dos sólidos. A maior variação da estrutura da comunidade microbiana foi verificada nas amostragens mensais e as menores ocorreram com amostras diárias.

- ◆ As mudanças das estruturas das comunidades microbianas foram pequenas, diante das mudanças temporais e operacionais. No entanto, observou-se que o sistema foi menos eficiente (parâmetros de desempenho), frente a essas mudanças (Tabela 5.2), isso possivelmente esteja mais relacionado a redução das atividades dos microrganismos do que com as estruturas microbianas.
- ◆ Os três sistemas de reação, apresentaram bandas similares nas amostragens. Na amostragem mensal foram encontradas 5 bandas, na amostragem diárias obteve-se 15 bandas semelhantes. Na amostragem semanal encontraram-se 8 bandas similares nos sistemas de reação 1 e 3 e 9 bandas no sistema de reação 2. Verificando dessa forma que em análise prolongada como a mensal, há ocorrência de menos bandas em comum, e nas diárias os números de bandas em comum são maiores. Sugerindo que pode existir substituição de algumas populações no decorrer do tempo.

⇒ Quanto à técnica PCR/DGGE, para avaliar a estrutura da comunidade microbiana, em sistemas de lodos ativados modificados, pode-se concluir que:

- ◆ Permitiu a determinação da estrutura e da dinâmica da comunidade microbiana complexa, em três sistemas de reação diferente, submetidas às diferentes condições anaeróbia, anóxica e aeróbia ;
- ◆ Foi uma ferramenta adequada, para a avaliação da estrutura da comunidade microbiana, diante de perturbações ambientais ou operacionais, numa escala temporal e espacial;
- ◆ Possibilitou a comparação da estrutura da comunidade microbiana, presentes em três sistemas de reação diferente durante o período de aproximadamente sete meses.
- ◆ A técnica pode ser utilizada para outros tipos de tratamento de águas residuárias, contanto que a escolha do “primer”, seja específico para a amostra em estudo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES.

Além da aplicação realizada no presente trabalho, a técnica PCR/DGGE permite ser utilizada também: na determinação da estrutura da comunidade microbiana de grupos cultiváveis e não cultiváveis; na estimação da diversidade filogenética, através da realização do sequenciamento das bandas individuais.

Na interpretação das bandas apresentadas no gel de DGGE, foi necessária a utilização de uma equação para calcular o coeficiente de similaridade entre duas amostras, para possibilitar a avaliação da similaridade de várias populações.

O coeficiente de similaridade calculada, a partir de equação de GILLAN *et al.* (1998) entre duas amostras, levou em consideração a posição das bandas; o número de bandas produzidas em cada amostra ou linha; e o número de bandas similares em cada posição de cada linha. No entanto, não levou em consideração a intensidade das bandas fracas e fortes.

Para os trabalhos futuros recomenda-se medir a intensidade das bandas fluorescentes, pois o perfil do DGGE constitui-se de bandas intensas, bem como bandas fracas. Inclusive recomenda-se a equação de dissimilaridade utilizada por KURISU *et al* (2000) descrita no item 3.8.

Na caracterização das comunidades microbianas envolvidas no processo de EBPR, seria interessante, complementar a técnica de DGGE, com um estudo metabólico e filogenético. MINO *et al.* (2000) propuseram uma estratégia, mostrado na Figura 7.1, onde após a caracterização da comunidade microbiana dos PAOs envolvidos na EBPR, utilizando a técnica do PCR/DGGE e clonagem, se realizariam o sequenciamento do DNA para projetar uma sonda da molécula isolada. Esta sonda passaria a ser utilizada na hibridização *in situ* (FISH), possibilitando uma quantificação dos grupos dominantes presentes no processo EBPR.

Com o isolamento da molécula, verificaria se as características metabólicas típicas dos PAOs, a partir da identificação das enzimas, coloração do poli-P e dos grânulos PHB e PHA, e de experimentos realizados em bateladas sob condições anaeróbias e aeróbias.

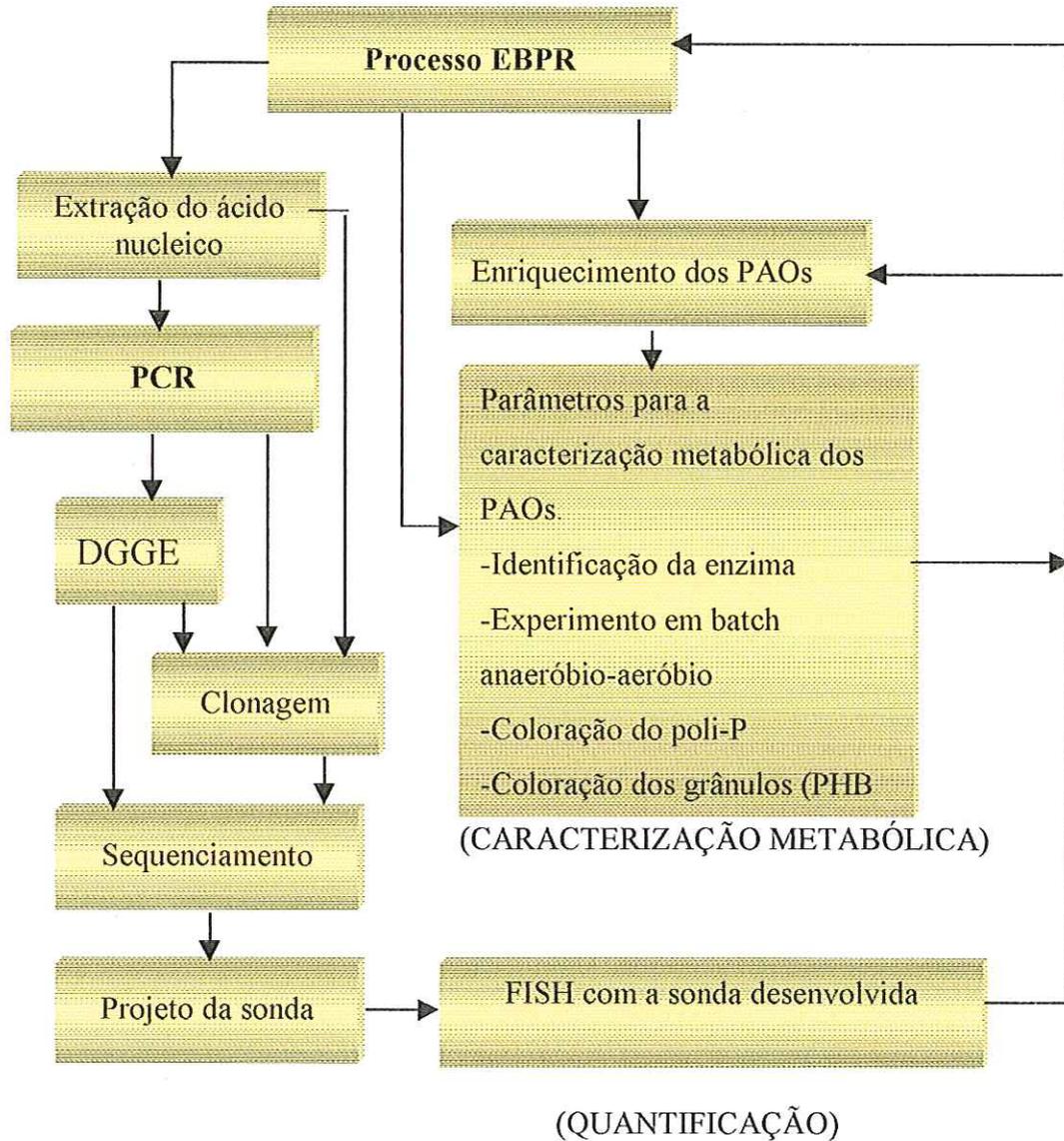


Figura 7.1: Esquema da proposta para caracterização da estrutura da comunidade microbiana no processo EBPR (modificado de MINO *et al.*, 2000).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALÉM SOBRINHO P. (1991) Contribuição ao estudo de remoção biológica de fósforo em excesso, de esgoto sanitário, por modificação do processo de lodos ativados. Tese de Livre Docência) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, v.1, 372p.
- AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. v.59, nº.1, p.143-169.
- APHA, AWWA and WEF. (1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th edition, American Public Health Association, Washington, DC.
- ARUN, V.; MINO, T.; MATSUO, T. (1988) Biological mechanism of acetate uptake mediated by carbohydrate consumption in excess phosphorus removal systems. *Water Research*. v.22 nº.5 p.565-570.
- BOND, P.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L. (1995) Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludge from sequencing batch reactor. *Applied and Environmental Microbiology*. v.61, nº.5, p.1910-1916.
- BOWMAN, J. P. & SAYLER, G. S. (1996) Nucleic acid techniques in the environmental detection of microorganisms and their activities. In: *Molecular approaches to environmental microbiology*. Edited by R. W. Pickup & J. R. Saunders. p. 63-97.
- BRDJANOVIC, D.; SLAMET, A.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HOOIJMANS, C. M.; ALAERTS, G. J.; HEIJNEN, J.J. (1998) Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Research*. v.32 nº.1 p.200-208.
- CECH, J. B & HARTMAN, P. (1993) Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphorus removal systems. *Water Research*. v.27 p.1219-1225.
- CHEN, H. (1999) Application of denaturing gradient gel electrophoresis technique to profile microbial community in activated sludge systems. (Thesis of doctorate) – Department of Urban Engineering. University of Tokyo, Japan.

- CLOETE, T.E. & STEYN, P. L. (1988) A combined membrane filter-immunofluorescent technique for the *in situ* identification and enumeration of *Acinetobacter* in activated sludge. *Water Research*. v.22 n°.8 p.961-969.
- COMEAU, Y.; HALL, K. J.; HANCOCK, R. E. W.; OLDHAM, W.K. (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*. v.20, n°.12, p.1511-1521.
- CURTIS, T. P. & CRAINE, N. G. (1998) The comparison of the diversity of activated sludge plants. *Water Science Technology*. Vol.37, n° 4-5, p.71-78.
- ESTEVEZ, F. A. (1988) Fósforo. *In: Fundamentos de limnologia*. Editora Interciência/FINEP. Cap. 14. p. 216-236.
- FERNÁNDEZ, A.; HUANG S.; SESTON, S.; XING, J.; HICKEY, R.; CRIDDLE, C.; TIEDJE, J. (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology*. v.65, n°.8, p.3697-3704.
- FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D.M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*. v.62, n°.2, p.340-346.
- FERRIS, M. J. & WARD, D.M. (1997) Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. v.63, n°.4, p.1375-1381.
- FERRIS, M. J.; NOLD, S. C.; REVSBECH, N. P.; WARD, D.M. (1997) Population structure and physiological change within a hot spring microbial mat community following disturbance. *Applied and Environmental Microbiology*. v.63, n°.4, p.1367-1374.
- GILLAN, D. C.; SPEKSNIJDER, A. G. C. L.; ZWART, G.; DE RIDDER, C. (1998) Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. v.64 n°.9 p.3464-3472.
- HENZE, M. (1997) Basic biological processes. *In: FÖRSTNER, U.; MURPHY, R. J.; RULKENS, W. H. Wastewater treatment biological and chemical processes*. 2nd edition. Berlin; Springer, cap. 3. p. 55-112.
- HESSELMANN, R. P. X.; VON RUMMELL, R.; RESNICK, S. M.; HANY, R.; ZEHNDER, A. J. B. (2000) Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal. *Water Research*. v.34 n°.14 p.3487 - 3494.

- HIRAISHI, A.; MASAMUNE, K.; KITAMURA, H. (1989) Characterization of the bacteria population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles. *Applied and Environmental Microbiology*. v.30, n°. -, p.197-210.
- HIRASHI, A. & MORISHIMA, Y. (1990) Capacity for polyphosphate accumulation of predominant bacteria in activated sludge showing enhanced phosphate removal. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. V. 69, n 6, p. 368-371.
- JENKINS, D & TANDOI, V. (1991) The applied microbiology of enhanced biological phosphate removal – Accomplishment and needs. *Water Research*. v.25, n°.12, p.1471-1478.
- KORTSTEE, G.J.J.; APPELDOORN, K.J.; BONTING, C.F.C.; VAN NIEL, E.W.J.; VAN VEEN, H.J.(2000) Ecological aspects of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *In: Advances in Microbial Ecology*. Ed. B. Shink. Kluwer Academic/Plenum Publishers. p. 169-200.
- KURISU, F. & ONUKI, M. (1999) Protocols for microbial community analysis. Department of Urban Engineering. University of Tokyo, Japan. 15 p.
- LIN, CHI-KANG.; KATAYAMA, Y.; HOSOMI, M.; MURAKAMI, A.; OKADA, M. (2000) The relationship between isoprenoid quinone and phosphorus removal activity. *Water Research*. v.34 n°.14 p.3607 - 3613.
- LIU, WEN-TSO.; MINO, T; NAKAMURA, K.; MATSUO, T. (1996a) Role of glycogen in acetate uptake and polyhydroxyalkanoate synthesis in anaerobic-aerobic activated sludge with a minimized polyphosphate content. *Journal of Fermentation Biotechnology*. v.77, p.535 - 540.
- LIU, WEN-TSO.; MINO, T.; SATOH, H.; NAKAMURA, K.; MATSUO, T. (1996b) Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal. *Water Research*. v.30 n°.1 p.75 - 82.
- LIU, WEN-TSO.; MINO, T.; MATSUO, T.; NAKAMURA, K.; (1996c) Biological phosphorus removal processes – Effect of pH on anaerobic substrate metabolism. *Water Science Technology*. v.34 n°.1-2 p.25 - 32.
- LIU, WEN-TSO.; NAKAMURA, K.; MATSUO, T.; MINO, T. (1996d) Internal energy based competition between polyphosphate and glycogen accumulating bacteria in biological phosphorus removal reactors – effect of P/C feeding ratio. *Water Research*. v.31 n°.6 p.1430 - 1438.

- LIU WEN-TSO; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S r RNA. *Applied and Environmental Microbiology*. v.63 n°.11 p.4516 - 4522.
- MATSUO, T & KURISU, F. (2000) Strategic approach for characterization of bacterial community in enhanced biological phosphate removal (EBPR) process. In: *The International Symposium of the COE, Center of Excellence, Project on Establishment and Evaluation of Advanced Water Treatment Technology Systems Using Functions of Complex Microbial Community*. Tokyo – Japan. p.3-16.
- MAURER, M.; GUJER, W.; HANY, R.; BACHMANN, S. (1997) Intracellular carbon flow in phosphorus accumulating organisms from activated sludge systems. *Water Research*. v.31 n°.4 p.907 - 917.
- METCALF & EDDY. (1991) *Wastewater Engineering treatment Disposal Reuse*. McGraw-Hill International. Third Edition.
- MINO, T.; LIU, W. T.; SATOH, H.; MATSUO, T. (1997) Novel trends in biological wastewater treatment – Microbial populations in biological phosphate removal processes. *In Progress in Microbial Ecology. Proceedings of seventh international symposium on microbial ecology*. Santos – Brazil. Martins, M. T. *et al* (eds.). p. 509-516.
- MINO, T.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Research*. v.32, n°.11, p.3193-3207.
- MINO, T.; SATOH, H.; ONUKI, M.; AKIYAMA, T.; NOMURA, T.; MATSUO, T. (2000) Strategic approach for characterization of bacterial community in enhanced biological phosphate removal (EBPR) process. In: *The International Symposium of the COE, Center of Excellence, Project on Establishment and Evaluation of Advanced Water Treatment Technology Systems Using Functions of Complex Microbial Community*. Tokyo – Japan. p.29-39.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. v.59, n°.3, p.695-700.
- MUYZER, G. & RAMSING, N. B. (1995) Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science Technology*. v.32, n°.8, p.1-9.

- NAKAMURA, K.; MASUDA, K.; MIKAMI, E. (1991) Isolation of new type of polyphosphate accumulating bacterium and its phosphate removal characteristics. *Journal of fermentation and bioengineering*. v.71 n°4 p.258-263.
- NIELSEN, T. A.; LIU, W-T.; FILIPE, C.; GRADY,L.; MOLIN, S.; STAHL, D. A. (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*. v.65, n°3, p.1251-1258.
- ODUM(1988) Ciclos biogeoquímicos. In: *Ecologia* - Editora Guanabara Koogan. capítulo 4.
- PELCZAR / REID / CHAN (1981) *Microbiologia ambiental e industrial*. In: *Microbiologia*. McGraw-Hill. volumeII. capítulo 33. p. 807-831.
- SAMUDIO, M. E. M. (1999) Estudos sobre remoção biológica de fósforo de esgoto sanitário, através do processo de lodos ativados operado em bateladas e sobre o excesso de lodo gerado. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Hidráulica e Sanitária. 365p.
- SATOH, H.; MINO, T.; MATSUO, T. (1992) Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal process. *Water Science Technology*. v.26 n°5-6 p.933 – 942.
- SATOH, H.; RAMEY, W. D.; KOCH, F. A.; OLDHAM, W. K.; MINO, T.; MATSUO, T. (1996) Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage. *Water Science Technology*. v.34 n°1 p.8 – 15.
- SATOH, H.; MINO, T.; MATSUO, T. (1998) Anaerobic uptake of glutamate and aspartate by enhanced biological phosphorus removal activated sludge. *Water Science Technology*. v.34 n°4-5 p.579 – 582.
- SATOH, H.; MINO, T.; MATSUO, T. (1999) PHA production by activated sludge. *International Journal of Biological Macromolecules* . v.25, p.105 – 109.
- SPEECE, R.E. (1996) *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press. 394p.
- SMOLDERS, G. J. F.; VAN LOOSDRECHT, M. C.M.; HEIJNEN, J. J. (1994) pH; key factor in the biological phosphorus removal process. *Water Science Technology*. v.29 n°7 p.71 – 74.
- SNAIDR, J.; AMANN, R.; HUBER, I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. v.63, n°7, p.2884-2896.

- STENSEL, H. D. (1991) Principles of biological phosphorus removal. In: Phosphorus and Nitrogen Removal from Municipal Wastewater – Principles and Practice. Richard Sedlak, Editor Cap.6 p.141-166.
- SUDIANA, I. M.; MINO, T.; SATOH, H.; MATSUO, T. (1998) Morphology, *in-situ* characterization with rRNA targeted probes and respiratory quinone profiles of enhanced biological phosphorus removal sludge with acetate and glucose as carbon source. *Water Science Technology*. v.38 n° 8-9 p.69-76.
- UBUKATA, Y. & TAKII, S. (1994) Induction ability of excess phosphate accumulation for phosphate removing bacteria. *Water Research*. v.28, n°.-, p.247-249.
- VAN LOOSDRECHT, M. C. M. & HEIJNEN, J. J. (1997) Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Water Science Technology*. v.35, n° 1, p.41-47.
- VAZOLLER, R. F. (1989) *Microbiologia de lodos ativados*. CETESB. Série manuais. 23p.
- VILLAS BÔAS, D. M.F. (1999) Estudo microbiológico de sistemas de lodos ativados com ênfase nas bactérias degradadoras de fenol. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Hidráulica e Sanitária. 161p.
- von SPERLING, M. (1997) Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol. 4. Lodos ativados. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 416p.
- WAGNER, M.; ERHART, R.; MANZ W.; AMANN, R.; LEMMER, H.; WEDI, D.; SCHLEIFER, K.-H. (1994) Development of an rRNA- targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acintobacter* and it's application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. v.60, n° 3, p.792-800.
- WINTZINGERODE, F. V.; GOBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. . v.21, n° 3, p.213-229.
- ZHU, H.; QU, F.; ZHU, L. H. (1993) Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl choride. *Nucleic Acids Res*. v.21, p.5279-5280.

ANEXOS A

- ◆ Géis de DGGE, resultados dos estudos de padronização.
- ◆ Géis das análises e algumas ampliações.

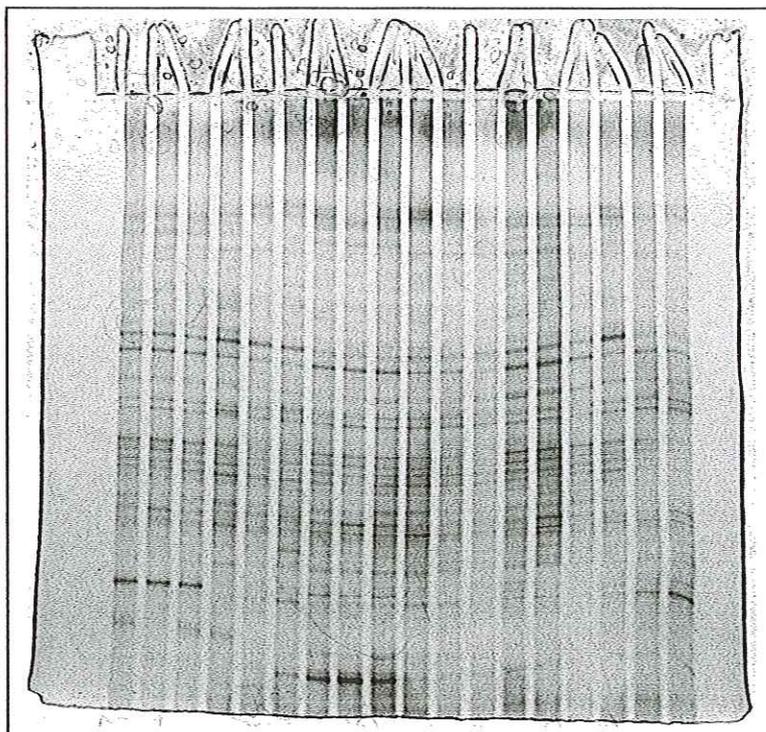


FIGURA A.1: Teste utilizando gel desnaturante de DGGE na concentração de 35%-55% e 330 minutos de tempo de corrida.

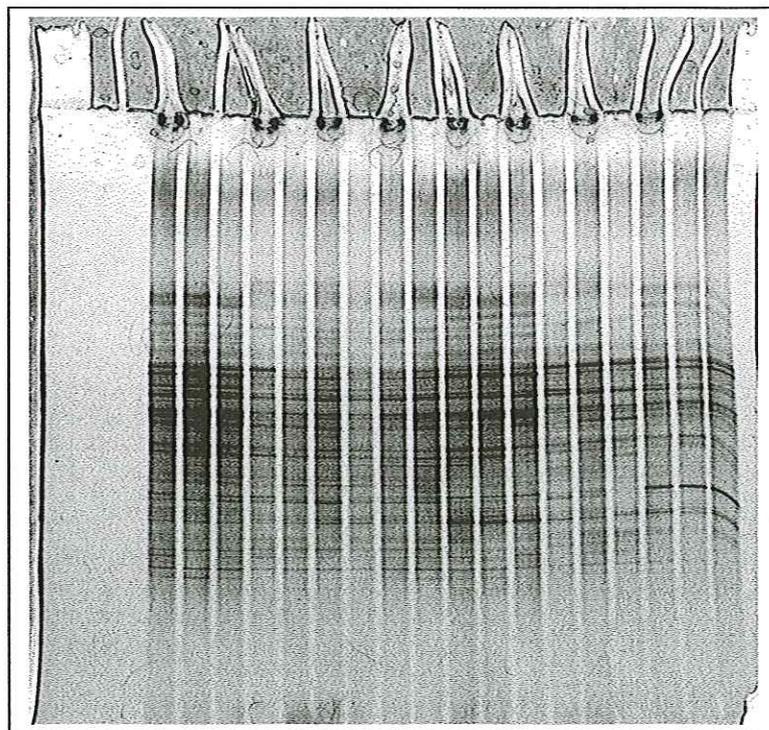


FIGURA A.2: Teste utilizando gel desnaturante de DGGE na concentração de 30%-60% e 270 minutos de tempo de corrida.

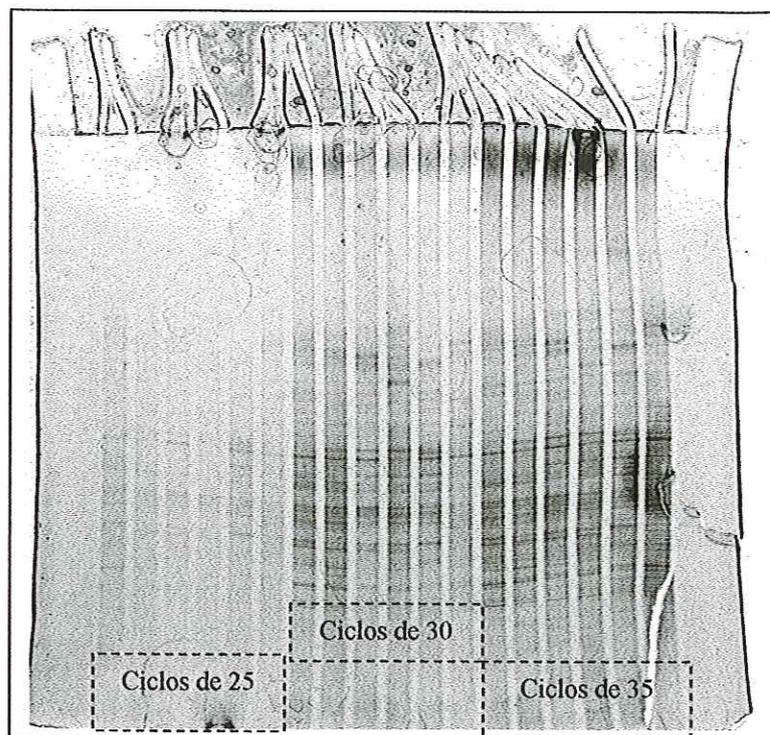


FIGURA A.3: Teste dos números de ciclos de 25, 30 e 35, utilizando-se tempo de corrida de 330 minutos e concentração do gel de 30%-60% de gradiente desnaturante.

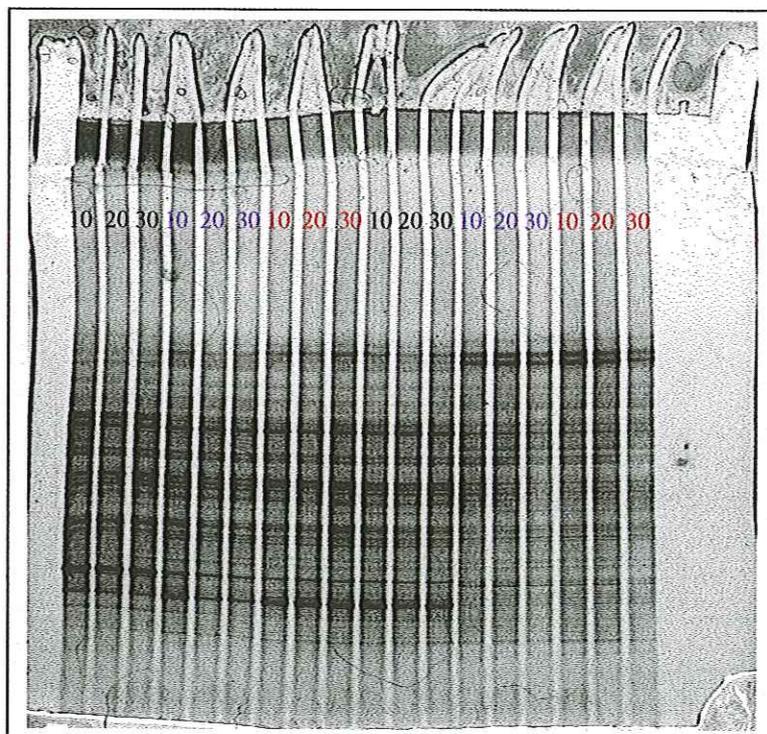


FIGURA A.4: Teste com diluições dos “templates” de 10, 20 e 30 vezes (amostras diferentes).

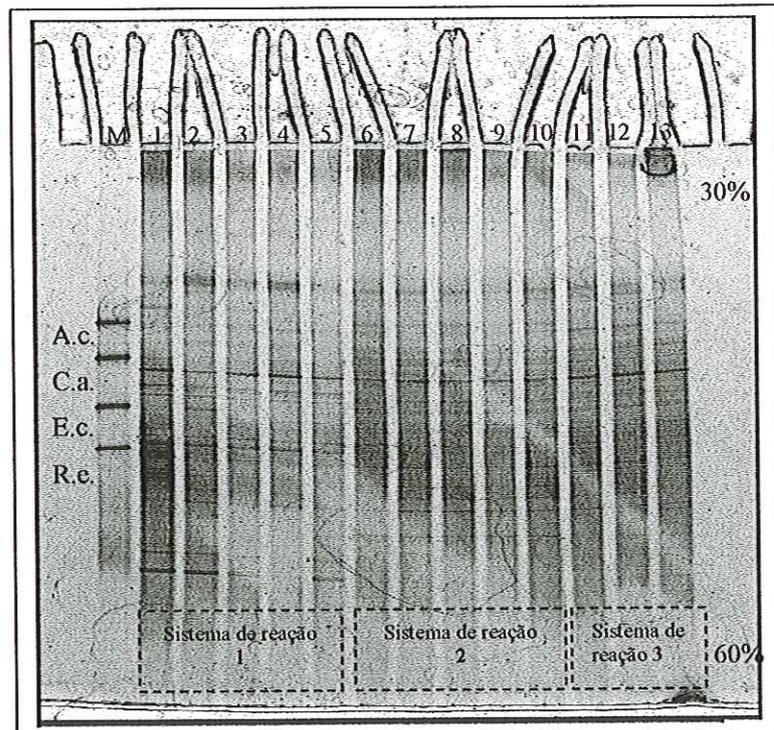


FIGURA A.5: Estrutura da comunidade microbiana dos três sistemas de reação estudados análise do DGGE.

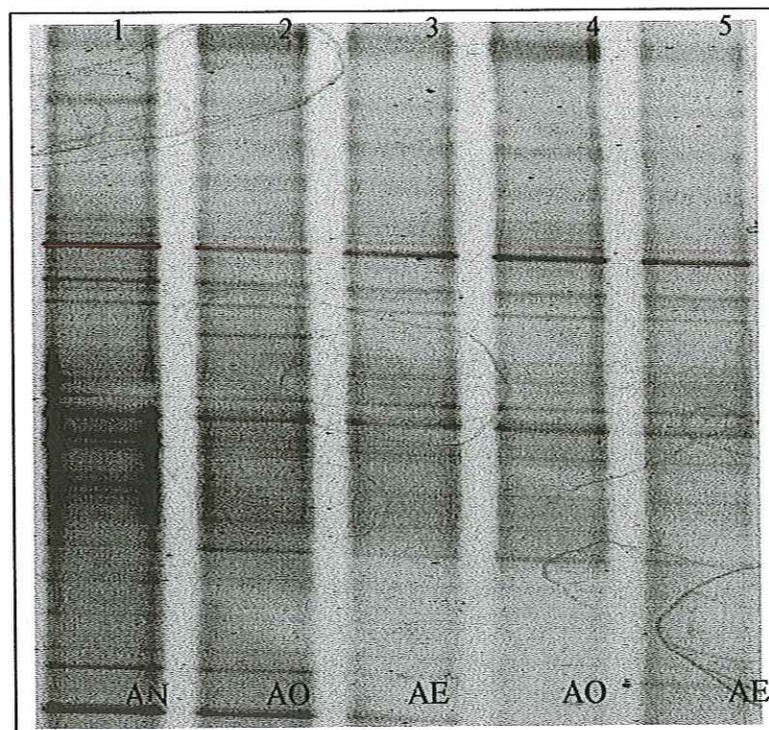


FIGURA A.6: Ampliação do gel de DGGE das amostras coletadas nos 5 compartimentos do sistema de reação 1 (AN=anaeróbio, AO=anóxico, AE=aeróbio).

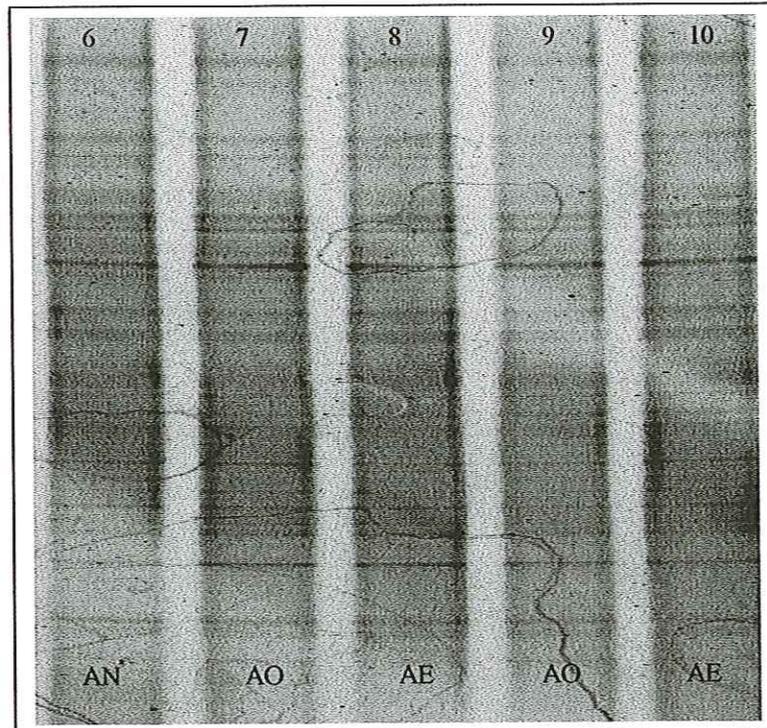


FIGURA A.7: Ampliação do gel de DGGE das amostras dos 5 compartimentos do sistema de reação 2.

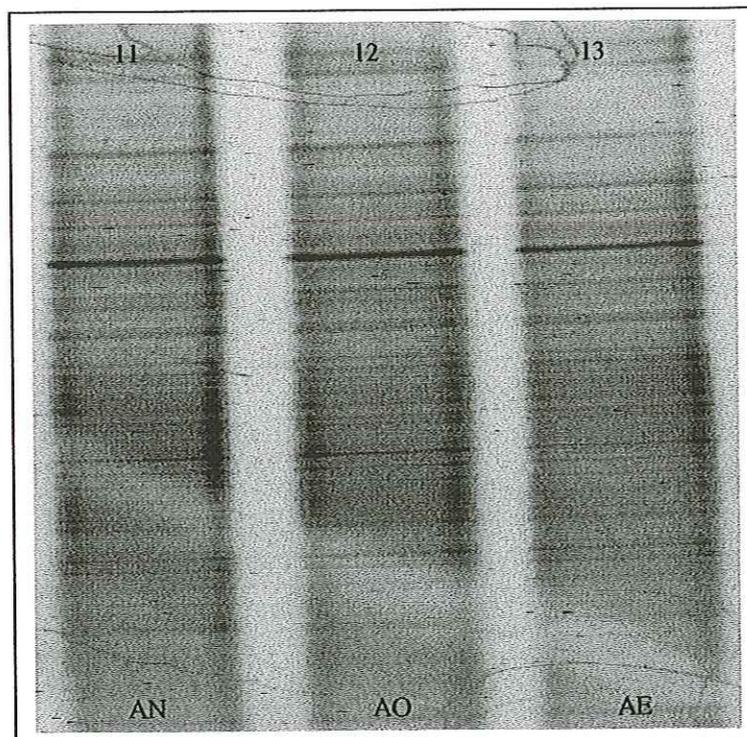


FIGURA A.8: Ampliação do gel de DGGE das amostras dos três compartimentos do Sistema de reação 3.

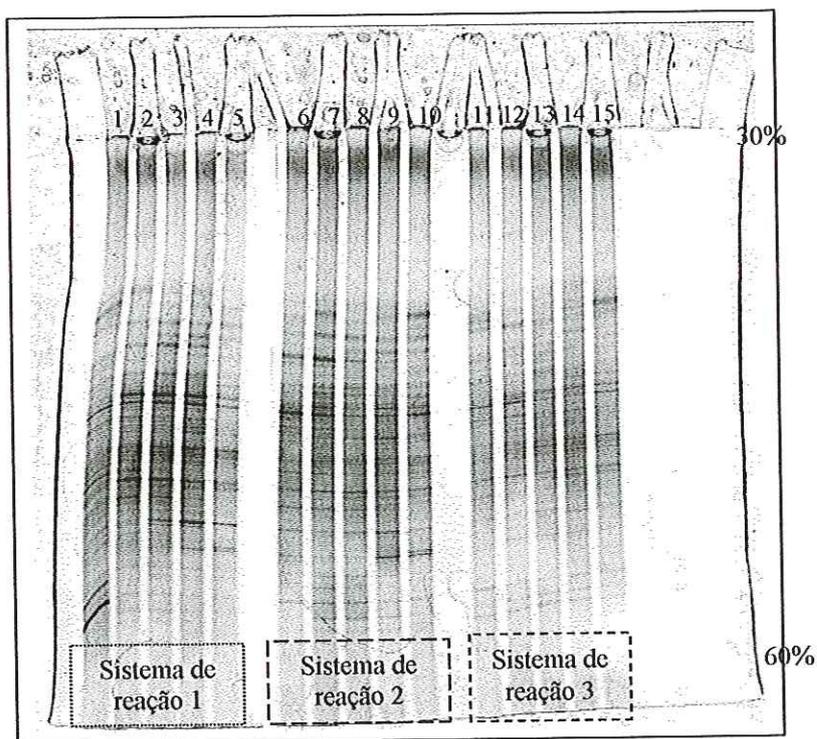


FIGURA A.9: Perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia dos três sistemas de reação.

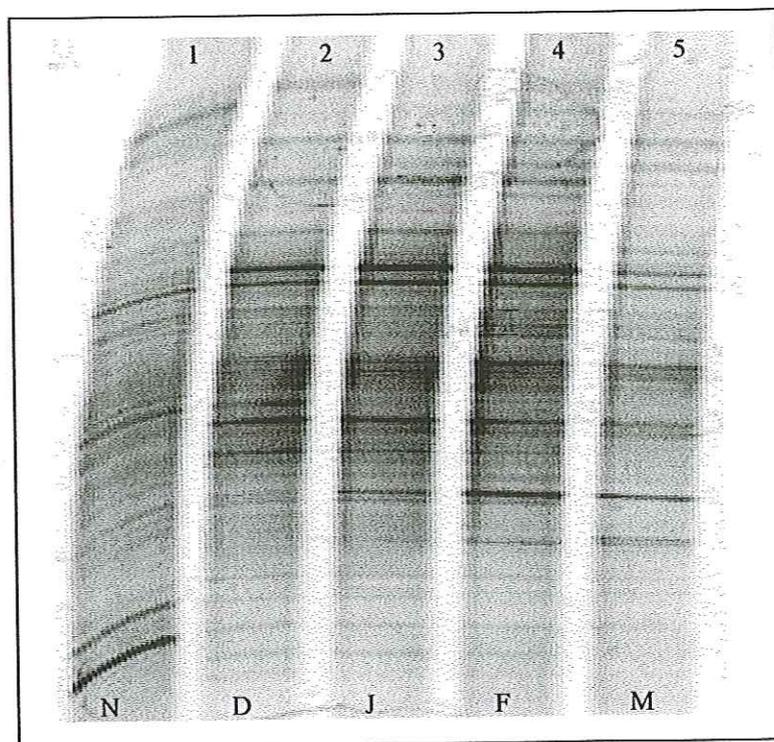


FIGURA A.10: Ampliação do perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia do sistema de reação 1 (N=novembro, D=dezembro, J=janeiro, F=fevereiro, M=março).

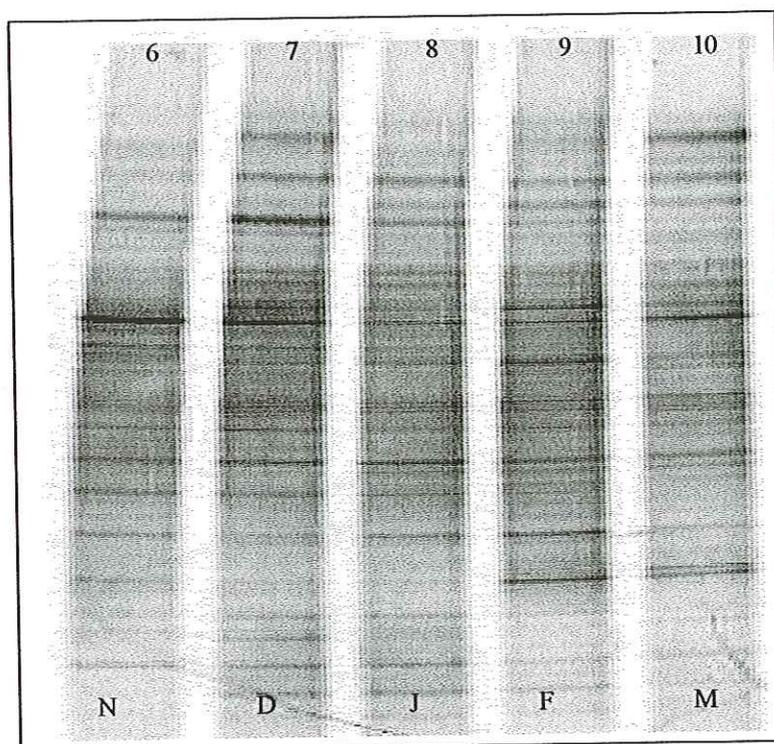


FIGURA A.11: Ampliação do perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia do sistema de reação 2 (N=novembro, D=dezembro, J=janeiro, F=fevereiro, M=março).

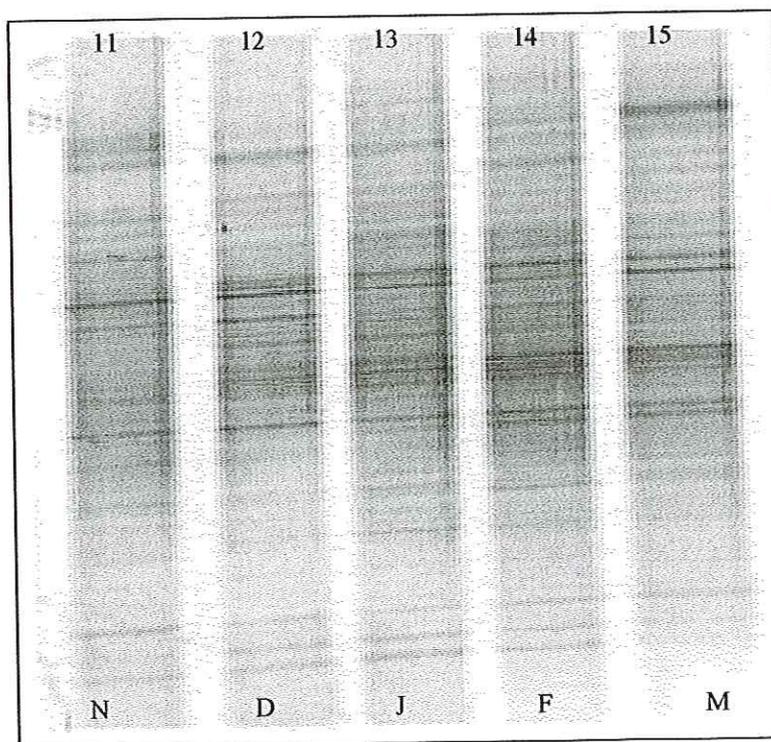


FIGURA A.12: Ampliação do perfil das bandas de DGGE, amostras coletadas mensalmente na última etapa aeróbia do sistema de reação 3 (N=novembro, D=dezembro, J=janeiro, F=fevereiro, M=março).

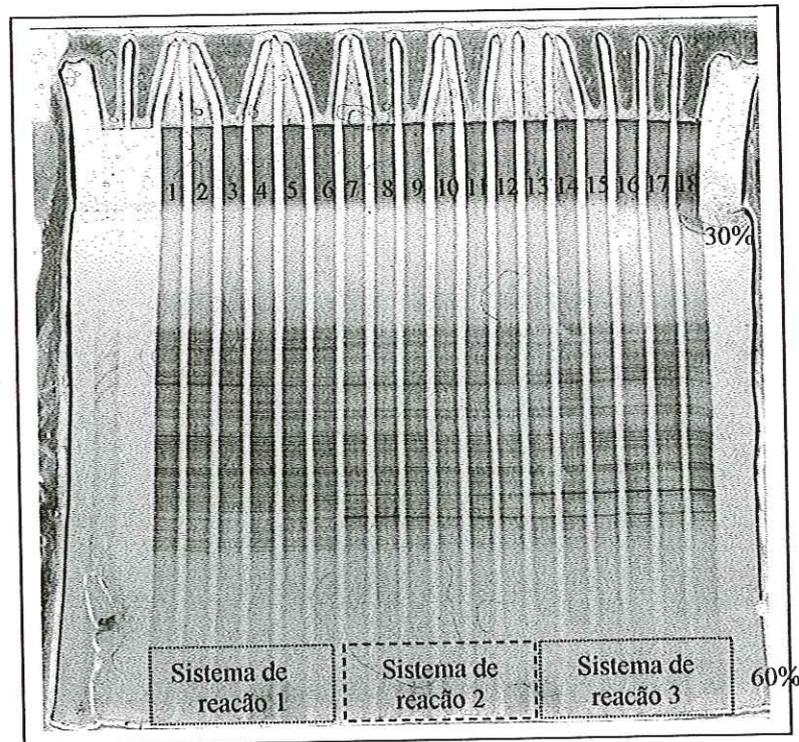


FIGURA A.13: Perfil das bandas padrões de DGGE, amostras coletadas diariamente na última etapa aeróbia dos três sistema de reação.

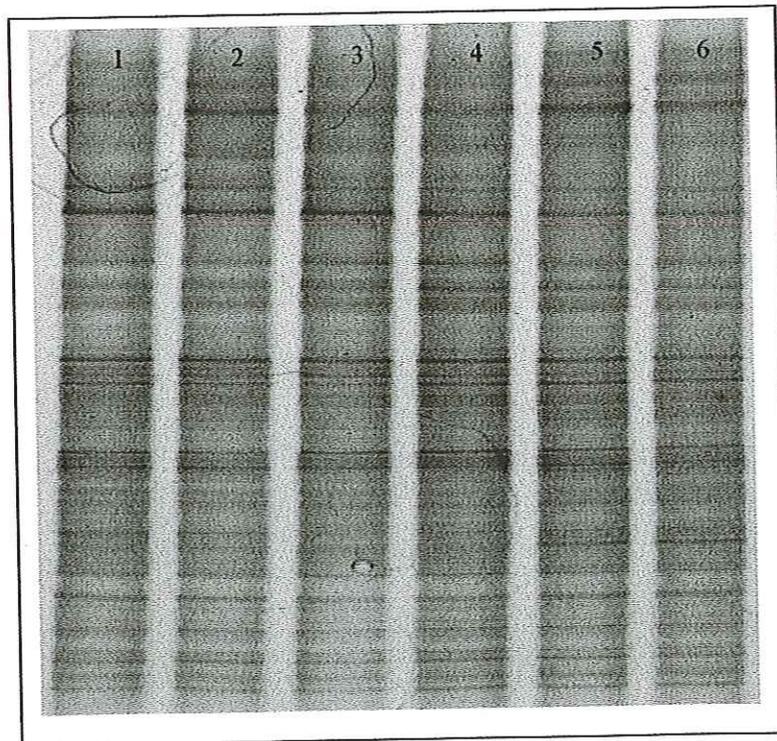


FIGURA A.14: Ampliação do perfil das bandas de DGGE, das amostras coletadas diariamente na última etapa aeróbia do sistema de reação 1.

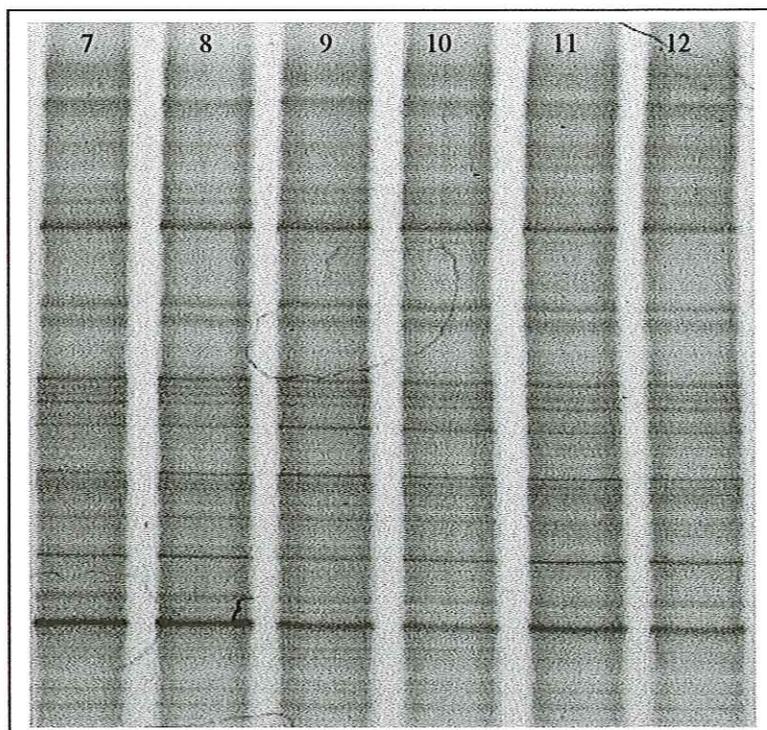


FIGURA A.15: Ampliação o perfil das bandas de DGGE, as amostras coletadas diariamente na última etapa aeróbia do sistema de reação 2.

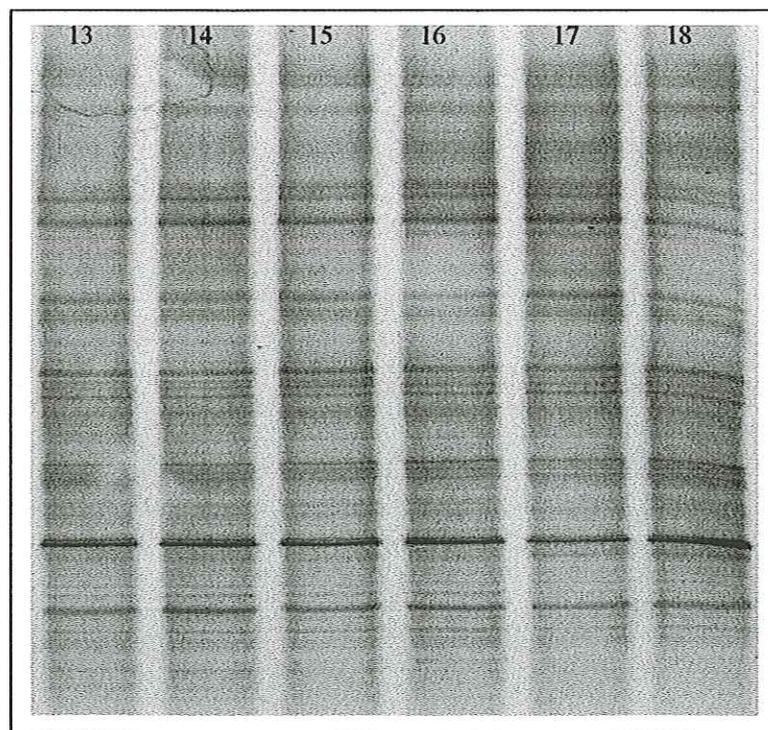


FIGURA A.16. :Ampliação o perfil das bandas de DGGE, as amostras coletadas diariamente na última etapa aeróbia do sistema de reação 3

ANEXOS B

- ◆ Medidas das concentrações de proteína e ácido nucleico.

TABELA B.1. Medidas da concentração de proteína e ácido nucleico das amostras, por espectrofotometro – Single Cell Module (BECKMAN DU^R 530 - Life Science UV/Vis), utilizando o programa Warburg – Christian.

Data: 25/11/99		Amostra: 01 - R ₁	
λnm	260	280	320
ABS	0,062	0,026	-0,008
Net A	0,070	0,034	-
Proteína	-0,6243 µg/ml	Ácidos Nucleicos	3,2037 µg/ml
Taxa 260/280	2,074	Taxa 280/260	0,482
Data: 25/11/99		Amostra: 02 - R ₁	
λnm	260	280	320
ABS	0,158	0,077	-0,009
Net A	0,166	0,086	-
Proteína	7,2783 µg/ml	Ácidos Nucleicos	7,3764 µg/ml
Taxa 260/280	1,938	Taxa 280/260	0,516
Data: 25/11/99		Amostra: 03 - R ₁	
λnm	260	280	320
ABS	0,174	0,089	-0,002
Net A	0,177	0,091	-
Proteína	8,3207 µg/ml	Ácidos Nucleicos	7,8086 µg/ml
Taxa 260/280	1,929	Taxa 280/260	0,518
Data: 25/11/99		Amostra: 04 - R ₁	
λnm	260	280	320
ABS	0,124	0,059	-0,008
Net A	0,132	0,067	-
Proteína	4,530 µg/ml	Ácidos Nucleicos	5,8833 µg/ml
Taxa 260/280	1,961	Taxa 280/260	0,510
Data: 25/11/99		Amostra: 05 - R ₁	
λnm	260	280	320
ABS	0,192	0,105	0,010
Net A	0,183	0,095	-
Proteína	9,6176 µg/ml	Ácidos Nucleicos	8,0526 µg/ml
Taxa 260/280	1,916	Taxa 280/260	0,522
Data: 25/11/99		Amostra: 06 - R ₂	
λnm	260	280	320
ABS	0,262	0,132	-0,006
Net A	0,268	0,138	-
Proteína	11,230 µg/ml	Ácidos Nucleicos	11,897 µg/ml
Taxa 260/280	1,942	Taxa 280/260	0,515
Data: 25/11/99		Amostra: 07 - R ₂	
λnm	260	280	320
ABS	0,364	0,185	-0,008
Net A	0,375	0,193	-
Proteína	15,226 µg/ml	Ácidos Nucleicos	16,627 µg/ml
Taxa 260/280	1,945	Taxa 280/260	0,514
Data: 25/11/99		Amostra: 08 - R ₂	
λnm	260	280	320
ABS	0,618	0,322	-0,003
Net A	0,621	0,324	-
Proteína	33,076 µg/ml	Ácidos Nucleicos	27,376 µg/ml
Taxa 260/280	1,915	Taxa 280/260	0,522

TABELA B.1 (Continuação). Medidas da concentração de proteína e ácido nucleico das amostras, por espectrofotometro – Single Cell Module (BECKMAN DU^R 530 - Life Science UV/Vis), utilizando o programa Warburg – Christian.

Data: 25/11/99		Amostra: 09 – R ₂	
λnm	260	280	320
ABS	0,261	0,132	-0,007
Net A	0,268	0,139	-
Proteína	12,839 µg/ml	Ácidos Nucleicos	11,849 µg/ml
Taxa 260/280	1,927	Taxa 280/260	0,519
Data: 25/11/99		Amostra: 10 – R ₂	
λnm	260	280	320
ABS	0,145	0,074	-0,004
Net A	0,149	0,078	-
Proteína	8,149 µg/ml	Ácidos Nucleicos	6,5485 µg/ml
Taxa 260/280	1,911	Taxa 280/260	0,523
Data: 25/11/99		Amostra: 11 – R ₃	
λnm	260	280	320
ABS	0,411	0,214	-0,005
Net A	0,417	0,220	-
Proteína	25,559 µg/ml	Ácidos Nucleicos	18,294 µg/ml
Taxa 260/280	1,896	Taxa 280/260	0,527
Data: 25/11/99		Amostra: 12 – R ₃	
λnm	260	280	320
ABS	0,420	0,220	-0,005
Net A	0,424	0,225	-
Proteína	27,177 µg/ml	Ácidos Nucleicos	18,605 µg/ml
Taxa 260/280	1,890	Taxa 280/260	0,529
Data: 25/11/99		Amostra: 13 – R ₃	
λnm	260	280	320
ABS	0,389	0,217	0,016
Net A	0,373	0,201	-
Proteína	29,50 µg/ml	Ácidos Nucleicos	16,231 µg/ml
Taxa 260/280	1,856	Taxa 280/260	0,539
Data: 02/12/99		Amostra: 14 – R ₁	
λnm	260	280	320
ABS	0,426	0,221	-0,002
Net A	0,428	0,224	-
Proteína	23,250 µg/ml	Ácidos Nucleicos	18,864 µg/ml
Taxa 260/280	1,912	Taxa 280/260	0,523
Data: 02/12/99		Amostra: 15 – R ₂	
λnm	260	280	320
ABS	0,574	0,299	0,003
Net A	0,571	0,296	-
Proteína	27,192 µg/ml	Ácidos Nucleicos	25,246 µg/ml
Taxa 260/280	1,928	Taxa 280/260	0,519
Data: 02/12/99		Amostra: 16 – R ₃	
λnm	260	280	320
ABS	0,564	0,295	0,001
Net A	0,563	0,294	-
Proteína	29,650 µg/ml	Ácidos Nucleicos	24,830 µg/ml
Taxa 260/280	1,916	Taxa 280/260	0,522

TABELA B.2: Conteúdo em massa (g) do “pellet”/ amostra, medidas da concentração de proteínas e ácidos nucleicos presentes nas amostras.

Datas	Amostra - Reator	Pellet (g)	Ácidos Nucléicos (µg/ml)	Proteínas (µg/ml)
25/11/99	01 - 1	0,013	3,20	0
	02 - 1	0,012	7,38	7,28
	03 - 1	0,015	7,81	8,32
	04 - 1	0,015	5,88	4,53
	05 - 1	0,015	8,05	9,62
	06 - 2	0,038	11,89	11,23
	07 - 2	0,054	16,63	15,23
	08 - 2	0,045	27,37	33,07
	09 - 2	0,044	11,85	12,84
	10 - 2	0,015	6,55	8,15
	11 - 3	0,043	18,29	25,56
	12 - 3	0,042	18,60	27,18
	13 - 3	0,023	16,23	29,50
02/12/99	14 - 1	0,020	18,86	23,25
	15 - 2	0,043	25,25	27,19
	16 - 3	0,026	24,83	29,65
09/12/99	17 - 1	0,019	21,83	19,80
	18 - 2	0,020	24,40	23,21
	19 - 3	0,019	17,92	20,01
15/12/99	20 - 1	0,039	20,77	25,33
	21 - 2	0,055	28,73	37,33
	22 - 3	0,055	32,12	47,69
22/12/99	23 - 1	0,043	17,84	26,61
	24 - 2	0,052	31,24	44,31
	25 - 3	0,062	25,58	39,59
28/12/99	26 - 1	0,048	26,29	51,18
	27 - 2	0,054	12,81	23,89
	28 - 3	0,066	18,16	38,03
07/01/00	29 - 1	0,036	12,62	6,70
	30 - 2	0,029	10,99	7,35
	31 - 3	0,042	21,26	21,04
13/01/00	32 - 1	0,021	15,45	15,75
	33 - 2	0,024	11,46	12,19
	34 - 3	0,023	22,51	28,71
04/02/00	35 - 1	0,025	27,63	31,38
	36 - 2	0,028	11,26	20,44
	37 - 3	0,020	18,81	22,47
18/02/00	38 - 1	0,020	42,34	60,69
	39 - 2	0,020	35,52	35,55
	40 - 3	0,020	30,18	23,46
21/02/00	41 - 1	0,021	29,99	22,06
	42 - 2	0,020	28,50	27,36
	43 - 3	0,020	31,88	20,79
22/02/00	44 - 1	0,018	18,62	19,13
	45 - 2	0,022	43,17	60,91
	46 - 3	0,021	36,70	36,96



TABELA B.2 (Continuação): Conteúdo em massa (g) do “pellet”/ amostra, medidas da concentração de proteínas e ácidos nucleicos presentes nas amostras.

Datas	Amostra – Reator	Pellet (g)	Ácidos Nucléicos (µg/ml)	Proteínas (µg/ml)
23/02/00	47 – 1	0,021	24,43	24,91
	48 – 2	0,020	19,32	24,36
	49 – 3	0,019	28,88	28,65
24/02/00	50 – 1	0,023	23,56	35,73
	51 – 2	0,022	27,56	26,07
	52 – 3	0,022	32,71	27,25
25/02/00	53 – 1	0,020	36,17	36,89
	54 – 2	0,021	27,71	22,74
	55 – 3	0,019	29,84	27,95
28/02/00	56 – 1	0,023	8,46	10,11
	57 – 2	0,024	9,46	11,19
	58 – 3	0,020	10,56	9,63
29/02/00	59 – 1	0,020	11,22	12,68
	60 – 2	0,020	12,36	12,48
	61 – 3	0,019	18,02	15,27
01/03/00	62 – 1	0,020	26,29	31,17
	63 – 2	0,023	23,39	22,44
	64 – 3	0,020	10,31	12,21
02/03/00	65 – 1	0,020	7,68	10,17
	66 – 2	0,020	6,70	7,41
	67 – 3	0,021	10,14	12,94
03/03/00	68 – 1	0,025	43,86	40,60
	69 – 2	0,032	32,94	26,46
	70 – 3	0,018	30,51	23,33
30/03/00	71 – 1	0,019	7,56	39,05
	72 – 2	0,018	9,07	10,89
	73 – 3	0,018	16,69	9,12
12/04/00	74 – 1	0,024	8,23	10,76
	75 – 2	0,018	20,48	17,26
	76 – 3	0,019	21,77	21,49
20/04/00	77 – 1	0,023	23,48	19,12
	78 – 2	0,019	25,95	19,19
	79 – 3	0,021	23,03	26,33
27/04/00	80 – 1	0,022	27,81	28,89
	81 – 2	0,017	21,36	16,42
	82 – 3	0,019	26,12	20,65
01/05/00	83 – 1	0,023	30,03	26,39
	84 – 2	0,018	22,38	20,07
	85 – 3	0,021	31,25	61,08
08/05/00	86 – 1	0,020	16,88	8,64
	87 – 2	0,019	15,04	9,04
	88 – 3	0,022	18,12	12,37
11/05/00	89 – 1	0,020	24,38	16,43
	90 – 2	0,020	20,71	18,79
	91 – 3	0,020	25,09	23,41

ANEXOS C

◆ Índice pluviométrico

TABELA C.1: Índice pluviométrico (mm) da Estação de Tratamento de Shibaura, Tokyo-Japão no período de janeiro a maio de 2000.

Dia	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maió
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,5	30,0	0,0
6	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
7	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
8	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	10,5	0,0	0,0	1,5	0,0
11	0,0	0,0	0,0	14,0	0,0
12	17,5	0,0	4,5	0,0	1,5
13	18,0	0,0	0,0	0,0	15,0
14	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0
15	0,0	0,0	0,0	17,5	16,0
16	0,0	0,0	21,0	4,5	0,0
17	20,0	0,0	0,0	0,0	1,0
18	0,0	0,0	0,0	0,0	5,5
19	6,0	0,0	0,0	0,0	1,5
20	0,0	2,5	0,0	31,0	30,0
21	0,0	0,0	0,0	9,5	3,0
22	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
23	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0
24	5,5	0,0	36,0	13,5	0,0
25	17,0	0,0	0,0	0,0	0,0
26	0,5	0,0	0,0	10,0	0,0
27	0,0	0,0	0,0	11,5	4,5
28	0,0	0,0	24,0	0,0	13,5
29	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0
30	0,0	-	0,0	0,0	-
31	0,0	-	0,0	-	-

ANEXOS D

◆ Datas das amostras coletadas.

TABELA D.1: Amostras coletadas no dia 25 de novembro de 1999, de todos os compartimentos dos três sistemas de reação e a condição que cada um foi submetida, os números são equivalentes as linhas da Figura 5.14.

Sistema de reação	1	2	3
Número e condições dos compartimentos	1(AN), 2(AO), 3(AE), 4(AO), 5(AE).	6(AN), 7(AO), 8(AE), 9(AO), 10(AE)	11(AN), 12(AO), 13(AE)

Legenda: AN - anaeróbio; AO – anóxico; AE – aeróbio.

TABELA D.2: Datas das coletas da amostragem mensal e os números equivalentes as linhas da Figura 5.19.

Datas	Sistema de reação 1	Sistema de reação 2	Sistema de reação 3
25/11/99	1	6	11
22/12/00	2	7	12
13/01/00	3	8	13
04/02/00	4	9	14
01/03/00	5	10	15

TABELA D.3: Datas e os números equivalentes as linhas da Figura 5.30, amostragem diária.

Data	Sistema de reação 1	Sistema de reação 2	Sistema de reação 3
22/02/00	1	7	13
23/02/00	2	8	14
24/02/00	3	9	15
25/02/00	4	10	16
28/02/00	5	11	17
29/02/00	6	12	18

TABELA D.4: Datas das coletas e os número são equivalentes as linhas das Figuras 5.24, 5.26 e 5.28, amostragem mensal.

Mês	Datas	Amostras
Novembro de 1999	25	1
Dezembro de 1999	2	2
	9	3
	15	4
	22	5
	28	6
Janeiro de 2000	7	7
	13	8
Fevereiro de 2000	4	9
	18	10
	25	11
Março de 2000	3	12
	30	13
Abril de 2000	12	14
	20	15
	27	16
Maio de 2000	1	17
	8	18
	11	19

ANEXOS E

- ◆ Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade.

TABELA E-1: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos cinco compartimentos do sistema de reação 1, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).

Linhas	a	b	j	Cs (%)
1,2	21	21	20	95
2,3	21	19	19	95
3,4	19	19	19	100
4,5	19	20	19	97
1,3	21	19	19	95
3,5	19	20	19	97
2,4	21	19	19	95
1,4	21	19	19	95
1,5	21	20	20	98
2,5	21	20	19	93

TABELA E-2: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos cinco compartimentos do sistema de reação 2, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).

Linhas	a	b	j	Cs (%)
6,7	22	22	22	100
6,8	22	22	22	100
6,9	22	22	22	100
6,10	22	22	22	100
7,8	22	22	22	100
7,9	22	22	22	100
7,10	22	22	22	100
8,9	22	22	22	100
8,10	22	22	22	100
9,10	22	22	22	100

TABELA E-3: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos três compartimentos do sistema de reação 3, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).

Linhas	a	B	j	Cs (%)
11,12	22	22	22	100
11,13	22	22	22	100
12,13	22	22	22	100

TABELA E-4: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos cinco compartimentos do sistema de reação 1 e 2, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).

Linhas	a	b	j	Cs (%)
1,6	21	22	13	60
2,7	21	22	12	56
3,8	19	22	11	54
4,9	19	22	11	54
5,10	20	22	12	57

TABELA E-5: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas nos compartimentos do sistema de reação 2 e 3, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).

Linhas	a	b	j	Cs (%)
6,11	22	22	18	82
7,12	22	22	18	82
8,13	22	22	18	82
9,12	22	22	18	82
10,13	22	22	18	82

TABELA E-6: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no primeiro e último compartimento dos sistemas de reação 1, 2 e 3, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).

Linhas	a	b	j	Cs (%)
1,6	21	22	13	60
1,11	21	22	15	70
6,11	22	22	18	82
5,10	20	22	12	57
5,13	20	22	13	62
10,13	22	22	18	82

TABELA E-7: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE encontradas nos três sistema de reação, submetidos as diferentes condições (anaeróbia, anóxica, aeróbia).

Linhas	a	b	J	Cs (%)
1,2	100	110	11	10
2,3	110	110	18	16
1,3	100	110	13	12

TABELA E-8: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1, amostras mensais.

Linhas	a	b	J	Cs (%)
1,2	20	23	19	88
2,3	23	25	22	92
3,4	25	24	22	90
4,5	24	18	16	76
1,3	20	25	18	80
3,5	25	18	15	70
2,4	23	24	19	81

TABELA E-9: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2, amostras mensais.

Linhas	a	b	j	Cs (%)
6,7	22	24	20	87
7,8	24	25	23	94
8,9	25	24	22	90
9,10	24	25	22	90
6,8	22	25	19	81
8,10	25	25	20	80
7,9	24	24	20	83

TABELA E-10: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 3, amostras mensais.

Linhas	a	b	j	Cs (%)
11,12	22	18	16	80
12,13	18	21	18	92
13,14	21	24	20	89
14,15	24	22	22	96
11,13	22	21	16	74
13,15	21	22	18	84
12,14	18	24	17	81

TABELA E-11: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1 e 2, amostras mensais.

Linhas	a	b	j	Cs (%)
1,6	20	22	15	71
2,7	23	24	19	81
3,8	25	25	21	84
4,9	24	24	18	75
5,10	18	25	16	74

TABELA E-12: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2 e 3, amostras mensais.

Linhas	a	b	j	Cs (%)
6,11	22	22	16	73
7,12	24	18	15	71
8,13	25	21	18	78
9,14	24	24	17	71
10,15	25	22	16	68

TABELA E-13: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1, amostras semanais.

Linhas	a	b	j	Cs
1,2	20	25	19	84
2,3	25	25	25	100
3,4	25	25	23	92
4,5	25	23	23	96
5,6	23	25	22	92
6,7	25	25	24	96
7,8	25	24	24	98
8,9	24	24	23	96
9,10	24	25	23	94
10,11	25	27	25	96
11,12	27	26	26	98
12,13	26	22	22	92
13,14	22	19	14	68
14,15	19	20	17	87
15,16	20	19	18	92
16,17	19	21	17	85
17,18	21	16	16	86
18,19	16	19	15	86

TABELA E-14: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2, amostras semanais.

Linhas	a	b	j	Cs
1,2	22	27	22	90
2,3	27	26	25	94
3,4	26	27	26	98
4,5	27	24	24	94
5,6	24	21	20	89
6,7	21	25	21	91
7,8	25	25	25	100
8,9	25	24	22	90
9,10	24	27	24	94
10,11	27	27	26	96
11,12	27	24	24	94
12,13	24	24	21	88
13,14	24	24	22	92
14,15	24	25	24	98
15,16	25	22	22	94
16,17	22	25	22	94
17,18	25	21	20	87
18,19	21	21	20	95

TABELA E-15: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1, amostras semanais.

Linhas	a	b	j	Cs
1,2	22	26	21	88
2,3	26	25	23	90
3,4	25	20	20	89
4,5	20	18	18	95
5,6	18	20	16	84
6,7	20	21	20	98
7,8	21	21	19	90
8,9	21	24	21	93
9,10	24	25	23	94
10,11	25	24	23	94
11,12	24	26	24	96
12,13	26	25	24	94
13,14	25	23	23	96
14,15	23	20	20	93
15,16	20	17	17	92
16,17	17	17	17	100
17,18	17	20	17	92
18,19	20	18	18	95

TABELA E-16: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1, amostras diárias

Linhas	a	b	j	Cs
1,2	28	29	28	98
2,3	29	28	28	98
3,4	28	27	27	98
4,5	27	27	27	100
5,6	27	27	27	100
1,3	28	28	28	100
3,5	28	27	27	98
2,4	29	27	27	96
4,6	27	27	27	100

TABELA E-17: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2, amostras diárias.

Linhas	a	b	j	Cs
7,8	27	27	27	100
8,9	27	27	27	100
9,10	27	27	27	100
10,11	27	26	26	98
11,12	26	26	26	100
7,9	27	27	27	100
9,11	27	26	26	98
8,10	27	27	27	100
10,12	27	26	26	98

TABELA E-18: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 3, amostras diárias.

Linhas	a	b	j	Cs
13,14	25	25	25	100
14,15	25	24	24	98
15,16	24	24	24	100
16,17	24	24	22	92
17,18	24	24	24	100
13,15	25	24	24	98
15,17	24	24	22	92
14,16	25	24	24	98
16,18	24	24	22	92

TABELA E-19: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 1 e 2, amostras diárias.

Linhas	a	b	j	Cs
1,7	28	27	21	76
2,8	29	27	22	79
3,9	28	27	21	76
4,10	27	27	20	74
5,11	27	26	20	75
6,12	27	26	20	75

TABELA E-20: Valores utilizados no cálculo do coeficiente de similaridade (Cs) das bandas DGGE, encontradas no último compartimento aeróbio do sistema de reação 2 e 3, amostras diárias.

Linhas	a	b	J	Cs
7,13	27	25	21	81
8,14	27	25	21	81
9,15	27	24	20	78
10,16	27	24	20	78
11,17	26	24	18	72
12,18	26	24	18	72