Avaliação da Atividade Microbiana Anaeróbia Metanogênica na Lagoa de Estabilização Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários do Município de Cajati, Vale do Ribeira de Iguape, Estado de São Paulo.

LARA STEIL

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 Engenharia Civil.

Área de Concentração: Hidráulica e Saneamento

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

São Carlos

2007

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

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

S818a Steil, Lara
Avaliação da atividade microbiana anaeróbia
metanogênica na lagoa de estabilização anaeróbia da
estação de tratamento de esgotos sanitários do município
de Cajati, Vale do Ribeira de Iguape, Estado de São Paulo
/ Lara Steil ; orientador Rosana Filomena Vazoller. --
São Carlos, 2007.

Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2007.

1. Lagoas de estabilização anaeróbias. 2. Esgotos
sanitários. 3. Metanogênese. 4. AME. 5. DGGE. 6. FISH.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **LÁRA STEIL**

Tese defendida e julgada em 31/08/2007 perante a Comissão Julgadora:

Prof.^a. Dr.^a. **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Instituto de Ciências Biomédicas/USP)

Aprovada

Prof. Titular **JOSÉ ROBERTO CAMPOS**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof.^a. Dr.^a. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Dr. **ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Campus de Jaboticabal)

Aprovado

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

Aprovada

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia (Hidráulica e Saneamento)

Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

D*edico* este trabalho a Deus, ao Universo, que sempre conspira a nosso favor e é fonte inesgotável de força e coragem, inteligência e sabedoria, amor e compaixão, de onde tudo vem e pra onde tudo vai

A todos aqueles que contribuíram para que eu seja quem sou hoje, e desta forma tornaram a realização deste trabalho possível.

Ao meu pai Valmor, minha mãe Maria Aparecida (in memorian), meu irmão Carlos, meus avós (Vó Maura e Vô Finoca (in memorian), Vó Geralda), tios e tias, primos e primas, à minha família toda, porque é aí onde tudo principia.

A todos os meus professores de todos os níveis... da escola Profa. Zina de Castro Bicudo, o Grupão de Santos-SP; da Escola Estadual Alfredo Olivotti em Extrema-MG, do Colégio de Caldas Novas – Caldas Novas-GO; e das universidades onde estudei, Departamento de Ciências Biológicas da UFSCAR – São Carlos-SP, Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada – CRHEA – EESC – USP – São Carlos-SP, Instituto de Química - Unesp - Araraquara-SP, Departamento de engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp Jaboticabal-SP, Departamento de Hidráulica e Saneamento - EESC – USP – São Carlos-SP, sem cada um desses mestres essa Tese não existiria.

A todos os meus amigos e amigas de todos os tempos, sem os quais eu não seria quem sou e sem os quais esse momento não seria tão importante quanto é.

À Isis e Afrodite, meus anjos eternos.

O*fereço* ao povo do meu país, um povo brilhante apesar de tantos e inúmeros reveses, um povo que paga altos impostos sem contudo ter uma educação, saúde, saneamento básico condizentes e para todos, um povo maravilhoso e, infelizmente, tão desperdiçado...
Humildemente, espero ter produzido um trabalho, de fato, útil para esse país.

*O que tu fazes, eu não posso fazer.
O que eu faço, tu não podes fazer.
Mas juntos, eu e tu, podemos fazer alguma coisa
grande e bela.
(Madre Tereza de Calcutá)*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller pelo privilégio da convivência, mesmo que distante, pela possibilidade de aprender tanto com uma pessoa tão iluminada, pelo exemplo de ética, humanidade, sabedoria, serenidade e competência profissional. Que bom que existem pessoas como você no mundo!!!

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento pela oportunidade e suporte para a realização do curso de doutorado. Em especial à profa. Maria do Carmo Calijuri pela paciência e apoio nos momentos mais problemáticos.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento, André, Rose, Flávia, Fernanda, Sá e Pavi, pela amizade e presteza no atendimento.

À SABESP-Unidade de Negócios do Vale do Ribeira por nos receber sempre tão bem em sua ETE e por estar sempre pronta a nos auxiliar. Em especial ao Eng. Químico Osvaldo Beltrame Filho da SABESP-Registro pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa no âmbito do Projeto Temático.

À Profa. Elizabeth de Matos Moraes e Maria Ângela Tallarico Adorno pelo apoio, paciência, amizade e dedicação em introduzir os alunos na arte da cromatografia.

À Dra. Flávia Tallarico Saia, minha irmã linda e iluminada, pela amizade sincera e eterna, pelo sorriso franco e contagiante, e pela paciência em me ensinar “zilhões” de coisas do universo da microbiologia das nossas queridinhas anaeróbias!

Ao Dr. Fábio Chinaglia... amigo querido pra todas as horas, das conversas descontraídas às discussões filosóficas e de trabalho, pelo companheirismo de sempre e por dividir comigo seus conhecimentos de DGGE.

Ao Dr. José Eduardo Alamy Filho pela amizade e eterna paciência com os gráficos da batimetria e cálculo de volume de lodo.

Às amigas do Biotace, Adriana, Juliana, Patrícia e Roseli, e ao André, pelo companheirismo e apoio durante as coletas.

Ao Miro e Betão, pessoas inigualáveis, divertidas, competentes e amigas com quem tive o privilégio de contar durante as coletas. Ao Seu Benezinho que também nos acompanhou nas coletas e foi de uma prestatividade inigualável!

Aos amigos e amigas eternos e do coração que fizeram da vida durante o doutorado muito mais legal, Monique, Karina e Fernandão, Tinil, Gláucio, Thiago Momenti, Katita, Karine e Joãozinho, Cáscia, Ignez, Roseli, Renato Siman, Mercinha, Paola, Jucélia, Fábio, Flavinha, Augusta e Raniere, Hugo e Roberta.

Às minhas companheiras de casa, pela amizade sincera de sempre e por fazer nossa estadia em Sanca city mais acolhedora.

A toda turma do SHS, Luana, Luciana Peixoto, Rodrigo, Ronan, Luciana Pallone, Bruna, Sidney, Betão, Arnaldo, Ari, Sandra, Tininha, Eduardo, Estela, Márcia, Cristina, Leonardo, Júlia, Katt, Luis Hamilton, Larissa, Ana Paula Micheleto, Madalena, Anderson, Gabriel, Glaucel, Isabel, Cláudia, Gunther e Dalva.

Ao Ibama-Prevfogo, em especial nas pessoas de Elmo Monteiro da Silva Júnior e José Lázaro de Araújo Filho pela confiança depositada e pelo apoio na finalização desta tese.

À todo o pessoal do Ibama-Prevfogo, especialmente à minha equipe de trabalho, Fábio Furquim, Flávia Leite, Mariana Senra, Rodrigo Andrade, Fernando Jorge, Bruno Alves, Heloíso Bueno Figueiredo e Suiá pelo companheirismo, paciência e apoio.

Ao amigo e “primo” Guilherme Destro! Pela amizade, paciência, companheirismo e apoio na reta final desse trabalho.

A uma turminha que dispensa comentários pela grandiosidade de alma, Paulo Roberto Russo, Ivan Favaro, Eduardo Wagner e Ana Martins, Cristiano Fernandes Ferreira e Mariana Senra, Verusca Cavalcante e Fernando Jorge. Obrigado por fazerem parte da minha vida, vocês são tudo de bom e moram no meu coração!!!

Aos amigos de todo o sempre que estiveram (e continuam estando) presentes durante muito tempo e em momentos imprescindíveis, Jefferson Rodrigues, Dimitrios Kondogeorgos, Gerson Narciso, Rogério Penetra, Ana Carolina Amorim, Lara Pinheiro, Eunice Piassi, Regiane Mathias, Renato Pereira e Ândrea Perseguini.

RESUMO

STEIL, L. **Avaliação da Atividade Microbiana Anaeróbia Metanogênica na Lagoa de Estabilização Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários do Município de Cajati, Vale do Ribeira de Iguape, Estado de São Paulo.** 2007. 267 f. Tese (Doutorado em engenharia hidráulica e saneamento) - Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS), Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo – USP. 2007

O estudo sobre a comunidade microbiana de um sistema de tratamento biológico de águas residuárias é de particular interesse, uma vez que o conhecimento da Microbiologia do processo pode levar ao aperfeiçoamento de projetos e ao aumento da eficiência dos sistemas. Este trabalho avaliou a atividade microbiana, particularmente a metanogênica, na lagoa de estabilização anaeróbia da estação de tratamento de esgotos sanitários do Município de Cajati – SP. Para isso adotou a taxonomia polifásica na caracterização dos microrganismos e de seus aspectos funcionais, buscando o conhecimento da diversidade dos microrganismos e suas relações nesse tipo de sistema anaeróbio. Objetivou também contribuir para o estabelecimento de um protocolo seguro na realização dos ensaios de atividade metanogênica específica (AME). Os estudos foram realizados com amostras dos sedimento da lagoa coletadas em três períodos diferentes, a saber: outubro/2003, outubro/2004 e dezembro/2004. Durante as amostragens foram determinadas variáveis abióticas como temperatura, condutividade, pH, potencial de óxido-redução e teor de oxigênio dissolvido. Medidas do conteúdo de sólidos totais e voláteis (SV) foram também realizadas. A avaliação da atividade microbiana foi feita por exames microscópicos de contraste de fase e fluorescência, AME, determinação do DNA_{total}, FISH - hibridização *in-situ* com sondas fluorescentes e DGGE - eletroforese em gel com gradiente linear de agentes desnaturantes. Também procedeu-se a contagem de protozoários e análise da presença de algas e cianobactérias. Os resultados revelaram que ocorreu variação nas condições do processo biológico nos períodos amostrados, sendo que em outubro/2004, durante período de fortes chuvas e ventos, a eficiência na redução da DBO foi apenas 18,2%. Nesse período, constatou-se organismos como algas do gênero *Chorella* sp e cianobactérias do gênero *Merismopedia* sp. Nas demais coletas a remoção da matéria orgânica medida em DBO foi superior a 80%, com boa atividade anaeróbia. Os resultados mostraram que a relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹ SV foi a mais adequada para determinar o valor de AME, e os ensaios com as amostras de outubro/2003 e dezembro/2004 revelaram valores de AME na faixa de 0,85 a 0,21 mgCH₄ g⁻¹SV d⁻¹. Constatou-se a ocorrência de alterações na estrutura da comunidade microbiana inicial em relação à final do experimento de AME, por meio do DGGE. Verificou-se também nesses ensaios, que o conteúdo de SV_{inicial} variou entre amostras e substratos, conferindo alta variabilidade ao teste. Os perfis de DGGE das amostras coletadas revelaram variação na estrutura das comunidades microbianas no sedimento, e maior diversidade de bactérias e arqueias quando a lagoa anaeróbia apresentava boa eficiência na redução da DBO. A técnica FISH como adotada não foi eficaz para quantificar e identificar os microrganismos devido ao excesso de hibridizações inespecíficas. Mesmo com suas limitações, a técnica FISH revelou a presença de microrganismos dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Nesse caso, a Família *Methanobacteriaceae*, a ordem *Methanomicrobiales* e o gênero *Methanosaeta* sp. foram confirmados. Nas diferentes coletas, foram identificados protozoários dos gêneros *Paramecium* sp. e *Vorticella* sp., e rotíferos dos gêneros *Brachionus* sp., *Trichocerca* sp., *Synchaeta* sp. e *Keratella* sp.

Palavras-chave: lagoas de estabilização anaeróbias, esgotos sanitários, metanogênese, AME, DGGE; FISH.

ABSTRACT

STEIL, L. **Assessment of anaerobic methanogenic microbial activity at anaerobic stabilization pond of domestic wastewater plant at Cajati city, Vale do Ribeira de Iguape, São Paulo State, Brazil.** 2007. 267 f. Thesis (Doctoral) - Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS), Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo – USP. 2007

Microbial diversity studies have remarkable relevance since the knowledge about the microbiology of process can improve plants and system efficiency. This work assessed microbial activity, specially methanogenic, at anaerobic pond for domestic wastewater treatment in the City of Cajati, São Paulo State, Brazil. Poliphasic taxonomy was adopted in order to contribute to the understanding of microbial community diversity and functionality. As well as to contribute for the establishment of a protocol to the specific methanogenic activity test (SMA). Three periods of sampling were done at the sediment of the anaerobic pond (october 2003, october 2004 and december 2004). Abiotic variables as temperature, conductivity, pH, dissolved oxygen and redox potential were measured at sampling time. TS and VS contents were determined in the samples. Microbial studies were done by observation on optical and fluorescent microscopy, analyse of SMA, total DNA quantitation, counting of protozoa, analyze of algal and cyanobacteria presence, as well as application of two molecular techniques: Fluorescent *in-situ* Hybridization (FISH) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Results showed that general conditions of the anaerobic pond changed among samplings. On October 2004, when the rain and wind were very strong, the organic matter removal efficiency (BOD basis) in the anaerobic pond was low (18.2%) and predominant microorganisms were of aerobic algae, as *Chorella* sp, and the blue-green algae *Merismopedia* sp. On the other hand, the removal of organics at other two samplings was more than 80% and the anaerobic microbial activity was verified in the sample. SMA tests showed the Food/Microorganism rate (F/M) of 0.25 gDQO g⁻¹ VS was the most suitable to the samples. The results showed SMA values between 0.85 and 0.21 mgCH₄ g⁻¹ VS d⁻¹ for samples of October 2003 and October 2004. SMA test induced modifications in the structure of the microbial community according to DGGE-profile. In addition, VS content, which was used in the SMA tests as biomass measurement, displayed variable behavior making test results difficult to interpret in some situations. DGGE-profile showed variation in the sediment community structure. Higher bacterial and archaeal diversity was observed when anaerobic pond showed 80%, or more, of DBO removal. FISH technique was not a suitable method to secure quantification and identification of the microorganisms from in excess. In spite of the technique limitations, it was possible to identify microorganisms of *Bacteria* Domain, *Archaea* Domain, *Methanobacteriaceae* Family, *Methanomicrobiales* Order, and microorganisms belonging to *Methanosaeta* genus. *Paramecium* and *Vorticella* were the protozoans identified in all samplings. Rotifers belonging to genders *Brachionus*, *Trichocerca*, *Synchaeta* and *Keratella* were also observed.

Keywords: anaerobic stabilization pond; domestic wastewater; methanogenesis; specific methanogenic activity; DGGE; FISH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral do estudo desenvolvido na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.....	54
Figura 2. (a) Vista aérea da ETE do município de Cajati; (b) Sistema de gradeamento e calha Parshal; (c) Entrada da Lagoa Anaeróbia; (d) Entrada do afluente na Lagoa Anaeróbia em três pontos; (e) Vista geral da Lagoa Anaeróbia; (f) Saída do efluente da Lagoa Anaeróbia em dois pontos; (g) Entrada do efluente da Lagoa Anaeróbia na Lagoa Facultativa; (h) Tanque por onde passa o efluente da Lagoa Facultativa antes do lançamento no Rio Jacupiranguinha.....	57
Figura 3. (a) D. Detalhe do lançamento do efluente do sistema no Tanque de cloração - nota-se claramente a presença de grande quantidade de algas, gerando a intensa coloração verde; (b) Saída do Tanque de Cloração; (c) e (d). Ponto de lançamento do efluente do sistema no Rio Jacupiranguinha (seta em vermelho).....	58
Figura 4. Universo amostral: distribuição dos pontos de coleta no sedimento da Lagoa Anaeróbia.....	59
Figura 5. (a) Coletor automático de amostras; (b) Painel de controle do coletor automático de amostras.....	60
Figura 6: Esquema dos testes de AME realizados com amostras de sedimento da Coleta Preliminar e na Segunda Coleta (20/10/2004).....	79
Figura 7. Esquema dos três grupos de testes de AME realizados com amostras de sedimento da Terceira Coleta (16/12/2004).....	80
Figura 8. Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridização in situ.....	87
Figura 9. Esquema da distribuição do sedimento na Lagoa Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos do Município de Cajati-SP; Pontos amostrados em destaque em vermelho. Coleta preliminar, outubro/2003.....	97
Figura 10. Esquema da distribuição do sedimento na Lagoa Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos do Município de Cajati-SP; Pontos amostrados em destaque em vermelho. Coleta de dezembro/2004.....	97
Figura 11. Esquema para comparação da distribuição do sedimento na Lagoa Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos do Município de Cajati-SP; (a) Coleta de outubro/2003; (b) Coleta de dezembro/2004; (c) perda de sedimento em dezembro/2004 em relação a outubro/2003.....	99
Figura 12. Valores de profundidade (a), temperatura (b), condutividade (c), oxigênio dissolvido (d), pH (e) e potencial de óxido redução (f) determinados nas amostras de sedimento coletadas nas regiões de entrada do afluente, central e saída do efluente da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos esquerdo (EptE, CptE, SptE), do centro (EptC, CptC, SptC) e da direita em relação ao fluxo (EptD, CptD, SptD). Coletas de outubro/2003, outubro e dezembro/2004. Considerando: EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; EptC – região de entrada ponto do centro em relação ao fluxo; EptD – região de entrada ponto da direita em relação ao fluxo; CptE – região central ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; CptD – região central ponto da direita em relação ao fluxo; SptE – região de saída ponto da esquerda em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo; SptD – região de saída ponto da direita em relação ao fluxo.....	100
Figura 13 - Valores de ST e SV nas amostras de sedimento provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos esquerdo (EptE, CptE e SptE), central (EptC, CptC e SptC) e direito em relação ao fluxo (EptD, CptD e SptD). Coletas de outubro/2003 (a), outubro/2004 (b) e dezembro/2004 (c). Considerando: EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; EptC – região de entrada ponto do centro em relação ao fluxo; EptD – região de entrada ponto da direita em relação ao fluxo; CptE – região central ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; CptD – região central ponto da direita em relação ao fluxo; SptE –	

região de saída ponto da esquerda em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo; SptD – região de saída ponto da direita em relação ao fluxo.....	105
Figura 14. Fotomicrografias dos tipos morfológicos predominantes nos pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati-SP. (a) e (b) bacilos, cocos e filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp; (c) morfologia espiralada; (d) bacilos agrupados formando filamento; (e) pequenos cocos e bacilos vistos em contraste de fase; (f) a foto anterior em fluorescência. Aumento 1500x. Coleta preliminar, outubro/2003.....	109
Figura 15. Fotomicrografia dos tipos morfológicos predominantes nos pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati-SP. (a) bacilos, cocos e filamentos; (b) cianobactéria do gênero <i>Merismopedia</i> sp. e protozoário; (c) algas do gênero <i>Chorella</i> sp; (d) filamentos e bacilos; (e) bacilos e cocobacilos. Aumento 1500x. Coleta outubro/2004.....	113
Figura 16. Fotomicrografia dos tipos morfológicos predominantes nos pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati-SP. (a) filamentos em arranjo paliádico semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp; (b) bacilos e filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp; (c) bacilos curvos; (d) cocos em cadeia, bacilos e alga do gênero <i>Chorella</i> sp.; (e) bacilos, cocos e filamento; (f) gênero de cianobactéria <i>Merismopedia</i> sp. Aumento 1500x. Coleta dezembro/2004.....	115
Figura 17. Valores numéricos médios (organismos $g^{-1}SV$) de protozoários, algas do gênero <i>Chlorella</i> sp e rotíferos encontrados nas amostras da Lagoa Anaeróbia coletadas nas regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente nos pontos da esquerda, do centro e da direita em relação ao fluxo. Coleta de outubro e dezembro/2004. Considerando: EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; EptC – região de entrada ponto do centro em relação ao fluxo; EptD – região de entrada ponto da direita em relação ao fluxo; CptE – região central ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; CptD – região central ponto da direita em relação ao fluxo; SptE – região de saída ponto da esquerda em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo; SptD – região de saída ponto da direita em relação ao fluxo.....	120
Figura 18. Fotomicrografias dos tipos morfológicos predominantes nas amostras após a realização do ensaio de AME. (a) Feixe de filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp, comumente encontrados no ensaio SptC _{0,25HPr} (b) cocos; (c) bacilos; (d), (e) e (f) diferentes tipos de filamentos. Aumento 1500x. Coleta preliminar - outubro/2003.....	134
Figura 19. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME utilizando HAC como fonte de carbono na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO $g^{-1}SV$ com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	147
Figura 20. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME utilizando HPr como fonte de carbono na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO $g^{-1}SV$ com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	148
Figura 21. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME utilizando HBu como fonte de carbono na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO $g^{-1}SV$ com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	149

Figura 22. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME utilizando HFor como fonte de carbono na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	150
Figura 23. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	151
Figura 24. Representação gráfica dos valores de produção de CH ₄ ao longo do ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV na amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	152
Figura 25. Valores de produção de CO ₂ ao longo do ensaio de AME utilizando mistura de ácidos (HAc:HPr:HBU:HFor) na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE e SptE), do centro (EptC, CptC e SptC) e da direita (EptD, CptD e SptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	156
Figura 26. Valores de distribuição de CO ₂ no headspace ao longo do ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV na amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	157
Figura 27. Fotomicrografia dos tipos morfológicos predominantes nas amostras após a realização do ensaio de AME. (a) Cocos; (b) Feixe de filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp; (c) Filamentos e bacilos; (d) Filamento; (e) Bacilos e cocos; e (f) filamento com vesículas de gás. Microscopia de contraste de fase, aumento 1500x. Coleta dezembro - 2004.....	174
Figura 28. Gel de DGGE com produto de PCR realizado com (a) primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) e (b) primer para <i>Archaea</i> (1100 FGC e 1400 R) aplicados às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBU e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	179
Figura 29. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para <i>Archaea</i> (1100 FGC e 1400 R) aplicados às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBU e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	181
Figura 30. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicados às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBU e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	182
Figura 31. Perfil de bandas do gel de DGGE com produto de PCR realizado com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta outubro - 2004.....	183
Figura 32. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado nas	

amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta outubro - 2004.....	184
Figura 33. Perfil de bandas do gel de DGGE com produto de PCR realizado com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	185
Figura 34. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	186
Figura 35. Perfil de bandas do gel de DGGE com produto de PCR realizado com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Comparação entre as coletas de outubro e dezembro - 2004.	187
Figura 36. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R), aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Comparação entre as coletas de outubro e dezembro - 2004.....	189
Figura 37. Gel de DGGE com produto de PCR realizado com primer para <i>Archaea</i> (1100 FGC e 1400 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	189
Figura 38. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para <i>Archaea</i> (1100 FGC e 1400 R), aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.. Coleta dezembro - 2004.....	191
Figura 39. Fotomicrografias das hibridizações inespecíficas e em grupos de material inorgânico e celular nas amostras provenientes dos nove pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati em dezembro de 2004. (a) Sonda EUB338, Domínio <i>Bacteria</i> ; (b) Sonda MS821, gênero <i>Methanosarcina</i> . Aumento de 2000x.....	195
Figura 40. Fotomicrografias das hibridizações realizadas com as amostras provenientes dos nove pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati em dezembro de 2004. (a) Sonda ARC915, Domínio <i>Archaea</i> ; (b) Sonda EUB338, Domínio <i>Bacteria</i> ; (c) Sondas MB1174 + MB310, família <i>Methanobacteriaceae</i> ; (d) Sonda MG1200, ordem <i>Methanomicrobiales</i> ; (e) Sonda Mst826, gênero <i>Methanosaeta</i> . (a) e (b) Aumento de 1500x. (c), (d) e (e) Aumento de 2000x.....	196
Figura 41. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do metano em amostras por cromatografia em fase gasosa.....	245
Figura 42. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do metano em amostras por cromatografia em fase gasosa.....	245
Figura 43. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido acético em amostras por cromatografia em fase líquida.....	246
Figura 44. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido butírico em amostras em amostras por cromatografia em fase líquida.....	246
Figura 45. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido propiônico em amostras por cromatografia em fase líquida.....	247
Figura 46. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido iso-valérico em amostras por cromatografia em fase líquida.....	247
Figura 47. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido fórmico em amostras em amostras por cromatografia em fase gasosa.....	248

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gêneros representantes das espécies metanogênicas, aspectos de sua morfologia e substrato utilizado para a conversão em biogás.....	29
Tabela 2. Características da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati e parâmetros de projeto do sistema.....	56
Tabela 3. Solução de metais traço Biota.....	65
Tabela 4. Composição da solução de vitaminas.....	65
Tabela 5. Descrição dos ensaios de AME realizados com as amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia - Outubro/2003.....	73
Tabela 6. Descrição dos ensaios de AME realizados com a amostra SptC da Lagoa Anaeróbia - Outubro/2003.....	74
Tabela 7. Descrição do primeiro grupo de ensaios de AME - Dezembro/2004.....	76
Tabela 8. Descrição do segundo grupo de ensaios de AME - Dezembro/2004.....	77
Tabela 9. Descrição do terceiro grupo de ensaios de AME - Dezembro/2004.....	77
Tabela 10. Descrição dos <i>primers</i> dos Domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> utilizados nas reações da PCR das amostras da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.....	83
Tabela 11. Descrição das sondas de oligonucleotídeos grupo-específicas utilizadas nas análises com FISH.....	85
Tabela 12. Descrição dos protocolos de hibridização e lavagem das amostras.....	88
Tabela 13 - Valores característicos das variáveis de monitoramento do sistema de tratamento de esgotos sanitários do município de Cajati em outubro/2003, março/2004, maio/2004, agosto/2004 e em novembro/2004.....	88
Tabela 14 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, ponto esquerdo (EptE), região central, ponto do centro (CptC) e região de saída do efluente da Lagoa Anaeróbia, ponto do centro (SptC). Coleta preliminar, outubro/2003.....	110
Tabela 15 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de entrada do afluente, pontos esquerdo (EptE), do centro (EptC) e direito (EptD). Coleta outubro/2004.....	113
Tabela 16 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região central da lagoa, pontos esquerdo (CptE), do centro (CptC) e direito (CptD). Coleta outubro/2004.....	113
Tabela 17 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de saída do efluente, pontos esquerdo (SptE), do centro (SptC) e direito (SptD). Coleta outubro/2004.....	113
Tabela 18 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de entrada do afluente, pontos esquerdo (EptE), do centro (EptC) e direito (EptD). Coleta dezembro/2004.....	116
Tabela 19 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região central da lagoa, pontos esquerdo (CptE), do centro (CptC) e direito (CptD). Coleta dezembro/2004.....	116
Tabela 20 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de saída do efluente, pontos esquerdo (SptE), do centro (SptC) e direito (SptD). Coleta dezembro/2004.....	117
Tabela 21 - Valores médios de Sólidos Voláteis (SV) iniciais e finais, da Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e da Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAC na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente e central da Lagoa Anaeróbia da ETE-	

Cajati nos pontos da esquerda (EptE e CptE), do centro (EptC e CptC) e da direita (EptD e CptD) em relação ao fluxo. Coleta preliminar, outubro/2003.....	124
Tabela 22 - Valores médios de Sólidos Voláteis (SV) iniciais e finais, da Atividade Metanogênica Aparente e da Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, a partir dos SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAc, HBU, HPr e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g ⁻¹ SV, com amostras provenientes da região de saída do efluente na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (SptE), do centro (SptC) e da direita (SptD) em relação ao fluxo. Coleta preliminar, outubro/2003.....	125
Tabela 23 - Valores médios da produção teórica total de metano esperada no ensaio de AME com adição de diferentes fontes orgânicas externas (HAc, HBU, HPr e HFor) nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g ⁻¹ SV h ⁻¹ , em amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e saída do efluente na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE, SptE), do centro (EptC, CptC, SptC) e da direita (EptD, CptD, SptD) em relação ao fluxo, submetidas aos ensaios de AME. Coleta preliminar - outubro/2003.....	131
Tabela 24 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados na amostra proveniente da região de entrada do afluente, ponto esquerdo, antes dos ensaios de AME (EptE _{original}), após sua realização, quando se utilizou HAc como fonte de carbono externa (EptE _{0,25HAc}) e no controle do ensaio (EptE _{Controle 0,25HAc}). Coleta preliminar - outubro/2003.....	135
Tabela 25 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados na amostra proveniente da região central, ponto do centro, antes dos ensaios de AME (CptC _{original}), após sua realização, quando se utilizou HAc como fonte de carbono externa (CptC _{0,25HAc}) e no controle do ensaio (CptC _{Controle}). Coleta preliminar - outubro/2003.....	135
Tabela 26 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados na amostra proveniente da região de saída do efluente, ponto do centro, antes dos ensaios de AME (SptC _{original}), após sua realização, quando se utilizou a relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV com (SptC _{0,25HAc}) e sem (SptC _{0,25HAc}) esgotamento da matéria orgânica; na relação S_0/X_0 de 0,5 g DQO g ⁻¹ SV (SptC _{0,5HAc}) e os controles dos ensaios (SptC _{Controle0,25HAc} , SptC _{Controle0,25HAc} e SptC _{Controle0,25HAc}). Coleta preliminar, outubro - 2003.....	136
Tabela 27 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras submetidas ao ensaio de AME após sua realização quando se utilizou os ácidos HBU, HPr e HFor como fontes de carbono externas. Coleta preliminar, outubro - 2003.....	137
Tabela 28 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes dos frascos-controle do ensaio de AME após sua realização quando se utilizou os ácidos HBU, HPr e HFor como fontes de carbono externas. Coleta preliminar, outubro/2003.....	137
Tabela 29 - Valores médios para $SV_{inicial}$ antes do ensaio de AME, $SV_{inicial}$ após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME em diferentes relações S_0/X_0 com diferentes substratos com amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	141
Tabela 30 - Valores médios para $SV_{inicial}$ antes do ensaio de AME, $SV_{inicial}$ após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE e SptE), do centro (EptC, CptC e SptC) e da direita (EptD, CptD e SptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro	

- 2004.....	141
Tabela 31 - Valores médios para $SV_{inicial}$ antes do ensaio de AME, $SV_{inicial}$ após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	142
Tabela 32 - SV e DNA _{total} determinados no início e no final dos ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV com amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004..	144
Tabela 33 - Densidades óticas (?) em 260 e 280 nm determinadas no início (amostra original) e no final dos ensaios de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV nas amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	144
Tabela 34 - Valores médios de Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g ⁻¹ SV e utilizando uma mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25, 0,5 e 0,75 g DQO g ⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	160
Tabela 35 - Valores médios da produção teórica e medida de metano no ensaio de AME utilizando HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g ⁻¹ SV, e utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25, 0,5 e 0,75 g DQO g ⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro – 2004.	161
Tabela 36 - Valores médios de Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. e SV_{final} no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e Hfor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (EptC, CptC e SptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004....	163
Tabela 37 - Valores médios da produção teórica e medida de metano no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro – 2004.	164
Tabela 38 - Valores médios para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. e SV_{final} na amostra submetida ao ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g ⁻¹ SV e proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	169
Tabela 39 - Valores médios da produção teórica e medida de metano durante o ensaio de AME com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.....	170

Tabela 40 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de entrada do afluente na Lagoa Anaeróbia, ponto do centro, EptC, antes e após a determinação da AME quando utilizou-se mix de ácidos como fonte de carbono na relação S_0X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV. Coleta dezembro 2004.....	175
Tabela 41 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia, ponto do centro, CptC, antes e depois do ensaio de AME quando utilizou-se mix de ácidos como fonte de carbono na relação S_0X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV. Coleta dezembro - 2004.....	175
Tabela 42 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de saída do efluente na Lagoa Anaeróbia, ponto do centro, SptC, antes e depois do ensaio de AME quando utilizou-se mix de ácidos como fonte de carbono na relação S_0X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV. Coleta dezembro - 2004.....	175
Tabela 43 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia, ponto do centro, CptC, antes e depois do ensaio de AME quando utilizou-se individualmente HAc, HPr, HBU ou HFor como fonte de carbono na relação S_0X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV. Coleta dezembro - 2004.	176
Tabela 44 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 26) com produto de PCR realizado com primer para <i>Archaea</i> (1100 FGC e 1400 R) aplicado às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBU e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	179
Tabela 45 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 26) com produto de PCR realizado com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBU e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	180
Tabela 46 - Representação gráfica do perfil do DGGE (Figura 29) com produto de PCR realizado com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta outubro - 2004.....	184
Tabela 47 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 31) com produto de PCR realizado com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.....	185
Tabela 48 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 33) com produto de PCR realizado com primer para <i>Eubacteria</i> (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Comparação entre as coletas de outubro e dezembro - 2004.....	188
Tabela 49 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 35) com produto de PCR realizado com primer para <i>Archaea</i> (1100 FGC e 1400 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.. Coleta dezembro - 2004.....	190
Tabela 50 - Valores da concentração de DNA _{total} das amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE de Cajati nas coletas de outubro e dezembro - 2004.....	192
Tabela 51 - Valores das densidades óticas em 260 e 280 nm das amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE de Cajati nas coletas de outubro e dezembro - 2004.....	193

Tabela 52 - Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região de entrada da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (EptE), ponto do centro (EptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (EptD). Coleta preliminar, outubro/2003.....	249
Tabela 53 - Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (CptE), ponto do centro (CptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (CptD). Coleta preliminar, outubro/2003.....	250
Tabela 54 - Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (SptE), ponto do centro (SptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (SptD). Coleta preliminar, outubro/2003.....	250
Tabela 55. Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região de entrada do afluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (EptE), ponto do centro (EptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (EptD). Coleta outubro/2004.....	251
Tabela 56. Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (CptE), ponto do centro (CptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (CptD). Coleta outubro/2004.....	251
Tabela 57. Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (SptE), ponto do centro (SptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (SptD). Coleta outubro/2004.....	252
Tabela 58 - Valores individuais de cada frasco-reator para as variáveis Sólidos Voláteis (SV) iniciais e finais, Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAC na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g ⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente e central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE e CptE), do centro (EptC e CptC) e da direita (EptD e CptD) em relação ao fluxo. Coleta preliminar, outubro/2003.....	253
Tabela 59 - Valores individuais de cada frasco-reator para as variáveis Sólidos Voláteis (SV) iniciais e finais, Atividade Metanogênica Aparente e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, a partir dos SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAC, HBU, HPR e HFOR nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 gDQO g ⁻¹ SV, com amostras provenientes da região de saída do efluente na lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (SptE), do centro (SptC) e da direita (SptD) em relação ao fluxo. Coleta preliminar, outubro/2003..	254
Tabela 60 - Valores da produção teórica total de metano esperada em cada frasco-reator com adição de fonte orgânica externa nas amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e saída do efluente na lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE, SptE), do centro (EptC, CptC, SptC) e da direita (EptD, CptD, SptD) em relação ao fluxo, submetidas aos ensaios de AME. Coleta preliminar, outubro/2003.....	256
Tabela 61 - Valores individuais de cada frasco-reator para $SV_{inicial}$ antes do ensaio de AME, $SV_{inicial}$ após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME em diferentes relações S_0/X_0 com diferentes substratos com amostras provenientes da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	258

Tabela 62 - Valores individuais de cada frasco-reator para $SV_{inicial}$ antes do ensaio de AME, $SV_{inicial}$ após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor) na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE e SptE), do centro (EptC, CptC e SptC) e da direita (EptD, CptDe SptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	259
Tabela 63 - Valores individuais de cada frasco-reator para $SV_{inicial}$ antes do ensaio de AME, $SV_{inicial}$ após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	260
Tabela 64 - Valores individuais de cada frasco-reator para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. e SV_{final} no ensaio de AME utilizando uma mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	261
Tabela 65 - Valores individuais de cada frasco-reator para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados calculados a partir do $SV_{inicial}$, antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. e SV_{final} na amostra submetida ao ensaio de AME utilizando HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g^{-1} SV e proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (CptE), do centro (CptC) e da direita (CptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	262
Tabela 66 - Valores da produção teórica e real de metano em cada frasco-reator no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25, 0,5 e 0,75 g DQO g^{-1} SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	263
Tabela 67 - Valores da produção teórica e real de metano em cada frasco-reator no ensaio de AME utilizando HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g^{-1} SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	263
Tabela 68 - Valores individuais de cada frasco-reator para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados calculados a partir do $SV_{inicial}$, antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. e SV_{final} no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e Hfor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE e SptE), do centro (EptC, CptC e SptC) e da direita (EptD, CptDe SptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	264
Tabela 69 - Valores da produção teórica e real de metano em cada frasco-reator no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004....	265

Tabela 70 - Valores individuais de cada frasco-reator para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados calculados a partir do $SV_{inicial}$, antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. e SV_{final} na amostra submetida ao ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBu ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV e proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	266
Tabela 71 - Valores da porcentagem de consumo de fonte de carbono externa e produção teórica e real de metano em cada frasco-reator durante o ensaio de AME com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.....	267

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ρ - Densidade ótica;
 AMA – Atividade metanogênica aparente;
 AME – Atividade metanogênica específica;
 APHA – American Public Health Association
 ASBBR - Reator Anaeróbio operado em bateladas sequenciais contendo biomassa imobilizada;
 ATP – Adenosina Trifosfato;
 CARD-FISH - Catalyzed reporter deposition-FISH
 CETEC – Centro Tecnológico da Fundação Paulista de Tecnologia e Educação;
 CNTP – Condições normais de temperatura e pressão;
 COV – Carga orgânica volumétrica aplicada;
 DAPI - 4',6-diamidino-2 fenilindol;
 DBO – Demanda biológica de oxigênio;
 DGGE – Eletroforese em gel com gradiente denaturante;
 DHA – Enzima desidrogenase;
 DP – Desvio padrão;
 DQO – Demanda química de oxigênio;
 EESC – Escola de engenharia de São Carlos;
 ETE – Estação de tratamento de esgotos;
 FISH – Hibridização *in situ* com sondas fluorescente;
 HAc – Ácido acético;
 HBu – Ácido butírico;
 HFor – Ácido fórmico;
 HisoVal – Ácido iso-valérico;
 HPr – Ácido propiônico;
 K_{max} – Taxa de conversão de substrato máxima
 L/W - Relação comprimento/largura;
 L:W – largura x comprimento;
 LPB – Laboratório de processos biológicos;
 M.O. – Matéria orgânica;
 MDR - Modified Robbins Device;
 NMP – Número mais provável;
 NTK – Nitrogênio total Kjedal;
 OD – Oxigênio dissolvido;
 OMS – Organização mundial de Saúde;
 PCP - Pentaclorofenol
 PCR – Reação em cadeia da polimerase;
 PROSAB - Programa de Pesquisas em Saneamento Básico
 RNAr 16S – subunidade 16S do RNA ribossômico;
 RTR - Resposta térmica relativa;
 S_0X_0 – Relação substrato microrganismo inicial;
 SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo;
 SHS – Departamento de Hidráulica e Saneamento;
 SS – Sólidos suspensos;
 SST – Sólidos Suspensos totais;
 SSV – Sólidos suspensos voláteis;
 ST – Sólidos totais;
 SV – Sólidos voláteis;

T – Temperatura;
TCE – Tricloroetileno;
TDH – Tempo de detenção hidráulica;
TGGE - Eletroforese em Gel com Gradiente Térmico;
T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism;
UASB – Upflow anaerobic sludged blanket reactor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	07
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	09
3.1 As Lagoas de Estabilização.....	09
3.1.1 Tipos e desempenho de lagoas de estabilização - considerações gerais.....	12
3.1.2. Particularidades das Lagoas de Estabilização Anaeróbias.....	16
3.2. Microbiologia de Lagoas de Estabilização.....	20
3.2.1. Microbiologia e Metabolismo Microbiano de Lagoas Anaeróbias.....	21
3.2.2. Particularidades da Degradação Anaeróbia Microbiana sob Metanogênese.....	25
3.3. Técnicas para Avaliação da Atividade Microbiana Anaeróbia.....	31
3.4. Técnicas Moleculares na Identificação e Quantificação de Microrganismos.....	40
3.4.1. Hibridização <i>in situ</i> com sondas fluorescentes – FISH.....	40
3.4.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE.....	43
3.4.3. Aplicação das técnicas moleculares.....	47
3.5. Técnicas de microscopia.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1. Área de estudo.....	53
4.2 Descrição do sistema de tratamento de esgoto.....	55
4.3 Caracterização do esgoto do município.....	56
4.4 Operação e monitoramento do sistema.....	58
4.5 Amostragem.....	58
4.6 Análises físico-químicas realizadas no laboratório.....	60
4.7. Exames microscópicos.....	61
4.7.1. Exames de procariontes.....	61
4.7.2. Exames e contagem de protozoários, rotíferos, microalgas e cianobactérias sob microscopia ótica comum.....	61
4.8. Determinação da atividade metanogênica específica (AME).....	62
4.8.1. Descrição do método de AME.....	63
4.8.2. Curvas de calibração do metano e do dióxido de carbono.....	67
4.8.3. Cálculo da atividade metanogênica específica – AME.....	68
4.8.4 Cálculo para determinação da produção teórica de metano.....	70
4.8.5. AME das amostras de sedimento da coleta preliminar - Outubro/2003.....	71
4.8.6. AME das amostras de sedimento da coleta - Outubro/2004.....	72
4.8.7. AME das amostras de sedimento da coleta - Dezembro/2004.....	75
4.9. Metodologias em biologia molecular.....	81
4.9.1. Determinação do DNA total.....	81
4.9.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE para Análise de Diversidade e Estrutura das Comunidades Microbianas.....	82
4.9.2.1. Preservação de amostras para DGGE.....	82
4.9.2.2. Metodologia para o DGGE.....	83
4.9.3. Hibridização <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH) para Análise da Composição Microbiana.....	85
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1. Acompanhamento e monitoramento da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) do município de Cajati.....	89
5.2 Variáveis físico-químicas determinadas durante a coleta de amostras.....	96
5.2.1. Batimetria.....	96

5.2.2. Temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido, pH e potencial de óxido-redução.....	100
5.2.2.1. Coleta preliminar - outubro/2003.....	101
5.2.2.2. Coleta outubro/2004.....	102
5.2.2.3. Coleta dezembro/2004.....	103
5.2.3. Variáveis físico-químicas determinadas em laboratório.....	104
5.2.3.1. Coleta preliminar - outubro/2003.....	104
5.2.3.2. Coleta outubro/2004.....	106
5.2.3.3. Coleta dezembro/2004.....	106
5.3. Exames microscópicos de procariontes – microscopia ótica comum de contraste de fase e epifluorescência.....	108
5.3.1 Exames microscópicos das amostras da coleta preliminar, outubro/2003..	108
5.3.2 Exames microscópicos das amostras da coleta de outubro/2004.....	110
5.3.3 Exames microscópicos das amostras da coleta de dezembro/2004.....	114
5.4. Exames microscópicos de eucariontes – Contagem de protozoários, algas e rotíferos.....	118
5.5. Atividade metanogênica específica (AME).....	121
5.5.1. Atividade metanogênica específica (AME) - Coleta preliminar de outubro/2003.....	121
5.5.1.1. Exames microscópicos das amostras dos testes de AME – Coleta preliminar, outubro/2003.....	133
5.5.2. Atividade metanogênica específica (AME) - Coleta de outubro/2004.....	138
5.5.3. Atividade metanogênica específica (AME) - Coleta de dezembro/2004.....	139
5.5.3.1. Valores dos Sólidos Voláteis (SV) obtidos durante o ensaio.....	139
5.5.3.2. Consumo de ácidos voláteis durante o ensaio.....	146
5.5.3.3. Distribuição da concentração de CO ₂ no headspace dos frasco-reatores.....	155
5.5.3.4. Valores de AME.....	158
5.5.3.5. Exames microscópicos das amostras dos testes de AME – Coleta dezembro/2004.....	173
5.5.3.6. Análise da diversidade microbiana por meio da técnica do DGGE nos testes de AME – Coleta dezembro/2004.....	177
5.6. Análise da diversidade microbiana por meio da eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE nas amostras originais das coletas de outubro e dezembro de 2004.....	182
5.7. Determinação da composição das populações por meio da técnica de hibridização <i>in situ</i> com sondas fluorescentes - FISH.....	193
6. CONCLUSÕES.....	197
6.1. Sobre a Metodologia da AME.....	197
6.2. Sobre a Microbiota presente na Lagoa Anaeróbia e Determinação de sua AME.....	198
6.2.1. Experimentos de AME e microbiota das amostras de Outubro de 2003....	198
6.2.2. Experimentos de AME e microbiota das amostras de Outubro de 2004....	199
6.2.3 Experimentos da AME e microbiota das amostras de Dezembro de 2004.	199
6.3. Conclusões gerais.....	200
7. RECOMENDAÇÕES.....	202
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	203
APÊNDICE A – Trabalho apresentado no 10 th World Congress on Anaerobic Digestion, Canadá, 2004.....	223

APÊNDICE B – Trabalho apresentado no The First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering, México, 2004	228
APÊNDICE C – Trabalho apresentado no VIII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia, Uruguai, 2005.....	240
APÊNDICE D – Retas padrão para o CH ₄	245
APÊNDICE E – Variáveis físico-químicas ao longo da coluna d'água.....	249
APÊNDICE F – Resultados de AME de cada uma das réplicas.....	253

*“[...] É proibido não rir dos problemas
Não lutar pelo que se quer,
Abandonar tudo por medo,
Não transformar sonhos em realidade [...]”
(Pablo Neruda)*

1. INTRODUÇÃO

Atualmente são inúmeras as alternativas tecnológicas cujo intuito é minimizar os efeitos poluentes ao meio ambiente e à saúde pública decorrentes do lançamento de esgotos domésticos “in natura” nos sistemas hídricos (STIKKER, 1998; MARA, 2001; SARMENTO, 2001). O tratamento biológico de esgotos sanitários pode ser realizado via metabolismo aeróbio ou anaeróbio de microrganismos em sistemas como lagoas de estabilização, lodos ativados, filtros biológicos, biorreatores anaeróbios com diferentes configurações, bem como pela aplicação controlada dos esgotos em alagados (“wetlands”) ou diretamente no solo. Segundo von Sperling (1996a), não há um sistema de tratamento ideal como solução única ao esgotamento sanitário. Cada situação deve ser analisada individualmente, levando-se em conta as especificidades e experiências de cada região.

As lagoas de estabilização são consideradas um dos sistemas mais simples para o tratamento de esgotos domésticos devido à sua facilidade e flexibilidade operacional e de manutenção, bem como à sua adequada eficiência e aos baixos custos de implantação e operação (GU e STEFAN, 1995; EL SHARKAWI, 1995; PEARSON, 1996; KELLNER e PIRES, 1998). Portanto, as lagoas são consideradas uma alternativa viável para pequenas e médias comunidades onde exista disponibilidade de espaço, podendo representar melhora significativa na qualidade de vida da comunidade, tanto do ponto de vista sanitário, quanto econômico (KELLNER e PIRES, 1998).

Esta forma de tratamento de esgoto baseia-se na habilidade natural de autodepuração de um corpo d'água, ou seja, notadamente na ação microbiana fotossintetizante oxigênica e heterotrófica, levando à redução de sólidos suspensos, patógenos e matéria orgânica (GU e STEFAN, 1995).

A eficiência das lagoas de estabilização no tratamento de esgotos domésticos é função da interação de diversos processos, os quais dependem das condições ambientais e das características físico-químicas do próprio esgoto, bem como da comunidade microbiana estabelecida no sistema de reação.

Considerando estes aspectos, o estudo da comunidade microbiana, não apenas em lagoas de estabilização, mas em qualquer sistema de tratamento biológico de águas residuárias é de particular interesse, uma vez que pode levar ao aperfeiçoamento de projetos e ao aumento de sua eficiência (SILVEIRA e MONTEGGIA, 2000). Pode-se, também, avaliar a influência de condições extremas de operação, presença de agentes tóxicos e utilização de diferentes modelos de biorreatores sobre a eficiência de tratamento por meio do estudo dos diferentes grupos tróficos microbianos participantes do processo (GÓMEZ e TORRES, 2000; SOLERA *et al.*, 2001). Avanços no desenho e conseqüente desempenho de biorreatores têm sido possíveis por meio da compreensão da ecologia e fisiologia dos diferentes grupos de microrganismos responsáveis pelas reações de transformação de compostos nos sistemas de tratamento (GARCIA *et al.*, 2000).

Nesse sentido, os microrganismos dos processos anaeróbios de estabilização da matéria orgânica poluente têm sido amplamente investigados.

Testes sobre a atividade microbiana potencial de amostras de sistemas de tratamento são amplamente utilizados e possuem um enorme valor para estudar diferentes grupos fisiológicos envolvidos nos processos biológicos, notadamente para avaliar a digestão anaeróbia metanogênica de resíduos (DOLFING e BLOEMEN, 1985; SORENSEN e

AHRING, 1993). O teste de atividade metanogênica específica (AME) foi um método desenvolvido com esse objetivo. Constitui-se em um ensaio em escala de laboratório que mede a conversão máxima de determinados substratos orgânicos em metano por unidade de biomassa presente em um lodo anaeróbio. Apesar de oportuno e eficiente, a literatura especializada mostra que não existe um protocolo único e aceito internacionalmente para o desenvolvimento do teste (COLLERAN e PENDER, 2002), o que leva à não reprodutibilidade do mesmo dependendo do laboratório e do método empregada, dificultando a possibilidade de comparação dos resultados. Os principais pontos discordantes entre os métodos propostos para os testes de atividade referem-se à forma de medida da produção de metano, substrato utilizado, temperatura do ensaio e relação substrato/microrganismo inicial. Dentre esses aspectos, a relação substrato/microrganismo, tipo de substrato utilizado, assim como a forma de determinação da biomassa ativa, são de relevante importância para que os resultados sejam confiáveis.

Os testes de atividade microbiana potencial podem ser aplicados para avaliar diferentes tipos de lodos anaeróbios, sejam eles imobilizados em biofilmes, granulares, floculentos ou mesmo lodos dispersos como o encontrado no sedimento de lagoas anaeróbias, em biodigestores rurais dentre outros.

No âmbito das pesquisas realizadas no LPB, o trabalho de Penna (1994) investigou os diversos métodos para a realização do AME, com o objetivo de otimizá-lo e assim contribuir para o estabelecimento de um protocolo para avaliação de lodos granulados de reatores do tipo UASB. Araújo (1995) avaliou a influência da estrutura populacional de biofilmes na degradação de ácidos graxos voláteis e conseqüente produção de metano. Além disso, determinou o comportamento dos biofilmes formados em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário sintético pelos valores de AME frente a diferentes fontes orgânicas. O teste de atividade metanogênica também foi empregado por OLIVEIRA (1997) com a finalidade de

avaliar a AME de lodos em diferentes condições operacionais (variação da carga orgânica e da temperatura), e em diferentes regiões da manta do lodo granulado de um reator anaeróbio UASB tratando águas residuárias de suinocultura. Carvalho (2006) avaliou a influência de variações senoidais cíclicas da vazão de entrada de um reator UASB tratando esgoto sintético sobre o comportamento das populações microbianas ao longo da operação do reator por meio do ensaio de AME. Lapa (2006) avaliou a influência da variação da recirculação da fase líquida e do regime de alimentação em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais contendo biomassa imobilizada (ASBBR) e tratando esgoto sanitário sobre a microbiota.

No estudo da microbiologia de sistemas de tratamento anaeróbio, técnicas microbiológicas clássicas, incluindo enriquecimento seletivo, isolamento em culturas puras, determinação do número mais provável e caracterização fenotípica já foram exaustivamente utilizadas. Entretanto, como afirmado por Raskin *et al.* (1994), as limitações das técnicas tradicionais, como aquelas relacionadas ao fato de que uma pequena fração dos microrganismos anaeróbios pode, geralmente, ser mantida em culturas, e quando isto é possível, são difíceis de identificar, dificulta estudos que associem estrutura microbiana e função.

Dessa forma, a evolução de técnicas da biologia molecular facilitou sobremaneira a caracterização direta de procariontes. Em consequência, muitos processos biotecnológicos sofreram enormes avanços em relação ao conhecimento dos agentes microbianos, particularmente os processos de tratamento de resíduos que empregam culturas mistas. A técnica de hibridização “in situ” com sondas fluorescentes (FISH), por exemplo, apresenta-se como uma ferramenta útil para detectar, quantificar e estudar microrganismos em ambientes naturais e biorreatores (AMANN *et al.*, 1995). Além desta, a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) separa seqüências de DNAr 16S de mesmo tamanho e com

apenas uma base nitrogenada diferente, permitindo determinar a estrutura de comunidades presentes em diferentes amostras.

Devido à sua eficiência e facilidade de realização, estas técnicas vêm sendo utilizadas por pesquisadores que compõem o grupo de pesquisa no qual este trabalho se insere, do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (LPB/SHS/EESC/USP), apresentando resultados importantes. Dentre os trabalhos desenvolvidos pode-se citar Domingues (2001 e 2002) que avaliou a metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios empregando o FISH; Araújo (2001) que investigou por meio do FISH o desenvolvimento de biofilmes anaeróbios em um sistema modelo do tipo “Modified Robbins Device (MDR)”; Sakamoto (2001) comparou a estrutura de diferentes comunidades microbianas provenientes de sistemas de lodos ativados com ocorrência de remoção biológica de fósforo utilizando o DGGE; Brucha (2002) estudou a diversidade microbiana de consórcios anaeróbios provenientes de sedimento lacustre na degradação de TCE por meio do DGGE; Saia (2005) empregou o FISH e DGGE em conjunto com técnicas microbiológicas clássicas a fim de avaliar a atividade microbiana anaeróbia capaz de degradar o PCP sob condições metanogênicas em amostras de sedimento da região do Estuário de Santos – São Vicente, visando à exploração biotecnológica da microbiota autóctone.

O presente trabalho teve como foco a compreensão da microbiota envolvida nos processos de degradação da matéria orgânica em amostras da lagoa de estabilização anaeróbia do sistema de tratamento de esgotos sanitários da cidade de Cajati - SP, pertencente ao Sistema do Vale do Ribeira de Iguape, com o objetivo de contribuir para o conhecimento da diversidade de microrganismos presente nesse ambiente, assim como estabelecer possíveis relações microbianas existentes nas lagoas anaeróbias. Considerando que pesquisas focando a microbiologia da degradação da matéria orgânica em lagoas anaeróbias são escassas,

objetivou-se também a avaliação do emprego de técnicas da biologia molecular como o DGGE e o FISH, bem como de testes de atividade potencial para o estudo de amostras de sedimento de lagoas anaeróbias. Além disso, investigou-se o teste de AME com vistas ao estabelecimento de um protocolo para avaliação de lodos anaeróbios de lagoas de estabilização.

Esta pesquisa integrou o Projeto Temático da FAPESP “Estudo dos sistemas naturais e artificiais redutores de cargas poluidoras para a sustentabilidade dos recursos hídricos do Baixo Ribeira de Iguape – SP”, envolvendo o Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos e o Instituto de Ciências Biomédicas, ambos da Universidade de São Paulo, o Departamento de Biologia da Universidade de Santo Amaro e o Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa. Fazem também parte deste Projeto Temático, trabalhos de iniciação científica, dissertações e teses concluídas (MOCCELLIN, 2006; BENASSI, 2006; DEL AGUILA, 2007) e em andamento.

Os resultados parciais desta tese foram encaminhados e aceitos em três congressos internacionais (Tenth World Congress on Anaerobic Digestion, Canadá, 2004; The First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering, México, 2004; VIII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia, Uruguai, 2005) e fazem parte de seus anais. As cópias desses artigos constam do item Apêndices.

*Qualquer um pode contar as sementes que há numa maçã
Mas quantos de nós somos capazes de contar
quantas maçãs há numa semente?
(Robert Schüller)*

2. OBJETIVOS

O objetivo geral da presente tese de doutorado foi avaliar a atividade e composição de arqueias metanogênicas na lagoa anaeróbia tratando esgotos sanitários do Município de Cajati – SP, Vale do Ribeira de Iguape, bem como investigar a estrutura da comunidade bacteriana e a presença de eucariontes no mesmo sistema em diferentes épocas de coleta. Para tanto, as seguintes abordagens foram consideradas:

- * Examinar amostras sob microscopia ótica comum, contraste de fase e epifluorescência a fim de avaliar os tipos morfológicos de procariontes e eucariontes (protozoários);
- * Avaliar a atividade metanogênica da comunidade microbiana presente na lagoa anaeróbia empregando-se testes específicos para determinação da produção de metano (AME);
- * Contribuir para o estabelecimento de um protocolo para o ensaio de AME com amostras de lagoas de estabilização anaeróbias por meio da investigação do comportamento da estrutura microbiana durante a realização dos testes de AME utilizando-se a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE;
- * Comparar a estrutura da comunidade microbiana procarionte presente na lagoa anaeróbia em diferentes pontos e épocas de coleta, empregando-se a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE;
- * Avaliar a composição da comunidade microbiana procarionte presente na lagoa anaeróbia em diferentes pontos e épocas de coleta, empregando-se a técnica de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes - FISH;

-
- * Avaliar a adequação de métodos para o estudo microbiano de amostras oriundas de sedimento de lagoa anaeróbia;
 - * Associar os resultados de eficiência de uma lagoa anaeróbia com a estrutura da comunidade microbiana presente no sedimento do sistema.

Somos todos anjos de uma asa só.

Só podemos voar quando estamos abraçados.

(Leo Buscaglia)

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. As Lagoas de Estabilização

A tecnologia de lagoas de estabilização para o tratamento de águas residuárias nos últimos anos avançou em termos de aplicação e confiança como consequência de pesquisas realizadas no Brasil. Embora a tendência da engenharia sanitária encontre-se direcionada aos processos ditos completos, como por exemplo, os sistemas de lodos ativados e os biodigestores anaeróbios, alternativas de tratamento mais simples e baratas para países emergentes são promissoras. Segundo Pearson (1996), as lagoas de estabilização apresentam-se como processos de tratamento apropriados, seguros e de baixo custo tanto para regiões tropicais como temperadas em suas áreas rurais e urbanas. Nesse sentido, são propostas diferentes configurações ou mesmo ordenamento de lagoas destinadas ao tratamento de esgotos sanitários e uma variedade de águas residuárias industriais.

Diversos autores (GU e STEFAN, 1995; XIAN-WEN, 1995; KELLNER e PIRES, 1998; NAMECHE e VASEL, 1998; von SPERLING, 2002) identificaram vantagens no uso das lagoas de estabilização, tais como: - simplicidade de construção, operação e manutenção; - baixo custo; - habilidade para suportar flutuações de carga orgânica volumétrica; - eficiência na redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e de patógenos; - baixíssima necessidade de equipamentos mecânicos; - requerimentos energéticos praticamente nulos; - grande aceitabilidade de mão-de-obra não especializada; - remoção de lodo em intervalos de tempo de até 5 anos, desde que o sistema possua tratamento preliminar para retirada dos

sólidos mais grosseiros, bem como um projeto adequado em termos de forma e profundidade da lagoa (PESCOD, 1996; PAPADOPOULOS *et al.*, 2003).

Hosetti e Frost (1995) destacaram também a possibilidade de utilização do efluente e do lodo das lagoas de estabilização como recursos sustentáveis, em atividades como agricultura, aquícultura e na produção de materiais de construção, além da possibilidade de aproveitamento do biogás como combustível quando tratar-se de lagoas anaeróbias. O reuso do esgoto doméstico após tratamento foi considerado por Kivaisi (2001) como uma importante estratégia para a conservação dos recursos hídricos, particularmente em regiões com problemas de escassez de água, uma realidade crescente em todo o mundo.

A possibilidade de reuso do efluente de lagoas de estabilização está condicionada a um tratamento prévio que permita a remoção principalmente de agentes patogênicos, dependendo do uso que se pretende. Estudos realizados por pesquisadores mostraram que os efluentes de sistemas de lagoas de estabilização são adequados para irrigação restrita, que inclui sua utilização em culturas de cereais, forragem, pastos e culturas arbóreas (OUAZZANI *et al.*, 1995). Outros estudos indicaram a utilização de efluentes de sistemas de lagoas para irrigação irrestrita, desde que submetidos a tratamento final em lagoas de maturação ou armazenamento do efluente em reservatórios para tratamento, nos quais os patógenos são eliminados (MARA, 1996; MARA *et al.*, 1996; PEARSON *et al.*, 1996a, MARA e PEARSON, 1999; ARAÚJO *et al.*, 2000).

No Brasil muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de avaliar a utilização de efluentes de sistemas de lagoas para fertirrigação, assim como para outras atividades produtivas. Mendonça e Piveli (2003a, b, c) e Mendonça *et al.* (2003) mostraram a possibilidade de irrigação de culturas de milho, girassol, café e flores (*Gypsophila paniculata* e crisântemo) de efluentes da Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários (ETE) do Município de Lins, Estado de São Paulo. A ETE é composta por três sistemas paralelos de

lagoas de estabilização, sendo cada sistema constituído por uma lagoa anaeróbia seguido de uma lagoa facultativa.

Lima *et al.* (2004) avaliaram a qualidade sanitária de efluentes de lagoas de estabilização anaeróbia seguida por uma de polimento na irrigação de plantações de alface. Para isso, consideraram a remoção de coliformes termotolerantes e ovos de helmintos. Os resultados deste trabalho mostraram a ausência de ovos de helmintos e a presença de coliformes termotolerantes no efluente da lagoa de polimento. Os valores foram inferiores aos do padrão de irrigação de culturas irrestritas, os quais segundo a OMS devem ser inferiores a 1000 UFC/100 mL de efluente. A qualidade da alface após a irrigação com efluente da lagoa de polimento manteve-se dentro dos critérios e padrões microbiológicos estabelecidos pela ANVISA para alimentos. Entretanto, a alface irrigada com o efluente da lagoa anaeróbia não apresentou características sanitárias compatíveis para consumo.

Souza *et al.* (2004) estudaram o reuso de um efluente oriundo de lagoa anaeróbia tratando esgoto sanitário com eficiência aproximada de 50% na remoção de matéria orgânica medida como DBO, e mostrou o potencial do uso do efluente na irrigação para o fornecimento dos nutrientes essenciais às plantas de milho.

A fertirrigação realizada com efluente de sistemas de lagoas apresenta potencial de aplicabilidade, entretanto maiores estudos precisam ser desenvolvidos no sentido de se determinar o impacto desse manejo sobre o solo e sobre a qualidade da água de aquíferos. Candela *et al.* (2004) verificaram alteração na qualidade da água de um aquífero quando o efluente de lagoas de estabilização foi utilizado na irrigação de um campo de golfe, revelando aumento significativo na salinidade da água subterrânea.

Os resultados do trabalho realizado por Bastos *et al.* (2003) indicaram a viabilidade técnico-econômica e sanitária do cultivo de tilápias com efluente de um reator anaeróbio

tratado por uma série de três lagoas de estabilização, e sugeriram a necessidade de otimização do manejo dos peixes objetivando melhor produtividade.

De forma geral, as desvantagens das lagoas de estabilização podem ser assim descritas: **a)** necessidade de grandes áreas, o que pode tornar sua aplicação difícil ou inviável do ponto de vista econômico; segundo Xian-Wen (1995), 60% dos custos de construção de um sistema de lagoas, como por exemplo, com uma lagoa anaeróbia seguida por uma facultativa e outra aerada, são devidos à aquisição da área; **b)** dificuldade em satisfazer padrões de lançamento muito restritivos; **c)** a simplicidade operacional pode levar ao descaso na sua manutenção, comprometendo o tratamento; **d)** desempenho dependente dos fatores climáticos e ambientais; **e)** necessidade de afastamento de residências de no mínimo 500 m (von Sperling, 2002) ou de 1000 ou mais metros (Kellner e Pires, 1998); **f)** possibilidade de geração de maus odores, principalmente de lagoas anaeróbias; **g)** proliferação de insetos (LAWTY *et al.* 1996).

3.1.1 Tipos e desempenho de lagoas de estabilização - considerações gerais

Segundo Kellner e Pires (1998) e von Sperling (2002), as lagoas de estabilização incluem lagoas anaeróbias, facultativas, aeróbias e de maturação, podendo funcionar individualmente ou combinadas a fim de possibilitarem a geração de efluente de acordo com o padrão de qualidade requerido para lançamento ou reuso (PEARSON *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1996).

As lagoas de estabilização são sistemas biológicos e, portanto, são influenciadas tanto pela sua configuração como pelas variáveis operacionais, além de uma série de fatores abióticos. Resumidamente incluem: - profundidade; - tempo de detenção hidráulica (TDH); - carga orgânica volumétrica aplicada (COV); - padrão de fluxo hidrodinâmico; - pH; -

temperatura; - luminosidade; - localização em relação aos ventos que desempenham um importante papel na homogeneização dos líquidos e nas suas condições hidráulicas (PEARSON, 1996; PESCOD, 1996; TORRES *et al.*, 1997; NAMECHE e VASEL, 1998; KELLNER e PIRES, 1998; von SPERLING, 2002; PERSSON e WITTGREN, 2003; TADESSE *et al.*, 2004).

Particularmente, as condições hidrológicas e hidráulicas afetam consideravelmente a capacidade de tratamento das lagoas (PERSSON e WITTGREN, 2003). Estas condições, por sua vez, são influenciadas pela geometria da lagoa, pelo posicionamento da entrada do afluente e saída do efluente, pelo padrão de acúmulo de lodo no fundo da lagoa, bem como pelos ventos (PEÑA *et al.* 2000).

Os modelos hidráulicos tradicionalmente descritos para lagoas são as condições de mistura completa e fluxo pistonado, embora, na prática, nenhum dos dois modelos tenha sido comprovadamente estabelecido (DOREGO e LEDUC, 1996). A literatura relata, embora com resultados controversos, que um regime hidrodinâmico próximo do tipo pistonado, obtido através da relação comprimento/largura elevada, da ordem de 20:1, melhora consideravelmente o desempenho do sistema (PEARSON, 1996). Pearson *et al.* (1995) verificaram que o aumento da relação comprimento/largura de 1:1 para 6:1, aparentemente, não teve efeito sobre lagoas facultativas. Estudos realizados por Nameche e Vasel (1998) mostraram que para a maioria das lagoas com uma relação comprimento/largura abaixo de 4 e por vezes abaixo de 8, a condição operacional corresponde à de reatores de mistura completa.

De acordo com revisão de literatura realizada por Kivaisi (2001), as lagoas de estabilização tratando esgotos sanitários com COV variando de 180 a 500 kgDBO acre⁻¹ d⁻¹ apresentam eficiências satisfatórias quando bem projetadas e operadas no que se refere à remoção de DBO (75 a 90%), nitrogênio (30 a 50%), fósforo (20 a 60%), microrganismos indicadores de qualidade sanitária, como ovos de helmintos, coliformes e vírus (60 a 99,99%).

Entretanto, o autor destaca que a presença de nutrientes residuais como nitrogênio e fósforo no efluente pode ocasionar problemas, a não ser que o efluente destine-se à fertirrigação ou piscicultura.

A utilização de sistemas de lagoas em série tem se mostrado mais eficiente que a operação de lagoa única com área equivalente (OLIVEIRA *et al.*, 1996). Segundo Pearson (1996), sistemas modernos de lagoas, particularmente aqueles com 4 ou mais lagoas em série, produzem efluentes com DBO e sólidos suspensos (SS) menores que 20 mg L^{-1} e 30 mg L^{-1} , respectivamente, incluindo os sólidos relativos às algas quando se tratar de lagoa facultativa. Entretanto, o mesmo autor destaca que esse desempenho não é verdadeiro para sistemas com apenas duas lagoas em série ou quando recebem altas cargas orgânicas. Por outro lado, processos adicionais estão disponíveis para melhorar a qualidade dos efluentes, dentre as quais estão os filtros de pedra, a filtração intermitente em leito de areia, a aplicação no solo para irrigação de culturas ou sistemas alagados (*wetlands*).

Ouazzani *et al.* (1995) compararam a eficiência de remoção de matéria orgânica, nutrientes e parasitas em três tipos de lagoas, lagoa macrofítica, lagoa facultativa e lagoa anaeróbia alimentadas com esgoto sanitário. Os resultados mostraram que a utilização de macrófitas na lagoa gerou uma melhor eficiência de redução de matéria orgânica (90% de redução de sólidos suspensos totais – SST – e 78% de redução nos valores de DQO) em comparação com a lagoa facultativa (37% para SST e 50% para DQO). Além disso, essas lagoas apresentaram maior eficiência na remoção de nutrientes, representados por 71% para NTK, 60% para NH_4 , 80% para P_{total} e 62% para PO_4 . Nesse estudo, a lagoa anaeróbia apresentou baixa eficiência, apenas 40% para remoção de matéria orgânica e 20% para nutrientes.

Oliveira *et al.* (1996) estudaram uma série de 10 lagoas em escala piloto constituída por uma lagoa anaeróbia seguida por uma lagoa facultativa e 8 lagoas de maturação, as quais

compõem a Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES) na cidade de Campina Grande - PB. Os autores avaliaram a eficiência de todo o sistema em dois experimentos distintos, no primeiro com TDH total de 19 dias, e no segundo com TDH total de 28,5 dias. Os teores de DBO, DQO, SS e coliformes fecais no afluente do sistema eram, respectivamente, de 186 mg L^{-1} , 502 mg L^{-1} , 283 mg L^{-1} e $2,72 \times 10^7$ para TDH de 19 dias, e de 240 mg L^{-1} , 508 mg L^{-1} , 298 mg L^{-1} e $4,12 \times 10^7$ para TDH de 28,5 dias. Foram verificadas eficiências de redução dos valores de DBO, DQO, SS e coliformes fecais para o primeiro e segundo TDHs, respectivamente, de 95,2 e 95%; 84,3 e 82,1%; 83,0 e 89,3%; 99,99 e 99,99%. De acordo com os autores, a eficiência do sistema foi bastante satisfatória, atendendo aos requerimentos da OMS para irrigação irrestrita dos efluentes da lagoa anaeróbia e da facultativa (TDH de 3 dias). A remoção de coliformes fecais também atendeu às normas da OMS para irrigação irrestrita ($<1000 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$) com um TDH de 13 dias.

Silva e Araújo (2004), realizando um levantamento sobre a aplicação de lagoas de estabilização no Estado do Ceará verificaram que os valores médios de redução de DBO, DQO e SS em nove das ETEs analisadas constituídas por lagoas únicas com cargas orgânicas variando de 44 a $232 \text{ kgDBO ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ foram da ordem de 79, 71 e 51%, respectivamente. Para sete sistemas de lagoas em série (3, 4 e 5 lagoas) com cargas orgânicas aplicadas variando de 75 a $176 \text{ kgDBO ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ os valores médios de redução foram de 89, 78 e 60%, respectivamente. Ainda neste estudo, os autores verificaram a ausência de ovos de helmintos, relacionando-a ao elevado TDH, igual a 25 dias. No que se refere à contagem de coliformes fecais, foram obtidos valores médios de $1,7 \times 10^6$ células/100 mL para os sistemas com uma única lagoa; $1,2 \times 10^4$ células/100mL para os sistemas em série de 3 lagoas; 27 e 980 células/100 mL nos sistemas em série de 4 e 5 lagoas, respectivamente. A maior eficiência foi encontrada nos sistemas com maior número de lagoas.

3.1.2 Particularidades das Lagoas de Estabilização Anaeróbias

As lagoas anaeróbias são geralmente aplicadas como unidade primária em sistemas de lagoas em série, funcionando tanto como sedimentador, como para o tratamento anaeróbio da matéria orgânica presente no afluente (SAQQAR e PESCOD, 1995a; PESCOD, 1996; BOLLER, 1997).

Atualmente ainda existe alguma resistência à aplicação de lagoas anaeróbias devido a problemas com geração de odores, decorrentes, principalmente, da liberação de sulfeto de hidrogênio (H_2S) para a atmosfera. Para que o H_2S seja produzido em níveis significativos, sulfatos e/ou enxofre devem estar presentes no afluente em concentrações acima de 100 mg L^{-1} (PESCOD, 1996) e o pH deve estar abaixo de 7,0; uma vez que, nessas condições, o sulfeto na forma não ionizada (H_2S) é encontrado em concentrações mais elevadas que as formas HS^- ou S^{2-} , que não geram maus odores (PESCOD, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2000). Von Sperlling (2002) relatou que em concentrações de sulfato no afluente da lagoa anaeróbia inferiores a 300 mg L^{-1} , a produção de sulfetos não deve ser problemática. No Ceará, muitas operadoras de sistemas de tratamento de esgoto sanitário relutam em adotar lagoas anaeróbias, pois o problema de geração de odor tem sido verificado quando a concentração de sulfeto total no efluente das lagoas anaeróbias é $= 2,62\text{ mg S L}^{-1}$ (SILVA e ARAÚJO, 2004).

Por outro lado, de acordo com von Sperlling (2002), a geração de mau cheiro não deve ocorrer se o sistema estiver operando em equilíbrio. De qualquer forma, a possibilidade de geração de maus odores deve ser sempre considerada nos sistemas de tratamento de qualquer resíduo (SWITZENBAUM, 1995). Encontram-se disponíveis diversos métodos para evitar esse tipo de problema em lagoas anaeróbias. Uma das alternativas consiste na recirculação do efluente de lagoas facultativas (ou de maturação, caso existam) para a lagoa anaeróbia formando uma camada superficial aeróbia, devido à sua temperatura mais elevada, onde os

gases causadores de mau cheiro serão oxidados (von SPERLING, 2002). A utilização de coletores de gases submersos nas lagoas apresenta-se também como uma opção bastante interessante, uma vez que o biogás é coletado e, assim, ao não ser liberado para a atmosfera, evitaria problemas de maus odores e ainda viabilizando-o como gás combustível (PEARSON, 1996; FEDLER e WHEELER, 1997).

Nessa direção, evita-se a emissão do gás CH₄ para a atmosfera, uma vez que o metano apresenta elevado potencial como gás de efeito estufa, sendo 21 vezes maior do que o equivalente em massa do CO₂ (EL-FADEL e MASSOUD, 2001). Por outro lado, o CH₄ pode reagir com o cloro e óxido nitroso provenientes, respectivamente, dos clorofluorcarbonos e aplicações de fertilizantes, ajudando a proteger a camada de ozônio da destruição por esses componentes (OWENS *et al.*¹, 1982 *apud* GARCÍA *et al.*, 2000).

A principal vantagem da utilização de lagoas anaeróbias como tratamento primário em um sistema em série de lagoas de estabilização é a redução na necessidade de área (SAQQAR e PESCOD, 1995a; PEARSON, 1996; PESCOD, 1996; von SPERLING, 2002). Pearson (1996) observou que isto ocorre porque as lagoas anaeróbias suportam cargas orgânicas bem maiores que as facultativas, uma vez que o processo biológico nesses ambientes ocorre em condições de anaerobiose, permitindo lagoas com grandes profundidades. Segundo von Sperling (2002), essa redução de área varia de 45 a 70% em comparação com o requisito de uma lagoa facultativa única. Para Pearson (1996), pode-se chegar a 75% ou mais para projetos de lagoas anaeróbias modernos com tempo de detenção hidráulica de 1 dia e em locais com temperaturas ambientes acima dos 16°C.

No trabalho de Vieira *et al.* (2004) foi verificado que sistemas de lagoas que incluíam lagoas anaeróbias seguidas de facultativas apresentaram eficiências de remoção de matéria orgânica medida como DBO mais elevadas do que sistemas constituídos apenas por lagoas

¹ OWENS, A.J.; STEED, J.M.; FILKIN, D.L.; MILLER, C.; JESSON, J.P. The potential effects of increased methane on atmospheric ozone. **Geophysical Research Letters**, v. 9, p. 1105-1108, 1982.

facultativas únicas, sendo 82 e 74%, respectivamente, com DBO afluente de 464 ? 152 mg L⁻¹.

Adicionalmente, as lagoas anaeróbias representam alternativas interessantes para efluentes industriais, pois permitem a remoção do meio de metais pesados como sulfetos insolúveis, além de tratar águas residuárias com altas concentrações de graxas e resíduos oleosos (PEARSON, 1996; RAJBHANDARI e ANNACHHATRE, 2004).

Como citado por von Sperling (2002), as lagoas anaeróbias normalmente apresentam eficiência de redução dos valores de DBO em torno de 50 a 70%, com profundidades da ordem de 3 a 5 m e TDH entre 3 e 6 dias, embora a literatura cite uma variação de 1 a 50 dias para esse parâmetro em lagoas anaeróbias tratando esgotos sanitários (SAQQAR e PESCOD, 1995a). A carga orgânica volumétrica (COV) aplicada a lagoas anaeróbias é também bastante variável, encontrando-se na faixa de 33 a 600 g DBO m³ d⁻¹ (SAQQAR e PESCOD, 1995a). Pearson *et al.* (1996b), estudando um sistema de lagoas em série em Campina Grande na PB, concluíram que para lagoas anaeróbias tratando esgotos sanitários com eficiência e operação adequadas, a COV máxima deve ser da ordem de 350 g DBO m³ d⁻¹, com TDH de 1 dia e temperatura na faixa de 25°C. Para Pescod (1996), a COV mínima para uma lagoa operada sob condições anaeróbias seguras é de 100 gDBO m³ d⁻¹.

O acúmulo de lodo em lagoas anaeróbias é inevitável, e a velocidade com que ocorre depende da concentração de sólidos inertes e orgânicos do afluente (PESCOD, 1996). Portanto, é importante a previsão de remoção desse lodo durante a operação do sistema. De acordo com Peña *et al.* (2000), o descarte de lodo em lagoas anaeróbias apresenta elevado impacto na qualidade do efluente, uma vez que o acúmulo de lodo pode levar a alterações hidráulicas com redução na eficiência do processo devido a diminuição do volume útil da lagoa, bem como a alterações na forma da superfície do fundo. Segundo Mendonça (1990)²

² MENDONÇA, S.R. **Lagoas de estabilização e aeradas mecanicamente: novos conceitos**. João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 1990. 388p.

apud von SPERLING, 2002), a taxa de acúmulo de lodo é da ordem de 0,03 a 0,04 m³ hab⁻¹ ano⁻¹.

Saqqar e Pescod (1995b) estudaram a distribuição do lodo em lagoas anaeróbias e observaram que essa distribuição não é homogênea, sendo que na entrada da lagoa, o acúmulo foi menor devido à alta velocidade do afluente. A distribuição do lodo varia com a geometria da lagoa e velocidade de entrada do afluente. Papadopoulos *et al.* (2003) e Nelson *et al.* (2004) verificaram a formação de uma camada uniforme de lodo no fundo de uma lagoa anaeróbia tratando esgotos sanitários. Mara *et al.* (1997)³ *apud* Papadopoulos *et al.* (2003), por outro lado, verificaram um maior acúmulo de lodo na entrada de uma lagoa anaeróbia.

A maior parte das reações de degradação ocorrem no sedimento dessas lagoas. Como decorrência, gases são liberados para a coluna d'água e microrganismos são levados para as camadas superiores, promovendo uma relativa mistura da coluna d'água (PESCOD, 1996). Entretanto, estudos têm mostrado que ocorre estratificação e desestratificação intermitente ao longo da coluna d'água como consequência primária do aquecimento diferencial ao longo da lagoa, assim como da ausência de ventos suficientes para permitir a mistura de toda a massa de água (GU e STEFAN, 1995).

Com base no que foi relatado sobre as lagoas de estabilização, pode-se concluir de maneira geral que esse tipo de sistema é bastante indicado para as condições brasileiras devido, principalmente, ao clima favorável (temperatura e insolação elevadas) e disponibilidade de área, considerando-se que 90% das cidades brasileiras possuem uma população de até 50 mil habitantes, e dessas cidades, 49% localizam-se nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, onde as condições de saneamento básico são mais problemáticas quando comparadas com aquelas das regiões Sul e Sudeste (IBGE, 2005). De acordo com dados do censo de 2000, a coleta de esgoto é realizada em 52% dos municípios brasileiros. A região Norte apresenta a maior proporção de

³ MARA, D.; PEARSON, H.; ALABASTER, G.; MILLS, S. An evaluation of waste stabilization ponds in Kenya. **Research Monographs**, n° 11. Department of Civil engineering, University of Leeds, UK, 1997.

municípios sem coleta (92,9%), seguida do Centro-Oeste (82,1%), Sul (61,1%), Nordeste (57,1%) e Sudeste (7,1%). Do total de municípios com coleta, o Brasil ainda possui 40% dos esgotos coletados sem tratamento, sendo lançados *in natura* nos rios e mares (IBGE, 2000).

Como as lagoas de estabilização representam uma opção de tratamento de esgotos sanitários de baixo custo é, portanto, um caminho interessante para a redução dos custos públicos destinados ao saneamento básico. O tratamento de 1m³ de água de boa qualidade custa quatro vezes menos do que é gasto com o tratamento da mesma quantidade de água de um rio poluído (GOULART e CALLISTO, 2003). Além disso, cada real aplicado em água e esgoto poupa R\$ 4,30 em saúde, o que certamente ajudaria a diminuir a média de 238 óbitos/dia causados por doenças provocadas pela água contaminada e dois terços das internações hospitalares no SUS (CHIAPERINI, 2003).

Somado às contribuições ao saneamento básico e ambiental e conseqüentemente à saúde pública, o emprego das lagoas de estabilização representa também uma possibilidade ao uso de águas com qualidade inferior em certas atividades, entre as quais se destacam: - irrigação; - criação de peixes; - dessedentação de animais; - caldeiras; - construção civil; - lagos ornamentais; - descarga de vasos sanitários; - geração de energia hidroelétrica (SILVA e ARAÚJO, 2004). Esse aspecto pode contribuir não apenas para a economia de água potável, mas também na geração de renda para a população local, na medida em que o efluente desse tipo de sistema pode ser utilizado em setores produtivos.

3.2. Microbiologia de Lagoas de Estabilização.

Os estudos microbiológicos em lagoas anaeróbias e lagoas de estabilização têm se restringido à determinação da redução de agentes patogênicos, como ovos de helmintos,

coliformes, salmonela, vírus, entre outros, no esgoto doméstico após a passagem pelo sistema de tratamento como foi retratado nos trabalhos de Emparanza-Knorr e Torrella (1995), Alcalde *et al.* (2003), Lucena *et al.* (2004), Mohammed (2006) e Oliveira (2006).

Alguns trabalhos identificaram a presença e o comportamento de certos grupos em lagoas facultativas, notadamente para zooplâncton e fitoplâncton em lagoas facultativas (PATIL *et al.*, 1975; RIVERA *et al.*, 1987). Estudos avaliando o comportamento de grupos bacterianos específicos como bactérias púrpuras (VENNES, 1970) e fototróficas (DEL AGUILA, 2006) frente às condições de operação e ambientais de sistemas de lagoas também são encontrados.

Entretanto, estudos que enfoquem a diversidade e a interação entre os microrganismos responsáveis pelos processos envolvidos na degradação da matéria orgânica são bastante escassos, particularmente para os organismos anaeróbios que se desenvolvem nas lagoas anaeróbias e na zona anaeróbia das lagoas facultativas.

3.2.1. Microbiologia e Metabolismo Microbiano de Lagoas Anaeróbias

Sob condições anaeróbias, organismos procariontes pertencentes ao Domínio *Bacteria* são predominantes nas lagoas, os quais integram grupos bem específicos em termos de metabolismo e papel que desempenham no processo como um todo. Microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea* são também importantes, sendo os responsáveis pela produção do metano nesses sistemas (VAZOLLER *et al.*, 1999; MONTEGGIA e SOBRINHO, 1999).

Como anteriormente observado, os estudos sobre a microbiota de lagoas de estabilização são escassos, e, também, assim são os de lagoas anaeróbias. Algumas das poucas pesquisas descritas na literatura, cujo enfoque é nos microrganismos envolvidos na

degradação da matéria orgânica em lagoas anaeróbias incluem o antigo trabalho realizado por Eppley e Maciasr (1963), os quais pesquisaram o papel da alga *Chlamydomonas mundana* nesses sistemas. De acordo com os resultados, os autores concluíram sobre a importância dessa espécie de alga sob anaerobiose, indicando a existência de um mecanismo de fotoassimilação do acetato, contribuindo para a estabilização da matéria orgânica. O ácido acético é um dos principais produtos da fermentação anaeróbia metanogênica. Pearson *et al.* (1987)⁴ *apud* Almasi e Pescod (1996) verificaram o mesmo metabolismo em outra espécie não identificada do gênero *Chlamydomonas* sp., bem como em *Euglena* sp.

Organismos fotossintetizantes como as cianobactérias são também encontrados nas lagoas anaeróbias, uma vez que Stal e Moezelaar (1997) reportaram a ocorrência de uma variedade de caminhos fermentativos em cianobactérias nos ambientes anaeróbios, incluindo as fermentações homo e heterolática, homoacetogênica e mista. Os produtos gerados pelas cianobactérias fermentativas incluem CO₂, H₂, ácidos fórmico, acético e láctico, e o etanol. Estudos sobre a presença, atividade e relevância desses microrganismos em lagoas anaeróbias ainda necessitam ser realizados, sobretudo devido a possibilidade de geração de cianotoxinas.

Em 1995, Polprasert e Agarwalla (1995) estudaram a influência de biofilmes formados nas paredes de lagoas anaeróbias com chicanas, encontrando significativa participação das células imobilizadas no processo. Estes autores desenvolveram e validaram um modelo matemático para determinar a participação do biofilme na remoção da matéria orgânica. Segundo o modelo proposto e validado em duas lagoas operadas em escala real, a contribuição do biofilme na redução dos valores de DBO foi de aproximadamente 50%, incluindo o biofilme formado nas paredes da lagoa, assim como nas chicanas.

A relevância dos nutrientes nas lagoas de estabilização é indiscutível. No caso das lagoas anaeróbias, alguns estudos realizados no sentido de verificar o fluxo de nitrogênio em

⁴ PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; MILLS, S.W.; SMALLMAN, D. Factors determining algal population in waste stabilization ponds and the influence of algae on pond performance. **Proc. Int. Conf. on Waste**

lagoas anaeróbias evidenciaram que a emissão do gás N_2 era maior ($8,9-120 \text{ kg } N_2-N \text{ ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$) se comparada à da amônia ($4,9-10,5 \text{ kg } NH_3-N \text{ ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (HARPER e SHARPE⁵, 1998 *apud* JONES *et al.*, 2000). Diferentes mecanismos poderiam explicar a geração de N_2 em lagoas anaeróbias. Alguns mais recentes identificaram em ambientes anaeróbios a atividade de microrganismos capazes de combinar amônia com nitrito ou ácido nitroso para formar N_2 , processo atualmente conhecido por ANAMOX (JONES *et al.*, 2000; VILLAYERDE, 2004). Jones *et al.* verificaram esse mecanismo em lagoas anaeróbias tratando água residuária de suinocultura. Além disso, reações de nitrificação/desnitrificação têm sido observadas em ambientes microaeróbios, e microhabitats com essas características devem ocorrer em lagoas anaeróbias uma vez que são sistemas abertos (JONES *et al.*, 2000). Organismos classificados como aeróbios obrigatórios (*Nitrosomonas* spp. e *Nitrobacter* spp.) foram encontrados na região anaeróbia de lagoas de estabilização (ABELIOVICH, 1987), e a espécie *Nitrosomonas europae* foi identificada na comunidade microbiana de lagoas anaeróbias (ST-ARNAUD *et al.*, 1991⁶ *apud* JONES *et al.*, 2000). Essas observações levantaram a possibilidade de ocorrência de formação de N_2 nesses ambientes, o que parecia ser pouco provável. Entretanto, questões relacionadas à viabilidade e atividade metabólica desses organismos em ambientes com altas concentrações de substrato, como as lagoas anaeróbias, ainda precisam ser respondidas.

Além da atividade microbiana procariótica em ambientes anaeróbios, existem indicações na literatura sobre a participação de protozoários no processo. A função de fermentação de substratos sempre relatada à atividade microbiana, pode também ser realizada por protozoários (SCHINK, 1997; GARCÍA *et al.*, 2000).

Stabilization Ponds, Lisboa, 1987.

⁵ HARPER, L.A.; SHARPE, R.R. (1998). Ammonia emissions from swine waste lagoons in the southeastern US coastal plains. 58-6612-7M-022 Division of Air Quality. North Carolina Department of Environment and Natural Resources, Raleigh, NC, 22.

⁶ ST-ARNAUD, S.; BISAILLON, J.G.; BEAUDET, R. Microbiological aspects of ammonia oxidation of swine waste. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 918-923, 1991.

Os protozoários anaeróbios diferem dos aeróbios devido à ausência de mitocôndrias e, portanto, da ocorrência de fosforilação oxidativa e da existência de uma cadeia de transporte de elétrons. A geração de energia nesses organismos é proveniente da glicólise (fosforilação no nível de substrato) e também a partir da fermentação de outros substratos. Em alguns casos, especialmente protozoários ciliados (BIAGINI *et al.*, 1998), há a presença de organelas redutoras que produzem H_2 , os hidrogenossomas (BIAGINI e BERNARD, 2000). Espécies amebóides, flageladas e ciliadas foram descritas em ambientes anaeróbios (BIAGINI *et al.*, 1998).

Os protozoários anaeróbios podem ser encontrados associados com as arqueias metanogênicas, as quais desempenham a função de remoção de H_2 , mantendo baixa a sua pressão parcial e reduzida concentração de formiato, permitindo a realização da fermentação de matéria orgânica complexa pelos protozoários (SCHINK, 1997; GARCÍA *et al.*, 2000). Estas espécies de protozoários são dependentes das metanogênicas que vivem no interior do seu citoplasma (CORLISS, 2002).

Oliveira (1997) destacou a freqüente observação de protozoários ciliados em lodo de reator anaeróbio do tipo UASB tratando águas residuárias de suinocultura e apresentou relatos de outros autores a este respeito, tais como o de Weimer (1992). O autor Weimer (1992) apontou o importante papel dos protozoários na degradação anaeróbia de material orgânico particulado em ambientes como o rúmen. Toerien e Hatting (1969 *apud* NOVAES, 1986) verificaram a presença de um pequeno número de protozoários em biodigestores. Muller e Finlay (1994) observaram relações de simbiose entre arqueias metanogênicas e cerca de cinquenta espécies de protozoários ciliados anaeróbios, os quais são, na grande maioria, originários de água doce.

Agrawa *et al.* (1997), avaliando as modificações na atividade microbiana dos diferentes grupos tróficos em um reator UASB tratando esgoto sanitário diluído verificou a presença do ciliado anaeróbio *Metopus* sp em relação endossimbiótica com metanogênicas.

Biagini *et al.* (1998) mostraram que a introdução do ciliado anaeróbio *Metopus palaeformis*, que possui hidrogenossomas e pode estar associado às metanogênicas endossimbióticas, em um ambiente anaeróbio resultou na redução do número de bactérias, com aumento na produção do metano e do sulfeto. Verificou-se que a estimulação da produção do metano foi proporcional ao aumento do número de ciliados na cultura. Os autores concluíram que as metanogênicas endossimbióticas não foram as responsáveis pelo aumento na produção do metano, mas provavelmente a disponibilidade de substratos como os ácidos orgânicos acético e propiônico, excretados pelos protozoários. O que parece um tanto controverso, uma vez que o metano é derivado das metanogênicas, talvez não das encontradas no interior dos protozoários. Trabalhos que enfoquem a participação desses organismos no processo de degradação anaeróbia são relativamente escassos e precisam ser desenvolvidos.

Tendo em vista os trabalhos apontados, torna-se evidente a necessidade de estudos mais aprofundados e voltados para os sistemas de tratamento anaeróbio de esgotos sanitários, com a finalidade de se conhecer melhor o comportamento e papel desses protozoários frente aos processos de estabilização da matéria orgânica.

3.2.2. Particularidades da Degradação Anaeróbia Microbiana sob Metanogênese.

O processo metanogênico de degradação anaeróbia da matéria orgânica é comandado por um consórcio de microrganismos que inclui principalmente organismos procariontes bactérias e arqueias, que convertem a matéria orgânica aos gases metano e dióxido de carbono, bem como a nutrientes inorgânicos e biomassa. A presença de protozoários e fungos

em certas fermentações metanogênicas pode ser também fundamental (CHYNOWETH e PULLAMMANAPPALLIL, 1996).

Em lagoas anaeróbias, assim como em outros tipos de sistemas anaeróbios de tratamento de resíduos ou em ambientes naturais, a degradação envolve passos coordenados pelos microrganismos que, em sua maioria, estabelecem entre si uma associação sintrófica em favor das reações energéticas celulares (SCHINK, 1997).

As etapas da degradação anaeróbia metanogênica que se destacam podem ser assim descritas, adaptando-se de Speece (1996):

(1) hidrólise de polímeros orgânicos complexos a monômeros (açúcares, ácidos orgânicos de cadeia curta e longa e aminoácidos) por meio da atividade de enzimas que são excretadas por bactérias fermentativas;

(2) absorção e conversão dos monômeros orgânicos gerados na hidrólise pelas células das bactérias fermentativas, sendo os produtos mais comuns o hidrogênio, os ácidos acético, propiônico, butírico, láctico, e álcoois como o etanol; os agentes microbianos são bactérias acidogênicas anaeróbias estritas (a maioria) e facultativas;

✍ As espécies bacterianas das etapas (1) e (2) podem ser representadas por *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacillus* sp., *Bacteroides succinogenes*, *Bifidobacterium* sp., *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Megasphaera* sp., *Lachnospira multiparus*, *Peptococcus anaerobicus*, *Selenomonas* sp., *Staphylococcus* sp. (ZEHNDER, 1988);

(3) oxidação dos compostos orgânicos reduzidos principalmente a hidrogênio, bicarbonato e ácido acético, a qual denomina-se acetogênese microbiana que é mediada por espécies de organismos também conhecidos por acetogênicos produtores obrigatórios de hidrogênio; a

acetogênese é termodinamicamente desfavorável nas CNTP, e os produtos de suas reações, o ácido acético e o H_2 necessitam ser removidos do meio, favorecendo assim o deslocamento da reação no sentido da formação desses produtos; tal condição é obtida por meio de uma estreita relação de sintrofia entre as espécies acetogênicas e aquelas utilizadoras de H_2 (STAMS, 1994), em geral as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas ou as bactérias redutoras do íon sulfato;

✍ As espécies bacterianas envolvidas na acetogênese descrita em (3) são *Acetobacterium woddii*, *Clostridium bryantii*, *Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Syntrophomonas wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophus buswellii* (ZEHNDER, 1988);

(4) respiração homoacetogênica do bicarbonato pelas bactérias homoacetogênicas, cujo produto final é o ácido acético;

(5) oxidação de compostos orgânicos reduzidos (ácidos propiônico, butírico e lático) e do H_2 pelas bactérias redutoras de nitrato e redutoras de sulfato;

✍ As espécies de bactérias redutoras de sulfato envolvidas nas etapas (4) e (5), mas que também podem atuar na etapa (3) integram dois grupos metabólicos distintos, o grupo das oxidadoras completas, ou capazes de usar completamente os substratos orgânicos, sendo os gêneros representativos o *Desulfobacter* sp., o *Desulfococcus* sp., o *Desulfosarcina* sp., o *Desulfonema* sp. e o *Desulfobacterium* sp.; o grupo das oxidadoras incompletas, ou que utilizam incompletamente os compostos orgânicos, compreendem as espécies *Desulfotomaculum* sp., *Desulfomonas pigra*, *Desulfovibrio thermophilus*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Thermodesulfobacterium commune* e *Desulfobulbus* sp. (WIDDEL, 1998).

(6) fermentação do ácido acético pelas arqueias metanogênicas acetotróficas com formação de metano;

(7) oxidação do ácido fórmico ou do gás H_2 por meio da redução do bicarbonato pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

✍ As espécies metanogênicas constituem um grupo especial de microrganismos com diferentes formas celulares e filogeneticamente distintas dos procariontes típicos (NOVAES, 1986; GARCÍA *et al.*, 2000). São microrganismos anaeróbios estritos, que vivem em potenciais de óxido-redução da ordem de $-350mV$ e são capazes de utilizar apenas poucas fontes energéticas (NOVAES, 1986; STAMS, 1994; VAZOLLER *et al.*, 1999). Atualmente são classificadas no Domínio procarionte *Archaea*, por isso a denominação recente arqueias metanogênicas (VAZOLLER *et al.*, 1999). Cabe citar algumas de suas peculiaridades incomuns:- ausência do ácido murâmico constituinte do peptoglicano da parede celular; - seqüências particulares do RNAr 16S que as tornam filogeneticamente distantes dos demais organismos procariontes (VAZOLLER *et al.*, 1999; GARCÍA *et al.*, 2000).

Filogeneticamente as metanogênicas estão divididas em cinco ordens, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales* e *Methanomicrobiales* (BOONE *et al.*, 1993; GARCÍA *et al.*, 2000). De acordo com García *et al.* (2000), são 83 espécies descritas, separadas em três grupos nutricionais dentro das cinco ordens referidas, sendo: - 56 espécies de hidrogenotróficas que oxidam H_2 e reduzem o CO_2 para formar metano, dentre as quais, 38 espécies também oxidam o ácido fórmico a metano; este grupo inclui a maioria das espécies das famílias *Methanobacteriaceae* e *Methanomicrobiaceae* (KLEIKEMPER *et al.*, 2005); - 19 espécies que utilizam compostos metilados, das quais 13 são metilotróficas obrigatórias; - 8 espécies que utilizam o ácido acético para a formação de metano, das quais 2 são metanogênicas acetotróficas obrigatórias, este grupo inclui os gêneros mais comuns encontrados em sistemas de tratamento, *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. A Tabela 1 apresenta aspectos da morfologia e os

substratos energéticos preferenciais de alguns gêneros metanogênicos, modificado de Madigan *et al.* (2003).

Tabela 1. Gêneros representantes das espécies metanogênicas, aspectos de sua morfologia e substrato utilizado para a conversão em biogás.

Gênero	Morfologia	Substrato
<i>Methanobacterium</i>	Bacilos longos/ filamentos	H ₂ + CO ₂ , formiato
<i>Methanobrevibacter</i>	Bacilos curtos/cadeias	H ₂ + CO ₂ , formiato
<i>Methanomicrobium</i>	Bacilos curtos/ alguns flagelados	H ₂ + CO ₂ , formiato
<i>Methanogenium</i>	Pequenos cocos irregulares	H ₂ + CO ₂ , formiato
<i>Methanospirillum</i>	Filamentos móveis	H ₂ + CO ₂ , formiato
<i>Methanoplanus</i>	Forma de prato	H ₂ + CO ₂ , formiato
<i>Methanothermus</i>	Bacilos	Somente H ₂ + CO ₂
<i>Methanococcus</i>	Cocos irregulares, alguns móveis	H ₂ + CO ₂ , formiato
<i>Methanosarcina</i>	Aglomerados de cocos grandes	Acetato, metilamina, metanol, H ₂ + CO ₂
<i>Methanosaeta</i>	Bacilos /filamentos	Somente acetato
<i>Methanolobus</i>	Cocos	Metanol, metilamina
<i>Methanococcoides</i>	Cocos irregulares	Metanol, metilamina

(Modificado de MADIGAN *et al.*, 2003)

O processo de degradação anaeróbia pode ser influenciado por uma série de fatores que, portanto, determinam o sucesso ou a falência do tratamento anaeróbio de determinada água residuária. Entre esses fatores pode-se citar a temperatura, o pH, a presença de nutrientes, a composição do substrato e como consequência destes, a interação entre os microrganismos envolvidos no processo. Distúrbios entre as populações microbianas de um nível trófico afetam toda a comunidade e causam desequilíbrios que se refletem na eficiência de todo o processo, com acúmulo de compostos intermediários, mudanças de pH, ou reduzida eficiência em um sistema de tratamento anaeróbio.

Fernández *et al.* (1999) mostraram que ocorrem significativas variações entre as populações microbianas de bactérias e arqueias em um reator que apresenta estabilidade de variáveis físico-químicas (redução de valores da DQO e de ácidos voláteis, produção de CH₄ e pH neutro). Portanto, a avaliação apenas desses fatores é inadequada para revelar modificações na estrutura da comunidade microbiana.

Os estudos microbiológicos clássicos compreendem o isolamento dos microrganismos e a detecção de rotas metabólicas e produtos por meio do emprego de ensaios biológicos e químicos. Embora fundamentais, o estudo da ecologia microbiana da digestão anaeróbia utilizando técnicas clássicas pode apresentar certas dificuldades, uma vez que os microrganismos envolvidos na metanogênese dos resíduos são exigentes em relação à anaerobiose e requerem longos períodos de incubação. Soma-se a isso, a dificuldade de separação de algumas espécies de seus parceiros sintróficos, a fim de serem obtidas em culturas puras (CHYNOWETH e PULLAMMANAPPALLIL, 1996; GARCIA *et al.*, 2000).

Mais recentemente, as técnicas da biologia molecular vêm eliminando as dificuldades na identificação dos tipos microbianos independentemente de cultivos. Particularmente para os anaeróbios estritos, os avanços têm sido determinantes para a compreensão da metanogênese microbiana. De forma geral, os métodos moleculares têm aumentado consideravelmente o conhecimento sobre a diversidade microbiana, não apenas do ponto de vista filogenético e taxonômico, mas também ecológico (HUNTER-CEVERA, 1998).

Segundo Díaz *et al.* (2003), as técnicas da biologia molecular, ferramentas importantes para a avaliação da diversidade, abundância e distribuição de microrganismos em ecossistemas naturais e artificiais, superando as restrições e falhas das técnicas convencionais, são a clonagem e o seqüenciamento a partir do RNAr 16S, a hibridização *in situ* com sondas fluorescentes - FISH (AMANN *et al.*, 1995) e a eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE (MUYZER *et al.*, 1993). Análises qualitativas e quantitativas podem ser

assim mais facilmente realizadas, e a dinâmica das populações microbianas, em conjunto com a identificação de espécies responsáveis pela degradação de substratos específicos, pode ser então melhor compreendida. Esse último resultado, sem dúvida, pode auxiliar o desenho e a operação de sistemas de tratamento, com vistas ao aprimoramento da eficiência na degradação de substratos e na produção do metano (AKARSUBASI *et al.*, 2005).

Porém, é a somatória dos métodos que resulta em descobertas seguras. Assim, não se invalidam experimentos tradicionais como os ensaios que avaliam a atividade microbiana específica de comunidades anaeróbias. E, portanto, a determinação da atividade específica das populações microbianas mantém-se como uma ferramenta fundamental para a análise da digestão anaeróbia. Nesse caso, empregam-se procedimentos experimentais cujos substratos consumidos ou os produtos gerados podem ser monitorados, e assim fornecem velocidades de utilização ou produção de um composto por um número de microrganismos em um dado espaço de tempo (SCHMIDT e AHRING, 1996).

É preciso coordenar e combinar análises bioquímicas e moleculares para que papéis individuais possam ser associados, levando a um melhor entendimento dos caminhos metabólicos (HUNTER-CEVERA, 1998; COLLINS *et al.*, 2003).

3.3. Técnicas para Avaliação da Atividade Microbiana Anaeróbia

A avaliação das atividades específicas de uma comunidade anaeróbia pode ser realizada através da determinação da velocidade de produção de gás metano e/ou do consumo de substratos pelos microrganismos. Nesse caso, obtém-se a atividade microbiana a partir do fornecimento de diferentes substratos específicos, considerando os grupos tróficos envolvidos na digestão anaeróbia.

O método para determinação da atividade específica de lodos anaeróbios tem sido muito aplicado com a finalidade de classificar o potencial metanogênico da biomassa oriunda de processos sob diferentes condições operacionais (CHERNICHARO, 1997). É, de fato, uma importante ferramenta para uma série de aplicações em que se incluem o conhecimento do efeito de compostos potencialmente inibidores no comportamento da biomassa, a determinação da toxicidade relativa de compostos químicos presentes em efluentes líquidos e resíduos sólidos (ROZZI *et al.*, 2002), o estabelecimento do grau de degradabilidade de um efluente (MORENO-ANDRADE e BUITRÓN, 2004), o monitoramento das alterações de um lodo após longos períodos de operação de reatores (CHO *et al.*, 2004), a determinação da carga orgânica máxima aplicada a um lodo (INCE *et al.* 1995) e a análise de parâmetros cinéticos gerais ou de grupos microbianos individuais (ROZZI e REMIGI, 2004).

Para determinar a atividade específica de lodos anaeróbios empregam-se métodos diretos, isto é, quantifica-se uma variável microbiológica ou físico-química, e indiretos, os quais detectam efeitos secundários da atividade microbiana (ROZZI e REMIGI, 2004).

Diversos métodos diretos foram propostos desde a década de 70, quando Van den Berg *et al.* (1974) determinaram a atividade metanogênica utilizando um manômetro com um sensor fotoelétrico para a quantificação do biogás produzido. Dentre as demais propostas que utilizaram a produção de biogás para determinação da atividade da comunidade microbiana, destacam-se as de De Zeeuw⁷ (1984 *apud* ARAÚJO, 1995), Dolfing e Bloemen (1985), Duborguier (1989 *apud* VAZOLLER, 1989), James *et al.* (1990), bem como os procedimentos estabelecidos no âmbito do Programa de Pesquisa em Saneamento Básico - PROSAB (CHERNICHARO, 1997).

⁷ DE ZEEUW, W. J. **Acclimatization of anaerobic sludge for UASB-reactor start-up**. 1984. 157f. Doctoral Thesis – Agricultural University Wageningen, The Netherlands, 1984.

Rozzi e Remigi (2004) destacaram a existência de métodos microbiológicos diretos para determinação da atividade de um lodo, incluindo a avaliação da concentração da coenzima F₄₂₀, do conteúdo de ATP das células e da atividade das enzimas desidrogenases.

A determinação da atividade microbiana de forma indireta inclui o método calorimétrico (JOLICOUER *et al.*⁸, 1998 *apud* ROZZI e REMIGI 2004) e o método titulométrico descrito por Rozzi *et al.* (2002).

Até o momento, não há um protocolo único estabelecido e aceito internacionalmente para a determinação de atividades específicas em amostras oriundas de populações microbianas de reatores anaeróbios (COLLERAN e PENDER, 2002). Fato que leva à não reprodutibilidade do teste dependendo do laboratório e do método empregado, dificultando a possibilidade de comparação dos resultados.

Um grupo de trabalho da International Water Association (IWA) foi montado com o objetivo de harmonizar os protocolos existentes visando o desenvolvimento de um procedimento único. O objetivo inicial do grupo foi o de estabelecer uma terminologia padrão para a avaliação da digestão anaeróbia, a atividade microbiana e para testes sobre inibição. Como segundo objetivo, o grupo buscou comparar os métodos existentes e desenvolver um protocolo padrão para a avaliação de parâmetros cinéticos do processo anaeróbio (ROZZI e REMIGI, 2004).

Independente do método empregado para avaliação da atividade específica, alguns aspectos podem influenciar o ensaio de forma que os resultados obtidos apresentem graus de incerteza (ANGELIDAKI e SANDERS, 2004). Entre esses aspectos ressaltam-se: - a relação entre a concentração inicial de substrato e a concentração inicial de biomassa (MORENO *et al.*, 1999; MORENO-ANDRADE e BUITRÓN, 2004; ROZZI e REMIGI, 2004); - o tipo de substrato utilizado; - a forma de determinação da biomassa ativa.

⁸ JOLICOEUR, C.; TO, T.; BEAUBIEN, A. Flow microcalorimetry in monitoring biological activity of aerobic and anaerobic wastewater treatment processes. **Analytica Chimica Acta**, v. 213, p. 165-176, 1998.

A concentração de substrato não deve limitar a atividade microbiana, seja por falta de alimento (INCE *et al.*, 1995), seja por inibição quando em concentrações excessivas. No protocolo desenvolvido pelo PROSAB (CHERNICHARO, 1997), as relações entre substrato e biomassa variaram de 0,4 a 1,0 g DQO-HAc g⁻¹ SV, sendo que em ensaio para determinação da atividade metanogênica específica de lodo anaeróbio, a maior atividade foi alcançada com a relação 0,8 g DQO-HAc g⁻¹ SV. No trabalho de Ince *et al.* (1995), a relação utilizada para o ensaio de atividade foi de 0,46 g DQO-HAc g⁻¹ SV para lodo de reator tratando água residuária de cervejaria. Diez *et al.* (1999) estudaram taxas de carga orgânica variando de 0,31 a 1,34 g DQO-HAc g⁻¹ SV. Em estudo realizado sobre métodos do teste de atividade metanogênica, Penna (1994) analisou diversas relações substrato/biomassa e destacou que, em função do tipo de lodo e de sua atividade metanogênica, deve ser pesquisada, preliminarmente aos testes, a relação ótima substrato/biomassa que conduza à atividade metanogênica específica máxima.

A utilização de substratos inadequados pode levar à inibição do processo, devido à não adaptação da população metanogênica a essas fontes. Os ácidos voláteis mais adequados ao ensaio de atividade específica são aqueles produzidos em maior quantidade durante a digestão anaeróbia do resíduo que está sendo tratado pela população microbiana da amostra ensaiada (STEIL, 2001). Para isso, deve-se ter conhecimento prévio dos produtos da fermentação, o que nem sempre é possível.

Steil (2001), estudando a atividade metanogênica de amostras de lodos provenientes de biodigestores alimentados em batelada com resíduos da avicultura e suinocultura na relação substrato/biomassa entre 0,25 a 1,00 g DQO g⁻¹ SV, observou que, em alguns casos, a atividade verificada no frasco-reator controle (sem adição de substrato) foi maior que naqueles com adição de substratos específicos. Esta observação foi atribuída ao fato de que o teor de sólidos voláteis (SV) empregado como medida da biomassa incluía uma grande parte de material orgânico não

ativo, levando a valores de atividade metanogênica específica incorretos, uma vez que a determinação da atividade metanogênica foi feita a partir da medida de produção de metano (determinada por meio do cálculo da inclinação máxima da curva de produção de metano), dividida pela média entre a quantidade inicial e final de biomassa presente no frasco-reator (determinada por meio do teor de SV).

Neste sentido, os resultados de atividade metanogênica específica devem ser vistos com cuidado, uma vez que os valores podem depender do teor de SV, cujo conteúdo não representa necessariamente apenas a biomassa ativa envolvida na conversão de substrato. Uma vez que não é possível a determinação da porcentagem de SV que corresponde à microbiota ativa no processo de digestão anaeróbia, o valor de SV como índice da biomassa é extremamente impreciso, pois realmente não distingue entre biomassa microbiana ativa e qualquer outro material orgânico presente na amostra (INCE *et al.*, 1995; DIEZ *et al.*, 1999; CRONJE *et al.*, 2002).

Montero *et al.* (2004) compararam a determinação de biomassa medida como SSV com a contagem de microrganismos em microscópio de epifluorescência, submetidos a coloração com DAPI. Os autores observaram correlação entre o número total de microrganismos com a medida de biomassa, entretanto não houve correlação entre o número de microrganismos e a medida de biomassa como SSV, levando à conclusão de que a determinação da biomassa desta forma não pode ser utilizada para avaliar a população microbiana. Por outro lado, os autores observaram que os resultados dos testes para medir as atividades acidogênicas e metanogênicas máximas foram válidos e reprodutíveis, independente do método empregado para quantificação da biomassa.

Outros métodos para quantificação da biomassa anaeróbia estão disponíveis como a contagem direta utilizando coloração com DAPI e laranja de acridina (KEPNER e PRATT, 1994), ou com sais de tetrazólio (ZIMMERMANN *et al.*, 1978; THOM *et al.*, 1993; BHUPATHIRAJU *et al.*, 1999a e b; VOLLERTSEN *et al.*, 2001), contagem de colônias viáveis

ou estimativa numérica do número de microrganismos presentes na amostra por meio das técnicas do *roll-tube* ou do número mais provável – NMP - (GÓMEZ e TORRES, 2000), medida da quantidade de coenzima F_{420} e determinação do conteúdo de ATP (JORGENSEN *et al.*, 1992). Entretanto, essas técnicas também apresentam limitações. A técnica de contagem de colônias e o NMP são métodos pouco práticos devido à necessidade de longos períodos de incubação e condições de anaerobiose estrita (COLLERAN *et al.*, 1991).

Em trabalho realizado por Kepner e Pratt (1994), a contagem direta realizada com amostras de sedimento apresentou problemas devido a coloração ineficiente com DAPI e a presença de material particulado que mascarou os resultados. Esses mesmos autores relataram a ausência de correlação na contagem de microrganismos de uma mesma amostra com DAPI e laranja de acridina, além de verificarem inconsistência nos diferentes métodos de aplicação dessa técnica, pela falta de sua adequada descrição. Segundo Vollertsen *et al.* (2001), a coloração com laranja de acridina superestima o número de microrganismos.

A utilização dos sais de tetrazólio baseia-se na sua redução intracelular, gerando o formazan, um composto com cor que é precipitado pelos componentes do sistema de transporte de elétrons ou pelas enzimas desidrogenases em microrganismos metabolicamente ativos (BHUPATHIRAJU *et al.*, 1999a). O precipitado formado pode ser individualmente detectado dentro das células por contagem direta ou quantificado em extratos celulares por espectrofotometria (ZIMMERMAN *et al.*, 1978). As limitações da técnica incluem a dificuldade em detectar a viabilidade de alguns organismos devido a deposição muito pequena de formazan (THOM *et al.*, 1993) e o fato de muitos agentes químicos e redutores endógenos poderem também reduzir o tetrazólio (BHUPATHIRAJU *et al.*, 1999a).

O cofator F_{420} é uma coenzima envolvida no transporte de elétrons e na reação da hidrogenase que ocorre no sistema de redução da Co-M (Wolfe⁹, 1971 *apud* NOVAES, 1986). A

⁹ WOLFE, R. S. Microbial formation of methane. In ROS, A. H.; WILKINSON, J. F. (Ed.). **Advances in Microbiological Physiology**. New York: Academic Press Inc., 1971. V. 6, p. 107-146.

F₄₂₀ apresenta fluorescência verde-azulada em sua forma reduzida sob luz ultravioleta e pode, desta forma, ser utilizada para identificar colônias e indiretamente estimar a biomassa metanogênica em sistemas anaeróbios (FERREIRA *et al.*, 1987). Entretanto, o conteúdo de F₄₂₀ pode variar entre as diversas espécies metanogênicas e mesmo entre a mesma espécie, portanto não é uma variável segura para determinação da biomassa.

CHUNG e NEETHLING (1990) propuseram a utilização de medidas de ATP (adenosina trifosfato) e de atividade das enzimas desidrogenases (DHA) para estimar a biomassa ativa de lodo anaeróbio. Os autores observaram que as medidas de ATP refletiram satisfatoriamente a quantidade de biomassa ativa nos lodos. Entretanto, outros autores (JORGENSEN *et al.*, 1992; CLARKE *et al.*, 1986) observaram variações nessa determinação, levando a resultados controversos. Quanto à determinação da atividade das enzimas DHA, os autores verificaram ser possível a determinação de um grupo distinto de microrganismos, como por exemplo, a atividade das metanogênicas acetotróficas quando se fornece acetato como substrato e realizam-se as medidas de DHA. Segundo Münch e Pollard (1997), a determinação do conteúdo desses compostos como medida de biomassa não é confiável porque dependem do estado metabólico do processo.

A análise dos ácidos graxos fosfolipídicos (PLFA) das membranas celulares foi também descrita para determinar a biomassa ativa de uma amostra (PENNANEN, 2001). Os ácidos graxos fosfolipídicos são encontrados exclusivamente nas membranas celulares de microrganismos, portanto, com a morte celular, são rapidamente degradados. Um determinado ácido graxo fosfolipídico é indicativo de grupos específicos de organismos, permitindo avaliar a presença e abundância de organismos a partir da presença e abundância do ácido graxo fosfolipídico presente na amostra e que é característico daquele grupo de organismos (HILL *et al.*, 2000). Além disso, seria possível, utilizando um fator de conversão, determinar a biomassa microbiana por exemplo, a partir da determinação dos fosfolipídeos característicos desse grupo

microbiano (PENNANEN, 2001). Por outro lado, Hill *et al.* (2000) apresentaram algumas limitações importantes dessa técnica, uma vez que as moléculas de fosfolípidos característicos de cada organismo não são conhecidas para todos os organismos e qualquer variação desses ácidos levaria a resultados falsos. Além disso, as bactérias e os fungos produzem diferentes quantidades de diversos ácidos graxos fosfolipídicos dependendo das condições ambientais e de crescimento, o que dificulta o emprego dessa medida na determinação da biomassa de uma amostra.

Técnicas de citometria de fluxo estão também disponíveis para a determinação do número de microrganismos em determinada amostra. Pela técnica, as células são individualmente contadas pela passagem em detectores físicos por fluxo capilar (CLARKE *et al.*, 1986). Em geral, os microrganismos devem ser submetidos a um processo de coloração para que possam ser diferenciados de outras partículas (YAMAGUCHI e NASU, 1997). As dificuldades da técnica relacionam-se ao alto custo do equipamento, além de problemas de obstrução de orifícios por bolhas e emulsões biológicas ou partículas não microbianas (CLARKE *et al.*, 1986).

Considerando as opções metodológicas para mensurar a biomassa, a determinação dos sólidos voláteis como representativa da biomassa, apesar de grosseira, ainda tem seu uso justificado devido à simplicidade da técnica. Além disso, as medidas de sólidos voláteis mostraram boas correlações com as medidas de atividade microbiana em alguns trabalhos reportados na literatura (DE ZEEW, 1984⁴ *apud* ARAÚJO, 1995; DOLFING e BLOEMEN, 1985).

Apesar dos problemas metodológicos, muitos trabalhos utilizaram o ensaio de AME para avaliar lodos anaeróbios em diversas configurações de sistemas de tratamento com objetivos distintos e resultados significativos. O tempo de duração dos ensaios usualmente é de 24 a 144 horas (CHO *et al.*, 2004). Nesse sentido, a seguir, relacionam-se alguns dos trabalhos mais relevantes que empregaram a AME.

Dolfing e Bloemen (1985) utilizaram o teste de AME para avaliar a influência de diversos parâmetros tais como tipo de substratos e influência do pH sobre a metanogênese, bem como investigaram processos de inibição e toxicidade da digestão anaeróbia por substâncias como cloreto de sódio e amônia.

Soto *et al.* (1993) aplicaram o teste de AME para estimar a carga orgânica inicial a ser aplicada ao lodo e acompanhar a atividade do lodo ao longo do processo de operação do reator. Os autores avaliaram também as atividades hidrolítica e acidogênica e determinaram parâmetros cinéticos referentes às etapas de hidrólise, acidogênese e metanogênese que caracterizam o processo anaeróbio.

Ince *et al.* (1995), utilizando o ensaio de atividade metanogênica, avaliaram a carga orgânica mais adequada durante a partida de um reator anaeróbio de membrana de ultra-filtração cruzada, assim como, conseguiram determinar o aumento ou diminuição da carga orgânica volumétrica de modo a melhorar o desempenho do reator até que as condições de estabilidade do sistema fossem alcançadas. Os pesquisadores Kalyuzhnyi *et al.* (1998), Lay *et al.* (1998), Nopharatana *et al.* (1998) e Jawed e Tare (1999) utilizaram o teste para o monitoramento e a determinação da biomassa em reatores anaeróbios. Nesses trabalhos, a partir dos ensaios de AME, foi possível avaliar o desempenho da biomassa ao longo da operação do reator e verificar modificações na microbiota em função de alterações operacionais impostas ao sistema.

No trabalho de Araújo (1995), avaliou-se a influência da estrutura populacional do biofilme na degradação dos ácidos graxos voláteis e, conseqüentemente, na produção de metano. Além disso, determinou-se o comportamento da atividade metanogênica do biofilme, frente às diversas fontes testadas ao longo do período de operação do reator, sendo possível a determinação das atividades acidogênica e acetogênica com a utilização dos substratos sacarose e butirato, respectivamente.

3.4. Técnicas Moleculares na Identificação e Quantificação de Microrganismos

Os métodos moleculares são técnicas interessantes no estudo da microbiota anaeróbia pelo seu potencial de identificação e quantificação de forma rápida e precisa, sem necessitar de cultivo celular. Além disso, possibilitam a determinação da presença de gêneros específicos de procariontes de acordo com o ambiente estudado ou, no caso de sistemas de tratamento de águas residuárias, de acordo com o resíduo tratado no sistema (ARAÚJO *et al.*, 2000).

Os genes do RNAr 16S são úteis nesses estudos, uma vez que estão presentes em todas as células procarióticas e que contém tanto regiões conservadas que podem ser usadas para desenhar primers para amplificação por PCR, como regiões variáveis que podem ser usadas para distinguir as seqüências umas das outras (ARAÚJO, 2001).

Estudos comparativos de seqüências do RNAr 16S têm mostrado que diferentes regiões da molécula variam na conservação da seqüência, permitindo a elaboração de sondas de oligonucleotídeos universais e seletivas, específicas para espécie, gênero, ou para grupo filogenético (AMANN, 1995).

3.4.1. Hibridização *in situ* com sondas fluorescentes – FISH

Uma das técnicas utilizadas para identificação de microrganismos provenientes de sistemas de tratamento de águas residuárias é a hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH), um método direto para identificar as células individuais presentes em ecossistemas complexos por meio do uso de sondas de oligonucleotídeos com 17 a 34 nucleotídeos (AMANN *et al.*, 1990; AMANN *et al.*, 1995).

O uso de sondas moleculares é um método que permite o estudo de organismos isolados e cultivados, assim como de organismos em amostras ambientais. Uma sonda consiste em um fragmento marcado de DNA ou RNA complementar à sequência de um gene-alvo de interesse. Sob condições controladas realiza-se a hibridização da sonda com sua sequência alvo. A detecção da sequência depende da natureza do sistema de marcação da sonda, que pode estar ligada a uma enzima ou molécula fluorescente, ou apresentar nucleotídeos marcados radiotivamente (COUTINHO *et al.*, 1999). Nesse caso, a detecção das sondas é respectivamente realizada por meio de microscopia de epifluorescência e autoradiografia (AMANN *et al.*, 1995).

O FISH consiste na determinação de uma sequência alvo do RNAr presente em células morfológicamente intactas, ou seja, a hibridização é feita com a célula íntegra. Portanto, as células podem ser detectadas, visualizadas e quantificadas em seus microhabitats naturais sem a necessidade de cultivá-las (AMANN *et al.*, 1995). Com esta técnica pode-se, então, determinar a morfologia da célula de um organismo não cultivado e a sua abundância, assim como analisar a sua distribuição espacial *in situ* (ARAÚJO, 2001).

O FISH consiste basicamente na realização de quatro etapas, a fixação, hibridização, lavagem e detecção. As etapas de fixação e hibridização são de relevante importância para a técnica (STAHL e AMMAN, 1991). De acordo com esses autores a etapa de fixação é responsável pela manutenção da integridade celular, especificamente da quantidade ribossomal, uma vez que as células passarão por altas temperaturas e concentrações de formamida durante o processo de hibridização. A fixação também é a etapa onde a permeabilização da membrana celular é realizada, facilitando a entrada da sonda no interior da célula, ou seja, permitindo o acesso da sonda ao RNAr 16S complementar. Na etapa de hibridização ocorre a ligação da sonda com a sequência alvo do RNAr 16S. Um aspecto importante desta etapa é a temperatura de hibridização, que é específica para cada sonda. A

temperatura permitirá a dissociação da estrutura secundária da molécula de RNAr, facilitando que o oligonucleotídeo fluorescente ligue-se às bases complementares da cadeia simples de RNAr. Temperaturas abaixo da ideal não permitirão a dissociação e, acima dela, podem levar ao desnaturamento da molécula de RNAr.

Como qualquer outra técnica, o FISH também apresenta limitações. Segundo Amann *et al.* (1995) o limite de detecção de 10^4 células mL^{-1} deve ser considerado, uma vez que populações presentes na amostra abaixo desta concentração não serão detectadas.

A estrutura espacial do ribossomo pode dificultar a acessibilidade da região alvo, que é um local do RNAr, à sonda (FUCHS *et al.*, 2000). Em trabalho desenvolvido por De Long *et al.* (1999) foi verificado que as principais dificuldades na aplicação de sondas de oligonucleotídeos complementares ao RNAr 16S por meio da técnica de FISH em amostras ambientais complexas relacionaram-se com a ligação ou hibridização variável da sonda às diferentes regiões do RNAr alvo, amostra com alta fluorescência de fundo e baixo conteúdo de RNAr, o que ocorre com muitas células encontradas no ambiente natural. Esses autores sugeriram a utilização de sondas maiores (cerca de 100 nucleotídeos) que as normalmente utilizadas no FISH com marcações fluorescente múltiplas para superar este problema. Pode-se também utilizar dupla hibridização numa mesma amostra, ou seja, aplicar duas sondas que reconhecem diferentes regiões do RNAr 16S marcadas com mesmo fluorocromo, aumentando assim a intensidade do sinal fluorescente (RASKIN *et al.*, 1994).

Falsos negativos, falsos positivos e conclusões equivocadas sobre a fisiologia do organismo detectado são problemas possíveis de ocorrerem quando sondas de oligonucleotídeos complementares ao RNAr são utilizadas (RAMSING *et al.* (1996). Segundo esses autores, para minimizar a ocorrência desses problemas, é necessário realizar hibridizações controle, incluindo controle positivo com linhagens de referência e controle

negativo. Além disso, seria mais correto ter dois observadores contando as mesmas amostras separadamente para posterior comparação e avaliação dos resultados.

Bouvier e del Giorgio (2003) observaram que a efetividade da aplicação do FISH foi variável e estava relacionada parcialmente a fatores metodológicos. Neste sentido, os autores destacaram que, como a proporção de células alvo que podem ser detectadas pelo FISH é crucial para avaliações tanto filogenéticas como fisiológicas, é necessário aumentar a sensibilidade do protocolo do FISH, assim como padronizar este protocolo.

Uma consideração importante sobre a técnica do FISH relaciona-se com amostras que contenham arqueias metanogênicas com altos níveis do cofator F_{420} . Este cofator apresenta autofluorescência azul-esverdeada, em comprimento de onda de 420 nm, quando submetido à luz ultravioleta. Neste sentido, ao usar-se uma sonda marcada com fluoresceína (de coloração verde) em amostras deste tipo observadas em microscópio de epifluorescência, as células com cofator F_{420} fluorescem apresentando sinal verde mesmo quando não foi aplicada qualquer sonda (FICKER *et al.*, 1999). Nestes casos, devem-se utilizar apenas sondas marcadas com rodamina (coloração vermelha) e/ou CY3 (coloração laranja).

3.4.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE

Outro método disponível para o estudo de comunidades microbianas complexas é a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Esta técnica tem como características a possibilidade de: - estimar a diversidade microbiana; - analisar a composição e diversidade genética; - identificar os tipos microbianos por meio do sequenciamento posterior da banda obtida; - analisar o perfil da estrutura da comunidade microbiana do ambiente; - acompanhar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema e comparar a diversidade microbiana

de várias amostras no mesmo gel; - analisar um grande número de amostras quando comparada com outras técnicas tal como a clonagem; - focar esforços na busca diferencial de representantes dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*; - testar a pureza de linhagens microbianas; - monitorar o isolamento de microrganismos de amostras ambientais (MUYZER e RAMSING, 1995; SAKAMOTO *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2000; SANZ, 2002).

A técnica da DGGE baseia-se na eletroforese de fragmentos de DNAr 16S amplificados por PCR em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes de DNA (uréia e formamida). Fragmentos de DNA com mesmo comprimento, mas com seqüências de pares de bases diferentes apresentam comportamento eletroforético diferente nestas condições, podendo, então, serem separados (MUYZER *et al.*, 1993). A seqüência de nucleotídeos de um fragmento de DNA definirá a posição no gradiente em que o DNA fita dupla será desnaturado e passará a fita simples, interrompendo sua migração no gel. Uma variação desta técnica, o TGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Térmico) utiliza concentração constante de uréia e formamida, variando a temperatura ao longo do gel. A identificação dos membros das comunidades microbianas pode ser dada pelo seqüenciamento das bandas excisadas ou por hibridização com sondas específicas (MUYZER, 1999). Dessa maneira, é possível determinar a diversidade genética de comunidades microbianas naturais e também identificar filogeneticamente os membros dessas comunidades e relacioná-los com aqueles que possuem o seqüenciamento apresentado nas bases de dados genéticas (SAKAMOTO, 2001), como por exemplo, o RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA; <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) e o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A técnica da DGGE está bem estabelecida como instrumento molecular para o estudo de amostras ambientais, permitindo uma avaliação da complexidade e do comportamento das

comunidades microbianas em grande número de amostras, de maneira rápida, relativamente barata e reproduzível (MUYZER, 1999).

A extração do DNA total de uma amostra seguido de amplificação dos genes do RNAr 16S deve gerar uma mistura de fragmentos de DNA que representa todas as espécies ou as mais abundantes presentes na amostra. O sucesso desse método não depende do estado fisiológico das células em que o DNA foi extraído, mas da lise das células por meio do método de extração empregado. Além disso, todos os genes do RNAr 16S devem estar igualmente acessíveis para a amplificação (ARAÚJO, 2001).

Padrões de bandas de comunidades microbianas com populações variadas e abundantes podem ser complexos e difíceis de analisar (OLIVEIRA, 2000). Nestes casos, o emprego de *primers* grupo-específicos (por exemplo, para arqueias metanogênicas) na PCR pode ser uma estratégia para melhorar o detalhamento de uma comunidade complexa e rastrear especificamente determinados grupos. Neste sentido, pode-se analisar o produto da PCR obtido com *primers* grupo-específicos diretamente via DGGE, ou o DNA de comunidades mistas pode ser amplificado primeiro com *primers* grupo-específicos que incluam uma região do gene para RNAr 16S que sirva para amplificação com *primers* universais. Ao mesmo tempo, o DNA da comunidade pode ser amplificado diretamente com os *primers* universais, permitindo a comparação do padrão de bandas dos constituintes dominantes de um determinado grupo com o padrão obtido para os constituintes dominantes da comunidade (hibridização dos padrões de DGGE com sondas de oligonucleotídeos grupo-específicas).

Os primeiros obstáculos a serem superados na utilização da técnica do DGGE incluem a extração e a purificação dos ácidos nucléicos. A eficiência na lise das células, a purificação e o tamanho dos ácidos nucléicos isolados desempenham um papel importante no sucesso da aplicação desse método (OGRAM, 2000). A qualidade do DNA isolado depende da eficiência

da lise celular, sendo que esta é mais difícil em certos grupos de microrganismos, como algumas arqueias metanogênicas (LANGE e AHRING, 2001). Os métodos que utilizam as amplificações por meio da PCR dependem da pureza das amostras uma vez que a reação em cadeia da polimerase é inibida por contaminantes. O tamanho do DNA extraído também influencia a reação, uma vez que o isolamento de pequenos fragmentos pode aumentar a frequência de formação de quimeras nessas reações.

Para Oliveira (2000) e Sanz (2002) as limitações da técnica incluem: **a)** problemas na extração e amplificação do DNA representativo das populações presentes na comunidade, dependendo do tipo de amostra; **b)** genes ricos em GC são difíceis de serem separados no gel, tornando sua análise complicada; **c)** o método envolve o uso de substâncias tóxicas como a formamida; **d)** algumas linhagens de organismos apresentaram a formação de duas ou mais bandas, sendo que, uma banda verificada no gel de DGGE corresponderia a uma única linhagem de organismo analisado. O que pode ser decorrente da heterogeneidade de sequência dos operons RNAr. Por outro lado, existem exemplos em que comportamentos eletroforéticos semelhantes foram observados entre linhagens proximamente relacionadas ou mesmo entre linhagens filogeneticamente não relacionadas. Isto deve ser considerado quando o número de bandas é usado como uma medida da diversidade; **e)** as relações filogenéticas estabelecidas com a técnica são menos confiáveis quando comparadas com as obtidas com a sequência completa do gene, uma vez que a informação de sequência obtida com o DGGE é limitada, já que a separação de produtos da PCR maiores que 500 pb (pares de bases) é reduzida; **f)** o DGGE não é uma técnica quantitativa, embora alguns autores tenham relatado que a comparação entre a intensidade de bandas no gel permite uma avaliação da abundância relativa, podendo ser utilizada para comparar alterações nas diferentes populações de uma comunidade (STEPHEN *et al.*, 1998 *apud* NICOL *et al.*, ; AKARSUBASI *et al.*, 2005).

3.4.3. Aplicação das técnicas moleculares

As técnicas moleculares estão sendo utilizadas em diversos estudos para determinação de grupos de organismos específicos tanto em ambientes naturais como naqueles construídos, como os sistemas de tratamento de águas residuárias.

Manz *et al.* (1994) caracterizaram a estrutura da comunidade microbiana em dois sistemas de lodos ativados, um tratando esgoto sanitário e o outro, efluente de indústria de laticínios. Neste estudo foi empregada a coloração com DAPI e a hibridização *in situ* com sondas fluorescentes específicas para grupos taxonômicos do domínio *Bacteria*. De acordo com esses autores, a maioria das células presentes em lodos ativados pode ser monitorada por meio da técnica de FISH em contraste com outros métodos, como cultivo ou imunofluorescência. Além disso, os autores concluíram que o uso de sondas fluorescentes é uma ferramenta adequada para avaliar a distribuição espacial e a atividade de microrganismos em lodos ativados.

Bond *et al.* (1999) investigaram as bactérias envolvidas na remoção de fósforo em lodos ativados operados em escala de laboratório. A estrutura da população bacteriana foi analisada por meio do FISH com sondas de oligonucleotídeos complementares às regiões 16S e 23S do RNAr.

Sekiguchi *et al.* (1999) avaliaram a estrutura de grânulos metanogênicos provenientes de reatores UASB operando em temperatura mesofílica e termofílica por meio da técnica do FISH, mostrando que a organização espacial dos microrganismos nos dois tipos de grânulos se dá em camadas. As sondas grupo específicas para os domínios *Archaea* e *Bacteria* utilizadas no estudo mostraram que as bactérias predominaram na camada externa dos grânulos, enquanto as arqueias foram os principais microrganismos presentes nas regiões mais internas.

Trabalho semelhante foi desenvolvido por Díaz *et al.* (2003) que avaliaram qualitativa e quantitativamente a diversidade de microrganismos presentes em bdo granular anaeróbio alimentado com diferentes substratos (formiato, acetato, propionato, sucrose, amido e peptona), assim como investigaram a estrutura dos grânulos. A técnica FISH foi empregada e os autores verificaram que os grânulos apresentavam uma estrutura em camadas, sendo que apenas bactérias estavam presentes nas camadas mais externas e eram, em sua maioria, gram-positivas. Nos grânulos provenientes do reator alimentado com formiato, as bactérias estavam quase que totalmente ausentes. Verificou-se também que a diversidade microbiana tanto de bactérias como de arqueias aumentaram com a complexidade dos substratos.

Araújo *et al.* (2000) utilizaram o FISH para avaliar a comunidade microbiana presente em biofilmes anaeróbios formados em diferentes tipos de materiais suportes hidrofílico (vidro) e hidrofóbico. O FISH foi utilizado pelos autores em conjunto com a microscopia confocal a laser (CLSM) apresentando resultados satisfatórios no acompanhamento do desenvolvimento dos biofilmes.

Watanabe *et al.* (2002) caracterizaram a população de *Archaea* presente em águas subterrâneas contaminadas com óleo. Os autores encontraram grande diversidade de populações de arqueias nas amostras coletadas por meio da técnica do FISH em conjunto com a análise de fragmentos do DNAr 16S, que foram amplificados por PCR utilizando-se oito diferentes combinações de *primers* específicos e universal. Os resultados mostraram que a seleção de *primers* para amplificação deve ser cuidadosa quando se busca o entendimento da diversidade molecular de uma comunidade microbiana.

Etchebehere *et al.* (2000), estudando um reator desnitrificante tratando chorume de aterro sanitário, combinaram técnicas clássicas de estudos microbiológicos (NMP, isolamento e identificação) com ensaios de atividade desnitrificante e análise de RNAr 16S. Os autores verificaram que os microrganismos isolados representaram uma pequena fração da população

desnitrificante presente no ecossistema, o que foi avaliado pelas medidas de atividade desnitrificante e pela análise do RNAr 16S. A conclusão a que chegaram foi que a combinação de ferramentas moleculares e medidas de atividade específica permitiram uma visão mais realista da população desnitrificante presente no reator.

Yu e Mohn (2001) examinaram as diferenças espaciais e temporais na estrutura de uma lagoa aerada com regime hidráulico pistonado no tratamento de efluentes de indústria de papel. Os gradientes físico-químicos ao longo da lagoa foram comparados com a estrutura da comunidade microbiana no espaço e no tempo por meio de um método composto baseado na análise do produto da PCR de espaçadores intergênicos ribossomais e de seqüências do DNAr 16S parcial ligado aos espaçadores intergênicos. Os autores puderam verificar sucessão espacial na comunidade microbiana, sendo que a diversidade e abundância dos organismos aumentavam da entrada para a saída da lagoa. Verificaram também diferenças na estrutura da comunidade dependendo do período de coleta, se no inverno ou no verão. A variação temporal na estrutura da comunidade foi mais elevada que a variação espacial.

Collins *et al.* (2003) combinaram as técnicas de sequenciamento de genes do RNAr 16S com a caracterização de comunidades pela técnica do polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) e ensaios de atividade metanogênica a fim de investigar a comunidade microbiana de um lodo anaeróbio mesofílico utilizado para tratar esgoto sintético em condições psicrófilas. Com a utilização dessas técnicas em conjunto, os autores puderam identificar modificações na microbiota do reator (reduzida granulação com predominância da *Methanosarcina* sp.) quando ocorreu queda na eficiência do mesmo, evidenciando a correspondência entre as técnicas moleculares empregadas e o teste de AME.

Nicol *et al.* (2003) compararam a comunidade de *Archaea* em pastagens naturais e manejadas por meio do DGGE. A partir deste estudo, os autores puderam concluir que o

manejo dos solos para pastagem favoreceu o crescimento de arqueias do grupo *Euryarchaeota* (ou seja, microrganismos metanogênicos) quando comparado com a pastagem natural, em cujo solo foram detectadas apenas arqueias *Crenarchaeota* (não metanogênicas).

Keyser *et al.* (2004) estudaram diferentes grânulos de reator UASB tratando efluente de destilaria, cervejaria, indústria de vinho e indústria de processamento de frutas. O padrão de bandas do DGGE desses grânulos provenientes de quatro diferentes reatores foi comparado e verificou-se que os grânulos apresentaram padrões distintos, levando à conclusão de que a composição do efluente representa o maior impacto sob as espécies presentes nos grânulos. Os fragmentos amplificados na PCR foram também seqüenciados e comparados com as seqüências conhecidas presentes no GenBank, a partir do qual foi possível identificar alguns gêneros bacterianos presentes nos grânulos.

Banning *et al.* (2005) investigaram a estrutura da população do sedimento de um lago salobro ligado ao estuário Beaulieu (Hampshire, UK) combinando medidas de atividade metanogênica e análise do RNAr 16S utilizando *primers* específicos para as metanogênicas e específico para o domínio *Archaea*. Os autores puderam concluir que a população metanogênica era dominada por hidrogenotróficas da ordem *Methanomicrobiales*, embora as metanogênicas acetotróficas também estivessem presentes.

Kleikemper *et al.* (2005) avaliaram a atividade e diversidade de microrganismos metanogênicos em um aquífero contaminado com PHC utilizando técnicas moleculares DGGE e FISH combinadas com ensaios de atividade potencial dos microrganismos.

Uma consideração importante a ser feita sobre os métodos moleculares refere-se ao protocolo utilizado em cada método. Na medida em que a eficiência das técnicas moleculares permite análises comparativas entre comunidades microbianas, deve-se priorizar a padronização dos métodos de processamento das amostras. Qualquer diferença observada

entre os padrões dessas comunidades será atribuída a diferenças na estrutura gênica das mesmas e não a diferentes formas de preparação das amostras (MARSH *et al.*, 2000).

3.5. Técnicas de microscopia

Os estudos microscópicos geralmente constituem o primeiro passo na análise de uma nova amostra, gerando dados essenciais, embora parciais, sobre os microrganismos presentes. A maioria dos autores considera que as descrições sobre a microbiota de um novo ambiente devem incluir dados visuais que descrevam a forma e o tamanho dos organismos presentes. Com este intuito, a microscopia ótica comum ou de contraste de fase constituem-se excelentes ferramentas. Em adição, as microscopias eletrônicas de varredura ou a de transmissão são utilizadas a fim de se obter imagens mais detalhadas e no estudo de características da superfície microbiana ou detalhes internos (SPROTT e BEVERIDGE, 1993).

Algumas *Archaea* metanogênicas, notadamente as pertencentes aos gêneros *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e *Methanospirillum* sp. têm morfologias suficientemente distintas para que possam ser identificadas por microscopia de contraste de fase, embora essa identificação deva ser sempre corroborada por meio de outros métodos. A microscopia de epifluorescência é um método bastante útil no estudo da ecologia metanogênica (ZINDER, 1993). Muitas arqueias metanogênicas possuem altas concentrações de F₄₂₀, que é um cofator envolvido na cadeia de transporte de elétrons e que apresenta autofluorescência sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 420nm (DODDEMA e VOGELS, 1978¹⁰, *apud* ZINDER, 1993). Esta técnica tem sido amplamente utilizada na identificação de metanogênicas, embora apresente algumas limitações relacionadas ao

¹⁰ DODDEMA, H.J.; VOGELS, G.D. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied Environmental Microbiology*, v. 36, n. 7, p. 752-754, 1978.

conteúdo variável de F₄₂₀ dependendo da espécie e das condições de crescimento, o que pode prejudicar a visualização dos microrganismos quando em baixas concentrações (GORRIS e van der DRIFT¹¹, 1986 *apud* ZINDER, 1993). O gênero *Methanosaeta* sp., por exemplo, geralmente não apresenta concentrações suficientes para autofluorescência.

O estudo microscópico inicial é também relevante para avaliações mais aprofundadas das amostras por meio de técnicas moleculares, na medida em que as morfologias observadas microscopicamente podem orientar a escolha das sondas a serem utilizadas nos métodos em biologia molecular para amostras provenientes de ambientes microbiologicamente ainda pouco conhecidos.

Se para as arqueias e bactérias a microscopia não é um exame que leve a dados conclusivos sobre o tipo de microrganismo presente em determinada amostra, o mesmo não ocorre para aqueles que apresentam maior tamanho, como é o caso dos protozoários. Estes podem ser, não só quantificados, como também identificados em amostras “a fresco”, por meio da observação, em microscopia óptica comum, do tipo de movimento, presença de vacúolos contráteis, tricocistos (estruturas ovais ou em forma de bastonetes que atuam como defesa), algas simbiontes, grânulos presentes, entre outras características (SELEGHIM, 2001). Para complementar esse tipo de análise, as amostras podem ser fixadas e coradas com DAPI para observação, em microscopia de epifluorescência, do macro e micronúcleo de ciliados (FOISSNER, 1996).

¹¹ GORRIS, L.G.M.; van der DRIFT, C. Methanogenic cofactors in pure cultures of methanogens in relation to substrate utilization. In: DUBOURGIER, H.C. *et al.* (eds.). **Biology of anaerobic bacteria**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1986. p. 144-150.

*Ajuntando novas pedras
e construindo novos poemas.
Recria tua vida, sempre, sempre.
Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.
(Cora Coralina)*

4. MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 1 na próxima página representa um esquema geral das coletas e ensaios realizados neste estudo. Foram realizadas três coletas no sedimento da Lagoa Anaeróbia. Uma delas foi considerada preliminar, realizada em 03/10/2003 com o intuito de conhecer a área de estudo, avaliar a melhor forma de amostragem, determinar os pontos representativos da lagoa visando uma coleta com o menor número de amostragens possível. Essa escolha buscou privilegiar o estudo com um maior número de réplicas, a fim de estabelecer protocolos seguros para os ensaios de medidas da atividade microbiana metanogênica. A segunda e a terceira coletas, respectivamente realizadas em 20/10/04 e 16/12/04, foram as consideradas ideais para o estudo sobre a diversidade funcional microbiana anaeróbia.

Figura 1. Esquema geral do estudo desenvolvido na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.

4.1. Área de estudo

A Lagoa Anaeróbia objeto do estudo deste trabalho constitui o sistema de tratamento de esgotos sanitários do Município de Cajati, localizado na região da Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, Estado de São Paulo.

A Bacia do Rio Ribeira de Iguape situa-se entre as latitudes 23°30' e 25°30' S e longitudes 46°50' e 50°00' W, abrangendo uma área de 24.980 km², dos quais 61% pertencem ao Estado de São Paulo e 39% ao Estado do Paraná, constituindo uma das regiões de menor desenvolvimento econômico em relação aos dois estados (CALIJURI *et. al*, 2002).

O clima da região, segundo Classificação de Köppen, é do tipo Cfa, subtropical úmido com verão quente. Os períodos mais chuvosos ocorrem entre novembro e abril, concentrando as maiores precipitações nos meses de janeiro/fevereiro (CETEC, 2000).

O município de Cajati possui área de 454,92 km². A sede do município localiza-se nas coordenadas 24°43'39" S e 48°07'30" W, sendo a população estimada em 32.724 habitantes, com aproximadamente 72% residente na área urbana (IBGE, 2005).

4.2 Descrição do sistema de tratamento de esgoto

Em Cajati, 67% do esgoto doméstico é coletado e 90% tratado na Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários (ETE-Cajati) do município. A ETE-Cajati é constituída por uma caixa de areia, uma calha Parshall seguida do sistema de lagoas sequenciais, sendo uma lagoa anaeróbia seguida por uma facultativa (Figuras 2 e 3). O efluente da estação é lançado no Rio Jacupiranguinha (Classe 2, de acordo com CETEC 2000). Os parâmetros operacionais do processo e suas características foram obtidos junto a Sabesp da região do Município de Registro (Unidade de Negócio Vale do Ribeira), unidade responsável pela ETE-Cajati. De relevância para presente tese de doutorado, encontram-se na Tabela 2 os dados técnicos de

projeto e condições de operação da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, cujo início de funcionamento se deu no ano de 2002.

Tabela 2. Características da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati e parâmetros de projeto do sistema.

Dimensões (m) (L:W): Nível da passarela	154,51 x 56,31
Nível do líquido	158,51 x 50,31
Nível do fundo	140,68 x 33,09
Altura da lâmina d'água (m)	4
Volume útil (m ³)	25.886,00
Capacidade de tratamento instalada (m ³ d ⁻¹)	17.257,33
Vazão de projeto (m ³ d ⁻¹)	4.681,15
DBO de projeto (mg L ⁻¹)	300,00
Carga orgânica afluyente (g DBO m ⁻³ d ⁻¹)	55,88
TDH (d)	5,5

Fonte: Dados fornecidos pela SABESP de Registro – Unidade de Negócio Vale do Ribeira.

À época das coletas, o fluxo de entrada do afluyente (esgoto sanitário) na Lagoa Anaeróbia ocorria em pulsos, e em três pontos; a saída do efluente se dava em dois pontos.

4.3 Caracterização do esgoto do município

Os valores das determinações físico-químicas do esgoto do Município de Cajati foram obtidos junto aos laboratórios da Sabesp de Registro – Unidade de Negócio Vale do Ribeira, nos meses de outubro/2003, março/2004, maio/2004, agosto/2004 e em novembro/2004. As coletas foram feitas pelo técnico Júlio C. de Moraes e analisadas pelo técnico Ivon João Villanova, ambos sob gerência do Engenheiro responsável Osvaldo Beltrame Filho, da Divisão de Controle Sanitário.

Figura 2. (a) Vista aérea da ETE do município de Cajati; (b) Sistema de gradeamento e calha Parshal; (c) Entrada da Lagoa Anaeróbia; (d) Entrada do afluente na Lagoa Anaeróbia em três pontos; (e) Vista geral da Lagoa Anaeróbia; (f) Saída do efluente da Lagoa Anaeróbia em dois pontos; (g) Entrada do efluente da Lagoa Anaeróbia na Lagoa Facultativa; (h) Tanque por onde passa o efluente da Lagoa Facultativa antes do lançamento no Rio Jacupiranguinha.

Figura 3. (a) D. Detalhe do lançamento do efluente do sistema no Tanque de cloração - nota-se claramente a presença de grande quantidade de algas, gerando a intensa coloração verde; (b) Saída do Tanque de Cloração; (c) e (d). Ponto de lançamento do efluente do sistema no Rio Jacupiranguinha (seta em vermelho).

4.4 Operação e monitoramento do sistema

O sistema de lagoas da ETE de Cajati - SP está em operação desde agosto de 2002. Desde então, tanto a operação, como o monitoramento do sistema pelas análises físico-químicas foram realizadas pela SABESP. Os dados das análises físico-químicas foram utilizados neste trabalho para complementar e subsidiar as informações sobre o processo microbiano anaeróbio.

4.5 Amostragem

Como descrito na Figura 1, as amostragens ocorreram em três períodos diferentes. Para cada amostragem, considerou-se o desenho mostrado no esquema da Figura 4, no qual observa-se a lagoa dividida em três regiões, a de entrada do afluente, a central e a de saída do efluente. Em cada uma dessas regiões, coletaram-se amostras do sedimento em três pontos

equidistantes, totalizando 9 pontos de amostragem, a saber: um ponto central, um à direita e um à esquerda em relação ao fluxo de entrada do afluente na lagoa. A localização dos pontos nas diferentes regiões foi determinada em função das dimensões da lagoa (Tabela 2), mantendo-se três metros de distância do fim do talude no fundo da lagoa.

Figura 4. Universo amostral: distribuição dos pontos de coleta no sedimento da Lagoa Anaeróbia.

De acordo com a região da lagoa e o ponto de amostragem em relação ao fluxo de entrada do afluente na lagoa, estabeleceu-se a seguinte nomenclatura para os pontos de coleta:

- EptE** – região de entrada da lagoa no ponto da esquerda em relação ao fluxo;
- EptC** - região de entrada da lagoa no ponto do centro em relação ao fluxo;
- EptD** - região de entrada da lagoa no ponto da direita em relação ao fluxo;
- CptE** – região central da lagoa no ponto da esquerda em relação ao fluxo;
- CptC** – região central da lagoa no ponto do centro em relação ao fluxo;
- CptD** – região central da lagoa no ponto do centro em relação ao fluxo;
- SptE** – região de saída da lagoa no ponto da esquerda em relação ao fluxo;
- SptC** - região de saída da lagoa no ponto do centro em relação ao fluxo;
- SptD** – região de saída da lagoa no ponto do centro em relação ao fluxo;

As coletas foram realizadas no sedimento da lagoa em todos os pontos indicados na Figura 4, e foram coletadas com o auxílio de um coletor automático de amostras da marca ISCO (Figura 5). Empregaram-se frascos de plástico pertencentes ao próprio coletor para a coleta e o transporte das amostras, que foram mantidas em banho de gelo e preservadas sob refrigeração a 4°C até o momento de uso.

Figura 5. (a) Coletor automático de amostras; (b) Painel de controle do coletor automático de amostras.

Foram realizadas as seguintes determinações físico-químicas no momento das coletas: temperatura (°C), condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), pH e potencial de óxido-redução (apenas nas coletas de outubro e dezembro/2004). As determinações foram feitas com a sonda da marca Yellow Springer, modelo 556-MPS. Na coleta preliminar, bem como na de outubro de 2004, as determinações físico-químicas foram feitas no sedimento e ao longo da coluna d'água em diversas profundidades. Na coleta de dezembro de 2004, as determinações foram feitas apenas no sedimento. Realizou-se também ensaios de batimetria na Lagoa Anaeróbia nas coletas preliminar e de dezembro/2004.

4.6 Análises físico-químicas realizadas no laboratório

Todas as amostras de sedimento das três coletas foram processadas para caracterização do seu conteúdo de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SV). As análises foram

realizadas segundo o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995).

4.7. Exames microscópicos

4.7.1. Exames de procariontes

Os exames microscópicos foram realizados por meio de microscopia óptica comum, de contraste de fase e epifluorescência utilizando Microscópio Leica DM LB, equipado com lâmpada de mercúrio OSRAM-HBO 100 W/2 e acoplado a câmara com captura de imagem e software Image-Pro Plus. O filtro utilizado foi o Filtro azul A4. Alíquotas das amostras de sedimento foram colocadas entre lâmina e lamínula, utilizando-se a técnica de preparação de lâmina descrita pela DSM (1991) *apud* VAZOLLER (1995). Uma solução de ágar liquefeito a 2% era disposta na superfície da lâmina; após a solidificação do mesmo, derramava-se a amostra sobre a superfície do ágar e cobria-se com lamínula. Esta técnica possibilita que o excesso de água da amostra seja absorvido pela gelatina, otimizando a qualidade da observação.

Foram examinadas no microscópio amostras de sedimento de todas as coletas e de todos os pontos amostrados, além de alíquotas retiradas de cada frasco-reator ao final de cada ensaio de atividade metanogênica específica (AME).

4.7.2. Exames e contagem de protozoários, rotíferos, microalgas e cianobactérias sob microscopia óptica comum.

Amostras do sedimento provenientes dos 9 pontos amostrados nas coletas de outubro e dezembro/2004 foram fixadas e coradas no momento da coleta para contagem de protozoários, rotíferos e algas. A fixação e coloração foram realizadas, respectivamente, com

uma solução saturada de HgCl_2 e Azul de Bromofenol 0,04%. Para cada 100 mL de amostra de sedimento foi utilizado 4,3 mL de fixador e 4 gotas de corante. Foram coletados, em triplicata, 200 mL de amostra de sedimento para cada ponto de coleta (SELEGHIM, 2001).

A contagem foi realizada nas amostras de sedimento já fixadas durante a coleta. Para proceder à observação dos microrganismos (Microscópio Leica DM LB; luz comum), cada amostra de sedimento foi deixada em repouso para sedimentação. A seguir, o sobrenadante era descartado para a concentração das amostras. O volume restante era homogeneizado para contagem em câmaras de Sedgwick-Rafter (tréplicas) sob aumento de 100x. Para cada uma das três réplicas de sedimento coletadas, em cada um dos pontos da lagoa, foram contados todos os campos de três câmaras. Isto significa que o resultado da contagem é produto do número de organismos encontrados em cada um dos 100 campos de cada uma das três câmaras contadas para cada uma das três réplicas de cada ponto, totalizando 900 campos contados para cada amostra. A metodologia utilizada baseou-se naquela descrita em Seleghim (2001).

A identificação dos gêneros foi feita com base em chaves de identificação para protozoários (FOISSNER e BERGER, 1996), cianobactérias (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1999) e clorofíceas (KOMÁREK e FOTT, 1983).

4.8. Determinação da atividade metanogênica específica (AME).

A avaliação da atividade metanogênica específica (AME) foi realizada com base nas metodologias descritas por Dubourguier (1989) *apud* VAZOLLER (1989) e Chernicharo (1997), como detalhadamente descrito nos itens 4.8.1. a 4.8.4.

Esta análise consistiu na determinação periódica por cromatografia gasosa da concentração de metano presente no biogás produzido no volume livre de frascos-reatores (headspace), e na determinação da concentração de ácidos orgânicos voláteis após a adição de

substratos fornecidos como fontes de carbono. Sua finalidade foi avaliar o potencial da biomassa, medida como SV, na conversão de substratos introduzidos no meio (fontes de carbono na forma de ácidos orgânicos voláteis) em metano e gás carbônico.

4.8.1. Descrição do método de AME.

Para a realização do ensaio de atividade metanogênica específica (AME) foram utilizados frascos-reatores de 100 ou 1000 mL dependendo do ensaio, como será exposto nos itens 4.8.5, 4.8.6 e 4.8.7. Para cada amostra e cada ensaio foram preparados como controles. frascos-reatores sem a adição das fontes. Antes do acréscimo das fontes de carbono, promovia-se o esgotamento da matéria orgânica presente na própria amostra. Para isso os frascos eram mantidos incubados nas condições de ensaio, e a produção de metano era monitorada até a sua estabilização. Os passos de a a s correspondem a descrição dos procedimentos para os ensaios de AME, sendo que as etapas de a a i correspondem aos procedimentos para esgotamento da matéria orgânica. Assim:

- a. Determinava-se a quantidade de SV nas amostras antes do início do ensaio;
- b. Pesavam-se os frascos totalmente preenchidos com água e fechados;
- c. Adicionava-se, sob fluxo de N₂, a quantidade pré-determinada da amostra (60 ou 600 mL) em cada frasco-reator;
- d. Fluxionava-se nitrogênio 100% puro por 5 minutos no espaço livre de cada frasco-reator;
- e. Fechavam-se os frascos com tampa e lacre de alumínio nos ensaios com frascos-reatores de 100 mL, e com tampa de borracha e rosca nos ensaios com frascos-reatores de 1000 mL;
- f. Iniciou-se imediatamente o acompanhamento da produção de metano com retirada de amostra para cromatografia gasosa (ver procedimentos em h);

- g. Após a primeira amostragem, os frascos-reactores eram levados para incubação em câmara Fanen modelo 347 CDG a 30°C; após o que, analisava-se diariamente o gás contido no *headspace*;
- h. Antes de cada amostragem para análise cromatográfica, a atmosfera gasosa era homogeneizada (homogeneização do *headspace*) retirando-se e introduzindo-se o gás produzido no frasco com auxílio de uma seringa por cerca de dez vezes; a seringa utilizada era a mesma empregada para a injeção no cromatógrafo, possuindo trava de pressão, que mantém o gás na seringa com a mesma pressão do frasco; após a homogeneização do *headspace*, retirava-se a amostra final para cromatografia gasosa;
- i. Monitorava-se a produção de metano até sua estabilização;
- j. Após a estabilização da produção de metano determinava-se novamente o conteúdo de SV de cada amostra; este procedimento foi realizado apenas nos ensaios com as amostras da coleta de Outubro e Dezembro/2004. Para os ensaios com frascos-reactores de 100 mL, eram mantidos nas condições do ensaio três frascos a mais de cada amostra para determinação do SV, utilizando-se todo o seu conteúdo. Para os frascos-reactores de 1000 mL, retirava-se uma alíquota de 100 mL de cada frasco-reactor para determinação do SV;
- k. Os frascos-reactores eram abertos sob fluxo de N₂ ou de uma mistura padrão 30/70% de CO₂/N₂ (apenas para o ensaio com frascos-reactores de 1000 mL);
- l. Sob o fluxo, adicionavam-se as fontes de carbono na relação desejada e 0,1 mL por cada 10 mL de amostra das soluções de minerais e vitaminas, descritas nas Tabelas 3 e 4 respectivamente;
- m. Os frascos-reactores eram novamente pesados;
- n. Determinava-se o *headspace* de cada frasco-reactor da seguinte forma:

$\text{volume livre} = \text{massa do frasco cheio com água} - \text{massa do frasco com amostra e fontes}$

Tabela 3. Solução de metais traço Biota.

Componente	Quantidade	Ordem de adição no preparo da solução
Ácido nitriloacético (NTA)*	1,5g	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g	2
MgSO ₄	1,0 g	3
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5g	4
Na ₂ MoO ₄	0,28g	5
Na ₂ WO ₂ .2 H ₂ O	0,165g	6
Na ₂ SeO ₃	0,15g	7
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,1g	8
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1g	9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1g	10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01g	11
AlK (SO ₄) ₂	0,02g	12
H ₃ BO ₃	0,01g	13
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL	14

Fonte: Saia (2005).

Tabela 4. Composição da solução de vitaminas.

Componente	Quantidade	Ordem de adição no preparo da solução
Biotina	0,002 g	1
Ácido fólico	0,002 g	2
Tiamina.HCl	0,005 g	3
Riboflavina	0,005 g	4
Ácido nicotínico	0,005 g	5
Pantotenato de cálcio	0,005 g	6
Piridoxina.HCl	0,010 g	7
Vitamina B ₁₂	0,0001 g	8
*Ácido lipóico	0,005 g	9
*Ácido-p-aminobenzóico	0,005g	10
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL	11

Fonte: Widdel e Pfennig (1984); Touzel e Albagnac (1983) *apud* Vazoller (1995);*para BRS.

- o. Após a adição das fontes orgânicas e pesagem dos frascos, iniciava-se imediatamente o acompanhamento da produção de metano e do dióxido de carbono, bem como do consumo de ácidos voláteis também por cromatografia gasosa; a primeira amostragem era considerada como o tempo zero do ensaio;
- p. Após a primeira amostragem, os frascos-reatores eram incubados e amostrados como descrito em g e h; a periodicidade de amostragem do gás no *headspace*, bem como dos ácidos voláteis no meio líquido (apenas para o ensaio com frascos-reatores de 1000 mL) foi de 4 horas;
- q. O conteúdo líquido de cada frasco-reator era homogeneizado manualmente antes e após a coleta do biogás e da alíquota para determinação dos ácidos voláteis;
- r. Obtidos os cromatogramas, calculava-se a composição dos gases metano e dióxido de carbono e a concentração dos ácidos acético, butírico, propiônico, fórmico e iso-valérico a partir de curvas de calibração (Apêndice D);
- s. Ao final do ensaio determinava-se novamente o teor de SV em cada frasco-reator.

A produção do gás metano e a avaliação do dióxido de carbono foram monitoradas por cromatógrafo de fase gasosa da marca Gow-Mac, equipado com as colunas Porapak-Q (de análise) e Porapak-T (de referência), e detector de condutividade térmica. O gás de arraste utilizado foi o H₂ e a temperatura do forno era mantida em 50°C. As amostras foram retiradas dos frascos-reatores por meio de seringa com trava de pressão e analisadas

Para a determinação dos ácidos voláteis, retiravam-se 3 mL da fase líquida dos frascos-reatores de 1000 mL. A essas alíquotas adicionavam-se 50 µL de NaOH 2M para armazenamento em freezer. O teor dos ácidos orgânicos voláteis foi determinado como descrito por Moraes *et al.* (2000), consistindo na filtração das amostras antes da injeção no HPLC. As amostras foram analisadas em Sistema Shimadzu para HPLC, equipado com

bomba LC-10AD_{VP}, válvula solenóide FCV-10AL_{VP}, detector de UV com arranjo de diodos SPD-M10A e uma unidade controladora SCL-10A_{VP}. A coluna utilizada foi a Aminex HPX-87N- 300 x 7,8 mm. As condições de análise utilizadas foram: eluente = solução de H₂SO₄ 0,005M; fluxo = 0,5 mL min⁻¹; temperatura do forno: 45°C; volume do loop = 100 µL.

4.8.2. Curvas de calibração do metano e do dióxido de carbono

A curva de calibração do metano foi estabelecida para que as áreas obtidas no cromatograma fossem convertidas para valores em massa do gás (mmoles CH₄). Para tanto, foram injetados diferentes volumes (0,005 a 0,5 mL) de metano 100% puro, e por meio da equação geral dos gases ($PV = nRT$) encontrou-se a concentração em mmoles de metano para cada volume injetado. Desta forma, pôde-se estabelecer uma relação entre área cromatográfica e quantidade de metano. A partir desses dados, traçou-se um gráfico de áreas de metano em função da quantidade de metano em mmoles. Ajustando-se esses pontos pelo método da regressão linear, obteve-se uma equação da reta ($y = ax+b$), que foi utilizada para a conversão dos dados.

Para este trabalho determinou-se duas retas padrão (gráficos no Apêndice D) a partir dos volumes injetados de metano e as médias das áreas cromatográficas de cinco injeções. As quantidades de metano abrangidas pela primeira reta padrão foram de 0,0002 a 0,0246 mmoles de CH₄. A equação da reta obtida foi:

$$\begin{aligned}x &= (y + 246,63) / 443663 \\R^2 &= 0,9988\end{aligned}\tag{1}$$

A segunda reta padrão englobou as quantidades de metano de 0,0005 a 0,0243 mmoles de CH₄ e foi representada pela equação da reta:

$$\begin{aligned}x &= (y + 407,86) / 476827 \\R^2 &= 0,9992\end{aligned}\tag{2}$$

Para determinação da reta padrão do CO₂, utilizou-se o mesmo procedimento do CH₄.

A reta obtida foi:

$$\begin{aligned} x &= (y + 2874,7208) / 2324660 \\ R^2 &= 0,9998 \end{aligned} \quad (3)$$

4.8.3. Cálculo da atividade metanogênica específica - AME

O método utilizado para o cálculo da AME foi o mesmo empregado por Araújo (1995), Oliveira (1997) e Steil (2001). Os valores da atividade foram obtidos por meio dos passos descritos a seguir.

- a. Corrigiram-se os dados da área de metano obtidos no cromatograma pelo método da resposta térmica relativa (RTR), que para o metano é 36, conforme equação dada por Ciola, 1985:

$$\frac{\text{Área de metano}}{RTR (36)} \quad (4)$$

- b. Os valores das áreas de metano obtidas foram convertidos por meio da equação da reta padrão a mmoles de CH₄;
- c. Os valores de metano obtidos para 0,5 mL (volume retirado para a amostragem) foram convertidos para o *headspace* de cada frasco a partir da seguinte equação:

$$[CH_4] \text{ no headspace (mmol)} = \frac{[CH_4] \text{ na amostra} * \text{volume do headspace}}{\text{volume de amostragem}(0,5\text{mL})} \quad (5)$$

- d. As concentrações de metano (em mmoles) foram acumuladas da seguinte forma:
 - No tempo 0, a concentração de metano era aquela obtida no *headspace* do frasco nesse tempo;

- No tempo 1, a concentração de metano era aquela obtida no *headspace* do frasco, nesse tempo, mais a concentração de metano obtida no tempo anterior (zero);
 - No tempo 2, a concentração de metano era aquela obtida no *headspace* do frasco, nesse tempo, mais a concentração de metano obtida no tempo 0, e no tempo 1. E assim sucessivamente;
- e. Traçou-se uma curva com os valores de produção de metano em função do tempo. A partir desta curva determinavam-se os pontos (no mínimo quatro) que correspondiam à fase de maior produção de metano. Estes dados foram então ajustados por meio do método de regressão linear. O coeficiente angular da reta representou a atividade metanogênica. Dividindo-se este valor pela concentração de biomassa de cada frasco-reator (g SV), obteve-se a atividade metanogênica específica aparente.
- f. Como valor da biomassa utilizou-se os teores de SV determinado no início (após o esgotamento da matéria orgânica) e no final do ensaio; assim como a média entre SV_{inicial} e SV_{final} a fim de observar o comportamento do valor final de AME em função do valor escolhido do conteúdo de SV;
- g. A AME real de cada frasco-reator foi obtida subtraindo-se o valor de AME do controle dos valores de AMEs obtidos com a adição das fontes orgânicas.

Para determinação da concentração de CO_2 no *headspace* dos frascos-reatores, os procedimentos descritos foram os mesmos descritos nos itens a a d, modificando-se apenas o valor de RTR, que para o CO_2 é 40 (CIOLA, 1985).

4.8.4 Cálculo para determinação da produção teórica de metano

Foi calculada a produção teórica de metano a partir das fontes orgânicas adicionadas em cada frasco-reator com base nas equações descritas em Chernicharo (1997):

$$V_{CH_4} = \frac{DQO_{CH_4}}{k(T)} \quad (6)$$

Em que:

V_{CH_4} = volume de metano produzido (L)

DQO_{CH_4} = carga de DQO correspondente a cada ácido orgânico adicionado no frasco-reator correspondente (g DQO)¹²

$K(t)$ = fator de correção para a temperatura operacional do reator (g DQO L⁻¹)

Para calcular o valor de $K(t)$, utilizou-se a equação:

$$K(t) = \frac{P * K}{R * (273 + t)} \quad (7)$$

Em que:

P = pressão atmosférica (1 atm)

K = DQO correspondente a um mmol de CH₄ (64 g DQO mol⁻¹)

R = constante dos gases (0,08206 atm.L (mol.°K)⁻¹)

¹² Nesta variável da fórmula é importante levar em conta no momento da análise dos resultados que parte da DQO de ácido orgânico adicionado ao frasco-reator é convertida em biomassa microbiana e não totalmente

4.8.5. AME das amostras de sedimento da coleta preliminar - Outubro/2003.

As amostras de sedimento provenientes da coleta preliminar foram submetidas ao teste de AME adicionando-se 60 mL de cada amostra em frascos-reatores de 100 mL, sob fluxo de nitrogênio. Os objetivos dos testes com as amostras da coleta preliminar forma avaliar a influência da m.o. degradável presente na amostra sobre o ensaio de AME, determinar a melhor relação S_0/X_0 para o ensaio, assim como determinar os pontos da lagoa com maior AME.

Antes da adição das fontes orgânicas, os frascos-reatores com as amostras foram deixados nas mesmas condições de incubação do ensaio de AME para que a matéria orgânica remanescente da própria amostra de sedimento fosse consumida até sua estabilização (esgotamento da matéria orgânica) e não interferisse nos resultados finais de AME. O acompanhamento do esgotamento da matéria orgânica foi feito por meio da determinação diária da produção de metano no headspace dos frasco-reatores.

Inicialmente, utilizou-se como fonte de carbono o ácido acético na relação substrato/microrganismo (S_0/X_0) de $0,25 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inicial}}$ para avaliar a AME de todos os pontos de coleta. Posteriormente, a amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto do centro (SptC) foi submetida ao ensaio utilizando-se os ácidos acético, propiônico, butírico e fórmico introduzidos individualmente em cada sistema reacional nas relações 0,25 e 0,5 $\text{g DQO g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inicial}}$. A amostra SptC foi a escolhida para o aprofundamento dos estudos nessa fase pois apresentava o teor mais elevado de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ e buscava-se avaliar a influência da determinação da biomassa como SV no ensaio de AME.

Buscou-se determinar a melhor relação substrato/microrganismo (S_0/X_0) com base no trabalho de Steil (2000), que empregou as relações S_0/X_0 de 0,25; 0,5; 0,75; e 1,0 $\text{g DQO g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inicial}}$. Nesse ensaio decidiu-se utilizar as relações 0,25 e

0,5 g DQO g⁻¹ SV_{inicial}, já que no trabalho citado a melhor relação encontrada foi a de 0,25 g DQO g⁻¹ SV_{inicial}. Nesta etapa foi determinada apenas a produção de metano. A relação 0,5 g DQO g⁻¹ SV_{inicial} foi testada na segunda alimentação.

A amostra SptC foi também submetida a um ensaio comparativo para a determinação da AME com amostras após o esgotamento da matéria orgânica presente na própria amostra de sedimento e sem esse procedimento. A amostra SptC foi selecionada para esse estudo por apresentar valores mais elevados de SV e DQO, bem como considerando-se que na região de origem da amostra as atividades microbianas seriam mais intensas.

A Tabela 5 apresenta a descrição dos ensaios de AME efetuados com as amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD de Outubro de 2003. Na Tabela 6 descrevem-se os diferentes ensaios efetuados com a amostra SptC da Lagoa Anaeróbia. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.8.6. AME das amostras de sedimento da coleta - Outubro/2004.

Todas as amostras de sedimento provenientes desta coleta foram também submetidas ao ensaio de AME após esgotamento da matéria orgânica remanescente do resíduo. Para isso, adicionou-se 60 mL de cada amostra em frascos-reatores de 100 mL sob fluxo de nitrogênio. Posteriormente, eram adicionadas as fontes de carbono nos frascos-reatores para realização do teste. As fontes testadas foram os ácidos acético, propiônico, butírico e fórmico introduzidos individualmente em cada sistema reacional apenas na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV_{iniciais}. O ensaio foi realizado em triplicata.

Tabela 5. Descrição dos ensaios de AME realizados com as amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia - Outubro/2003.

Ensaio	Descrição
EptE _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região de entrada da lagoa, ponto da esquerda em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
EptC _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região de entrada da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
EptD _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região de entrada da lagoa, ponto da direita em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
CptE _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto da esquerda em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
CptC _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
CptD _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto da direita em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
SptE _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto da esquerda em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
SptD _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto da direita em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
SptC _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.

M.O. = matéria orgânica; HAc = ácido acético.

Tabela 6. Descrição dos ensaios de AME realizados com a amostra SptC da Lagoa Anaeróbia - Outubro/2003.

Ensaio	Descrição
SptC _{0,5HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,5 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
SptCo _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo na qual adicionou-se 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc sem promover o esgotamento da matéria orgânica.
SptC _{0,25HBu}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HBu.
SptC _{0,25HPr}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa armazenada, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HPr.
SptC _{0,25HFor}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HFor.
SptC _{0,5HBu}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,5 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HBu.
SptC _{0,5HPr}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,5 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HPr.
SptC _{0,5HFor}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída da lagoa armazenada por cerca de 20 dias em geladeira, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,5 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HFor.

M.O. = matéria orgânica; HAc = ácido acético; HBu = ácido butírico; HPr = ácido propiônico; For = ácido fórmico.

4.8.7. AME das amostras de sedimento da coleta - Dezembro/2004

Estes ensaios foram divididos em três grupos experimentais. No primeiro, buscou-se determinar a melhor relação S_0/X_0 ao se utilizar como substrato apenas o HFor ou uma mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor. Assim, a amostra CptC foi submetida ao teste AME após esgotamento da matéria orgânica na presença do ácido fórmico (HFor) como fonte de carbono nas relações S_0/X_0 , 0,25 e 0,5 g DQO g⁻¹ SV_{iniciais} (ensaio representado pelas siglas CptC_{0,25HAc} e CptC_{0,5HAc}), bem como da mistura dos ácidos acético (HAc), propiônico (HPr), butírico (HBu) e fórmico, na relação 2:1:1:1 com S_0/X_0 de 0,25, 0,5 e 0,75 g DQO g⁻¹ SV_{iniciais} (ensaio representado pelas siglas CptC_{0,25mix}, CptC_{0,5mix} e CptC_{0,75mix}).

No segundo grupo de ensaios, cuja finalidade foi determinar a região da lagoa com valores de AME mais elevados, as amostras dos pontos do centro de cada região, EptC, CptC e SptC, foram submetidas à AME após esgotamento da matéria orgânica, utilizando-se como fonte de carbono a mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor na relação 2:1:1:1. A relação substrato/microrganismo (S_0/X_0) utilizada foi de 0,25 g DQO g⁻¹ SV_{iniciais}.

No terceiro grupo de ensaios, a fim de avaliar a atividade de diferentes grupos tróficos microbianos metanogênicos, considerando-se a metanogênese celular, testaram-se as fontes orgânicas em separado. As diferentes fontes utilizadas incluíram os ácidos HAc, HPr, HBu e HFor, introduzidos individualmente em cada sistema reacional na relação 0,25 g DQO g⁻¹ SV_{iniciais}.

No primeiro e no segundo grupo experimental foram utilizados 60 mL de amostra e os frascos-reatores eram de 100 mL. O terceiro realizou-se com 600 mL de amostra em frascos-reatores de 1000 mL. Nesse caso, aumentou-se o volume reacional para que alíquotas pudessem ser retiradas diretamente dos frascos-reatores para determinação do SV após o esgotamento da matéria orgânica. Ainda, nesse terceiro experimento, além do acompanhamento da produção do

metano, foram monitorados o dióxido de carbono no *headspace* e o consumo dos ácidos orgânicos na fase líquida.

A adição de fontes externas nos frascos-reatores foi realizada utilizando-se como base de cálculo o SV obtido após o esgotamento da matéria orgânica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 estão descritos os experimentos realizados, respectivamente, no primeiro, segundo e terceiro grupo de experimentos.

As amostras do início e final dos ensaios de AME do terceiro grupo foram avaliadas quanto ao seu conteúdo de DNA_{total} e à estrutura das comunidades de arqueias e bactérias por meio da técnica do DGGE a fim de, respectivamente, comparar DNA_{total} e conteúdo de SV_{inicial} das amostras e avaliar a estrutura da comunidade.

Tabela 7. Descrição do primeiro grupo de ensaios de AME - Dezembro/2004.

Ensaio	Descrição
CptC _{0,25mix}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor.
CptC _{0,5mix}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,5 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor.
CptC _{0,75mix}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,75 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor.
CptC _{0,25Hfor}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HFor.
CptC _{0,5Hfor}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo na qual adicionou-se, após esgotamento da M.O., 0,5 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HFor.

M.O. = matéria orgânica; HAc = ácido acético; HBU = ácido butírico; HPr = ácido propiônico; For = ácido fórmico.

Tabela 8. Descrição do segundo grupo de ensaios de AME - Dezembro/2004.

Ensaio	Descrição
EptC _{0,25mix}	Amostra de sedimento proveniente da região de entrada do afluente na lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor.
CptC _{0,25mix}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor.
SptC _{0,25mix}	Amostra de sedimento proveniente da região de saída do efluente da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor.

M.O. = matéria orgânica; HAc = ácido acético; HBu = ácido butírico; HPr = ácido propiônico; For = ácido fórmico.

Tabela 9. Descrição do terceiro grupo de ensaios de AME - Dezembro/2004..

Ensaio	Descrição
CptC _{0,25HAc}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HAc.
CptC _{0,25HPr}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HPr.
CptC _{0,25HBu}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HBu.
CptC _{0,25HFor}	Amostra de sedimento proveniente da região central da lagoa, ponto do centro em relação ao fluxo, na qual adicionou-se após esgotamento da M.O., 0,25 g DQO g ⁻¹ SV _{inicial} de HFor.

M.O. = matéria orgânica; HAc = ácido acético; HBu = ácido butírico; HPr = ácido propiônico; For = ácido fórmico.

Para cada um dos ensaios descritos nas Tabelas de 5 a 9, haviam frascos-reactores controle nos quais adicionou-se apenas a amostra de sedimento, sem adição de fonte de carbono. Quando o ensaio foi feito com esgotamento de matéria orgânica remanescente, o controle também foi submetido a esse procedimento. Quando não ocorreu o esgotamento no frasco-reactor com adição de fonte de carbono, este também não foi feito no frasco controle. O controle foi feito também em triplicata.

As Figuras 6 e 7 nas páginas seguintes representam esquematicamente todos os ensaios de AME realizados com as amostras das três coletas efetuadas ao longo do estudo da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.

Figura 6: Esquema dos testes de AME realizados com amostras de sedimento da Coleta Preliminar e na Segunda Coleta (20/10/2004).

Figura 7. Esquema dos três grupos de testes de AME realizados com amostras de sedimento da Terceira Coleta (16/12/2004).

4.9. Metodologias em biologia molecular

A diversidade microbiana foi examinada por meio das seguintes metodologias de biologia molecular: a) para avaliar a estrutura da comunidade empregou-se a eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE; b) a identificação de microorganismos presentes na amostra foi feita por meio da hibridização *in situ* com sondas fluorescentes – FISH. Para a determinação do DNA total empregou o protocolo de Sambrook *et al.* (1989).

4.9.1. Determinação do DNA total

O DNA total foi determinado nas amostras iniciais e finais dos ensaios de AME realizados durante o terceiro grupo de experimentos com as amostras de Dezembro de 2004.

Para a determinação do DNA total por espectrofotometria, extrai-se o DNA da amostra a ser analisada. A extração de DNA foi utilizado o método de lise direta descrito no item 4.10.2.2(a), o mesmo para análise das amostras por DGGE. A seguir tomou-se 2 μL da amostra de DNA extraído e diluiu-se em 498 μL de água destilada. 100 μL dessa diluição era colocado em mini-cubetas, que eram então lidas quanto à sua densidade óptica em dois comprimentos de onda, 260 e 280 nm, utilizando-se espectrofotômetro Hiachi U-2000. A leitura em 260 nm permite o cálculo da concentração de ácidos nucleicos na amostra. Uma densidade óptica de 1 corresponde a aproximadamente 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA dupla fita, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA fita simples e RNA. A relação entre as leituras feitas em 260 e 280 nm ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$) permite uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. Amostras puras de DNA e RNA possuem valores de $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ de 1,8 e 2,0 respectivamente. Amostras contaminadas com proteínas ou fenol, apresentam $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ com valores significativamente inferiores a esses, não sendo possível a quantificação dos ácidos nucleicos nessas amostras (SAMBROOK *et al.*, 1989)

4.9.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE para Análise de Diversidade e Estrutura das Comunidades Microbianas

Alíquotas das amostras de sedimento coletadas em Outubro e Dezembro de 2004, de todos os pontos de coleta, foram avaliadas quanto à estrutura da comunidade por meio da técnica do DGGE. Alíquotas dos frascos-reatores do terceiro grupo de ensaios de AME com amostras de sedimento da coleta de Dezembro/2004 foram também avaliadas quanto à sua estrutura no início e ao final dos ensaios de AME quando utilizou-se os ácidos individuais como fontes externas de carbono.

4.9.2.1. Preservação de amostras para DGGE

Para preservação das amostras para DGGE era retirada uma alíquota de 10 mL de cada amostra, colocada em tubos para centrifugação de 15 mL estéreis e, em seguida, procedia-se a centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos e temperatura de 4°C. Descartava-se o sobrenadante, adicionava-se 10 mL de tampão TE, promovia-se a lavagem da amostra com o tampão TE por meio de agitação dos tubos em vórtex. Por fim, as células eram concentradas por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos à temperatura de 4°C e armazenadas em freezer a -20°C para posterior análise.

4.9.2.2. Metodologia para o DGGE

Para o estudo da diversidade microbiana empregou-se o método DGGE descrito como em Brucha (2002). O DNA total da comunidade microbiana foi extraído das amostras e os RNAr16S foram amplificados por PCR, utilizando-se inicialmente *primers* universais para os Domínios *Archaea* e *Bacteria*. Os produtos da PCR foram então separados por DGGE. Os procedimentos adotados incluíram:

(a) Extração de DNA – para a extração do DNA da comunidade microbiana foi utilizado o método de lise direta (TSAI e OLSON, 1991; SMALLA *et al.*, 1993). Após lavagem da amostra com tampão TE, as células eram concentradas por centrifugação e então lisadas por agitação com pérolas de vidro. A metodologia foi adaptada de forma a otimizar o processo de extração de DNA de alto peso molecular;

(b) Purificação do DNA - a purificação do DNA foi feita como descrito por Smalla et al. (1993);

(c) Reação em cadeia da polimerase (PCR) - com o DNA extraído do material biológico foram obtidos fragmentos de DNAr16S, dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, utilizando-se a técnica da PCR com *primers* homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 10; as amplificações foram feitas usando termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). A quantidade e integridade do DNA obtido foram estimadas através de eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK *et al.*, 1989), antes da realização do DGGE;

Tabela 10. Descrição dos *primers* dos Domínios *Archaea* e *Bacteria* utilizados nas reações da PCR das amostras da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.

Primers		Seqüência (5'→3')	Fonte
Domínio <i>Archaea</i>	1100FGC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA	Kudo <i>et al.</i> (1997)
		CGG GGGG AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG	
		CGAG	
	1400R	CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC	
Domínio <i>Bacteria</i>	968FGC	AAC GGA AGA ACC TTAC CGC CCG GGG CGC GCC	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
		CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG	
	1392R	ACG GGC GGT GTC TAC	

(d) Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) - os fragmentos de DNAr 16S amplificados foram então separados em gel de DGGE, produzindo bandas que refletiram a diversidade microbiana da amostra analisada (MUYZER *et al.*, 1996). Após a padronização inicial do gradiente ótimo de agentes desnaturantes (MUYZER *et al.*, 1993), os produtos da PCR das amostras das lagoas foram submetidos a experimentos de DGGE paralelo em equipamento BioRad. O gel foi corado com corante de ácido nucléico SYBR Green I (Molecular Probes) e os resultados foram documentados em equipamento Eagle Eye II System (Stratagene). Para controles positivos e negativos foram empregadas culturas puras de *Archaea* metanogênicas da Família *Methanosarcinaceae* e uma cultura pura de *Escherichia coli*. A avaliação da diversidade presente nas amostras foi realizada por meio da equação descrita por 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 a seguinte:

$$C_s = \frac{2 * J}{(a + b) * 100} \quad (8)$$

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.

4.9.3. Hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) para Análise da Composição Microbiana.

Além das análises por DGGE, as amostras de todos os pontos da coleta de Dezembro de 2004 foram submetidas ao método FISH, utilizando-se primeiramente sondas de oligonucleotídeos Domínio-específicas para os Domínios *Archaea* e *Bacteria* e posteriormente, sondas grupo-específicas para espécies de metanogênicas, como descrito na Tabela 11.

Tabela 11. Descrição das sondas de oligonucleotídeos grupo-específicas utilizadas nas análises com FISH.

Sondas	Grupos microbianos alvo e posição no RNAr	Seqüências (5' → 3')	Referências
NON338	Nenhum – controle negativo (RNAr 16S, 338-355)	ACTCCTACGGGAGGC AGC	Manz <i>et al.</i> (1992)
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i> (RNAr 16S, 338-355)	GCTGCCTCCCGTAGG AGT	Amann <i>et al.</i> (1990)
ARC915	Domínio <i>Archaea</i> (RNAr 16S, 915-934)	GTGCTCCCCGCGCAA TTCCT	Stahl e Amann (1991)
MS821	<i>Methanosarcina</i> sp. (RNAr 16S, 821-844)	CGCCATGCCTGACAC CTAGCGAGC	Raskin <i>et al.</i> (1994)
Mst825	<i>Methanosaeta</i> sp. (RNAr 16S, 825-847)	TCGCACCGTGGCCGA CACCTAGC	Raskin <i>et al.</i> (1994)
MB1174	<i>Methanobacteriaceae</i> (RNAr 16S, 1195-1174)	TACCGTCGTCCACTC CTTCCTC	Raskin <i>et al.</i> (1994)
MB310	<i>Methanobacteriaceae</i> (RNAr 16S, 331-310)	CTTGTCTCAGGTTCC ATCTCCG	Raskin <i>et al.</i> (1994)
MSMX860	<i>Methanosarcinaceae</i> (RNAr 16S, 880-860)	GGCTCGCTTCACGGC TTCCCT	Raskin <i>et al.</i> (1994)
MC1109	<i>Methanococcaceae</i> (RNAr 16S, 1109-1128)	GCAACATAGGGCAC GGGTCT	Raskin <i>et al.</i> (1994)
MG1200	<i>Methanomicrobiales</i> (RNAr 16S, 1200-1220)	CGGATAATTCGGGGC ATGCTG	Raskin <i>et al.</i> (1994)

A sonda NON338 foi utilizada como controle negativo visando detectar hibridização inespecífica, como preconizado por Manz *et al.* (1992). Este tipo de hibridização refere-se àquela que ocorre entre a sonda e uma porção do RNAr não complementar a este. Isto pode ser decorrente do uso de temperaturas inadequadas, ou devido à secagem indevida do tampão de hibridização e das células durante o processo de hibridização, ou mesmo da secagem do tampão de lavagem (Araújo, 2001). Os procedimentos adotados estão de acordo com Araújo *et al.* (2000) e Domingues *et al.* (2002).

(a) Fixação das Células - As amostras foram fixadas em solução tampão com paraformaldeído em PBS. Com água Milli-Q aquecida em aproximadamente 55-65°C foram dissolvidas 2 g de paraformaldeído, 150 µL de NaOH 1N e 5mL de PBS 10X (1,3M NaCl + 70mM Na₂HPO₄ + 30mM NaH₂PO₄ em pH 7,2). O pH da solução foi corrigido para 7,2 a 7,4 com HCl e o volume final aferido em 50mL, com água Milli-Q. O tampão foi armazenado na geladeira por no máximo dois dias. A amostra foi centrifugada, ressuspensa em PBS 1X (130mM NaCl + 7mM Na₂HPO₄ + 3mM NaH₂PO₄ em pH 7,2) e submetida a centrifugação por 2 minutos em alta rotação. O material foi novamente ressuspensa em 200 µL de PBS 1X com 600 µL de tampão de fixação gelado e colocado por aproximadamente 16 horas a 4°C. Lavou-se a amostra por duas vezes com PBS 1X e uma vez com PBS 1X + NP40 e ressuspendeu-se em etanol gelado + PBS 1X com volumes iguais. A amostra foi então armazenada a -20°C;

(b) Hibridização – Colocou-se 1 µL da amostra sobre o pocinho da lâmina de vidro coberta com teflon (Figura 8) e transferiu-se para ambiente escuro por 15 a 20 minutos a 45°C. A seguir, realizou-se a desidratação em série gradativa de etanol (50, 80 e 100 %) por 3 minutos cada. Adicionou-se 8 µL do tampão de hibridização em cada pocinho na presença de concentrações

apropriadas de formamida para a estringência de cada sonda específica (Tabela 12). A concentração final da sonda era de 25 mM, correspondendo a 25 a 50 ng μL^{-1} . As lâminas foram transferidas para câmara úmida preparada com tubos Falcon com papel filtro umedecido em tampão de hibridização, evitando a secagem das células e mantendo a concentração do mesmo inalterada, em temperatura e período de tempo apropriado para cada sonda (Tabela 12). Após essa etapa, as lâminas foram submetidas ao tampão de lavagem por tempo e temperatura específicos para cada sonda (Tabela 12), em seguida lavadas com água Milli-Q para a remoção de sais e finalmente coradas com 10 μL de uma solução de DAPI 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (4',6-diamidino-2-fenil indol; Sigma), por 10 minutos à temperatura ambiente e depois novamente lavadas com água Milli-Q. Após a secagem da lâmina, foi adicionado 1,4 μL de glicerol/PBS (80/20%) em pH 8,5 para a observação em microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus BX60 ou Leica DM LB). Foi utilizado o filtro UG-1, com excitação na região UV do espectro, para a observação das células coradas com DAPI e o filtro BP-545, com excitação na região verde do espectro, para as células hibridizadas com sondas marcadas com rodamina e CY3;

Figura 8. Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridização in situ.

Tabela 12. Descrição dos protocolos de hibridização e lavagem das amostras.

Sondas	Temperatura de hibridização	Tampão de hibridização	Temperatura de lavagem	Tampão de lavagem	Referências
EUB338 e NON338	46°C por 1 hora e 30 minutos	0,9 M NaCl, 20mM TrisHCl, 1mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 20 minutos	20 mM TrisHCl, 1mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) com 225 mM de NaCl	Abe (1998)
ARC915	45°C por 2 horas	0,9 M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 30% formamida	48°C por 20 minutos	20 mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) com 80mM de NaCl	Hahn <i>et al.</i> (1992)
MB1174, MB310, MsMX860, MG1200, MS821, Mst825 e MC1109	37°C por 4 horas	0,9 M NaCl, 20mM TrisHCl, 0,1% SDS (pH 7,2) + 40% formamida	37°C por 30 minutos	Igual ao tampão de hibridização	Raskin <i>et al.</i> (1994)

A Pedra

*“O distraído nela tropeçou
O bruto a usou como projétil.
O empreendedor, usando-a, construiu.
O camponês cansado da lida, dela fez assento.
Para meninos, foi brinquedo.
Drummond a poetizou.
David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura..
E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no homem!
Não existe "pedra" no seu caminho que você não possa aproveitar para o seu próprio crescimento.”*
(Autor desconhecido)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Acompanhamento e monitoramento da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) do município de Cajati.

Os dados apresentados na Tabela 13 compõem os relatórios trimestrais de acompanhamento e monitoramento da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) do município de Cajati, e se referem às análises feitas no afluente e efluente da Lagoa Anaeróbia e do sistema como um todo. Estes foram cedidos pela Sabesp de Registro – Unidade de Negócio Vale do Ribeira, responsável pela operação e manutenção do sistema. Os resultados apresentados correspondem às campanhas de análises realizadas pela Sabesp em outubro de 2003, período em que foi realizada a coleta preliminar neste estudo, e em março, maio, agosto de novembro de 2004. Esta última campanha de análises corresponde ao período em que ocorreu a segunda coleta de amostras para o desenvolvimento do presente trabalho de doutorado.

Tabela 13 - Valores característicos das variáveis de monitoramento do sistema de tratamento de esgotos sanitários do município de Cajati em outubro/2003, março/2004, maio/2004, agosto/2004 e em novembro/2004.

Variável	Esgoto bruto	Efluente da Lagoa Anaeróbia	Efluente do sistema	Remoção na Lagoa Anaeróbia (%)	Remoção no sistema (%)
Temperatura do ar (°C)					
outubro/2003	26,0	26,0	26,0	-	-
março/2004	25,0	24,0	24,0	-	-
maio/2004	26,5	26,5	26,5	-	-
agosto/2004	23,0	23,0	23,0	-	-
novembro/2004	26,3	26,3	26,4	-	-
pH					
outubro/2003	6,71	7,00	7,57	-	-
março/2004	7,27	7,18	8,15	-	-
maio/2004	7,04	7,20	7,48	-	-
agosto/2004	6,97	7,29	8,46	-	-
novembro/2004	6,92	8,32	8,08	-	-
Alcalinidade (mg L⁻¹ CaCO₃)					
outubro/2003	163	189	140	-	-
março/2004	197	135	77	-	-
maio/2004	174	135	100	-	-
agosto/2004	144	151	96	-	-
novembro/2004	121	112	113	-	-
ST (mg L⁻¹)					
outubro/2003	1292	619	512	52,1	60,4
março/2004	616	306	300	50,3	51,3
maio/2004	NR	NR	NR	-	-
agosto/2004	1050	377	383	64,1	63,5
novembro/2004	114	296	256	-	-
SST (mg L⁻¹)					
outubro/2003	550	80	185	70,9	66,4
março/2004	355	60	110	83,1	69,0
maio/2004	NR	NR	NR	-	-
agosto/2004	460	45	160	90,2	65,0
novembro/2004	30	150	110	-	-

Variável	Esgoto bruto	Efluente da Lagoa Anaeróbia	Efluente do sistema	Remoção na Lagoa Anaeróbia (%)	Remoção no sistema (%)
DBO (mg L⁻¹)					
outubro/2003	500	120	50	76,0	90,0
março/2004	280	50	30	82,1	89,3
maio/2004	320	84	50	73,8	84,4
agosto/2004	400	50	25	87,5	83,8
novembro/2004	55	45	40	18,2	27,3
Coliformes totais(NMP/100mL)					
outubro/2003	1,3x10 ⁸	NR	1,9x10 ⁵	-	99,8
março/2004	NR	NR	6,3 x 10 ⁴	-	-
maio/2004	NR	NR	7,3 x 10 ⁵	-	-
agosto/2004	NR	NR	NR	-	-
novembro/2004	NR	NR	1,2 x 10 ⁵	-	-
Coliformes fecais(NMP/100mL)					
outubro/2003	7,4x10 ⁶	NR	2,6 x 10 ⁴	-	99,6
março/2004	NR	NR	9,6 x 10 ³	-	-
maio/2004	NR	NR	4,4 x 10 ⁴	-	-
agosto/2004	NR	NR	NR	-	-
novembro/2004	NR	NR	1,9 x 10 ⁴	-	-

NR: Não realizado. Adaptado dos Relatórios Trimestrais da Sabesp de Registro – Unidade de Negócio Vale do Ribeira.

Muito embora os resultados da Tabela 13 não tenham sido obtidos através de base experimental da autora da presente tese de doutorado, optou-se por apresentá-los no capítulo Resultados e Discussão e não em Material e Métodos, a fim de facilitar a discussão dos experimentos da tese.

A média dos valores de DBO no afluente nas primeiras 4 campanhas foi de 375 mg L⁻¹, sendo que este esgoto pode ser considerado de concentração média-forte (SILVA e ARAÚJO, 2004). Entretanto, em novembro de 2004, o valor da DBO do esgoto sanitário foi baixo, da ordem de 55 mg L⁻¹, revelando um afluente ao sistema anaeróbio mais diluído. O mesmo

comportamento foi observado para ST e SST, que apresentaram, respectivamente, valores médios nas 4 primeiras campanhas de 986 mg L⁻¹ e de 455 mg L⁻¹, enquanto no período de novembro de 2004, esses valores foram reduzidos para 114 mg L⁻¹ e 30 mg L⁻¹, respectivamente para ST e SST.

As eficiências de remoção de matéria orgânica no sistema todo nas quatro primeiras campanhas de análise foram de 90,0; 89,3; 84,4 e 83,8 % respectivamente nos meses de outubro/2003, março/2004, maio/2004 e agosto/2004. Esses valores estavam de acordo com aqueles encontrados na literatura e considerados satisfatórios para sistemas tratando esgotos sanitários com configuração igual a estudada neste trabalho (60 a 80%, como DBO), assim como semelhantes a outros sistemas de lagoas em série com configurações diversas, sendo aproximadamente 90 % a redução média dos valores da DBO. Como exemplo de sistemas brasileiros semelhantes com eficiências próximas às encontradas na ETE estudada, pode-se citar os trabalhos a seguir.

Oliveira *et al.* (1996), avaliando um sistema em escala piloto tratando esgoto sanitário encontrou eficiências de redução da DBO que variaram entre 78 e 89 % para o efluente da lagoa facultativa, e da ordem de 95,0 % para o conjunto de lagoas como um todo. O sistema localizado em Campina Grande – PB era composto por uma Lagoa Anaeróbia (TDH de 1 a 1,5 dias) seguida por uma facultativa (TDH de 2 a 3 dias) e 8 lagoas de maturação (TDH de 2 a 3 dias em cada lagoa), tendo valores de DBO na entrada da primeira lagoa entre 186 a 240 mg L⁻¹. Em outra série de lagoas localizada na mesma cidade para o tratamento de esgotos sanitários, a saber, 2 lagoas anaeróbias seguidas por 5 facultativas e 10 lagoas de maturação, Pearson *et al.* (1996b) encontraram eficiências de redução da DBO de 91 %, com valores de DBO de entrada na faixa de 181 a 215 mg L⁻¹. A eficiência calculada de redução da demanda bioquímica de oxigênio após as lagoas anaeróbias e facultativas foi em média de 82 %.

A ETE Ponta Negra localizada em Natal-RN é composta por 3 lagoas em série, sendo 1 lagoa facultativa primária (TDH de 18,9 dias) e 2 de maturação (TDH de 7,2 e 7,3 dias). Oliveira *et al.* (2005), avaliando o desempenho dessas lagoas encontraram eficiências de redução da DBO de 73 %, com um valor de DBO afluente em média de 304,8 mg DBO L⁻¹.

Em trabalho desenvolvido por Araújo e Silva (2004), foram avaliados 7 sistemas de lagoas em série tratando esgoto sanitário na região metropolitana de Fortaleza. Os autores verificaram que os valores médios da DBO de entrada dos diferentes sistemas foram de 344 ± 119 mg L⁻¹ (TDH entre 30 e 139,9 d), e a eficiência de redução da DBO foi da ordem de 89%.

A literatura (OLIVEIRA *et al.*, 1996; PEARSON *et al.*, 1996b; OLIVEIRA *et al.*, 2005; ARAÚJO e SILVA, 2004) indica que a redução dos SST em sistemas de lagoas é em média aproximadamente 75 %. Considerando os valores da Sabesp, a eficiência média do sistema de Cajati nas quatro primeiras campanhas medida como remoção de SST foi mais baixa que as normalmente encontradas na literatura para sistemas semelhantes, apresentando reduções do conteúdo de sólidos de 66,8 ± 2,0 % para SST e de 58,4 ± 6,3% para ST, considerando-se a média total dos períodos.

Por outro lado, os resultados das análises de novembro de 2004 mostraram uma queda de eficiência do sistema como um todo, com valor de 27,3 % na redução da DBO e aumento no teor de SST de 30 mg L⁻¹ no afluente para 110mg L⁻¹ na efluente do sistema. O aumento no teor de sólidos suspensos pode ser associado ao crescimento de algas na lagoa facultativa, como foi verificado em outro trabalho por Oliveira *et al.* (2005).

Avaliando-se as variáveis medidas para a análise da Lagoa Anaeróbia observa-se que nas quatro primeiras campanhas de coleta a redução média dos valores de DBO foi de 79,8 ± 6,2%. Segundo Mara (1997)¹³ *apud* von Sperling (2002), em temperaturas acima de 25°C a eficiência de remoção de matéria orgânica esperada em lagoas anaeróbias é de 70 % ou mais. Os valores de

¹³ MARA, D.D. **Design manual for waste stabilisation ponds in Índia**. Leeds: Lagoon Technology International Ltd, 1997.

monitoramento da Lagoa Anaeróbia de Cajati, segundo os dados da Sabesp, também mostram semelhanças quanto a eficiência com resultados descritos por Almeida *et al.* (2005), os quais revelaram uma redução média da DBO de 71,77 % operando uma Lagoa Anaeróbia de 8 m de profundidade, com valores da DBO do esgoto sanitário na entrada do sistema da ordem de 379 mg L^{-1} , ou seja, semelhante ao verificado pela Sabesp na ETE Cajati, 380 mg L^{-1} em média para as 4 primeiras campanhas de análise. As coletas realizadas por Almeida *et al.* (2005) foram feitas durante 10 meses e também incluíram períodos chuvosos e não chuvosos. Diferente do que ocorreu com a Lagoa Anaeróbia da ETE Cajati, nos períodos chuvosos não se verificou redução da eficiência da lagoa estudada por Almeida *et al.* (2005), o que pode estar associado à maior profundidade desta (8 m) em relação à lagoa da ETE Cajati (4 m), reduzindo a influência das condições ambientais na coluna d'água.

Ainda, Oliveira *et al.* (1996) e Pearson *et al.* (1996b) operando duas lagoas anaeróbias situadas em Campina Grande e submetidas a condições ambientais semelhantes às desse trabalho, alcançaram eficiências médias de redução da DBO entre 61,7 a 81,2 e 58,8 %, respectivamente. Papadopoulos *et al.* (2003) estudaram uma Lagoa Anaeróbia de 4 m de profundidade tratando esgoto sanitário, localizada na estação experimental da National Agricultural Research Foundation na Grécia, e operada sob temperaturas entre 4 a 25°C, ou seja, temperaturas muitas vezes mais baixas que as medidas na ETE-Cajati. No trabalho de Papadopoulos *et al.* (2003), verificaram-se eficiências de remoção de DBO de 44 e 57 %, respectivamente para o período do inverno com DBO média de entrada de 427 mg L^{-1} e para o de verão, com DBO média afluyente de 444 mg L^{-1} . Como esperado a eficiência do sistema estudado no presente trabalho de doutorado foi mais elevada ($79,8 \pm 6,2\%$ de remoção de DBO) em função da manutenção da temperatura mais elevada (média de 25°C) e com menor variação ao longo do tempo (de 23 a 26,5°C). A mesma comparação pode ser feita em relação a uma outra Lagoa Anaeróbia (profundidade de 1,6 m e TDH variando de 1,4 a 4 dias) também localizada na

Grécia (temperaturas de 10 a 20°C), onde foi verificada uma eficiência de remoção de DBO de 47 % para um valor inicial de 412 mg L⁻¹ (ALEXIOU *et al.*, 2004).

Como ocorreu em todo o sistema, no período de chuvas excessivas a eficiência de remoção de matéria orgânica na Lagoa Anaeróbia, determinada pela análise de DBO, foi de apenas 18,2 %. Saquar e Pescod (1995) encontraram resultado semelhante em uma Lagoa Anaeróbia localizada em Alsamra (Jordânia), na qual a eficiência do sistema foi afetada por condições ambientais como na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Segundo esses autores, a chuva intensa levou a um fluxo elevado na lagoa ocasionando uma significativa redução na remoção de matéria orgânica na lagoa quando comparada com a eficiência encontrada durante condições normais de chuva e fluxo.

Em relação à remoção de SST verificou-se que a eficiência média da Lagoa Anaeróbia nas quatro primeiras campanhas ($81,4 \pm 9,8$ %) foi semelhante às encontradas na literatura em outras lagoas anaeróbias operando em temperaturas muito próximas as da lagoa de Cajati, ou seja de 25°C , e mais elevada que as encontradas em temperaturas baixas. Oliveira *et al.* (1996) verificaram porcentagens médias de remoção de SST de 78,1 % em Lagoa Anaeróbia operada em Campina Grande-PB. Hranova (2004) avaliando um sistema em Harare (Zimbábue - África) encontrou remoção de 80,5 % de SST no efluente da Lagoa Anaeróbia. Nas lagoas anaeróbias estudadas por Alexiou *et al.* (2004) e Papadopoulos *et al.* (2003) as eficiências de remoção de SST foram de 58 e 64 %, respectivamente. Como esperado, a eficiência da Lagoa Anaeróbia deste estudo apresentou valores mais elevados (com exceção do período de chuvas intensas) do que aqueles verificados em lagoas anaeróbias operando em baixas temperaturas, que se referem aos dois últimos trabalhos citados.

A reduzida eficiência verificada na campanha de novembro de 2004 no sistema, assim como a da Lagoa Anaeróbia, foi relacionada diretamente ao excesso de chuvas na região durante o período. É certo que a diluição dos esgotos sanitários, bem como a operação de sistemas

abertos, como as lagoas, aplicados ao tratamento de resíduos líquidos são inegáveis fatores de influência do processo biológico.

O esgoto afluyente foi acentuadamente diluído devido a altas taxas de infiltração no sistema de rede de esgoto. Os valores de DBO de entrada da Lagoa Anaeróbia estudada variaram de 280 a 500 mg L⁻¹ nas quatro primeiras campanhas, enquanto no período chuvoso (novembro/2004) o valor da DBO afluyente foi de 55 mg L⁻¹, muito aquém da DBO de entrada prevista em projeto, 300 mg L⁻¹. Outros autores também pontuaram a marcante influência da pluviosidade em sistema de Lagoa Anaeróbia, Hranova (2004), por exemplo, mostrou que a eficiência era significativamente reduzida perante um valor muito baixo de DBO do esgoto sanitário, da ordem de 24 mg L⁻¹.

Considerando apenas o efluente do sistema de Lagoa Anaeróbia, os valores de coliformes fecais encontrados mostraram a inviabilidade de sua utilização. Porém, como a ETE de Cajati é composta da Lagoa Anaeróbia seguida de uma Lagoa de Estabilização Facultativa, a avaliação das condições sanitárias somente possui valor se for considerado o sistema como um todo.

5.2 Variáveis físico-químicas determinadas durante a coleta de amostras

5.2.1. Batimetria

A Figura 9 mostra o resultado da batimetria, com a distribuição do sedimento na Lagoa Anaeróbia na coleta preliminar em outubro de 2003. Como pode ser observada nos gráficos da Figura 9, a distribuição não era uniforme ao longo da largura e comprimento da lagoa, concentrando-se no centro e na esquerda da lagoa em relação ao fluxo. A região de entrada apresentou menor quantidade de sedimento quando comparada com as outras duas regiões (central e de saída).

Na coleta de outubro/2004 não foi realizada a batimetria. Entretanto, a análise das amostras coletadas nos mesmos pontos mostrou que o sedimento estava acentuadamente diluído como será discutido no próximo item. Os resultados da batimetria obtidos durante a coleta de dezembro/2004 (Figura 10) mostraram uma distribuição também irregular do sedimento no fundo da Lagoa Anaeróbia, sendo que o maior acúmulo de lodo na lagoa ocorreu dos 5 metros aos 70 m.

Figura 9. Esquema da distribuição do sedimento na Lagoa Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos do Município de Cajati-SP; Pontos amostrados em destaque em vermelho. Coleta preliminar, outubro/2003.

Figura 10. Esquema da distribuição do sedimento na Lagoa Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos do Município de Cajati-SP; Pontos amostrados em destaque em vermelho. Coleta de dezembro/2004.

Pescod (1996), analisando o sedimento de lagoas anaeróbias no sistema de tratamento de Alsamra (Jordânia) encontrou uma distribuição de lodo não homogênea, e da mesma forma que observado na lagoa estudada neste trabalho de doutorado, o acúmulo mais elevado ocorreu ao longo da lagoa e a região de entrada apresentou menores quantidades de sedimento. De acordo com o autor, a pequena quantidade de sedimento na entrada daquela lagoa foi consequência de elevada velocidade do fluxo na entrada única do sistema, especialmente nos períodos mais chuvosos e com ventos. Possivelmente este mesmo fato tenha motivado a presença de lodo em maior quantidade após o local de entrada do afluente, que no caso da ETE-Cajati se dava por três pontos.

Por outro lado, nos trabalhos de Nelson *et al.* (2004) e Papadopoulos *et al.* (2003), a distribuição de sedimento nas lagoas anaeróbias investigadas foi uniforme. Papadopoulos *et al.* (2003) associaram a uniformidade do sedimento no fundo da lagoa à forma da mesma, que se apresentava como uma pirâmide invertida facilitando as condições para deposição de material particulado, diferentemente do formato da Lagoa Anaeróbia de Cajati, que apresenta um fundo plano.

Nelson *et al.* (2004), por sua vez, apontaram a existência de múltiplas entradas (quatro) na Lagoa Anaeróbia e pequenos TDH's (2,5 dias) como as causas para a distribuição uniforme de sedimento no fundo da lagoa. Ou seja, condições que diferem daquelas encontradas na Lagoa Anaeróbia estudada no presente trabalho, na qual a entrada do afluente se dava por três entradas e o TDH era de 5,5 dias.

Comparando-se a distribuição de sedimento na Lagoa Anaeróbia com base nas batimetrias realizadas em outubro/2003 e dezembro/2004 (Figura 11), observa-se uma redução na quantidade de sedimento no fundo da lagoa. O cálculo do volume de lodo presente na Lagoa Anaeróbia foi feito por meio do programa Suffer nas duas batimetrias e os valores encontrados corroboram essa afirmação. Em outubro de 2003, o volume de sedimento era de

2.023,93 m³, enquanto a batimetria de dezembro de 2004 revelou um volume de apenas 724,30 m³. Essa redução de 64 % do sedimento esteve provavelmente associada à mistura e manutenção do sedimento na coluna d'água, bem como ao carreamento de sólidos com o efluente da lagoa em consequência das chuvas e ventos intensos observados na região, no período que antecedeu à coleta de dezembro. Como mostrado na Tabela 13, ocorreu aumento no teor de sólidos suspensos do afluente (30 mg⁻¹) para o efluente da Lagoa Anaeróbia (150 mg⁻¹), indicando a retirada de sólidos suspensos antes presentes na lagoa.

Figura 11. Esquema para comparação da distribuição do sedimento na Lagoa Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos do Município de Cajati-SP; (a) Coleta de outubro/2003; (b) Coleta de dezembro/2004; (c) perda de sedimento em dezembro/2004 em relação a outubro/2003.

5.2.2. Temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido, pH e potencial de óxido-redução

A Figura 12 apresenta os resultados das variáveis físico-químicas determinadas com a sonda Yellow Springer 556-MPS, durante as campanhas de amostragens nos três pontos das diferentes regiões estudadas na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.

Figura 12. Valores de profundidade (a), temperatura (b), condutividade (c), oxigênio dissolvido (d), pH (e) e potencial de óxido redução (f) determinados nas amostras de sedimento coletadas nas regiões de entrada do afluente, central e saída do efluente da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos esquerdo (EptE, CptE, SptE), do centro (EptC, CptC, SptC) e da direita em relação ao fluxo (EptD, CptD, SptD). Coletas de outubro/2003, outubro e dezembro/2004. Considerando: EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; EptC – região de entrada ponto do centro em relação ao fluxo; EptD – região de entrada ponto da direita em relação ao fluxo; CptE – região central ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; CptD – região central ponto da direita em relação ao fluxo; SptE – região de saída ponto da esquerda em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo; SptD – região de saída ponto da direita em relação ao fluxo.

5.2.2.1. Coleta preliminar - outubro/2003

Comparando-se os pontos amostrados e os valores das análises físico-químicas realizadas numa mesma região da lagoa (EptE, EptC e EptD; CptE, CptC e CptD; e SptE, SptC e SptD), na coleta preliminar (Figura 12), foi possível observar que em relação a temperatura, condutividade e pH não houve diferenças nos valores dessas variáveis nos pontos amostrados de uma mesma região. Porém, os valores de OD nas regiões de entrada e de saída da Lagoa Anaeróbia foram acentuadamente menores no ponto do centro quando comparados com os demais valores. Na região central o menor valor de OD foi verificado no ponto da direita. Os resultados possivelmente são associados a um fluxo preferencial existente à época das amostragens, com conseqüente aporte de matéria orgânica nestes pontos levando a uma maior atividade anaeróbia.

A atividade anaeróbia desenvolve-se em ambientes reduzidos, ou seja, na ausência de baixos valores de O_2 e, portanto, com potenciais de óxido-redução negativos. Segundo Zinder (1993), os microrganismos metanogênicos são os mais sensíveis a essas condições, necessitando de potenciais de óxido-redução da ordem de -300 mV. Hungate¹⁴ (1967) *apud* Zinder (1993) calculou que a concentração teórica de O_2 para esse potencial de óxido-redução era de 10^{-56} , ou seja, muito abaixo das concentrações encontradas na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Entretanto, de acordo com Zinder (1993) há uma considerável variação na sensibilidade das metanogênicas ao O_2 , o que sugere segundo este autor, que esses microrganismos podem existir em alguns habitats nos quais existem microambientes anaeróbios ou nos quais as condições anaeróbias acontecem de forma transiente.

Comparando-se os valores das diferentes variáveis entre os pontos de uma mesma região ao longo da coluna d'água na Lagoa Anaeróbia (os valores das variáveis ao longo da coluna d'água verificados na coleta preliminar encontram-se no Apêndice E – Tabelas 52 a

¹⁴ HUNGATE, R.E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (Eds.). **Methods in Microbiology**. Academic Press, New York, 1967. v. 2B, p. 117-132.

54), observa-se um comportamento semelhante ao do sedimento, com valores de temperatura, condutividade e pH semelhantes e diferenças para os valores de OD. Nas regiões de entrada e de saída os valores de OD foram acentuadamente menores no ponto do centro. Já na região central, verificou-se uma alternância de valores mais baixos de OD entre o ponto do centro e o da direita dependendo da profundidade.

Como esperado, os valores de condutividade e OD diminuíram da superfície em direção ao sedimento em todos os pontos analisados.

5.2.2.2. Coleta outubro/2004

Nesta coleta, observou-se que a Lagoa Anaeróbia não apresentava um desempenho satisfatório, com uma eficiência de remoção de matéria orgânica de 18,2%, como discutido anteriormente a partir dos dados fornecidos pela Sabesp (Item 5.1). Além disso, as condições anaeróbias estavam comprometidas. As determinações de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido, pH e potencial de óxido-redução mostraram homogeneidade entre os pontos ao longo da coluna d'água (Apêndice E – Tabelas 55 e 56). No sedimento da região de entrada da lagoa os valores observados para temperatura e pH foram sempre menores que os da coluna d'água (Figura 12).

A condutividade e o potencial de óxido-redução foram sempre mais elevados no sedimento dessa região (Figura 12). O esperado era um potencial de óxido-redução com valores mais negativos no sedimento, uma vez que se trata de uma Lagoa Anaeróbia e que o sedimento deveria apresentar as condições mais favoráveis para as atividades anaeróbias, já que está distante da superfície e, portanto, sem contato direto com as trocas gasosas de O₂ com a atmosfera. A região central da lagoa apresentou a mesma tendência, porém com uma variação menos acentuada entre os valores das variáveis. A região de saída apresentou homogeneidade nos valores das variáveis medidas entre todos os pontos avaliados, com

exceção dos valores do potencial de óxido-redução, que foram diferentes ao longo da coluna d'água e no sedimento. Ainda, os valores dessa variável no sedimento foram diferentes entre os pontos amostrados.

Os resultados mostram que as condições físico-químicas dentro da lagoa apresentaram grande variação, mostrando que as condições de mistura da mesma não eram satisfatórias. Essas variações podem levar à existência de diferentes microhabitats que comportam microrganismos diversos, incluindo microrganismos aeróbios, como foi o caso durante esta coleta como será discutido no item de microscopia (5.3, pág. 109).

5.2.2.3. Coleta dezembro/2004

As determinações de temperatura e pH no sedimento da lagoa (Figura 12) mostraram pequena variação entre os pontos estudados. Os valores de condutividade, oxigênio dissolvido e potencial de óxido-redução variaram, porém sem diferenças acentuadas. Nesta coleta, observou-se que a lagoa apresentou características de anaerobiose, mostrando uma elevada capacidade de recuperação do sistema, já que em um período de apenas 2 meses ocorreu o reestabelecimento da comunidade anaeróbia no sistema.

Ao se comparar os valores dos potenciais de óxido-redução desta coleta com os de outubro de 2004, notou-se que os valores encontrados em dezembro aproximaram-se mais das condições favoráveis à ação dos microrganismos anaeróbios, embora ainda estivessem distantes dos valores ótimos para a metanogênese, ou seja, próximos a -250 a -300 mV.

Nelson *et al.* (2004) encontraram potenciais de óxido-redução no sedimento de uma Lagoa Anaeróbia variando de -50 a -200 mV, ou seja favorecendo as atividades anaeróbias mais próximas à redução do sulfato do que a metanogênese. Entretanto, no presente estudo, apesar dos valores dos potenciais de óxido-redução não serem tão desfavoráveis a atividade metanogênica, variando de 14,1 a -32,7 mV, observou-se resposta metanogênica como será posteriormente comentado. Os autores associaram essa aparente discordância de resultados a

problemas com o eletrodo utilizado para a medida (eletrodo de platina de 2 mm) e falhas na forma de medida da variável. Naquele estudo, as amostras eram avaliadas após sua retirada do sedimento, o que poderia incorporar oxigênio à mesma, alterando os valores de potencial de óxido-redução. Os autores sugeriram a realização da medida no próprio sedimento utilizando um eletrodo menor. Neste trabalho, o potencial de óxido-redução foi determinado diretamente no sedimento, entretanto, limitações do eletrodo podem também ter resultado em medidas erradas, já que o eletrodo pode apresentar interferências devido à alta concentração do sedimento estudado.

5.2.3. Variáveis físico-químicas determinadas em laboratório

As amostras foram analisadas quanto ao seu conteúdo de Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis totais (SV). Na Figura 13 estão apresentados os resultados obtidos para as variáveis nas amostras coletadas nos três diferentes pontos das regiões de entrada, central e de saída da Lagoa Anaeróbia, nas três campanhas de coleta.

5.2.3.1. Coleta preliminar - outubro/2003

Os valores de ST e SV mostraram que não houve homogeneidade entre as amostras de sedimento coletadas dos diferentes pontos de uma mesma região da lagoa para essas variáveis (Figura 13). Os pontos da direita apresentaram valores inferiores para todas as variáveis em relação aos pontos do centro e da esquerda em relação ao fluxo. Portanto, pode ter ocorrido caminho preferencial da matéria orgânica no interior da lagoa com acúmulo irregular de sedimento, levando a uma maior atividade dos microrganismos nos pontos com maior concentração de matéria orgânica, já que nesses pontos havia maior disponibilidade de material orgânico para ser consumido.

Os valores de ST e SV aumentaram acentuadamente da entrada da lagoa para a saída, com exceção para os pontos CptD e SptD, entre os quais ocorreu diminuição dos valores de SV e ST. Entretanto, comparando-se entrada e saída sempre ocorreu aumento no teor de ST e SV no sedimento da lagoa. As regiões central e de saída da lagoa apresentaram um sedimento mais concentrado e em maior volume, como foi possível observar no gráfico de batimetria (Figura 9). Esses resultados corroboram a idéia de que a deposição de sedimento no início da lagoa é dificultada em função da velocidade de entrada do afluente (discutido no item 5.2.1) levando ao acúmulo de lodo nas demais regiões e ao aumento da concentração de sólidos nesses sedimentos.

Figura 13 - Valores de ST e SV nas amostras de sedimento provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos esquerdo (EptE, CptE e SptE), central (EptC, CptC e SptC) e direito em relação ao fluxo (EptD, CptD e SptD). Coletas de outubro/2003 (a), outubro/2004 (b) e dezembro/2004 (c). **Considerando:** EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; EptC – região de entrada ponto do centro em relação ao fluxo; EptD – região de entrada ponto da direita em relação ao fluxo; CptE – região central ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; CptD – região central ponto da direita em relação ao fluxo; SptE – região de saída ponto da esquerda em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo; SptD – região de saída ponto da direita em relação ao fluxo.

Como não ocorreu homogeneidade nas variáveis físico-químicas analisadas entre os diferentes pontos de uma mesma região, manteve-se a coleta nos 9 pontos nas campanhas seguintes, e não em apenas um ponto representando cada região, como havia sido pensado inicialmente.

5.2.3.2. Coleta outubro/2004

O sedimento da lagoa em outubro de 2004 apresentou uma homogeneidade elevada para os valores das variáveis ST e SV (Figura 13) quando comparado com os valores encontrados para as amostras da coleta preliminar. Além disso, esses se mostraram acentuadamente mais baixos, o que corroborou a informação apresentada anteriormente de diluição do esgoto afluyente em função das chuvas excessivas na região durante o período.

Diferente do que foi observado na coleta anterior (outubro/2003), não houve indicação de caminho preferencial e acúmulo de sedimento irregular na lagoa. Aparentemente não havia sedimento acumulado nesta coleta, o que ocorreu, provavelmente, devido a excesso de chuvas e ventos provocando a movimentação da coluna d'água e a mistura do sedimento na massa de água.

5.2.3.3. Coleta dezembro/2004

Os valores de ST e SV encontrados nas amostras de sedimento coletadas em dezembro de 2004 (Figura 13) apresentaram-se extremamente elevados quando comparados com as duas coletas anteriores. Exceção apenas para os pontos SptE e SptC que apresentaram teores de ST e SV mais elevados na coleta preliminar.

Teores de ST tão elevados já foram relatados na literatura para sedimentos de lagoas anaeróbias. Nelson *et al.* (2004) encontraram valores que variaram de 3 g L⁻¹ a 300 g L⁻¹ no sedimento de uma Lagoa Anaeróbia tratando esgoto sanitário localizada no México central.

Comparando-se as regiões de entrada e saída, observou-se que houve redução nos valores das duas variáveis analisadas ao longo da lagoa. Esses resultados coincidem com o maior acúmulo de sedimento nos primeiros 70 m da lagoa determinado pela batimetria (Figura 10). Exceção para os pontos EptE e CptE, entre os quais ocorreu aumento no teor de SV, entretanto no ponto EptE havia maior altura de sedimento do que em CptE.

O comportamento de deposição de sedimento nesta coleta foi oposto aquele encontrado na coleta preliminar, onde o maior acúmulo de sedimento ocorreu ao longo da lagoa, nas regiões central e de saída quando comparadas com a região de entrada.

Todas as variações encontradas ao longo da lagoa, especialmente nas coletas de outubro/2003 e dezembro/2003, quando foram excepcionalmente significativas, indicaram a existência de curtos circuitos dentro da lagoa. Segundo a literatura, uma Lagoa Anaeróbia com baixa relação comprimento/largura (L/W), abaixo de 4 e em alguns casos abaixo de 8, corresponderia a um padrão de mistura completa (NAMECHE e VASEL, 1998). A relação L/W para esta lagoa é em média 3,7 (calculada a partir da média entre a relação L/W do fundo da lagoa, 4,25; e da relação L/W da altura do líquido, 3,15), ou seja, a condição de mistura completa seria a esperada, entretanto a distribuição de sedimento e as variáveis físico-químicas indicaram que essa condição não existiu.

A formação de curtos-circuitos pode ser ocasionada pelo próprio padrão de distribuição do sedimento no fundo na lagoa, que por sua vez é determinado pela posição das entradas do afluente, como relatado por Peña *et al.* (2000). Outro fator importante a ser considerado são a direção e intensidade dos ventos, Peña *et al.* (2000) observaram interferência da direção e intensidade dos ventos sobre o padrão de fluxo em uma Lagoa Anaeróbia. Esses podem ter sido também os fatores que levaram à formação de curtos-circuitos na lagoa estudada neste trabalho, pois como comentado pelos autores citados (Peña *et al.*, 2000), quando o vento encontra-se a favor da direção do fluxo da lagoa os curtos-circuitos podem ser acentuados. Para minimizar este

problema, Peña *et al.* (2000) sugeriam a introdução de chicanas nas lagoas a fim de reduzir as falhas na operação dos sistemas.

A partir da análise das variáveis físico-químicas investigadas pode-se verificar que a Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati passou por alterações influenciadas por condições ambientais. Essas alterações nas condições físico-químicas, como seria esperado, agiram sobre a microbiota modificando-a. Neste sentido, a comunidade microbiana presente no sedimento da lagoa na coleta de outubro de 2003 era de microrganismos anaeróbios, quando as características favoráveis à anaerobiose eram prevalecentes. Na coleta de outubro de 2004, o excesso de chuvas e ventos incorporaram oxigênio à coluna d'água e a microbiota presente foi aquela adequada a essas condições. Na coleta de novembro de 2004, as condições de anaerobiose da lagoa estavam aos poucos sendo readquiridas, e o mesmo ocorria com a comunidade microbiana. Embora parte dessa comunidade ainda fosse característica de um ambiente com presença de oxigênio em função das recentes alterações físico-químicas promovidas pelas chuvas e ventos intensos ocorridos até outubro de 2004.

5.3. ExAMEs microscópicos de procariontes – microscopia ótica comum de contraste de fase e epifluorescência.

5.3.1 ExAMEs microscópicos das amostras da coleta preliminar, outubro/2003.

Os tipos morfológicos presentes nas amostras estudadas foram os mesmos em todas as regiões (Figura 14), compreendendo filamentos de diversos tipos, filamentos com vesículas de gás característicos do gênero *Methanosaeta* sp. (BERGEY e HOLT, 1994), bacilos pequenos, com cerca de 1,5 μm , bacilos maiores que os anteriores (cerca de 5 μm ou mais) e cocos. Apenas a morfologia espiralada, que apresentou células com comprimento de cerca de 7,5 μm , não foi encontrada em todas as amostras. Este tipo morfológico apareceu apenas em EptE

e CptC. Foram observados também cistos fluorescentes semelhantes aos formados por *Methanosarcina* sp (SPROT & BEVERIDGE, 1993).

Figura 14. Fotomicrografias dos tipos morfológicos predominantes nos pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati-SP. (a) e (b) bacilos, cocos e filamentos com vesículas de gás semelhantes a *Methanosaeta* sp; (c) morfologia espiralada; (d) bacilos agrupados formando filamento; (e) pequenos cocos e bacilos vistos em contraste de fase; (f) a foto anterior em fluorescência. Aumento 1500x. Coleta preliminar, outubro/2003.

Na maioria dos casos as morfologias presentes não fluoresceram. Observou-se fluorescência em alguns campos (Figura 14f), mas devido à presença de grande quantidade de material inorgânico proveniente do sedimento não foi possível determinar se a fluorescência

ocorreu devido à presença de microrganismos com essa característica ou devido a material inorgânico.

A análise de frequência foi realizada (Tabela 14) com as amostras EptE, CptC e SptC (Tabela 25), e mostrou que houve variação dos tipos morfológicos dependendo do ponto de coleta na Lagoa Anaeróbia. Exceção para os bacilos maiores (5 μm), que apresentaram frequência muito próxima entre todos os pontos avaliados.

Tabela 14 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, ponto esquerdo (EptE), região central, ponto do centro (CptC) e região de saída do efluente da Lagoa Anaeróbia, ponto do centro (SptC). Coleta preliminar, outubro/2003.

Tipos morfológicos	EptE	CptC	SptC
Filamentos	+++	++	++++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	+++++	++	N.O.
Bacilos pequenos (cerca de 1,5 μm)	+++	+	+++
Bacilos grandes (cerca de 5 μm)	+++++	+++++	++++
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	N.O.	++++	+++
Espirilos	++	++	N.O.
Cocos	+++	++	N.O.

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado. EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo.

5.3.2 ExAMES microscópicos das amostras da coleta de outubro/2004

Os exAMES microscópicos realizados nas amostras coletadas em outubro/2004 (Figura 15) mostraram que os tipos morfológicos característicos dos procariontes estavam quase ausentes, prevalecendo pequenas quantidades como os observados nas Figuras 15A e 15E. Como a operação da Lagoa Anaeróbia não se encontrava adequada no período, como discutido nos itens 5.1 e 5.2., verificou-se a presença de organismos fotossintetizantes, Figuras 15B e 15C, respectivamente, as cianobactérias do gênero *Merismopedia* sp.

(KOMARÉK & ANAGNOSTIDIS, 1999; BICUDO, 2005) e algas do gênero *Chlorella* sp. Deve-se ressaltar que todas as amostras apresentaram alta frequência de algas, com predominância do gênero *Chlorella* sp (Tabelas 15 a 17), ou seja, organismos característicos de lagoas facultativas. Foram também observados microrganismos móveis, alguns relacionados a protozoários flagelados e ciliados, bacilos, cocos, filamentos e, algumas vezes, bacilos filamentosos com vesículas de gás, que não puderam ser relacionados ao gênero metanogênico *Methanosaeta* sp devido a morfologia celular. A Figura 15B mostra também a presença de um protozoário (canto inferior esquerdo).

Microrganismos pertencentes ao grupo das cianofíceas foram observados em grandes quantidades. O gênero *Merismopedia* sp. foi encontrado em todas as amostras, apresentando alta frequência na maioria delas. São conhecidas mais de 30 espécies de *Merismopedia*, sendo a maioria delas planctônicas de águas continentais. Possuem células esféricas, algumas com aerótopos e são caracterizadas pela formação de colônias tabulares (BICUDO e MENEZES, 2005). É importante ressaltar que a identificação desse gênero deve ser feita com cuidado, uma vez que as espécies com aerótopos, como as presentes nessa amostra, podem ser confundidas com a *Thiopedia* sp., uma bactéria púrpura sulfurosa (KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS, 1999; BICUDO e MENEZES, 2005), comumente encontrada na zona anaeróbia de lagoas facultativas e sendo responsável pela oxidação do sulfeto nesses ambientes (VEENSTRA et al., 1995). Espécies de *Merismopedia* são comumente encontradas em reservatórios brasileiros e podem ser identificadas por meio do trabalho de Werner (2002). Sua presença já foi também identificada em lagoas facultativas tratando esgoto sanitário (GOTARDO, 2005).

Tabela 15 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de entrada do afluente, pontos esquerdo (EptE), do centro (EptC) e direito (EptD). Coleta outubro/2004.

Tipos morfológicos	EptE	EptC	EptD
Filamentos	+	++	++
Bacilos com vesículas de gás	N.O.	+++	N.O.
Bacilos	+	+++++	++
Cocos	+++++	N.O.	++
<i>Chorella</i> sp	+++++	++++	+++++
<i>Merismopedia</i> sp.	+++	++	+++++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado. EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; EptC – região de entrada ponto do centro em relação ao fluxo; EptD – região de entrada ponto da direita em relação ao fluxo.

Tabela 16 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região central da lagoa, pontos esquerdo (CptE), do centro (CptC) e direito (CptD). Coleta outubro/2004.

Tipos morfológicos	CptE	CptC	CptD
Filamentos	++	+	++
Bacilos com vesículas de gás	N.O.	N.O.	N.O.
Bacilos	+++++	N.O.	+
Cocos	N.O.	N.O.	+
<i>Chorella</i> sp	++++	++++	+++++
<i>Merismopedia</i> sp.	+++	+	+++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado. CptE – região central ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; CptD – região central ponto da direita em relação ao fluxo.

Tabela 17 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de saída do efluente, pontos esquerdo (SptE), do centro (SptC) e direito (SptD). Coleta outubro/2004.

Tipos morfológicos	SptE	SptC	SptD
Filamentos	+++++	++	++++
Bacilos com vesículas de gás	++	++++	+
Bacilos	+++	++++	++++
Cocos	+++	N.O.	+++
<i>Chorella</i> sp	+++	++	+++
<i>Merismopedia</i> sp.	+++	++	++++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente. SptE – região de saída ponto da esquerda em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo; SptD – região de saída ponto da direita em relação ao fluxo.

A elevada frequência desses organismos característicos de ambientes com presença de O₂, notadamente os fotossintetizantes, mostrou que as condições ambientais de alta pluviosidade e ventos fortes interferiram profundamente também na microbiota presente na lagoa. A qual foi projetada para funcionar como Lagoa Anaeróbia, entretanto apresentou características de lagoa facultativa nesta coleta. As mudanças físico-químicas, assim como as biológicas provocadas pelo choque hidráulico ocasionado pelas chuvas intensas e reduzida carga orgânica afluyente levaram à reduzida eficiência na remoção de matéria orgânica (de apenas 18,2% para DBO) encontrada na lagoa neste período.

5.3.3 ExAMEs microscópicos das amostras da coleta de dezembro/2004

Os tipos morfológicos encontrados no sedimento da lagoa em dezembro/2004 (Figura 16) incluíram morfologias típicas de metanogênicas, como filamentos com vesículas de gás característicos do gênero *Methanosaeta* sp., indicando que as condições propícias para as atividades anaeróbias haviam sido, ou estavam sendo recuperadas na lagoa. Porém, morfologias de ambientes aeróbios também foram encontradas, como a alga *Chorella* sp., a cianobactéria *Merismopedia* sp. e protozoários flagelados e ciliados. Filamentos diversos, cocos e bacilos estavam presentes. Os diferentes tipos morfológicos foram encontrados em todos os pontos amostrados, com frequência variada (Tabelas 18 a 20).

Comparativamente à coleta de outubro/2004, as morfologias aeróbias apresentaram menor frequência na coleta de dezembro/2004, e foi frequente uma morfologia típica de arqueias metanogênicas, a do gênero *Methanosaeta* sp (Figuras 16A e 16B - seta). A Figura 16A, particularmente, mostra o arranjo paliçádico dos bacilos com extremidade quadrada e bastante comum ao gênero metanogênico citado (BERGEY e HOLT, 1994).

Figura 16. Fotomicrografia dos tipos morfológicos predominantes nos pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati-SP. (a) filamentos em arranjo paliçádico semelhantes a *Methanosaeta* sp; (b) bacilos e filamentos com vesículas de gás semelhantes a *Methanosaeta* sp; (c) bacilos curvos; (d) cocos em cadeia, bacilos e alga do gênero *Chorella* sp.; (e) bacilos, cocos e filamento; (f) gênero de cianobactéria *Merismopedia* sp. Aumento 1500x. Coleta dezembro/2004.

Tabela 18 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de entrada do afluente, pontos esquerdo (EptE), do centro (EptC) e direito (EptD). Coleta dezembro/2004.

Tipos morfológicos	EptE	EptC	EptD
Filamentos	++++	+++++	++++
Bacilos e filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	++	+++	++
Cocos	+	++	+++
Espirilo	N.O.	+	N.O.
Bacilos	++++	+++++	+++
Bacilos curvos	N.O.	+++	++
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	N.O.	N.O.	+++
<i>Chorella</i> sp	++	+	++
<i>Merismopedia</i> sp.	++	N.O.	++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado. EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; EptC – região de entrada ponto do centro em relação ao fluxo; EptD – região de entrada ponto da direita em relação ao fluxo.

Tabela 19 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região central da lagoa, pontos esquerdo (CptE), do centro (CptC) e direito (CptD). Coleta dezembro/2004.

Tipos morfológicos	CptE	CptC	CptD
Filamentos	+++++	++++	+++
Bacilos e filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	++	+++	+++
Cocos	++	+	++++
Bacilos	++++	++	++
Bacilos curvos	++	++	++
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	N.O.	+++	++
<i>Chorella</i> sp	+++	++++	+++
<i>Merismopedia</i> sp.	++	+++	+++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado. CptE – região central ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; CptD – região central ponto da direita em relação ao fluxo.

Tabela 20 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de saída do efluente, pontos esquerdo (SptE), do centro (SptC) e direito (SptD). Coleta dezembro/2004.

Tipos morfológicos	SptE	SptC	SptD
Filamentos	++++	+++	+++
Bacilos e filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	+++++	++	+++
Cocos	+++	+++	+++
Bacilos	+++	++	+++
Bacilos curvos	++	++	++
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	N.O.	N.O.	N.O.
<i>Chorella</i> sp	++++	++	+
<i>Merismopedia</i> sp.	++	+++	+

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente. SptE – região de saída ponto da esquerda em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo; SptD – região de saída ponto da direita em relação ao fluxo.

Neste sentido, as alterações verificadas nas populações presentes na Lagoa Anaeróbia, não necessariamente implicaram em um mau funcionamento da mesma. Na coleta de outubro/2004 quando a influência das condições ambientais, as características físico-químicas, a concentração de matéria orgânica no afluente (apenas 55 mg L⁻¹) e as populações microbianas não eram adequadas aos processos anaeróbios, a eficiência do sistema foi acentuadamente reduzida em relação às outras.

Porém, além das interferências citadas no parágrafo anterior (condições ambientais, físico-químicas e microbiológicas) é preciso considerar a forma de avaliação dessa eficiência, pois em lagoas com presença de algas, como ocorreu em outubro/2004, é comum no efluente ocorrer alta concentração desses organismos, o que pode interferir no teste de DBO. A utilização da DQO filtrada como forma de determinar a eficiência do sistema pode ser aplicável nestes casos. Hranova (2004) verificou baixas eficiências (38 e 32 %) em uma Lagoa Anaeróbia operando com características de lagoa facultativa quando utilizou a DQO

total, entretanto ao avaliar a DQO filtrada, verificou que as eficiências de remoção eram maiores, 67 e 50 %.

5.4. ExAMEs microscópicos de eucariontes – Contagem de protozoários, algas e rotíferos.

A literatura relata a participação de protozoários no processo de fermentação anaeróbia de substratos, sendo que estes foram citados por outros autores como fazendo parte da microbiota de reatores anaeróbios. A presença de protozoários anaeróbios pode ser indicativa da presença obrigatória de arqueias metanogênicas, uma vez que alguns protozoários são dependentes de metanogênicas que vivem no seu interior e mantêm baixa a pressão parcial de H_2 no seu interior (CORLISS, 2002). Neste sentido, a avaliação e quantificação de protozoários em lagoas anaeróbias podem indicar a relevância de sua participação na degradação da matéria orgânica nesse tipo de sistema. As algas e rotíferos foram também investigados em função da detecção de sua elevada presença nas amostras de outubro de 2004.

A comparação da concentração de protozoários, algas e rotíferos nas amostras estudadas de outubro e dezembro/2004 (Figura 17) revelou que na maioria dos pontos o número de protozoários e rotíferos aumentou de outubro para dezembro/2004. Provavelmente, esse comportamento ocorreu devido à maior disponibilidade de matéria orgânica na última coleta (dezembro/2004). Em outubro/2004, as chuvas e ventos intensos levaram a uma diluição significativa da matéria orgânica presente no esgoto afluente, assim como na massa de água e no sedimento na Lagoa Anaeróbia, o que pode ser verificado também a partir dos valores reduzidos de SV nas amostras de outubro/2004, em comparação com as amostras de dezembro/2004 (Figura 13). Por outro lado, o número de algas presentes no sedimento

amostrado decresceu acentuadamente de outubro para dezembro/2004, indicando a tendência da lagoa de manter as características de anaerobiose.

A alga predominante identificada nas amostras pertence ao gênero *Chorella*. Este gênero é comumente encontrado em lagoas de estabilização facultativas (ROCHE, 1995; THARAVATHI e HOSETTI, 2003) atuando nos processos fotossintéticos neste tipo de lagoa.

Dentre os protozoários presentes na amostra, os gêneros identificados foram *Paramecium* e *Vorticella* (FOISSNER e BERGER, 1996). Outros estudos em lagoas de estabilização também indicaram a presença desses gêneros em suas comunidades microbianas (RIVERA et al., 1987; THARAVATHI e HOSETTI, 2003).

No grupo dos rotíferos identificaram-se os gêneros *Brachionus*, *Trichocerca*, *Synchaeta* e *Keratella*. Esses gêneros têm sido encontrados como parte integrante das comunidades presentes em reservatórios eutróficos e *wetlands* (ARMENGOL et al., 2003; DEVETTER e STROJSOVA, 2003; RADWAN et al., 2003), assim como em lagoas facultativas de estabilização tratando chorume de aterro sanitário doméstico (KHATTABI, 2002) e efluente de indústria de laticínios (ROCHE, 1995). Nandini et al. (2004) relataram a ocorrência de rotíferos planctônicos quando alimentados com efluentes de indústria de alimentos ou com esgotos sanitários, sendo capazes de crescer a velocidades comparáveis àquelas verificadas quando se utilizou uma dieta de algas verdes.

A presença das algas, das espécies encontradas de protozoários e rotíferos indicam que a Lagoa Anaeróbia nas condições do período, não eram as comuns à esse sistema. Embora os protozoários e rotíferos encontrados sejam comuns em ambientes eutróficos, eles necessitam de O₂ para a realização de seu metabolismo. As algas desempenham papel metabólico fotossintético, enquanto os protozoários e rotíferos atuam diretamente no consumo de material orgânico, portanto esses organismos contribuíram para a retirada de DBO na lagoa, entretanto, isso só foi possível porque as condições de anaerobiose estavam comprometidas (no período

de outubro/2004) ou, porque haviam microhabitats com presença de pequenas quantidades de O_2 (no período de novembro/2004).

Figura 17. Valores numéricos médios (organismos g⁻¹SV) de protozoários, algas do gênero *Chlorella* sp e rotíferos encontrados nas amostras da Lagoa Anaeróbia coletadas nas regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente nos pontos da esquerda, do centro e da direita em relação ao fluxo. Coleta de outubro e dezembro/2004. **Considerando:** EptE – região de entrada ponto da esquerda em relação ao fluxo; EptC – região de entrada ponto do centro em relação ao fluxo; EptD – região de entrada ponto da direita em relação ao fluxo; CptE – região central ponto da esquerda em relação ao fluxo; CptC – região central ponto do centro em relação ao fluxo; CptD – região central ponto da direita em relação ao fluxo; SptE – região de saída ponto da esquerda em relação ao fluxo; SptC – região de saída ponto do centro em relação ao fluxo; SptD – região de saída ponto da direita em relação ao fluxo.

5.5. Atividade metanogênica específica (AME)

5.5.1. Atividade metanogênica específica (AME) - Coleta preliminar de outubro/2003

O ensaio de outubro de 2003, considerado preliminar, foi realizado com o propósito de avaliar a resposta do lodo biológico da Lagoa Anaeróbia estudada frente à metodologia para determinação da AME. A relação S_0/X_0 , como anteriormente apresentado no capítulo Revisão da Literatura, é crucial para obtenção de respostas seguras da AME (MORENO et al., 1999; STEIL, 2000; MORENO-ANDRADE e BUITRÓN, 2004; ROZZI e REMIGI, 2004). Nesse sentido, os experimentos com os lodos coletados em outubro de 2003 resultaram em respostas relevantes para a implantação do protocolo mais adequado à determinação da AME das demais amostras (Outubro e Dezembro de 2004), sobretudo na escolha dos valores de SV a serem empregados no cálculo da AME.

Uma das lacunas nos testes de AME refere-se aos métodos de medidas da quantidade de células presentes em uma amostra de lodo biológico de reatores anaeróbios (INCE et al., 1995; DIEZ et al., 1999 e CRONJE et al., 2002). No presente trabalho optou-se pela análise do conteúdo de Sólidos Voláteis (SV), variável comum no monitoramento de processos biológicos de tratamento de resíduos e, além disso, essas medidas têm mostrado boas correlações com as medidas de atividade microbiana (DE ZEEW, 1984 apud ARAÚJO, 1995; DOLFING e BLOEMEN, 1985).

As Tabelas 21 e 22 reúnem os valores médios dos SV antes e após os ensaios de AME, das atividades metanogênicas aparentes (AMA) e das atividades metanogênicas específicas (AME) calculadas a partir do SV_{inicial} , do SV_{final} e da média entre SV_{inicial} e SV_{final} , após 216 horas de incubação dos frascos e alimentação individual com os ácidos HAc, HBu, HPr e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g⁻¹ SV_{inicial} . Lembrando que os experimentos de AME com as amostras de entrada (Ept) e centro (Cpt) da lagoa foram

realizados apenas com ácido acético como única fonte de carbono acrescida ao meio, e as amostras do ponto de saída da lagoa (Spt) foram as únicas testadas com a maior relação S_0/X_0 ($0,5 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inicial}}$) e demais fontes orgânicas.

Em geral, observando-se os valores de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ e SV_{final} das amostras, verifica-se que os mesmos variaram entre si para uma mesma amostra, ou entre amostras diferentes, e foram aleatoriamente maiores ou menores do início para o final do ensaio. Em alguns casos, como nos ensaios com as amostras $\text{EptC}_{0,25\text{HAc}}$, $\text{CptD}_{0,25\text{HAc}}$, $\text{SptD}_{0,25\text{HAc}}$, $\text{SptC}_{0,25\text{HFor}}$ e $\text{SptC}_{0,5\text{HFor}}$, ocorreram variações acentuadas nos valores de SV_{final} encontrados entre as réplicas de uma mesma amostra, com coeficientes de variação (CV) acima de 40%. Os resultados individuais de cada réplica do ensaio estão apresentados nas Tabelas 58 a 60 do Apêndice E.

Destacam-se os valores diferentes de SV_{final} de algumas réplicas de ensaios, ora maiores, ora menores, tais como as réplicas da amostra $\text{CptD}_{0,25\text{HAc}}$ com o teor de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ de $561,0 \text{ mg L}^{-1}$ e teores de SV_{final} de $579,7$ e $289,8 \text{ mg L}^{-1}$; as réplicas da amostra $\text{SptD}_{0,25\text{HAc}}$, com teor de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ de $283,0 \text{ mg L}^{-1}$ e teores de SV_{final} de $571,4$ e $166,7 \text{ mg L}^{-1}$; as réplicas da amostra $\text{SptC}_{0,25\text{HFor}}$, com teor inicial de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ de $4.218,0 \text{ mg L}^{-1}$ e teores de SV_{final} de $11.987,2$ e $6.110,6 \text{ mg L}^{-1}$. O mesmo comportamento foi observado entre as réplicas do ensaio $\text{EptE}_{0,25\text{HAc}}$, com teor de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ de $1.378,7 \text{ mg L}^{-1}$ e teores de SV_{final} de $1.293,9$ e de $1.407,8 \text{ mg L}^{-1}$, porém com uma variação de apenas 6% (Tabelas 58 e 59 – Apêndice E). Nesses casos, ficou evidente o impacto dos diferentes valores de SV_{final} no cálculo da AME, considerando-se as réplicas de ensaios. Assim, quando o valor de AME é obtido com base no valor de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ comum às réplicas, sua variação é apenas dependente da produção do gás medido ao longo do ensaio, diferentemente do cálculo da AME de réplicas dependente dos valores de SV_{final} . Ao considerá-los, a disparidade entre as réplicas, como obtido no presente trabalho, pode ser relacionada à desigualdade de valores dos conteúdos de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ nos lodos biológicos em cada frasco, individualmente considerados, como será discutido à frente.

Nos ensaios nas condições descritas para CptE_{0,25HAc}, CptC_{0,25HAc}, SptE_{0,25HAc}, SptC_{0,25HAc} e SptC_{0,5HAc}, SptCo_{0,25HAc}, e, SptC_{0,25HPr} e SptC_{0,5HPr}, o CV entre as repetições ficou abaixo de 10% e ocorreu diminuição nos teores de SV_{inicial} em relação ao SV_{final} do ensaio. Comportamento semelhante foi observado nos ensaios EptC_{0,25HAc}, SptC_{0,25HBu} e SptC_{0,5HBu}, porém com CV acima de 10% entre as repetições.

Os teores de SV_{inicial} em relação ao SV_{final} sempre decresceram nos frascos-reatores controle, com exceção das amostras CptD e SptD, nas quais foram verificados aumentos nesses valores. Considerando as variações observadas no comportamento do SV_{inicial} e SV_{final} e, como consequência, as variações nos valores de AME, tornou-se então relevante a determinação do SV_{inicial} em cada alíquota da amostra-inóculo dos frascos-reatores, permitindo constatar variações iniciais nos conteúdos dos SV para cada réplica. A homogeneidade de uma mesma amostra-inóculo é dificultada pelas características do próprio lodo biológico que, em geral, contém material particulado no qual há adesão de células. Quando a amostra é dividida em alíquotas para constituir réplicas, essa falta de homogeneidade impossibilita uma adequada distribuição de células nos sistemas de reação. Quanto menor o sistema de reação, maior pode ser o efeito dessa má distribuição. A maioria dos experimentos de AME dessa tese foi conduzida em frascos-reatores de 100 mL e alíquotas de lodo biológico de 60 mL foram os inóculos. A dimensão dos ensaios de AME escolhida foi função da disponibilidade das condições de trabalho no laboratório.

A análise dos valores de AME mostrou que, na maioria dos casos, calculando-se os seus valores a partir do SV_{final} ocorre variação mais acentuada entre as réplicas em decorrência da maior variação nos teores dessa medida (Tabelas 21 e 22, e Tabelas 58 e 59 – Apêndice E).

Tabela 21 - Valores médios de Sólidos Voláteis (SV) iniciais e finais, da Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e da Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAc na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente e central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE e CptE), do centro (EptC e CptC) e da direita (EptD e CptD) em relação ao fluxo. Coleta preliminar, outubro/2003.

Ensaio	SV_i ($mg\ L^{-1}$)	SV_f ($mg\ L^{-1}$)	AMA (SV_i) ($mg\ CH_4\ g^{-1}\ SV\ h^{-1}$)	AMA (SV_f) ($mg\ CH_4\ g^{-1}\ SV\ h^{-1}$)	AMA (SV_i/SV_f) ($mg\ CH_4\ g^{-1}\ SV\ h^{-1}$)	AME (SV_i) ($mg\ CH_4\ g^{-1}\ SV\ h^{-1}$)	AME (SV_f) ($mg\ CH_4\ g^{-1}\ SV\ h^{-1}$)	AME (SV_i/SV_f) ($mg\ CH_4\ g^{-1}\ SV\ h^{-1}$)
EptE _{0,25Hac}	1,38	1,35	0,93 ± 0,25	0,96 ± 0,31	0,94 ± 0,28	0,56 ± 0,25	0,58 ± 0,31	0,57 ± 0,28
EptE _{Controle}		1,33				0,37	0,38	0,37
EptC _{0,25Hac}	1,1	0,70	0,52 ± 0,00	0,88 ± 0,39	0,64 ± 0,11	0,47 ± 0,00	0,79 ± 0,39	0,57 ± 0,11
EptC _{Controle}		0,58				0,05	0,09	0,06
EptD _{0,25Hac}	0,26	0,62	0,98 ± 0,07	0,41 ± 0,004	0,58 ± 0,02	0,57 ± 0,07	0,07 ± 0,004	0,21 ± 0,02
EptD _{Controle}		0,32				0,41	0,34	0,37
CptE _{0,25Hac}	1,79	1,55	1,07 ± 0,36	1,24 ± 0,43	1,15 ± 0,39	0,86 ± 0,36	0,74 ± 0,43	0,85 ± 0,39
CptE _{Controle}		0,75				0,21		0,29
CptC _{0,25Hac}	2,58	2,04	0,69 ± 0,15	0,88 ± 0,17	0,77 ± 0,16	0,42 ± 0,15	0,53 ± 0,17	0,47 ± 0,16
CptC _{Controle}		1,99				0,27	0,35	0,30
CptD _{0,25Hac}	0,56	0,43	1,00 ± 0,00	1,45 ± 0,68	1,15 ± 0,24	0,28 ± 0,00	0,80 ± 0,68	0,47 ± 0,24
CptD _{Controle}		0,62				0,71	0,65	0,68

Tabela 22 - Valores médios de Sólidos Voláteis (SV) iniciais e finais, da Atividade Metanogênica Aparente e da Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, a partir dos SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAc, HBu, HPr e HFOr nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g⁻¹ SV, com amostras provenientes da região de saída do efluente na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (SptE), do centro (SptC) e da direita (SptD) em relação ao fluxo. Coleta preliminar, outubro/2003.

Ensaio	SV _i (mg L ⁻¹)	SV _f (mg L ⁻¹)	AMA (SV _i) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i /SV _f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i /SV _f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
SptE _{0,25HAc}	1,87	1,69	0,65 ± 0,00	0,72 ± 0,02	0,69 ± 0,01	0,33 ± 0,00	0,21 ± 0,02	0,29 ± 0,01
SptE _{Controle}		1,19				0,33	0,51	0,40
SptC _{0,25HAc}	4,22	3,21	0,51 ± 0,02	0,67 ± 0,03	0,58 ± 0,002	0,37 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,40 ± 0,002
SptC _{Controle}		2,64				0,14	0,23	0,18
SptD _{0,25HAc}	0,28	0,37	1,16 ± 0,47	1,30 ± 0,65	1,21 ± 0,13	0,61 ± 0,47	0,63 ± 0,65	0,50 ± 0,13
SptD _{Controle}		0,32				0,75	0,67	0,71
SptC _{0,5HAc}	4,22	3,21	0,26 ± 0,03	0,34 ± 0,07	0,29 ± 0,04	0,03 ± 0,03	-0,02 ± 0,07	0,01 ± 0,04
SptC _{Controle}		2,64				0,23	0,36	0,28
SptC _{0,25HBu}	4,22	3,04	0,69 ± 0,01	0,96 ± 0,04	0,80 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,08 ± 0,04	0,20 ± 0,02
SptC _{Controle}		2,20				0,46 ± 0,004	0,88 ± 0,01	0,60 ± 0,005
SptC _{0,25HBu}	4,22	3,38	0,58 ± 0,10	0,74 ± 0,22	0,65 ± 0,15	0,50 ± 0,10	0,54 ± 0,22	0,54 ± 0,15
SptC _{0,5HBu}		3,38	0,23 ± 0,16	0,30 ± 0,24	0,26 ± 0,19	0,15 ± 0,16	0,10 ± 0,24	0,14 ± 0,19
SptC _{0,25HPr}	4,22	3,56	0,42 ± 0,005	0,50 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,34 ± 0,005	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,02
SptC _{0,5HPr}		3,56	0,13 ± 0,04	0,15 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,04	-0,04 ± 0,06	0,03 ± 0,05
SptC _{0,25HFOr}	4,22	9,05	0,41 ± 0,01	0,21 ± 0,09	0,27 ± 0,08	0,033 ± 0,01	0,019 ± 0,09	0,16 ± 0,08
SptC _{0,5HFOr}		9,05	0,80 ± 0,04	0,41 ± 0,17	0,53 ± 0,14	0,73 ± 0,04	0,22 ± 0,17	0,42 ± 0,14
SptC _{Controle 0,25}	4,22	1,65				0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,11 ± 0,01
SptC _{Controle 0,5}	4,22	1,65				0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,11 ± 0,02

Na região de entrada da lagoa, os valores médios da AME calculados em função do SV_{inicial} e do substrato adicionado na relação $0,25 \text{ g DQO-HAc g}^{-1} SV_{\text{inicial}}$ foram de $0,57 \pm 0,07 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} SV \text{ h}^{-1}$ para EptD; $0,56 \pm 0,25 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} SV \text{ h}^{-1}$ para EptE e $0,47 \pm 0,00 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} SV \text{ h}^{-1}$ para EptC. Observando-se os resultados, pode-se afirmar que os valores encontrados foram próximos, revelando AMEs semelhantes para as amostras do ponto de entrada (Ept). Contudo, ao comparar-se os valores médios calculados em função do SV_{final} , são constatadas diferenças relevantes entre os pontos. O maior valor de AME foi determinado para o EptC, de $0,79 \pm 0,39 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} SV \text{ h}^{-1}$. Por sua vez, os valores de AME nos pontos EptE e EptD foram determinados, respectivamente, em $0,56 \pm 0,31 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} SV \text{ h}^{-1}$ e $0,07 \pm 0,004 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} SV \text{ h}^{-1}$. Comportamento semelhante foi observado quando se consideraram os valores de AME calculados a partir da média entre SV_{inicial} e SV_{final} , o que ocorre devido ao aumento no teor de SV final observado no ensaio com a amostra EptD (Tabela 21).

Os valores médios das AMEs determinados para os pontos da região central também foram variáveis em função do cálculo pelos teores de SV_{inicial} ou de SV_{final} . No primeiro caso, assim como no cálculo feito pela média, a maior atividade foi do CptE, seguida por CptC e CptD. No segundo caso, a AME obtida para a amostra do ponto CptD foi maior, seguindo-se os pontos CptE e CptC.

Na região de saída, não houve diferenças em relação aos valores de AME calculados a partir dos teores de SV_{inicial} , de SV_{final} ou da média entre eles. Nesse caso, a maior atividade foi obtida com a amostra SptD, seguida por SptC e SptE.

Comparando-se os resultados do ensaio $SptC_{0,25HAc}$ (Tabela 22), quando se promoveu o esgotamento da matéria orgânica antes da adição da fonte, com o ensaio em que não ocorreu o esgotamento da matéria orgânica ($SptCo_{0,25HAc}$), notou-se que a AME foi mais elevada para $SptC_{0,25HAc}$. Esta diferença foi mais acentuada quando o cálculo foi realizado em função do

SV_{final} . Supõe-se que possa ter ocorrido um efeito inibitório na amostra $SptCo_{0,25HAc}$, uma vez que o ácido acético adicionado pode ter se somado aqueles presentes e gerados pela degradação da matéria orgânica remanescente do próprio resíduo.

Em diversos trabalhos (PENNA, 1994; ARAÚJO, 1995; OLIVEIRA 1997; STEIL, 2000) utilizou-se a média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} para o cálculo da AME, e esta, de fato pode ser a melhor opção. Entretanto, a melhor estratégia é investigar o comportamento dos SV na amostra estudada. Lodos muito ativos teriam suas AMEs determinadas em curto espaço de tempo, portanto, a diferença entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} é pequena e a média adequada para o cálculo. Já lodos menos ativos podem apresentar comportamento diverso e, embora a utilização da média seja adequada, pois mesmo havendo pequeno crescimento microbiano, a comparação desses dados com outros lodos pode estar comprometida.

A comparação entre os valores de AME calculados a partir de $SV_{inicial}$, SV_{final} , assim como da sua média, para as diferentes relações S_0/X_0 para uma mesma fonte orgânica da amostra SptC (Tabela 22) mostrou que a relação $0,25 \text{ g DQO g}^{-1} SV_{inicial}$ foi a mais favorável para os ácidos acético, butírico e propiônico, o que pode estar associado com alguma toxicidade provocada pelas maiores concentrações desses ácidos nos frascos-reatores com carga orgânica mais elevada ($0,5 \text{ g DQO g}^{-1} SV_{inicial}$). Este fato foi ressaltado quando se observou os resultados de AME negativos encontrados em uma das réplicas para $SptCo_{0,5HAc}$ e $SptCo_{0,5HPt}$ (Tabela 59 – Apêndice E). Isto ocorreu devido à atividade superior no controle em relação às atividades dos frascos-reatores com ácidos voláteis adicionados, mesmo após a degradação da maior parte da matéria orgânica remanescente no resíduo, o que foi realizado durante a etapa de esgotamento da matéria orgânica. Portanto, a microbiota presente na amostra não foi capaz de consumir satisfatoriamente a fonte orgânica adicionada nas concentrações mais elevadas ($0,5 \text{ g DQO g}^{-1} SV_{inicial}$) nem a matéria orgânica restante do próprio resíduo, devido a um possível efeito tóxico da carga aplicada.

Steil et al. (2004) verificaram comportamento semelhante ao descrito em amostras de lodo disperso proveniente de biodigestor tratando água residuária de suinocultura, associando os resultados negativos a excesso de substrato e inibição da microbiota. Nopharatana *et al.* (1998) e Agrawal *et al.* (1997) também observaram atividades microbianas mais elevadas ou semelhantes nos frascos controle em alguns dos seus ensaios, associando este padrão a excesso de substrato nos frascos com adição de substrato externo.

Amostras com alto teor de SV, sendo grande parte desses sólidos constituída por material orgânico de fácil degradação, apresentariam atividades elevadas nos controles. No trabalho de Oliveira (1997), a AME de lodo granulado lavado, ou seja isento da massa líquida em que se encontra imerso, mostrou valores de atividade microbiana mais elevados quando comparado com os valores encontrados para lodo bruto. Os autores atribuíram este resultado à retirada dos sólidos finos com a lavagem do lodo, bem como à alta atividade determinada no lodo do frasco controle dos ensaios com lodo bruto pela presença de substrato disponível à metanogênese.

Outro aspecto a ser considerado para amostras de lodo disperso, ou mesmo de lodo granular que apresente material orgânico disperso, é a carga orgânica aplicada aos microrganismos dessas amostras. Nesses casos, a carga orgânica seria superior àquela aplicada nas amostras com menor teor de SV, uma vez que o cálculo é realizado com base no teor de SV_{inicial} , que para algumas amostras inclui alto teor de matéria orgânica de fácil degradação. Portanto, a quantidade de fonte orgânica disponível para os microrganismos incluiria, além da fonte orgânica externa, o material remanescente da própria amostra. Essas duas fontes somadas podem ter efeito inibitório sobre a microbiota.

Levando-se em conta essas considerações, tornou-se difícil a comparação dos valores de AME entre as diferentes amostras, assim como com outros trabalhos publicados, uma vez que não foi possível determinar a porcentagem de SV que corresponde a biomassa ativa,

matéria orgânica de fácil degradação e matéria orgânica recalcitrante. Para minimizar este problema sugere-se determinar o teor de SV após o esgotamento da matéria orgânica remanescente. A partir deste valor seriam, então, feitos os cálculos de quantidade de fonte a adicionar no ensaio. Este procedimento foi adotado nos ensaios de AME que se seguiram a estes, nas demais coletas realizadas neste trabalho de doutorado.

Os cálculos finais de AME poderiam também ser feitos com base nesses valores de SV. Ainda assim, é possível que as relações S_0/X_0 sejam diferentes entre as amostras, se essas apresentarem porcentagens diferentes de biomassa ativa e material orgânico recalcitrante entre si. Considerando amostras de um mesmo sistema de tratamento que se aproxime do padrão de mistura completa ou fluxo pistonado este fato seria possivelmente irrelevante, porém em sistemas com curtos circuitos, poderia influir acentuadamente nos valores de AME para interpretação de um sistema metanogênico.

Para o ácido fórmico (HFor) encontrou-se atividade mais elevada na relação $0,5 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inicial}}$. Para o ensaio com HFor e $0,25 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inicial}}$, a atividade microbiana foi menor, provavelmente devido ao fato de a quantidade de substrato adicionada não ter sido consumida pela biomassa para produção de gás, mas sim para biossíntese, uma vez que houve acentuado aumento dos teores de SV como constatado pelos valores de SV_{final} em relação ao $\text{SV}_{\text{inicial}}$ (ou seja, de 4,22 para $9,0 \text{ mg L}^{-1}$). Neste sentido, o ensaio com a relação $0,5 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inicial}}$ pode ter sido favorecido, uma vez que o HFor para este ensaio foi adicionado como segunda alimentação, ou seja, na mesma amostra submetida ao ensaio com $0,25 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inicial}}$, e no qual supõe-se tenha ocorrido crescimento microbiano. Segundo Robinson e Tiedje (1984)¹⁵ *apud* Coates et al. (1996), as metanogênicas hidrogenotróficas podem apresentar tempo de duplicação de 3 horas e, assim, pode ter ocorrido crescimento deste tipo microbiano durante o decorrer do teste de AME (216 horas), o que justificaria o aumento

¹⁵ ROBINSON, J.A.; TIEDJE, J.M. Comparison between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H_2 under resting growing conditions. *Archives of Microbiology*, v. 137, p. 26-32, 1984.

dos teores de SV_{final} . Para o HFor, o valor negativo de AME da relação 0,25, réplica 2 (Tabela 59 – Apêndice F) foi consequência do aumento acentuado de SV no sistema de reação, ao considerar o valor de SV no frasco controle que decresceu ao longo do ensaio.

Um incremento no SV_{final} referente às fontes externas adicionadas deve ter ocorrido, uma vez que sempre se verificou um teor de SV_{final} superior para os frascos-reatores com fontes adicionadas em relação aos frascos controle, e, na maioria dos casos, a produção medida não se igualou à teórica. A produção medida de CH_4 foi em média de 63,9 e 52,2% da produção teórica estequiometricamente calculada a partir das equações 6 e 7 descritas no item 4.8.7 de material e métodos (Tabela 23), respectivamente para $SptC_{0,25Hfor}$ e $SptC_{0,5HFor}$. Entretanto, o aumento observado no teor de SV_{final} não ocorreu para as outras fontes orgânicas externas utilizadas, mesmo quando a produção medida de CH_4 não passou de 6,9% da teórica, como ocorreu com $SptC_{0,5HPr}$.

Neste sentido, presumiu-se que tenha havido crescimento microbiano quando se utilizou HFor. Nos demais ensaios com outras fontes orgânicas, pode-se também supor a ocorrência de baixo crescimento microbiano, devido às menores velocidades de crescimento em ácido acético, ou mesmo pela rota metabólica dos ácidos butírico e propiônico, que devem ser primeiramente utilizados por organismos não-metanogênicos, para depois serem metabolizados pelas arqueias metanogênicas, seguindo os processos de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. De acordo com Wu et al. (1995), sob condições mesofílicas, o tempo de duplicação das bactérias degradadoras de propionato é de 5 a 7 dias, das degradadoras de butirato, varia de 3 a 5 dias, e o tempo de duplicação das metanogênicas acetotróficas é de 4 a 7 dias.

Tabela 23 - Valores médios da produção teórica total de metano esperada no ensaio de AME com adição de diferentes fontes orgânicas externas (HAc, HBU, HPr e HFor) nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g⁻¹ SV h⁻¹, em amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e saída do efluente na Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE, SptE), do centro (EptC, CptC, SptC) e da direita (EptD, CptD, SptD) em relação ao fluxo, submetidas aos ensaios de AME. Coleta preliminar - outubro/2003.

Ensaio	Produção teórica esperada de CH ₄ (mg)	Produção total medida de CH ₄ (mg)	Relação produção medida / teórica
EptE _{0,25HAc}	0,359	0,32 ± 0,03	0,90 ± 0,09
EptC _{0,25HAc}	0,279	0,29 ± 0,02	1,02 ± 0,06
EptD _{0,25HAc}	0,067	0,07 ± 0,001	1,10 ± 0,01
CptE _{0,25 HAc}	0,466	0,40 ± 0,05	0,86 ± 0,11
CptC _{0,25 HAc}	0,672	0,43 ± 0,04	0,64 ± 0,7
CptD _{0,25HAc}	0,146	0,19 ± 0,02	1,32 ± 0,15
SptE _{0,25HAc}	0,487	0,36 ± 0,01	0,74 ± 0,02
SptC _{0,25HAc}	1,097	0,83 ± 0,08	0,76 ± 0,07
SptD _{0,25HAc}	0,074	0,06 ± 0,001	0,74 ± 0,01
SptC _{0,5HAc}	1,829	0,47 ± 0,01	0,26 ± 0,01
SptCo _{0,25HAc}	0,914	0,70 ± 0,04	0,77 ± 0,04
SptC _{0,25HBU}	0,914	0,65 ± 0,11	0,71 ± 0,12
SptC _{0,5HBU}	1,829	0,48 ± 0,002	0,26 ± 0,001
SptC _{0,25HPr}	0,914	0,55 ± 0,03	0,60 ± 0,03
SptC _{0,5HPr}	1,829	0,13 ± 0,08	0,07 ± 0,04
SptC _{0,25HFor}	0,914	0,58 ± 0,05	0,64 ± 0,06
SptC _{0,5HFor}	1,829	0,96 ± 0,01	0,52 ± 0,01

Cálculos realizados com base nas equações 6 e 7 descritas no item 4.8.7 (pg. 58) de Material e Métodos.

No início dos ensaios, as réplicas dos frascos-reactores alimentados com HFor apresentaram acentuada diferença no valor de SV_{final} , o que evidenciou a importância da determinação do conteúdo de $SV_{inicial}$ de cada frasco reator e não a partir de uma alíquota única, como anteriormente discutido. Com os dados da Tabela 58 – Apêndice F, pode-se verificar diferença acentuada entre as réplicas, uma vez que o frasco 1 apresentou SV_{final} de 6,1 g L⁻¹, o valor encontrado para SV_{final} foi de 12,0 g L⁻¹ para o frasco 2.

Comparando-se os valores das atividades metanogênicas específicas calculadas em função de todos os SV (ou seja, em função de SV_{inicial} , SV_{final} ou da sua média) entre as réplicas (Tabela 58 e 59 – Apêndice E), observou-se que houveram diferenças nos coeficientes de variação (CVs) acima de 10% (Tabelas 21 e 22) em 69% dos valores considerados, e apenas 20% apresentaram CVs abaixo de 5%. Essas variações dificultam a utilização das médias como valor da AME para cada amostra, uma vez que indicam comportamentos diferentes entre as réplicas. Contudo, sabe-se que o valor de CV significativo para uma determinada análise deve ser oriundo da pesquisa da distribuição desses valores inerente ao que se está comparando. Não foi possível proceder a essa pesquisa na presente tese.

De acordo com Snedecor e Cochran (1980), a distribuição do CV possibilita estabelecer faixas de valores que orientam os pesquisadores sobre a validade de seus experimentos. Em biologia, coeficientes de variação inferiores a 1% são raros, embora não o sejam para ciências físicas (GILL, 1987). Muitas características biológicas, segundo o autor, apresentam CVs na faixa de 5 a 50%. Pimentel Gomes (1990), considera CVs baixos quando são inferiores a 10%, médios quando estão entre 10 e 20%, altos quando estão entre 20 e 30% e muito altos, quando são superiores a 30%. Esses valores foram sugeridos para experimentos de campo com culturas agrícolas.

Steil (2004) aplicou o ensaio de AME em frascos-reatores de 500 mL com 300 mL de amostras de reatores alimentados em batelada com águas residuárias de avicultura e suinocultura com lodo disperso como as provenientes da Lagoa Anaeróbia. Os resultados encontrados apresentaram coeficientes de variação que se mantiveram abaixo de 10% para ensaios com mistura dos ácidos acético, propiônico, butírico e fórmico como substrato, na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV, considerada a mais adequada para aquelas amostras. Coeficientes de variação elevados foram observados entre as repetições dos frascos-reatores

com relações S_0/X_0 acima de 0,25 e quando a amostra utilizada era proveniente de reator com água residuária de suinocultura, sendo que essa amostra apresentou os menores valores de AME (AME mais elevada para essa amostra foi de apenas $0,05 \pm 0,02 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$).

As variações observadas nos ensaios realizados na presente tese de doutorado podem estar associadas à escala de realização do ensaio (foram utilizados frascos-reatores de 100 mL com 60 mL de amostra), às próprias características do lodo que era muito heterogêneo e a retirada de alíquotas homogêneas para cada frasco-reator pode não ter ocorrido. Além disso, atividades microbianas muito baixas e substrato adicionado em quantidade tóxica para os microrganismos levando ao consumo irregular de substrato podem ter interferido nos ensaios e provocado as variações aleatórias no comportamento do SV entre réplicas e do início para o final dos ensaios.

5.5.1.1. ExAMEs microscópicos das amostras dos testes de AME – Coleta preliminar, outubro/2003

Na Figura 18 são apresentadas as fotomicrografias dos exAMEs sob microscopia de contraste de fase das amostras após a realização dos ensaios de AME. Os tipos morfológicos encontrados foram bastante próximos aos encontrados nas amostras originais. Entretanto, ocorreu variação de frequência para determinados tipos morfológicos (Tabelas 24 a 28) dependendo do tipo de ácido orgânico utilizado como fonte de carbono. Em geral, a morfologia de coco ocorreu quando alguma fonte externa de carbono foi adicionada. Nos controles, sem adição de fonte externa, foram encontrados poucos cocos, ou estes não apareceram.

Figura 18. Fotomicrografias dos tipos morfológicos predominantes nas amostras após a realização do ensaio de AME. (a) Feixe de filamentos com vesículas de gás semelhantes a *Methanosaeta* sp, comumente encontrados no ensaio SptC_{0,25HPr} (b) cocos; (c) bacilos; (d), (e) e (f) diferentes tipos de filamentos. Aumento 1500x. Coleta preliminar - outubro/2003.

As morfologias predominantes foram os filamentos em todas as amostras dos ensaios de AME, independente do ácido orgânico adicionado (Figura 18A e 18D) Quando a fonte orgânica foi o ácido propiônico, ocorreu uma maior frequência de todos os tipos morfológicos, com predominância de filamentos com vesículas de gás, que podem ser relacionados ao gênero *Methanosaeta* sp. No entanto, como é de amplo conhecimento, os exAMES microscópicos conferem apenas um panorama dos tipos morfológicos presentes em

um lodo biológico anaeróbio, com algumas morfologias podendo ser particularmente relacionadas com as arqueias metanogênicas, sobretudo quando o sistema produz acentuadamente gás metano. São inúmeros os artigos publicados que referenciam essa afirmação (SCHINK, 1988; ROTT & BEVERIDGE, 1993), sobretudo após análise de microscopia eletrônica de varredura (ARAUJO et al., 2003). Com essa experiência pretérita de outros trabalhos, os resultados dos exAMES microscópicos indicaram morfologias de arqueias metanogênicas, muito embora realce-se que são indicações, pois as morfologias podem também representar presença de outros procariontes. Em relação a indicação de estruturas semelhantes a cistos de *Methanosarcina* sp., o critério de determinação foi realizado com base em indicações do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (BERGEY e HOLT, 1994).

Tabela 24 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados na amostra proveniente da região de entrada do afluente, ponto esquerdo, antes dos ensaios de AME (EptE_{original}), após sua realização, quando se utilizou HAc como fonte de carbono externa (EptE_{0,25HAc}) e no controle do ensaio (EptE_{Controle 0,25HAc}). Coleta preliminar - outubro/2003.

Tipos morfológicos	EptE_{original}	EptE_{0,25HAc}	EptE_{Controle 0,25HAc}
Filamentos	+++	+++++	+++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	+++++	N.O.	N.O.
Bacilos pequenos (cerca de 1,5 µm)	+++	+++	+++
Bacilos grandes (cerca de 5 µm)	+++++	+++	+
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	N.O.	+++	+++
Espirilos	++	N.O.	N.O.
Cocos	+++	++	N.O.

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado.

Tabela 25 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados na amostra proveniente da região central, ponto do centro, antes dos ensaios de AME (CptC_{original}), após sua realização, quando se utilizou HAc como fonte de carbono externa (CptC_{0,25HAc}) e no controle do ensaio (CptC_{Controle}). Coleta preliminar - outubro/2003.

Tipos morfológicos	CptC original	CptC 0,25HAc	CptC Controle
Filamentos	++	+++++	+++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	++	+	+
Bacilos pequenos (cerca de 1,5 µm)	+	+++	+++
Bacilos grandes (cerca de 5 µm)	+++++	++	++
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	++++	++++	++
Espirilos	++	N.O.	N.O.
Cocos	++	++	N.O.

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado.

Tabela 26 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados na amostra proveniente da região de saída do efluente, ponto do centro, antes dos ensaios de AME (SptC_{original}), após sua realização, quando se utilizou a relação S₀X₀ de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com (SptC_{0,25HAc}) e sem (SptCo_{0,25HAc}) esgotamento da matéria orgânica; na relação S₀X₀ de 0,5 g DQO g⁻¹ SV (SptC_{0,5HAc}) e os controles dos ensaios (SptC_{Controle0,25HAc}, SptCo_{Controle0,25HAc} e SptC_{Controle0,5HAc}). Coleta preliminar, outubro - 2003.

Tipos morfológicos	SptC original	SptC 0,25HAc	SptC ₀ , 5HAc	SptCo 0,25HAc	SptC Controle 0,25HAc	SptC Controle 0,5 HAc	SptCo Controle 0,25HAc
Filamentos	++++	++++	++++	++++	+	++	++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	+
Bacilos pequenos (cerca de 1,5 µm)	+++	+	++	+++	+++	++	++
Bacilos grandes (cerca de 5 µm)	++++	++	+++	+++	+	++	+
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	+++	++	+++	+++	++	N.O.	+
Espirilos semelhantes	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Cocos	N.O.	++	++	++	+	N.O.	N.O.

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado.

Tabela 27 - Análise da frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras submetidas ao ensaio de AME após sua realização quando se utilizou os ácidos HBU, HPr e HFor como fontes de carbono externas. Coleta preliminar, outubro - 2003.

Tipos morfológicos	SptC *	SptC 0,25HBU	SptC 0,5HBU	SptC 0,25HPr	SptC 0,5HPr	SptC 0,25HFor	SptC 0,5HFor
Filamentos	+++	++++	++	++++	+++	+++	+++++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	++	+++	+++	++++ +	N.O.	N.O.	N.O.
Bacilos pequenos (cerca de 1,5 µm)	++	+++	+	++	N.O.	+	+++
Bacilos grandes (cerca de 5 µm)	+++	++++	++	+++	++	+++	++++
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	++	++	++	+	++	N.O.	+
Espirilos	N.O.	N.O.	+	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Cocos	++	+	+	+++	++	+	++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente

* Amostra retirada dos frasco-reactores após o esgotamento da matéria orgânica remanescente.

Tabela 28 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes dos frascos-controle do ensaio de AME após sua realização quando se utilizou os ácidos HBU, HPr e HFor como fontes de carbono externas. Coleta preliminar, outubro/2003.

Tipos morfológicos	SptC original	SptC*	SptC Controle_ 0,25 HBU, HPr e HFor	SptC Controle 0,5 HBU, HPr e HFor
Filamentos	++++	+++	+++	+++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	N.O.	++	++++	N.O.
Bacilos pequenos (cerca de 1,5 µm)	+++	++	+	+
Bacilos grandes (cerca de 5 µm)	++++	+++	+++	+++
Estruturas semelhantes a cistos de <i>Methanosarcina</i> sp.	+++	++	+++	N.O.
Espirilos	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Cocos	N.O.	++	++	N.O.

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente. * Amostra retirada dos frasco-reactores após o esgotamento da matéria orgânica remanescente.

Os resultados da análise microscópica das amostras antes e após o ensaio de atividade metanogênica permitiram concluir que as condições do ensaio promovem alterações na microbiota presente na amostra, selecionando determinadas populações a aparentemente, aumentando o número de alguns tipos morfológicos. Consideração que deve ser observada ao utilizar o ensaio, uma vez que este foi proposto para determinar a atividade microbiana real no seu local de origem, ou seja, sem alterações na comunidade de microrganismos. Ensaios com lodos mais ativos, que requeiram menor tempo de incubação podem fornecer respostas mais próximas à essa consideração.

5.5.2. Atividade metanogênica específica (AME) - Coleta de outubro/2004

As amostras provenientes desta coleta e submetidas ao ensaio de AME não apresentaram produção de metano durante as amostragens de gás realizadas durante a fase de esgotamento da matéria orgânica, nem após a adição das fontes orgânicas que se pretendia avaliar. Esse resultado corroborou mais uma vez a discussão levantada anteriormente (itens 4.1 e 4.2), de que as condições anaeróbias da lagoa estavam comprometidas, provavelmente em decorrência das fortes chuvas e ventos ocorridos no período desta coleta, promovendo a incorporação de oxigênio e a homogeneização da massa d'água.

Como pode ser observado na Figura 12 (pg. 100), os teores de OD na lagoa durante a coleta de outubro apresentaram os menores valores entre todas as coletas, porém este fato pode ser decorrência de um rápido consumo de O_2 pela população aeróbia que estava presente na lagoa.

Segundo informações do operador do sistema (Sabesp de Registro – Unidade de Negócio do Vale do Ribeira), é comum às lagoas anaeróbias sob monitoramento da Sabesp nesta região (18 ETE's no total, sendo 11 com lagoas anaeróbias) apresentarem comportamento e características de lagoa facultativa quando o esgoto permanece muito

diluído por longos períodos, o que é característico dos períodos de chuvas e ventos intensos. A diluição do esgoto leva à aplicação de cargas orgânicas reduzidas na Lagoa Anaeróbia, permitindo que o oxigênio seja incorporado e organismos aeróbios e facultativos passem a predominar no sistema. Segundo Pescod (1996) a COV mínima para uma Lagoa Anaeróbia é de $100 \text{ gDBO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Considerando esses aspectos, supõe-se que os microrganismos envolvidos com o processo de degradação anaeróbia presentes anteriormente no sedimento da lagoa (coleta de outubro de 2003) podem ter sofrido danos importantes e/ou foram levados do sistema.

Por outro lado, entre outubro de 2004 e novembro de 2004 a diminuição da intensidade pluviométrica e dos ventos levou a uma estabilização das condições da Lagoa Anaeróbia. Em função disso, os microrganismos envolvidos nos metabolismos anaeróbios de degradação da matéria orgânica voltaram a crescer e desempenhar suas funções na lagoa. Como será visto no item seguinte, diferentemente do que ocorreu com as amostras de outubro, em novembro ocorreu atividade metanogênica a partir do sedimento coletado.

5.5.3. Atividade metanogênica específica (AME) - Coleta de dezembro/2004

5.5.3.1. Valores dos Sólidos Voláteis (SV) obtidos durante o ensaio

A partir dos resultados encontrados nos ensaios de AME realizados com as amostras da coleta preliminar optou-se aqui por realizar a determinação do SV em cada alíquota destinada a cada um dos frascos-reatores, ou seja, mesmo entre as réplicas de um mesmo teste os valores de SV foram determinados individualmente em cada frasco. Além disso, o SV foi medido em três momentos: 1) previamente a qualquer procedimento relativo ao teste, ou seja, na amostra original antes de se promover o esgotamento da matéria orgânica; 2) posterior ao esgotamento da matéria orgânica, ou seja, após a amostra ser submetida às condições do teste,

porém sem adição de substrato externo, por período suficiente para que a produção de metano se estabilizasse, sendo, então, assumido que o substrato presente na própria amostra é passível de ser consumido pelos microrganismos havia sido completamente esgotado; 3) ao final de todo o ensaio, ou seja, após adição das fontes externas e estabilização da produção de metano.

Considerando estes procedimentos, cabe ressaltar que o SV utilizado para o cálculo da quantidade de substrato externo a ser adicionado, assim como o SV inicial utilizado para os cálculos das atividades específicas foi aquele descrito no item 2. Ou seja, o SV após esgotamento da matéria orgânica degradável presente na amostra. Desta forma, ao se ler a seguir $SV_{inicial}$, este valor refere-se aos sólidos voláteis medidos após completo consumo da matéria orgânica degradável presente na amostra inicial, a menos que esteja indicado que está se referindo ao $SV_{inicial}$ da amostra original.

Os ensaios de AME realizados com as amostras obtidas na coleta de dezembro foram organizados em três grupos de ensaios com a finalidade de, no primeiro grupo, determinar a melhor relação S_0/X_0 para o teste com uma mistura de ácidos, assim como reavaliar a melhor relação S_0/X_0 quando o substrato utilizado foi o HFor. No segundo grupo de ensaios o objetivo foi o de comparar as atividades metanogênicas específicas nas diferentes regiões da lagoa utilizando a mistura de ácidos. E no terceiro grupo, a finalidade foi a de avaliar a atividade específica de diferentes grupos tróficos, assim como aprofundar o estudo do comportamento da biomassa durante o ensaio de AME. Para a consecução desses objetivos determinou-se a AME e avaliou-se o comportamento do processo nos frascos de reação por meio também da análise dos teores de ácidos orgânicos durante o processo e da determinação da concentração de DNA_{total} no início e no final do ensaio.

Como pode ser verificado nas Tabelas 29, 30 e 31, os valores de SV ao longo do ensaio foram variáveis, tal como ocorreu nos ensaios conduzidos com as amostras de outubro/2003 (Tabelas 21 e 22). Observou-se ora diminuição, ora aumento no teor de SV

determinado após o esgotamento da matéria orgânica disponível originalmente na amostra de lodo retirada da Lagoa Anaeróbia, bem como nos teores de SV_{final} dos ensaios de AME em relação aos teores de $SV_{inicial}$ determinados para cada amostra estudada. Neste ensaio o CV foi, em geral, inferior a 10%, diferentemente do que ocorreu nos ensaios com amostras da coleta preliminar, nos quais a maioria dos CV's estava acima de 10%. A exceção foi observada nos ensaios com as amostras CptC_{0,5mix} (CV de 12%) e EptC_{Controle} (CV de 13%).

Tabela 29 - Valores médios para $SV_{inicial}$ antes do ensaio de AME, $SV_{inicial}$ após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME em diferentes relações S_0/X_0 com diferentes substratos com amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Ensaio	$SV_{inicial}$ amostra original (g L ⁻¹)	$SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. (g L ⁻¹)	SV_{final} (g L ⁻¹)
CptC _{0,25mix}	3,96 ± 0,13	3,59 ± 0,07	4,62 ± 0,51
CptC _{0,5mix}	3,96 ± 0,13	3,59 ± 0,07	5,43 ± 0,59
CptC _{0,75mix}	3,96 ± 0,13	3,59 ± 0,07	6,70 ± 0,36
CptC _{0,25HFor}	3,96 ± 0,13	3,59 ± 0,07	6,39 ± 0,47
CptC _{0,5HFor}	3,96 ± 0,13	3,59 ± 0,07	7,27 ± 0,01
CptC _{Controle}	3,96 ± 0,13	3,59 ± 0,07	3,39 ± 0,18

Tabela 30 - Valores médios para $SV_{inicial}$ antes do ensaio de AME, $SV_{inicial}$ após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor) na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos do centro (EptC, CptC e SptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Ensaio	$SV_{inicial}$ amostra original (g L ⁻¹)	$SV_{inicial}$ após esgotamento da m.o. (g L ⁻¹)	SV_{final} (g L ⁻¹)
EptC _{0,25mix}	25,06 ± 9,08	29,38 ± 0,16	29,96 ± 1,41
EptC _{Controle}	25,06 ± 9,08	29,38 ± 0,16	29,64 ± 1,35
CptC _{0,25mix}	3,96 ± 0,13	3,93 ± 0,10	4,52 ± 0,04
CptC _{Controle}	3,96 ± 0,13	3,93 ± 0,10	3,97 ± 0,35
SptC _{0,25mix}	2,69 ± 0,17	2,99 ± 0,02	3,82 ± 0,40
SptC _{controle}	2,69 ± 0,17	2,99 ± 0,02	3,04 ± 0,05

Tabela 31 - Valores médios para SV_{inicial} antes do ensaio de AME, SV_{inicial} após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Ensaio	SV_{inicial} amostra original (g L⁻¹)	SV_{inicial} após esgotamento da m.o. (g L⁻¹)	SV_{final} (g L⁻¹)
CptC _{0,25HAc}	3,96 ± 0,13	3,08 ± 0,13	3,31 ± 0,18
CptC _{0,25HPr}	3,96 ± 0,13	5,77 ± 0,23	4,10 ± 0,08
CptC _{0,25HBU}	3,96 ± 0,13	3,66 ± 0,02	3,75 ± 0,10
CptC _{0,25HFor}	3,96 ± 0,13	4,00 ± 0,38	5,02 ± 0,37
CptC _{Controle}	3,96 ± 0,13	3,74 ± 0,21	3,81 ± 0,35

No primeiro grupo de ensaios (Tabela 29), observou-se que o conteúdo determinado de SV após o esgotamento da matéria orgânica foi inferior aquele obtido com a amostra antes do esgotamento. Por sua vez, o segundo grupo (Tabela 29) revelou uma resposta diferente entre os valores de SV após o esgotamento da matéria orgânica. Neste último caso, houve aumento no teor de SV. Os valores de SV do terceiro grupo de experimentos foram variáveis, com aumento e redução dos mesmos após esgotamento da matéria orgânica da amostra em relação ao SV da amostra original.

Comparando-se os valores de SV_{inicial} com o SV_{final} , pode-se verificar que no primeiro e segundo grupos de ensaios sempre ocorreu aumento do conteúdo de sólidos nos frascos-reatores com adição de fontes de carbono externas (Tabelas 29 e 30), com exceção das repetições 1 e 3 do ensaio EptC_{0,25mix}, as quais apresentaram pequena redução no teor de SV (0,8% em média) do início para o final do ensaio (Tabela 62 – Apêndice E). No terceiro grupo de ensaios observou-se comportamento semelhante ao se empregar como substratos os ácidos HAc, HBU e HFor. Nos frascos-reatores com adição de HPr ocorreu redução no teor de SV_{inicial} em relação ao SV_{final} do ensaio (Tabela 31).

Considerando-se os resultados alcançados, foi possível verificar ausência de um padrão de comportamento dos teores de SV durante o ensaio de AME, mostrando que este é

um dado que agrega alta variabilidade à resposta do ensaio, já que a medida de biomassa nas amostras foi feita com base nessa determinação. Na tentativa de se evidenciar o significado do teor de SV da amostra, notadamente como medida de biomassa no ensaio de AME, determinou-se por espectrofotometria o conteúdo do DNA total no início e final do terceiro grupo de ensaios de AME realizado com a amostra CptC, na presença dos ácido orgânicos HAc, HPr, HBu e Hfor, individualmente acrescidos ao meio.

O conteúdo de DNA_{total} (Tabela 32) apresentou um padrão de comportamento variável do início para o final do ensaio. Em alguns casos, CptC_{0,25HAc} e CptC_{0,25HBu}, permaneceu praticamente o mesmo, sendo de 9,7 µg mL⁻¹ no início para ambos os ensaios e de 9,7 e 9,8 µg mL⁻¹ no final, respectivamente para CptC_{0,25HAc} e CptC_{0,25HBu}. No ensaio CptC_{0,25HPr} ocorreu aumento do DNA_{total} do início para o fim do teste. Já para CptC_{0,25HFor} e CptC_{Controle} verificou-se diminuição do conteúdo de DNA_{total} do início para o fim do teste. Sendo que no caso do controle essa diminuição foi mais elevada, da ordem de 42%. Neste caso, pode-se supor que o conteúdo de DNA_{total} tenha diminuído devido a processos de endogenia, morte celular e degradação do DNA presente nas células. Nesse sentido, comenta-se que nos frascos controle não se adicionou nenhuma fonte de carbono, e a matéria orgânica degradável presente na própria amostra já havia sido consumida durante a primeira etapa do teste que possibilita o esgotamento da matéria orgânica.

É importante considerar na análise dessas diferenças, a presença de proteínas nas amostras, as quais interferem na medida de densidade ótica. Segundo Sambrook et al. (1989), as medidas tomadas em 260nm permitem calcular a concentração de ácidos nucleicos na amostra, e a relação entre as densidades óticas medidas em 260nm e 280nm mostra uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. Amostras puras de DNA e RNA apresentam relações $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ de 1,8 e 2,0, respectivamente. Em amostras com contaminação por proteínas ou fenol, as relações $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ são significativamente inferiores a esses valores.

Tabela 32 - SV e DNA_{total} determinados no início e no final dos ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S₀/X₀ de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Ensaio	SV _{inicial} (g L ⁻¹)	SV _{final} (g L ⁻¹)	DNA _{total} inicial (μg mL ⁻¹)	DNA _{total} final (μg mL ⁻¹)
CptC _{0,25HAc}	3,15	3,38	9,7	9,7
CptC _{0,25HPr}	6,02	4,08	9,7	11,6
CptC _{0,25HBU}	3,64	3,67	9,7	9,8
CptC _{0,25HFor}	3,74	4,62	9,7	8,3
CptC _{Controle}	3,93	4,20	9,7	5,6

Neste sentido, no ensaio CptC_{0,25HPr}, no qual ocorreu aumento do conteúdo de DNA total e a relação $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ final foi de 2,1 (Tabela 33), pode-se inferir um aumento real de microrganismos durante o ensaio, possivelmente associados às bactérias relacionadas à degradação de HPr, as quais incluem poucas espécies e, em geral, são encontradas em número reduzido em lodos metanogênicos (Öztürk, 1993). Por outro lado, em CptC_{Controle} verificou-se diminuição do DNA_{total} do início para o fim do ensaio, sendo a relação $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ final de 1,0. Nesse caso, é possível comentar sobre a interferência na leitura de proteínas, provavelmente derivadas do processo de endogenia e morte celular com liberação de proteínas celulares internas, passível de ocorrência nos sistemas de reação que não sofreram adição de fontes de carbono.

Tabela 33 - Densidades óticas (λ) em 260 e 280 nm determinadas no início (amostra original) e no final dos ensaios de AME utilizando HAc, HPr, HBU ou HFor individualmente na relação S₀/X₀ de 0,25 g DQO g⁻¹ SV nas amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Ensaio	λ_{260} nm	λ_{280} nm	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$
CptC amostra original	0,193	0,110	1,8
CptC _{0,25HAc} final	0,194	0,092	2,1
CptC _{0,25HPr} final	0,233	0,111	2,1
CptC _{0,25HBU} final	0,197	0,110	1,8
CptC _{0,25HFor} final	0,166	0,143	1,2
CptC _{Controle} final	0,112	0,106	1,0

A suposição anterior conduz ao questionamento sobre a validade da utilização de controles nos ensaios de AME, notadamente ao se promover inicialmente o esgotamento da matéria orgânica, uma vez que a microbiota dos frascos-reatores controle, ou parte dela, estará sob influência de um meio menos favorável ao seu desenvolvimento. Assim, sugere-se não descontar a atividade medida no controle daquela encontrada nos frasco-reatores com adição de substratos, sendo a atividade metanogênica específica o valor cumulativo de metano produzido dividido pela quantidade de biomassa.

Comparando-se a resposta dos teores de SV_{inicial} e SV_{final} com os valores de DNA_{total} inicial e final (Tabela 32), verificou-se que nos ensaios $CptC_{0,25HAc}$ e $CptC_{0,25HBu}$ houve tendência a manutenção dos mesmos valores no conteúdo de DNA_{total} inicial e final, tal como verificado para os conteúdos de SV_{inicial} e SV_{final} , os quais foram de, respectivamente, 3,15 e 3,38 $mg\ L^{-1}$ para $CptC_{0,25HAc}$, e de 3,64 e 3,67 $mg\ L^{-1}$ para $CptC_{0,25HBu}$.

Por outro lado, nos ensaios $CptC_{0,25HPr}$, $CptC_{0,25HPr}$ e no sistema controle, os valores do conteúdo de SV e do DNA_{total} iniciais e finais não apresentaram a mesma tendência. Verificou-se aumento significativo (20,7 %) de DNA_{total} do início para o fim no ensaio $CptC_{0,25HPr}$, enquanto o SV_{inicial} foi maior que o SV_{final} . No ensaio $CptC_{0,25HFor}$ e no controle ocorreu redução de 14 e 42 %, respectivamente, na concentração de DNA_{total} do início para o final do ensaio de AME, enquanto o teor de SV aumentou no ensaio $CptC_{0,25HFor}$ e permaneceu praticamente o mesmo no frasco-reator controle.

Essas observações mostram que a utilização do SV como medida de biomassa ativa para lodos dispersos é discutível, pois não revela com segurança o comportamento real da biomassa ativa. É fato que a resposta da determinação do conteúdo de SV não diferiu em alguns casos da resposta do DNA_{total} , sendo que esta variável é uma medida mais real de biomassa ativa.

A utilização do SV tem sido aplicada uma vez que essa medida é fácil e rápida de ser obtida, além de ser uma variável comumente avaliada em sistemas de tratamento de águas residuárias. Entretanto, considerando as discussões anteriores, o uso de SV como medida de biomassa para os ensaios de AME torna-o um teste cujos resultados precisam ser vistos com cuidado. Particularmente quando se tratar de lodo disperso. Os resultados, nesse caso, permitem apenas a comparação entre as amostras do mesmo sistema. Para lodos granulares, onde a maior parte do SV é constituída por microrganismos, o uso de SV pode ser válido, entretanto precisa ser melhor investigado. Talvez a utilização da determinação do $\text{DNA}_{\text{total}}$ possa ser um substituto ao SV, uma vez que também é uma medida rápida de ser obtida. Porém, requer um equipamento mais sofisticado no laboratório para determinação da densidade óptica de reduzidas quantidades de amostra, como descrito no item 4.10.1 de Material e Métodos. A utilização do $\text{DNA}_{\text{total}}$ precisa ser melhor investigada, uma vez que nenhum trabalho associando $\text{DNA}_{\text{total}}$, SV e AME foi encontrado na literatura para aprofundamento dessa discussão.

5.5.3.2. Consumo de ácidos voláteis durante o ensaio

Os ácidos voláteis foram avaliados para a amostra CptC coletada em dezembro de 2004 quando submetida ao teste de AME em triplicatas de frascos-reatores de 1 L com as fontes externas HAc, HBu, HPr e HFor individualmente fornecidas, ou seja, refere-se ao grupo de ensaios 3.

Nas Figuras 19 a 23 estão apresentados os gráficos com as concentrações dos ácidos acético (HAc), propiônico (HPr), butírico (HBu), fórmico (HFor) e iso-valérico (HisoVal) ao longo dos ensaios de AME para cada uma das réplicas de cada ensaio. Verificou-se que o padrão de consumo dos ácidos adicionados como fontes externas de carbono foi semelhante entre as réplicas, com exceção das amostras CptC_{0,25HPr} e CptC_{0,25HFor}.

Figura 19. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME utilizando HAc como fonte de carbono na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Figura 20. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME utilizando HPr como fonte de carbono na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Figura 21. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME utilizando HBU como fonte de carbono na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Figura 22. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME utilizando HFor como fonte de carbono na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Figura 23. Representação gráfica dos valores de produção e consumo de ácidos voláteis em cada uma das réplicas dos frascos-reatores durante o ensaio de AME com amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Figura 24. Representação gráfica dos valores de produção de CH₄ ao longo do ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBu ou HFor individualmente na relação S₀/X₀ de 0,25 g DQO g⁻¹ SV na amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Em uma das réplicas da amostra CptC_{0,25}HPr do grupo 3 de ensaios de AME (Figura 20), observou-se uma segunda fase de consumo de substrato, o que não ocorreu nas demais. Comparando-se os gráficos de consumo de substrato e de produção de metano (Figura 24), notou-se que não houve correspondência entre o comportamento do consumo do substrato e a produção do metano, sendo que esta se manteve constante mesmo quando ocorreu aumento no consumo do HPr em uma das réplicas (Figura 24, denominada repetição 3).

As repetições do ensaio CptC_{0,25HFor} também variaram entre si (Figura 22), sendo que uma delas apresentou uma inclinação mais acentuada, indicando que houve uma tendência de consumo mais rápido do substrato, enquanto a produção de metano entre as repetições foi semelhante. Essas observações podem ser associadas a possível crescimento microbiano, no qual o consumo do substrato promoveu preferencialmente o aumento de massa microbiana (anabolismo) e não a produção de CH₄.

Durante os ensaios foi observada a presença de ácidos orgânicos diferentes daqueles fornecidos como fonte de carbono. A produção e o consumo desses ácidos foram variáveis entre as repetições.

Os ácidos produzidos e detectados durante os ensaios foram os ácidos acético, propiônico, butírico e iso-valérico, sendo que o HisoVal foi o ácido produzido predominantemente nos frascos-reatores com HAc, HPr e HBu fornecidos como substrato e também nos controles (Figuras 19, 20, 21 e 22). A produção desse ácido foi expressiva em todos os ensaios alcançando picos de concentração que variaram de 440 a 1060 mg L⁻¹. Possivelmente, o HisoVal foi gerado por meio dos metabolismos de redução do CO₂ pelo H₂ e de biossíntese a partir do acetato e propionato (LIN *et al.*, 1986). Esses autores, realizaram ensaios com lodo digerido mesofílico de esgoto sanitário alimentado com uma mistura de ácidos (2HAc:1HPr:1HBu) em digestores anaeróbios do tipo quimiostato, e também detectaram a presença do HisoVal como consequência dos metabolismos indicados anteriormente. Mecanismo semelhante foi citado por DOLFING (1988) ao descrever a formação de ácidos voláteis de cadeia mais longa a partir de componentes de dois carbonos, como o acetato.

O aparecimento do HisoVal, assim como dos outros ácidos, pode também ter ocorrido devido ao consumo de material orgânico de difícil degradação ou recalcitrante presente na amostra e que não foi utilizado durante a fase de esgotamento da matéria orgânica. No caso

dos controles, o aparecimento desses ácidos pode estar associado ao processo de endogenia, uma vez que se observou acentuada queda no $\text{DNA}_{\text{total}}$ (Tabela 32) do início para o final do ensaio, como discutido no item anterior.

No ensaio com HFor (Figura 22), a concentração de HisoVal foi acentuadamente menor, alcançando no máximo 104 mg L^{-1} na repetição 1, 29 mg L^{-1} na repetição 2. Contudo, não foi detectado na repetição 3. Neste ensaio, o ácido produzido mais expressivamente foi o HAc, o qual pode ter sido gerado via metabolismo de transformação do HFor em $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (CHYNOWEH e PULLAMMANAPPALLILK, 1996 e GARCIA et al., 2000), seguido de homoacetogênese, com a formação de HAc (HARPER e POHLAND, 1985, FERRY, 1993 e SCHINK, 1997). A formação do HisoVal neste ensaio, foi, então consequência do metabolismo descrito anteriormente de formação de ácidos voláteis de cadeia maior a partir do acetato (DOLFING, 1988).

O HFor não foi produzido durante os ensaios tanto nos frascos-reatores com adição de fontes, como nos frascos-reatores controles, com exceção da repetição 1 do controle (Figura 23), na qual foi detectado o HFor na primeira amostragem (concentração de 222 mg L^{-1}).

Comparando-se o padrão de consumo dos substratos adicionados (Figuras 19 a 23) com a produção de metano (Figura 24), observou-se que nos ensaios $\text{CptC}_{0,25\text{HAc}}$ e $\text{CptC}_{0,25\text{HABu}}$ houve correspondência entre consumo e produção. Já nos ensaios $\text{CptC}_{0,25\text{HPr}}$ e $\text{CptC}_{0,25\text{HFor}}$ observou-se a ocorrência de aumento no consumo de substrato que não correspondeu a aumento na produção de metano. As respostas podem ser associadas ao metabolismo biossintético, com consequente aumento no número de microrganismos. Os aumentos nos valores de SV e $\text{DNA}_{\text{total}}$ para, respectivamente, $\text{CptC}_{0,25\text{HFor}}$ e $\text{CptC}_{0,25\text{HPr}}$ (Tabela 32) corroboram essa afirmação.

As concentrações detectadas para os ácidos apresentaram-se mais elevadas do que aquelas normalmente esperadas em efluentes de reatores anaeróbios, as quais, segundo Speece

(1996) estão na faixa de 100 a 300 mg L⁻¹. Por outro lado, este mesmo autor destaca que para ensaios de determinação de toxicidade de águas residuárias sobre a biomassa anaeróbia, substrato em excesso deve ser fornecido para evitar inibição por falta de substrato, segundo este autor, para o HPr por exemplo, concentrações de 3000 mg L⁻¹ são adequadas para esse tipo de ensaio (SPEECE, 1996). O excesso de substrato não deve, entretanto, inibir a microbiota devido elevadas concentrações. Nesses ensaios, essa condição parece não ter ocorrido, uma vez que se verificou o decaimento na concentração dos substratos fornecidos, com geração de outros ácidos orgânicos ou de metano. Ou seja, a relação S_0/X_0 foi adequada para essa amostra.

Com base nos resultados da determinação dos ácidos ao longo do ensaio de AME pode-se concluir que as vias metabólicas utilizados pelos microrganismos presentes na amostra incluíram a homoacetogênese, biosíntese de ácidos voláteis de cadeia maior, como o ácido propiônico, butírico e iso-valérico, a partir do acetato. Além desses metabolismos, verificou-se os processos de metanogênese acetotrófica e hidrogenotrófica com formação de metano.

5.5.3.3. Distribuição da concentração de CO₂ no headspace dos frasco-reatores.

No segundo grupo de ensaios de AME utilizando a mistura de ácidos (2HAc:1HPr:1HBu:1HFor) como fonte de carbono e realizada com as amostras provenientes das regiões de entrada, central e de saída da lagoa, observou-se consumo de CO₂ sempre que foram adicionados substratos (Figura 25). A redução na concentração de CO₂ no headspace dos reatores foi de cerca de 46% para EptC e CptC, e de 77 % para SptC. O mesmo comportamento não foi detectado nos frascos controle, indicando que a presença de algum dos ácidos da mistura levou ao consumo do CO₂.

A distribuição de CO_2 durante o grupo de ensaios empregando a adição individual dos ácidos (Figura 26) revelou que o HFor levou à redução de sua concentração no headspace dos frascos-reatores, uma vez que nesse grupo ocorreu consumo de CO_2 apenas quando o HFor foi adicionado, sendo que a redução na concentração de CO_2 foi de 87%.

Figura 25. Valores de produção de CO_2 ao longo do ensaio de AME utilizando mistura de ácidos (HAC:HPr:HBu:HFor) na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE e SptE), do centro (EptC, CptC e SptC) e da direita (EptD, CptD e SptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Figura 26. Valores de distribuição de CO₂ no headspace ao longo do ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBu ou HFor individualmente na relação S₀/X₀ de 0,25 g DQO g⁻¹ SV na amostra proveniente da região central da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

No ensaio CptC_{0,25}HFor observou-se consumo mais acentuado de CO₂ (Figura 26) entre 55 e 70 horas após o início do monitoramento dos gases no headspace. Esse período antecedeu a fase de consumo mais acelerado do HFor e coincidiu com o início da geração de HAc nesses frascos (Figura 22), indicando a transformação de HFor em CO₂/H₂ seguida de homoacetogênese. Nos ensaios CptC_{0,25}HAc, CptC_{0,25}HPr, CptC_{0,25}HBu e CptC_{Control} não se observou consumo de CO₂.

A redução na concentração de CO₂ pode também estar associada ao equilíbrio do sistema carbônico (H₂CO₃; HCO₃⁻; CO₃⁻²). Compostos como o CO₂ e ácidos graxos voláteis de cadeia curta, tendem a abaixar o pH, enquanto cátions geradores de alcalinidade, como os

íons de nitrogênio amoniacal provenientes da degradação de proteínas e o sódio originado da ionização do sal utilizado como substrato para os ensaios de AME, aumentam a alcalinidade e o pH (SPEECE, 1996 e FORESTI *et al.*, 1999).

5.5.3.4. Valores de AME

Neste item serão apresentados os resultados da AME dos três grupos de ensaio realizados com as amostras coletadas em dezembro/2004. Os valores das atividades específicas discutidos foram calculados por meio da taxa de produção cumulativa de metano em função da concentração de biomassa determinada por meio do conteúdo de SV da amostra. A determinação da produção de CH₄ foi feita por cromatografia em fase gasosa e plotada em um gráfico. O valor da tangente no trecho de inclinação máxima de cada curva forneceu a medida de atividade. Foram escolhidos 4 pontos para determinar a reta de maior inclinação na curva de produção de metano, a qual corresponde à maior atividade microbiana. A unidade de medida utilizada foi mg CH₄ g⁻¹ SV h⁻¹, a qual pode divergir da unidade utilizada por alguns outros autores em relação à medida de produção de metano. Entretanto, essas diferentes unidades podem ser uniformizadas por meio de relações estequiométricas, tornando-se possível a comparação entre elas. Cabe ressaltar, que para isso, é necessário que os volumes de metano medidos refiram-se às condições normais de temperatura e pressão (CNTP) e que as atividades metanogênicas medidas sejam as taxas específicas máximas de conversão de substratos da biomassa presente na amostra ensaiada (PENNA, 1994).

Ensaio do Grupo 1

No primeiro grupo de ensaios foram analisadas as diferentes relações substrato/microrganismo (S₀/X₀), quais sejam 0,25; 0,5 e 0,75 gDQO g⁻¹SV, sendo as fontes de carbono a mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor na proporção 2:1:1:1. Os resultados que serão discutidos também incluem o teste individual feito com a amostra CptC na presença

de HFor. Esse teste foi feito em função dos resultados obtidos com as amostras de outubro de 2003, os quais mostraram que a melhor relação S_0/X_0 era de 0,5 gDQO g⁻¹SV, entretanto ficaram dúvidas sobre a correção desse resultado como discutido no item 5.5.1. O tempo de duração do ensaio foi de 74 horas, o qual foi suficiente para a estabilização da produção de metano.

Verificou-se que a mais adequada relação S_0/X_0 foi a de 0,25 gDQO g⁻¹SV com a mistura de ácidos como fonte de carbono (Tabela 34), uma vez que as AMEs mais elevadas foram encontradas nessa relação quando comparadas com aquelas determinadas para as relações de 0,5 e 0,75 gDQO g⁻¹SV.

A produção teórica de CH₄ comparada com a medida (Tabela 35) mostrou que o consumo do substrato adicionado foi bastante reduzido nos frascos-reatores com relações S_0/X_0 de 0,5 e 0,75 gDQO g⁻¹SV, provavelmente devido a inibição da atividade microbiana pelo excesso de substrato adicionado. Nessas relações, a produção medida de metano foi 10 a 18% daquela esperada. Os frascos-reatores, com relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV, apresentaram 40% do valor teórico total de metano esperado.

O ensaio realizado com HFor nas relações 0,25 e 0,5 gDQO g⁻¹SV resultou em valores mais elevados de AME na menor relação S_0/X_0 . Comparando-se esses valores com os encontrados para a amostra coletada no mesmo ponto em outubro/2003, verificaram-se diferenças, pois a mais adequada relação do ensaio anterior foi de 0,5 gDQO g⁻¹SV (Tabela 22).

Naquele ensaio, como discutido anteriormente (item 5.5.1), os valores calculados foram comprometidos devido ao crescimento microbiano no início do ensaio, quando se adicionou HFor na relação 0,25 gDQO g⁻¹SV, já que o ensaio com 0,5 foi realizado como segunda alimentação.

Tabela 34 - Valores médios de Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do SV_{inicial} , antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g⁻¹ SV e utilizando uma mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25, 0,5 e 0,75 g DQO g⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Amostra	AMA (SV_i) ¹ (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV_i) ² (mg CH ₄ g ⁻¹ h ⁻¹)	AMA (SV_f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV_i^2/SV_f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_i) ¹ (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_i) ² (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_i/SV_f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
CptC _{0,25HFor}	0,16 ± 0,004	0,17 ± 0,005	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,006	0,11 ± 0,005	0,12 ± 0,005	0,05 ± 0,007	0,07 ± 0,006
CptC _{0,5HFor}	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,005	0,06 ± 0,007	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	-0,005 ± 0,003	0,01 ± 0,003
CptC _{0,25mix}	0,22 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,14 ± 0,04	0,16 ± 0,04
CptC _{0,5mix}	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,13 ± 0,005	0,16 ± 0,001	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,005	0,11 ± 0,001
CptC _{0,75mix}	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,10 ± 0,003	0,12 ± 0,004	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,04 ± 0,003	0,07 ± 0,004
CptC _{Controle}	-	-	-	-	0,04 ± 0,005	0,05 ± 0,005	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,004

¹ SV da amostra original antes do esgotamento da m.o.

² SV no frasco-reator após o esgotamento da m.o.

A comparação da produção medida e teórica de CH_4 (Tabela 35) mostrou novamente que na maior relação S_0/X_0 ocorreu inibição do consumo do substrato, sendo que apenas 11% do CH_4 esperado foi produzido. Enquanto na relação $0,25 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SV}$, a produção medida foi de 33% em relação à teórica.

Tabela 35 - Valores médios da produção teórica e medida de metano no ensaio de AME utilizando HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 $\text{g DQO g}^{-1}\text{SV}$, e utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25, 0,5 e 0,75 $\text{g DQO g}^{-1}\text{SV}$ com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro – 2004.

Ensaio	Produção teórica esperada de CH_4 (mg)	Produção total medida de CH_4 (mg)	Relação produção medida / teórica
CptC _{0,25HFor}	0,775	$0,25 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,02$
CptC _{0,5HFor}	1,550	$0,18 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,005$
CptC _{0,25mix}	0,775	$0,31 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,02$
CptC _{0,5mix}	1,550	$0,28 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$
CptC _{0,75mix}	2,324	$0,25 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$

Pode-se então concluir que para o lodo estudado, a melhor relação S_0/X_0 é a de $0,25 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SV}$ quando se utiliza uma mistura de ácidos ou quando se utiliza o HFor individualmente. Sendo que o mesmo resultado foi encontrado para os demais ácidos (HAc, HPr e HBU) em ensaio anterior, o qual foi discutido no item 5.5.1.

Ensaio do Grupo 2

A Tabela 36 apresenta os resultados do ensaio de AME realizado com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente, no ponto do centro em relação ao fluxo, utilizando-se uma mistura dos ácidos HAc, HBU, HPr e HFor na proporção 2:1:1:1. O tempo de duração do ensaio foi de 102 horas.

Considerando os cálculos feitos com a média entre o $\text{SV}_{\text{inicial}}$ após esgotamento da matéria orgânica e o SV_{final} , pode-se observar que as atividades microbianas mais elevadas

estavam concentradas na região central ponto do centro em relação ao fluxo – CptC ($0,30 \pm 0,02 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$), seguidas por SptC ($0,16 \pm 0,01 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$) e EptC ($0,08 \pm 0,02 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$).

O ensaio com a amostra EptC apresentou elevada variação entre as réplicas, com CVs oscilando de 17 a 31% da média (Tabela 68 – Apêndice E). Esta amostra foi a que apresentou teores de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ mais altos (Tabela 30), mostrando que a realização do ensaio de AME com amostras complexas e com altos teores de $\text{SV}_{\text{inicial}}$ é particularmente problemática quanto aos seus resultados, mesmo após se promover o esgotamento da matéria orgânica presente no resíduo. Observando-se a AME encontrada nos frascos controle foi possível verificar que ainda havia matéria orgânica a ser degradada na amostra, uma vez que as atividades desses controles foram mais elevadas quando comparadas com as dos controles das demais amostras estudadas no período. Além disso, as AMAs dos ensaios EptC_{0,25} se mantiveram próximas das AMAs encontradas para as demais amostras, CptC e SptC. O que pode indicar mascaramento dos resultados da amostra EptC, a qual apresentou menores atividades em função das atividades elevadas nos controles, onde havia matéria orgânica remanescente da própria amostra para ser degradada, e não porque os microrganismos presentes na amostra fossem menos ativos que os das amostras CptC e SptC.

As AMEs mais baixas da amostra EptC podem também estar associadas a inibição dos microrganismos por excesso de substrato. A Tabela 37 apresenta as produções medida e teórica, em que se pode observar apenas uma pequena porcentagem (16 a 20%) de CH_4 produzida em relação àquela esperada, indicando que muito pouco do substrato adicionado foi consumido. Provavelmente esse substrato somou-se a ácidos já presentes na amostra, levando à inibição da atividade da microbiota e, portanto, a uma baixa atividade metanogênica.

Tabela 36 - Valores médios de Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do SV_{inicial} , antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e SV_{final} no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e Hfor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (EptC, CptC e SptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Amostra	AMA (SV _i) ¹ (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i) ² (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i ² /SV _f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) ¹ (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) ² (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i ² /SV _f) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
EptC _{0,25mix}	0,30 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02
EptC _{Controle}	-	-	-	-	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01
CptC _{0,25mix}	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,30 ± 0,02
CptC _{Controle}	-	-	-	-	0,05 ± 0,005	0,05 ± 0,004	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
SptC _{0,25mix}	0,28 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01
SptC _{Controle}	-	-	-	-	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,001	0,06 ± 0,0005

¹ SV da amostra original antes do esgotamento da m.o.

² SV no frasco-reator após o esgotamento da m.o.

Tabela 37 - Valores médios da produção teórica e medida de metano no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro – 2004.

Ensaio	Produção teórica esperada de CH ₄ (mg)	Produção total medida de CH ₄ (mg)	Relação produção medida / teórica
EptC _{0,25mix}	6,390	1,10 ± 0,16	0,17 ± 0,02
CptC _{0,25mix}	0,878	1,26 ± 0,39	1,43 ± 0,45
SptC _{0,25mix}	0,646	0,28 ± 0,01	0,44 ± 0,02

As AMEs das amostras da lagoa estudada apresentaram valores comparáveis e coerentes com as atividades de lodos de outros sistemas quando os ensaios de atividade metanogênica utilizaram a mesma metodologia e as mesmas fontes orgânicas, como é o caso dos trabalhos de Oliveira *et al.* (1997), Steil *et al.* (2004), Lapa (2006) e Carvalho (2006).

Oliveira *et al.* (1997) estudaram a biomassa granular de um reator UASB tratando água residuária de suinocultura e encontraram valores de AMEs que variaram de 0,32 a 2,08 mg CH₄ g⁻¹ SV h⁻¹. A metodologia para os ensaios de AME e para o cálculo da mesma foi a mesma utilizada neste trabalho, assim como as fontes e a relação entre elas, já que o autor utilizou os ácidos HAc, HPr, HBu e HFor, na relação 2:1:1:1, ou seja, igual à que foi utilizada no grupo de ensaios 2 e cujos resultados são discutidos comparativamente aqui. Oliveira *et al.* (1997) utilizaram a média entre SV_{inicial} e SV_{final} no cálculo da AME. Na comparação de dados que se segue, os valores utilizados deste trabalho referem-se aqueles calculados considerando como biomassa a média entre SV_{inicial} e SV_{final}. Os valores de atividade encontrados para o lodo granular foram mais elevados do que a atividade encontrada para o lodo da lagoa, o que seria esperado, uma vez que o lodo granular possui características estruturais que melhoram a atividade microbiana.

É importante ressaltar que os ensaios com biomassa granular de UASB que apresentaram as AMEs mais elevadas foram realizados com lodo lavado, ou seja a m.o. remanescente do resíduo tratado foi retirada da amostra de lodo. Por outro lado, as amostras

com AMEs mais baixas foram realizados sem a lavagem do lodo, ou seja a m.o. remanescente do resíduo e passível de ser degradada estava presente promovendo atividades nos controles mais elevadas e interferindo no resultado do ensaio. Nesse caso, os resultados desses autores apresentaram-se próximos ($0,32 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$) do encontrado na amostra CptC ($0,30 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$). De acordo com Oliveria (1997) os aumentos da AME para o lodo granular lavado podem ser atribuídos ao efeito da retirada dos sólidos finos com a lavagem do lodo, conduzindo à consideração de que os mesmos prejudicam a AME. O autor observou que os valores da atividade metanogênica aparente (AMA) para o lodo bruto com AME de $0,32 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$ foi de $1,12 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$ para o frasco controle e de $1,44 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$ a média dos frascos com as fontes de ácidos graxos voláteis, mostrando que, neste caso, a AME (AMA dos frascos com ácidos graxos menos a AMA do frasco controle) foi baixa em virtude do alto valor da AMA do controle, o qual pode ser atribuído à presença de substrato disponível para a metanogênese no frasco controle, como veio sendo discutido neste trabalho ao longo do item 5.5 em relação à presença de material orgânico digerível na amostra. Por isso, a importância em se promover o esgotamento da matéria orgânica presente na amostra antes do início do ensaio. No caso de lodos granulares, isso pode ser feito promovendo a sua lavagem, entretanto, para lodos dispersos só pode ser feito promovendo a digestão anaeróbia dessa matéria orgânica.

Ao se comparar a AMA do ensaio CptC_{0,25mix} (Tabela 36) com a AMA do lodo granular que apresentou AME semelhante a CptC_{0,25mix}, verifica-se valores mais próximos do que seria esperado ao se comparar lodo disperso com lodo granular, o qual apresentaria atividade microbiana mais elevada. No ensaio CptC_{0,25mix} a AMA foi de $0,36 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$ enquanto para o lodo granular foi de $1,44 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$.

Steil *et al.* (2004) avaliaram a AME de lodo proveniente de biodigestores rurais tratando individualmente águas residuárias de avicultura de postura, avicultura de corte e

suinocultura. A metodologia para desenvolvimento do teste, a forma de cálculo da AME, o SV utilizado no cálculo (média entre SV_{inicial} e SV_{final}), o substrato do teste (mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor na proporção 2:1:1:1) e a relação S_0/X_0 (0,25 g DQO g^{-1} SV) foram os mesmos utilizados neste grupo de ensaios. A biomassa desses biodigestores caracterizou-se por ser dispersa como o lodo da lagoa anaeróbia, ou seja, a interferência da m.o. no ensaio de AME foi um fato relevante, como é discutido pela própria autora do trabalho. As AMES encontradas foram de 0,54; 0,30 e 0,05 $mg\ CH_4\ g^{-1}\ SV\ h^{-1}$ respectivamente para resíduos de avicultura de postura, avicultura de corte e suinocultura. Pode-se observar que os valores de atividade microbiana foram próximos dos encontrados para as amostras da lagoa quando comparados com a atividade no biodigestor alimentado com resíduos de avicultura de corte.

A comparação dos valores encontrados neste trabalho com os encontrados nos trabalhos de Lapa (2006) e Carvalho (2006) mostrou atividades consideravelmente menores para o lodo disperso da lagoa. A metodologia do teste, o cálculo da AME, o SV utilizado no cálculo (média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e SV_{final}), o substrato do teste (2HAc:1HPr:1HBu:1HFor), assim como a relação S_0/X_0 (0,25 g DQO g^{-1} SV) também foram os mesmos utilizados neste grupo de ensaios. A atividade microbiana mais intensa nos trabalhos das autoras foi um resultado esperado, uma vez que a biomassa estudada pelas autoras apresentava características que são esperadas contribuir consideravelmente para um melhor desempenho da biomassa, além de possuírem, provavelmente, uma quantidade menor de matéria orgânica remanescente do resíduo para ser degradada.

Carvalho (2006) avaliou lodo granular de UASB tratando esgoto sanitário, o qual apresentou atividades microbianas variando de 1,31 a 9,34 $mg\ CH_4\ g^{-1}\ SV\ h^{-1}$. Lapa (2006) submeteu ao ensaio de AME biomassa imobilizada em espuma de poliuretano proveniente de

reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais tratando esgoto sanitário. Os valores de AMEs encontrados permaneceram em torno de $15 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$.

Ensaio do Grupo 3

Nesse grupo de ensaios realizado com a amostra da região central CptC foi utilizada uma relação S_0/X_0 de $0,25 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SV}$ para os ácidos HAc, HBu, HPr e HFor, adicionados individualmente. O tempo de duração do ensaio foi de 118 horas, o qual correspondeu ao tempo necessário para estabilização da produção de metano.

Verificou-se o maior valor de AME quando a fonte de carbono utilizada foi o HAc (Tabela 38). O valor de AME encontrado para o HPr foi sempre o mais baixo em relação a todas as outras fontes. O que está possivelmente relacionado ao fato de que a degradação do HPr só começa a se tornar favorável à pressão parcial de hidrogênio de 10^{-4} atm (FORESTI, 1994). Portanto, é necessário que a concentração de hidrogênio no meio seja reduzida, o que só ocorre quando bactérias utilizadoras de hidrogênio (metanogênicas, acetogênicas e redutoras de sulfato) estão presentes (ZEHNDER, 1988). Em biomassa dispersa a proximidade dos microrganismos é aleatória, o que pode dificultar a associação sintrófica entre as degradadoras de HPr e as consumidoras de hidrogênio, levando a baixas atividades específicas com o HPr.

Para os ácidos HBu e HFor, as atividades foram as mesmas no cálculo realizado com a média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e o SV_{final} . Lembrando que a média entre essas medidas foi o valor escolhido para representar a biomassa, já que a literatura sugere o uso da média entre SV_{inicial} e SV_{final} para o cálculo da AME. Além disso, os ensaios de AME realizados com a amostra de outubro de 2003 sugeriram que o uso do SV_{inicial} após esgotamento da m.o. é o mais adequado, já que elimina a m.o. passível de ser degradada do conteúdo total de m.o. da amostra, tornando essa medida mais próxima da biomassa ativa real.

Analisando a variação entre as réplicas foi possível observar que para o ensaio CptC_{0,25HBU}, o CV esteve sempre abaixo de 10%, independente do SV utilizado no cálculo (Tabela 70 – Apêndice E). Para os ensaios CptC_{0,25HAc} e CptC_{0,25HFor}, o CV encontrado esteve um pouco acima de 10% (11 e 12%, respectivamente) quando utilizou-se para cálculo o SV após esgotamento da matéria orgânica como medida da biomassa. Para o ensaio com HPr, o CV esteve sempre acima de 20% e para o controle o CV foi de 12 e 15% dependendo do conteúdo de SV utilizado no cálculo. Essas observações levaram às conclusões de que o comportamento da biomassa não foi uniforme quando o material a ser degradado era de difícil metabolismo, o que pode ser suposto para os controles (material recalcitrante presente na amostra) e também para os frascos-reatores com HPr como fonte externa de carbono. Uma vez que o HPr é um substrato reconhecido de degradação complexa em sistemas anaeróbios por exigir condições estritas de pH, pressão parcial de H₂, além de microrganismos específicos para sua metabolização (SPEECE, 1996). Com base nos resultados obtidos pode-se inclusive supor que a concentração de 0,25 gDQO g⁻¹SV para HPr provocou inibição da microbiota neste ensaio. Na Tabela 39, verifica-se que a relação produção medida de CH₄/produção teórica foi bastante reduzida para o HPr (0,21 ± 0,002), embora a porcentagem de consumo de substrato (53% em média) tenha sido semelhante às outras fontes. Esse comportamento pode indicar que a microbiota responsável pelo consumo de HPr pode ter utilizado o ácido para crescimento microbiano, a fim buscar um equilíbrio entre a concentração de HPr no meio e o número de microrganismos envolvidos na sua degradação. Por isso, observou-se o consumo do HPr e reduzida geração de CH₄, ou seja, as bactérias não metanogênicas envolvidas, utilizaram o substrato para anabolismo e não para catabolismo com geração de substratos para metanogênese e conseqüente formação de CH₄.

Tabela 38 - Valores médios para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do SV_{inicial} , antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e SV_{final} na amostra submetida ao ensaio de AME utilizando HAC, HPr, HBu ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV e proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Amostra	AMA (SV_i) ¹ (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV_i) ² (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA ($SV_{\bar{t}}$) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA ($SV_i^2/SV_{\bar{t}}$) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_i) ¹ (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_i) ² (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME ($SV_{\bar{t}}$) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME ($SV_i^2/SV_{\bar{t}}$) (mg CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
CptC _{0,25HAc}	0,24 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,02
CptC _{0,25HPr}	0,04 ± 0,004	0,03 ± 0,002	0,04 ± 0,005	0,04 ± 0,003	0,02 ± 0,004	0,004 ± 0,003	0,02 ± 0,005	0,01 ± 0,003
CptC _{0,25HBu}	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01
CptC _{0,25HFor}	0,24 ± 0,004	0,24 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,004	0,21 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,02
CptC _{Controle}	-	-	-	-	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,004

¹ SV da amostra original antes do esgotamento da m.o.

² SV no frasco-reator após o esgotamento da m.o.

Tabela 39 - Valores médios da produção teórica e medida de metano durante o ensaio de AME com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro - 2004.

Ensaio	Produção teórica esperada de CH ₄ (mg)	Produção total medida de CH ₄ (mg)	Relação produção medida / teórica
CptC _{0,25HAc}	12,51	4,33 ± 0,15	0,35 ± 0,02
CptC _{0,25HPr}	7,86	1,62 ± 0,02	0,21 ± 0,002
CptC _{0,25HBu}	8,86	3,88 ± 0,25	0,44 ± 0,06
CptC _{0,25HFor}	6,67	4,60 ± 0,18	0,69 ± 0,04

Comparando-se os valores das AMEs obtidos utilizando-se o HAc na relação 0,25 g DQO g⁻¹SV da amostra CptC coletada em dezembro de 2004 (0,27±0,02 mg CH₄ g⁻¹ SV h⁻¹ - Tabela 38) com os de outubro de 2003 (0,47±0,16 mg CH₄ g⁻¹ SV h⁻¹ - Tabela 21), verificou-se que ocorreu redução significativa (cerca de 50%) da atividade microbiana encontrada neste ponto de coleta da lagoa de outubro/2003 para dezembro/2004. O que pode estar associado ao desbalanceamento do sistema de tratamento devido às chuvas e ventos intensos ocorridos na região no período imediatamente anterior à coleta de dezembro de 2004, ocasionando danos aos microrganismos anaeróbios e até o seu carreamento para fora do sistema, o que pode ser verificado em outubro de 2004, quando a AME das amostras foi nula (item 5.5.2).

Avaliando-se os valores de AME obtidos utilizando-se a mistura de ácidos como substrato (Tabela 36) e aqueles encontrados quando os ácidos HAc, HPr, HBu e HFor serviram como fonte de carbono individualmente testadas (Tabela 38), foi possível verificar que o ensaio com a mistura de ácidos levou a atividade microbiana mais elevada. Entretanto, a soma das atividades de cada ácido fornecido individualmente (0,64 mg CH₄ g⁻¹SV h⁻¹ em média, considerando os resultados calculados a partir da média entre o SV inicial após esgotamento da m.o. e o SV final) foi mais elevada do que a atividade total encontrada quando se forneceram todos os ácidos em conjunto.

Araújo (1995) utilizou a mesma metodologia de ensaio para biofilme desenvolvido em camada suporte (areia com aproximadamente 0,2 mm) de reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário. A autora realizou o ensaio com biofilme íntegro e macerado. A comparação dos resultados das atividades microbianas individuais mostrou que para HAc a AME do lodo da lagoa anaeróbia ($0,27 \pm 0,02 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$) esteve dentro da faixa de atividades verificada para o biofilme (0,096 a $0,528 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$), sendo que as maiores atividades foram determinadas nos biofilmes íntegros em relação ao biofilme macerado (0,096 a $0,24 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$). No ensaio com HPr a atividade do lodo da lagoa anaeróbia ($0,01 \pm 0,003 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$) foi semelhante apenas à atividade mais baixa encontrada para o biofilme (0,012 a $0,37 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$), a qual se referiu a AME do lodo macerado. A atividade de degradação do HBu para o lodo da lagoa anaeróbia ($0,18 \pm 0,01 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$) manteve-se na faixa de AMEs encontradas para o biofilme macerado (0,064 a $0,368 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$) e semelhante ou inferior em relação ao biofilme íntegro (0,16 a $0,51 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$). O consumo do HFor verificado para a biomassa da lagoa anaeróbia ($0,18 \pm 0,02 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$) foi superior a maior parte das AMEs encontradas para o biofilme tanto macerado quanto íntegro (0,032 a $0,048 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV h}^{-1}$). Em apenas uma das amostras ensaiadas, a atividade do biofilme íntegro foi levemente superior àquela encontrada para o lodo da lagoa anaeróbia, sendo de 0,24. Possivelmente, as atividades semelhantes encontradas entre lodo da lagoa e biofilme para o HFor deve-se ao fato de que as relações S_0/X_0 utilizadas pela autora foram, em média, de $0,016 \text{ mg DQO g}^{-1} \text{SV}$, ou seja muito inferiores à que foi usada neste trabalho ($0,25 \text{ mg DQO g}^{-1} \text{SV}$), o que pode ter levado a AMEs subestimadas pela falta de substrato em concentração ótima.

É interessante notar, a partir da comparação com os resultados de AMEs de biofilme no trabalho de Araújo (1995), que as atividades encontradas para as amostras da lagoa estiveram sempre mais próximas das atividades encontradas para o lodo macerado (exceção

para o HFor), ou seja semelhantes a uma biomassa com mesma característica estrutural de biomassa dispersa. Outro ponto a destacar, é o fato de que o biofilme íntegro apresentou AMEs pouco mais elevadas (de no máximo cerca de três vezes, como foi o caso do HBu – 0,512 mg DQO g⁻¹ SV para o biofilme e 0,18 mg DQO g⁻¹ SV para amostra da lagoa) que as da lagoa. A comparação das atividades do lodo da lagoa com outras biomassas imobilizadas (discutido para os ensaios do grupo 2, mostraram que estas últimas alcançaram AMEs muito mais elevadas. Esta constatação pode estar relacionada ao fato de que as relações S₀/X₀ utilizadas por Araújo (1995) foram, na maioria dos casos, bastante inferiores àquela usada para as amostras da lagoa (0,25 mg DQO g⁻¹ SV), variando de 0,1 a 0,24 nos ensaios com HAc, 0,09 a 0,2 para HPr e 0,11 a 0,26 para HBu. Concentrações muito baixas de substrato podem levar a AMEs subestimadas como discutido no parágrafo anterior para o HFor. Salienta-se, portanto, com base nessa discussão, a relevância de se testar diferentes concentrações de substrato em relação à biomassa inicial para que o teste de AME apresente, de fato, o potencial máximo dessa biomassa na conversão de determinada fonte de carbono.

A partir dos resultados apresentados para os três grupos de ensaios de AME realizados com as amostras coletadas em dezembro de 2004, e comparados com os resultados de outros trabalhos que utilizaram metodologia igual, mesmo valor de SV para o cálculo da atividade e os mesmos substratos, pode-se concluir que os valores encontrados neste trabalho apresentaram-se coerentes com a literatura. A comparação feita com lodos granulares e aderidos a suporte mostrou atividade mais elevada para a microbiota nestas estruturas, o que era esperado, uma vez que essas formações melhoram as atividades microbianas, uma vez que possibilitam a maior concentração admissível de microrganismos e com isso pode-se explicar o máximo possível de sua potencialidade natural (CAMPOS, 1992). As atividades encontradas na literatura para outros lodos dispersos mantiveram-se próximas daquelas encontradas para o lodo da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati, embora o tipo de sistema e o

resíduo tratado por aqueles lodos apresentassem características diferentes das do lodo estudado neste trabalho. A comparação com lodos de outras lagoas anaeróbias não foi possível, pois não se encontrou trabalho com essa abordagem nas bases de dados.

5.5.3.5. ExAMEs microscópicos das amostras dos testes de AME – Coleta dezembro/2004

As amostras de sedimento da lagoa examinadas sobre microscopia óptica comum incluem aquelas destinadas aos grupos de ensaio 2 e 3, ou seja, no teste de AME com a mistura de ácidos e as amostras EptC, CptC e SptC, e no teste com os ácidos fornecidos individualmente e a amostra CptC. Os exAMEs foram feitos antes do início e no final do teste.

Os tipos morfológicos microbianos observados sob microscopia de contraste de fase no início e final dos ensaios de AME foram bastante semelhantes (Figura 27). Como ocorreu com as amostras de outubro/2003, verificou-se variação na frequência dos tipos morfológicos encontrados (Tabelas 40 a 43). Entretanto, nesse caso, a variação não foi tão intensa como nas amostras examinadas de outubro/2003, provavelmente em função do tempo de ensaio que foi cerca de duas vezes maior naquele experimento (216 horas) em relação a dezembro/2004 (103 e 118 horas para o segundo e terceiro grupos de ensaio, respectivamente).

Figura 27. Fotomicrografia dos tipos morfológicos predominantes nas amostras após a realização do ensaio de AME. (a) Cocos; (b) Feixe de filamentos com vesículas de gás semelhantes a *Methanosaeta* sp; (c) Filamentos e bacilos; (d) Filamento; (e) Bacilos e cocos; e (f) filamento com vesículas de gás. Microscopia de contraste de fase, aumento 1500x. Coleta dezembro - 2004.

Tabela 40 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de entrada do afluente na Lagoa Anaeróbia, ponto do centro, EptC, antes e após a determinação da AME quando utilizou-se mix de ácidos como fonte de carbono na relação S_0X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV. Coleta dezembro - 2004.

Tipos morfológicos	EptC antes AME	EptC após AME	EptC Controle
Filamentos	+++++	++++	+++++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	+++	++	+++
Cocos	++	++	++
Espirilo	+	N.O.	+
Bacilos	+++++	+++++	+++++
Bacilos curvos	+++	N.O.	+++
<i>Chorela</i> sp	+	N.O.	+
<i>Merismopedia</i> sp.	N.O.	N.O.	++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado.

Tabela 41 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia, ponto do centro, CptC, antes e depois do ensaio de AME quando utilizou-se mix de ácidos como fonte de carbono na relação S_0X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV. Coleta dezembro - 2004.

Tipos morfológicos	CptC antes AME	CptC após AME	CptC Controle
Filamentos	++++	++++	++++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	+++	N.O.	N.O.
Cocos	+	+	+
Bacilos	++	++	++
Bacilos curvos	++	++	++
Cistos semelhantes a <i>Methanosarcina</i> sp.	+++	+++	+++
<i>Chorela</i> sp	++++	++	++++
<i>Merismopedia</i> sp.	+++	+++	+++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado.

Tabela 42 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região de saída do efluente na Lagoa Anaeróbia, ponto do centro, SptC, antes e depois do ensaio de AME quando utilizou-se mix de ácidos como fonte de carbono na relação S_0X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV. Coleta dezembro - 2004.

Tipos morfológicos	SptC antes AME	SptC após AME	SptC Controle
Filamentos	+++	+++	+++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	++	N.O.	N.O.
Cocos	+++	+++	+++
Bacilos	++	++	++
Bacilos curvos	++	++	++
<i>Chorela</i> sp	++	++	++
<i>Merismopedia</i> sp.	+++	+++	+++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado.

Tabela 43 - Análise de frequência dos tipos morfológicos encontrados nas amostras provenientes da região central da Lagoa Anaeróbia, ponto do centro, CptC, antes e depois do ensaio de AME quando utilizou-se individualmente HAc, HPr, HBU ou HFor como fonte de carbono na relação S_0X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV. Coleta dezembro - 2004.

Tipos morfológicos	CptC	CptC	CptC	CptC	CptC	CptC
	Antes AME	AME HAc	AME HPr	AME HBU	AME HFor	AME Controle
Filamentos	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Filamentos com vesículas de gás semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp.	+++	N.O.	+++	+++	+	+++
Cocos	+	++	++	++	+	+
Bacilos	++	+++	+++	++	++	++
Bacilos curvos	++	N.O.	++	++	+	++
Cistos semelhantes a <i>Methanosarcina</i> sp.	+++	N.O.	+++	+++	+++	+++
<i>Chorela</i> sp	++++	++	++	++	++	++
<i>Merismopedia</i> sp.	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Legenda: + muito pouco freqüente, ++ pouco freqüente, +++ freqüente, ++++ muito freqüente, +++++ muitíssimo freqüente; N.O. não observado.

Foi notável a diminuição na frequência dos filamentos com vesículas de gás semelhantes à *Methanosaeta* após a realização do teste nos frascos com adição da mistura de substrato para as três amostras testadas neste grupo de ensaios (EptC, CptC e SptC), assim como no ensaio com HAc e amostra CptC. Essa redução de frequência pode estar relacionada ao fato de que a *Methanosaeta* tem alta afinidade pelo acetato ($K_s = 20 \text{ mg L}^{-1}$), porém apresenta uma taxa máxima de conversão de substrato reduzida ($K_{\max} = 2 \text{ a } 4 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$), enquanto a *Methanosarcina* apresenta afinidade menor ($K_s = 400 \text{ mg L}^{-1}$) e taxa máxima de conversão de substrato mais elevada ($K_{\max} = 6 \text{ a } 10 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$) (SPEECE, 1998). Ou seja, em altas concentrações de substrato a *Methanosarcina* tende a predominar sobre a *Methanosaeta*. Ainda no ensaio com a amostra CptC e HAc como único substrato, verificou-se o aumento no número de cocos, os quais podem estar relacionados com o gênero *Methanosarcina* corroborando a discussão apresentada neste parágrafo.

No ensaio com HFor também foi verificada redução de frequência da *Methanosaeta*, porém, neste caso, possivelmente associada ao fato de que o HFor não é substrato passível de ser utilizado pela *Methanosaeta*, que é uma metanogênica exclusivamente acetotrófica.

Outro ponto a ser destacado nas observações microscópicas é o fato de que os organismos claramente não relacionados aos anaeróbios, especificamente neste caso a alga *Chlorella* e a cianobactéria *Merismopedia*, permaneceram com mesma frequência no final da maioria dos ensaios, quando o esperado era que as células lisassem e não fossem mais observadas, ou fossem observadas em menor quantidade. Na amostra inicial do ensaio com a amostra EptC e a mistura de ácidos como substrato não foi observado o gênero *Merismopedia*, entretanto no final do ensaio, verificou-se a presença deste gênero na amostra do frasco controle. Possivelmente isso ocorreu por alguma falha de amostragem, embora tenham sido feitas três lâminas de cada amostra para análise da frequência.

5.5.3.6. Análise da diversidade microbiana por meio da técnica do DGGE nos testes de AME – Coleta dezembro/2004.

A diversidade microbiana nos ensaios de AME foi avaliada por meio da técnica do DGGE no terceiro grupo de ensaios com a amostra CptC coletada em dezembro/2004, ou seja quando foram testados diferentes ácidos (HAc, HPr, HBu e HFor) fornecidos individualmente. Alíquotas para a técnica do DGGE foram colhidas antes do início do ensaio de AME e após a realização do mesmo com a finalidade de se verificar a ocorrência de alterações na comunidade microbiana pertencente aos Domínios *Archaea* e *Bacteria* ao longo do ensaio. As atividades específicas dos diferentes grupos tróficos encontradas foram de $0,27 \pm 0,02 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$ para CptC_{0,25HAc}, $0,01 \pm 0,003 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$ para CptC_{0,25HPr}, $0,18 \pm 0,01 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$ para CptC_{0,25HBu} e de $0,18 \pm 0,02 \text{ mg CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV h}^{-1}$ para CptC_{0,25Hfor}.

A estrutura da comunidade microbiana antes e ao final do ensaio de AME quando foram utilizados os ácidos acético, propiônico, butírico e fórmico individualmente testados como fonte de carbono está apresentada nos géis de DGGE da Figura 28. Para melhor visualização do perfil

de bandas, os géis estão representados nas Tabelas 44 e 45. Para comparação das diferentes alíquotas da amostra foi utilizada a equação do coeficiente de similaridade (Figuras 29 e 30).

A análise da diversidade microbiana por DGGE, da amostra CptC antes e ao final do ensaio de AME quando foram utilizados os ácidos acético, propiônico, butírico e fórmico individualmente testados como fonte de carbono (Figura 28 e Tabelas 44 e 45), mostrou que ocorreu variação na estrutura da comunidade de bactérias e arqueias, sendo a maior variação na população bacteriana. Como mostrado na Figura 28b e Tabela 44, após o ensaio de AME ocorreu o aparecimento de uma população de arqueia, representada pela banda 4 (Tabela 44) no ensaio realizado com o HFor. Por sua vez, quanto a comunidade bacteriana (Figura 28a e Tabela 45) após o teste de AME com HFor, identificaram-se 4 novas bandas ao final do experimento. As populações bacterianas identificadas apenas ao final do ensaio estão representadas na Tabela 45 pelas bandas 1 e 2, encontradas ao final do ensaio com o HFor e no controle, pela banda 11 encontrada ao final do ensaio com HFor e pela banda 13, a qual também foi obtida após o experimento de AME com os ácidos HPr, HAc e no reator controle, exceção foi observada na amostra retirada do meio com HBu.

As populações tanto bacterianas quanto de arqueias encontradas no final dos experimentos de AME podem ser associadas a microrganismos diretamente relacionados à degradação do substrato fornecido como fonte de carbono, com ocorrência de seleção de tipos em função das condições de realização dos testes. No caso dos controles, as três novas populações bacterianas (indicadas pelas bandas 1, 2 e 13 na Tabela 45) foram associadas aos microrganismos envolvidos na degradação de possíveis produtos liberados pelas células em processo de endogenia.

Figura 28. Gel de DGGE com produto de PCR realizado com (a) primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) e (b) primer para *Archaea* (1100 FGC e 1400 R) aplicados às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBu e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.

Tabela 44 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 28) com produto de PCR realizado com primer para *Archaea* (1100 FGC e 1400 R) aplicado às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBu e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.

Ensaio							
N	CptC inicial	CptC _{0,25HAc} final	CptC _{0,25HPr} final	CptC _{0,25HBu} final	CptC _{0,25HFor} final	CptC _{Controle} final	H
1	■	■		■			3
2	■	■	■	■	■	■	6
3	■	■	■	■		■	5
4					■		1
5	■	■	■	■	■	■	6
6	■	■	■	■	■	■	6
7	■	■	■	■	■	■	6
8	■				■		2
9	■	■	■	■		■	5
10	■	■	■	■		■	5
11	■			■	■		3
12	■			■	■		3
V	11	8	7	10	8	7	

N = posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas).

Algumas bandas de arqueias e bactérias inicialmente presentes na amostra não foram identificadas ao final dos ensaios. As bandas 2, 5, 6 e 7 correspondentes a presença de arqueias foram identificadas ao final de todos os ensaios; porém, para a comunidade

bacteriana, algumas bandas representadas em 5, 8, 9 e 14 desapareceram ao final de todos os ensaios, possivelmente devido a seleção.

As maiores variações nas comunidades bacterianas e de arqueias ocorreram no ensaio realizado com HFor. Analisando-se a semelhança da estrutura microbiana antes e depois do ensaio com essa fonte, verificou-se que o coeficiente de similaridade, calculado a partir da equação descrita por Gillan *et al.* (1998), foi de 33 (similaridade moderadamente baixa, LAPARA *et al.*, 2000 e LAPARA *et al.*, 2002) e 73% (similaridade moderadamente alta, MURRAY *et al.*, 1996 e LAPARA *et al.*, 2002), respectivamente para arqueias (Figura 29) e bactérias (Figura 30). Para os demais ensaios, os coeficientes de similaridade variaram de 78 a 85% (similaridade alta, KONOPKA *et al.*, 1999) para arqueias e de 40 (similaridade moderadamente baixa) a 67% (similaridade moderadamente alta) para bactérias.

Tabela 45 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 28) com produto de PCR realizado com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicado às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBu e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.

Ensaio							H
N	CptC inicial	CptC _{0,25HAc} final	CptC _{0,25HPr} final	CptC _{0,25HBu} final	CptC _{0,25HFor} final	CptC _{Controle} final	
1					■	■	2
2				■	■	■	3
3	■		■	■			3
4	■		■	■		■	4
5	■						1
6	■		■			■	3
7	■	■	■		■	■	5
8	■						1
9	■						1
10	■			■	■		3
11					■		1
12	■	■	■				3
13		■	■		■	■	4
14	■						1
15	■	■	■		■	■	5
V	11	4	7	4	7	7	

N = posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas).

Figura 29. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para *Archaea* (1100 FGC e 1400 R) aplicados às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBu e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.

Figura 30. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicados às amostras iniciais e finais do ensaio de AME com HAc, HPr, HBu e HFor individualmente testados como substrato na relação S_0/X_0 de 0,25 gDQO g⁻¹SV com a amostra CptC da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.

Em relação à intensidade das bandas, embora sujeita a discussão (AKARSUBASI *et al.*, 2005; SANZ e KÖCHLING, 2007), observou-se diferenças, principalmente em relação ao controle, que apresentou bandas mais fracas. Entretanto, essa comparação só se torna viável quando a quantidade de DNA nas amostras é muito próxima (NICOL *et al.*, 2003). Como

apresentado na Tabela 32 (pg 144), apenas os ensaios CptC_{0,25HAc}, CptC_{0,25HPr} e CptC_{0,25HBu} apresentaram valores de DNA total próximos entre si e também em relação à amostra inicial (CV de 9%). Outro aspecto a ser considerado é a qualidade do DNA extraído para determinação de sua concentração por espectrofotometria. Como discutido anteriormente e apresentado no item 5.5.3.1, apenas as amostras desses três ensaios permitem essa comparação, já que o controle e a amostra do ensaio CptC_{0,25HFor} apresentaram relação $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ significativamente inferior a 1,8 (Tabela 33, pg 144).

5.6. Análise da diversidade microbiana por meio da eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE nas amostras originais das coletas de outubro e dezembro de 2004.

Na análise da estrutura da comunidade microbiana presente nos 9 pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati nas coletas de outubro e dezembro de 2004, utilizando os géis de DGGE das Figuras 31, 33, 35 e 37, realizou-se a representação em Tabelas 46, 47, 48 e 49 para melhor visualização do perfil de bandas. Em seguida, usou-se a equação do coeficiente de similaridade para comparar os diferentes pontos de coleta entre si (Figuras 32, 34 e 38) e mesmo ponto nas coletas de outubro e dezembro/2004 (Figura 36).

O perfil de bandas encontrado empregando-se o primer de *Eubacteria* para as amostras de outubro/2004 (Figura 31 e Tabela 46) mostrou a presença de 3 bandas similares entre os pontos de coleta da lagoa, indicadas pelos números 3, 4 e 7, sugerindo a existência de 3 populações em comum nos 9 pontos de amostragem.

Na Figura 32, pode-se verificar que a estrutura da comunidade bacteriana entre os diferentes pontos de coleta foi variável, apresentando 100% de similaridade apenas na comparação entre os pontos CptE e CptC, CptD e SptC, CptD e SptD, SptE e SptC, SptC e

SptD. A comparação entre os demais pontos variou de 57 a 95% de similaridade. Esses valores indicam a existência de populações diferentes nos pontos amostrados (MURRAY *et al.*, 1996; KONOPKA *et al.*, 1999; LAPARA *et al.*, 2000; SAKAMOTO, 2001 e LAPARA *et al.*, 2002).

A análise das bandas do gel de DGGE resultantes do emprego do primer de *Eubacteria* nas amostras da coleta de dezembro/2004 (Figura 33 e Tabela 47) mostrou um número maior de populações bacterianas em relação a outubro de 2004 (7 bandas no total). Foram observadas 12 bandas, significando 12 populações bacterianas, considerando que não tenha ocorrido sobreposição de bandas, o que pode eventualmente ocorrer na utilização desta técnica.

Figura 31. Perfil de bandas do gel de DGGE com produto de PCR realizado com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta outubro - 2004.

Tabela 46 - Representação gráfica do perfil do DGGE (Figura 31) com produto de PCR realizado com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta outubro - 2004.

Pontos de coleta – Coleta de Outubro										
N	EptE	EptC	EptD	CptE	CptC	CptD	SptE	SptC	SptD	H
1		■					■			2
2	■	■	■							3
3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
5	■	■	■			■		■	■	6
6	■									1
7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
V	6	6	5	3	3	4	4	4	4	

N = posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas).

Figura 32. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta outubro - 2004.

Figura 33. Perfil de bandas do gel de DGGE com produto de PCR realizado com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.

Tabela 47 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 33) com produto de PCR realizado com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicado EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004

Pontos de coleta – Coleta de Dezembro										
N	EptE	EptC	EptD	CptE	CptC	CptD	SptE	SptC	SptD	H
1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
2	■		■	■	■	■	■			6
3	■		■	■	■	■	■			6
4			■		■	■	■			4
5	■				■	■	■			4
6	■		■	■	■	■				5
7	■		■	■	■	■	■	■	■	8
8	■		■	■	■	■	■		■	7
9	■		■	■	■	■	■		■	7
10							■			1
11	■		■		■	■				4
12	■		■	■	■	■	■			6
V	10	1	10	8	11	11	10	2	4	

N = posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas).

A variação de populações bacterianas entre os pontos da lagoa foi também mais elevada para as amostras coletadas em dezembro/2004 em comparação a outubro/2004. Nas amostras de dezembro/2004, apenas uma banda foi comum a todos os pontos de coleta, indicada pelo número 1.

Somado a isso, o coeficiente de similaridade calculado segundo a equação descrita por Gillan et al. (1998) (Figura 34) apresentou amplitude de variação mais elevada, de 18 a 95%. Sendo que a similaridade de 100% foi verificada apenas entre as amostras CptC e CptD.

Figura 34. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.

Comparando-se os perfis de bandas do DGGE entre os mesmos pontos de amostragem na coleta de outubro e na coleta de dezembro de 2004 (Figura 35 e Tabela 48) observou-se que das 15 bandas identificadas como populações bacterianas, apenas 6 (as bandas identificadas pelos números 4, 9, 10, 11, 12 e 13) foram comuns entre as coletas de outubro e dezembro. Dentre essas bandas, as bandas 9 e 10 foram as mais freqüentes nas duas coletas,

sendo que a soma dessas bandas entre os pontos amostrados nas diferentes coletas totalizou 15 e 17 de um total possível de 18 aparecimentos.

Figura 35. Perfil de bandas do gel de DGGE com produto de PCR realizado com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Comparação entre as coletas de outubro e dezembro - 2004.

Os coeficientes de similaridade calculados segundo a equação descrita por Gillan et al. (1998) (Figura 36) foram baixos entre os mesmos pontos amostrados nas duas coletas, de no máximo 67% para o ponto de amostragem SptC e nulo para EptC e EptD, indicando que ocorreu modificação na estrutura das populações bacterianas de outubro para dezembro/2004. Yu e Mohn (2001), estudando uma lagoa aerada tratando efluente de indústria de papel também verificaram, por meio de análises moleculares, modificação da comunidade ao longo do tempo de operação, assim na distribuição das populações ao longo da lagoa.

As bandas indicadas pelos números 9 e 10 (Tabela 48) representaram as populações mais freqüentes entre as duas amostragens, pois as mesmas foram encontradas em 15 e 17 amostras, respectivamente, das 18 analisadas e comparadas, sugerindo que esses microrganismos estiveram presentes no sedimento da lagoa independente das características físico-químicas desse sedimento.

Pontos de coleta

N = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas).

Figura 36. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para *Eubacteria* (968 FGC e 1392 R), aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Comparação entre as coletas de outubro e dezembro - 2004.

Na avaliação do DGGE com *primer de Archaea* (Figura 37 e Tabela 49) observou-se um total de 12 bandas, sendo 4 delas similares (indicadas pelos números 2, 3, 6 e 7) em todos os pontos amostrados na coleta de dezembro/2004, sugerindo a existência de 4 populações comuns entre os nove pontos amostrados na lagoa.

Figura 37. Gel de DGGE com produto de PCR realizado com primer para *Archaea* (1100 FGC e 1400 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati. Coleta dezembro - 2004.

Tabela 49 - Representação em tabela do perfil do DGGE (Figura 37) com produto de PCR realizado com primer para *Archaea* (1100 FGC e 1400 R) aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.. Coleta dezembro – 2004.

Pontos de coleta – Coleta de Dezembro										
N	EptE	EptC	EptD	CptE	CptC	CptD	SptE	SptC	SptD	H
1		■	■	■						3
2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
4	■	■	■	■	■	■		■		7
5	■	■	■	■	■	■		■		7
6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
8	■	■	■	■	■	■		■		7
9	■	■	■	■	■	■		■		7
10		■	■							2
11	■	■	■		■	■		■		6
12	■	■	■		■	■		■		6
V	10	12	12	9	10	10	4	10	4	

N = posição das bandas; V = número de bandas produzidas em cada amostra ou coluna; H = número de bandas das posições de cada coluna (marcas negras representam as bandas).

A diferença na estrutura da população de arqueias analisada a partir do coeficiente de similaridade (Figura 37) mostrou que as populações bacterianas apresentaram maior variabilidade (coeficientes de similaridade variando de 18 a 95%) (Figura 34) do que as populações de arqueias (coeficientes de similaridade variando de 50 a 95%) entre os pontos amostrados nessa coleta. Além disso, 24% das amostras comparadas apresentaram 100% de similaridade, enquanto que para as bactérias apenas 3% das amostras comparadas apresentaram 100% de similaridade.

Outro aspecto a ser considerado na comparação das bandas dos géis de DGGE é a intensidade dessas bandas. Apesar das limitações na interpretação quantitativa dos perfis de DGGE, Akarsubasi *et al.* (2005) mostraram que as diferenças de intensidade das bandas eram reprodutíveis, sugerindo que essas mudanças de intensidade poderiam refletir diferenças reais na abundância relativa de populações.

Figura 38. Representação gráfica da comparação das bandas do DGGE gerado com produto de PCR com primer para *Archaea* (1100 FGC e 1400 R), aplicado nas amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati.. Coleta dezembro - 2004.

Nicol *et al.* (2003) também sugeriram a análise de variação no número de indivíduos de uma mesma população a partir da intensidade das bandas nos perfis de DGGE. Entretanto, esses mesmos autores chamam a atenção para o fato de que diferenças na intensidade das bandas podem ser causadas por variações na cinética de amplificação por PCR, quantidade de DNA presente na amostra entre outros aspectos. Para esses autores, as diferenças de intensidade das bandas são adequadas apenas para comparação das bandas de uma mesma laneleta no gel, ou seja, de uma mesma amostra.

Por outro lado, pode-se supor que para amostras com mesma quantidade de DNA total, a intensidade das bandas indique a abundância relativa dos organismos em uma dada população (NICOL *et al.*, 2003).

A Tabela 50 apresenta os valores de DNA total de cada uma das amostras avaliadas quanto à sua estrutura por meio do DGGE. Em média, a concentração de DNA nas amostras coletadas nos 9 pontos de amostragem da Lagoa Anaeróbia nas duas campanhas de 2004 (outubro e dezembro) foi de $10 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 0,97$, ou seja, com 90% de certeza pode-se analisar as bandas comparativamente em relação à sua intensidade. Isto é, bandas com maior intensidade teriam um número maior de indivíduos naquela população (STEPHEN *et al.*, 1998). Por outro lado, outro aspecto deve também ser considerado nesta comparação, a presença de contaminantes na amostra, inviabilizando a utilização dos valores de DNA_{total}.

Como discutido anteriormente no item 5.5.3.1, deve-se determinar a densidade ótica das amostras em 260 e 280 nm. A relação entre essas duas medidas deve ser de 1,8 e 2,0 (SAMBROOK *et al.*, 1989), respectivamente, para amostras puras de DNA e RNA. Na Tabela 64 estão apresentadas essas relações e pode-se observar que para as amostras EptC e EptD coletadas em outubro e dezembro, as amostras CptE, CptC e CptD de outubro e SptE e SptC de dezembro não apresentaram valores satisfatórios. Portanto, para essas amostras a análise da intensidade de bandas no gel de DGGE deve ser vista com ressalvas, uma vez que a concentração real de DNA pode ter sido mascarada pela presença de contaminantes.

Tabela 50 – Valores da concentração de DNA_{total} das amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE de Cajati nas coletas de outubro e dezembro - 2004.

Amostras de outubro/2004	DNA _{total} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Amostras de dezembro/2004	DNA _{total} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EptE	9,5	EptE	10,4
EptC	11,3	EptC	9,4
EptD	10,0	EptD	9,9
CptE	9,4	CptE	11,3
CptC	9,8	CptC	9,7
CptD	8,5	CptD	10,2
SptE	10,5	SptE	10,1
SptC	8,3	SptC	9,4
SptD	11,2	SptD	11,5

Tabela 51 – Valores das densidades óticas em 260 e 280 nm das amostras EptE, EptC, EptD, CptE, CptC, CptD, SptE, SptC e SptD da Lagoa Anaeróbia da ETE de Cajati nas coletas de outubro e dezembro - 2004.

Amostras de outubro/2004	λ_{260} nm	λ_{280} nm	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$	Amostras de dezembro/2004	λ_{260} nm	λ_{280} nm	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$
EptE	0,189	0,108	1,8	EptE	0,208	0,115	1,8
EptC	0,226	0,186	1,2	EptC	0,187	0,126	1,5
EptD	0,200	0,115	1,7	EptD	0,198	0,129	1,5
CptE	0,188	0,114	1,6	CptE	0,225	0,122	1,8
CptC	0,195	0,119	1,6	CptC	0,193	0,110	1,8
CptD	0,169	0,114	1,5	CptD	0,203	0,101	2,0
SptE	0,210	0,118	1,8	SptE	0,201	0,124	1,6
SptC	0,165	0,090	1,8	SptC	0,187	0,115	1,6
SptD	0,223	0,120	1,9	SptD	0,230	0,125	1,8

5.7. Determinação da composição das populações por meio da técnica de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes - FISH.

A utilização da técnica de FISH para as amostras de sedimento da Lagoa Anaeróbia não apresentou resultados satisfatórios. Ocorreu intensa hibridização inespecífica com a sonda NON338 e com as demais sondas utilizadas (Figura 39a), o que pode estar associado à grande quantidade de material inorgânico na amostra, como argila, que é um componente que pode hibridizar inespecificamente com as sondas. Nessas condições, tornou-se inviável a contagem de células inicialmente planejada para esse trabalho. A única resposta possível foi determinar a presença de alguns microrganismos específicos. Entretanto, a sua ausência não pode ser concluída, uma vez que as amostras continham muitos grumos de material inorgânico e celular, tornando difícil a avaliação de um resultado positivo verdadeiro ou falso (Figura 39b). Todas as

sondas utilizadas apresentaram hibridizações inespecíficas. Por isso, considerou-se resultado positivo verdadeiro apenas quando foi possível identificar individualmente a morfologia no contraste de fase, confirmar a célula com DAPI e depois com a sonda. O que não significa que na ausência dessas visualizações, os microrganismos relacionados a uma das sondas utilizadas não estivesse presente.

Dentre as sondas utilizadas e com as quais foi possível individualizar as células e com isso concluir por um resultado positivo verdadeiro estavam os grupos de microrganismos do Domínio *Archaea*, sonda ARC915 (Figura 40a), Domínio *Bacteria*, sonda EUB338 (Figura 40b), da Família *Methanobacteriaceae*, sonda MB1174 e MB310 (Figura 40c), da ordem *Methanomicrobiales*, sonda MG1200 (Figura 40d) e microrganismos pertencentes ao gênero *Methanosaeta*, sonda Mst826 (Figura 40e).

Para minimização dos problemas aqui apontados, a técnica do CARD-FISH mostra-se como uma ferramenta interessante para esse tipo de amostra, uma vez que o sinal emitido pela sonda é mais forte e a possibilidade de hibridização inespecífica é reduzida. Na técnica do CARD-FISH (*catalyzed reporter deposition*-FISH) há um passo de amplificação do sinal fluorescente. As sondas estão ligadas à HRP (horseradish peroxidase) que catalisa a formação de radicais de tiramida marcados com fluorocromo. Essas moléculas altamente reativas se ligam às regiões ribossomais e a proteínas próximas da sonda, aumentando significativamente o sinal fluorescente (PERNTHALER *et al.*, 2002; SANZ e KÖCHLING, 2007). Como o sinal da sonda é amplificado muitas vezes pela deposição massiva de tiramida marcada, células com um único ribossomo ou células em uma amostra com muito material disperso que apresenta interferência na técnica comum do FISH, como as amostras aqui estudadas, podem ser mais bem identificadas (SANZ e KÖCHLING, 2007).

Figura 39. Fotomicrografias das hibridizações inespecíficas e em grumos de material inorgânico e celular nas amostras provenientes dos nove pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati em dezembro de 2004. (a) Sonda EUB338, Domínio *Bacteria*; (b) Sonda MS821, gênero *Methanosarcina*. Aumento de 2000x.

Figura 40. Fotomicrografias das hibridizações realizadas com as amostras provenientes dos nove pontos de coleta da Lagoa Anaeróbia da ETE-Cajati em dezembro de 2004. (a) Sonda ARC915, Domínio *Archaea*; (b) Sonda EUB338, Domínio *Bacteria*; (c) Sondas MB1174 + MB310, família *Methanobacteriaceae*; (d) Sonda MG1200, ordem *Methanomicrobiales*; (e) Sonda Mst826, gênero *Methanosaeta*. (a) e (b) Aumento de 1500x. (c), (d) e (e) Aumento de 2000x.

*"[...] Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito [...]
Não somos o que deveríamos ser, mas somos o que iremos ser.
Mas GRAÇAS A DEUS, não somos o que éramos"*
(MARTIN LUTER KING)

6. CONCLUSÕES

Embora a Lagoa Anaeróbia da ETE de Cajati tenha demonstrado irregularidades de condições operacionais nos três períodos amostrados, foi possível concluir que:

6.1. Sobre a Metodologia da AME:

- O protocolo experimental para determinação da AME de lodos de Lagoa Anaeróbia revelou a necessidade de estabelecer previamente a melhor relação S_0/X_0 para amostras da lagoa mediante cada fonte orgânica testada; assim, permite-se a determinação do potencial da biomassa na conversão de substrato no menor espaço de tempo possível, uma vez que, constatou-se por DGGE que quanto mais longa a duração do teste, maior a variação entre a microbiota inicial e a final;
- As condições experimentais para a determinação da AME empregadas no presente estudo foram satisfatórias;
- O emprego do conteúdo de SV para a determinação da AME foi viável e simplificou a metodologia adotada, mas a variação dos valores em uma mesma amostra dificultou a comparação das réplicas de AME nas condições estudadas;
- A impossibilidade de determinação da porcentagem de material orgânico de fácil degradação, material orgânico recalcitrante e microrganismos ativos no conteúdo de SV, torna

difícil e imprecisa a interpretação e comparação dos resultados de AME quando utiliza-se o SV como medida de biomassa no ensaio;

- Para amostras de lodo disperso deve-se promover o esgotamento da matéria orgânica remanescente do resíduo antes da adição da fonte orgânica;
- É aconselhável determinar o SV nas amostras submetidas ao teste após o esgotamento da matéria orgânica remanescente do resíduo e utilizar esse valor para o cálculo da quantidade de fonte orgânica a ser adicionada no teste, caso esta seja a variável utilizada como medida da biomassa;
- Deve-se determinar o SV individual de cada frasco-reator no ensaio de AME não apenas no final, mas no início e após esgotamento da matéria orgânica remanescente do resíduo;
- A relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV foi a mais apropriada nos ensaios de AME para as amostras estudadas independente do substrato utilizado como fonte de carbono.

6.2. Sobre a Microbiota presente na Lagoa Anaeróbia e Determinação de sua AME:

6.2.1. Experimentos de AME e microbiota das amostras de Outubro de 2003:

- As condições do ensaio de AME provocaram alterações nos tipos microbianos ao longo dos testes; ocorrendo predominância de determinadas morfologias microbianas segundo a fonte orgânica utilizada;
- A morfologia dos tipos microbianos nos diferentes pontos da lagoa nesta coleta foi bastante semelhante, incluindo bacilos, cocos e filamentos e variando a frequência de cada tipo dependendo do ponto amostrado.

6.2.2. Experimentos de AME e microbiota das amostras de Outubro de 2004:

- Os experimentos de AME com todas as amostras de Outubro de 2004 não apresentaram atividade nos lodos coletados na Lagoa Anaeróbia cuja eficiência era de 18,2% na redução da DBO (dados da SABESP), bem como na presença de chuvas e ventos intensos, e vazão afluyente com esgotos sanitários apresentando valor de DQO na entrada de 55 mg L⁻¹;
- Os tipos microbianos encontrados nesta coleta diferiram das demais amostragens, ocorrendo influência das condições ambientais e do funcionamento da lagoa sobre a microbiota do sedimento; assim, predominaram morfologias características de ambientes aeróbios como a da alga *Chlorella* sp., eutrofizados como a cianobactéria *Merismopedia* sp., além de protozoários ciliados e flagelados;
- Os resultados do DGGE mostraram que as comunidades bacterianas variaram quanto à sua disposição no sedimento da Lagoa Anaeróbia, sendo que o coeficiente de similaridade entre os pontos amostrados variou de 57 a 100% em outubro/2004;
- Não foram identificadas bandas nos géis de DGGE do Domínio *Archaea*.

6.2.3 Experimentos da AME e microbiota das amostras de Dezembro de 2004:

- O ensaio de AME provocou alterações na estrutura da comunidade microbiana do início para o final do experimento; a comunidade bacteriana apresentou maior variabilidade que a comunidade de arqueias segundo o emprego da técnica DGGE;
- Alterações nas frequências dos tipos microbianos, segundo a morfologia examinada por microscopia ótica comum também foram verificadas entre as amostras iniciais e finais dos testes de AME;
- A região central apresentou os maiores valores de AME, indicando que é neste ponto que ocorrem as principais relações de degradações na Lagoa Anaeróbia; neste ponto a atividade acetotrófica foi a predominante;

- Os resultados do DGGE para as amostras originais mostraram que as comunidades microbianas variaram quanto à sua disposição no sedimento da Lagoa Anaeróbia, sendo que para as comunidades bacterianas o coeficiente de similaridade entre os pontos amostrados variou de 18 a 100% em dezembro de 2004;
- Pela técnica DGGE observou-se que a estrutura da comunidade de arqueias apresentou menor variabilidade de populações nas amostras da lagoa, de 50 a 95%;
- A técnica FISH revelou inconstância de resultados, pois os passos empregados foram sujeitos a interferência da composição das amostras, dificultando a quantificação e identificação de microrganismos devido ao excesso de hibridizações inespecíficas; porém, alguns resultados confirmaram a presença de representantes dos Domínios *Archaea*, notadamente dos tipos metanogênicos pertencentes a Família *Methanobacteriaceae*, da ordem *Methanomicrobiales* e do gênero *Methanosaeta*; o FISH também revelou a presença de representantes do Domínio *Bacteria*.

6.3. Conclusões gerais

- Os experimentos de AME realizados com a relação 0,25 gDQO g⁻¹SV e amostras da Lagoa Anaeróbia tratando esgotos sanitários revelaram diferenças entre as amostragens de Outubro de 2003, Outubro de 2004 e Dezembro de 2004 que puderam ser relacionadas às condições de operação do sistema;
- Os tipos morfológicos encontrados nas diferentes coletas diferiram entre si, ocorrendo influência das condições ambientais e do funcionamento da lagoa sobre a microbiota do sedimento;
- A comparação das bandas de DGGE obtidas com o *primer* de *Eubacteria* entre os mesmos pontos e as coletas de outubro e dezembro de 2004 apresentou coeficiente de similaridade de 0 a no máximo 67%;

- Maior diversidade bacteriana e de arqueias foi encontrada quando a Lagoa Anaeróbia estava sob condições de normalidade para chuvas, ventos, vazão do sistema e concentração de esgoto afluyente;
- Ocorreu variação nas condições físico-químicas da lagoa, assim como na distribuição do sedimento, em decorrência de alterações ambientais, como chuvas e ventos, levando a uma modificação significativa na microbiota presente no sistema, bem como na sua eficiência;
- A lagoa apresentou acúmulo irregular de sedimento com maior concentração no centro e na esquerda da lagoa na coleta preliminar, porém esse padrão foi modificado como decorrência de alterações ambientais;
- Não ocorreu homogeneidade de variáveis físico-químicas entre os pontos amostrados no sedimento da lagoa quando esta apresentava características de anaerobiose e sua eficiência era considerada satisfatória;
- A distribuição irregular de sedimento e os valores variáveis para as análises físico-químicas de um mesmo ponto e mesma região, assim como entre as diferentes coletas indica a existência de curto-circuito no fluxo da Lagoa Anaeróbia;
- Tendo em vista a pouca literatura abordando a digestão anaeróbia em lagoas com foco na microbiologia e técnicas para seu estudo nesse tipo de sistema associado à eficiência do mesmo, o presente trabalho apresenta-se como primeiro passo para um aprofundamento maior neste tópico. Sendo que os resultados aqui apresentados poderão fornecer subsídios importantes para trabalhos posteriores com mesmo foco, buscando o aprimoramento dos sistemas de lagoas, que se apresenta como uma opção interessante para o tratamento de esgotos sanitários no Brasil.

'O que fazer?', é o que se perguntam, em unanimidade, os poderosos e os subjugados, os revolucionários e os activistas sociais, entendendo sempre com essa questão o que os outros devem fazer; ninguém se pergunta quais são as suas próprias obrigações.

(Léon Tolstoi)

7. RECOMENDAÇÕES

Para o processo, derivadas dos ensaios biológicos:

- Estudos que enfoquem a influência das condições ambientais, especificamente de ventos, chuvas excessivas com diluição acentuada do esgoto afluyente, devem ser conduzidos com foco na busca de soluções de engenharia para esses problemas;
- Para a manutenção de um desempenho adequado no sistema de lagoas, o monitoramento contínuo e o controle das cargas orgânicas e das variáveis ambientais são essenciais.

Para os ensaios biológicos

- Sobre o ensaio de AME, deve-se buscar a substituição do teor de SV como medida de biomassa por outra variável que traduza mais apuradamente a quantidade de microrganismos presentes na amostra. Para o estabelecimento de um protocolo mundialmente aceito e que permita a comparação entre diferentes amostras proveniente de diferentes sistemas, esse ponto é crucial;
- Investigações sobre a utilização do DNA_{total} com essa finalidade podem ser interessantes, uma vez que a determinação do DNA_{total} é fácil de ser conduzida em laboratório, e produz resultados de quantidade de biomassa mais representativas da densidade de microrganismos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, D.S. **Desnitrificação e caracterização filogenética das bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas no hipolímnio do lago Kizaki, Japão.** 1998. 106f. Tese. (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

ABELIOVICH, A. Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 754-760, 1987.

AGRAWA, L.K.; HARADA, H.; TSENG, I.; OKUI, H. Treatment of dilute wastewater in a UASB reactor at a moderate temperature: microbiological aspects. **Journal of Fermentation and bioengineering**, v. 83, n. 2, p. 185-190, 1997.

AKARSUBASI, A.T.; INCE, O.; KIRDAR, B.; OZ, N.A.; ORHON, D.; CURTIS, T.P.; HEAD, I.M.; INCE, B.K. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. **Water Research**, v. 39, p.1576-1584, 2005.

ALCALDE, L.; ORON, G.; GILLERMAN, L.; SALGOT, M.; MANOR, Y. Removal of fecal coliforms, somatic coliphages and F-specific bacteriophages in a stabilization pond and reservoir system in arid regions. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 3, n. 4, p. 177-184, 2003.

ALEXIOU, G.E.; ALEXIOU, I.E.; MARA, D.D. Sewerage treatment with a pilot scale anaerobic waste stabilization pond in a Greek Island. In: WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, 10th, 2004, Montreal. **Proceedings...**Montreal, 2004. v. 3. p. 1426-1430.

ALM, E.W.; OERTHER, D.; LARSEN, N.; STAHL, D.A.; RASKIN, L. The oligonucleotide probe database. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3557-59, 1996.

ALMASI, A.; PESCOD, M.B. Wastewater treatment mechanisms in anoxic stabilization ponds. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 7, p. 125-132, 1996.

ALMEIDA, T.M.V.; ARRUDA, C.B.A.; OLIVEIRA, R.; COURA, M.A.; ALVES, K.G.B. Estudo das condições operacionais de uma lagoa anaeróbia profunda e produção de lodo durante seu tempo de funcionamento na estação de tratamento de esgotos da bacia do rio Paraíba na grande João Pessoa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23. 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2005. CD-ROM.

AMANN, R.I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 762-70, 1990.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 3, p. 117-129, 2004.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington: American Public Health Association/American Water Works Association, Water Environment Federation, 1998. 1134 p.

ARAÚJO, A.L.C.; OLIVEIRA, R.; MARA, D.D.; PEARSON, H.W.; SILVA, S.A. Sulphur and phosphorus transformations in wastewater storage and treatment reservoirs in northeast Brazil. **Water Science and Technology**, v. 42, n. 10-11, p. 203-10, 2000.

ARAÚJO, J. C. **Biofilmes anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação in situ com sondas fluorescentes**. 2001. 188f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

ARAÚJO, J. C. **Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético**. 1995. 158f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

ARAÚJO, J. C.; MORTARA, R.; CAMPOS, J.R. ; VAZOLLER, R.F. The use of fluorescence in situ hybridization to evaluate microbial composition of the anaerobic sludge and biofilms in wastewater treatment systems. In: OFICINA E SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, 6., 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, 2000. v. 1, p. 285-292.

ARAÚJO, J.C.; TERAN, F.C.; OLIVEIRA, R.A.; NOUR, E.; MONTENEGRO, M.; CAMPOS, J.R.; VAZOLLER, R.F. Comparison of Hexamethyldisilazane and Critical-Point Drying Treatments for SEM analysis of biofilms and granular sludge. **Journal of Electron Microscopy**. Tokyo, v. 52, p.429-433, 2003.

ARMENGOL, X.; LARROSA, J.; ROJO, C.; ORTEGA, E.; ÁLVAREZ, M. Temporal changes in the rotifer community from a stressed wetland, “Las Tablas de Daimiel” National Park, Spain. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ROTIFERS, 2003, Illmitz, Austria. **Abstracts...** Illmitz, Austria: Biological Station Neusiedler See, Nationalpark neusiedler See - Seewinkel, Institute of Zoology – University of Salzburg, 2003. p. 7.

AWUAH, E. **Pathogen removal mechanisms in macrophyte and algal waste stabilization ponds**. 2006. folhas. Thesis – Wageningen University – UNESCO-IHE Institute for Water Education, Delft, The Netherlands, 2006.

BANNING, N.; BROCK, F.; FRY, J.C.; PARKES, R.J.; HORNIBROOK, R.C.; WEIGHTMAN, A.J. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. **Environmental Microbiology**, v.7, n.7, p.947-960, 2005.

BASTOS, R.K.X.; FREITAS, A.S.; SALARO, A.L.; LANNA, E.A.T.; BEVILACQUA, P.D. Avaliação da produção de tilápia do Nilo com efluente de lagoa de estabilização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais...** Joinville: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2003. CD-ROM.

BENASSI, R.F. **Dinâmica espaço-temporal de um sistema de áreas alagáveis na planície de inundação do rio Jacupiranguinha, Vale do Ribeira de Iguape, SP.** 2006. 183f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

BERGEY, D.H.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1994. 9th ed. 787 p.

BHUPATHIRAJU, V.K.; HERNANDEZ, M.; LANDFEAR, D.; ALVAREZ-COHEN, L. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 231-243, 1999a.

BHUPATHIRAJU, V.K.; HERNANDEZ, M.; LANDFEAR, D.; ALVAREZ-COHEN, L. A new direct microscopy based method for evaluating in-situ bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. B67, p. 299-312, 1999b.

BIAGINI, G.A.; FINLAY, B.J.; LLOYD, D. Protozoan stimulation of anaerobic microbial activity: enhancement of the rate of terminal decomposition of organic matter. **Fems Microbiology Ecology**, v. 27, p. 1-8, 1998.

BIAGINI, G. A.; BERNARD, C. Primitive anaerobic protozoa: a false concept? Microbiology Comment. **Microbiology** 146, p. 1019-1022, 2000.

BICUDO, E.M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições).** São Carlos: RiMa, 2005. 508 p.

BOLLER, M. Small wastewater treatment plants – a challenge to wastewater engineers. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 6, p. 1-12, 1997.

BOND, P.L.; ERHART, R.; WAGNER, M.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4077-4084, 1999.

BOONE, D.; WHITMAN, W.; ROUVIERE, P. Diversity and taxonomy of methanogens. In: FERRY, J.G. (Ed.). **Methanogenesis – Ecology, Physiology, biochemistry & Genetics.** New York: Chapman & Hall, 1993. p. 35-80.

BOUVIER, T.; del GIORGIO, P.A. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. **Fems Microbiology Ecology**, v. 44, p. 3-15, 2003.

BRUCHA, G. **Avaliação da diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia do tricloroetileno – TCE, empregando-se a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE**. 2002. 150f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

CALIJURI, et. al. **Estudo dos sistemas redutores de cargas naturais e artificiais para a sustentabilidade dos Recursos Hídricos do Baixo Ribeira de Iguape – SP**. Projeto Temático. São Carlos: Departamento de Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002. 88 p.

CAMPOS, J.R. Um estudo sobre reatores anaeróbios de leito expandido. In: TALLER Y SEMINARIO LATIIONAMERICATO “TRATAMIENTO ANAEROBIA DE AGUAS RESIDUALES, 3, 1992, Habana, Cuba. **Anais...** 29p.

CANDELA, L.; FABREGAT, S.; JOSA, A. Treated urban wastewater re-use for irrigation of a golf course and impacts on soil and groundwater. **Wastewater Re-use and Groundwater Quality** (Proceedings of symposium HS04 held during IUGG2003 at Sapporo, July 2003). IAHS Publ. 285. p. 41-47, 2004.

CARVALHO, K.Q. **Resposta dinâmica de reator UASB em escala piloto submetido a cargas orgânicas e hidráulicas cíclicas: modelos matemáticos e resultados experimentais**. 2006. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

CETEC – Centro Tecnológico da Fundação Paulista de Tecnologia e Educação. **Diagnóstico da situação dos recursos hídricos da Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul – Relatório Zero UGRHI11**, 2000. Disponível em: <http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBH-RB/360/relatorio%20de%20situacao%20dos%20recursos%20hidricos%20cbh-rb-2000.pdf> Acesso em 12/06/2007.

CHERNICHARO, C.AL. **Princípios do tratamento Biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. v. 5, 246 p.

CHIAPERINI, M. 2003. Disponível em http://www.accessmylibrary.com/coms2/summary_0286-24729425_ITM. Acesso em 24 jan. 2007

CHO, Y. T.; YOUNG, J. C.; JORDAN, J. A.; MOON, H. M. Factors affecting measurement of specific methanogenic activity. In: WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, 10th, 2004, Montreal. **Proceedings...**Montreal, 2004. v. 1. p.79–84.

CHUNG, Y-C.; NEETHILING, J.B. Viability of anaerobic digester sludge. **Journal of Environmental engineering**, v. 115, n. 2, p. 330-342, 1990.

CHYNOWETH, D.P.; PULLAMMANAPPALLIL, P. Anaerobic digestion of municipal solid wastes. IN: Palmisano, A.C. and Barlaz, M.A. (eds). **Microbiology of Solid Waste**. CrC Press, Inc., Boca Raton, Florida. p. 71-113, 1996.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a gás**. 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1985. 297p.

CLARKE, D.J.; BLAKE-COLEMAN, B.C.; CARR, R.J.G.; CALDER, M.R.; ATKINSON, T. Monitoring reactor biomass. **Trends in Biotechnology**, p. 173-178, July, 1986.

COATES, J.D.; COUGHLAN, M.F.; COLLERAN, E. Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, p. 237-246, 1996.

COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. 7 th ed. Ames: The Iowa State University Press, 1980. 593p.

COLLERAN, E.; CONCANNON, F.; GOLDEN, T.; GEOGHEGAN, F.; CRUMLISH, B.; KILLILEA, E.; HENRY, M.; COATES, J. Use of a methanogenic activity tests to characterize anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic sludges, screen for anaerobic trophic groups and species. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION, 6th, 1991, São Paulo. **Anais...** São Paulo: IAWPRC/ABES/CETESB/IPT/SABESP, 1991. p.31-32.

COLLERAM, E.; PENDER, S. Anaerobic biodegradability, methanogenic activity and toxicity test systems: defining the test conditions. In: WORKSHOP ON HARMONISATION OF ANAEROBIC BIODEGRADATION, ACTIVITY AND INHIBITION ASSAYS, 2002, Lago d'Orta-Italy. **Proceedings...**, Lago d'Orta-Italy: Jos Ligthart and Hans Nieman, 2002. p. 1-10.

COLLINS, G.; WOODS, A.; McHUGH, S.; CARTON, M.W.; O'FLAHERTY, V. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. **Fems Microbiology Ecology**, v. 46, p. 159-170, 2003.

CORLISS, J.O. Biodiversity and biocomplexity of the Protists and an overview of their significant roles in maintenance of our biosphere. **Acta Protozoologica**, v. 41, p. 199-219, 2002.

COUTINHO, H.L.; OLIEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 491-503, 1999.

CRONJE, G.L.; BEEHARRY, A.O.; WENTZEL, M.C.; EKAMA, G.A. Active biomass in activated sludge mixed liquor. **Water Research**, v. 36, p. 439-44, 2002.

DEL AGUILA, N.K.S. **Avaliação de bactérias fototróficas em lagoas de estabilização : diversidade, purificação e identificação.** 2007. 224f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

De LONG, E.F.; TAYLOR, L.T.; MARSH, T.L.; PRESTON, C.M. Visualization and enumeration of marine planktonic *Archaea* and *Bacteria* by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5554-5563, 1999.

DEVETTER, M.; STROJSOVA, M. Seasonal dynamics and vertical stratification of planktonic rotifers in the Rimov reservoir. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ROTIFERS, 2003, Illmitz, Austria. **Abstracts...** Illmitz, Austria: Biological Station Neusiedler See, Nationalpark neusiedler See - Seewinkel, Institute of Zoology – University of Salzburg, 2003. p. 22.

DÍAZ, E.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 57-64, 2003.

DIEZ, V.; GARCIA, P. A.; POLANCO, F. Evaluation of methanogenic kinetics in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). **Process Biochemistry**, v. 34, p. 213-19, 1999.

DOLFING, J.; BLOEMEN, W. G. B. M. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. **Journal of Microbiology Methods**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 1985.

DOLFING, J. Acetogenesis. IN: ZEHNDER, A.J.B. **Biology of anaerobic microorganisms.** New York: John Wiley & Sons, 1988. Capítulo 9, p. 417-468.

DOMINGUES, M.R.; ARAÚJO, J.C.; VARESCHE, M.B.A.; VAZOLLER, R.F. Evaluation of the microbial composition of thermophilic anaerobic biofilms and suspension cultures grown in acetate plus sulfate using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Water Science and Technology**, v. 45, n. 10, p. 27-33, 2002.

EL SHARKAWI, F.; EL SEBAIE, O.; HOSSAM, A.; KERIM, G.A. Evaluation of Daqahla wastewater treatment plant, aerated lagoon and ponds systems. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 11, p. 111-19, 1995.

EL-FADEL, M.; MASSOUD, M. Methane emissions from wastewater management. **Environmental Pollution**, v. 114, p. 177-185, 2001.

EMPARANZA-KNORR, A.; TORRELLA, F. Microbiological performance and salmonella dynamics in a wastewater depuration pond system of southeastern Spain. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 239-248, 1995.

EPPLEY, R.W.; MACIASR, F.M. Role of the alga *Chlamydomonas mundana* in anaerobic waste stabilization lagoons. **Limnology and Oceanography**, v. 8, n. 4, p. 411-16, 1963.

ETCHEBEHERE, C.; ERRAZQUIN, M.I.; DABERT, P.; MOLETTA, R.; MUXÍ, L. (2000). Characterization of the microflora of a denitrifying reactor by standard culture dependent techniques and new molecular culture-independent tools. In: OFICINA E SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, 6., 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências. v. 1, p. 143-49.

FEDLER, C. B.; WHEELER, D. A. **Integrated facultative ponds: their use for wastewater treatment prior to land application.** In: FEDERAL CONVENTION, 17th, 1997, Melbourne, Australia. Australian Water and Wastewater Association (AWWA), 1997.

FERNÁNDEZ, A.; HUANG, S.; SESTON, S.; XING, J.; HICKEY, R.; CRIDDLE, C.; TIEDJE, J. How stable is stable? Function versus community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3697-3704, 1999.

FERREIRA, S. V.; SILVA, I. M., MARTELLI, H. L. Quantificação da coenzima F₄₂₀ em lodo proveniente da biodigestão de vinhoto de cana. **Revista de Microbiologia**, v. 18, n. 2, p. 156-58, 1987.

FERRY, J.G. Fermentation of acetate. In:_____. **Methanogenesis – Ecology, Physiology, biochemistry & Genetics.** New York: Chapman & Hall, 1993. p. 304-334.

FICKER M.; KRASTEL K.; ORLICKY S.; EDWARDS, E. Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.12, p. 5576-5585, 1999.

FOISSNER, W.; BERGER, H. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with note on their ecology. **Freshwater Biology**, v. 35, n. 2, p. 375-482, 1996.

FORESTI, E. Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: TALLER Y SEMINARIO LATINOAMERICANO SOBRE TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES, 3., 1994, Montevideo. **Anales...** Montevideo: Universidad de la Republica, 1994. p. 97-110.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; Van HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P.F.F. Fundamentos do Tratamento Anaeróbio. IN: CAMPOS, J.R. (Coord.) **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo.** Rio de Janeiro: RiMa Artes e Textos, 1999. Capítulo 2, p. 29-52.

FREITAS, E. A. C. **Bactérias do sedimento da lagoa do infernã (Luiz Antônio – SP): distribuição temporal e composição por grupos produtores de exoenzimas.** 1989. 100f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1989.

FUCHS, B.M.; GLOECKNER, F.O.; WULF, J.; AMANN, R. Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3063-3607, 2000.

GARCIA, J.L.; PATEL, B.K.C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. **Anaerobe**, v. 6, p. 205-226, 2000.

GILL, J.L. **Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences**. Ames: The Iowa State University Press, v. 1, 1987. 411p.

GILLAN, D.C.; SPEKSNIJDER, A.G.C.L.; ZWART, G.; DE RIDDER, C. 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, 1998.

GÓMEZ, P.V.; TORRES, M.L. Caracterización microbiológica de lodos anaerobio presentes en reactores alimentados com cachaza tratada y sin tratar. In: OFICINA E SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, 6., 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, 2000. v. 2, p. 93-96.

GOTARDO, J.T. **Perfil longitudinal de uma lagoa facultativa de tratamento de esgoto doméstico aplicada nas condições ambientais do sul do Brasil**. 2005, 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GOULART, M.D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista FAPAM**, v. 2, n. 2, p. 153-164, 2003.

GU, R.; STEFAN, H.G. Stratification dynamics in wastewater stabilization ponds. **Water Research**, v. 29, n. 8, p. 1909-23, 1995.

HAHN, D., AMANN, R.I., LUDWIG, W., AKKEMANS, A.D.L., SCHLEIFER, K.H. Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA target, fluorescent labeled oligonucleotides. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 138, p. 879-887, 1992.

HARPER, R.; POHLAND, F.G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 585-602, 1986.

HERBERT, R.A. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In: GRIGORVA, R.; NORRIS, J.R. (Eds.) **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press, 1990. p. 1-37.

HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICHE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v.15, p. 25-36, 2000.

HOSETTI, B.; FROST, S. A review of the sustainable value of effluents and sludges from wastewater stabilization ponds. **Ecological engineering**, v. 5, p. 421-31, 1995.

HRANOVA, R. Treatment of municipal wastewater in anaerobic ponds – seasonal performance evaluation and design alternatives. In: WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, 10th, 2004, Montreal. **Proceedings...**Montreal, 2004. v. 1. p.212–217.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Ecological and Industrial Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento no Brasil**. 2000. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13/01/2007.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades@**. 2005. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 12/06/06.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Perfil dos Municípios Brasileiros Gestão Pública 2005**. 2005. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/perfilmunic/2005/default.shtm>>. Acesso em 12/01/07.

INCE, O.; ANDERSON, G.K.; KASAPGIL, B. Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during star-up of an anaerobic digestion system. **Water Research**, v. 29, n. 1, p. 349-55, 1995.

JAMES, A.; CHERNICHARO, C.A.L.; CAMPOS, C.M.M. The development of a new methodology for the assessment of specific methanogenic activity. **Water Research**, v. 24, n. 7, p. 813-25, 1990.

JAWED, M.; TARE, V. Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. **Water SA**, v. 25, n. 3, p. 345-50, 1999.

JONES, M.L.; LIEHR, S.K.; CLASSEN, J.J.; ROBARGE, W. Mechanisms of dinitrogen gas formation in anaerobic lagoons. **Advances in Environmental Research**, v. 4, p. 133-139, 2000.

JORGENSEN, P.E.; ERIKSEN, T.; JENSEN, B.K. Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. **Water Research**, v. 26, n. 11, p. 1495-1501, 1992.

KALYUZHNYI, S.; FEDOROVICH, V.; NOZHEVNIKOVA, A. Anaerobic treatment of liquid fraction of hen manure in UASB reactors. **Bioresource Technology**, v. 62, 221-25, 1998.

KELLNER, E.; PIRES, E.C. **Lagoas de estabilização: projeto e operação**. Rio de Janeiro: ABES, 1998. 244 p.

KEPNER, R.L.; PRATT, J.R. Use o fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 603-615, 1994.

KEYSER, M.; WITTHUHN, R.C.; BRITZ, T.J. PCR-based DGGE fingerprinting and identification of *Eubacteria* present in four different UASB granules. In: WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, 10th, 2004, Montreal. **Proceedings...**Montreal, 2004. v. 3. p.1882–1884.

KHATTABI, H. **Intérêts de l'étude des paramètres hydrogéologiques et hydrobiologiques pour la compréhension du fonctionnement de la station de traitement des lixiviats de la décharge d'ordures ménagères d'Etueffont (Belfort, France).** 2002. 167 f. Thèse (Spécialité: Sciences de l'eau et de l'environnement) – L'Institut des Sciences de l'Environnement, l'UFR des Sciences et Techniques, Soutenu, France, 2002.

KIVAIISI, A.K. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. **Ecological engineering**, v. 16, p. 545-60, 2001.

KLEIKEMPER, J.; POMBO, S.A.; SCROTH, M.H.; SIGLER, W.V.; PESARO, M.; ZEYER, J. Activity and diversity of methanogens in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n. 1, p. 149-158, 2005.

KOMÁREK, J., FOTT, B.: *Chlorophyceae* (Grünalgen), Ordnung *Chlorococcales*. In: HUBER-PRESTALOZZI, G. (Ed.). **Das Phytoplankton des Süßwassers, Die Binnengewässer**. Stuttgart: Schweizerbart Verlag, 1983. v. 7. 1044p.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. *Cyanoprokaryota* I. Teil *Chroococcales*. In: ETTL, H.H.; GÄRTNER, G.; HEYNIG, D.M.; MOLLENHAUER, D. (eds) **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Jena Stuttgart Lübeck Ulm: Gustav Fischer, 1999. v. 19. 548p.

KONOPKA, A.; ZAKHAROVA, T.; LaPARA, T.M. Bacterial function and community structure in reactors treating biopolymers and surfactants at mesophilic and thermophilic temperatures. **Journal of Industrial Microbiology & biotechnology**, v. 23, p.127-132, 1999.

KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 39-48, 1997.

LAPA, K.R. **Avaliação da recirculação da fase líquida e do regime de alimentação no reator anaeróbio, em escala piloto, operado em bateladas sequenciais contendo biomassa imobilizada (ASBBR), aplicado ao tratamento de esgoto sanitário.** 2006. 187 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006. Exemplar de defesa.

LaPARA, T.M.; KONOPKA, A.; NAKATSU, C. H.; ALLEMAN, J. E. Thermophilic aerobic wastewater treatment in continuous-flow bioreactors. **Journal of Environmental Engineering**, august, p. 739-744, 2000.

LaPARA, T. M.; NAKATSU, C. H.; PANTEA, L. M.; ALLEMAN, J. E. Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. **Water Research**, v. 36, p. 638-646, 2002.

LANGE, M.; AHRING, B.K. A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 553-571, 2001.

LAWTY, R.; ASHWORTH, B.; MARA, D.D. Waste stabilization pond decommissioning a painful but necessary decision. **Water science and Technology**, v.33, n. 7, p. 107-115, 1996.

LAY, J.J.; LI, Y.Y.; NOIKE, T. Developments of bacterial population and methanogenic activity in a laboratory-scale landfill bioreactor. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3673-79, 1998.

LIMA, S.M. S.; ARAÚJO, H.W.C.; CEBALLOS, B.S.; SOUSA, J.T.; FREITAS, L.A. Avaliação sanitária de efluente e da alface irrigada com esgotos tratados. In: SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 11., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2004. CD-ROM.

LIN, C.Y.; SATO, K.; NOIKE, T.; MATSUMOTO, J. Methanogenic digestion using mixed substrate of acetic, propionic and butyric acids. **Water Research**, v. 20, n. 3, p. 385-394, 1986.

LUCENA, F.; DURAN, A.E.; MORÓN, A.; CALDERÓN, E.; CAMPOS, C.; GANTZER, C.; SKRABER, S.; JOFRE, J. Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1069-1076, 2004.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 10th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2003. 1104 p.

MANZ, W.; WAGNER, M.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.H. *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 28, n. 8, p. 1715-23, 1994.

MARA, DD. Waste stabilization ponds: effluent quality requirements and implications for process design. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 7, p. 23-31, 1996.

MARA, D.D. Appropriate wastewater collection, treatment and reuse in developing countries. IN: PROCEEDINGS OF THE INSTITUTION OF THE CIVIL ENGINEERS. **Municipal Engineer**, v. 145, n. 4, p. 299-303, (2001).

MARA, D.D.; PEARSON, H.W. A hybrid waste stabilization pond and wastewater storage and treatment reservoir system for wastewater reuse for both restricted and unrestricted crop irrigation. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 591-594, 1999.

MARA, D.D.; PEARSON, H.W.; SILVA, S.A.; OLIVEIRA, R.; ARAUJO, A.L.C.; OLIVEIRA, R.E.; SOARES, J. Process performance of na experimental deep effluent storage reservoir under different organic loadings in northeast Brazil. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 7, p. 243-249, 1996.

MARSH, T.L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MENDONÇA, F. C.; PIVELI, R. P. Uso de esgotos tratados em lagoas de estabilização para fertirrigação nas culturas do milho e girassol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22. 2003a, Joinville. **Anais...** Joinville: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2003a. CD-ROM.

MENDONÇA, F. C.; PIVELI, R. P. Fertirrigação com efluentes de lagoas de estabilização na cultura do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22. 2003b, Joinville. **Anais...** Joinville: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2003b. CD-ROM.

MENDONÇA, F. C.; PIVELI, R. P. Irrigação da cultura do milho com efluente de esgotos tratados em lagoas de estabilização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22. 2003c, Joinville. **Anais...** Joinville: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2003c. CD-ROM.

MENDONÇA, F. C.; PIVELI, R. P. CARMELO, Q. A. C. Uso de efluentes de lagoas de estabilização para produção de flores em sistema de hidroponia em vasos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22. 2003, Joinville. **Anais...** Joinville: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2003. CD-ROM.

MOCCELLIN, J. **A microbacia do rio Jacupiranguinha como unidade de estudo para a sustentabilidade dos recursos hídricos no Baixo Ribeira de Iguape – SP.** 2006. 135f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

MOHAMMED, B. Design and performance evaluation of a wastewater treatment unit. **Au J. T.**, v. 9, n. 3, p. 193-198, 2006.

MONTEGGIA, L. O.; SOBRINHO, P. A. Lagoas anaeróbias. IN: CAMPOS (coord.). **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo.** Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 101-16.

MONTERO, B.; SOLERA, R.; ROMERO, L. I.; SALES, D.; GARCÍA-MORALES, J. L. Determination of acidogenic and methanogenic activity in thermophilic anaerobic reactors. Application of different techniques for biomass quantification. In: WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, 10th, 2004, Montreal. **Proceedings...**Montreal, 2004. v. 3. p.1561–1563.

MORAES, E.M.; ADORNO, M.A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: OFICINA E SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, 6. 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências. v. 2, p. 235-238.

MORENO-ANDRADE, I.; BUITRÓN, G. Effect of the medium composition, initial methanogenic activity and initial substrate to microorganisms ratio on the anaerobic biodegradability test. In: WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, 10th, 2004, Montreal. **Proceedings...**Montreal, 2004. v. 3, p. 1564-1567.

MORENO, G.; CRUZ, A.; BUITRÓN, G. Influence of So/Xo ratio on anaerobic activity test. **Water Science Technology**, v. 40, n. 8, p. 9-15, 1999.

MÜLLER, M.; FINLAY, B.J. Protists of anaerobic environments. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PROTOZOOLOGY, 9., 1993, Berlim. **Proceedings...** New York: Gustav Fischer Verlag 1993. p.101-104.

MUNCH, E.Ç POLLARD, P.C. Measuring bacterial biomass-COD in wastewater containing particulate matter. **Water Research**, v. 31, n. 10, p. 2550-2556, 1997.

MURRAY, A. E.; HOLLIBAUGH, J. T.; ORREGO, C. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2676-2680, 1996.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 1-9, 1995.

MUYZER, G., HOTTENTRÄGER, S., TESKE., A., WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR - amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. **Molecular Methods Ecology Manual**. p. 1 – 23, 1996.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. 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. 03, p. 695 – 700, 1993.

NAMECHE, T.; VASEL, J.L. Hydrodynamic studies and modelization for aerated lagoons and waste stabilization ponds. **Water Research**, v. 32, n. 10, p. 3039-45, 1998.

NANDINI, S.; AGUILERA-LARA, D.; SARMA, S.S.S; RAMÍREZ-GARCÍA, P. The ability of selected cladoceran species to utilize domestic wastewaters in México City. **Journal of Environmental Management**, v. 71, p. 59-65, 2004

NELSON, K.L., CISNEROS, B.J., TCHOBANOGLIOUS, G., DARBY, J.L. Sludge accumulation, characteristics, and pathogen inactivation in four primary waste stabilization ponds in central Mexico. **Water Research**, v.38, p. 111-127, 2004.

NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Molecular analysis of methanogenic archaeal communities in managed and natural upland pasture soils. **Global Change Biology**, v. 9, p. 1451-1457, 2003.

NOPHARATANA, A.; CLARKE, W.P.; PULLAMMANAPPALLIL, P.C.; SILVEY, P., CHYNOWETH, D.P. Evaluation of methanogenic activities during anaerobic digestion of municipal solid waste. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 169-174, 1998.

NOVAES, R.F.V. Microbiology of anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 1-14, 1986.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1499-1504, 2000.

OLIVEIRA, E.C.A.; ARAÚJO, G.M.; MACEDO, S.L.; DUARTE, M.A.C.; ARAÚJO, A.L.C. Avaliação da remoção da matéria orgânica na estação de tratamento de esgotos de Ponta Negra/RN. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23. 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2005. CD-ROM.

OLIVEIRA, R.; SILVA, S.A.; ARAUJO, A.L.C.; SOARES, J.; MARA, D.D.; PEARSON, H.W. The performance of a pilot-scale series of tem ponds treating municipal sewage in northeast Brazil. **Water science and Technology**, v. 33, n. 7, p. 57-61, 1996.

OLIVEIRA, R. A. **Efeito da concentração de sólidos suspensos do afluente no desempenho e características do lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo tratando águas residuárias de suinocultura.** 1997. 357f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

OLIVEIRA, R.A.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. Sludge bed characteristics of UASB reactors: growth, activity, microbial structure and chemical composition of granules. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANAEROBIC DIGESTION, 8th, 1997, Sendai-Japan. **Proceedings...** Sendai-Japan, 1997. v. 2 p. 524-531.

OLIVEIRA, V.M. **Métodos moleculares para a caracterização de comunidades microbianas.** In: **Métodos moleculares para a caracterização da diversidade microbiana.** Apostila do curso de treinamento (23-27 de outubro de 2000), Fundação André Tosello (Campinas), 2000.

OUAZZANI, N.; BOUHOUM, K.; MANDI, L. BOUARAB, L.; HABBARI, Kh.; RAFIQ, F.; PICOT, B.; BONToux, J.; SCHWARTZBROD, J. Wastewater treatment by stabilization pond: Marrakesh experiment. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 75-80, 1995.

ÖZTÜRK, M. Degradation of acetate, propionate, and butyrate under shock temperature. **Journal of Environmental Engineering**, v. 119, n. 2, p. 321-331, 1993.

PAPADOPOULOS, A., PARISOPOULOS, G., PAPADOPOULOS, F., KARTERIS, A. Sludge accumulation pattern in na anaerobic pond under Mediterranean climatic conditions. **Water Research**, v. 37, p. 634-644, 2003.

PATIL, H.S.; DODAKUNDI, G.B.; RODGI, S.S. Succession in Zoo and phytoplankton in a sewage stabilization pond. **Hydrobiologia**, v. 47, n. 2, p. 253-264, 1975.

PEARSON, H.W. Expanding the horizons of pond technologoy and application in an environmentally conscious world. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 7, p. 1-9, 1996.

PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; ARRIDGE, H.A. The influence of pond geometry and configuration on facultative and maturation waste stabilization pond performance and efficiency. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 129-39, 1995.

PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; CAWLEY, L.R.; ORAGUI, J.I.; SILVA, S.A. Pathogen removal in experimental deep effluent storage reservoirs. **Water science and Technology**, v. 33, n. 7, p. 251-260, 1996a.

PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; CAWLEY, L.R.; ORAGUI, J.I.; SILVA, S.A. The performance of an innovative tropical experimental waste stabilization pond system operating at high organic loadings. **Water science and Technology**, v.33, n. 7, p. 63-73, 1996b.

PEÑA, M.R.; MARA, D.D.; SANCHEZ, A. Dispersion studies in anaerobic ponds: implications for design and operation. **Water Science and Technology**, v. 42 n.10-11, p. 273-282, 2000.

PENNA, J. A. **Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica**. 1994. 517f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994.

PENNANEN, T. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH – a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog? ³H-thymidine incorporation methods in field studies. **Geoderma**, v. 100, p.91-126, 2001.

PERSSON, J.; WITTGREN, H.B. How hydrological and hydraulic conditions affect performance of ponds. **Ecological Engineering**, v. 21, p. 259-269, 2003.

PESCOD, M.B. The role and limitations of anaerobic pond systems. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 7, p. 11-21, 1996.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 467p.

POLPRASERT, C. AGARWALLA, B.K. Significance of biofilm activity in facultative pond design and performance. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 119-28, 1995.

RADWAN, S.; DEMETRAKI-PALEOLOG, A.; WOJCIECHOWSKA, W. The relationship between planktonic rotifers and phytoplankton in lakes of different trophic status in the Polesie Region of Eastern Poland. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ROTIFERS, 2003, Illmitz, Austria. **Abstracts...** Illmitz, Austria: Biological Station Neusiedler See, Nationalpark neusiedler See - Seewinkel, Institute of Zoology – University of Salzburg, 2003. p. 76.

RAJBHANDARI, B.K.; ANNACHHATRE, A.P. Anaerobic ponds treatment of starch wastewater: case study in Thailand. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 135-143, 2004.

RASKIN, L.; STROMLEY, J.M.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1232-1240, 1994.

RIVERA, F.; SANCHEZ, M.R.; LUGO, A.; RAMIREZ, P.; ORTIZ, R.; CALDERON, A. Ciliates in a waste stabilization pond system in México. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 34, n. 3, p. 245-262, 1987.

ROCHE, K.F. Growth of the Rotifer *Brachionus calyciflorus pallas* in dairy waste stabilization pond. **Water Research**, v. 29, n. 10, p. 2255-2260, 1995.

ROZZI, A.; CASTELLAZZI, L.; SPEECE, R.E. Acetoclastic methanogenic activity measurement by a titration bioassay. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 1, p. 20-26, 2002.

ROZZI, A.; REMIGI, E. Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 3, p. 93-115, 2004

SAIA, F.T. **Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP: Avaliação do potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)**. 2005. 326f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

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)**. 2001. 159f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

SAMBROOK, F., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2nd edition, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SANZ, J.L. Metodos analiticos de biologia molecular en digestion anerobia. In: TALLER Y SIMPOSIO LATINOAMERICANO SOBRE DIGESTIÓN ANAEROBIA, 7., 2002, Merida, México. **Anais...** Merida: Editora A. Noyola, 2002. p. 1-20.

SANZ, J.L. KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 119-133, 2007.

SAQQAR, M.M.; PESCOD, M.B. Modelling the performance of anaerobic wastewater stabilization ponds. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 171-83, 1995a.

SAQQAR, M.M.; PESCOD, M.B. Modelling sludge accumulation in anaerobic wastewater stabilization ponds. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 171-83, 1995b.

SARMENTO, V.B.A. **Low-cost sanitation improvements in poor communities: conditions for physical sustainability**. 2001. 280f. PhD Thesis – School of Civil Engineering – Tropical Public Health Engineering Research Group – University of Leeds – UK, 2001.

SCHMIDT, J.E.; AHRING, B.K. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p.229-246, 1996.

SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K.; OHASHI, A.; HARADA, H. Fluorescence in situ hybridization using 16S RNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1280-88, 1999.

SELEGHIM, M. H. R. **Rede trófica microbiana em um sistema eutrófico raso (reservatório do Monjolinho – São Carlos – SP) – estrutura e função**. 2001. 92f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

SCHINK, B.. Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. In: ZEHNDER, A.J.B. (Ed.). **Biology of anaerobic microorganisms**. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 771-846.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 262-280, 1997.

SILVA, F.J.A.; ARAÚJO, L.F.P. Trinta Anos de Lagoas de Estabilização no Ceará. In: SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 11., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2004. CD-ROM.

SILVEIRA, I.C.T.; MONTEGGIA, L.O. Caracterização da biomassa metanogênica presente em reatores alimentados por efluentes de baixa carga orgânica através de teste de atividade. In: OFICINA E SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, 6. 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, 2000. v. 1, p. 162-66.

SMALLA, K.; Van OVERBEEK, L.S.; Van ELSAS, J.D. Prevalence of nptII in kanamycin resistant bacteria from different environments. **Fems Microbial Ecology**, v. 13, p. 47-58, 1993.

SOLERA, R.; ROMERO, L.I.; SALES, D. Determination of the microbial population in a thermophilic anaerobic reactor: comparative analysis by different counting methods. **Anaerobe**, v. 7, p. 79-86, 2001.

SORENSEN, A.H.; AHRING, B.K. Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 427-437, 1993.

SOTO, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. **Water Research**, v. 27, n. 8, p. 1361-76, 1993.

SOUZA, S. B. S.; CORAUCCI FILHO, B.; BERTONCINI, E. E.; STEFANUTTI, R.; BELINGIERE, P. H. Produção de milho da variedade AG 405 em solo irrigado com efluente de lagoa anaeróbia. In: SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 11., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2004. CD-ROM.

SPEECE, R.E **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Tennessee: Vanderbilt University, 394 p, 1996.

SPROTT, G. D.; BEVERIDGE, T. J. Microscopy. In: FERRY, J. G (Ed.). **Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics**. New York: Chapman & Hall. p. 81-127, 1993.

STAHL, D.A.; AMANN, R. I. Development and application of nucleic acid probes. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, v. 8. London, England: John Willey & Sons Ltd., 1991, p. 207-248.

STAL, L.J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **Fems Microbiology Reviews**, v. 21, p. 179-211, 1997.

STAMS, A.J.M. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, p. 271-294, 1994.

STEIL, L., Lucas Jr., J., Oliveira, R.A., Vazoller, R.F. Evaluation of dispersed biomass by using standardized batch methanogenic activity test at different initial substrates and biomass ratios. In: WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION, 10th, 2004, Montreal. **Proceedings...**Montreal, 2004. v. 3. p.1585–1589.

STEIL, L. **Avaliação do uso de inóculos em biodigestores operados com resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos**. 2001. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2001.

STEPHEN, J.R.; KOWALCHUK, G.A.; MAV, B. Analysis of beta-subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, v. 64, p. 2958-2965.

STIKKER, A. Water today and tomorrow. **Future**, v. 30, n. 1, p. 43-62, 1998.

SWITZENBAUM, M.S. Obstacles in the implementation of anaerobic treatment technology. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 255-62, 1995.

TADESSE, I.; GREEN, F.B.; PUHAKKA, J.A. Seasonal and diurnal variations of temperature, pH and dissolved oxygen in advanced integrated wastewater pond system treating tannery effluent. **Water Research**, v. 38, p. 645-654, 2004.

THARAVATHI, N.C.; HOSETTI, B.B. Biodiversity of algae and protozoa in a natural waste stabilization pond: a field study. **Journal of Environmental Biology**, v. 24, n. 2, p. 193-199, 2003.

THOM, S.M.; HOROBIN, R.W.; SELDLER, E.; BARER, M.R. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 433-443, 1993.

TORRES, J.J.; SOLER, A.; SÁEZ, J.; ORTUÑO, J.F. Hydraulic performance of a deep wastewater stabilization pond. **Water Research**, v. 31, n. 4, p. 679-88, 1997.

TSAL, Y.; OLSON, B.H. Rapid Method for direct Extraction of DNA from soil and Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1070-74, 1991.

VAZOLLER, R. F. **Manual técnico do curso de ecologia da digestão anaeróbia**. São Paulo: CETESB, 1989.

VAZOLLER, R. F. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas**. 1995. 259f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração: Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

VAZOLLER, R. F.; MANFIO, G. P.; CANHOS, V. P.. Diversidade do Domínio *Archaea*. In: **Biodiversidade do Estado de São Paulo Microrganismos & Vírus**. São Paulo: FAPESP, 1999. p 17-24.

VEENSTRA, S.; AL-NOZILY, F.A.; ALAERTS, G.J. Purple non-sulfur bacteria and their influence on waste stabilisation pond performance in the Yemen republic. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 141-149, 1995.

VENNES, J. W. Microbiology of sewage lagoons: role of purple sulfur bacteria in stabilization of industrial wastes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 988-996, 1970.

VIEIRA, M. R.; OLIVEIRA, S. M. A. C.; von SPERLING, M.; CHERNICHARO, C. A. L. SOBRINHO, P. A. Avaliação do desempenho de 115 lagoas facultativas primárias e secundárias no sudeste do Brasil, tratando esgotos municipais. In: SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 11. 2004, Natal. **Anais...** Natal: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária (ABES), 2004. CD-ROM.

VILLAYERDE, S. Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 3, p. 171-183, 2004.

VOLLERTSEN, J.; JAHN, A.; NIELSEN, J.L.; HVITVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P.H. Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater. **Water Research**, v. 35, n. 7, p. 1649-1658, 2001.

von SPERLING, M. Comparison among the most frequently used systems for wastewater treatment in developing countries. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 59-72, 1996a.

von SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: lagoas de estabilização**. v. 3. 2ª. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 196 p.

WATNABE, K.; KODAMA, Y.; HAMAMURA, N.; KAKU, N. Diversity, abundance and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom

of na underground crude oil storage cavity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3899-3907, 2002.

WEIMER, P.J. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 189-223, 1992.

WERNER, V.R. **Cyanophyceae/cyanobacteria no sistema de lagoas e lagunas da planície costeira do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2002. 363f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, São Paulo, 2002.

WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: ZEHNDER, A. J. B. **Biology of anaerobic microorganisms**. New York: John Wiley & Sons, 1998.p. 469-586.

WHO – World Health Organization. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. **Technical report series 778**. Geneva: World Health Organization, 1989.

WU, W.M.; JAIN, M.K.; THIELE, J.H.; ZEIKUS, J.G. Effect of storage on the performance of methanogenic granules. **Water Research**, v. 29, n. 6, p. 1445-1452, 1995.

XIAN-WEN, L. Technical economic analysis of stabilization ponds. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 103-110 1995.

YAMAGUCHI, N.; NASU, M. Flow cytometric análise of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 43-52, 1997.

YU, Z.; MOHN, W.W. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1565-1574, 2001.

ZEHNDER, A.J.B. **Biology of anaerobic microorganisms**. New York: John Wiley & Sons, 1988. 872 p.

ZIMMERMANN, R.; ITURRIAGA, R.; BECKER-BIRCK, J. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 926-935, 1978.

ZINDER, S.H. Physiological Ecology of Methanogens. In: FERRY, J. G (Ed.). **Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics**. New York: Chapman & Hall, 1993. p.128-206.

**APÊNDICE A – Trabalho apresentado no 10th World Congress on Anaerobic Digestion,
Canadá, 2004**

EVALUATION OF DISPERSED BIOMASS BY USING STANDARDIZED BATCH METHANOGENIC ACTIVITY TEST AT DIFFERENT INITIAL SUBSTRATES AND BIOMASS RATIOS.

L. Steil¹, J. Lucas Jr.², R. A. Oliveira², R. F. Vazoller^{1,3}

¹ Department of Hydraulic and Sanitation, University of São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, Zip Code 13566-590, São Carlos, SP, Brazil; lsteil@sc.usp.br;

² Department of Rural Engineering, UNESP, Via de acesso Paulo Donato Castellane s/n, Zip Code 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil; jlucas@fcav.unesp.br / oliveira@fcav.unesp.br

³ Department of Microbiology, Biomedical Science School, University of São Paulo; Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, Zip Code 05508-900, São Paulo, SP BRAZIL; vazoller@uol.com.br

Abstract. Using a sort of organic acids (acetic, butyric, propionic and formic) in order to establish the best ratio S_0/X_0 for starting the SMA tests, the assessment of the maximum specific activity of sludge from anaerobic batch reactors treating laying hens, poultry and swine wastes was determined. Samples from sewage anaerobic stabilisation pond were also evaluated. Results of SMA test appear to be most affected by volatile solids content of the samples than the best ability of the microorganisms to convert substrate. The best S_0/X_0 ratio for activity test was 0,25 gCOD g⁻¹VS for most cases, except for sample from anaerobic pond submitted to the test with formic acid, which presented better SMA value at 0.5 S_0/X_0 ratio.

Keywords anaerobic stabilization pond, batch systems, biomass evaluation, methanogenic activity

Introduction

Maintenance of high methanogenic populations in an anaerobic treatment plant has been pointed out as a critical factor for stable performance of overall process. Therefore qualitative and quantitative evaluation of methanogenic biomass has important role to improve operation and control of anaerobic reactors. Specific methanogenic activity (SMA) test is a common parameter performed to assess the seed sludge characteristics of bioreactors start-up and provides information on the development of the sludge during microbial anaerobic degradation. A number of procedures have been proposed for the SMA tests based on CH₄ production measurement in the headspace of closed bottles (Dolfing & Bloemen, 1985). However, until now, no internationally accepted test protocols have been established for determination of the specific activity of populations in anaerobic digester sludge samples (Colleran & Pender, 2002). In general, the test is achieved as a batch experiment in which a fixed amount of substrate is fed to a predetermined amount of sludge-solids, and SMA values are calculated from the CH₄ production rate and the amount of sludge present (de Zeew, 1984). It has been observed that the results of the SMA tests could vary upon the methodology followed. The most important variables that influence the results include the initial substrate concentration to the initial biomass amount ratio (S_0/X_0) (Ince et al., 1995; Moreno *et al.*, 1999), the kind of substrate and the biomass measurement (Kalyuzhnyi *et al.*, 1998).

Material and Methods

The SMA method used was based on the determination of methane production measured in the headspace of 500 mL serum bottles. A known amount of sludge was transferred into each serum bottle. The bottles were closed with butyl rubber stoppers and screw caps, and the O₂-free headspace was kept by purged N₂ gas. Appropriate quantities of substrate were added to each serum bottle so as to obtain initial S_0/X_0 ratio of the 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 gCOD g⁻¹VS. The mixture of organic acids was added to the bottles as sodium salts, and individual contribution of each was 2:1:1:1 (COD basis),

respectively for acetic, propionic, butyric and formic acids. For samples from anaerobic pond were used 100 mL serum bottles and the acids were added individually at 0.25 and 0.5 S_0/X_0 ratio. Methane concentrations were determined by gas chromatography (Finigan GC-2001 and Gow Mac) using Porapak Q column, H_2 as gas carrier and thermal conductivity detector. The batch-fed activity tests were incubated at 30°C, and intermittently stirred, just after methane sampling. All tests were running in duplicate and controls did not receive any extra organic acids. The specific sludge activity was calculated from the maximum slope of the cumulative methane production in relation to average of initial and final VS contents. Values of methanogenic activity from controls were taking away from the total data.

The three anaerobic batch systems sampled were individually fed with diluted laying hens, poultry and swine wastes, and operated until biogas production was complete, at pilot scale in 0.06 m³ reactors. The wastes were diluted to obtain influents with 8% of total solids, and the reactors were running under fed-batch conditions with 10% inoculum. The systems were kept at ambient temperature. SMA test was carried out 90 days after the start of the reactors when efficiencies were 62, 39 and 32% of VS removal, and with 97, 92 and 45% of CH_4 total production, respectively for reactors fed with laying hens, poultry and swine wastes.

The anaerobic pond was large-scale process of sewage wastewater treatment, with 6 months of operation time under stable conditions of COD removal. Nine samples were collected from anaerobic pond. The samples were submitted to test conditions before adding organic acids until the methane production stabilisation. This procedure aimed to remove the easy degradable organic matter from sample, so improving the final results of SMA test. Only one sample was investigated by SMA test. The selected sample presented higher values of VS content and methane production from remainder organic matter. The specific sludge activity was calculated separately in relation to initial and final VS contents.

Results and Discussion

Batch systems fed with diluted laying hens, poultry and swine wastes at pilot scale. Comparison of different S_0/X_0 ratios measurements showed that significant high SMA values were obtained with 0.25 ratio for all different sludge tested (Table 1 shows total and potential SMA values; the potential values might be deduced from methane values of the controls). It seemed that S_0/X_0 ratios over than 0.25 influenced SMA tests, which probably caused sludge inhibition or toxicity effects on the biomass. The negative SMA potential values obtained to swine waste sludge highlight this fact, mainly when methane production values of swine waste sludge controls were evaluated. For instance, the reactor treating swine wastes at 90th day only presented 45% of total produced biogas, which addressed that biodegradable organic compounds in these samples still remained to be transformed as a source of methane microbial activity. And so, control activities overcame total SMA values under extra

Table 1. Specific Methanogenic Activity (SMA) and Methanogenic Activity in control (MAC) (mmol CH_4 g⁻¹VS h⁻¹) ± SD values of sludge samples from batch reactors with different feeding, at different S_0/X_0 ratios (gCOD g⁻¹VS).

Reactor fed	S_0/X_0	SMA ¹	SMA ²	MAC
Laying hens wastes	0.25	0.0378 ± 0.0004	0.0340 ± 0.0004	0.0038 ± 0.0005
	0.50	0.0340 ± 0.0003	0.0302 ± 0.0003	0.0005
	0.75	0.0166 ± 0.0008	0.0128 ± 0.0008	
	1.00	0.0082 ± 0.0014	0.0044 ± 0.0014	
Poultry wastes	0.25	0.0213 ± 0.0001	0.0188 ± 0.0001	0.0025 ± 0.0003
	0.50	0.0090 ± 0.0010	0.0064 ± 0.0010	0.0003
	0.75	0.0048 ± 0.0002	0.0022 ± 0.0002	
	1.00	0.0030 ± 0.0001	0.0004 ± 0.0001	
Swine wastes	0.25	0.0169 ± 0.0015	0.0029 ± 0.0015	0.0139 ± 0.0003
	0.50	0.0058 ± 0.0004	-0.0081 ± 0.0004	0.0003
	0.75	0.0033 ± 0.0004	-0.0107 ± 0.0004	
	1.00	0.0067 ± 0.0001	-0.0072 ± 0.0001	

¹Total values of SMA; ²Potential values of SMA.

organic acids. It seemed clear that remainder biodegradable organic compounds sum extra organic acids had a harmful effect on microbial activity. reactors biomass samples.

Sludge from laying hens or poultry wastes systems at 90th day presented better results of SMA as a whole, which could be explained by the performance of reactors origins with amounts of methane production over than 90%, and low content of degradable organic matter. It could be mentioned that at the SMA assay conditions, these samples had a potential cell activities to produce methane from the range of substrates tested, which stimulates activity of acidogenic, acetogenic and methanogenic populations in anaerobic

Best results of apparent and specific methanogenic activity were obtained in the sludge samples from reactors fed with laying hens, followed by poultry and swine wastes, at four S_0/X_0 ratios. Average VS determined for each sample tested, such as 17.5, 33.0 and 50.0 g L⁻¹, respectively for laying hens, poultry and swine wastes included a great portion of non-active biomass. In this sense, differences noticed among specific methanogenic activities can be more associated to VS content than the largest capacity of active biomass to substrate conversion. Once that it was not possible to determine the portion of VS that corresponded to biomass associated to anaerobic degradation. This is due to the fact the VS parameter is extremely undefined as an index of active biomass (Diez *et al.*, 1999). This consideration seemed to be confirmed by potential biogas production obtained to the reactors: 1.32, 1.03 and 1.00 m³ kg⁻¹VS_{reduced}, respectively for lying hens, poultry and swine wastes. They did not present differences to each other by Tukey's test at 5% (Steil *et al.*, 2002).

Oliveira (1997) compared SMA values between raw and washed granular sludge from UASB reactor treating swine wastes, and verified lower activity from raw sludge. This result was attributed to wash of light suspended solids in washed granular sludge and to high control activity of raw sludge as a consequence of high organic matter content available to methanogenesis in the sample. Kalyuzhnyi (1998) also related the influence of degradable organic material on SMA value when compared the activity of seeding sludge and sludge from UASB reactor treating hen manure after a period of operation. The activity of the sludge was less than the activity of seeding sludge apparently due to dilution of biomass, measured as VSS, by organic matter from waste.

Large-scale anaerobic pond wastewater treatment. As for sludge from bath systems, sample from anaerobic pond attained best performance in the test with 0.25 S_0/X_0 ratio independently of the substrate used. Except when formic acid was added (see Table 2). In the test with formic acid, the 0.5 S_0/X_0 ratio presented higher activity than 0.25. In this assay, VS content strongly increased from 4.2, at the beginning, to 9.0 g L⁻¹, at the ending of the test. The same behaviour was not observed for both anaerobic pond samples assayed with other organic acids or samples from batch systems. Probably, it occurred microbial growth. Negative SMA value for 0.25 gHFor g⁻¹VS_{initial} seemed to confirm this supposition. At lower substrate concentration, microbial activity was lower, probably due to formic acid amount could not be quickly consumed during the test, but it promoted microbial growth. So, 0,5 S_0/X_0 test was favoured once HFor was added to the same sample assayed for 0,25 S_0/X_0 ratio.

In this sense, better performance of the test with 0.5 S_0/X_0 was associated to microbial growth and not to activity of biomass originally presented in the sample. A portion of the VS increased could be associated to organic acid degradation was not complete, so at test ending the substrate added was still present in the medium leading to VS rise. Real total production of CH₄ was 63.9 and 52.2% of theoretical production stoichiometrically calculated.

Comparison between SMA values calculated from VS_i and VS_f showed that in most cases, values calculated from VS_f presented higher standard deviation, as a consequence of higher variation between repetitions. Negative SMA values were also found for samples from anaerobic pond with 0.5 S_0/X_0 ratio and acetic or propionic acids as substrate added when calculated from VS_f. In this cases, the activity in the control was higher than activity under extra organic acids even after degradation of reminded organic matter present in the sample, that was promoted for these samples. So,

microorganisms were not able to consume either the organic acid added or the organic matter of the sample due inhibition by substrate.

Table 2. Specific Methanogenic Activity (SMA) and Methanogenic Activity in control (MAc) ($\text{mmolCH}_4 \text{ g}^{-1}\text{VS h}^{-1}$) $\pm$ SD values calculate based on initial and final VS content of sludge sample from anaerobic pond with different feeding at different S_0/X_0 ratios ($\text{gCOD g}^{-1}\text{VS}$).

Substrate	S_0/X_0	$\text{SMA}^1(\text{VS}_i)$	$\text{SMA}^1(\text{VS}_f)$	$\text{SMA}^2(\text{VS}_i)$	$\text{SMA}^2(\text{VS}_f)$	MAc (VS_i)	MAc (VS_i)
HAc	0.25	0.0320 ± 0.0011	0.0421 ± 0.0017	0.0229 ± 0.0011	0.0275 ± 0.0017	0.0091	0.0145
	0.50	0.0161 ± 0.0020	0.0213 ± 0.0042	0.0019 ± 0.0020	-0.0014 ± 0.0042	0.0142	0.0228
HBu	0.25	0.0363 ± 0.0064	0.0462 ± 0.0139	0.0304 ± 0.0064	0.0311 ± 0.0139		
	0.50	0.0142 ± 0.0101	0.0187 ± 0.0150	0.0083 ± 0.0100	0.0035 ± 0.0150		
HPr	0.25	0.0263 ± 0.0003	0.0164 ± 0.0228	0.0204 ± 0.0003	0.0013 ± 0.0228		
	0.50	0.0081 ± 0.0027	0.0061 ± 0.0086	0.0021 ± 0.0027	-0.0091 ± 0.0086		
HFor	0.25	0.0256 ± 0.0007	0.0133 ± 0.0058	0.0197 ± 0.0007	-0.0018 ± 0.0058		
	0.50	0.0503 ± 0.0027	0.0259 ± 0.0106	0.0443 ± 0.0027	0.0106 ± 0.0103		
Control of HBu, HPr and HFor						0.0059 ± 0.0008	0.0151 ± 0.0010
Control of HBu, HPr and HFor						0.0059 ± 0.0008	0.0153 ± 0.0032

¹Total values of SMA; ²Potential values of SMA.

Conclusions

Specific methanogenic activity tests to evaluate dispersed anaerobic sludge like as from batch reactors without immobilized biomass or pond wastewater sediments must be carefully used. The high amount of easy degradable organic matter present in VS content can mistake the results. Strategies should be taken to minimise that problem.

To obtain the best performance of SMA tests, S_0/X_0 initial ratio must be always assayed for unknown sludge, and the more appropriate mixture of organic acids, or even individual one as well. This work showed that 0.25 is the proper ratio for the sludge tested when acetic, propionic, butyric or a sort of organic acids were used as substrate. To formic acid, the 0,5 ratio was more suitable.

References

- Colleram, E.; Pender, S. (2002). Anaerobic biodegradability, methanogenic activity and toxicity test systems: defining the test conditions. In: *Workshop on Harmonisation of Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition Assays*, June 7-8, 2002, Lago d'Orta-Italy. Proceedings..., Lago d'Orta-Italy, Jos Ligthart and Hans Nieman, 1-10.
- de Zeeuw, W. J. (1984). *Acclimatization of anaerobic sludge for UASB-reactor start-up*. Doctoral Thesis, Agricultural University Wageningen, The Netherlands.
- Diez, V.; Garcia, P. A.; Polanco, F. (1999). Evaluation of methanogenic kinetics in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). *Process Biochemistry*, 34, 213-219.
- Dolfing, J.; Bloemen, W. G. B. M. (1985). Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *Journal of Microbiology Methods*, 4(1), 1-12.
- Ince, O.; Anderson, G. K.; Kasapgil, B. (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during star-up of an anaerobic digestion system. *Water Research*, 29(1), 349-355.
- Kalyuzhnyi, S.; Fedorovich, V.; Nozhevnikova, A. (1998). Anaerobic treatment of liquid fraction of hen manure in UASB reactors. *Bioresource Technology*, 62, 221-25.
- Moreno, G.; Cruz, A.; Buitrón, G. (1999). Influence of S_0/X_0 ratio on anaerobic activity test. *Water Science Technology*, 40(8), 9-15.
- Oliveira, R.A.; Vazoller, R.F.; Foresti, E. (1997) Sludge bed characteristics of UASB reactors: growth, activity, microbial structure and chemical composition of granules. In: *International Conference on Anaerobic Digestion*, 8th, May 25-29, 1997, Sendai-Japan. Proceedings..., Sendai-Japan, IWA, 524-530.
- Steil, L.; Lucas Jr, J.; Oliveira, R.A. (2002). Evaluation of the use of inoculum in anaerobic digestion of laying hens, poultry and swine wastes. *Journal of the Brazilian Society of Agricultural Engineering*, 22(2), p. 146-59.

**APÊNDICE B – Trabalho apresentado no The First International Meeting on
Environmental Biotechnology and Engineering, México, 2004**

SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY TEST AS A TOOL TO MICROBIAL CHARACTERISTICS ASSESMENT IN SEWAGE ANAEROBIC STABILISATION POND SLUDGE

Lara Steil (1); Maria do Carmo Calijuri (1); Rosana Filomena Vazoller (1, 2)

(1) Department of Hydraulic and Sanitation, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil. E-mail: lsteil@sc.usp.br; calijuri@sc.usp.br

(2) Department of Microbiology, Biomedical Science School, University of São Paulo; São Paulo, SP Brazil. E-mail: vazoller@uol.com.br

ABSTRACT

The objective of this research was to assess microbial characteristics in sewage anaerobic stabilisation pond sludge by means of SMA tests. HAc, HBU, HPr and HFor were individually used as the carbon source in SMA test at two different S_0/X_0 ratio. Morphological types of microorganisms were also studied. The best S_0/X_0 ratio for activity test was 0.25 gCOD/gVS for most cases, except for sample from anaerobic pond submitted to the test with formic acid, which presented better SMA value at 0.5 S_0/X_0 ratio. Morphological types were the same for all samples collected at anaerobic pond, including rods, coccus and filaments. Morphological types found during and after SMA test were the same as original samples, that is, before beginning the test. But, frequency variation was observed depending on the organic acid added as substrate.

INTRODUCTION

Anaerobic ponds have been pointed out as interesting system for treating domestic sewage regarding to its easy operation and maintenance, low cost, effective organic matter removal, flexibility and simplicity (Gu and Stefan, 1995; El Sharkawi, 1995, Pearson, 1996). Anaerobic pond efficiency is related to interaction among environmental conditions, wastewater characteristics and microorganisms that are responsible for degrading organic matter. In this sense, microbial community assessment is an important aspect to investigate, once it can lead to improvement and efficiency increase of wastewater treatment systems.

Microbiology researches on anaerobic ponds are scarce and have focused only in pathogens removal. Microbial diversity and microorganism interactions have not yet been investigated in this system type.

Anaerobic microorganisms are usually studied by classical techniques as selective enrichment, pure culture isolation, MPN determination and phenotype characterization. However, Raskin *et al.* (1994) pointed out that researches focused on associating microbial structure and function are not common due to difficulty to cultivate anaerobic microorganisms. Specific methanogenic activity (SMA) test is a suitable method to assess different physiological groups involved on anaerobic digestion (Dolfing and Bloemen, 1985; Sorensen and Ahring, 1993). Sludge specific activity is directly linked to relative biomass amount and consumption or production speed of certain compound under determined substrate concentration during a time (Schmidt and Ahring, 1996).

A number of procedures have been proposed for the SMA tests based on CH₄ production measurement in the headspace of closed bottles (Dolfing & Bloemen, 1985). However, until now, no internationally accepted test protocols have been established for determination of the specific activity of populations in anaerobic digester sludge samples (Colleran & Pender, 2002). In general, the test is achieved as a batch experiment in which a fixed amount of substrate is fed to a predetermined amount of sludge-solids, and SMA values are calculated from the CH₄ production rate and the amount of sludge present (de Zeew, 1984). In spite of the procedure adopted, some important aspects can influenced the test.

Initial substrate concentration to the initial biomass amount ratio (S_0/X_0) is an important factor once it can inhibit microbial activity (Ince *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 1999). Kind of substrate supplied in the test must be related to compounds produced by microorganisms degrading wastewater in the system where sludge came from. Generally, acetic acid is the only substrate utilised in the test (Ince *et al.*, 1995; Kalyuzhnyi *et al.*, 1998; Diez *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 1999) allowing evaluation of acetotrophic activity. However, other organic acids can be used to assess different physiological groups, as well as a mixed substrate of the major intermediate products of anaerobic digestion aiming maximum methanogenic activity determination (Lin *et al.*, 1986).

Biomass measurement has remarkable relevance in SMA test (Kalyuzhnyi *et al.*, 1998), once specific activity calculation is based on this determination. Volatile solids content is usually the parameter utilised as biomass measurement in the assays what can be a limitation in the test depending on sample and considering that VS parameter is extremely undefined as an index of active biomass (Diez *et al.*, 1999).

In this study, acetic acid (HAc), butyric acid (HBu), propionic acid (HPr) and formic acid (HFor) were individually used as the carbon source in SMA test. The purpose of this research was to assess microbial characteristics in sewage anaerobic stabilisation pond sludge. Specifically, the methanogenic activity, the allowable S_0/X_0 ratio to SMA test with different organic acids as carbon source, the validity of VS measurement in the test for dispersed biomass and morphological type of microorganisms were studied.

METHODOLOGY

Study site and sampling. The anaerobic pond studied was large-scale process of municipal sewage wastewater treatment plant at Cajati, São Paulo, Brazil. The system consists of an anaerobic pond followed by a facultative pond and had 6 months of operation under stable conditions of COD removal at sampling time. The efficiency of anaerobic pond was 76% according to SABESP, the system operator.

Nine samples were collected from sediment in different regions of anaerobic pond. Three samples from lagoon inlet, three samples from central region of the lagoon and the last three, from lagoon outlet. Figure 1 shows sediment distribution in the lagoon and the sampling points. Graphs were obtained by means of the software Sufer 8.0 based on bathymetry results.

Sediments were sampled by using an automatic portable sampler (ISCO-6700) and kept them in flasks. All samples were transported to the laboratory in a cool box, and they were transferred to bottles under anaerobic conditions (atmosphere of 100% N₂) and remained at 4°C until their processing.

Figure 1: (a) Sediment distribution in anaerobic pond at municipal sewage wastewater treatment plant at Cajati, São Paulo, Brazil; (b) sampling points (white points).

Dissolved oxygen, conductivity, temperature and pH were determined at sampling time by means of Yellow-Springer 556 Multi-Probe System. Total and volatile solids, as well as COD were determined at the laboratory according to the Standard Methods, 1995.

Natural potential methane production and specific methanogenic activity test.

All samples were evaluated with regard to their natural potential methane production (NPMP). That is, methane production from organic matter remainder of the sample. A known amount of each sample, 60 mL, was transferred into 100 mL serum vial, which was made anaerobic prior to methane determination by flushing with purged N_2 gas. The vials were sealed with butyl rubber stoppers and crimped with one-piece aluminium seals. No extra organic substrate was added to the flasks. Methane concentrations in bottles headspace were determined by gas chromatography (Gow Mac) using Porapak Q column, H_2 as gas carrier and thermal conductivity detector. Vials were incubated at $30^\circ C$ and intermittently stirred, just after methane sampling. All samples were evaluated in triplicate.

For SMA tests extra organic acids were added individually into the flasks as

substrate. The extra organic acids were supplied to microorganisms as sodium salts. Appropriate quantities of substrate were added to each serum bottle so as to obtain initial S_0/X_0 ratio of the 0.25 or 0.5 gCOD/gVS_{initial} (Steil, 2001). All samples were tested with acetic acid at 0.25 S_0/X_0 ratio. Sample from centre-half of outlet lagoon region was further assayed with acetic, propionic, butyric and formic acid individually added at 0.25 and 0.5 S_0/X_0 ratios. S_0/X_0 ratio of 0.5 gCOD/gVS_{initial} was carried out as second fed to the serum vial. Assay descriptions are presented at Table 1 and 2.

Table 1: SMA tests performed with samples from inlet and centre of the lagoon at different points regarding to the flow.

Sample	Description
InL _{0.25HAc}	Sample from lagoon inlet collected at left regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.
InC _{0.25HAc}	Sample from lagoon inlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.
InR _{0.25HAc}	Sample from lagoon inlet collected at right regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.
CenL _{0.25HAc}	Sample from central region of the lagoon collected at left regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.
CenC _{0.25HAc}	Sample from central region of the lagoon collected at centre-half regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.
CenR _{0.25HAc}	Sample from central region of the lagoon collected at right regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.

Table 2: SMA tests performed with samples from lagoon outlet at different points regarding to the flow.

Sample	Description
OutL _{0.25HAc}	Sample from lagoon outlet collected at left with regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.
OutR _{0.25HAc}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.
OutC _{0.25HAc}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS.
OutC _{0.5HAc}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HAc at 0.5 gCOD/gVS.
OutCo _{0.25HAc}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HAc at 0.25 gCOD/gVS without prior decomposition of organic matter remainder.
OutC _{0.25HBu}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HBu at 0.25 gCOD/gVS.
OutC _{0.25HPr}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HPr at 0.25 gCOD/gVS.
OutC _{0.25HFor}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HFor at 0.25 gCOD/gVS.
OutC _{0.5HBu}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HBu at 0.5 gCOD/gVS.
OutC _{0.5HPr}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HPr at 0.5 gCOD/gVS.
OutC _{0.5HFor}	Sample from lagoon outlet collected at centre-half regarding to flow, to which was added HFor at 0.5 gCOD/gVS.

All samples tested, except for OutCo, were evaluated regarding to natural methane production. So, easy organic matter remainder from sample was degraded before SMA test. This procedure aimed both to assess natural potential methane production and to remove any easy degradable organic matter from sample, so improving the final results of SMA tests.

The SMA method used was based on the determination of methane production measured in the headspace of the vials after addition of extra organic acids. Methane production measurement, incubation and stirring were carried out as reported before for determination of natural potential methane production. All tests were running in duplicate and controls did not receive any extra organic acids. The specific sludge activity (as for NPMP) was calculated from the maximum slope of the cumulative methane production in relation to initial and final VS contents. Values of methanogenic activity from controls were taking away from the total data.

Cell morphologies were observed under phase contrast and fluorescence LEICA DM LB microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical characteristics of sampling points. Temperature, conductivity and pH measurements (Table 3) showed relatively homogeneity among sampling points. For DO, centre-half points presented lower values at pond inlet and outlet. TS, VS and COD determination showed that there was no homogeneity among sampling points. In general, points at right regarding to the flow had lower values for all parameters. It was interesting to point out that TS and VS contents increased from pond inlet to outlet. Opposite behaviour was observed for COD at right and left regarding to flow. But among centre-half points marked COD raise was noted.

Table 3: Characteristics of samples from three points (left, centre-half and right regarding to the flow) at inlet, outlet and centre regions of the anaerobic pond at municipal sewage wastewater treatment plant at Cajati, São Paulo, Brazil.

Sampling points	Depth (m)	T (°C)	Conduc. (µS/S)	D.O. (mg/L)	pH	TS (mg/L)	VS (mg/L)	COD (mg/L)
InL	3.2	23.1	0.888	0.21	6.57	2,408.0	1,378.7	3,859.89
InC	3.5	23.1	0.996	0.08	6.41	1,328.0	1,074.0	247.77
InR	3.2	23.1	0.842	0.23	6.71	636.0	259.0	313.00
CenL	3.8	22.4	1.032	0.51	6.70	3,363.0	1,790.0	3,010.66
CenC	3.8	22.3	1.115	0.22	6.72	5,058.0	2,582.0	4,602.49
CenR	3.8	22.4	0.921	0.20	6.82	971.0	561.0	741.63
OutL	3.8	22.7	0.891	0.26	6.88	4,418.0	1,873.0	2,991.25
OutC	3.8	22.6	0.891	0.13	6.83	8,509.0	4,218.0	6,699.04
OutR	3.8	22.4	0.921	0.20	6.82	641.0	283.0	210.50

Natural potential methane production and specific methanogenic activity test. NPMP found in samples from same lagoon regions and different sampling points showed higher values when COD concentration was also higher (Table 3 and 4). Comparing all NPMP values it can be noticed that better result occurred for InL followed by CenC, OutC, CenL, OutL, CenR, InR, OutR and InC. It seemed that organic matter had preferential path along the pond trending to concentrate on

centre-half and left regarding to flow, where organic matter degradation by microorganisms was more pronounced.

Table 4: Natural potential methane production (NPMP) ($\text{mmolCH}_4/\text{gVS.h}$) $\pm$ SD values calculated based on initial and final VS content by samples from three sampling points (left, centre-half and right regarding to the flow) at inlet, outlet and centre of the anaerobic pond at municipal sewage wastewater treatment plant at Cajati, São Paulo, Brazil.

Sample	NPMP based on VS_i	NPMP based on VS_f
InL _{0.25HAc}	0.1934 ± 0.0042	0.1986 ± 0.0121
InC _{0.25HAc}	0.0145 ± 0.0024	0.0257 ± 0.0097
InR _{0.25HAc}	0.0900 ± 0.0193	0.0471 ± 0.0095
CenL _{0.25HAc}	0.0627 ± 0.0059	0.0996 ± 0.0513
CenC _{0.25HAc}	0.1072 ± 0.0023	0.1370 ± 0.0056
CenR _{0.25HAc}	0.0446 ± 0.0052	0.0576 ± 0.0300
OutL _{0.25HAc}	0.0733 ± 0.0018	0.0926 ± 0.0215
OutR _{0.25HAc}	0.0393 ± 0.0068	0.0383 ± 0.0192
OutC _{0.25HAc}	0.0759 ± 0.0100	0.1060 ± 0.0074
OutC _{0.25HBu}	0.0209 ± 0.0013	0.0259 ± 0.0017
OutC _{0.25HPr}	0.0204 ± 0.0007	0.0208 ± 0.0019
OutC _{0.25HFor}	0.0216 ± 0.0010	0.0255 ± 0.0045
OutC _{Control 0.25HBu, HPr, HFor}	0.0216 ± 0.0013	0.0553 ± 0.0008

OutC_{0.25HAc} showed higher capacity of conversion of the organic matter remainder from sample (Table 4) in comparison with OutC_{0.25HAc}, OutC_{0.25HBu}, OutC_{0.25HPr}, OutC_{0.25HFor} and OutC_{Control 0.25}. Assay with OutC_{0.25HAc} and with other organic acids (HBu, HPr and HFor) was carried out after 30 days of sample collection and storage at 4°C. This procedure markedly decreased natural potential methane production.

Samples from anaerobic pond attained best performance in the test with 0.25 S_0/X_0 ratio independently of the substrate used. Except when formic acid was added (Table 5 and 6). In the test with formic acid, the 0.5 S_0/X_0 ratio presented higher activity than 0.25. In this assay, VS content strongly increased from 4.2, at the beginning, to 9.0 g/L, at the ending of the test. The same behaviour was not observed for anaerobic pond samples assayed with other organic acids. Probably, it occurred microbial growth. Negative SMA value for 0.25 gHFor/gVS_{initial} seemed to confirm this supposition. At low substrate concentration, microbial activity was lower, probably due to formic acid amount could not be quickly consumed during the test, but it promoted microbial growth. So, 0.5 S_0/X_0 test was favoured once HFor was added to the same sample assayed for 0.25 S_0/X_0 ratio.

In this sense, better performance of the test with 0.5 S_0/X_0 was associated, probably, to microbial growth and not to activity of biomass originally presented in the sample. A portion of VS increased could be associated to organic acid degradation was not complete, so at test ending the substrate added was still present in the medium leading to VS rise. Real total production of CH_4 was 63.9 and 52.2% of theoretical production stoichiometrically calculated, respectively for OutC_{0.25HFor} and OutC_{0.5HFor}.

Table 5: Apparent and Specific Methanogenic Activity (AMA and SMA) and Methanogenic Activity in control (MAc) (mmolCH₄/gVS.h) $\pm$ SD values calculated based on initial VS content of sludge sample from three sampling points (left, centre-half and right regarding to the flow) at inlet, outlet and centre of anaerobic pond at municipal sewage wastewater treatment plant at Cajati, São Paulo, Brazil.

Sample	S ₀ /X ₀	AMA ¹	SMA ²	MAc
InL _{0.25HAc}	0.25	0.0580 $\pm$ 0.0154	0,0351 $\pm$ 0,0154	0,0230
InC _{0.25HAc}	0.25	0.0326 $\pm$ 0.0000	0,0295 $\pm$ 0,0000	0,0031
InR _{0.25HAc}	0.25	0.0611 $\pm$ 0.0046	0,0354 $\pm$ 0,0046	0,0257
CenL _{0.25HAc}	0.25	0.0670 $\pm$ 0.0224	0,0540 $\pm$ 0,0224	0,0130
CenC _{0.25HAc}	0.25	0.0432 $\pm$ 0.0091	0,0265 $\pm$ 0,0091	0,0168
CenR _{0.25HAc}	0.25	0.0624 $\pm$ 0.0000	0,0178 $\pm$ 0,0000	0,0446
OutL _{0.25HAc}	0.25	0.0409 $\pm$ 0.0000	0.0205 $\pm$ 0.0000	0.0205
OutR _{0.25HAc}	0.25	0.0726 $\pm$ 0.0292	0.0383 $\pm$ 0.0292	0.0471
OutC _{0.25HAc}	0.25	0.0320 $\pm$ 0.0011	0.0229 $\pm$ 0.0011	0.0091
OutC _{0.5HAc}	0.50	0.0161 $\pm$ 0.0020	0.0019 $\pm$ 0.0020	0.0142
OutCo _{0.25HAc}	0.25	0.0431 $\pm$ 0.0006	0,0146 $\pm$ 0,0006	0,0286 $\pm$ 0,0003
OutC _{0.25HBu}	0.25	0.0363 $\pm$ 0.0064	0.0304 $\pm$ 0.0064	0.0059 $\pm$ 0.0008
OutC _{0.5HBu}	0.50	0.0142 $\pm$ 0.0101	0.0083 $\pm$ 0.0100	0.0059 $\pm$ 0.0008
OutC _{0.25HPr}	0.25	0.0263 $\pm$ 0.0003	0.0204 $\pm$ 0.0003	0.0059 $\pm$ 0.0008
OutC _{0.5HPr}	0.50	0.0081 $\pm$ 0.0027	0.0021 $\pm$ 0.0027	0.0059 $\pm$ 0.0008
OutC _{0.25HFor}	0.25	0.0256 $\pm$ 0.0007	0.0197 $\pm$ 0.0007	0.0059 $\pm$ 0.0008
OutC _{0.5HFor}	0.50	0.0503 $\pm$ 0.0027	0.0443 $\pm$ 0.0027	0.0059 $\pm$ 0.0008

¹Total values of MA; ²Potential values of MA.

Negative SMA values were found for samples from anaerobic pond with 0.5 S₀/X₀ ratio and acetic or propionic acids as substrate added when calculated from VS_f. In this cases, the activity in the control was higher than activity under extra organic acids even after degradation of reminder organic matter present in the sample, that was promoted for these samples. So, microorganisms were not able to consume either the organic acid added or the organic matter of the sample due inhibition by substrate.

Comparison among SMA values calculated from VS_i and VS_f (Table 5 and 6) showed that in most cases, values calculated from VS_f presented higher standard deviation, as a consequence of higher variation between repetitions. VS content showed to be a variable pattern depending on sample and organic acid added. In some samples it increased and in other it decreased from beginning to the end of the test. This variation occurred by microorganism grow or partial degradation of organic acid added. It was difficult the comparison between samples considering the variable VS content. Once, it was not possible to evaluate VS content to its percentage of non-active biomass. Furthermore, organic load (as gCOD/gSV_{inicial}) applied to microorganisms can have been higher in that samples in which content of easy or recalcitrant organic matter in VS were elevated.

Determining VS content after evaluation of natural methane potential production and using this measurement in SMA test could be a procedure to minimise this problem. Once easy degradable organic matter would have consumed before calculations of organic acid to be added.

Table 6. Apparent and Specific Methanogenic Activity (AMA and SMA) and Methanogenic Activity in control (MAc) (mmolCH₄/gVS.h) $\pm$ SD values calculated based on final VS content of sludge sample from three sampling points (left, centre-half and right regarding to the flow) at inlet, outlet and centre of anaerobic pond at municipal sewage wastewater treatment plant at Cajati, São Paulo, Brazil.

Sample	S ₀ /X ₀	AMA ¹	SMA ²	MAc
InL _{0.25HAc}	0.25	0.0598 $\pm$ 0.0193	0.0360 $\pm$ 0.0193	0.0238
InC _{0.25HAc}	0.25	0.0551 $\pm$ 0.0243	0.0494 $\pm$ 0.0243	0.0058
InR _{0.25HAc}	0.25	0.0257 $\pm$ 0.0002	0.0047 $\pm$ 0.0002	0.0210
CenL _{0.25HAc}	0.25	0.0774 $\pm$ 0.0269	0.0461 $\pm$ 0.0269	0.0313
CenC _{0.25HAc}	0.25	0.0547 $\pm$ 0.0104	0.0330 $\pm$ 0.0104	0.0218
CenR _{0.25HAc}	0.25	0.0906 $\pm$ 0.0427	0.0499 $\pm$ 0.0427	0.0406
OutL _{0.25HAc}	0.25	0.0453 $\pm$ 0.0010	0.0132 $\pm$ 0.0010	0.0321
OutR _{0.25HAc}	0.25	0.0812 $\pm$ 0.0407	0.0392 $\pm$ 0.0406	0.0420
OutC _{0.25HAc}	0.25	0.0421 $\pm$ 0.0017	0.0275 $\pm$ 0.0017	0.0145
OutC _{0.5HAc}	0.50	0.0213 $\pm$ 0.0042	-0.0014 $\pm$ 0.0042	0.0228
OutCo _{0.25HAc}	0.25	0.0597 $\pm$ 0.0026	0.0052 $\pm$ 0.0026	0.0549 $\pm$ 0.0005
OutC _{0.25HBu}	0.25	0.0462 $\pm$ 0.0139	0.0311 $\pm$ 0.0139	0.0151 $\pm$ 0.0010
OutC _{0.5HBu}	0.50	0.0187 $\pm$ 0.0150	0.0035 $\pm$ 0.0150	0.0153 $\pm$ 0.0032
OutC _{0.25HPr}	0.25	0.0164 $\pm$ 0.0228	0.0013 $\pm$ 0.0228	0.0151 $\pm$ 0.0010
OutC _{0.5HPr}	0.50	0.0061 $\pm$ 0.0086	-0.0091 $\pm$ 0.0086	0.0153 $\pm$ 0.0032
OutC _{0.25HFor}	0.25	0.0133 $\pm$ 0.0058	-0.0018 $\pm$ 0.0058	0.0151 $\pm$ 0.0010
OutC _{0.5HFor}	0.50	0.0259 $\pm$ 0.0106	0.0106 $\pm$ 0.0103	0.0153 $\pm$ 0.0032

¹Total values of MA; ²Potential values of MA.

The analysis of SMA results from assay with 0.25 gCOD/gVS_{inicial} of HAc showed that test achieved, after consumption of easy degradable organic matter (OutC_{0.25HAc}) remainder from the sample, better result than test carried out without elimination of easy degradable organic matter remainder from the sample (OutCo_{0.25HAc}). In the last case, extra organic acid added as substrate was available to microorganisms as well as substrates coming from sewage, the pond influent. Probably, a harm effect occurred on microorganisms. HAc added was summed to other organic acids produced from organic matter degradation of sewage.

Microscopic examination. Morphological types present in the samples collected were the same for all sampling points at anaerobic pond (Figure 2), including rods, coccus, different filaments and filaments with gas vesicles like *Methanosaeta* sp. *Methanospirillum*-like filaments were also found, but only at InL and CenC samples.

Morphological types found during and after SMA test were the same as original samples, that is, before beginning the test. But, frequency variation was observed depending on the organic acid added as substrate. In general, cocci were absent in the controls and present in the samples fed with any organic acid (Figure 3a). Using HPr in SMA test it was observed higher frequency of all morphological types, prevailing filaments with gas vesicles related to *Methanosaeta* sp (Figure 3b).

Figure 2. Photomicrographs of cell morphologies predominant in all sampling points at anaerobic lagoon at municipal sewage wastewater treatment plant at Cajati, São Paulo, Brazil. (a) and (b) rods, coccus and *Methanosaeta*-like filaments with gas vesicles (1500x); (c) *Methanospirillum*-like filament at CenC sampling point (1500x); (d) Filament (1500x). Bar represents 5 μm .

Figure 3. Photomicrographs of cell morphologies found in samples after SMA test. (a) Coccus (1500x); (b) *Methanosaeta*-like filament with gas vesicles at OutC_{0.25HPr} sample (1500x). Bar represents 5 μm .

CONCLUSIONS

The use of VS content only as determination of active biomass became the SMA test too imprecise. This work showed that 0.25 S_0/X_0 was the proper ratio for the sludge tested when a HAc, HPr and HBu were used as substrate. HFor presented better

SMA values at 0.5 S_0/X_0 ratio. Rods, coccus and filaments were the morphologies found in all sampling points. SMA test led to a frequency variation of morphological types in the samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to SABESP staff for their cooperation in sampling. This study was funded by FAPESP and a CNPq postgraduate studentship.

REFERENCES

- Colleram, E.; Pender, S. (2002). Anaerobic biodegradability, methanogenic activity and toxicity test systems: defining the test conditions. In: Workshop on Harmonisation of Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition Assays, June 7-8, 2002, Lago d'Orta-Italy. *Proceedings...*, Lago d'Orta-Italy, Jos Ligthart and Hans Nieman, 1-10.
- Diez, V.; Garcia, P. A.; Polanco, F. (1999). Evaluation of methanogenic kinetics in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). *Process Biochemistry*, **34**: 213-219.
- Dolfing, J.; Bloemen, W. G. B. M. (1985). Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *Journal of Microbiology Methods*, **4**(1): 1-12.
- El Sharkawi, F.; El Sebaie, O.; Hossam, A.; Kerim, G. A. (1995). Evaluation of Daqahla wastewater treatment plant, aerated lagoon and ponds systems. *Water Science and Technology*, **32**(11): 111-19.
- Gu, R.; Stefan, H. G. (1995). Stratification dynamics in wastewater stabilization ponds. *Water Research*, **29**(8): 1909-23.
- Ince, O.; Anderson, G. K.; Kasapgil, B. (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system. *Water Research*, **29**(1): 349-355.
- Kalyuzhnyi, S.; Fedorovich, V.; Nozhevnikova, A. (1998). Anaerobic treatment of liquid fraction of hen manure in UASB reactors. *Bioresource Technology*, **62**: 221-25.
- Lin, C. Y.; Sato, K.; Noike, T.; Matsumoto, J. (1986). Methanogenic digestion using mixed substrate of acetic, propionic and butyric acids. *Water Research*, **20**(3): 385-94.
- Moreno, G.; Cruz, A.; Buitrón, G. (1999). Influence of S_0/X_0 ratio on anaerobic activity test. *Water Science Technology*, **40**(8): 9-15.
- Pearson, H. W. (1996) Expanding the horizons of pond technology and application in an environmentally conscious world. *Water Science and Technology*, **33**(7): 1-9.
- Raskin, L.; Stromley, J.M.; Rittmann, B.E.; Stahl, D.A. (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(4): 1232-1240.
- Schmidt, J.E.; Ahring, B.K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. **49**: 229-246.
- Sorensen, A.H.; Ahring, B.K. (1993) Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **40**: 427-437.
- Standard Methods (1995). *Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters*. APHA, AWWA, WPCF. 19th ed., Washington DC.
- Steil, L. (2001) *Evaluation of the use of inoculum in anaerobic digestion of laying hens, poultry and swine wastes*. M.Sc. Thesis. UNESP. Chemistry Institute, Araraquara, Brazil. In Portuguese
- de Zeeuw, W. J. (1984). *Acclimatization of anaerobic sludge for UASB-reactor start-up*. Doctoral Thesis, Agricultural University Wageningen, The Netherlands.

NOTATION

COD	Chemical oxygen demand
CenL	Sample from centre of the lagoon collected at left regarding to flow

CenC	Sample from centre of the lagoon collected at centre-half regarding to flow
CenR	Sample from centre of the lagoon collected at right regarding to flow
InL	Sample from lagoon inlet collected at left regarding to flow
InC	Sample from lagoon inlet collected at half-centre regarding to flow
InR	Sample from lagoon inlet collected at right regarding to flow
HAc	Acetic acid
HBu	Butyric acid
HFor	Formic acid
HPr	Propionic acid
MA	Methanogenic activity
MAc	Methanogenic Activity in control
MPN	Most probable number
NPMP	Natural potential methane production
OutL	Sample from lagoon inlet collected at left regarding to flow
OutC	Sample from lagoon inlet collected at centre-half regarding to flow
OutR	Sample from lagoon inlet collected at right regarding to flow
SD	Standard deviation
SMA	Specific methanogenic activity
VS	Volatile solids

**APÊNDICE C – Trabalho apresentado no VIII Taller y Simposio Lationoamericano
sobre Digestión Anaerobia, Uruguai, 2005**

Microbial community diversity and functionality in anaerobic pond for sewage wastewater treatment

L. Steil¹, M. C. Calijuri¹, and R. F. Vazoller^{1, 2}

¹ Department of Hydraulic and Sanitation, Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil. E-mail: lsteil@sc.usp.br;

² Department of Microbiology, Biomedical Science School, University of São Paulo; São Paulo, SP Brazil.

Abstract This work aimed to study microorganisms involved at organic degradation in anaerobic pond in order to contribute to the knowledge of the microbial community diversity and functionality. Two periods of sampling were done during the raining and dry seasons at large-scale anaerobic pond for municipal sewage wastewater treatment in the City of Cajati, São Paulo State, Brazil. The organic matter (COD basis) removal efficiency in the system, at raining period, was low (18.2%) and the anaerobic characteristics of the pond were compromised showing the predominance of aerobic algae. In the other hand, the removal of organics at dry period was of 87.5% and the main microbial morphological types were of anaerobes. Samples of the raining period did not produce methane and the specific methanogenic activity taken at dry period was up to $0.1908 \pm 0.0142 \text{ mmol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{VS d}^{-1}$ for the sample collected in the centre of the pond. DGGE-profile showed that the band pattern was the same between the sampling points but different among the raining and dry seasons. Higher microbial diversity was observed at dry period when anaerobic conditions were established in the system.

Keywords anaerobic pond; microbial diversity; municipal sewage; specific methanogenic activity

Introduction

Stabilization ponds are one of the simplest systems for domestic wastewater treatment due to its simple maintenance and operational regime, low cost, good efficiency, flexibility and simplicity (Pearson, 1996). They are alternative for small and medium communities where space is available (Kellner and Pires, 1998). Treatment efficiency is the result of the interaction of several processes, which depend on the environmental conditions and influent physico-chemical characteristics, as well as the microbial community established in the system.

In this way, the study of microbial community is of relevant importance once it can lead to project improvement and efficiency enhancement. Regarding to the relevance of microbiology studies, this work focused on the microorganisms of the sediment involved in the degradation processes of an anaerobic pond. Therefore, the aim of this study was to contribute to the knowledge of microbial diversity in this type of system, as well as to establish possible microbial functions in the anaerobic ponds.

Methods

Study site, sampling and chemical analyses

The anaerobic pond studied was large-scale process of municipal wastewater treatment plant at Cajati, São Paulo, Brazil. The system consists of an anaerobic pond followed by a facultative pond. Influent flow was of $1,017.79 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$, according to Sabesp, the managing-agency of the system.

Two samplings of sediment were carried out in the pond. The first sampling was carried out in raining period and the second after 20 days of drought. Nine sediment samples (Table 1) were collected in three different regions of the anaerobic pond: at the inlet, at the central region and at the outlet.

Temperature, conductivity, pH, dissolved oxygen and redox potential (Eh) were determined at sampling periods using Yellow-Springer 556 Multi-Probe System. Total solids and volatile solids (TS and VS), as well as COD, were all determined according to the Standard Methods, 1999.

Table 1. Sampling points assessed in the sediment of the anaerobic pond regarding to the direction of the flow.

Representation	Description
InL	Left of the inlet
InC	Centre-half of the inlet
InR	Right of the inlet
CenL	Left of the central region
CenC	Centre-half of the central region
CenR	Right of the central region
OutL	Left of the outlet
OutC	Centre-half of the outlet
OutR	Right of the outlet

Microbial analyses

Cell morphologies were observed under phase contrast and fluorescence using LEICA DM LB microscope. Samples were evaluated by DGGE-profiling and the samples collected in the centre-half points of each region (InC, CenC, OutC, Table 1) of the pond were also submitted to a specific methanogenic activity test.

Specific methanogenic activity (SMA) test

SMA test was carried out according to methodologies described by Dubourguier (1989) *apud* Vazoller (1989) and Chernicharo (1997). The SMA method was based on the determination of methane production measured in the testing vials headspace by gas chromatography after the addition of a sort of extra organic acids: acetic, propionic, butyric and formic acids in the proportion of 2:1:1:1 (COD basis) in order to obtain initial substrate/microorganisms ratio (S_0/X_0) of 0.25 gCOD g⁻¹VS, as suggested by Steil *et al.* (2004). However, before the addition of the extra organic acids, endogenous organic matter was exhausted of the samples by incubating them under similar conditions of the test. This procedure aimed to improve the final results of SMA tests. Once methane production subsided, as the result of endogenous organic matter degradation, the addition of extra organic acids was made. Samples were evaluated in triplicate and controls did not receive any extra organic acids. The specific methanogenic activity was calculated using the maximum slope of the cumulative methane production in relation to the average of VS, which was estimated using the VS determined after degradation of endogenous organic matter and the VS determined at the end of the experiment. Values of methanogenic activity of the controls were subtracted from the total data.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE

For studying microbial diversity, total rDNA was extracted from the samples (Griffiths *et al.*, 2000). Fragment of 16S rDNA were amplified by PCR with the primers 968FGC and 1392R (Nielsen *et al.*, 1999) for *Bacteria* Domain and primers 1100FGC and 1400R for *Archaea* Domain (Kudo *et al.*, 1997). PCR products were separated by DGGE (Muyzer *et al.*, 1993). The denaturing gradient used in the gel was of 30-70% (formamide and urea). The band patterns obtained with DGGE-profiling were stained with ethidium bromide (0.5 mg⁻¹ L in 15 min.) and documented using Eagle Eye TMIII (Stratagene) coupled to a computer equipped with the Software Eagle Sight.

Results and discussion

Chemical variables

Anaerobic pond at raining period showed low efficiency of BOD removal: 18.2% according to Sabesp and the anaerobic characteristics were compromised, probably due to influent wastewater dilution and/or circulation of the water column as a consequence of the rain and wind. Chemical variables showed similar values in all sampling points at raining period (Table 2), except for conductivity and redox potential. The Eh values ranged from -5.1 to 15.9 mV in spite of the depth (3.5 to 4.0 m) which are suitable for anaerobic ponds and for the maintenance of anaerobic conditions. In this sense, the Eh variation was probably related to water column circulation occasioned by strong rain and wind.

Sampling at dry period showed that pond recovered anaerobic characteristics. The Eh values ranged from -15.8 to -32.7 mV (Table 3), which is more suitable, but not ideal, for

anaerobic microorganisms activities. TS, VS and COD contents were significantly high (varying from 464 to 28,081 mg L⁻¹) and the sampling at raining period (varying from 297 to 501 mg L⁻¹) confirmed the hypothesis of influent wastewater dilution by rain. BOD removal efficiency at the dry period was of 87.5% according to Sabesp.

Table 2. Characteristics of the samples collected in the sediment of the anaerobic pond at raining period.

Samples	Depth (m)	T (°C)	Cond. (µS)	pH	D.O. (mg L ⁻¹)	Eh (mV)	TS (mg L ⁻¹)	VS (mg L ⁻¹)	COD (mg L ⁻¹)
InL	3.5	22.9	890	7.9	0.07	14.1	664.0	501.0	29.74
InC	3.5	22.7	1023	7.9	0.07	15.9	609.0	413.0	90.05
InR	3.5	22.9	726	8.0	0.04	8.7	573.0	341.0	58.79
CenL	4.0	22.2	638	8.1	0.04	6.0	582.0	417.0	68.66
CenC	3.5	22.3	619	8.3	0.05	1.2	543.0	283.0	43.98
CenR	3.5	22.8	584	8.3	0.04	-1.6	612.0	368.0	52.20
OutL	3.5	23.0	558	8.4	0.04	-5.1	549.0	297.0	16.01
OutC	3.5	22.5	592	8.3	0.04	0.8	608.0	437.0	40.69
OutR	3.5	22.8	572	8.4	0.04	-3.7	609.0	464.0	27.53

Table 3. Characteristics of the samples collected in the sediment of the anaerobic pond at dry period.

Sampling points	Depth (m)	T (°C)	Cond. (µS)	pH	D.O. (mg L ⁻¹)	Eh (mV)	TS (mg L ⁻¹)	VS (mg L ⁻¹)	COD (mg L ⁻¹)
InL	3.46	24.0	700	8.8	0.30	-25.3	8,819	3,317	5,608
InC	3.66	24.0	769	8.8	0.34	-23.0	64,755	25,057	40,957
InR	3.60	24.0	846	8.6	0.24	-15.8	82,960	28,081	43,178
CenL	3.96	23.9	593	9.0	0.27	-32.7	13,110	4,690	7,739
CenC	4.00	23.8	731	8.8	0.28	-23.5	10,775	3,955	6,571
CenR	3.96	23.8	549	8.7	0.23	-21.4	12,162	4,444	7,155
OutL	3.50	23.8	490	8.7	0.16	-21.7	1,159	464	573
OutC	3.92	23.7	539	8.7	0.31	-20.2	7,870	2,692	4,540
OutR	3.60	23.8	562	8.3	0.45	-24.7	5,126	1,889	3,412

Microbial analyses

Microbial morphological types found at raining period were similar in all sampling points. Typical anaerobes were absent or rarely observed. Ciliates and flagellates, rods, coccus and different types of filaments were observed. The algae *Chlorella* sp. was the main morphological specie in all samples (Figure 1a). At dry period the main microbial morphologies were also similar in all collected samples, including coccus, small rods (*Methanobrevibacter*-like cells), large rods (*Methanobacterium*-like cells), and several types of filaments, some of them with gas vesicle, which is characteristic of *Methanosaeta*-like cells (Figure 1b).

Figure 1. Photomicrographs of the main cell morphologies observed in the anaerobic pond sediment. (a) *Chlorella* sp. was the predominant cell at raining period; (b) rods, coccus and *Methanosaeta*-like cells with gas vesicles observed at dry period. 1500x. Bar represents 5 µm.

Methane production was not detected in the samples collected during the raining period even after the addition of extra organic acids. The lack of methanogenic activity pointed out that anaerobic conditions were compromised. Microorganisms related to anaerobic degradation probably suffered important damages or were removed from the system as a consequence of the huge quantity of rain and wind. Evaluation of SMA results at dry period showed that methanogenic microorganisms present in CenC sample were more active ($0.1909 \pm 0.0142 \text{ mmol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV d}^{-1}$) than in InC ($0.0511 \pm 0.0122 \text{ mmol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV d}^{-1}$) and OutC ($0.0972 \pm 0.0064 \text{ mmol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SV d}^{-1}$).

DGGE-profile (Figure 2) showed higher diversity for Bacteria Domain at dry period than the raining period and higher diversity for Archaea Domain than Bacteria Domain at dry period. Archaea were not detected at raining period. The DGGE-profiles were similar between all sampling points in the same sampling period for Bacteria and Archaea Domains.

Figure 2. The DGGE-profile of 16S rDNA fragments amplified with primer 968FGC and 1392R (Bacteria Domain) and with primer 1100FGC and 1400R (Archaea Domain) using samples of the sediment of the anaerobic pond at raining and dry periods.

Conclusions

Physico-chemical characteristics affected by rain and wind led to significant variations on the microbial diversity in the sediment of the anaerobic pond. The main microbial morphologies observed during the raining period were characteristic of aerobic environments. After the drought period anaerobic conditions were prevalent in the system and typical anaerobic microorganisms were observed, including rods, coccus and several types of filaments.

Central area of the pond had the highest methanogenic activity, pointing out that there was variation in the microbial activity along the pond and that central area concentrated the reactions of conversion of the organic matter to CH_4 and CO_2 . Archaea and Bacteria diversity was higher at dry period when anaerobic conditions were established in the system.

References

- APHA-AWWA-WPCF. (1999). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. Washington.
- Chernicharo C.A.L. (1997). *Princípios do tratamento Biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios*. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Universidade Federal de Minas Gerais. v. 5, 246 p.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A.S.; Bailey, M.J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5488-5491.
- Gu R., Stefan H.G. (1995). Stratification dynamics in wastewater stabilization ponds. *Wat. Res.*, 29(8), 1909-23.
- Kellner E., Pires E.C. (1998). *Lagoas de estabilização: projeto e operação*. Rio de Janeiro: ABES. 244 p.
- Kudo, Y.; Nakajima, T.; Miyaki, T.; Oyaizu, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in japan *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 39-48.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 695-700.
- Nielsen, T. A., Liu, W-T., Filipe, C., Grady, L., Molin, S. and Stahl, D. A. (1999). Identification of novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 65, 1251-1258
- Pearson H.W. (1996). Expanding the horizons of pond technology and application in an environmentally conscious world. *Wat. Sci. Tech.*, 33(7), 1-9.
- Steil, L. Calijuri, M.C., Vazoller R.F. (2004). Specific methanogenic activity test as a tool to microbial characteristics assessment in sewage anaerobic stabilization pond sludge. In: THE FIRST INTERNATIONAL MEETING ON ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY AND ENGINEERING, Mexico City – Mexico. Proceedings... CD.
- Vazoller R.F. (1989). *Manual técnico do curso de ecologia da digestão anaeróbia*. São Paulo, CETESB. 100-7.

APÊNDICE D – Curvas de Calibração do CH₄ e dos ácidos HAc, HBu, HPr e HFor

Figura 41. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do metano em amostras por cromatografia em fase gasosa.

Figura 42. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do metano em amostras por cromatografia em fase gasosa.

Figura 43. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido acético em amostras por cromatografia em fase líquida.

Figura 44. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido butírico em amostras em amostras por cromatografia em fase líquida.

Figura 45. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido propiônico em amostras por cromatografia em fase líquida.

Figura 46. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido iso-valérico em amostras por cromatografia em fase líquida.

Figura 47. Curva de calibração elaborada para determinação da massa do ácido fórmico em amostras em amostras por cromatografia em fase gasosa.

APÊNDICE E – Variáveis físico-químicas ao longo da coluna d'água

Tabela 52 - Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região de entrada da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (EptE), ponto do centro (EptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (EptD). Coleta preliminar, outubro/2003.

Prof (m)	EptE				EptC				EptD			
	T (°C)	Cond. (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	T (°C)	Cond. (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	T (°C)	Cond. (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH
0	23,5	821	5,00	6,62	23,1	822	2,50	6,77	23,9	812	4,20	6,75
0,5	23,1	822	2,50	6,54	23,1	822	0,68	6,47	23,1	812	2,70	6,71
1	23,1	822	1,46	6,56	23,1	822	0,34	6,35	23,2	812	1,85	6,71
1,5	23,1	822	0,84	6,59	23,1	821	0,20	6,33	23,2	817	1,03	6,73
2	23,1	821	0,51	6,61	23,1	821	0,12	6,36	23,1	817	0,64	6,73
2,5	23,1	822	0,37	6,62	23,1	821	0,09	6,41	23,1	818	0,45	6,73
3	23,1	822	0,29	6,63	23,1	821	0,08	6,47	23,1	820	0,34	6,73
3,2	23,1	888	0,21	6,57	23,1	821	0,08	6,48	23,1	842	0,23	6,71
3,5	-	-	-	-	23,1	996	0,08	6,41	-	-	-	-

Tabela 53 - Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (CptE), ponto do centro (CptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (CptD). Coleta preliminar, outubro/2003.

Prof (m)	CptE				CptC				CptD			
	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH
0	23,5	832	5,17	7,36	23,8	834	4,03	7,06	24,2	0,856	4,30	6,99
0,5	23,6	827	3,43	7,23	23,6	824	3,12	7,02	24,0	0,831	2,61	6,94
1	23,2	826	2,74	7,15	23,2	823	2,12	6,99	23,2	0,828	2,05	6,95
1,5	23,1	826	2,27	7,09	23,1	823	0,95	6,92	23,1	0,828	1,50	6,98
2	23,1	826	1,73	7,04	23,1	823	0,66	6,91	23,1	0,829	0,91	6,94
2,5	23,1	826	1,26	6,95	23,1	823	0,44	6,87	23,1	0,828	0,63	6,91
3	23,1	827	0,92	6,90	23,1	822	0,33	6,85	23,1	0,829	0,50	6,89
3,5	23,1	826	0,70	6,89	23,1	818	0,27	6,86	23,0	0,824	0,30	6,89
3,8	22,4	1032	0,51	6,70	22,3	1115	0,22	6,72	22,4	0,921	0,20	6,82

Tabela 54 - Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (SptE), ponto do centro (SptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (SptD). Coleta preliminar, outubro/2003.

Prof (m)	SptE				SptC				SptD			
	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH
0	25,5	867	4,35	6,79	25,8	872	3,11	7,06	24,2	856	4,30	6,99
0,5	25,2	852	2,25	7,05	24,6	873	1,54	7,07	24,0	831	2,61	6,94
1	23,7	841	1,75	7,09	24,1	857	1,09	7,09	23,2	828	2,05	6,95
1,5	23,3	838	1,32	7,06	23,2	855	0,59	7,03	23,1	828	1,50	6,98
2	23,1	838	0,91	7,01	23,1	854	0,46	7,02	23,1	829	0,91	6,94
2,5	23,1	838	0,65	6,99	23,1	852	0,30	6,95	23,1	828	0,63	6,91
3	23,1	839	0,46	6,96	23,1	857	0,20	6,91	23,1	829	0,50	6,89
3,5	23,1	835	0,34	6,95	22,8	852	0,16	6,91	23,0	824	0,30	6,89
3,8	22,7	891	0,26	6,88	22,6	891	0,13	6,83	22,4	921	0,20	6,82

	EptE					EptC					EptD				
Prof (m)	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	Pot. Redox (mV)	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	Pot. Redox (mV)	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	Pot. Redox (mV)
0	23,2	557	0,14	8,5	-9,0	23,8	562	0,15	8,4	-2,5	23,9	563	0,08	8,3	-1,6
0,5	23,3	555	0,07	8,5	-8,2	23,3	557	0,06	8,4	-4,3	23,7	562	0,05	8,4	-3,5
1	23,2	556	0,06	8,5	-7,6	23,2	556	0,05	8,4	-4,9	23,3	556	0,03	8,4	-4,9
1,5	23,1	556	0,05	8,5	-7,1	23,2	562	0,04	8,4	-5,3	23,2	554	0,03	8,4	-5,2
2	23,1	556	0,05	8,5	-7,3	23,2	563	0,04	8,4	-5,5	23,1	554	0,03	8,4	-4,8
2,5	23,1	556	0,04	8,5	-6,9	23,1	561	0,04	8,4	-5,2	23,1	555	0,03	8,4	-5,8
3	23,1	556	0,04	8,4	-6,3	23,1	557	0,04	8,4	-5,4	23,1	559	0,03	8,4	-1,7
3,5	22,9	890	0,07	7,9	14,1	22,7	1023	0,07	7,9	15,9	22,9	726	0,04	8,0	8,7

[illegible]

Tabela 57. Valores de temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido e pH ao longo da coluna d'água na região de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto esquerdo (SptE), ponto do centro (SptC) e ponto da direita em relação ao fluxo (SptD). Coleta outubro/2004.

Prof (m)	EptE					EptC					EptD				
	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	Pot. Redox (mV)	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	Pot. Redox (mV)	T (°C)	Cond (mS cm ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	pH	Pot. Redox (mV)
0	23,3	561	0,1	8,4	-4,6	23,3	561	0,11	8,4	-3,8	23,2	559	0,11	8,4	-3,0
0,5	23,1	557	0,05	8,4	-5,1	23,1	557	0,07	8,4	-5,0	23,1	556	0,10	8,4	-4,3
1	23,0	556	0,05	8,4	-5,1	23,0	556	0,06	8,4	-5,1	23,0	555	0,07	8,4	-4,7
1,5	23,0	556	0,05	8,4	-5,0	23,0	556	0,06	8,4	-4,6	23,0	555	0,06	8,4	-4,7
2	23,0	556	0,05	8,4	-5,1	23,0	556	0,05	8,4	-5,0	23,0	556	0,05	8,4	-5,0
2,5	23,0	556	0,05	8,4	-5,3	23,0	556	0,04	8,4	-5,5	23,0	556	0,05	8,4	-5,0
3	23,0	557	0,05	8,4	-4,5	23,0	560	0,04	8,4	-5,1	23,0	557	0,04	8,4	-5,1
3,5	23,0	558	0,04	8,4	-5,1	22,5	592	0,04	8,3	0,8	22,8	572	0,04	8,4	-3,7

APÊNDICE F – Resultados de AME de cada uma das réplicas.

Tabela 58 - Valores individuais de cada frasco-reator para as variáveis Sólidos Voláteis (SV) iniciais e finais, Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, do SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAC na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente e central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE e CptE), do centro (EptC e CptC) e da direita (EptD e CptD) em relação ao fluxo. Coleta preliminar, outubro/2003.

Ensaio	SV _i (mg L ⁻¹)	SV _f (mg L ⁻¹)	AMA (SV _i) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i /SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i /SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
EptE _{0,25Hac1}	1.378,7	1.293,9	0,0689	0,0734	0,0711	0,0459	0,0497	0,0477
EptE _{0,25Hac2}		1.407,8	0,0472	0,0462	0,0466	0,0242	0,0224	0,0233
EptE _{Controle}		1.332,8				0,0230	0,0238	0,0234
EptC _{0,25Hac1}	1.074,0	483,9	0,0326	0,0723	0,0449	0,0295	0,0666	0,0409
EptC _{0,25Hac2}		923,1	0,0326	0,0379	0,0350	0,0295	0,0322	0,0310
EptC _{Controle}		579,7				0,0031	0,0058	0,0040
EptD _{0,25Hac1}	259,0	645,2	0,0644	0,0258	0,0369	0,0386	0,0048	0,0137
EptD _{0,25Hac2}		588,2	0,0579	0,0255	0,0354	0,0322	0,0045	0,0123
EptD _{Controle}		158,7				0,0257	0,0210	0,0231
CptE _{0,25Hac1}	1.790,0	1.571,4	0,0512	0,0583	0,0545	0,0382	0,0271	0,0361
CptE _{0,25Hac2}		1.538,5	0,0829	0,0964	0,0891	0,0698	0,0652	0,0707
CptE _{Controle}		746,3				0,0130	0,0313	0,0184
CptC _{0,25Hac1}	2.582,0	2.004,7	0,0368	0,0473	0,0414	0,0200	0,0256	0,0225
CptC _{0,25Hac2}		2.066,7	0,0497	0,0621	0,0552	0,0329	0,0403	0,0363
CptC _{Controle}		1.991,9				0,0168	0,0218	0,0190
CptD _{0,25Hac1}	561,0	579,7	0,0624	0,0604	0,0614	0,0178	0,0198	0,0189
CptD _{0,25Hac2}		289,8	0,0624	0,1208	0,0823	0,0178	0,0801	0,0398
CptD _{Controle}		615,4				0,0446	0,0406	0,0425

Tabela 59 - Valores individuais de cada frasco-reator para as variáveis Sólidos Voláteis (SV) iniciais e finais, Atividade Metanogênica Aparente e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do $SV_{inicial}$, a partir dos SV_{final} e a partir da média entre $SV_{inicial}$ e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAc, HBu, HPr e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g⁻¹ SV, com amostras provenientes da região de saída do efluente na lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (SptE), do centro (SptC) e da direita (SptD) em relação ao fluxo. Coleta preliminar, outubro/2003.

Ensaio	SV _i (mg L ⁻¹)	SV _f (mg L ⁻¹)	AMA (SV _i) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i /SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i /SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
SptE _{0,25HAc1}		1.718,8	0,0409	0,0446	0,0427	0,0205	0,0125	0,0177
SptE _{0,25HAc2}	1.873,0	1.666,7	0,0409	0,0460	0,0433	0,0205	0,0139	0,0183
SptE _{Controle}		1.194,0				0,0205	0,0321	0,0250
SptC _{0,25HAc1}		3.383,0	0,0328	0,0409	0,0364	0,0237	0,0264	0,0252
SptC _{0,25HAc2}	4.218,0	3.045,1	0,0312	0,0432	0,0363	0,0221	0,0287	0,0251
SptC _{Controle}		2.635,7				0,0091	0,0145	0,0112
SptD _{0,25HAc1}		166,7	0,0648	0,1100	0,0815	0,0177	0,0680	0,0371
SptD _{0,25HAc2}	283,0	571,4	0,1060	0,0525	0,0702	0,0589	0,0105	0,0258
SptD _{Controle}		317,5				0,0471	0,0420	0,0444
SptC _{0,5HAc1}		3.383,0	0,0147	0,0183	0,0163	0,0005	-0,0044	-0,0012
SptC _{0,5HAc2}	4.218,0	3.045,1	0,0175	0,0243	0,0204	0,0033	0,0015	0,0029
SptC _{Controle}		2.635,7				0,0142	0,0228	0,0175
SptCo _{0,25HAc1}		3.107,3	0,0427	0,0579	0,0491	0,0142	0,0034	0,0118
SptCo _{0,25HAc2}		2.978,6	0,0435	0,0616	0,0510	0,0150	0,0070	0,0136
SptCo _{Controle}	4.218,0	2.200,0				0,0288	0,0553	0,0379
SptCo _{Controle}		2.200,0				0,0284	0,0546	0,0374

Ensaio	SV _i (mg L ⁻¹)	SV _f (mg L ⁻¹)	AMA (SV _i) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i /SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i /SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
SptC _{0,25} HBu1		3.072,5	0,04078	0,0560	0,0247	0,0348	0,0409	0,0387
SptC _{0,25} HBu2	4.218,0	3.685,0	0,03177	0,0364	0,0076	0,0258	0,0213	0,0254
SptC _{0,5} HBu1		3.072,5	0,02134	0,0213	0,0247	0,0154	0,0140	0,0162
SptC _{0,5} HBu2		3.685,0	0,00711	0,0071	0,0076	0,0012	-0,0071	-0,0009
SptC _{0,25} HP1		3.447,6	0,02655	0,0325	0,0292	0,0206	0,0174	0,0207
SptC _{0,25} HP2	4.218,0	3.675,6	0,02608	0,0299	0,0279	0,0202	0,0148	0,0194
SptC _{0,5} HP1		3.447,6	0,00996	0,0122	0,0110	0,0040	-0,0031	0,0024
SptC _{0,5} HP2		3.675,6	0,00616	0,0071	0,0066	0,0002	-0,0082	-0,0020
SptC _{0,25} HFor1		6.110,6	0,02513	0,0174	0,0205	0,0192	0,0022	0,0120
SptC _{0,25} HFor2	4.218,0	11.987,2	0,02608	0,0092	0,0136	0,0201	-0,0059	0,0051
SptC _{0,5} HFor1		6.110,6	0,04836	0,0334	0,0395	0,0424	0,0181	0,0310
SptC _{0,5} HFor2		11.987,2	0,05216	0,0184	0,0272	0,0462	0,0031	0,0186
SptC _{Controle 0,25} 1		1.736,2				0,0065	0,0158	0,0092
SptC _{Controle 0,25} 2	4.218,0	1.566,7				0,0053	0,0144	0,0078
SptC _{Controle 0,5} 1		1.736,2				0,0053	0,0130	0,0076
SptC _{Controle 0,5} 2	4.218,0	1.566,7				0,0065	0,0176	0,0095

Tabela 60 - Valores da produção teórica total de metano esperada em cada frasco-reator com adição de fonte orgânica externa nas amostras provenientes das regiões de entrada do afluyente, central e saída do efluente na lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE, SptE), do centro (EptC, CptC, SptC) e da direita (EptD, CptD, SptD) em relação ao fluxo, submetidas aos ensaios de AME. Coleta preliminar, outubro/2003.

Ensaio	Produção teórica esperada de CH₄ (mmol)	Produção total real de CH₄ (mmol)	Relação produção real / teórica
EptE _{0,25HAc} 1	0,359	0,298	0,831
EptE _{0,25HAc} 2		0,346	0,966
EptC _{0,25HAc} 1	0,279	0,298	1,067
EptC _{0,25HAc} 2		0,273	0,977
EptD _{0,25HAc} 1	0,067	0,075	1,107
EptD _{0,25HAc} 2		0,073	1,089
CptE _{0,25 HAc} 1	0,466	0,364	0,782
CptE _{0,25 HAc} 2		0,438	0,939
CptC _{0,25 HAc} 1	0,672	0,398	0,593
CptC _{0,25 HAc} 2		0,463	0,689
CptD _{0,25HAc} 1	0,146	0,178	1,219
CptD _{0,25HAc} 2		0,208	1,429
SptE _{0,25HAc} 1	0,487	0,354	0,727
SptE _{0,25HAc} 2		0,370	0,760
SptC _{0,25HAc} 1	1,097	0,887	0,808
SptC _{0,25HAc} 2		0,775	0,707
SptD _{0,25HAc} 1	0,074	0,055	0,748
SptD _{0,25HAc} 2		0,054	0,734
SptC _{0,5HAc} 1	1,829	0,482	0,253
SptC _{0,5HAc} 2		0,462	0,263

Ensaio	Produção teórica esperada de CH₄ (mmol)	Produção total real de CH₄ (mmol)	Relação produção real / teórica
SptCo _{0,25Hac} 1	0,914	0,676	0,739
SptCo _{0,25Hac} 2		0,734	0,802
SptC _{0,25HBu} 1	0,914	0,725	0,793
SptC _{0,25HBu} 2		0,566	0,619
SptC _{0,5HBu} 1	1,829	0,483	0,264
SptC _{0,5HBu} 2		0,486	0,266
SptC _{0,25HPr} 1	0,914	0,571	0,625
SptC _{0,25HPr} 2		0,529	0,578
SptC _{0,5HPr} 1	1,829	0,181	0,099
SptC _{0,5HPr} 2		0,072	0,040
SptC _{0,25HFor} 1	0,914	0,621	0,679
SptC _{0,25HFor} 2		0,548	0,600
SptC _{0,5HFor} 1	1,829	0,949	0,519
SptC _{0,5HFor} 2		0,9678	0,528

Tabela 61 - Valores individuais de cada frasco-reator para SV_{inicial} antes do ensaio de AME, SV_{inicial} após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME em diferentes relações S_0/X_0 com diferentes substratos com amostras provenientes da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Ensaio	SV_{inicial} amostra original (mg L ⁻¹)	SV_{inicial} após esgotamento da m.o. (mg L ⁻¹)	SV_{final} (mg L ⁻¹)
CptC _{0,25mix} 1	3.955,3	3.574,0	4.469,4
CptC _{0,25 mix} 2			4.199,7
CptC _{0,25 mix} 3			5.190,5
CptC _{0,5mix} 1	3.955,3	3.574,0	5.475,7
CptC _{0,5 mix} 2			5.995,4
CptC _{0,5 mix} 3			4.812,8
CptC _{0,75mix} 1	3.955,3	3.574,0	6.284,8
CptC _{0,75 mix} 2			6.858,5
CptC _{0,75 mix} 3			6.946,4
CptC _{0,25HFor} 1	3.955,3	3.574,0	6.745,6
CptC _{0,25HFor} 2			6.565,6
CptC _{0,25HFor} 3			5.853,4
CptC _{0,5HFor} 1	3.955,3	3.574,0	7.250,8
CptC _{0,5HFor} 2			7.276,0
CptC _{0,5HFor} 3			7.274,2
CptC _{Controle} 1	3.955,3	3.574,0	3.748,0
CptC _{Controle} 2			3.630,0
CptC _{Controle} 3			3.394,0

Tabela 62 - Valores individuais de cada frasco-reator para SV_{inicial} antes do ensaio de AME, SV_{inicial} após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor) na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g^{-1} SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE e SptE), do centro (EptC, CptC e SptC) e da direita (EptD, CptDe SptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Ensaio	SV_{inicial} amostra original (mg L⁻¹)	SV_{inicial} após esgotamento da m.o. (mg L⁻¹)	SV_{final} (mg L⁻¹)
EptC _{0,25mix} 1	25.057,3	29.474,0	28.984,2
EptC _{0,25 mix} 2			31.571,4
EptC _{0,25 mix} 3			29.310,4
EptC _{Controle} 1	25.057,3	29.474,0	28.807,7
EptC _{Controle} 2			28.922,4
EptC _{Controle} 3			31.195,9
CptC _{0,25mix} 1	3.955,3	4.044,0	4.568,3
CptC _{0,25 mix} 2			4.498,0
CptC _{0,25 mix} 3			4.490,2
CptC _{Controle} 1	3.955,3	4.044,0	3.636,7
CptC _{Controle} 2			3.951,3
CptC _{Controle} 3			4.330,6
SptC _{0,25mix} 1	2.692,0	2.982,0	3.460,0
SptC _{0,25 mix} 2			3.748,0
SptC _{0,25 mix} 3			4.258,5
SptC _{Controle} 1	2.692,0	2.982,0	3.098,0
SptC _{Controle} 2			3.005,1
SptC _{Controle} 3			3.034,0

Tabela 63 - Valores individuais de cada frasco-reator para SV_{inicial} antes do ensaio de AME, SV_{inicial} após esgotamento da matéria orgânica e SV_{final} no ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBu ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Ensaio	SV_{inicial} amostra original (mg L ⁻¹)	SV_{inicial} após esgotamento da m.o. (mg L ⁻¹)	SV_{final} (mg L ⁻¹)
CptC _{0,25HAc} 1	3955,3	3.150,0	3.379,0
CptC _{0,25HAc} 2		3.150,0	3.101,0
CptC _{0,25HAc} 3		2.925,0	3.454,0
CptC _{0,25HPr} 1	3.955,3	5.584,0	4.185,0
CptC _{0,25HPr} 2		5.701,0	4.026,0
CptC _{0,25HPr} 3		6.025,0	4.085,0
CptC _{0,25HBu} 1	3.955,3	3.616,0	3.865,0
CptC _{0,25HBu} 2		3.639,0	3.670,0
CptC _{0,25HBu} 3		3.627,5	3.723,0
CptC _{0,25HFor} 1	3.955,3	4.435,0	5.348,0
CptC _{0,25HFor} 2		3.735,0	4.616,0
CptC _{0,25HFor} 3		3.815,0	5.095,0
CptC _{Controle} 1	3.955,3	3.522,0	3.535,0
CptC _{Controle} 2		3.782,0	3.693,0
CptC _{Controle} 3		3.933,0	4.200,0

Tabela 64 - Valores individuais de cada frasco-reator para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do SV_{inicial} , antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e SV_{final} no ensaio de AME utilizando uma mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Amostra	AMA (SV_i) ¹ (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV_i) ² (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV_f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV_i/SV_f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_i) ¹ (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_i) ² (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV_i/SV_f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
CptC _{0,25mix1}	0,1517	0,1679	0,13425	0,1492	0,1230	0,1362	0,1027	0,1176
CptC _{0,25mix2}	0,1416	0,1567	0,13334	0,1441	0,1129	0,1250	0,1018	0,1125
CptC _{0,25mix3}	0,1112	0,1231	0,08477	0,1004	0,0826	0,0914	0,0533	0,0688
CptC _{0,5mix1}	0,1163	0,1287	0,08401	0,1017	0,0876	0,0970	0,0525	0,0701
CptC _{0,5mix2}	0,1214	0,1343	0,08006	0,1003	0,0927	0,1026	0,0486	0,0687
CptC _{0,5mix3}	0,1062	0,1175	0,08727	0,1002	0,0775	0,0858	0,0558	0,0686
CptC _{0,75mix1}	0,0961	0,1063	0,06046	0,0771	0,0674	0,0746	0,0290	0,0455
CptC _{0,75mix2}	0,1062	0,1175	0,06124	0,0805	0,0775	0,0858	0,0297	0,0489
CptC _{0,75mix3}	0,1011	0,1119	0,05758	0,0760	0,0725	0,0802	0,0261	0,0444
CptC _{Controle1}					0,0303	0,0336	0,0320	0,0328
CptC _{Controle2}					0,0303	0,0336	0,0331	0,0333
CptC _{Controle3}					0,0253	0,0280	0,0295	0,0287

¹ SV da amostra original antes do esgotamento da m.o.

² SV no frasco-reator após o esgotamento da m.o.

Tabela 65 - Valores individuais de cada frasco-reator para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados calculados a partir do SV_{inicial} , antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e SV_{final} na amostra submetida ao ensaio de AME utilizando HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g⁻¹ SV e proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (CptE), do centro (CptC) e da direita (CptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Amostra	AMA (SV) ¹ (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV) ² (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV) _i (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i /SV) _f (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV) _i ¹ (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV) _i ² (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV) _f (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _f /SV) _f (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
CptC _{0,25HFor1}	0,0961	0,1063	0,0563	0,0736	0,0674	0,0746	0,0248	0,0420
CptC _{0,25HFor2}	0,1011	0,1119	0,0609	0,0789	0,0725	0,0802	0,0294	0,0473
CptC _{0,25HFor3}	0,0961	0,1063	0,0649	0,0806	0,0674	0,0746	0,0334	0,0490
CptC _{0,5HFor1}	0,0556	0,0616	0,0303	0,0407	0,0270	0,0298	-0,0012	0,0090
CptC _{0,5HFor2}	0,0556	0,0616	0,0302	0,0406	0,0270	0,0298	-0,0013	0,0090
CptC _{0,5HFor3}	0,0455	0,0507	0,0247	0,0332	0,0168	0,0186	-0,0068	0,0016
CptC _{Controle1}					0,0303	0,0336	0,0320	0,0328
CptC _{Controle2}					0,0303	0,0336	0,0331	0,0333
CptC _{Controle3}					0,0253	0,0280	0,0295	0,0287

¹ SV da amostra original antes do esgotamento da m.o.

² SV no frasco-reator após o esgotamento da m.o.

Tabela 66 - Valores da produção teórica e real de metano em cada frasco-reator no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBu e HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25, 0,5 e 0,75 g DQO g⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004

Ensaio	Produção teórica esperada de CH ₄ (mmol)	Produção total real de CH ₄ (mmol)	Relação produção real / teórica
CptC _{0,25mix} 1	0,775	0,317	0,409
CptC _{0,25 mix} 2		0,326	0,421
CptC _{0,25 mix} 3		0,290	0,374
CptC _{0,5mix} 1	1,550	0,275	0,177
CptC _{0,5 mix} 2		0,293	0,189
CptC _{0,5 mix} 3		0,273	0,176
CptC _{0,75mix} 1	2,324	0,238	0,102
CptC _{0,75 mix} 2		0,259	0,111
CptC _{0,75 mix} 3		0,265	0,114

Tabela 67 - Valores da produção teórica e real de metano em cada frasco-reator no ensaio de AME utilizando HFor nas relações S_0/X_0 de 0,25 e 0,5 g DQO g⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004

Ensaio	Produção teórica esperada de CH ₄ (mmol)	Produção total real de CH ₄ (mmol)	Relação produção real / teórica
CptC _{0,25HFor} 1	0,775	0,237	0,306
CptC _{0,25HFor} 2		0,264	0,341
CptC _{0,25HFor} 3		0,261	0,337
CptC _{0,5HFor} 1	1,550	0,177	0,114
CptC _{0,5HFor} 2		0,186	0,120
CptC _{0,5HFor} 3		0,171	0,110

Tabela 68 - Valores individuais de cada frasco-reator para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do SV_{inicial} , antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e SV_{final} no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e Hfór na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostras provenientes das regiões de entrada do afluente, central e de saída do efluente da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati nos pontos da esquerda (EptE, CptE e SptE), do centro (EptC, CptC e SptC) e da direita (EptD, CptD e SptD) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Amostra	AMA (SV _i) ¹ (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i) ² (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV ₀) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i /SV ₀) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) ¹ (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) ² (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV ₀) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i /SV ₀) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
EptC _{0,25mix1}	0,17480	0,14861	0,15112	0,14985	0,04603	0,03913	0,04234	0,04076
EptC _{0,25mix2}	0,21151	0,17982	0,16787	0,17364	0,08274	0,07034	0,05910	0,06455
EptC _{0,25mix3}	0,18438	0,15675	0,15762	0,15718	0,05561	0,04727	0,04885	0,04810
EptC _{Controle1}					0,11813	0,10043	0,10275	0,10158
EptC _{Controle2}					0,12930	0,10993	0,11202	0,11097
EptC _{Controle3}					0,13888	0,11807	0,11155	0,11472
CptC _{0,25mix1}	0,24271	0,23739	0,21014	0,22294	0,20900	0,20442	0,17627	0,18956
CptC _{0,25mix2}	0,22754	0,22255	0,20009	0,21072	0,19383	0,18958	0,16621	0,17734
CptC _{0,25mix3}	0,25788	0,25223	0,22716	0,23904	0,22417	0,21925	0,19328	0,20566
CptC _{Controle1}					0,03540	0,03462	0,03850	0,03645
CptC _{Controle2}					0,03540	0,03462	0,03543	0,03502
CptC _{Controle3}					0,03034	0,02967	0,02771	0,02866
SptC _{0,25mix1}	0,16345	0,14755	0,12717	0,13660	0,11887	0,10731	0,08776	0,09679
SptC _{0,25mix2}	0,16345	0,14755	0,11740	0,13076	0,11887	0,10731	0,07799	0,09094
SptC _{0,25mix3}	0,19316	0,17438	0,12211	0,14364	0,14859	0,13414	0,08270	0,10382
SptC _{Controle1}					0,04458	0,04024	0,03874	0,03947
SptC _{Controle2}					0,04458	0,04024	0,03993	0,04009
SptC _{Controle3}					0,04458	0,04024	0,03955	0,03989

¹ SV da amostra original antes do esgotamento da m.o.

² SV no frasco-reator após o esgotamento da m.o.

Tabela 69 - Valores da produção teórica e real de metano em cada frasco-reator no ensaio de AME utilizando mistura dos ácidos HAc, HPr, HBU e HFor na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004

Ensaio	Produção teórica esperada de CH ₄ (mmol)	Produção total real de CH ₄ (mmol)	Relação produção real / teórica
EptC _{0,25mix} 1	6,390	1,017	0,159
EptC _{0,25 mix} 2		1,009	0,158
EptC _{0,25 mix} 3		1,288	0,202
CptC _{0,25mix} 1	0,878	0,916	1,045
CptC _{0,25 mix} 2		1,171	1,336
CptC _{0,25 mix} 3		1,684	1,921
SptC _{0,25mix} 1	0,646	0,271	0,419
SptC _{0,25 mix} 2		0,278	0,430
SptC _{0,25 mix} 3		0,295	0,456

Tabela 70 - Valores individuais de cada frasco-reator para Atividade Metanogênica Aparente (AMA) e Atividade Metanogênica Específica (AME) calculados a partir do SV_{inicial} , antes e após o esgotamento da m.o., do SV_{final} e a partir da média entre SV_{inicial} após esgotamento da m.o. e SV_{final} na amostra submetida ao ensaio de AME utilizando HAc, HPr, HBu ou HFor individualmente na relação S_0/X_0 de 0,25 g DQO g⁻¹ SV e proveniente da região central da lagoa anaeróbica da ETE-Cajati no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Amostra	AMA (SV _i) ¹ (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i) ² (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AMA (SV _i /SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) ¹ (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i) ² (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)	AME (SV _i /SV _f) (mmol CH ₄ g ⁻¹ SV h ⁻¹)
CptC _{0,25HAc} 1	0,0149	0,0187	0,0174	0,0180	0,0133	0,01700	0,0158	0,0164
CptC _{0,25HAc} 2	0,0140	0,0175	0,0178	0,0177	0,0124	0,01586	0,0162	0,0160
CptC _{0,25HAc} 3	0,0158	0,0214	0,0181	0,0196	0,0143	0,01974	0,0165	0,0180
CptC _{0,25HPr} 1	0,0025	0,0018	0,0024	0,0020	0,0010	0,00013	0,0008	0,0004
CptC _{0,25HPr} 2	0,0030	0,0021	0,0030	0,0025	0,0015	0,00044	0,0013	0,0008
CptC _{0,25HPr} 3	0,0028	0,0019	0,0027	0,0022	0,0013	0,00020	0,0011	0,0006
CptC _{0,25HBu} 1	0,0123	0,0134	0,0126	0,0130	0,0107	0,01178	0,0109	0,0113
CptC _{0,25HBu} 2	0,0121	0,0132	0,0131	0,0131	0,0106	0,01153	0,0114	0,0115
CptC _{0,25HBu} 3	0,0112	0,0122	0,0119	0,0120	0,0096	0,01052	0,0102	0,0104
CptC _{0,25HFor} 1	0,0147	0,0131	0,0108	0,0119	0,0131	0,01142	0,0092	0,0102
CptC _{0,25HFor} 2	0,0151	0,0160	0,0130	0,0143	0,0136	0,01435	0,0113	0,0127
CptC _{0,25HFor} 3	0,0150	0,0156	0,0117	0,0133	0,0134	0,01391	0,0100	0,0117
CptC _{Controle} 1					0,0017	0,00193	0,0019	0,0019
CptC _{Controle} 2					0,0014	0,00143	0,0015	0,0014
CptC _{Controle} 3					0,0016	0,00163	0,0015	0,0016

¹ SV da amostra original antes do esgotamento da m.o.

² SV no frasco-reator após o esgotamento da m.o.

Tabela 71 - Valores da porcentagem de consumo de fonte de carbono externa e produção teórica e real de metano em cada frasco-reator durante o ensaio de AME com amostra proveniente da região central da lagoa anaeróbia da ETE-Cajati, no ponto do centro (CptC) em relação ao fluxo. Coleta de dezembro/2004.

Ensaio	% de consumo de fonte externa	Produção teórica esperada de CH₄ (mmol)	Produção total real de CH₄ (mmol)	Relação produção real / teórica
CptC _{0,25HAc} 1	67,1	12,106	4,457	0,368
CptC _{0,25HAc} 2	62,7	12,360	4,376	0,354
CptC _{0,25HAc} 3	75,3	13,062	4,164	0,319
CptC _{0,25HPr} 1	45,2	7,839	1,606	0,205
CptC _{0,25HPr} 2	88,2	7,889	1,638	0,208
CptC _{0,25HPr} 3	53,1	7,864	1,612	0,205
CptC _{0,25HBu} 1	54,4	9,615	3,806	0,396
CptC _{0,25HBu} 2	62,6	8,097	4,162	0,514
CptC _{0,25HBu} 3	50,6	8,856	3,672	0,415
CptC _{0,25HFor} 1	42,9	6,829	4,405	0,645
CptC _{0,25HFor} 2	61,0	6,829	4,773	0,699
CptC _{0,25HFor} 3	90,4	6,341	4,616	0,728