USP

Campus de São Carlos

Avaliação da comunidade e atividade microbiana em reator anaeróbio de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP), através de métodos cromatográficos, exames microscópicos e técnicas moleculares de PCR, ARDRA *e slot-blot*

AUTORA:. ELIZABETH APARECIDA BARALDI

ORIENTADORA: PROF[a]. Dr[a].ROSANA FILOMENA VAZOLLER
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. GILSON PAULO MANFIO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

Serviço de Pós-Gradução EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 15/10/01

Ass.: Guilherme

Avaliação da comunidade e atividade microbiana em reator anaeróbio de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP), através de métodos cromatográficos, exames microscópicos e técnicas moleculares de PCR, ARDRA e slot-blot

FARM. BIOQ. ELIZABETH APARECIDA. BARALDI

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

ORIENTADORA: PROF[a]. Dr[a].ROSANA FILOMENA. VAZOLLER

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. GILSON PAULO MANFIO

EESC - USP Biblioteca CAMPUS DE S. CARLOS

SÃO CARLOS - 2001

DEDALUS - Acervo - EESC

31100036809

Class. TESE
Cutt. 0562
Tombo T0229/01

st 1207591

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

B224a

Baraldi, Elizabeth Aparecida
Avaliação da comunidade e atividade microbianas em reator anaeróbio de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP), através de métodos cromatográficos, exames microscópicos e técnicas moleculares de PCR, ARDRA e slot-blot / Elizabeth Aparecida Baraldi. -- São Carlos, 2001.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2001.
Área: Hidraúlica e Saneamento.
Orientador: Profª. Drª. Rosana Filomena Vazoller.
Co-Orientador: Prof. Dr.Gilson Paulo Manfio

1. Pentaclorofenol. 2. Desalogenação redutiva. 3. Degradação anaeróbia. 4. Domínio *Archaea*. 5. PCR. 6. ARDRA. 7. Hibridaçào slot-blot. I. Titulo.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Farmacêutica **ELIZABETH APARECIDA BARALDI**

Tese defendida e julgada em 06-08-2001 perante a Comissão Julgadora:

Aprovada

Profa. Dra. **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello")

Aprovada.

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

Aprovada

Dra. **MÁRCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLI DAMIANOVIC**
(Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello")

APROVADO

Dr. **GILSON PAULO MANFIO**
(Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello")

Aprovada

Prof. Dr. **EDSON LUIZ SILVA**
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)

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

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

Dedico este trabalho à minha mãe, que foi sempre o alicerce de meu desenvolvimento, ao meu saudoso pai pelo caráter digno que me deixou, aos meus irmãos Onofre e Eduardo pela ajuda nos momentos difíceis, ao meu esposo, companheiro e grande amigo, Dari, pelo carinho, dedicação e apoio, e especialmente ao meu filho Tiago, um raio luz na minha vida!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, tenho o prazer de agradecer o Prof. Dr. Eduardo Cleto Pires pelo apoio e orientação inicial.

À Profª. Drª. Rosana Filomena Vazoller, eu agradeço a orientação e a oportunidade de estudar e prazerosamente entender o importante papel da bioquímica e microbiologia e seus desbravamentos com as ferramentas da biologia molecular nos processos biológicos saneadores.

Ao Prof. Dr. Gilson Paulo Manfio pela co-orientação quanto as técnicas de biologia molecular e a possibilidade de realização das análises na Fundação André Tosello.

Agradeço o Prof. Dr. Eugênio Foresti pelas sugestões oferecidas durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. João Bosco Ladislau de Andrade e a Profª. Elizabeth de Mattos Moraes pelas sugestões na redação.

Aos colegas Ariuska e Lorena pela amizade e ajuda inicial com a operação do reator, Kátia, Silvana e Suzi que auxiliaram nas práticas iniciais do laboratório de microbiologia anaeróbia e Juliana pela ajuda inicial com as práticas de biologia molecular.

Às Técnicas, Profª. Elizabeth de Mattos Moraes e Maria Angela Talarico pela dedicação nas análises cromatográficas. À Drª. Eloísa P. Gianotti, pelos auxílios prestados durante o trabalho no laboratório de processos anaeróbios.

A FAPESP pelas verbas que possibilitaram o desenvolvimento do trabalho.

A CAPES pela bolsa cedida.

Ao Dari Campolina de Onofre, pela ajuda na edição das imagens e editoração do texto e pela paciência e cooperação em todos os momentos.

E a todos os amigos que de alguma forma ajudaram.

" ...ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.
E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes e não tivesse amor, nada seria..."

Novo testamento
1 coríntios 13
capítulo 13

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i
LISTA DE TABELAS viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS xi
RESUMO xiv
ABSTRACT xv
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 4
3. REVISÃO DE LITERATURA 5
3a - Reação de desalogenação redutiva 5
3a1 - Desalogenação redutiva com enzimas específicas 8
3a2 - Desalogenação redutiva por enzimas não-específicas 9
3a3 - Desalogenação redutiva por sistemas enzimáticos 9
3a4 - Bioquímica da desalogenação redutiva 12
3a5 - Biodisponibilidade dos organoclorados 16
3a6 - Adaptação microbiana- aspectos fisiológicos e bioquímicos 19
3a7 - Desalogenação redutiva de organoclorados em culturas anaeróbias mistas 24
3a8 - Desalogenação redutiva em culturas puras 27
3a9 - Importância das metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato para a desalogenação redutiva e mineralização do PCP 30
3a10 - Morfologias predominantes em grânulos anaeróbios que desalogenam redutivamente o PCP 32
3b - Biologia molecular e detecção de microrganismos 34
3b1 - Reação de polimerase em cadeia (PCR) 35
3b2 - Hibridação em membrana suporte 37
3b3- ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restrition Analysis*) 41
4. MATERIAIS E MÉTODOS 43
4.1 - Instalações experimentais – Reator anaeróbio de leito fixo (RALHF) 43
4.1.1 - Inoculação de microrganismos no reator- (RALHF) 44
4.2 – Meio de cultura 44
4.2.1 - Preparação do meio ZINDER 44
4.2.2 - Preparação da solução de traços de metais 45
4.2.3 - Preparação da solução de bicarbonato de sódio 46
4.2.4 - Preparação da solução de vitaminas 46
4.2.5 - Preparação da solução de extrato de levedura 47
4.2.6 - Redução do meio de cultivo ZINDER 47
4.2.7- Preparações das soluções estoques de fonte de carbono 48
4.2.8 - Preparação da solução estoque de pentaclorofenol 48
4.2.9 - Preparação do meio de cultivo basal acrescido das fontes orgânicas e demais soluções 49
4.3 - Operação do sistema 49

4.3.1 - Análises para o monitoramento do reator..... 50
4.3.1 - Esquema mostrando o desenvolvimento do experimento..... 51
4.3.3 - Sistema de coleta e estocagem de amostras..... 52
4.4 - Procedimentos para análises físico-químicas..... 52
4.4.1 - Análises cromatográficas..... 52
Cromatografia de gás metano..... 53
Cromatografia de ácidos voláteis e fenol..... 53
Cromatografia do Pentaclorofenol e seus metabólitos..... 54
4.4.2 - Demanda química de oxigênio – DQO..... 55
4.4.3 - Análises de pH..... 55
4.5 – Análises microbiológicas..... 55
4.5.1 - Exames microscópicos..... 56
Microscopia óptica, contraste de fase e fluorescência..... 56
Microscopia de varredura eletrônica..... 57
4.5.2 - Análises de biologia molecular..... 57
4.5.2.1 - Extração de DNA..... 58
4.5.2.2 - Purificação do DNA..... 59
4.5.2.3 - Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)..... 59
4.5.2.4 - PCR específico para Domínio *Archaea*..... 60
4.5.2.5 - Análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA)..... 61
4.5.2.6 - Hibridação *Slot- Blot*..... 61
Sondas de oligonucleotídeos..... 62
Reconstituição das sondas..... 62
Cálculo das concentrações das sondas..... 63
Reação de marcação das sondas..... 63
Estimativa d as concentrações das sondas marcadas..... 63
Protocolo para fixação do DNA na membrana..... 64
Hibridização usando sondas marcadas com digoxigenina (DIG)..... 65
Detecção do sinal da hibridação usando quimioluminescência..... 66
Revelação do filme raio-X..... 67
Cálculo da porcentagem final de cada grupo populacional analisado..... 67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 68
5.1 - Origem do inóculo do reator anaeróbio horizontal de leito fixo..... 69
5.2 – Operação do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)..... 72
5.2.1 - Estabelecimento das condições metanogênicas no RAHLF..... 75
5.2.2 – Operação do sistema RAHLF na presença de PCP..... 77
5.3 – Análise das características morfológicas dos microrganismos presentes no biofilme do reator..... 89
5.4 – Análises para caracterização dos microrganismos através de métodos da Biologia Molecular..... 105
5.4.1- Extração do DNA das amostras..... 105

5.4.2 – Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) 108

5.4.3 – Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA) 110

5.4.4- Hidridação *Slot-Blot* 115
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES 119
ANEXOS 123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 138
APÊNDICES 152

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3a1 - Exemplos de desalogenação redutiva 07

FIGURA 3a2 – Hipótese esquematizada da transferência de elétrons para o PCE durante a metanogenese, resultando na formação de TCE. E os elétrons (X) envolvidos na biossíntese do metano 13

FIGURA 3a3- Relação sintrófica em um consórcio definido de microrganismos que crescem com 3Clorobenzoato, mostrando a hipótese do fluxo de nutrientes entre eles 14

FIGURA 3a4 – Ilustração do modelo respiratório, no qual, uma força próton-motiva pode acoplar a desalogenação redutiva e síntese de ATP via uma ATPase próton-dirigida. BZ-benzoato, DCl – enzima desalogenadora, FDH dehidrogenase formiato 15

FIGURA 3a5 – Modelo de sistema respiratório da *Dehalobacter restrictus* ,Hy = hidrogenase, ETS = sistema de transferência de elétrons, PCER = redutase tetracloroetileno, PCE = tetracloroetileno, cis-1,2 DCE = cis-1,2 dicloroetileno 16

FIGURA 3a6 – Fluxo da informação genética na expressão dos genes 20

FIGURA 4.1 - Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), mostrando os pontos de coleta 43

FIGURA 4.2 - Fluxograma do experimento mostrando o esquema de análises 51

FIGURA 4.3 - Estratégias para o estudo do DNA da população presente na amostra do reator por PCR, ARDRA, Slotting-blot 58

FIGURA 5.1 Fotomicrografias referentes a mistura dos lodos, examinado sob microscopia de contraste de fase (aumento de 1240x). (A) Feixe de células formadoras de filamentos relacionados ao gênero *Methanosaeta sp.*. (B) Célula

formadora de filamento relacionada ao gênero *Methanosaeta sp.*.(C) Células em formato de bacilos curvos, retos, cocos, diplococos. 72

FIGURA 5.2.1 Três estágios diferentes na formação do biofilme na matriz de poliuretano : a e b – Células aderidas a espuma de poliuretano formando um tapete, c – formação de micro-granulo aderido a parte da espuma, d. micro-granulo na espuma de poliuretano. 74

FIGURA 5.1.1 Comportamento dos parâmetros DQO, pH, ácidos orgânicos voláteis e CH_4 nos primeiros trinta dias de operação do reator. 76

FIGURA 5.2.1 (A) Concentração da DQO adicionada ao reator, mgDQO/L em relação ao período de operação; (B) Períodos das diferentes adições de PCP 78

FIGURA 5.2.2 Diferentes estágios na formação do biofilme na matriz de poliuretano : a, b e c – Três diferentes tamanho de micro-grânulos aderidos na espuma de poliuretano e d - células observadas na superfície do micro-grânulo. 79

FIGURA 5.2.3 Perfis de DQO (a): no 47° dia de operação, sem adição de PCP. (b) : no 85° dia de operação, logo após adição de 2mgPCP/L no meio de cultura. (c) : no 120° dia de operação com meio de cultura contendo de 2mgPCP/L. (d) : no 166° dia de operação com meio de cultura contendo 5mgPCP/L. (e) : no 190° dia de operação com meio de cultura contendo 8mgPCP/L. (f) : no 207° dia de operação com meio de cultura contendo 10mgPCP/L 81

FIGURA 5.2.4 Perfis de Ácidos Orgânicos Voláteis- (a): no 47° dia de operação sem adição de PCP. (b) : no 120° dia de operação, em meio de cultura contendo 2mgPCP/L. (c) : no 166° dia de operação, em meio de cultura contendo 5mgPCP/L. (d) : no 190° dia de operação, em meio de cultura contendo 8mgPCP/L (e) : no 207° dia de operação, em meio de cultura contendo 10mgPCP/L 83

FIGURA 5.2.5 Perfis de PCP (a): no 120° dia de operação, com afluente contendo 2,0mgPCP/L. (b) : no 166° dia de operação, com afluente contendo 5,0mgPCP/. (c) : no 190° dia de operação, com afluente contendo 8,0mgPCP/L. (d) : no 207° dia de operação, com afluente contendo 10,0mgPCP/L 85

FIGURA 5.2.6 Concentração de metano em função do tempo de operação. As setas indicando as adições de PCP nas concentrações: 2, 5, 8, 10 e 13 mg/l e dias de operação de: 72, 133, 175, 193 e 207 86

FIGURA 5.2.7 Decaimento da DQO em função do tempo de operação. As setas indicando as adições de PCP nas concentrações: 2, 5, 8, 10 e 13 mg/l e dias de operação de: 72, 133, 175, 193 e 207 87

FIGURA 5.3.1 Fotomicrografias (a) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 5000x)(seta indicando as sarcinas). (b) - Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x)(seta indicando as sarcinas). (c) – Células formadoras de filamentos, relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 5000x). (d) - Células em formato bacilos curtos, relacionadas ao gênero *Methanobrevibacter* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x))(seta indicando bacilo curto aos pares) 94

FIGURA 5.3.2 Fotomicrografias (a) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 10000x). (b) - Células em formato de cocos fluorescentes, analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x). (c) – Células formadoras de filamentos, relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 10000x). (d) - Células em formato bacilos, relacionadas ao gênero *Methanobrevibacter*

sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x) 95

FIGURA 5.3.3 Fotomicrografias (a) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 2000x). (b)- Células em formato de sarcinas, relacionadas aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 5000x). (c) – Células em formato bacilos curtos (cocobacilos fluorescentes), relacionadas ao gênero *Methanobrevibacter* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x))(seta indicando os bacilos curtos). (d) - Células em formato bacilos (aparentando formação de cadeias ou filamentos), relacionadas ao gênero *Methanobacterium* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x))(seta indicando os bacilos em filamentos). (e) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x) 96

FIGURA 5.3.4 Fotomicrografias (a) – Células em formato de cocos fluorescentes, analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x). (b) - Células em formato de cocos, analisadas sob microscopia contraste de fase (aumento 1240x). (c) - Células em formato de bacilos, analisadas sob microscopia de contraste de fase (aumento 1240x) com células em formato de sarcinas no centro 97

FIGURA 5.3.5 Fotomicrografias (a) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento de 5000x). (b) – Células filamentosas formando feixes, relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento de 3000x). (c) – Células em formato de bacilos curtos, examinadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento de 10000x). (d) – Destacando célula em formato de espiroqueta,

	analisada sob microcopia eletrônica de varredura (aumento de 10000x). (e) – Aglomerado de células em formato de sarcinas relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia fluorescência (aumento de 1240x). (F) – Aglomerado de células em formato bacilos, analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento de 1240x)	 98
FIGURA 5.3.6	Fotomicrografias (a) Seta apontando o *gênero Methanosarcina sp.*, analisado sob microscopia de fluorescência (aumento de 1240 x). (b) Seta apontando o *gênero Methanosarcina sp.*, analisado sob microscopia de contraste de fase (aumento de 1240 x). (c) e (d) *Methanosarcina sp.* formando pacotes, analisado sob microscopia de contraste de fase e fluorescência (aumento de 1240 x).	 101
FIGURA 5.3.7	Fotomicrografias (a) e (b), As setas indicam a morfologia do provável gênero *Methanobacterium sp.*, sob microscopia de fluorescência e controle de fase, respectivamente	 101
FIGURA 5.3.8	Fotomicrografias (a) e (b) indicam morfologia relacionada ao gênero *Methanobrevibacter* sp, sendo que a seta em (a) mostra formação em cadeia, e em (b) formações aos pares, sob microscopia de fluorescência (aumento 1240 x)	 102
FIGURA 5.3.9	Fotomicrografias (a) e (b) que indicam a morfologia relacionada ao gênero *Methanospirillum sp.*, sob microscopia de fluorescência e contraste de fase, respectivamente, (aumento de 1240 x).	 102
FIGURA 5.4.1	Fotografia de gel de agarose corado com brometo de etídio, apresentando bandas de DNA extraídos de amostras de microrganismos presentes em biofilme de reator anaeróbio em ausência de PCP. A quantificação do DNA extraído de amostra do biofilme estão indicadas nas colunas 1, 2 e 3, e referem-se aos padrões de DNA de	

concentração 15ng, 30ng e 100ng, respectivamente. As linhas 4, 5, 6, 7 e 8 referem-se aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator 106

FIGURA 5.4.2 Fotografia de gel de agarose corado com brometo de etídio, apresentando bandas de DNA extraídos de amostras de microrganismos presentes em biofilme de reator anaeróbio com adição de 2mgPCP/L. As linhas 1, 2, 3, 4 e 5 referem-se aos respectivos pontos do reator. 107

FIGURA 5.4.3 Fotografias de géis de agarose corados com brometo de etídio, apresentando bandas de DNA extraídos de amostras de microrganismos presentes em biofilme de reator anaeróbio recebendo 10mgPCP/L. (a) Extração de DNA sem a purificação dos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator. (b) Concentração de DNA da amostra de 10mgPCP/L extraída e purificada. As linhas 1, 2, 3, referem-se a concentração de padrões de 15, 30 e 50ng, respectivamente e as linhas 4, 5, 6, 7 e 8 aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator. 107

FIGURA 5.4.2.1 Fotografia do gel de eletroforese após a reação de polimerase em cadeia 2,0mgPCP/L e 10,0mgPCP/L, e sem PCP. Na parte superior estão apresentados as amostras referentes aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator, para as amostras sem PCP e 2,0mgPCP/L e, na parte inferior, os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator da amostra 10,0mgPCP/L. Nas duas partes, M refere-se a padrão de DNA, mostrando que o fragmento amplificado desta reação foi de 1,5Kb referentes aos *primers* universais 109

FIGURA 5.4.2.2 Fotografia do gel de eletroforese após a reação de polimerase em cadeia submetidas a 2,0mgPCP/L, 10,0mgPCP/L e sem PCP. A parte superior refere-se às amostras referentes aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator para as amostras sem PCP e 2,0mgPCP/L e na parte inferior os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator, a 10,0mgPCP/L. Nas duas partes M refere-se a padrão de DNA, mostrando que o fragmento amplificado desta reação foi de 1,0Kb referentes aos *primers* específicos para o Domínio *Archaea* 109

FIGURA 5.4.3.1 Fotografia do gel com padrões ARDRA obtidos com a enzima de restrição *Dde* para as amostras submetidas a 2,0mgPCP/L e 10mgPCP/L, e sem PCP. As primeira e última linhas marcador de fragmentos de DNA sendo M_1, de 100pb e a M_2, de 50pb. As linhas 1, 2,3,4 e 5 representam as amostras sem PCP, as 6, 7, 8, 9 e 10 as amostras submetidas a 2,0mgPCP/L e as 11, 12, 13, 14 e 15 as amostras submetidas a 10,0mgPCP/L. Setas mostrando coluna com bandas mais fortes 111

FIGURA 5.4.3.2 Fotografia do gel com padrões ARDRA obtidos com a enzima de restrição *AluI* para as amostras 2,0mgPCP/L, 10mgPCP/L e sem PCP. As linhas M_1 e M_2 representam o marcador de fragmentos de DNA. de 100pb e 50pb, respectivamente. As linhas 1,2,3,4 e 5 representam as amostras livres de PCP, as 6, 7, 8, 9 e 10 as amostras 2,0mgPCP/L e as 11, 12, 13, 14 e 15 as submetidas a 10,0mgPCP/L. Setas mostrando colunas com maior números de bandas 112

FIGURA 5.4.3.3 Fotografia do gel com padrões ARDRA obtidos com a enzima de restrição *RSA* para as amostras 2,0mgPCP/L, 10,0mgPCP/L, e livre de PCP. M_1 e M_2 representam o marcador de fragmentos de DNA, com 100pb e 50pb, respectivamente. As linhas 1, 2, 3, 4 e 5 representam a amostra livre de PCP; as 6, 7, 8, 9 e 10, as amostras submetidas a 2,0mgPCP/L e as 11, 12, 13, 14 e 15 as amostras submetidas a 10,0mgPCP/L. Setas mostrando colunas com maior número de bandas 114

FIGURA 5.4.4.1 Esquema elaborado para estimar as porcentagens dos grupos de microrganismos analisados pelo método *slot-blot*. 116

FIGURA 5.4.4.2 Raio-X referente a análise *slot-blot* realizada para as amostras: livres de PCP (colunas: 1, 2, 3, 4 e 5 das linhas a, b, c, d, e, f, g e h), submetidas a 2mgPCP/L (colunas: 6, 7, 8, 9 e 10 das linhas a, b, c, d, e, f, g e h) e submetidas a 10mgPCP/L (colunas: 1, 2, 3, 4 e 5 das linhas a_1, b_1, c_1, d_1, e_1, f_1, g_1 e h_1), ... 117

LISTA DE TABELAS

TABELA 3b1- Sondas de oligonucleotídeos utilizadas em hibridações 39

TABELA 4.1- Composição do meio de cultivo ZINDER 45

TABELA 4.2- Composição da solução traços de metais meio ZINDER 46

TABELA 4.3- Composição da solução de vitaminas 47

TABELA 4.4- Fontes de carbono 48

TABELA 4.5 - Composição do Substrato 49

TABELA 4.6- Análises de monitoramento do reator e realização de perfis 50

TABELA 4.7- Análises microbiológicas 50

TABELA 4.11- Cálculo das temperaturas de lavagem estringente de cada sonda 66

TABELA 5.3.1 Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator sem adição de PCP, após cerca de 48 dias de operação 90

TABELA 5.3.2 Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator na concentração de 2mg/L de PCP, após cerca de 120 dias de operação 90

TABELA 5.3.3 Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator na concentração de 5mg/L de PCP, após cerca de 166 dias de operação 90

TABELA 5.3.4 Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator na concentração de 8mg/L de PCP, após cerca de 190 dias de operação 91

TABELA 5.3.5 Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator na concentração de 10mg/L de PCP, após cerca 207 dias de operação 91

TABELA 8.1	Concentração de Ácidos Orgânicos Voláteis no efluente durante a partida do reator	 123
TABELA 8.2	Concentração de metano nos pontos A, B e C durante a partida do reator	 123
TABELA 8.3	Variação de pH nos pontos: Entrada, ponto 3 ao longo do reator e saída, durante a partida do reator	 124
TABELA 8.4	Concentração de DQO e Eficiência de remoção durante a partida do reator	 124
TABELA 8.5	Concentração (mg/L) de DQO de entrada e saída no reator durante o período experimental	 127
TABELA 8.6	Concentração de CH_4 em mmol/L obtidos durante o período experimental	 129
TABELA 8.7	Concentração de PCP e seus metabólitos durante o período experimental	 130
TABELA 8.8	Perfil de DQO no 47° de operação do reator, sem adição de PCP	 134
TABELA 8.9	Perfil de DQO no 85° de operação do reator, com adição de 2mgPCP/L	 134
TABELA 8.10	Perfil de DQO no 120° de operação do reator, com adição de 2mgPCP/L	 134
TABELA 8.11	Perfil de DQO no 166° de operação do reator, com adição de 5mgPCP/L	 134
TABELA 8.12	Perfil de DQO no 190° de operação do reator, com adição de 8mgPCP/L	 135
TABELA 8.13	Perfil de DQO no 207° de operação do reator, com adição de 10mgPCP/L	 135
TABELA 8.14	Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 47° de operação do reator, sem adição de PCP	 135
TABELA 8.15	Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L)	

	no 120° de operação do reator, com adição de 2mgPCP/L	.....	135
TABELA 8.16	Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 166° de operação do reator, com adição de 5mgPCP/L	.....	136
TABELA 8.17	Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 190° de operação do reator, com adição de 8mgPCP/L	.....	136
TABELA 8.18	Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 207° de operação do reator, com adição de 10mgPCP/L	.....	136
TABELA 8.19	Perfil de PCP no 120° de operação do reator, com adição de 2mgPCP/L	.....	137
TABELA 8.20	Perfil de PCP no 166° de operação do reator, com adição de 5mgPCP/L	.....	137
TABELA 8.21	Perfil de PCP no 190° de operação do reator, com adição de 8mgPCP/L	.....	137
TABELA 8.22	Perfil de PCP no 207° de operação do reator, com adição de 10mgPCP/L	.....	137
TABELA A.1	Nomenclatura de sondas e *primers*	.....	152
TABELA 4.8-	Reação de marcação das sondas	.....	153
TABELA 4.9-	Diluições das sondas marcadas	.....	153
TABELA 4.10 -	Diluições do DNA padrão	.....	153

Lista de Abreviaturas e Siglas

ARDRA	*Amplified Ribisomal DNA Restrition Analysis*
ATP	Adenosina trifosfato
BESA	ácido 2bromoetanosulfonado
Biolog. Mol.	biologia molecular
BRS	bactéria redutora de sulfato
CBz	clorobenzoato
CNTP	condições normais de temperatura e pressão
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Conc.	concentração
CP	clorofenol
CPCR	substrato da fosfatase alcalina (Boehringer-mannhein)
CT	carbono tetraclorado
DCP	diclorofenol
DGGE	*denaturing gradient gel eletrophoresis*
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
DQO	demanda química de oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
FISH	*Fluorescent in situ hibridization*
GMOs	microrganismos geneticamente modificados
HCB	hexaclorobenzeno
IRPTC	*International Register of Potentially Toxic Chemical*
MEV	microscopia eletrônica de varredura
Norm.	Normalmente
p.a.	puro para análise
PA	*primers* de Domínio *Archaea*
Paf	ponto de coleta do afluente
PCB	policlorobenzeno
PCDD	dibenzo para dioxinas policloradas
PCDF	dibenzofuranos policlorados
PCE	policloroetileno

PCP	pentaclorofenol
PCR	reação em cadeia de polimerase
Pef	ponto de coleta do efluente
Pi	fosfato inorgânico
PU	*primers* de Domínio Universal
q.s.p.	quanto serve para
RAHLF	reator anaeróbio horizontal de leito fixo
rDNA	DNA codificado a partir do rRNA
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosômico
SDS	detergente- sulfato de dodecil sódico
SSC	tampão de cloreto e citrato de sódio
SSV	sólidos suspensos voláteis
TCP	triclorofenol
Td	Temperatura de dissociação
TE	tampão-tris-EDTA
TEC	tampão-tris-EDTA-cálcio
TeCP	tetraclorofenol
TM	Temperatura de *melting*
UASB	*Upflow anaerobic sludge blanket*
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra-violeta
WHO	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	porosidade do leito
°C	graus Celsius
μg	microgramas
ΔG^o	variação de energia livre de Gibbs
μL	microlitro
μM	micromol
μm	micrometro
Co	cobalto
g	grama
h	hora
kb	kilobase
kg	quilograma
kgf	quilogramaforça
kJ	quilojoule
M	molaridade
mg/L	miligrama por litro
min	minuto
mL	mililitro
mm	milimetro
mM	milimolar
mV	milivolt
ng	nanograma
Ni	níquel
OD	oxigênio dissolvido
pH	potencial hidrogenionico
psi	unidade de pressão
rpm	rotações por minuto
T	temperatura
V	volt
Ves	volume de escoamento
Vu	volume útil

RESUMO

BARALDI, E.A. **Avaliação da comunidade e da atividade microbiana em reator anaeróbio de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP), através de métodos cromatográficos, exames microscópicos e técnicas moleculares de *PCR, ARDRA* e *slot-blot*.** São Carlos, 2001. 153p. Tese-Doutorado - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Foi estudada a degradação do pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) de volume de 2000mL. O reator foi inoculado com microrganismos oriundos de reatores anaeróbios não previamente adaptados a PCP. A atividade microbiana foi monitorada através de técnicas clásssicas na presença do organoclorado na faixa de 2,0 a 13 mg/L de PCP. O reator apresentou eficiência de 97% na remoção de DQO e completo desaparecimento do composto PCP em todas as concentrações testadas. A fração orgânica foi consumida totalmente na primeira terça parte do reator de acordo com os valores determinados de ácidos voláteis, DQO e PCP. Não foi verificada inibição da atividade das culturas microbianas. Os exames microscópicos, fluorescência e varredura, permitiram verificar o predomínio de microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea*. As técnicas moleculares PCR, ARDRA e hibridação *slot-blot* confirmaram o predomínio do Domínio *Archaea* e possibilitaram a verificação de alterações na diversidade das populações após a adição de 2mgPCP/L. Concluiu-se que o reator sem prévia adaptaçãodo inóculo foi eficiente para o tratamento do PCP, e os microrganismos relacionados às *Archaea* metanogênicas acetocláticas podem estar envolvidas na degradação deste composto.

Palavras-chave: Pentaclorofenol; Desalogenação redutiva; Degradação anaeróbia; Domínio *Archaea*, PCR; ARDRA; Hibridação *slot-blot*.

ABSTRACT

BARALDI, E.A. **Evaluation of microbial communities and their activities in a Horizontal Anaerobic Immobilized System** (HAIS) **fed with pentachlorophenol (PCP) by using chromatography, microscopy and molecular techniques of the PCR, ARDRA and SLOT-BLOT**.

São Carlos, 2001. 153p. Tese de Doutorado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The degradation of pentachlorophenol (PCP) was studied in a 2000mL Horizontal Anaerobic Immobilized System (HAIS). The reactor was inoculated with microorganisms obtained from an anaerobic reactor without previous adaptation to the PCP. The microbial activity was evaluated by using classic techniques in order to monitor its behavior during the HAIS fed with a range of PCP between 2.0 to 13 mg/L. The reactor presented 97% of efficiency in the removal of COD and complete decrease of PCP in all concentrations tested. The total consumption of organic fraction took place mainly in the first third part of the reactor according the values of volatile fatty acids, COD and PCP obtained. Microbial inhibition was not verified in during HAIS operation. Microscopic examinations allowed certifying the *Archaea* Domain predominance according the morphologies observed. The molecular techniques polimerase chain reaction (PCR), ARDRA and *slot-blot* hibridation confirmed the predominance of *Archaea* Domain and allowed verifying some changes in the population's diversity under additions of 2mg PCP/L. The efficiency of PCP decreased in the anaerobic reactor was related to the presence of *Archaea* Domain, especially the acetoclastic methanogens, whose where probably involved with the organochlorine compound degradation.

Key-words: Pentachlorophenol; Reductive Dehalogenation, Anaerobic Degradation; *Archaea* Domain, PCR; ARDRA; Slot-Blot Hibridation.

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho aborda o tema tratamento anaeróbio de resíduos com características tóxicas e persistentes no ambiente. O composto xenobiótico estudado foi o pentaclorofenol (PCP), considerado tóxico e potencialmente carcinogênico. Mais especificamente, a pesquisa enfocou o desempenho de um reator horizontal de leito fixo na degradação anaeróbia de PCP, sem adaptação prévia dos microrganismos utilizados como inóculo ao clorofenol. Os microrganismos capazes de degradar clorofenóis são de grande interesse para a tecnologia ambiental e, portanto, pesquisas sobre suas características morfo-fisiológicas, bem como de identificação de espécies a que pertencem são fundamentais.

O PCP é uma molécula constituída de um anel aromático (fenol) ligada a cinco átomos de cloro. Consiste em pó branco levemente amarelado, com odor característico. Sua pressão de vapor sugere que ela seja relativamente volátil em temperatura ambiente constante, é praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos. Segundo o INDEX MERCK (1976), a fórmula molecular é C_6HCl_5O, e seu peso molecular é de 266,4g. O PCP e seus derivados foram bastante utilizados como biocidas por mostrar uma efetividade que é pouco atingida por outros pesticidas, apresentando eficiência de largo espectro[1] com baixo custo. De acordo com BRYANT *et al.* (1991); WU *et al.* (1993) e MCALLISTER *et al.* (1996), o PCP foi largamente usado em vários países, principalmente para a preservação de madeira. Foi considerado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) e pela Comunidade Européia, como poluente prioritário no

[1] Atividade letal sobre muitas espécies de microrganismos (PELCZAR *et al*, 1980)

desenvolvimento de técnicas de degradação, devido ao seu potencial carcinogênico e tóxico para os seres vivos quando lançados no meio ambiente.

LARRIZZATI (1998), em sua revisão, mostrou que no Brasil a utilização de compostos orgânicos clorados constituiu fonte de contaminação ambiental relevante. De acordo com OLIVEIRA (1998) apesar da Resolução número 5 do CONAMA, de 20/11/1985 proibir o uso de organoclorados como o PCP, soluções para as inúmeras áreas contaminadas ainda são incipientes. RADEHAUS & SCHMIDT (1992) afirmaram que a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) considera a concentração de 1 mg/L de PCP arriscada para a disposição em solo e, no entanto, citam áreas com pontos de poluição contendo PCP em concentrações tão elevadas quanto 9.000 mg de PCP/kg de solo. A USEPA afirmou sobre a necessidade do desenvolvimento de novas e seguras tecnologias que recuperem tais locais, antes de ocasionarem danos maiores e irreversíveis.

O mecanismo mais importante envolvido na transformação destes poluentes é a desalogenação redutiva em ambientes anaeróbios por consócios microbianos. Apenas como um exemplo, KENNES *et al.* (1996) demonstraram a desalogenação e mineralização do PCP por grânulos metanogênicos. Além disso, vale ressaltar, que pesquisadores da área não têm observado aspectos recalcitrantes destes compostos em ambientes anaeróbios controlados. SPEECE (1996) observou que compostos clorados considerados recalcitrantes sob condições aeróbias, foram transformados biologicamente sob condições anaeróbias. Nos últimos anos, trabalhos de DOONG & WU (1995), TOWNSEND & SUFLITA (1996), van EEKERT *et al.* (1998), evidenciaram a importância da biotransformação anaeróbia na remediação biológica *in situ* de águas subterrâneas e locais como interior de solos, sedimentos de lagos, rios, mares, pântanos e biorreatores.

Processos biotecnológicos anaeróbios, que incluem a biorremediação aplicada à degradação de compostos artificialmente sintetizados, especialmente os organoclorados, apresentam como um dos princípios fundamentais a ocorrência de reações de óxido-redução, como a desalogenação redutiva. A desalogenação redutiva ocorre, preferencialmente, em ambientes anaeróbios, como os biorreatores inoculados com microrganismos anaeróbios (DAMIANOVIC, 1997).

Neste sentido, pesquisas realizadas no Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (BOLAÑOS, 1996; LARIZZATTI, 1997; DAMIANOVIC, 1997) revelaram a eficiência da ação de microrganismos anaeróbios na estabilização do PCP, sob condições metanogênicas.

Particularmente, o trabalho desenvolvido por DAMIANOVIC (1997) mostrou resultados com um reator de leito fixo (RAHLF), apresentando vantagens sobre os outros biorreatores anaeróbios de tratamento de resíduos tóxicos. A degradação de 0,2 a 8,0 mg/L de PCP adicionado a um lodo previamente adaptado em reatores de mistura completa (BOLAÑOS, 1996).

Entretanto, nenhum microrganismo responsável pela degradação do PCP nos trabalhos citados foi caracterizado. A importância da identificação de culturas ou consórcios de culturas microbianas reside na necessidade da compreensão sobre o metabolismo celular envolvido na degradação anaeróbia do PCP. Alguns tipos de microrganismos anaeróbios foram descritos nos últimos anos como degradadores de orgânicos clorados. FATHEPURE & BOYD (1988) relataram a presença de sarcinas metanogênicas degradadoras de PCE (percloroetileno), no caso pertencentes ao gênero *Methanosarcina*. Outros organismos, redutores de sulfato a *Desulfomonile tiedjei* foram identificados em sistemas com ocorrência de degradação de compostos organoclorados (DEWEERD *et al.*, 1990). Outro grupo que se destaca é o gênero *Desulfitobacterium* sp (UTKIN *et al.*, 1994).

Apesar dos sucessos na identificação de algumas culturas microbianas degradadoras, a dificuldade no isolamento, caracterização e classificação de culturas anaeróbias é histórica, pois as técnicas tradicionais de cultivo e seleção em meios de cultura de populações anaeróbias apesar de eficientes, são trabalhosas, acrescendo-se a isso, o crescimento lento dos anaeróbios. Recentemente, o desenvolvimento das técnicas moleculares que assistem a identificação de microrganismos tem facilitado o reconhecimento de espécies, notadamente aquelas mais exigentes no cultivo em laboratório (ROSADO *et al.*, 1997).

Autores como RASKIN *et al.* (1994) e FANTROUSSI *et al.* (1997), usando as técnicas moleculares (hibridração em membrana e *in situ* combinadas, técnica PCR para amplificação da região do DNA que codifica o gene 16S do rRNA)

verificaram tipos metanogênicos relevantes na estrutura da comunidade microbiana anaeróbia tanto no tratamento de resíduos sólidos e esgoto sanitários, como em locais contaminados com organoclorados, para fins de biorremediação.

A presente pesquisa refere-se ao estudo da degradação do PCP em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), inoculado com microrganismos oriundos de reatores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB) operados com esgoto sanitários, sem prévia adaptação destes ao PCP, buscando conhecer o metabolismo microbiano e a caracterização dos tipos de bactérias e arqueas através das técnicas que reúnem as clássicas aplicadas à compreensão do metabolismo celular anaeróbio (VAZOLLER, 1995) e moleculares como reação em PCR, hibridação *slot-blot*, e ARDRA (RASKIN *et al.*, 1994; FANTROUSSI *et al.*,1997).

2. OBJETIVOS

O trabalho de pesquisa apresentou os seguintes objetivos:

- Avaliar o desempenho de um reator do tipo RAHLF (reator anaeróbio horizontal de leito fixo) , preenchido com espuma de poliuretano, na degradação do PCP (pentaclorofenol) adicionando na faixa de concentração de 2 a 13 mg/L de PCP, sem prévia adaptação do inóculo;
- Caracterizar as culturas microbianas anaeróbias e avaliar o metabolismo microbiano no reator, sob presença e ausência de PCP, utilizando técnicas moleculares – PCR, ARDRA e hibridação *slot-blot*, e clássicas- microscopias, cromatografia (PCP, metano e ácidos voláteis), determinação de Demanda Química de Oxigênio e pH.

3. REVISÃO DE LITERATURA

De modo geral, os microrganismos anaeróbios apresentam vasta capacidade bioquímica, isto é, produzem enzimas e mecanismos necessários para diferentes rotas metabólicas, as quais, juntamente com outros fatores, são responsáveis pelas biotransformações de compostos causadores de poluição.

Entre estes compostos, estão os organoclorados, que, em geral, são moléculas de origem orgânica, muitas delas derivadas de petróleo. Na manufatura de determinados produtos pelas indústrias petroquímicas, átomos de cloro podem ser adicionados a moléculas, tornando-as mais estáveis e aumentando, assim, o grau de dificuldade para suas degradações. Tais moléculas apresentam caraterísticas tóxicas e recalcitrantes quando expostas no meio ambiente.

Em ambientes anaeróbios, nos quais os potenciais de oxi-redução são da ordem de –300 mV, os compostos organoclorados podem ser degradados, com muito sucesso, por microrganismos anaeróbios, através de reação denominada desalogenação redutiva. Nessa reação, átomos de halogênios são removidos ao mesmo tempo que a molécula desalogenada ganha elétrons. Sob condições anaeróbias, pode ocorrer a mineralização total do composto orgânico halogenado com produção de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2).

3a - Reação de desalogenação redutiva

De acordo com MOHN & TIEDJE (1992), a desalogenação redutiva é um importante processo de biodegradação de numerosos compostos, incluindo os pesticidas organoclorados, solventes alquila e outros poluentes ambientais mais

tóxicos e persistentes. Essa reação é um dos poucos mecanismos, conhecidos até o momento, para explicar a biodegradação de poluentes relevantes como bifenilas policlorados (PCBs), hexaclorobenzeno (HCB), tetracloroeteno (PCE) e pentaclorofenol (PCP).

NICHOLSON *et al.* (1992) destacaram que a grande importância ambiental da desalogenação redutiva anaeróbia é a capacidade de gerar metabólitos menos clorados, portanto, menos tóxicos e mais fáceis de serem degradados. MOHN & TIEDJE (1992) e MOHN & KENNEDY (1992) esclareceram que a desalogenação redutiva ocorre, preferencialmente, sob condições anaeróbias, e parece ser o passo inicial para a degradação de todos os clorofenóis.

Apesar da desalogenação redutiva ocorrer sob condições aeróbias, FIELD *et al.* (1995) observaram que poluentes aromáticos eletrofílicos, altamente clorados apresentam um caráter persistente à biodegradação aeróbia, sendo mais facilmente reduzidos por consórcios microbianos anaeróbios. O resultado dessa ação pode ser a formação de aromáticos menos clorados, que por sua vez, também podem ser de difícil mineralizações.

Em uma revisão da literatura, MOHN & TIEDJE (1992) explicaram que a desalogenação redutiva consiste na remoção de halogênio da molécula (ao grupo dos halogênios pertencem os elementos flúor, cloro, bromo, iodo e astato), com simultânea adição de elétrons, sendo, para tanto, necessária a presença de um doador de elétrons (agente de redução ou redutor), que pode ser um produto da própria atividade biológica, transportadores de elétrons (geralmente, cofatores enzimáticos) e aceptores de elétrons (o agente de oxidação ou oxidante), neste caso, o próprio organoclorado. Essencialmente, dois tipos de reação foram identificadas: a primeira, hidrogenólise, responsável pela substituição de um halogênio por um átomo de hidrogênio; e a segunda, redução vicinal (dihaloeliminação), quando são removidos dois halogênios de átomos de carbono da molécula adjacente, com formação de uma ligação adicional entre eles. Os átomos de halogênio, nesse caso, são liberados como ânions. A Figura 3a1 ilustra os dois tipos de reação de desalogenação redutiva: hidrogenólises de compostos de arila e alquila, e redução vicinal de uma alquila.

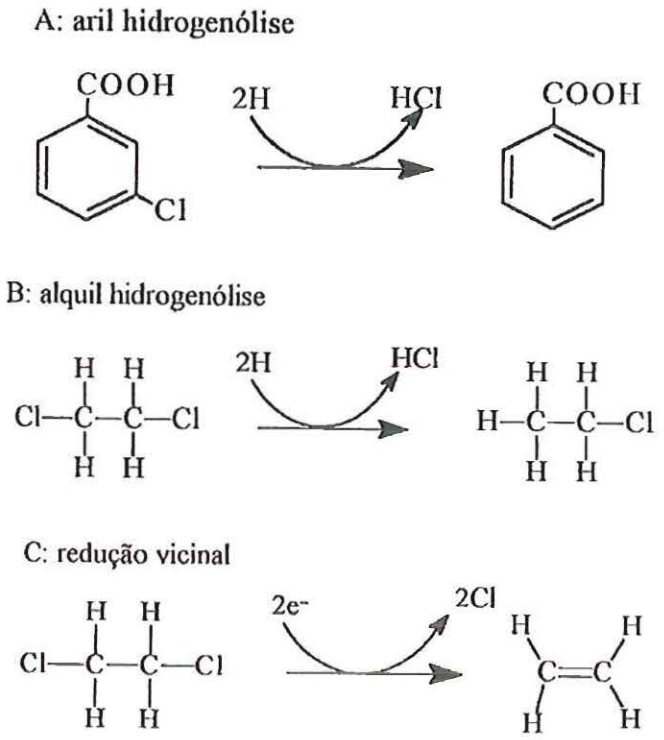


FIGURA 3a1 - Exemplos de desalogenação redutiva
Fonte : MOHN & TIEDJE, 1992.

Os autores *(opt.cit.)* comentaram que a desalogenação redutiva, como outros processos anaeróbios, é normalmente realizada em comunidades mutualísticas complexas, sendo mediada biologicamente, e que o estudo da atividade enzimática de desalogenação redutiva sugere que as enzimas responsáveis pela reação podem ser específicas e não-específicas. De acordo com HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), os microrganismos anaeróbios podem transformar diretamente os poluentes orgânicos através de reduções enzimáticas ou, indiretamente, através de produção de grande quantidade de compostos reduzidos de ferro e de enxofre. Neste caso, a reação pode ser acelerada pela ação de transportadores de elétrons, tais como, quinonas e porfirinas, complexos coordenados por metais, como exemplo, o grupo heme.

3a1 - Desalogenação redutiva com enzimas específicas

Segundo HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), as longas fases de adaptação que alguns microrganismos exigem antes de iniciar a desalogenação redutiva de compostos halogenados indicam a necessidade de enzimas específicas para catalisar essas reações. Estas enzimas, provavelmente, começam a ser produzidas após o período de adaptação dos microrganismos, nos quais ocorre apenas crescimento celular, não se observando a ocorrência de reações de desalogenação. YOUNG & CERNIGLIA (1995) consideram que os períodos de adaptação são atribuídos ao tempo necessário para que o pequeno número inicial, dentro da biomassa total, de microrganismos detentores da capacidade de degradação desses substratos, possa aumentar o suficiente para tornar quantificáveis os produtos da degradação.

MOHN & TIEDJE (1992) esclareceram que comunidades mistas provocam com maior freqüência, a desalogenação redutiva de arilas em relação a alquilas. No entanto, a desalogenação redutiva de arilas parece ser mais dependente de períodos de adaptação do que as de alquilas, sugerindo que as populações responsáveis pela desalogenação redutiva de arilas são mais raras na natureza, o que pode justificar a grande dificuldade em isolar culturas puras com capacidade para a desalogenação redutiva desses compostos.

O isolamento da espécie anaeróbia *Desulfomonile tiedjei* ofereceu a oportunidade de se estudar a desalogenação de compostos aromáticos. Neste caso, observou-se que a desalogenação redutiva exibiu especificidade de substrato e o organismo desalogenou a molécula, preferencialmente, na posição *meta*. Porém, o entendimento dessa reação depende também da complexidade dos sistemas nos quais elas ocorrem. Muitos aspectos verificados em cultura pura são semelhantes aos que ocorrem em populações mistas, as quais catalisam a desalogenação redutiva de arilas. Assim, a desalogenação de arila é provavelmente catalisada por enzimas induzidas, apresentando diferente especificidade ao substrato, e os microrganismos com tal atividade são adaptados para viver em comunidades sintróficas, portanto, dificultando o isolamento de culturas puras. A desalogenação redutiva de radicais

arila pôde ser constatada através do enriquecimento de consórcios microbianos e está relacionada à obtenção de energia pelos microrganismos (MOHN& TIEDJE,1992).

3a2 - Desalogenação redutiva por enzimas não-específicas

Normalmente, microrganismos que apresentam atividade de desalogenação redutiva de alquilas utilizam uma grande variedade de substratos, sugerindo que esta atividade possa ser muito difundida. Como não são necessários longos períodos de adaptação, a desalogenação redutiva de alquilas parece ser enzimaticamente não-específica.

Segundo MOHN & TIEDJE (1992), os microrganismos capazes da desalogenação redutiva de alquilas são numerosos e filogeneticamente diferentes, englobando ambas as organizações celulares, eucariótica e procariótica. A dificuldade de isolamento desses microrganismos parece estar relacionada às suas características bioquímicas. A desalogenação redutiva foi somente verificada após testes específicos sobre essa capacidade metabólica.

3a3 - Desalogenação redutiva por sistemas enzimáticos

MOHN & TIEDJE (1992) explicaram os sistemas enzimáticos e sua importância no entendimento das reações de desalogenação redutiva. O estudo isolado de tais reações enzimáticas foi realizado por testes efetuados com o material obtido por lise celular. Esses estudos são importantes no sentido de revelar aspectos ou passos geralmente ocultos, quando considerados os sistemas celulares íntegros.

Para os autores, a desalogenação redutiva, avaliada através de atividade enzimática isolada, sugeriu que essa reação ocorre através de sistemas enzimáticos adaptados ou não, ou seja, enzimas específicas ou não. A atividade enzimática isolada foi avaliada em diferentes meios: extrato celular, enzimas purificadas, e complexos contendo metais de transição. Em extrato celular de microrganismos, foi verificada a reação de desalogenação redutiva de várias moléculas de organoclorados. No entanto, muitos processos envolvidos não foram caraterizados. Em geral, a atividade encontrada pareceu ser sensível ao calor, sugerindo a possibilidade do envolvimento de uma estrutura protéica intacta.

No caso de extratos celulares da espécie *D. tiedjei*, foi verificada a atividade de desalogenação redutiva de radicais arila, com remoção de cloro da posição *meta* de 3Cloro-benzoato, evidenciando a mesma regioespecificidade que em células íntegras de cultura pura. A atividade foi dependente de transportador de elétrons artificial, viologeno de metila (*metil viologen*). Testes com os transportadores biológicos: NAD (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo), NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato), FAD (flavina-adenina-dinucleotídeo), FMN (flavina-mononucleotídeo), *desulfoviridin* e o citocromo-c_3, não produziram desalogenação. Supõe-se que, uma vez que o viologeno de metila apresenta um potencial de oxi-redução mais baixo que todos os cofatores testados, existe um cofator "*in vivo*" com similaridade funcional a ele.

De acordo com STUART *et al.* (1998), mudanças do potencial de oxi-redução podem provocar efeitos na reação de desalogenação redutiva. Os autores *(opt.cit.)* verificaram que a elevação do potencial de oxi-redução, de –0,26V para –0,10V provocou a inibição da metanogênese, e as transformações de PCP e de TeCP continuaram em velocidades progressivamente menores. Porém, quando o potencial oxi-redução foi mantido em – 0,10V e um pequeno volume de hidrogênio puro foi adicionado na atmosfera do reator, a velocidade da desalogenação redutiva aumentou drasticamente. O fato sugeriu que a disponibilidade de hidrogênio foi o ponto crítico para a ocorrência da desalogenação redutiva. Sugeriu-se que a presença de extrato de levedura e a metanogênese acetoclástica contribuíram expressivamente com a disponibilidade de hidrogênio para as culturas desalogenantes.

MOHN & TIEDJE (1992) comentaram que enzimas purificadas como a P-450cam, que contêm ferro-porfirina, catalisaram a desalogenação redutiva de halometanos, da mesma forma que o citocromo P-450. Essas enzimas podem ser responsáveis pela atividade "*in vivo*" . Segundo os autores, esse sistema enzimático parece representar claramente um exemplo de desalogenação redutiva gratuita. Estruturas formadas por complexos contendo metais de transição são comuns para muitas enzimas que catalisam a desalogenação de radicais alquilas e arilas, podendo ser também relacionados à desalogenação redutiva "*in vivo*".

A capacidade do cofator enzimático, ferroheme (Fe(II)-porfirina) para a desalogenação redutiva de alquilas foi demostrada em 1964 por CASTRO[1] *apud* MOHN & TIEDJE (1992), e a freqüência de enzimas, contendo o grupo heme, em microrganismos condiz com o grande número de comunidades mistas e culturas puras que possuem a capacidade de desalogenação redutiva. Além das porfirinas, os corrinóides contendo Co e enzimas como o Fator-430 contendo Ni também mostraram tal atividade. Um aspecto interessante é que os corrinóides são largamente distribuídos nos microrganismos, e que aqueles encontrados na vitamina B_{12} e no Fator-430, enzimas envolvidas na desalogenação redutiva, parecem estar presentes preponderantemente nas metanogênicas.

Nesse sentido, GANTZER & WACCKETT et al. *apud*[2] MOHN & TIEDJE (1992) mostraram que a vitamina B_{12} catalisou a desalogenação de PCP, constatando que tais corrinóides podem desalogenar halogênios em arilas. SMITH & WOODS (1994) também estudaram a reação de desalogenação redutiva de PCP, usando a vitamina B_{12} reduzida por citrato de titanium (III). Duas caraterísticas importantes foram analisadas na reação de desalogenação de monoclorofenol: a primeira, que a regioespecificidade de tal reação foi bastante semelhante a de consórcios microbianos adaptados, que preferencialmente desalogenam clorofenóis na posição *meta*; e a segunda, e talvez a mais importante para o ambiente, é que a reação de desalogenação não ocorreu com facilidade. Nesse caso, os autores verificaram que a vitamina B_{12} apresentou atividade de desalogenação apenas quando estava completamente reduzida. A vitamina B_{12} apresenta três estados de oxidação Vit B_{12a} (CoIII- mais oxidado), Vit B_{12r} (CoII) e Vit B_{12s} (CoI- mais reduzido). Em iguais condições, a desalogenação redutiva de PCP não ocorreu quando Vit B_{12r} substituiu a Vit B_{12s}.

Como exemplo, van EEKERT *et al.* (1998) mostraram que a desalogenação redutiva do tetracloreto de carbono pôde ocorrer em lodo granulado esterelizado, dando suporte a hipótese de que a vitamina B_{12}, corrinóides e cofatores como F_{430}

---

[1] CASTRO, C. E. 1964. The rapid oxidation of iron (II) porphyrins by alkylhalides. A possible mode of intoxication of organisms by alkylhalides. *J. Am. Chem. Soc.* 86:2310-2311.

[2] GANTZER, C.J.;WACCKETT 1991 Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition-metal coenzymes *Environ. Sci. Technol.* 25 ; 715-722.

podem ter um importante papel nesse processo. Os autores (*op. cit.*) afirmaram que a desalogenação redutiva por material biológico esterelizado, isto é, não vivo, foi dependente das enzimas liberadas no meio pelas células antes ou durante a esterilização. Essas enzimas estão envolvidas nas reações e não apresentam especificidade ao substrato, caraterizando assim a desalogenação redutiva não-específica, que normalmente ocorre sem a necessidade existência de fase de adaptação do microrganismos ao substrato.

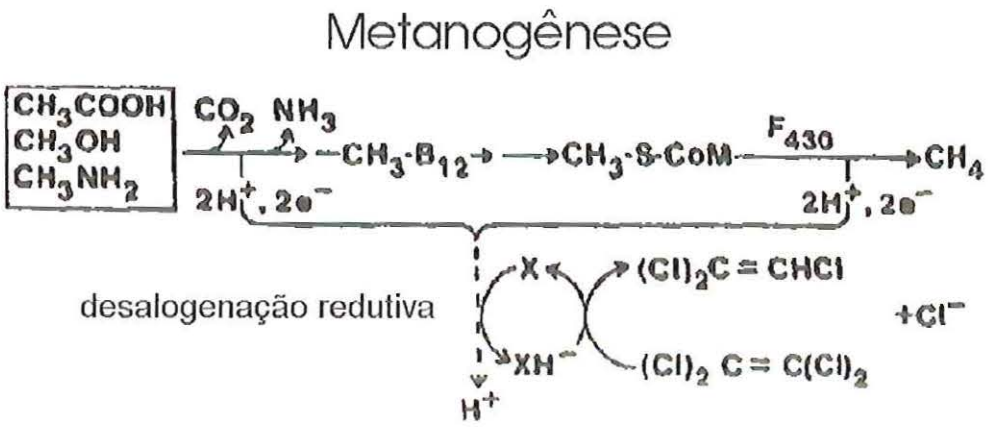
3a4 - Bioquímica da desalogenação redutiva

As vantagens que a desalogenação redutiva fornece ao microrganismo ou a populações microbianas ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que essa reação, para alguns microrganismos, está acoplada à obtenção de energia e, possivelmente, pode também proporcionar a fixação de carbono.

FARTHEPURE & BOYD (1988) estudaram a desalogenação redutiva de tetracloroetileno (PCE) por culturas puras do gênero *Methanosarcina* linhagem DCM, que desalogenam PCE a tricloroetileno (TCE). Observaram que não houve desalogenação redutiva quando cessou a produção de CH_4. Tal fato deixou evidente o acoplamento entre a produção do gás e a desalogenação do PCE, e segundo os autores, os elétrons gerados durante a biossíntese de metano podem ter sido desviados para a desalogenação redutiva de PCE. Foi idealizada, uma hipótese simplificada desse mecanismo, como mostra a Figura 3a2.

DEWEERD *et al.* (1990), que estudaram a remoção de halogênios pela *Desulfomonile tiedjei*, constataram que a desalogenação redutiva representou um novo tipo de respiração anaeróbia, acoplando a essa reação, a obtenção e conservação de energia para o crescimento celular.

Dessa forma, MOHN & TIEDJE (1992) baseados em DOLFING & TIEDJE (1986) ressaltaram a dificuldade em isolar um microrganismo com a capacidade de desalogenar redutivamente. O ponto crítico do isolamento seria a otimização do meio de crescimento. Em meio ambiente natural, a existência de relações sintróficas microbianas, talvez seja essencial para que o processo de desalogenação redutiva ocorra. Para ilustrar tal fato, um esquema hipotético de fluxo de nutrientes entre três microrganismos está apresentado na Figura 3a3.



Fonte: FARTHEPURE & BOYD, 1988.

FIGURA 3a2 – Hipótese esquematizada da transferência de elétrons para o PCE durante a metanogênese, resultando na formação de TCE. E os elétrons (X) envolvidos na biossíntese do metano.
Fonte: FARTHEPURE & BOYD, 1988.

MOHN & TIEDJE (1992) estudaram a hipótese do mecanismo quimiosmótico acoplar a desalogenação redutiva à síntese de ATP, por uma cultura pura de *D. tiedjei*. Eles usaram formiato e hidrogênio como doadores de elétrons e verificaram que a desalogenação redutiva foi acoplada à oxidação dessas substâncias, mas, formiato e hidrogênio não são conhecidos por suportarem a fosforilação em nível de substrato, isto é, formação de ATP. A energia (ATP) obtida no metabolismo do formiato, hidrogênio e 3-clorobenzoato, presumidamente, deve ser gerada a partir de um processo de respiração. Os mesmos autores esclareceram também que a

desalogenação redutiva suporta a translocação de prótons pela célula e, assim, pode ocorrer a formação de uma força próton-motora.

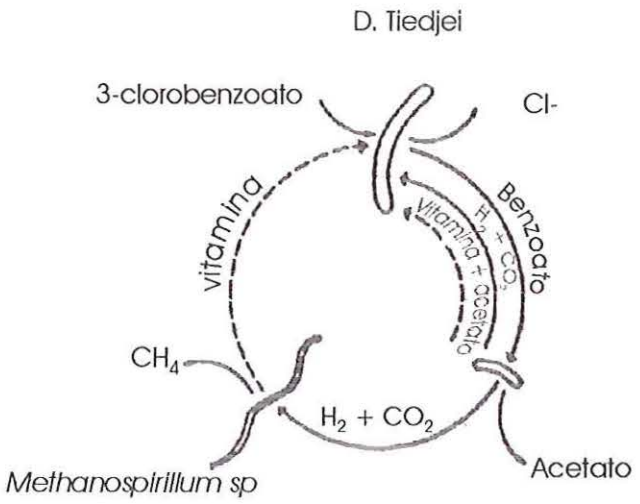


FIGURA 3a3- Relação sintrófica em um consórcio definido de microrganismos que crescem com 3-Clorobenzoato, mostrando a hipótese do fluxo de nutrientes entre eles.
Fonte: MOHN & TIEDJE (1992)

MOHN & TIEDJE (1992) explicaram que inibidores respiratórios provocaram efeitos negativos na eficiência da desalogenação dependente da síntese de ATP, fortalecendo ainda mais a hipótese da respiração de um composto halogenado, via a enzima ATPase (adenosina-trifosfatase) próton – direcionada. O modelo foi proposto como apresentado na FIGURA 3a4. Nesse modelo, os arranjos da formiato dehidrogenase e da enzima desalogenante resultam na expulsão dos prótons da célula. Segundo os autores, o arranjo das enzimas é puramente especulativo. É interessante observar que, nesse caso, o organoclorado (3-clorobenzoato) já se encontrava dentro da célula e o doador de elétrons era ácido fórmico.

Segundo HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), alguns microrganismos anaeróbios catalisam reações de desalogenação redutiva em processos de co-metabolismo, enquanto outros desalogenam em processos respiratórios. Em processos de co-metabolismo, as desalogenações não estão acopladas à produção de ATP, ocorrendo de forma não-específica, por reações alternativas de certos sistemas enzimáticos.

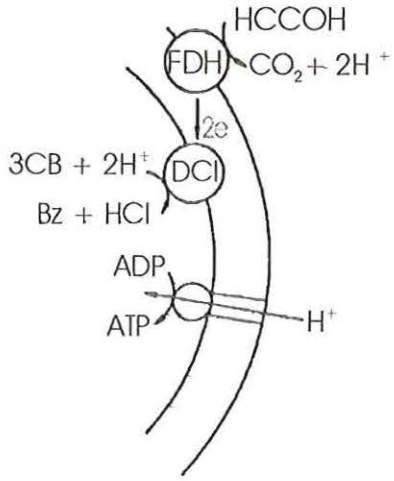


FIGURA 3a4 – Ilustração do modelo respiratório, no qual, uma força próton-motiva pode acoplar a desalogenação redutiva e síntese de ATP via uma ATPase próton-dirigida. BZ-benzoato, DCl – enzima desalogenadora, FDH dehidrogenase formiato
Fonte: MOHN & TIEDJE, 1992

Recentemente, segundo HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), duas linhagens de microrganismos que utilizam PCE (tetracloroetileno) como aceptor final de elétrons foram isoladas: *Dehalobacter restrictus* e a *Dehalospirillum multivorans*, as quais desalogenam PCE para cis-1,2 dicloroetileno e acoplam essa reação ao seus crescimentos. Dessa forma, os autores propuseram um modelo de sistema respiratório (Figura 3a5) para *Dehalobacter restrictus* , no qual duas enzimas estão envolvidas, a hidrogenase e a PCE-redutase (PCER), catalisando a reação: PCE + $2H_2 \rightarrow$ cis-1,2 DCE + $2H^+ + 2Cl^-$ ($\Delta G^o = -377,5$ KJ/mol PCE).

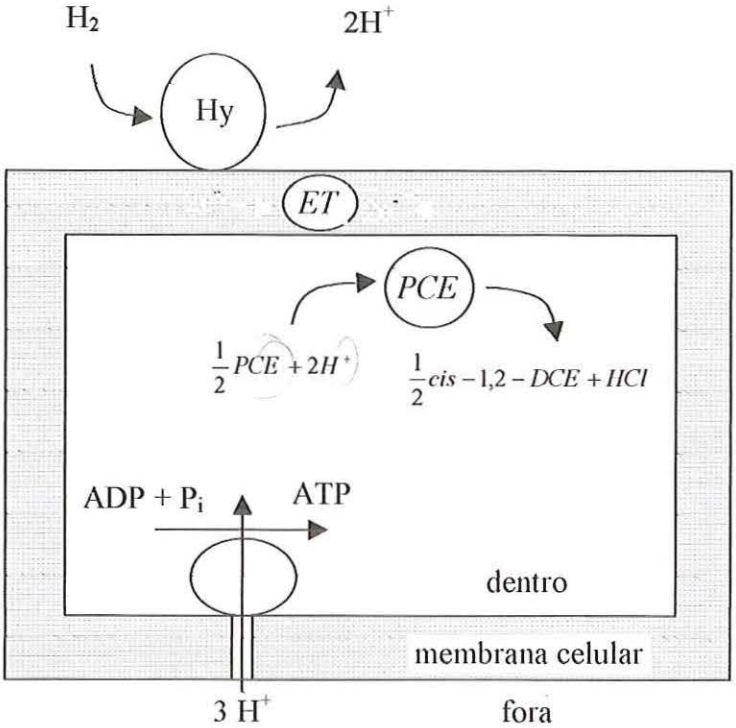


FIGURA 3a5 – Modelo de sistema respiratório da *Dehalobacter restrictus* , Hy = hidrogenase, ETS = sistema de transferência de elétrons, PCER = redutase tetracloroetileno, PCE = tetracloroetileno, cis-1,2 DCE = cis-1,2 dicloroetileno
Fonte: HOLLIGER & SCHUMACHER, 1994

Supondo como possíveis os dois modelos descritos anteriormente, o respiratório de MOHN & TIEDJE (1992) e o de HOLLIGER & SCHUMACHER (1994) o processo pelo qual o poluente, no caso organoclorado, burlou a seletividade da membrana celular, ainda precisa ser explicado.

3a5 - Biodisponibilidade dos organoclorados

De acordo com FIELD *et al.* (1995), o acúmulo de poluentes aromáticos no ambiente indica que esses compostos podem ser resistentes ao ataque biológico. Vários fatores são responsáveis pelas caraterísticas recalcitrantes de determinados compostos, entre eles, a biodisponibilidade do composto, limitações intrínsecas dos microrganismos degradadores e condições ambientais, as quais, muitas vezes, facilitam a ligação irreversível de poluentes aromáticos à matéria orgânica. A maioria dos poluentes aromáticos, como hidrocarbonetos policlorados e policíclicos

é altamente apolar, tendo baixa solubilidade na água e alta tendência de absorção pela matéria orgânica do solo ou do sedimento. Dessa forma, acredita-se que o passo limitante da biodegradação dos compostos em questão é devido a suas baixas solubilidades em água (FIELD *et al.*, 1995).

BARKOVSKII & ADRIAENS (1996) alertaram que a bioconcentração de compostos como PCDDs (dibenzo-para-dioxinas) em tecidos vegetais e animais tem sido bastante relatada nos últimos anos. Pelo fato de serem apolares, sua deposição em tecidos gordurosos é bastante comum. Nesse sentido, DULFER & GOVERS (1995) demonstraram a alta afinidade de membranas lipídicas por xenobióticos hidrofóbicos como PCBs, e concluíram que a composição molecular da membrana celular dos microrganismos pode ser determinante no processo de retirada dos xenobióticos do meio, pelas células.

MOHN & TIEDJE (1992) relataram que a atividade desalogenante de extratos também pareceu estar associada às membranas. Assim, essa localização seria bastante significativa para o sistema respiratório, aparentemente envolvido na desalogenação ligada à síntese de ATP, pois o sistema respiratório das células procarióticas está localizado nas membranas celulares.

TOWNSEND & SULFITA (1996) estudaram a desalogenação de tetracloroetileno por extratos de células de *Desulfomonile tiedjei* e sua relação com a desalogenação de clorobenzoato. Nesse estudo, para identificar os reagentes nos extratos celulares, os autores partiram de extratos de uma cultura de *D. tiedjei e* utilizaram uma técnica de solubilização das proteínas estruturais das membranas, atribuindo a atividade desalogenante da *D. tiedjei* a essas proteínas.

BROCK *et. al.* (1994), descreveu as membranas citoplasmáticas formadas, geralmente, por fosfoslipídeos bipolares que contêm um ácido graxo, altamente hidrofóbico, e uma molécula de glicerol relativamente hidrofílica. O mesmo autor *(opt.cit.)* relatou também que as membranas de *Archaeas* possuem uma estrutura química única: diferentes de *Bacterias* e de *Eucarya*, possuem lipídios com ligações éter. Vários tipos de membranas foram descritos, mas, de forma geral apresentam transportadores de elétrons como citocromos e ATPases ligadas a membranas, que representam parte da maquinária respiratória.

Para HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), que propuseram um modelo de sistema de respiração para a *Dehalobacter restrictus* (Figura 3a3), duas enzimas são essenciais, a Hy-hidrogenase e a PCER-redutase tetracloroetileno. Nesse modelo, a hidrogenase localiza-se externamente da membrana celular e a PCER, internamente. Os autores justificaram que esse arranjo foi evidenciado por resultados experimentais descritos por JONES & GARLAND (1977)[1] *apud* HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), de valores idênticos de atividades da hidrogenase em células intactas e lesadas, ao contrário da atividade da PCER, que tornou-se seis vezes maior após tratamento que possibilitou a lise das células. Essa diferença de acessibilidade da enzima ao transportador de elétrons indicou que a localização da hidrogenase é externa à membrana celular e a PCER, interna, uma vez que o transportador de elétrons (viologeno de metila) estudado foi impermeável à membrana.

MAGNUSON *et al.* (1998) discutem o recente interesse dos pesquisadores em isolar as enzimas responsáveis pela desalogenação redutiva de compostos clorados. NEUMAN *et al.* (1995 e 1996)[2] *apud* MAGNUSON *et al.* (1998) isolaram três enzimas, a partir de uma cultura pura de *Dehaloespirillum multivorans*, que desalogena PCE: uma citoplasmática, e as demais associadas à membrana. MAGNUSON *et al.* (1998) descreveram que, a partir de uma cultura da espécie *Dehalococcoides ethenogenes* 195, duas novas dehalogenases redutivas foram identificadas e denominadas como: TCE-RDASE (tetracloroetileno redutase), responsáveis pela redução de etenos clorados, exceto PCE, e PCE-RDASE, que reduz PCE para TCE, ambas apresentando estruturas de anéis corrinóides.

Ainda com objetivo de identificar qual a localização celular da ocorrência da desalogenação redutiva, WOLFAARDT *et al.* (1995) estudaram o potencial de bioacumulação do herbicida "diclofop" em polímeros extracelulares (EPS) de biofilmes microbianos, bem como sua utilização pela comunidade do biofilme durante período de escassez de nutrientes. Os autores verificaram que o composto foi

---

[1] JONES, R. W., GARLAND P.B.(1977) Site and specificity of the reation of bipyridylium compounds with anaerobic respiratory enzymes of Escherichia coli. Effects of permeability barriers imposed by the cytoplasmic membrane...*Biochem.J.* 164: 199-211

[2] NEUMANN, A., WOHLFARTH G., DIEKERT G. 1995. Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*. Arch. Microbiol. 163:276-281.
NEUMANN, A., WOHLFARTH G., DIEKERT G. 1996. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. J. Biol. Chem. 271: 16515-16519

acumulado no EPS de biofilmes cultivados, como deu-se também nas cápsulas das células.

Várias são as evidências de que determinadas enzimas relacionadas à desalogenação redutiva localizam-se nas membranas celulares, e o fato dessa reação produzir energia para alguns microrganismos também contribui para tais suposições, uma vez que o processo assemelha-se muito a processos respiratórios que também ocorrem nas membranas.

3a6 - Adaptação microbiana- aspectos fisiológicos e bioquímicos

Como visto anteriormente, autores como MOHN & TIEDJE (1992); HOLLIGER & SCHUMACHER (1994) mostraram que moléculas de organoclorados são então passíveis de degradação. Através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, essas moléculas podem entrar nas células microbianas e atuarem como aceptores finais de elétrons, participando de processos respiratórios desses microrganismos.

As moléculas utilizadas como alimentos entram nas células por um mecanismo ativo chamado *uptake* (absorção) ou processo de difusão passiva, mas infelizmente, pouco se conhece a respeito das possibilidades desses transportes (ativo ou passivo) dos poluentes ambientais. Entretanto, quando um composto entrou na célula, ele foi previamente, reconhecido como uma fonte de alimento digerível. Essa incumbência, dentro da célula, é normalmente realizada por proteínas sensoras ou reguladoras especializadas, que podem interagir com a molécula do alimento e então estimular a expressão dos genes, codificando as enzimas necessárias para a conversão do composto. A Figura 3a6 apresenta, de forma simplificada, a síntese de proteínas (enzimas) que é controlada geneticamente nas células de procariotos.

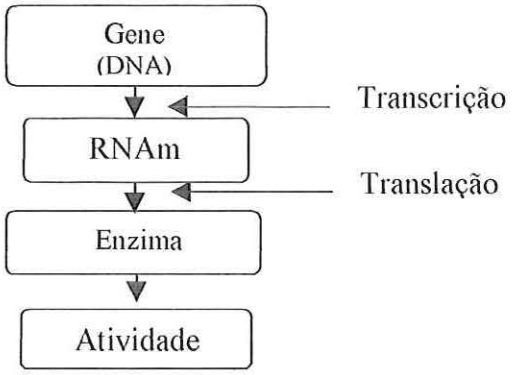


FIGURA 3a6 – Fluxo da informação genética na expressão dos genes
Fonte: YOUNG & CERNIGLIA (1995)

FLEMING (1995) afirmou que compostos organoclorados são produzidos naturalmente em grandes quantidades em ambientes aquáticos e terrestres, podendo ser metabolizados naturalmente em grande escala, sendo, apenas alguns deles, persistentes. Assim, pode-se supor o uso de rotas metabólicas naturais para a degradação de moléculas xenobióticas de organoclorados.

Baseados no mesmo argumento, MOHN & TIEDJE (1992) sugeriram que durante a evolução microbiana, pode ter ocorrido uma pressão seletiva de microrganismos com atividade em desalogenar, redutivamente, moléculas naturais. Os autores sugeriam possíveis explicações metabólicas para a ocorrência do período de adaptação dos microrganismos, necessário à manifestação da capacidade de desalogenação redutiva de moléculas, relacionando-os à: - mudança genética; - indução enzimática; e exaustão do substrato preferencial. Além disso, o crescimento de populações com atividade desalogenante, inicialmente em baixa densidade, pode refletir na existência de uma fase de adaptação da cultura. Os autores concluíram que a melhor explicação seria a indução enzimática, pois seus resultados não permitem concluir a existência de alterações genéticas nas culturas estudadas, uma vez que a reprodução microbiana ocorreu no período de adaptação.

van DER MEER *et al.* (1994) apontaram dois caminhos diferentes para a adaptação microbiana ao poluente. A chamada adaptação bioquímica, que ocorre quando os compostos são reconhecidos pelos microrganismos e os genes codificadores das enzimas necessárias só precisam ser ativados, e adaptação

genética, na qual mudanças ou adições nas informações genéticas são necessárias para adequar as enzimas ao novo substrato.

Os mesmos autores *(opt. cit.)* estudaram as possibilidades dos mecanismos moleculares estarem envolvidos na adaptação dos microrganismos. Ressaltaram a semelhança de ação e função desses compostos organoclorados, que deixam de ser tóxicos, para serem metabolizados, com a resistência microbiana a antibióticos.

PELCZAR (1981) explicou que a resistência do microrganismo ao antibiótico é um processo de adaptação genética e pode ser conseqüência de mutação natural ou aquisição de genes de resistência. A mutação natural carateriza-se por alterações nas seqüências de nucleotídeos do DNA, que codificam a informação contida no gene, resultando na formação de uma proteína modificada. Pode ocorrer por processos expontâneos durante a replicação do DNA, ou induzidos por vários fatores ambientais, inclusive agentes tóxicos, o que representa um tipo de evolução, chamada de vertical por van DER MEER *et al.* (1994).

A aquisição de genes de resistência pode ser explicada da seguinte forma: os microrganismos carregam suas informações hereditárias em um cromossomo simples, em forma de molécula circular fechada, o DNA. Cada região dessa molécula determina um gene específico, que codificam enzimas, proteínas e RNA-ribossômico (rRNA). No entanto, muitos microrganismos apresentam elementos genéticos extra cromossômicos que são chamados plasmídeos. As informações genéticas do DNA cromossômico são essenciais à vida, os plasmídeos contêm genes extras, não essenciais, mas que conferem uma vantagem seletiva às células que os contêm, como exemplo, a resistência aos antibióticos. Outra caraterística importante dos plasmídeos é que seus genes podem transferir-se a outras células, não necessariamente da mesma espécie, através do processo chamado de conjugação, que representa um tipo de evolução, chamada de horizontal por van DER MEER *et al.* (1994).

van DER MEER *et al.* (1994) citaram um exemplo de mutação natural que permitiu a degradação de organoclorados. Nesse caso, enzimas específicas para degradação de halogênios foram desenvolvidas em bactérias aeróbias, como a enzima clorocatecol 1,2 dioxigenase, da família das enzimas intradiol dioxigenase. Tais enzimas são produtos de um grupo de genes que adquiriram e acumularam muitas mudanças em suas seqüências de nucleotídeos no DNA cromossômico

(portanto, adaptação genética) e as novas enzimas originadas, como conseqüência dessas mudanças, passaram a apresentar especificidade a substratos completamente diferentes daquelas das enzimas codificadas pelos genes membros dessa família, nesse caso, uma evolução vertical.

Os mesmos autores *(opt.cit.)* comentaram também o exemplo de aquisição de genes (evolução horizontal); nesse caso apontaram os genes que codificam as enzimas envolvidas na degradação de clorobenzenos. Esse genes adquiridos estão localizados no DNA plasmidial, e acredita-se que podem ter origem em um microrganismo capaz de degradar o tolueno. A primeira enzima envolvida na degradação foi a tolueno dioxigenase, e a análise da seqüência do gene da clorobenzeno dioxigenase indicou que esse gene tem alta porcentagem de homologia ao gene que codifica a enzima tolueno dioxigenase. Os autores ressaltaram que, nas últimas duas décadas, foram detectados muitos plasmídeos auto-transferíveis que carregam informações para a degradação de compostos aromáticos halogenados ou de pesticidas.

Nesse sentido, RAVAN *et al.* (1998) estudaram a freqüência da transferência de um elemento genético contendo genes de degradação do clorocatecol entre espécies de *Pseudomonas sp.* B13, *Pseudomonas putida* F1 e microrganismos do ambiente presentes no lodo do reator operado com de lodos ativados. Os autores (opt.cit.) concluíram que no meio ambiente, quando a densidade de células é muito baixa ou muitas espécies diferentes estão presentes, como é o caso do solo e lodo de esgoto, a freqüência de transferência desses elementos é muito menor do que em relação a um microcosmo, onde existem condições ótimas para a ocorrência de transferência entre os microrganismos. Mas, a seleção e crescimento de uma linhagem que possui genes localizados em um elemento transponível, interagindo com linhagens anfitriãs, dependem da presença e concentração suficientemente altas de substrato específico, o que pode demonstrar que a evolução para uma nova via metabólica pode estar baseada em eventos raros de transferência e forças seletivas fracas, quando ocorrem em condições ambientais.

Apenas para exemplificar, uma adaptação bioquímica foi suposta por CHAMAMA & CRAWFORD (1997) através do estudo com um microrganismo empregando-se técnicas de biologia molecular e genes cromossômico que codificam

as enzimas atuantes na degradação aeróbia de PCP. A espécie *Sphingomonas* (*Flavobacterium*) *clorophenolica* ATCC 39723, um microrganismo aeróbio capaz de degradar PCP, foi isolada de solos contaminado com PCP do estado de Minessota, Estados Unidos. Os autores evidenciaram que a primeira enzima da via da *S. clorophenolica* é PCP4-monoxigenase, codificada pelo gene chamado de pcpB-cromossomal. O produto dessa reação originou tretacloro-p-hidroquinona (TeCH), posteriormente desalogenado redutivamente para tricloro-p-hidroquinona e dicloro-p-hidroquinona (diCH) por uma segunda enzima, a desalogenase redutiva, codificada pelo gene pcpC-cromossomal e diclorohidrolase, uma terceira enzima codificada pelo gene pcpA-cromossomal. Esse exemplo mostra que o microrganismo apresentou genes que podem ter sofrido uma mutação natural ou induzida pela contaminação do local, através de uma adaptação genética, ou que esses genes já existiam, e somente foram estimulados com a presença do poluente, nesse caso, uma adaptação bioquímica.

Portanto, os dois tipos de adaptações, genética ou bioquímica, da mesma forma que afirmaram van DER MEER *et al.* (1994) são passíveis de ocorrência frente a poluentes ambientais. A adaptação genética foi bem esclarecida por autores como PELCZAR, 1981; van DER MEER *et al.*,1994; RAVAN *et al.*, 1998; a adaptação bioquímica, como foi chamada por CHAMAMA & CRAWFORD (1997) e apresenta vias ainda desconhecidas. Ressaltando esse fato, PACE (1997) esclareceu que a grande maioria dos microrganismos existentes ainda são desconhecidos, assim como suas vias metabólicas, por isso deve-se estimular os estudos sobre biodiversidade microbiana.

3a7 – Desalogenação redutiva de organoclorado em culturas anaeróbias mistas

A atividade de desalogenação redutiva por consórcios microbianos não definidos tem sido bastante estudada, especialmente em ambientes anaeróbios como sedimentos de rios, lacustres e marinhos, em lodos de esgoto e populações microbianas de reatores de tratamentos de águas residuárias (DOONG & WU, 1995; TOWNSEND &SULFITA, 1996; van EEKERT *et al.* 1998).

De acordo com estudos realizados por DISTEFANO *et al.* (1991), a desalogenação redutiva do PCE por consócios microbianos não-adaptados produziu acúmulo de intermediários, e o passo limitante foi a desalogenação de cloreto de vinila a eteno. Os experimentos foram conduzidos com metanol, para o enriquecimento de uma cultura não-definida, observando-se a ocorrência de 80 % de desalogenação, com formação de 20 % de cloreto de vinila. No entanto, tais transformações ocorreram na ausência de metanogênese, inibida pela alta concentração de PCE. O balanço de elétrons demonstrou que o consumo de metanol resultou em 31 % da desalogenação do composto e 69 % da produção de acetato.

Nesse sentido, FLORENCIO (1994) esclareceu que o destino do metanol em condições anaeróbias pode ser definido pelo grupo de microrganismos predominantes. A um grupo, pertencem as metanogênicas metilotróficas que levam o metanol a metano e, ao outro, as acetogênicas metilotróficas que produzem acetato e butirato. Embora transformações do metanol para hidrogênio e CO_2, pelas acetogênicas, sejam termodinamicamente desfavoráveis, essas reações podem ocorrer sob condições de sintrofismo com consumidoras de hidrogênio.

BRYANT *et al.* (1991) estudaram a desalogenação redutiva de PCP por sedimentos anaeróbios não-adaptados e comunidades microbianas previamente adaptadas ao 3,4 DCP. Os sedimentos não-adaptados removeram cloreto preferencialmente da posição *para*, diferindo de estudos realizados com culturas puras, como os de MOHN & TIEDJE (1992). BRYANT *et al.* (1991) concluíram que comunidades microbianas não-adaptadas podem apresentar diferentes microrganismos, com diferentes rotas metabólicas para a desalogenação redutiva, não seguindo uma regra padrão.

YE *et al.* (1995) estudaram a desalogenação redutiva de bifenilas policloradas (PCBs) por sedimentos do rio Hudson, Estado de Nova York, EUA, enriquecendo as amostras com metanol para estimular o crescimento de organismos metanogênicos. Para avaliar o papel das metanogênicas na desalogenação redutiva desses compostos aromáticos clorados, foi testada a adição dos os antibióticos penicilina G e *D-cicloserina* para inibir as bactérias, e de metanol para estimular a metanogênese. Os resultados mostraram que ocorreu desalogenação redutiva preferencialmente nas posições *para* e *meta*. Em um segundo teste foi adicionado BESA (ácido 2-bromoetanosulfonado), ocorrendo inibição parcial da desalogenação redutiva na posição *para*. O BESA é normalmente usado para inibir a metanogênese, entretanto, os autores destacaram que, em estudos anteriores, foi observado que BESA inibiu a desalogenação redutiva por atuar como aceptor final de elétrons, não por inibir a metanogênese, mas por competir pelos elétrons. Dessa forma, YE *et al.* (1995) concluíram que os resultados acima descritos suportaram a hipótese de que as metanogênicas são responsáveis pela desalogenação redutiva de PCBs na posição *para*, mas existe uma enorme dificuldade em demostrar essa atividade em culturas puras. O que justificaria é o fato de não se reproduzirem, nos cultivos puros, as condições encontradas nos cultivos mistos.

van EEKERT *et al.* (1998) estudaram o potencial de um lodo granulado, não adaptado a poluentes clorados, oriundo de reator UASB alimentado com metanol, ácidos voláteis, e sacarose para a desalogenação redutiva de tetracloreto de carbono. Os autores (*opt.cit.*) relataram que reações de desalogenações não específicas podem ser atribuídas a cofatores como a vitamina B_{12} e F_{430} excretados por microrganismos metanogênicos para o meio de cultura em que estão inseridos, pois e ensaios com lodo esterelizado indicaram que a desalogenação ocorreu por processo mediado por cofatores ou outros componentes de origem orgânica diluídos no meio.

BOYD & SHELTON (1984) observaram que culturas anaeróbias não-definidas podem apresentar regioespecificidade quanto à desalogenação, dependendo do substrato utilizado na adaptação ao organoclorado. Os autores (*opt.cit.*) verificaram que culturas adaptadas com 2CP (desalogenação *orto*), degradaram 4CP (desalogenação *para*) e 2,4DCP(desalogenações *orto* e *para*). As desalogenações nas posições *orto* e *meta* do anel aromático foram mais difíceis, tanto que não ocorreu

degradação de 3CP (desalogenação *meta*). O lodo metanogênico, alimentado com acetato e exposto diretamente ao PCP por 10 dias, desalogenou a molécula principalmente na posição *orto*, semelhante aos resultados de lodo não-adaptado. O lodo já adaptado por 6 meses removeu cloro em todas as posições, sendo mais freqüente na posição *orto*.

HENDRIKSEN *et al.* (1992) estudaram a desalogenação do PCP em dois reatores UASB de bancada. Os reatores foram inoculados com lodo granulado estocado a -10°C por 1,5 anos, anteriormente aclimatado por meio contendo glicose. Para ativar o lodo, os reatores foram alimentados com 0,90g de glicose/L, e a partida durou cerca de 3 a 4 semanas. Após a partida, os reatores foram alimentados com fenol e PCP; glicose foi usada na alimentação de um dos reatores. Os autores concluíram que compostos recalcitrantes podem ser facilmente degradados em reatores de fluxo contínuo, e que o reator alimentado com glicose apresentou um melhor desempenho devido à alta concentração de biomassa formada, o que representou um efeito estimulante direto da glicose na taxa de desalogenação.

Por sua vez, NICHOLSON *et al.* (1992) relataram que a desalogenação redutiva de CP tem sido observada em culturas anaeróbias aclimatadas e não-aclimatadas e que o caminho da biodegradação depende em grande parte das caraterísticas do consórcio microbiano, destacando que, consórcios não-aclimatados removem, preferencialmente, na posição *orto*.

MOHN & KENNEDY (1992) avaliaram a capacidade de um lodo granulado, proveniente de um reator UASB, em degradar 2,3,6 TCP; 2,4,6 TCP; 3,5 DCP, em sistema operado sob condições descontínuas ou batelada e alimentado com sacarose e acetato. Nesse caso, não houve desalogenação nas posições *meta* e *para*, sendo o TCP desalogenado somente na posição *orto*, e o DCP somente na *meta*. Os autores ainda testaram os doadores de elétrons H_2, formiato, acetato e propionato, e verificaram que os mesmos não aumentaram a taxa de desalogenação, mas propiciaram a metanogênese.

WU *et al.* (1993) observaram que grânulos metanogênicos adaptados desalogenaram PCP nas posições, *meta* e *orto*. Os ensaios para demostrar a existência de toxicidade dos intermediários formados revelaram que a concentração de 1,0 mg/L de 3,4,5 TCP (derivados da desalogenação na posição *orto)* afetou o

lodo de forma a inibir a degradação dos ácidos gráxos voláteis do meio, e a mesma concentração do composto 2,4,6 TCP (derivado da desalogenação na posição *meta*) não afetou a degradação. Portanto, essa última reação gerou intermediários mesmos tóxicos para a comunidade de microrganismos do lodo.

Nesse sentido, KENNES *et al.* (1996) observaram que em consócio anaeróbio adaptado, o caminho principal da desalogenação de PCP para TCP, é na posição *meta*. Os autores acreditam que realmente tal via é menos tóxica para os microrganismos.

3a8 - Desalogenação redutiva em culturas puras

A desalogenação redutiva é a mais importante reação envolvida nas transformações de poluentes halogenados por microrganismos anaeróbios. O isolamento de uma cultura com essa caraterística conduz o estudo da sua bioquímica, como conseqüente entendimento do metabolismo do microrganismo. Isso pode permitir o controle e o estímulo da reação. A identificação do microrganismo possibilita também o monitoramento de locais contaminados. Portanto, a caraterização e o entendimento de culturas puras promotoras de desalogenação redutiva são extremamente necessários à Biotecnologia Ambiental.

FATHEPURE & BOYD (1988) estudaram a desalogenação redutiva de PCE por cultura de *Methanosarcina* sp. linhagem DCM, isolada e purificada pelo emprego de antibióticos no meio de cultivo. Sua identificação foi feita através da morfologia e de respostas fisiológicas. Foi observado que a desalogenação redutiva ocorreu durante a metanogênese, não sendo observada quando cessou a produção de CH_4. A desalogenação foi claramente dependente da quantidade de substrato metanogênico consumido, no caso, metanol. O gênero *Methanosarcina* estudado possuiu muita semelhança com a espécie *M. mazei* S6. Porém, através de análises baseadas reações imunológicas, a cultura pareceu pertencer a espécie *M. acetivorans*. A inabilidade da linhagem DCM em desalogenar PCE, na ausência de outro substrato contendo carbono, sugeriu que o processo metabólico funcionasse como co-metabolismo, e nessa condição, a velocidade de formação de CH_4 foi 30 vezes maior que a taxa de desalogenação do PCE. O fato das metanogênicas possuírem muitas coenzimas, as quais estão envolvidas nos processos de oxi-redução, como a

coenzima F_{430} que contém Ni, e faz parte do último passo do transporte de elétrons para a formação de CH_4, bem como de outras biomoléculas como os citocromos, pode responder sua à capacidade de desalogenação redutiva, o que seria ecologicamente muito importante, pois as metanogênicas são microrganismos amplamente encontrados em ambientes anaeróbios. Portanto, em locais contaminados com PCE, a velocidade de desalogenação redutiva pode ser aumentada estimulando-se a metanogênese.

MIKESELL & BOYD (1990) estudaram a desalogenação redutiva de tetracloreto de carbono, clorofórmio ($CHCl_3$) e bromofórmio por culturas de *Methanosarcina* sp. linhagem DCM e *M.mazei* S6. Os experimentos mostraram que, inicialmente, o clorofórmio não foi desalogenado e a metanogênese realizada pela *Methanosarcina* sp. DCM foi inibida por 0,1 μM – 10 μM de clorofórmio. Entretanto, posteriormente, quando clorofórmio foi adicionado junto com uma segunda parcela de substrato, não houve inibição da metanogênese e ocorreu uma rápida desalogenação, atingindo 65% de clorofórmio desalogenado pela *Methanosarcina* sp. DCM e 78% pela *M. mazei* S6. A ausência de desalogenação no lodo, na primeira fase, e a redução da metanogênese indicaram toxicidade do clorofórmio para a metanogênese quando a relação concentração $CHCl_3$/nº. de microrganismos foi alta. Os experimentos mostraram que a desalogenação foi proporcional à quantidade de metano produzida, e que as culturas anaeróbias de *Methanosarcina* sp. atuaram sobre os compostos: clorofórmio, tetracloreto de carbono e bromofórmio.

DIETRICH & WINTER (1990) fizeram um isolamento parcial de microrganismos degradadores de clorofenol, a partir de lodo de esgoto. Observaram, através de microscopia de contraste de fase e varredura eletrônica, três morfologias predominantes: microrganismos com morfologia semelhante a espiroquetas, bacilos e cocos. Não foram observadas a utilizações de sulfato e de nitrato como aceptores de elétrons.

DEWEERD *et al.* (1990) estudaram a fisiologia e a bioquímica da primeira cultura pura anaeróbia isolada e identificada, capaz de realizar a desalogenação redutiva de compostos aromáticos clorados, a espécie *Desulfomonile tiedjei*

(anteriormente DCB-1 por SHELTON & TIEDJE, 1984), um bacilo, Gram-negativo, não-esporulado.

MADSEN & LICHT (1992) isolaram outro microrganismo anaeróbio que degradou vários fenóis clorados, chamado de DCB-2. As colônias eram de coloração marrom-amarelado. A célula possuiu formato de bacilo, formador de endosporos terminais, móvel, ligeiramente curvo. A cultura não reduziu sulfato, e nitrato foi reduzido produzindo nitrito e amônia. O gênero proposto foi *Clostridium,* capaz de desalogenar os clorofenóis substituindo o cloro por grupos OH, preferencialmente na posição *orto*. O PCP foi desalogenado na posição *orto*, e não houve desalogenação na posição *para*.

Segundo HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), duas linhagens de microrganismos que utilizam PCE (tetracloroetileno) como aceptor final de elétrons, foram recentemente isoladas: *-Dehalobacter restrictus; -Dehalospirillum multivorans*, que desalogenam PCE para cis-1,2 dicloroetileno e acoplam essa reação a obtenção de energia para seu crescimento. A primeira espécie foi isolada de um reator de filme fixo, alimentado com lactose e PCE, sendo Gram-positiva; a segunda espécie foi capaz de utilizar vários substratos como doadores de elétrons, por exemplo, piruvato, formiato e hidrogênio molecular que serviram como doadores de elétrons, e PCE, fumarato e enxofre elementar, aceptores de elétrons. Ambas as culturas foram capazes de realizar metabolismo fermentativo .

UTKIN *et al.* (1994) isolaram e caraterizaram um microrganismo anaeróbio presente em sedimento de lago, que desalogenou redutivamente compostos clorofenólicos. Esse microrganismo foi capaz de desalogenar redutivamente 2,4 DCP e 3 Cloro- 4 hidroxifenilacetato (3-Cl-4OHPA). Os autores, baseados na análise do 16S rRNA, e na inabilidade desse organismo para realizar a redução desassimilatória do sulfato e na capacidade em utilizar uma variedade de aceptores de elétrons, como o enxofre elementar, concluíram que a linhagem isolada não pertencia a gêneros e espécies anteriormente descritos. Sugeriram um novo gênero, *Desulfitobacterium,* caraterizado por bacilos curvos e retos, redutor de sulfato; a espécie denominada *dehalogenans,* referindo-se à caraterística de desalogenar vários compostos clorofenólicos. A obtenção de energia foi obtida através da desalogenação redutiva.

DENNIE *et al.* (1998) estudaram a indução da atividade desalogenante das posições *orto*, *meta* e *para* em diferentes clorofenóis e a especificidade ao substrato por *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 isolada por BOUCHARD *et al.* (1996). O *D. frappieri* PCP-1 é um microrganismo Gram-positivo, estritamente anaeróbio, que pode desalogenar redutivamente PCP para 3-clorofenol e diferentes clorofenóis nas posições *orto*, *meta* e *para*. Essa cultura desalogenou PCP para 2,4,6 TCF, 2,3,4 TCF, 2,3,5 TCF, 2,6 DCP e 2,4 DCF na posição *orto*. Vários compostos halogenados foram transformados por *D. frappieri* PCP-1: pentacloroanilina, 2, 3, 5, 6-tetracloroanilina, pentacloronitrobenzeno, pentacloropiridina, tetracloroetileno, 3-cloro-4-hidróxifenilacetato e tetraclorocatecol, mas com poucas exceção, estes compostos não foram desalogenados por culturas não induzidas, sugerindo que não podem induzir sua própria desalogenação. O microrganismo *D. frappieri* PCP-1 pôde desalogenar nas posições *orto*, *meta* e *para*, uma grande variedade de moléculas aromáticas. Segundo os autores, esta diferença de especificidade de substrato faz parte do gênero *Desulfitobacterium* e o *D. frappieri* PCP-1.

WIEGEL *et al.* (1999) observaram que, após dez anos do conhecimento a existência da desalogenação anaeróbia de PCBs em lodo de sedimento, nenhuma cultura pura de procariotos que desalogenam PCBs foi isolada, e nenhuma cultura anaeróbia que desalogena HO-PCBs foi descrita até agora. Entretanto, células em suspensão de uma cultura anaeróbia de *Desulfitobacterium dehalogenans* puderam desalogenar redutivamente compostos clorados substituindo por grupos hidroxila na ausência de solo ou matrizes como sedimento. O *D. dehalogenans* exibiu uma alta especificidade ao substrato e desalogenou somente cloretos para fenóis e compostos aromáticos hidroxilados quando eles estavam posicionados juntos ao grupo hidroxila.

3a9 - Importância das metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato para a desalogenação redutiva e mineralização do PCP

KENNES *et al.* (1996) estudaram a capacidade de desalogenação e mineralização de grânulos metanogênicos adaptados a degradar organoclorados. Os grânulos foram obtidos de um sistema em operação, reator UASB (WU *et al.*,1993). Nos experimentos, foi usado PCP marcado com ^{14}C, e foram realizados testes com grânulos ativos e inativos. Os grânulos inativados por autoclavação não apresentaram

nenhuma ação em relação ao PCP. Por sua vez, os grânulos ativos desalogenaram PCP a TCP na posição *meta*, DCP na posição *orto*, MCP nas posições *para* e *meta*. Nesse experimento, para verificar o envolvimento das bactérias redutoras de sulfato (BRS) na desalogenação, adicionou-se molibdato (10 μM) como inibidor do metabolismo redutor do íon sulfato. Os resultados mostraram uma diminuição na desalogenação redutiva e da mineralização do PCP. Um teste com BESA (10 μM) mostrou a inibição total da desalogenação, sendo cessada a formação do íon Cl^-. Entretanto, não foi possível garantir que a metanogênese esteja relacionada com a desalogenação do PCP, nessa população. Segundo os autores *(opt.cit.)* seria necessário conhecer o metabolismo de desalogenação do PCP em cultura pura. Mas os autores ressaltaram que o metabolismo dos microrganismos metanogênicos foi extremamente importante, nessa comunidade, para degradação sintrófica de compostos não clorados como: fenol e benzoato. O estudo com $FeSO_4$ (3,0 mM) mostrou que o aumento inicial na taxa de desalogenação foi concomitante com aumento de formação de $^{14}CH_4$ e $^{14}CO_2$, confirmando a hipótese de que o sulfato pode estimular a desalogenação redutiva.

TOWSEND *et. al.* (1997) investigaram a desalogenação redutiva e a mineralização de 3CB por microrganismos presentes em sedimentos de um aqüífero, cuja análise prévia não demostrou atividade de degradação de compostos cloroaromáticos, na presença de sulfato. Os testes foram realizados com concentrações de 300 μM de 3CBz, na presença de 6 mM de sulfato. Os autores concluíram que a desalogenação redutiva e a redução do sulfato ocorreram concomitantemente, e que a degradação do 3CB foi dependente da adição de sulfato. Segundo os autores (*opt.cit*), benzoato pode ser metabolizado por oxidação direta para dióxido de carbono, por BRS, ou por oxidação incompleta para acetato, por microrganismos sintróficos que acoplam seu metabolismo ao das metanogênicas consumidoras de hidrogênio ou das BRS. A biodegradação sintrófica do benzoato é termodinamicamente mais favorável quando ocorre o acoplamento da BRS com metanogênicos.

KIM & RHEE (1997) estudaram a dinâmica de uma população microbiana anaeróbia que desalogenou PCB, empregando a técnica do NMP (Número Mais Provável). A partir de uma cultura obtida dos sedimentos do lago Owasco

NewYork, EUA, que foi adaptada em Aroclor 1248, preparou-se uma série de diluições (10^{-1}-10^{-9}). Foi constatado que as populações de BRS foram 2 ordens de magnitude superior à população de desalogenadores em todos os frascos, sendo positiva a desalogenação nos frascos com redução do sulfato. Nos frascos com cultivo de metanogênicos, observou-se que a fase lag de crescimento foi semelhante à dos desalogenadores. O número de metanogênicos e redutoras de sulfato foi bastante semelhante no sedimentos, em presença e ausência de PCB. Mas, nos frascos em que as desalogenaçôes de 2,3,4 e 2,5,3',4'-CBPs foram verificadas, metano não foi gerado. Concluiu-se que é possível que alguns organismos desalogenadores sejam também metanogênicos ou redutores de sulfato, e que representem uma parte da populações presente.

3a10 - Morfologias predominantes em grânulos anaeróbios que desalogenam redutivamente PCP

WU *et al.* (1993) obtiveram grânulos metanogênicos que degradavam PCP em um reator UASB, operado em escala de laboratório. Os grânulos obtidos apresentavam cor marrom a amarelo-cinzento, indicando um baixo conteúdo de sulfeto ferroso, com diâmetro de 0,10 – 5,0 mm, predominando os maiores que 2,0 mm. O exame microscópico mostrou a presença predominante de bacilos semelhantes a *Methanosaeta* sp. (anteriormente *Methanothrix* sp.), crescendo como longos filamentos, de outros tipos de bacilos formadores de cadeias de três ou mais células, e de estruturas celulares semelhantes metanogênicas dos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanobacterium* sp.

Da mesma forma, JUTEAU *et al.* (1995) observaram que em biofilme de um reator anaeróbio de filme fixo, capaz de degradar PCP, o consórcio microbiano presente possuía um arranjo bem estruturado. Através da microscopia eletrônica de varredura, os autores observaram que microrganismos do tipo *Methanosaeta* sp. (anteriormente *Methanothrix* sp.) estavam presentes, principalmente na base do biofilme, enquanto na superfície, uma grande diversidade de morfologias como pequenos bastonetes foram dominantes. Os autores sugeriram que os microrganismos do biofilme podem formar estruturas semelhantes àquelas descritas para grânulos microbianos de reatores UASB, modelo em multicamadas. Neste, na camada mais

externa, predominam microrganismos acidogênicos, seguidos por acetogênicos produtores e consumidores de hidrogênio em uma segunda camada, e no centro, predominam morfologias celulares semelhantes a acetoclástica metanogênica *Methanosaeta* sp. (anteriormente *Methanothrix* sp.). Segundo DAMIANOVIC (1997), durante estudos sobre a degradação de PCP em reatores anaeróbios contínuos horizontais de leito fixo, observou-se a predominância de morfologias semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (anteriormente *Methanothrix* sp.), além de espécies metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina* sp.

LARIZZATI (1998) constatou em reatores operados em batelada para a degradação de PCP, a morfologia predominante semelhante ao gênero *Methanosarcina* sp.

As morfologias relacionadas aos organismos metanogênicos encontrados nos grânulos e biofilmes descritos nos trabalhos anteriormente referidos não diferem, em geral, das observadas nos reatores anaeróbios que não tratam PCP. ROBINSON *et al.* (1984) examinaram a estrutura de biofilmes de oito reatores de leito fixo operados com resíduo fresco de suínos, observaram um grande número de microrganismos metanogênicos, que foram identificados, por sua fluorescência sob radiação 420 nm: duas morfologias foram predominantes, uma semelhante a *Methanosaeta* sp. (anteriormente *Methanothrix* sp.) que estava presente em grande quantidade na superfície do biofilme e a outra à *Methanosarcina* sp., localizada mais internamente.

VARESCHE *et al.* (1997), que pesquisaram a composição microbiana de um lodo anaeróbio imobilizado em matrizes de poliuretano de um reator tratando um substrato composto basicamente de glicose, observaram a presença de bacilos não fluorescentes, relacionados com bactérias acidogênicas, devido à presença de glicose. Observaram também agrupamentos de células semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. (anteriormente *Methanothrix* sp.), e bacilos fluorescentes, estes associados ao metabolismo hidrogenotrófico.

A partir do exposto anteriormente, nota-se que as mesmas morfologias de organismos metanogênicos aparecem nos reatores que contêm ou não PCP. Portanto, PCP não inibiu essas populações, indicando possivelmente sua participação, direta ou indiretamente, na degradação desses poluentes organoclorados. Os cofatores

com BESA inibem a metanogênese e cessam a desalogenação são fortes indicações do importante papel dos microrganismos metanogênicos na reação de desalogenação redutiva.

3b – Biologia molecular e detecção de microrganismos

PACE (1996) explicou que os avanços alcançados na ecologia microbiana têm mostrado que os microrganismos são o alicerce da biosfera e, de acordo com o mesmo autor (1999), a comunidade microbiana pode constituir mais da metade da biomassa global. Porém, uma pequena parcela, menos que 1% dos organismos, distribuídos no meio ambiente, pode ser cultivado pelas técnicas convencionais utilizadas até hoje. Entretanto, técnicas como de a DNA recombinante e filogenia molecular permitem, agora, o acesso a muitos microrganismos, antes não conhecidos, pela dificuldade de cultivo. Além disso, EMBLEY & STACKEBRANDT (1996) esclarecem que, os microrganismos que crescem em condições de isolamento, são os que melhor se adaptam ao meio de cultura utilizado, e às condições fornecidas, e não necessariamente àqueles que são metabolicamente mais ativos e abundantes no meio ambiente de origem.

De acordo com PACE (1997), após três décadas de estudos de filogenia molecular, as pesquisas mostraram um aumento robusto no mapa da diversidade evolucionária, apontando que, a principal diversidade de vida é a microbiana, distribuída em três domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*. O mesmo esclareceu que os estudos filogenéticos baseados em genes que codificam o RNA-ribossômico (rRNA) destes microrganismos mostraram que apesar dos domínios *Archaea* e *Bacteria* apresentarem estrutura celular procariótica, são filogeneticamente diferentes.

PACE (1997) relatou que a caracterização de um microrganismo (filotipo) requer somente a seqüência de um ou mais genes, e não a análise do funcionamento da célula com as técnicas convencionais, e conseqüentemente, os tipos e números de organismos de uma comunidade natural, podem ser obtidos, a partir do isolamento do DNA diretamente da célula, de seu habitat. O DNA extraído é então analisado, gerando a seqüência de um gene, normalmente do rRNA e usa esta seqüência para: definir propriedades de organismos não cultiváveis; sintetizar sondas de

oligonucleotídeos para identificação de morfologias; detectar crescimento de um microrganismo específico em culturas mistas ou monitorar a distribuição natural destes; avaliar a taxa de crescimento relativo *in situ*; identificar fontes de outros genes; e possibilitar um rápido estudo de biodiversidade. EMBLEY & STACKEBRANDT (1996) relataram que a subunidade 16S dos rRNAs são boas regiões de estudo, pois exibem, constância funcional, ocorrem em todas as células, e diferentes posições em suas seqüências mudam com taxas diferentes, permitindo medir melhor as relações filogenéticas, e ainda, apresentam as vantagens de possuírem tamanhos razoavelmente grandes, e de conterem muitos domínios funcionais.

Os estudos de uma população, com os métodos baseados na análise de DNA desta, podem gerar informações sobre a composição genética da comunidade microbiana, isto é, permitir o estudo da diversidade dos microrganismos presentes em tais amostras, enquanto, que os métodos baseados na análise de RNA permitem o estudo da atividade dessa comunidade. Em outras palavras, esclarece-se o fato de que o RNA, especificamente RNA ribossômico (rRNA), apresenta-se no microrganismo em grande quantidade, durante a síntese de proteínas. Entretanto, ambos os métodos podem ser usados para detectar um gene específico.

Vários são os métodos que podem ser utilizados para tais análises, entre eles, destaca-se a reação de polimerase em cadeia (PCR), as hibridações de DNA e RNA em membranas, ou utilizando a própria célula (hibridação "*in situ*" ou FISH) e ainda, os métodos de separações de DNA ou fragmentos destes, como ARDRA e DGGE.

3b1 – Reação de polimerase em cadeia (PCR)

De acordo com STEFFAN & ATLAS (1991), o desenvolvimento da PCR em 1983 foi o maior avanço nas metodologias utilizadas em biologia molecular. A PCR permite a replicação "*in vitro*" de seqüências definidas de DNA, nas quais, segmentos de genes podem ser amplificados. Dessa forma, a PCR aumenta significantemente a probabilidade de detecção de seqüências raras em misturas heterólogas de DNA.

ROSADO *et al.* (1997) esclareceram que a amplificação PCR, a partir de amostras ambientais, é um grande passo no avanço do estudo da ecologia

microbiana. PCR é baseada em ciclos enzimáticos repetidos, promovendo a extensão dos *primers*, posicionados no final do DNA-matriz (alvo). Os ciclos necessitam de alta temperatura de desnaturação do DNA (freqüentemente 94°C), uma temperatura mais baixa, que permita o anelamento dos *primers* (isto é, 37°C a 60°C), e uma intermediária, para a extensão dos *primers* (70°C a 72°C).

STEFFAN & ATLAS (1991), em sua revisão, mostraram as variações desenvolvidas para a reação da PCR, e relataram que sua utilidade para rastear microrganismos geneticamente modificados (GMOs), monitorar populações específicas ou patógenas em águas, solos e sedimentos. Além disso, o produto da PCR pode ser quantificado, permitindo estimar os organismos em amostras ambientais. Também é útil para medir expressões genéticas, e para a clonagem de genes, que possibilitarão o seqüênciamento, mostrando, dessa forma, que a PCR promete ampla aplicações em Microbiologia ecológica e análises microbianas ambientais.

SELENSKA (1995) explicou que o estudo da expressão genética através das proteínas produzidas pelos microrganismos pode ser realizado através da PCR, analisando a região 16S do rRNA ou o mRNA, realizando a RT-PCR, que seria a amplificação a partir do RNA, utilizando a enzima transcriptase reversa na reação da PCR.

A reação PCR foi utilizada também por WARD *et al.* (1996) para investigar a composição de bactérias que oxidam amônia em ambiente aquático. Foram utilizados *primers* específicos para nitrificantes e foi possível avaliar a presença ou ausência de *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas sp.* (marinha) e outras da subclasse beta Proteobactérias.

FANTROUSSI *et al.* (1997) também utilizaram a PCR para detecção e monitoramento dos microrganismos *Desulfomonile tiedjei* e *Desulfitobacterium dehalogenans* que foram inoculados em solo contaminado com organoclorados, com a finalidade de estimular ou promover uma nova função metabólica para a biorremediação da área. Os autores ressaltaram que o monitoramento do destino dos microrganismos é importante para estudar suas aplicações e respostas a novas situações, tais como, se desaparecerão, se serão capazes de competir com

microrganismos naturais e se proliferarão e começarão a estabilizar a área comprometida, temporária ou permanentemente.

LEVESQUE *et al.* (1998) usaram uma PCR competitiva (cPCR) para quantificar duas espécies anaeróbias. *Desulfitobacterium frappieri* PCP1, em um consórcio usado em reator contínuo de lodo ativado para tratar efluente industrial contaminado com PCP, e *Clostridium* S6, em um consórcio metanogênico que degradou compostos fenólicos em efluentes industriais. A PCR competitiva (cPCR: uma PCR usando dois *primers* diferentes) revelou que PCP1 estava presente na concentração de $1{,}8.10^5$ células/mL no reator, e que S6, no início, apresentou uma concentração de $2{,}3.10^5$ células/mL que após 20 dias a concentração passou para $6{,}5.10^5$ células/mL, mostrando que nesse microcosmo as duas linhagens estavam presentes, porém, para a linhagem S6, as condições de crescimento foram melhores.

MIGUEZ *et al.* (1999) também usaram o método com PCR para avaliar a capacidade de culturas metanotróficas crescerem ou sobreviverem em um reator hibrído anaeróbio-aeróbio. Foi possível monitorar a população metanotrófica no reator através do gene codificador da enzima solúvel metano monooxigenase (sMMO). O método pôde detectar, depois do reator estabilizar-se aproximadamente 2.000 genes (sMMO) por g (massa úmida) de lodo granulado.

TARTAKOVSKY *et al.* (1999) inocularam a espécie *Desulfitobacterium frappieri* PCP1 em um reator UASB com a finalidade de tratar resíduos contaminados com PCP e aumentar a eficiência do sistema de tratamento. Nesse trabalho, o método da cPCR foi utilizado para avaliar o crescimento desta população. Os autores verificaram que a população de *Desulfitobacterium frappieri* PCP1 aumentou de 10^6 para 10^{10} células/g de SSV, sendo que a proliferação da linhagem PCP1 permitiu um aumento na carga volumétrica do PCP de 5,0 para 80 mg/L. Os autores puderam concluir que esse aumento da população, medida através da PCR, foi responsável pelo aumento da eficiência de remoção de PCP, chegando a 99% mesmo com enorme aumento da carga volumétrica desse organoclorado.

3b2 - Hibridação em membrana suporte

De acordo com ROSADO *et al.* (1997), a técnica da hibridação usando membranas como suporte para DNA pode ser realizada diretamente após a extração

dos ácidos nucleicos da amostra que será analisada, ou após serem submetidos à técnica da PCR.

A hibridação DNA-DNA caracteriza-se essencialmente em quatro passos essenciais: (1) fixar DNA fita simples na membrana de nylon, (2) marcar a sonda e adicioná-la, na forma de fita simples, na solução de hibridação, (3) a sonda marcada ligar-se-á ao DNA complementar formando um híbrido (DNA-SONDA) e (4) a membrana que contém os híbridos deverá ser exposta ao filme de raio-X, sendo que o local onde os híbridos são estáveis podem ser visualizados devido à substância quimioluminescente que produziu uma mancha (banda) no filme de raio X.

Segundo ROSADO *et al.* (1997), vários parâmetros podem influenciar na estabilidade da hibridação: temperatura de hibridação, temperatura de lavagem, comprimento das sondas, carga iônica ou presença de adjuvantes (como formamina) afetando a taxa de formação da hibridação. Esse método pode ser útil para verificar a presença de uma determinada espécie, a partir de uma comunidade microbiana, e a distribuição temporal dos membros da comunidade.

As sondas de oligonucleotídeos usadas no estudo da região 16S do rRNA devem ser complementares à molécula do gene 16S rRNA e podem ser preparadas em um sintetizador de DNA e marcadas quimicamente. RASKIN (s/d) apresentou uma tabela de sondas complementares às moléculas 16S rRNA, usadas principalmente em estudos de microrganismos anaeróbios, Tabela 3b.1. E ALM *et al.* (1996) padronizaram a nomenclatura para sondas e *primers*. Esta padronização incluiu, na nomenclatura, informações precisas a respeito das sondas e dos *primers*, que ser encontradas na "Base de Dados"[1] (Apêndice 1).

De acordo com MUYZER & RAMSING (1995), o princípio da hibridação *slot-blot* baseia-se em amplificar as fitas dos ácidos nucleicos extraídos da amostra, através da PCR para aumentar exponencialmente seus números e, após essa reação submetê-los à técnica de hibridação. Esse método permite estimar a abundância relativa de taxonomias específicas.

STHAL *et al.* (1988) aplicaram o método de hibridação para estudar a ecologia microbiana do rúmen bovino e quantificar diferentes microrganismos metanogênicos em biorreatores anaeróbios. Os autores concluíram que esse método

---

[1] - http://www.cme.msu.edu/OPD

foi mais consistente para monitorar comunidades microbianas em relação aos métodos que verificam as alterações do metabolismo das populações.

TABELA 3b1- Sondas de oligonucleotídeos utilizadas em hibridações

Nome da sonda	Grupo alvo	T_d (°C)	Seqüência da sonda (5'-3')
Sonda Universal			
S-*-Univ-1392-a-A-15	Normalmente todos os org.		ACGGGCGGTGTGT(G/A)C
Sondas para Domínios			
S-D-Arch-0344-a-A-20	Norm. todos Archaea	54	TCGCGCCTGCTGCICCCCGT
S-D-Arch-0915-a-A-20	Norm. todos Archaea	56	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT
S-D-Bact-0338-a-A-18	Norm. todos Bacteria		GCTGCCTCCCGTAGGAGT
S-D-Bact-00080-a-A-19	Norm. todos Bacteria		TGAGCCAGGATCAAACTCT
S-D-Euca-0502-a-A-16	Norm. todos Eucarya		ACCAGACTTGCCCTCC
Sondas para Metanog.			
S-F-Mcoc-1109-a-A-20	*Methanococcaceae*	55	GCAACATAGGGCACGGGTCT
S-F-Mbac-0310-a-A-22	*Methanobacteriaceae*	57	CTTGTCTCAGGTTCCATCTCCG
S-F-Mbac-1174-a-A-22	*Methanobacteriaceae*	62	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC
S-O-Mmic-1200-a-A-21	*Methanomicrobiales*	53	CGGATAATTCGGGGCATGCTG
S-O-Msar-0860-a-A-21	*Methanosarcinales*	60	GGCTCGCTTCACGGCTTCCCT
S-F-Msar-1414-a-A-21	*Methanosarcinaceae*	58	CTCACCCATACCTCACTCGGG
S-G-Msar-0821-a-A-24	*Methanosarcina*	60	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC
S-F-Msae-0825-a-A-23	*Methanosaetaceae*	59	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC
Sondas para BRS			
S-*-Srb-0385-a-A-18	BRS-subd-delta de Prot.		CGGCGTCGCTGCGTCAGG
S-F-Dsv-0687-a-A-16	*Desulfovibrionaceae*		TACGGATTTCACTCCT
S-*-Dsb-0804-a-A-18	Grupo *Desulfobacter*		CAACGTTTACTGCGTGGA
S-G-Dsbm-0221-a-A-20	*Desulfobacterium*		TGCGCGGACTCATCTTCAAA
S-G-Dsb-0129-a-A-18	*Desulfobacter*		CAGGCTTGAAGGCAGATT
S-G-Dsb-0220-a-A-20	*Desulfobacter*		TMCGCARACTCATCCCCAAA
S-*-Dscoc-0814-a-A-18	Grupo *Desulfococcus*		ACCTAGTGATCAACGTTT
S-G-Dsbb-0660-a-A-20	*Desulfobulbus*		GAATTCCACTTTCCCCTCTG
S-S-Dsm.sp-0647-a-A-19	Esp.-como-*Desulfuromonas*		TCTCCCGTATTCAAGTCTG
S-S-Dsv.sp-0647-a-A-19	Esp.-como-*Desulfovibrio*		TCTCCCGAACTCAAGTCCA

Fonte: Modificado de RASKIN (s/d)

RASKIN *et al.* (1994) usaram a técnica de hibridação para quantificar grupos metanogênicos filogeneticamente diferentes em comunidades anaeróbias de digestores de resíduos sólidos e de lodo de esgoto municipal. Os autores concluíram que os microrganismos metanogênicos da Ordem *Methanobacteriales* e espécies *Methanosarcina e Methanosaeta* foram as mais abundantes, respectivamente. Os

mesmos autores desenharam e caracterizaram oito sondas de microrganismos metanogênicos de grupos filogeneticamente definidos, para uso nas hibridações em estudos de Microbiologia ambiental.

RASKIN *et al.* (1995a) usaram a técnica de hibridação em membrana para quantificar a população de metanogênicos e de BRS da comunidade microbiana de reatores anaeróbios de leito fixo. Os autores *(opt. cit.)* verificaram que a presença de BRS, especialmente do gênero *Desulfovibrio* sp. não dependia da presença de sulfato, e que, em tais condições (ausência de sulfato), a Família *Methanobacteriales* foi a principal competidora por hidrogênio com as BRS .

RASKIN *et al.* (1995b) analisaram a comunidade microbiana em reatores anaeróbios para o tratamento de esgoto sanitário e verificaram que os microrganismos metanogênicos representavam de 8% -12% do total da comunidade, e desses, *Methanosarcinales* e *Methanomicrobiales* constituíam a maioria, e que o grupo de redutoras de sulfato foi a população dominante, sendo que, *Desulfovibrio* e *Desulfobulbus* sp. foram as predominantes.

RASKIN *et al.* (1996) analisaram a competição e a coexistência de bactérias redutoras de sulfato e microrganismos metanogênicos em biofilmes de reatores anaeróbios. O biofilme foi examinado antes e após a ocorrência de uma perturbação do sistema pela introdução de sulfato no afluente ao reator. Foi observado que os microrganismos metanogênicos que se apresentavam em níveis de 25% passaram para 8%, e as BRS de 15% aumentaram para 30% a 40%. As observações realizadas indicaram que os métodos baseados em análise de rRNA para monitorar os níveis de microrganismos em um sistema fornecem bons resultados, especialmente para microrganismos de difícil identificação ou quantificação usando métodos tradicionais.

MOBARRY *et al.* (1996), utilizando hibridação *slot-blot* e *in situ*, analisaram a abundância e a organização espacial de bacterias nitrificantes em reatores de lodo ativado e amostras de biofilme. Através dos resultados, os autores caracterizaram a população de nitrificantes da comunidade identificado a população de *Nitrosomonas* como predominante e freqüentemente associada a *Nitrobacter* sp., também puderam constatar a ocorrência de uma nova população de oxidantes de amônia.

LIN *et al.* (1997) avaliaram a estrutura da comunidade anaeróbia microbiana do trato gastrointestinal de vários animais domésticos (bovino, ovino, caprino e suíno) usando a hibridação com sondas de oligonucleotídeos dos grupos de metanogênicos e bactérias redutoras de sulfato. Foi verificado que os Domínios *Bacteria*, *Eukarya* e *Archaea* apresentavam-se em porcentagens de 60 a 90%, 3 a 30% e 0,5 a3%, respectivamente. Determinaram também a abundância filogenética de metanogênicos e BRS, sendo que a Ordem *Methanobacteriales* foi predominante em rúmen bovinos e caprinos, e o gênero *Desulfovibrio* sp. foi a Gram-negativa mais abundante no trato gastrointestinal da maioria do animais.

3b3- ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restrition Analysis*)

Segundo MASSOL-DEYA *et al.* (1995), esse método é baseado no princípio de que locais do rDNA chamados de "*fingerprints*", onde estão localizados os segmentos do DNA designados de operon[2] (esses segmentos são conservados de acordo com o padrão filogenético de cada espécie). Quando submetidos a cortes com enzimas especializadas (enzimas de restrição) cada grupo resulta em um padrão de segmentos de DNA diferente que são então visualizados por eletroforese em gel (gel de agarose corado com brometo de etídio e fotografado sob iluminação ultravioleta).

O método ARDRA envolve o uso de um par de *primers* para amplificação (PCR) de DNA de um grupo específico de microrganismos e o produto dessa PCR é então digerido com enzimas de restrição[3]. O resultado dessa digestão, os fragmentos dos ácidos nucleicos, produtos dessa clivagem, são submetidos à eletroforese e diferentes tamanhos de fragmentos de DNA ocuparão, no gel, diferentes posições, sendo que quanto maior o fragmento, menor sua mobilidade no gel, ficando retido no início, enquanto os menores avançarão mais, atingindo posições próximas do final do gel. Desta forma, poderão ser visualizados através das bandas, e avaliados por

---

[2] Operon, consiste de um grupo de genes estruturais funcionalmente relacionados, que podem ser coordenadenadamente acionados ou não, mais o seu operador, existem muitos operons no DNA. E ainda, segundo LEHNINGER (1990), operon é a unidade de expressão Gênica que consiste de um ou mais genes relacionados e de seqüências de operador e promotor que regulam a sua transcrição

[3] LEHNINGER (1990): enzimas de restrição são enzimas que clivam ambas as fitas de qualquer DNA, que apresentam seqüências de bases específicas, como exemplo a *HindII* (uma enzima de restrição da *Hemophilus influenzae*) que corta o DNA quando encontra a seguinte seqüências: 5'-G-T-Py↓Pu-A-C-3', 3'-C-A-Pu ↓Py-T-G-5'

comparação com bandas de microrganismos conhecidos (padrões), ou hibridizando com sondas específicas. O ARDRA é, portanto, um método semi-quantitativo, isto é, existe uma relação entre o número de células de microrganismos e a intensidade das bandas.

MASSOL-DEYA *et al.* (1995) estudaram a estrutura de uma comunidade microbiana presente no biofilme de um reator de leito expandido, amostrado a partir do primeiro dia de operação, até o 65°. dia. O biorreator foi inicialmente inoculado com as linhagens: G4, *Pseudomonas cepacia*, *PKO1*, *P. pickettii* e *Paw1*, *P putida*. Foram obtidos os padrões ARDRA dessas culturas puras e os padrões ARDRA referentes à população inicial do reator, que apresentavam muita semelhança. Porém, no 19°. dia de operação foi permitida a entrada de água subterrânea contendo microrganismos do ambiente. A partir disto, houve uma diferença de padrões ARDRA da população microbiana do reator, mostrando que as linhagens que vieram da água subterrânea prevaleceram em relação às inoculadas. Os autores *(opt.cit.)* ressaltaram também que esse método tem sido usado para examinar a estrutura de comunidades em biorreatores, em nível de espécies, e para verificar a abundância relativa de determinadas linhagens.

WOOD *et al.* 1997 estudaram a abundância da linhagem *Prevotella ruminicola* em ecossistemas anaeróbios do rúmen bovino através do método ARDRA. SMIT *et al.* (1997) utilizaram esse método para verificar o efeito da contaminação do solo por cobre na comunidade microbiana. O método permitiu verificar diferenças na comunidade e para diversidade foi encontrada onde o solo foi contaminado, em relação ao solo não contaminado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Instalações experimentais – Reator anaeróbio de leito fixo (RAHLF)

Foi utilizado um Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), construído em vidro de boro-silicato, com 100 cm de comprimento e cinco cm de diâmetro, 1.995 mL de volume total (volume últil -Vu) e 798 mL de volume de escoamento (Ves), sendo que o Ves = Vu. γ, onde γ = porosidade do leito = 0,4 (40%).

Na parte superior do reator, três pontos (A, B e C) ao longo do mesmo coletaram o gás gerado durante o processo. O leito do reator foi preenchido com lodo imobilizado em matrizes de espuma de poliuretano, nas quais os microrganismos foram inoculados de acordo com metodologia desenvolvida por ZAIAT *et al.* (1994). Os pontos de amostras rotineiras foram a entrada e saída do reator. Para realização das análises ao longo do reator foram utilizados também os pontos 1, 2, 3, 4 e 5.

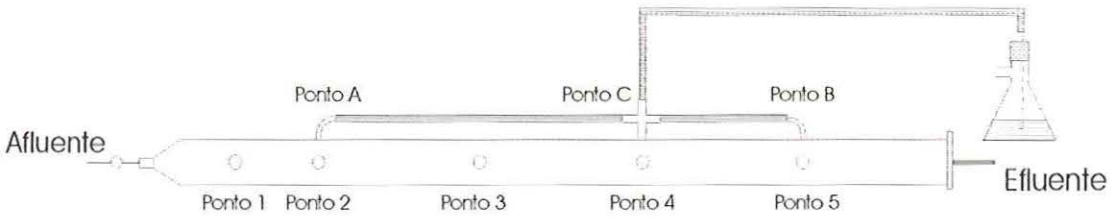


FIGURA 4.1 -Esquema do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), mostrando os pontos de coleta

Fonte: Modificado de ZAIAT *et al.* (1994)

4.1.1 - Inoculação de microrganismos no reator- (RALHF)

Os lodos biológicos que foram usados como inóculo no reator em estudo foram oriundos de um reator UASB aplicado ao tratamento de efluentes da Indústria de Reciclagem de Papel e Papelão de São Carlos, e de um reator UASB operado em escala piloto para o tratamento de esgoto sanitário da EESC-USP. A proporção utilizada de cada lodo foi de 70 e 30 %, respectivamente. O procedimento para a inoculação foi descrito por ZAIAT *et. al.* (1994), no qual a mistura dos lodos foi realizada através de homogeneização manual e o lodo foi peneirado para rompimento dos grânulos em peneira doméstica. Após o procedimento acima, o lodo foi colocado em contato com cubos de espuma de poliuretano de uma e aproximadamente 3 mm de aresta, ficou 12 horas em repouso, na temperatura de 30°C. Após o que drenou-se o líquido e a espuma foi colocada no interior do reator.

4.2 - Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi estabelecido comparando o meio de cultivo de microrganismos descrito por ANGELIDAKI *et al.* (1990) e utilizado por DAMIANOVIC (1997) e por ZINDER *apud*[1] VAZOLLER (1995). Optou-se pelo meio ZINDER acrescido das fontes de carbonos utilizadas por DAMIANOVIC (1997).

4.2.1- Preparação do meio ZINDER

Os substratos orgânicos utilizados foram baseado naqueles empregados nos cultivos microbianos em meio basal segundo ZINDER (ZINDER *et al. apud* VAZOLLER, 1995). Este meio, segundo VAZOLLER (1995), tem a característica de possuir uma composição básica de minerais e pode ser acrescido das fontes orgânicas

[1] ZINDER, S.H.; CARDWELL,S.C.; ANGUISH,T.; LEE,M.; KOCH,M. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digestor: *Methanothrix* sp. as important acetoclastic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 796-807, 1984a

e inorgânicas necessárias ao estudo em questão. O meio ZINDER foi preparado em frasco de Duran de 5.000 mL, nele os componentes foram adicionados de acordo com a Tabela 4.1 e completados com água destilada para um volume final de 3.000 mL. Após homogenização dos componentes, foi introduzido no meio, por 15 minutos, um fluxo de 100% de nitrogênio, por borbulhamento. Posteriomente, fez-se esterilização por autoclavação, durante 20 minutos a 120°C e 15 psi. Os frascos contendo o meio estéril ficaram estocados no escuro até o momento de sua utilização.

TABELA 4.1 - Composição do meio de cultivo ZINDER

Componentes	Quantidades- q.s.p. 1.000 ml de água destilada/ deionizada[1]
NH_4Cl	0,5 g
KH_2PO_4	0,4 g
$MgCl_2.6H_2O$	0,1 g
$CaCl_2.2H_2O$	0,05 g
Solução de resazurina 0,1%	1,0 mL
Solução traço de metais	10,0 mL

Fonte: ZINDER *et al. apud* Vazoller (1995)

1. Água utilizada na preparação de meio de cultivo e soluções, padrão Milli-Q

Previamente a utilização do meio basal, e consequentes adições das demais soluções empregadas para o cultivo microbiano, os meios estocados foram submetidos a troca de atmosfera gasosa, de 100% nitrogênio para uma mistura de 70% de nitrogênio e 30% de dióxido de carbono. A troca foi feita com lavagem da atmosfera original do frasco, utilizando-se vácuo e introdução da mistura gasosa, sob pressurização (pressão dos gases na linha1'- 3kgf/cm^2). O procedimento de lavagem e introdução da mistura gasosa foi realizado até 3 vezes. Ao final, os frascos foram mantidos pressurizados. Antes da introdução das soluções complementares, os frascos foram mantidos sob pressão atmosférica.

4.2.2 - Preparação da solução de traços de metais

A solução traço de metais foi preparada adicionando-se primeiramente o NTA na água Milli-Q, seguindo-se os outros componentes como descrito na Tabela 4.2. O pH foi ajustado para 7,0 com uma solução de 10 M de KOH. A solução traço de metais foi mantida sob refrigeração, em frascos fechados com rolha de borracha, e a retirada de volumes para a preparação do meio foi sob condições de assepsia.

TABELA 4.2- Composição da solução traço de metais-meio ZINDER

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000 mL de água destilada / deionizada
NTA	4,5 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,556 g
$MnSO_4.H_2O$	0,086 g
$COCl_2.6H_2O$	0,17 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,21 g
H_3BO_3	0,19 g
$NiCl_2$	0,02 g
Na_2MoO_4	0,01 g

Fonte: ZINDER et al. *apud* Vazoller (1995)

4.2.3 - Preparação da solução de bicarbonato de sódio

Para a manutenção do pH foi acrescido ao meio uma solução de 10 % de bicarbonato de sódio, preparada e distribuída em frascos de 30 ml, sob fluxo de 100% de nitrogênio. A solução foi esterilizada por filtração sistema Millipore com filtros 0,22 μm de porosidade. Os frascos foram previamente esterilizados e fechados com batoques estéreis de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio e estocados no escuro.

4.2.4- Preparação da solução de vitaminas

A solução de vitaminas foi preparada adicionando os componentes descritos na Tabela 4.3, em 1.000 mL de água Milli-Q. A solução foi preparada sob fluxo de

100 % de nitrogênio e submetida a esterilização por filtração sistema Millipore com filtros 0,22 μm de porosidade. Os frascos foram previamente esterelizados e fechados com batoques estéreis de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio e estocados sob refrigeração. As alíquotas que foram adicionadas foram retiradas, com seringas estéreis, sob condições de assepsia.

TABELA 4.3- Composição da solução de vitaminas

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000 mL de água destilada / deionizada
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina.HCL	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005g
Panteonato de cálcio	0,005 g
Priridoxina.HCL	0,010 g
Vitamina B_{12}	0,0001 g
Ácido lipóico	0,005 g

Fonte:TOUZEL&ALBAGNAC; DUBOURGUIER *apud*[2] VAZOLLER(1995)

4.2.5- Preparação da solução de extrato de levedura

A solução de extrato de levedura a 5% foi preparada e distribuída em frascos de soro sob fluxo de 100 % de nitrogênio, autoclavada por 20 minutos a 120°C e 15 psi, e estocados no escuro.

4.2.6 - Redução do meio de cultivo ZINDER

[2] TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G. Isolation and caracterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology*, 54: 441-5, 1988.
DUBOURGUIER, H.C. Curso de ecologia da digestão anaeróbia. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, São Paulo. 1987.

A redução completa do meio ZINDER foi realizada pela adição de uma solução redutora, mantida em estoque e composta por sulfeto de sódio a 5%, preparada e distribuída em frascos de soro sob fluxo de 100% de nitrogênio, submetida a esterilização por filtração sistema Millipore com filtros 0,22 μm de porosidade e estocada no escuro à temperatura ambiente.

4.2.7 - Preparações das soluções estoques de fonte de carbono

As fontes de carbono que foram utilizadas no trabalho estão descritas na Tabela 4.4, resultando em uma DQO final de aproximadamente 3000 mg/L . As soluções de carbono foram preparadas sob fluxo de 100 % de nitrogênio, autoclavadas por 20 minutos a 120°C e 15 psi, e estocadas sob refrigeração, sob condições de anaerobiose.

TABELA 4.4- Fontes de carbono

Fontes de Carbono	Concentração da solução estoque (Molar)	Concentração final no substrato (mMolar)
Acetato de sódio	2	10
Formiato de sódio	2	20
Glicose	1	2
Metanol[1]	-	40

Obs – [1] A solução alcóolica foi preparada após autoclavação em separado da água destilada e do metanol. Os volumes necessários para a formulação da solução serão retirados com seringas estéreis e transferidos para um frasco estéril, fechado sob atmosfera de 100 % de nitrogênio e estocados em temperatura ambiente, no escuro.

4.2.8 - Preparação da solução estoque de pentaclorofenol

O PCP foi dissolvido em metanol previamente autoclavado por 20 minutos a 120°C e 15 psi em frasco de Duran de 200mL, obtendo-se uma concentração final de 12.000 mg/L. A partir desta solução, alíquotas foram retiradas com uma seringa de 1mL a fim de obter-se a concentração desejada. Esta solução foi estocada no escuro, em *freezer*, e foi utilizada durante todo o trabalho.

4.2.9 - Preparação do Meio de cultivo basal acrescido das fontes orgânicas e demais soluções

O substrato utilizado foi baseado no meio de cultivo ZINDER. O meio basal ZINDER, autoclavado e estocado, foi acrescido de soluções estoque, antes da sua utilização conforme Tabela 4.5.

TABELA 4.5 - Composição do Substrato

Solução	Volume adicionado em mL
Meio basal - ZINDER	q.s.p. 3.000
Bicarbonato de sódio - 10 %	30
Vitaminas	30
Extrato de leveduras - 5 %	1,5
$Na_2S.9H_2O$ - 5 %	15
Acetato de sódio - 2 M	15
Formiato de sódio - 2M	30
Glicose - 1M	6
Metanol	4,8

Obs. Quando a solução de PCP (metanol + PCP) for adicionada no meio, igual volume de metanol foi diminuido do colocado na tabela para manter a mesma concentração de metanol no meio de cultivo.

4.3 - Operação do sistema

O reator foi operado 8 meses, com uma vazão de 31,8 mL/h, o que equivale a um tempo de detenção de aproximadamente 25 h. A operação do reator foi em temperatura controlada de 30°C±1°C. A porosidade do leito foi de aproximadamente 40%, sendo que do volume total 2.000 mL do reator, 800 mL é volume de substrato e 1.200 mL é volume de espuma com microrganismos inoculados.

Foram realizados ensaios com a taxa de carregamento orgânico do afluente constante, 3.000 mg/L, variando-se a concentração de PCP de 2 a 13 mg/L do sistema.

4.3.1 - Análises para o monitoramento do reator

As análises e as freqüências, assim como os pontos de coletas, são apresentados na Tabela 4.6. Para cada concentração de PCP o reator foi operado até atingir o estado estacionário, quando foram realizadas as análises microbiológicas (Tabela 4.7) e os Perfis (análise ao longo do reator).

TABELA 4.6- Análises para o monitoramento do reator e realização de perfis

	Rotinas	Perfis- a c/d conc. de PCP
DQO	2 x sem.- Paf. e Pef.	Paf., P1, P2, P3, P4, P5 e Pef.
pH	2 x sem.- Paf. e Pef.	Paf. e Pef.
Ácidos orgânicos	2 x sem.- Paf. e Pef.	Paf., P1, P2, P3, P4, P5 e Pef.
Metano	2 x sem. PA, PB e PC	PA, PB e PC
Degradação do PCP	2x sem.- Paf. e Pef.	Paf., P1, P2, P3, P4, P5 e Pef.
Fenol	2x sem.- Paf. e Pef.	Paf., P1, P2, P3, P4, P5 e Pef.

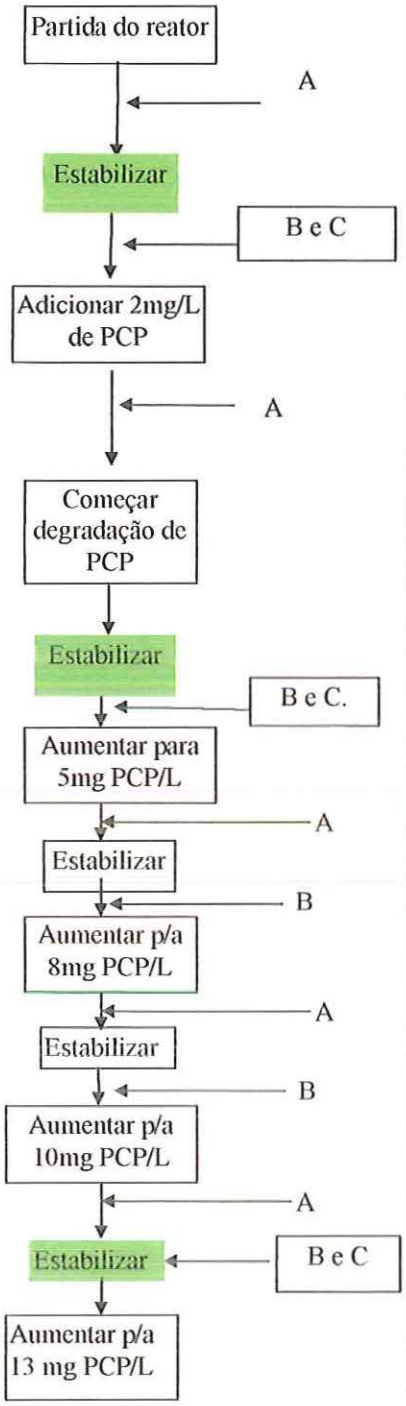
Obs. Paf. e Pef. correspondem a Ponto do afluente e Ponto do efluente, respectivamente e sem.= semanal.

TABELA 4.7- Análises microbiológicas

Análises	Antes de cada troca de concentração
Biologia molecular (PCR com análises do produto, com *slot blot*, ARDRA.	Perfil– 0 mg/L PCP Perfil– 2 mg/L PCP Perfil– 10 mg/L PCP
Microscopia óptica e contraste de fase	Perfis–Todos
Microscopia de fluorescência	Perfis – Todos
Microscopia de varredura eletrônica	Perfis – Todos

EESC - USP Biblioteca Campus de S. Carlos

4.3.1 - Esquema mostrando o desenvolvimento do experimento



A e B significam duas séries de análises:

A- Análises de rotina, para o monitoramento do reator. O objetivo dessas análises é acompanhar o funcionamento do reator e verificar possíveis choques toxicológicos com as mudanças na concentração do PCP.

B- Análises ao longo do reator (perfil), após estabilização deste com a nova concentração de PCP. E caracterização das morfologias microbiológicas.

A e B foram:

A: DQO afluente e efluente; pH afluente e efluente; Conc.CH_4, ácidos voláteis afluente e efluente; Conc.PCP afluente e efluente e Conc. de Fenol afluente e efluente.

B: Variação ao longo do reator nos cincos pontos (definido com perfil) das análises de morfologias microbiológicas, microscopias em geral, e nos mesmos pontos, conc. de ácidos voláteis, variação da DQO, variação da conc. de metano, variação da degradação do PCP, de fenol, de pH.

C: Análises de Biologia molecular:

1°.Amostra: Sem PCP (verificar predomínio da população).
2°.Amostra : Após a adição de PCP.
3°.Amostra: Com concentração de 10 mgPCP/L .

FIGURA 4.2 - Fluxograma do experimento mostrando o esquema de análises

4.3.3 - Sistema de coleta e estocagem de amostras

As amostras da parte líquida do reator foram retiradas com seringa nos pontos efluente (Pef.), afluente (Paf.), P1, P2, P3, P4 e P5, ao longo do reator, para análises de DQO, pH, ácidos voláteis, fenol e PCP.

As análises de DQO, pH, foram realizadas imediatamente após a coleta. As amostras de ácidos voláteis, fenol e PCP foram armazenadas em frasco escuros, tampados e estocadas em freezer (-18°C), para posterior análises.

As amostras de biomassas para microscopia óptica, contraste-de-fases e fluorescência foram rapidamente diluídas em frascos com água fervida e atmosfera dentro destes foi trocada com fluxo de nitrogênio e imediatamente submetidas a microscopia. As amostras para microcopia eletrônica foram submetidas imediatamente ao tratamento adequado.

As amostras que foram analisadas através das técnicas de Biologia Molecular foram armazenadas em frasco da seguinte forma:

1. Ao natural
2. Em solução de etanol-75%
3. Em solução de etanol-100%

As amostras do biogás foram coletadas em seringa e injetadas imediatamente no cromatógrafo.

4.4 - Procedimentos para análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram DQO, pH e as análises cromatográficas e estão descritas a seguir.

4.4.1- Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram para gás metano, ácidos voláteis, fenol e PCP.

- Cromatografia de gás metano

As análises dos gases formados pelo metabolismo microbiano foram realizadas por cromatografia a gás. Foi retirado 0,5 mL em volume da atmosfera do coletor de gás e injetado no cromatógrafo.

A curva de calibração foi traçada segundo VAZOLLER (1995) em que, os resultados de concentração de gás metano foram expressos em mmoles, e o padrão de metano foi de (97±1%). Diferentes volumes foram injetados no cromatógrafo. A curva de calibração foi traçada utilizando-se os pontos da área medida pelo cromatógrafo e o volume injetado expresso em mmoles. As correções nas CNTP foram consideradas. As equações referentes as curvas estão apresentadas nos anexos.

- Cromatografia de ácidos voláteis e fenol

Os procedimentos utilizados para análise de ácidos voláteis e fenol, por cromatografia gasosa (CG), foram desenvolvidos no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC / USP. De acordo com as autores(as)[3] e executantes tais análises foram realizadas seguindo o protocolo a seguir:

A extração dos ácidos voláteis e fenol foi realizada sem prévia destilação das amostras. Ao volume de 2 mL da amostra foram acrescido 1,0 g de NaCl, 70 µL de solução de ácido crotônico (700 mg/L), 0,5 mL de uma solução de 1 M H_2SO_4 e e 0,6 mL de éter etílico. Esta mistura foi então agitada por 1 minuto no agitador de tubos (vórtex), na velocidade máxima, e centrifugada por 1 minuto a 3.000 rpm observando-se a formação de duas fases distintas.

A fase superior corresponde a fase etéria ou orgânica, na qual estão dissolvidos os ácidos voláteis e o fenol. Uma alíquota de 1 µL desta fase deve ser injetada no cromatógrafo e em aproximadamente 30 minutos tem-se o cromatograma correspondente.

---

[3] Maria Angela Talarico Adorno e Profa. Elizabeth de Mattos Moraes (Comunicação pessoal)

- Condições do aparelho para as análises de ácidos e fenol:

1) cromatógrafo HP 6890, com injetor *split/splitless* e detector de ionização de chama;

2) coluna HP INNOWAX, 30 m / 0,25 mm de diâmetro interno / 0,25 μm de espessura de filme, T injetor = 250°C; razão de split = 1:20, volume injetado = 1μl;

3) T detector = 300°C, fluxo de ar sintético = 300 ml / minutos, fluxo de H_2 = 30 ml / minuto, fluxo de gás auxiliar (N_2) = 33 ml / minuto, range 1.

4) T forno = 100°C (3 min.) - 180°C (5 minutos), 5°C/ minutos, fluxo do gás de arraste na coluna (H_2) = 2,0 ml / minuto.

- T = temperatura

Para quantificar os ácidos voláteis foram utilizado o método do padrão interno. Para tanto, foi usado o ácido crotônico como padrão interno.

- ***Cromatografia do Pentaclorofenol e seus metabólitos***

A metodologia utilizada foi desenvolvida por DAMIANOVIC (1997). Consta de obtenção da curva padrão, a qual deve ser realizada com concentrações conhecidas de padrões de PCP, TCP e DCP no substrato em que serão avaliadas. Portanto, neste trabalho as curvas padrão foram obtidas a partir de soluções de meio ZINDER (apenas o meio basal), com concentrações conhecidas de 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L dos seguintes padrões: 2,5-diclorofenol; 3,4-diclorofenol; 2,4,6 – triclorofenol; 2,3,6–triclorofenol; 2,3,4 – triclorofenol; 2,4,5 – triclorofenol e o pentaclorofenol. Sendo que o padrão interno [4] foi usado o 2,4 dibromofenol.

As amostras foram extraídas da seguinte forma: adicionou-se a 4 mL de amostra a aproximadamente 50μL de ácido sulfúrico, ajustando-se o pH para 2. Posterirormente acresce-se 1g de NaCl e 2 ml de hexano. Agitou-se por 1 minuto no agitador de tubos (vórtex) em velocidade máxima e, finalmente, centrifugou-se por 1 minuto a 3.000 rpm. Após a extração 1 mL da amostra foi derivatizada pela adição de 1 mL de uma solução etéria de diazometano (recém preparada), cuja função é

[4] Profa. Elizabeth de Mattos Moraes (Comunicação pessoal)

promover a esterificação dos clorofenóis, facilitando sua separação e detenção na coluna do cromatógrafo. Esta mistura foi deixada em repouso por aproximadamente 30 minutos (em tubos fechados) e então foi submetida à evaporação, sob fluxo de nitrogênio gasoso, até se obter o volume de 1 mL. Deste, apenas 1 μL foi injetado no cromatógrafo.

-Condições do aparelho para as análises dos clorofenóis:

1) Cromatógrafo HP 5890, com injetor split/splitless e detector de captura de elétrons;
2) Coluna SPB ™.S (sulpeco) 30 m / 0,25 mm de diâmetro interno / 0,25 μm de espessura de filme;
3) T injetor = 280°C; injeção splitless, volume injetado = 1μL;
4) T detector = 300°C, fluxo de gás auxiliar N_2 = 30 mL/ minutos;
5) T forno = 50°C (2 minutos)- 70°C (0 minutos), 5°C / minutos- 200°C (5 minutos), 8°C/ minutos.

Para quantificação de PCP foi utilizado o método do padrão interno. Sendo este o 2,4 dibromofenol.
Obs: Na extração deve-se adicionar o padrão interno antes de agitar.

4.4.2- Demanda química de oxigênio – DQO

As análises de DQO foram realizadas de acordo com método descrito no *Standard Methods for the examination of water and wasterwater* (1992).

4.4.3 - Análises de pH

As análises de pH foram realizadas através do método potenciométrico.

4.5- Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram divididas em exames microscópicos e análises de Biologia Molecular. Pretendeu-se verificar as morfologias microbianas predominantes e compará-las com os resultados obtidos nas análises de Biologia Molecular para identificação microbiana em meios complexos.

4.5.1 - Exames microscópicos

Os exames microscópicos foram realizados sob luz comum, contraste de fase e fluorescência, bem como sob varredura eletrônica .

- Microscopia óptica, contraste de fase e fluorescência

Para os exames microscópicos sob luz comum e contraste de fase, as amostras de microrganismos imobilizadas foram retiradas da matriz de espuma, diluídas em água Milli-Q e fervida por alguns minutos para a expulsão do oxigênio. As amostras foram colocadas entre lâmina e lamínula. Também foi utilizada a técnica de preparação de lâmina descrita pela DSM (1991)[5] *apud* VAZOLLER (1995). Nesta técnica, uma solução de ágar liquefeito a 2% é disposta na superfície da lâmina, e após solidificação a alíquota da amostra é derramada sobre a superfície gelatinosa. Uma lamínula é colocada sobre o espécime a ser analisado. Segundo VAZOLLER (1995), esta técnica possibilita que o excesso de água da amostra seja absorvido pela gelatina, otimizando a qualidade da observação.

Os exames sob microscopia de fluorescência utilizando a lâmpada ultra-violeta, foram realizados colocando-se as amostras diretamente sobre a lâmina e cobrindo-as com lamínula. Através da microscopia de fluorescência é possível indicar a presença de microganismos metanogênicos, os quais fluorescem na cor azul-esverdeado quando a radiação ultra-violeta incide sob sua célula, uma vez que possuem uma coenzima, denominada F_{420}, que lhe concede essa característica.

---

[5] DMS – Deutsche Sammlung von Mikrrorganismen und Zellkulturen GMBH-DMS. Curso: Scientific services of culture collections – The DMS experience. Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello". Campinas, SP, 1991.

- Microscopia eletrônica de varredura

As amostras analisadas por microscopia de varredura foram submetidas a técnica aplicada por VARESCHE *et al.* (1997) em biofilme imobilizados em matrizes de poliuretano.

As amostras foram fixadas em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,3) contendo 2,5% de glutaraldeído por 12 h a 4 °C. Após fixação foram lavadas três vezes em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,3) e desidratada gradualmente por sucessivas imersões em soluções de concentrações crescentes de etanol (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % e 95%).

Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em etanol 100% (grau PA). E permaneceram 10 minutos em cada lavagem. Depois foram imersas em hexamethydisilasane por 30 segundos. Secaram-se as amostras por 2 horas a 30°C. E foram, então, coladas em um suporte com cola de prata e submetidas ao banho de pó de ouro. E, analisadas usando um microscópio Zeiss digital DMS-960.

4.5.2 - Análises de biologia molecular

Foram coletadas as amostras nos cinco pontos do reator e estas foram armazendas em freezer a - 80°C, para posteriores análises da seqüência do gene 16S rDNA por PCR reação em cadeia da polimerase), com utilização do produto desta reação para posterior análise com endonucleases de restrição (ARDRA) e análises em *slot blot* nos tempos: 0,0 ; 2,0 e 10,0 mg/L de PCP. Como mostra a Figura 4.3 .

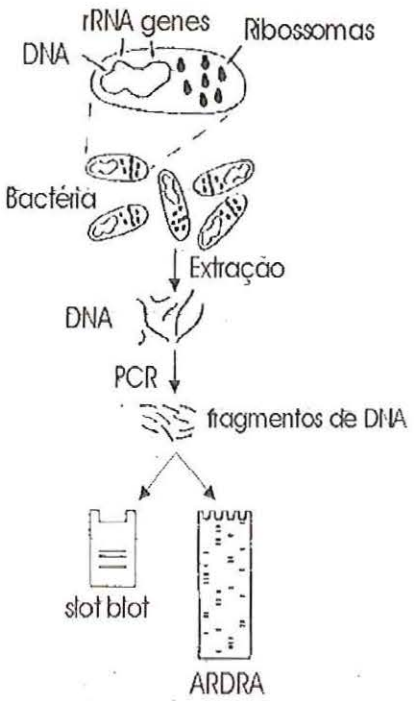


FIGURA 4.3 - Estratégias para o estudo do DNA da população presente na amostra do reator por PCR, ARDRA, *Slot-blot*
Fonte: Modificado e adaptado para o trabalho em questão de MUYZER (1995)

4.5.2.1 - Extração de DNA

Foram realizadas análises preliminares para avaliar dois métodos de extração de DNA. Um dos métodos foi o descrito por SMALLA (1995) e o outro método foi o descrito por NG. *et al.* (1994). Optou-se pelo segundo por mostrar bons resultados de extração de DNA e por ser mais simples de executar.

As amostras foram armazenadas em *freezer* até o uso, quando foram descongeladas e homogeneizadas em vórtex. Foi usado o tampão TESC, pH= 8,3. Usou-se o princípio do congelamento e descongelamento para a lise das células, assim as amostras foram colocadas em *freezer* a - 20°C, por 16 horas e, após descongelar, adicionou-se 50 μL de DMSO para ajudar na lise das células. Deixou-se 1 minuto em temperatura ambiente, misturou-se em vórtex por 3-5 minutos e adicionou-se 5 mL de

fenol:clorofórmio (1:1, v/v). Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi removida e 300 μL de acetato de sódio 3M (pH= 5,6) foi adicionado antes da precipitação do DNA com 6 mL de etanol. Finalmente, foi usado tampão TE (pH = 8,3) para ressuspender o *pellet*. Observação: o fenol foi substituído por uma solução de guanidina e clorofórmio- álcool iso-anílico (24:1).

4.5.2.2 - Purificação do DNA

Através de testes preliminares foi verificado a necessidade de purificação das amostras. Para isso, foi utilizado o sistema Wizard DNA Clean-Up, que é composto por uma coluna aclopada a uma seringa, em que coloca-se 1 mL de resina aquecida a 37°C e 100 μL da amostra de DNA. Passa-se a mistura pela coluna. Lava-se a coluna com 2 mL de isopropanol 80% e centrifuga-se a coluna por 20 segundos e deixando-se secar por 10 minutos em temperatura ambiente. Transfere-se a coluna para um tubo de eppendorf e coloca-se 50 μL de água aquecida a 60-70°C direto na coluna e centrifuga-se por 20 segundos para o DNA que estava preso a coluna ser trasnferido para o *eppendorf* junto com a água. Repete-se novamente este passo.

O DNA, então, é submetido a eletroforese junto com padrões de DNA, em um gel de agarose (já corado com brometo de etídio) 1,0 % a 80 V, 310 mA e fotografado. O padrão de DNA usado foram DNA lambda (Promega), concentração 460 μg/mL e foi diluído para 46ng/ μL, 92ng/ μL, 132ng/ μL. E foram aplicados 5 μL tem-se 230ng, 460ng, 690ng de DNA. O marcador de peso molecular usado foi o Kilobase da Pharmacia, concentração de 0,5 μg/ μL, diluído 10x = 50 ng/ μL.

4.5.2.3 - Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Foram realizadas reações de amplificação (PCR) da região 16S do rDNA da população microbiana amostrada. Para isto foram utilizados *primers* específicos para a região do DNA descrita acima, porém, estes *primers* denominados universais. São os seguintes:

- 27f - [5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'] posição na porção inicial do rRNA 16S, *forward* e

- 1525 r - [5'AAGGAGGTGWTCCARCC -3'] , posição na porção final do rRNA 16S, *reverse*.

-Protocolo para a amplificação do DNA :

Cada reação de PCR continha: 0,25 µL de cada solução de *primer*, 0,2 µL de DNTP, 0,5 µL de $MgCl_2$ a 25mM, 2,5 µL de tampão da *taq.*, 0,8 µL de *taq.*, correspondendo a 4U/ reação, 3 µL de DNA e 17,5 µL de H_2O, para um volume final de 25µL de solução. Esta reação foi então colocada no termociclador com um programa de: 1 ciclo a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos: (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos), 1 ciclo final de extensão do *primers* a 72°C por 3 minutos e finalizar a 4°C. O produto desta reação foi submetido a eletroforese em um gel de agarose (já corado com brometo de etídio) 1,0 % a 80 V, 310 mA e fotografado.

4.5.2.4 - PCR específico para o Domínio *Archaea*

Foram realizadas reações de amplificação (PCR) da região 16S do rDNA da população amostrada, porém com especificidade para o Domínio *Archaea*. Para isto foram utilizados *primers* específicos para a região do DNA descrita acima e somente para este Domínio. Estes *primers* são denominados específicos para *Archaea*. São os seguintes:

- 1 AF - [TCYGKTTGATCCYGSCRGAG]
- 1100 RA - [TGGGTCTGGCTCGTTG]

-Protocolo para a amplificação do DNA :

Cada reação da PCR continha: 0,25 µL de cada solução de *primer*, 0,2 µL de DNTP, 2,5 µL de tampão da *taq.*, 0,8 µL de *taq.* (correspondendo a 4U/ reação), 3 µL de DNA e 17,5 µL de H_2O, para um volume final de 25µL de solução. Esta reação foi então colocada no termociclador com um programa de: 1 ciclo a 95°C por

2 minutos, 30 ciclos (94°C por 1 minuto, 52°C por 1minuto e 72°C por 3 minutos), 1 ciclo final de extensão dos *primers* a 72°C por 3 minutos e finalizar a 4°C. O produto foi submetido a eletroforese em um gel de agarose (já corado com brometo de etídio) 1,0 % a 80 V, 310 mA e fotografado.

4.5.2.5 - Análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA)

O DNA amplificado (produto da reação anteriormente apresentada) foi digerido com uma bateria de enzimas de restrição com sítio de reconhecimento para 4 bases, estas enzimas cortam a fita de DNA quando encontram com esses sítios. As enzimas usadas foram: *Sau*3A que corta o DNA como esquema seguinte: (↓GATC e ↓CTAG), *Alu I* (AG↓CT e TC↓GA), *Dde I* (C↓TNAG e GANT↓C), *RSA* (↓TA e ↓AT).

Protocolo para a digestão do DNA:

Cada DNA amplificado na reação da PCR foi submetido a esta análise da seguinte forma: uma alíquota de 10 μL do produto do PCR (sendo este volume anteriormente testado), 2 μL de tampão de enzima, 1 μL de enzima, 2 μL de H_2O, para um volume final de 15 μL de solução. Esta reação foi incubada por 2 horas a 37°C e o produto foi submetido a eletroforese em um gel de agarose (já corado com brometode etídio) 1,5% a 5 V/cm e fotografado.

4.5.2.6 - Hibridação *Slot- Blot*

Para a realização da hibridação *slot-blot* foi necessário a realização prévia da PCR, a qual aumentou exponencialmente a quantidade de DNA inicialmente extraído das amostras microbianas retiradas do reator. Utilizou-se também as sondas descritas a seguir e os procedimentos necessários para o uso destas:

a) Sondas de oligonucleotídeos

As sondas de oligonucleotídeos foram sintetizadas pela GIBCO-BRL e enviadas liofilizadas ao laboratório.

As sondas utilizadas foram as seguintes:

S-*-Univ-1392-a-A-15

S-D-Arch-0915-a-A-20

S-F-Mbac-0310-a-A-22

S-O-Msar-0860-a-A-21

S-*-Srb-0385-a-A-18

S-D-Bact-0338-a-A-18

b) Reconstituição das sondas

As sondas lifiolizadas foram inicialmente reconstituídas com TE e depois marcadas com digoxigenina. O tubo de *eppendorf* contendo as sondas foi centrifugado por alguns segundos e, então, adicionou-se um volume apropriado de TE (10mM tris-Hcl, ph= 8,0 e 1mM EDTA), e misturando-se por dois minutos, seguido-se uma agitação em vórtex por 15 segundos.

Para cada sonda, foi calculado o volume necessário de TE para se ter uma concentração final de 200 μM utilizando a massa em μg's* e o peso molecular em μg/mole indicados no laudo do fornecedor, no caso, a GIBCO. O volume de TE foi calculado através da fórmula abaixo :

$$M = \frac{massa \quad (g)}{P.M \quad .Vol \quad .(l)} \qquad (1)$$

As sondas reconstituídas passaram a concentração teórica de 200 μM. Em seguida, foram quantificadas espectrofotometricamente adicionando-se uma alíquota ressuspensa do oligonucleotídeo em um volume final de 1.000 μL de água, misturando no vórtex por alguns segundos e foi realizada leitura de absorbância a 260 nm. A concentração passou assim para μg/mL calculada através da fórmula a seguir:

$$Conc. = Abs.(260nm) x O.D. x F.D. \quad (2)$$

em que o O.D. é fornecido no laudo e o F.D. é o fator de diluição utilizado no procedimento acima.

c) Cálculo das concentrações das sondas

Como as sondas devem ser usadas em uma concentração aproximada de 20 μM, foi utilizado, para tanto, em um volume apropriado da solução estoque, que foi diluída para 100 μL, e esta concentração foi então testada no gel a 4%, utilizando-se como padrões diluições de *primers* de concentrações conhecidas de 5μM, 10μM, 15μM e 20μM. O gel foi preparado utilizando uma mistura na concentração 3:1 de agarose tipo *low melting* para agarose comum corada com brometo de etídio. O gel foi submetido a eletroforese com tempo de corrida de 35 minutos. Desta forma foi calculado o volume da solução de oligonucleotídio já hidratado a ser utilizado na reação de marcação das sondas com digoxigenina usando a fórmula seguinte:

$$C_1 . V_1 = C_2 . V_2 \quad (3)$$

em que, C_1 será estimado pelo sinal obtido no gel, C_2 é a concentração final esperada (segundo Tabela 4.8 = 5μM) e V_2 é o volume final da reação (50μL).

d) Reação de marcação das sondas

As sondas foram marcadas com digoxigenina como descrito em BOEHRINGER MANNHEIM / BIOCHEMICA, e a título de esclarecimento está apresentado no APÊNDICE - 2 resumido na Tabela 4.8.

e) Estimativa das concentrações das sondas marcadas

As sondas marcadas foram diluídas como descrito em BOEHRINGER MANNHEIM / BIOCHEMICA, e a título de esclarecimento está apresentado na Tabela 4.9, APÊNDICE - 2.

Destas diluições utilizou-se 1μL, que foi aplicado sob a membrana para visualizar o sinal produzido, utilizando-se como padrão uma solução de DNA de concentração conhecida, conforme descrito em BOEHRINGER MANNHEIM / BIOCHEMICA (Tabela 4.10 - APÊNDICE - 2).

Destas diluições foram colocadas 1μL de cada sob a membrana molhada com 2SSC, faz-se o *cross-link* para fixar o DNA com a membrana molhada e empregou-se o procedimento de detecção usando quimioluminescência descrita mais adiante para estimativa da concetração das sondas.

Após a sonda reconstituída, marcada com digoxigenina e com uma concentração estimada, procedeu-se a hibridação *slot blot* propriamente dita. O protocolo usado para a fixação do DNA na membrana foi cedido gentilmente por Yoko[6]. Este procedimento posssibilitou a fixação do DNA ou o produto da PCR na membrana, o qual foi hibridizado com as sondas marcadas.

f) Protocolo para fixação do DNA na membrana

O protocolo orienta que o produto da PCR seja diluido para 1.000 μL em TE e fervido por 10 minutos, seguindo imediatamente para o gelo. A membrana de nylon deve ser lavada em 10 x SSC e colocada no sistema de *slot blot*.

Após montar a membrana de nylon no sistema-*manifold* para *slot*, deve-se aplicar 0,5 mL de 10 x SSC em cada cavidade e a bomba de vácuo deve ser utilizada para otimizar a passagem da solução. Em seguida deve-se adicionar um volume de 50 μL de 20 x SSC a 50 μL do produto da PCR diluído e desnaturado que deve estar no gelo e aplica-se um volume de 100 μL nas cavidades do sistema *manifold* e liga-se a bomba de vácuo. Depois de todo o volume das amostras terem passado pela membrana, desliga-se a bomba e adiciona-se 0,5 mL de 10 x SSC e liga-se novamente a bomba. Repetindo a operação. No final deixa-se a bomba ligada por mais 5 minutos ficando retido apenas o DNA na membrana. Retira-se a membrana do sistema, coloca-se sobre papel de filtro umidecido com solução de desnaturação por 20 minutos. Transfere-se a membrana para papel de filtro umedecido com solução de

---

[6] Edmilson-Yoko, Departamento de Genética- UNICAMP, 1998. COMUNICAÇÃO PESSOAL

neutralização e deixa-se por 10 minutos. Finalmente coloca-se a membrana sobre papel de filtro e faz-se o *cross-link* em UV ou 3 minutos no UV do transiluminador, fixando-se o DNA na membrana.

g) Hibridação usando sondas marcadas com digoxigenina (DIG)

Para esta hibridação segue-se o protocolo descrito no manual BOEHRINGER- MANNHEIM (1998), no qual, após o procedimento anterior realiza-se a pré-hibridação. Nesta fase, as membranas foram inseridas nas garrafas de hibridação e foi adicionado 3 a 4 mL do tampão de hibridação (N'laurilsarcosina 0,1%, SDS 0,02%, solução bloqueadora 10X-1%) sem adicionar a solução com a sonda marcada. Para tanto, o tampão de hibridação foi pré-aquecido e colocado em contato com a membrana por 2 horas a 40°C.

A solução bloqueadora consistiu em dissolver em 10% o reagente Bloqueador (vial 11- BOEHRINGER- MANNHEIM) em tampão1 com agitação constante a 65°C, autoclavar e estocar a 4°C. O tampão 1 consistiu em uma solução de ácido maléico (0,1M, NaCl- 0,15M ajustando o pH para 7,5 com NaOH sólido).

Transcorridas as 2 horas, a solução usada na pré-hibridação foi descartada e adicionou-se a solução de 3 mL da solução de hibridação com 3 μL da solução da sonda marcada, sendo que esta foi anteriormente desnaturada fervendo por 10 minutos e colocando-a no gelo. Esta solução também foi pré-aquecida em temperatura de hibridação (40°C) e deixou-se hibridizando por 14 a 18 horas no forno de hibridação.

Terminada a hibridação as membranas foram lavadas duas vezes com SSC 6X (30 mL SSC 20X, 100 μL de SDS 10% e 70 mL de água) por 15 minutos a temperatura ambiente, e novamente lavadas por 1 hora com a mesma solução.

Finalmente, uma foi realizada uma lavagem estrigente com a mesma solução por 3 minutos em temperatura de lavagem de cada sonda (a solução de SSC 20X consiste em 175 g de NaCl, 88 g de citrato de sódio, completar com água para 1L de solução e ajustou o pH = 7,0 com NaOH e autoclavar). A temperatura de lavagem de cada sonda foi calculada de acordo com a Tabela 4.11.

TABELA 4.11 - Cálculo das temperaturas de lavagem estringente de cada sonda

Sonda	*TM - 5 °C*
S-D-Arch-0915-a-A-20	74°C - 5 °C = 69°C
S-*-Srb-0385-a-A-18	76 °C - 5 °C = 71°C
S-*-Univ-1392-a-A-15	65°C -5 °C = 60 °C
S-D-Bact-0338-a-A-18	71 °C - 5 °C = 66 °C
S-O-Msar-0860-a-A-21	77°C - 5°C = 72°C
S-F-Mbac-0310-a-A-22	73°C - 5°C = 68 °C

Obs.: TM foi obtido do fornecedor

h) Detecção do sinal da hibridação usando quimioluminescência

Esta detecção apresenta o sinal obtido pela hibridação e este deve ser compatível com a quantidade de DNA presente na amostra relativo a quantidade de microrganismos que aquela sonda representa. Para esta detecção segue-se o protocolo da BOEHRINGER- MANNHEIM.

i) Protocolo para a detecção do sinal por quimioluminescência na membrana hibridizada

Para esta detecção as membranas foram lavadas rapidamente (1-5 minutos) em tampão de ácido maléico (tampão 1). Depois foram incubadas por pelo menos 30 minutos em cerca de 100 mL de tampão 2 (solução bloqueadora 10X diluída a 1% em tampão 1). Em seguida, uma solução fresca do anticorpo conjugado anti-DIG -AP (vial 3) foi preparado em tampão 2 (2 μL de anti-DIG para 20 ml de tampão 2) então, incubou-se as membranas por 30 minutos com 20 mL desta solução. Em seguida removeu-se a solução do anticorpo conjugado e lavou-se 2 vezes por 15 minutos cada com 100 mL do tampão de ácido maléico (tampão 1) e equilibrou-se as membranas por 2-5 minutos em 20 mL do tampão de detecção (tampão 3). O tampão 3, chamado de tampão de detecção foi constituído por tris-HCL 0,1 M, NaCL 0,1 M, $MgCl_2$ 50 m M e pH = 9,5 .

Em seguida, diluiu-se o substrato da fosfatase alcalina, CSPD (vial 5), na concentração de 1:100 em tampão 3 e incubou-se as membranas seladas num saco de

hibridação por 5 minutos em 1-2 mL de solução de CSPD. Deixou-se escorrer o excesso de líquido e colocou-se a membrana rapidamente em papel de filtro (obs.: deixar o DNA para cima) Whatman 3 MM. A membrana úmida foi selada num saco de hibridação e incubou-se por 5-15 minutos a 37°C.

Finalmente, a membrana hibridizada foi expostas por 15-20 minutos em temperatura ambiente em filme de raio-X ou utilizando filme polaroid 667 que foi queimado pela digoxigenina da sonda marcada.

j) Revelação do filme de raio-X

Após o procedimento descrito anteriormente, o filme foi revelado de acordo com procedimento descrito pelo fornecedor, o qual, orientou para mergulhar o filme na solução reveladora sem mexer por 5 minutos, em cabine escura. Em seguida, lavou-se em água corrente por 30 segundos e mergulhou-se então na solução fixadora por 7 minutos mexendo sempre. Após tal procedimento, lavou-se em água corrente por 30 segundos e deixou-se secar.

l) Cálculo da porcentagem final de cada grupo populacional analisado

Após estes procedimentos, obteve-se o resultado final da hibridação, o qual foi submetido em um scanner (*Eagle-eye*) que estimaria as porcentagem de cada banda através do sinal obtido no raio-X, representando a quantidade estimada da população detectada pela sonda específica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão apresentados a seguir compreendem, em primeiro lugar, a avaliação das condições do reator horizontal de leito fixo operado sob condições mesofílicas, temperatura média de 30°C, por cerca de 220 dias, recebendo quantidades crescentes de PCP. O reator foi considerado como um microcosmo capaz de promover, nas condições estudadas, a seleção de tipos microbianos, principalmente metanogênicos, o que suportou a hipótese da tese ora apresentada, na qual se procurou avaliar o papel desse grupo microbiano na degradação do PCP. Produção de metano ocorreu durante todo o período de operação. A análise dos resultados considera, primordialmente, a composição microbiana que se estabeleceu no sistema, revelando a presença de grupos predominantes com base nos estudos sobre morfologia, comportamento metabólico e práticas em técnicas moleculares para caracterização de gêneros e espécies microbianas.

Técnicas de cromatografia foram usadas para medir a concentração de metano, ácidos orgânicos voláteis e PCP. Os resultados estão apresentados em números absolutos, porém deve-se considerar que, no caso da cromatografia, os valores foram obtidos em um determinado intervalo.

Em segundo e terceiro lugares são apresentados os resultados sobre os exames microscópicos realizados, isto é, a caracterização das morfologias microbianas predominantes em cada ponto do reator, constatada em cada concentração de PCP estudada e, terceiro, as análises moleculares das amostras, realizadas previamente, logo após a primeira introdução de PCP no sistema, e no final do experimento, com a maior concentração de PCP estudada.

5.1- Origem do inóculo do reator anaeróbio horizontal de leito fixo

O inóculo do reator horizontal de leito fixo (RAHLF) foi constituído por uma mistura de dois lodos. Como descrito no capítulo Material e Métodos, 70% oriundos de um reator UASB de indústria de reciclagem de papel (São Carlos S/A Indústria de Papel e Embalagens) e 30% de um reator UASB operado em escala piloto para o tratamento de esgotos sanitários (Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP). As amostras estudadas foram coletadas diretamente dos reatores, através de torneiras para descarte de lodos biológicos e acondicionadas em galões plásticos de 5L, previamente lavados com soluções aquosa de detergente *Extran* (Merck) e enxaguadas com água destilada. Os galões foram armazenados em freezer a - 18°C por 24 horas antes dos experimentos.

O reator UASB da indústria de reciclagem de papel estava sob condições reduzidas de operação[1], ou seja, estava sendo operado aquém de sua capacidade máxima, e o reator UASB operado em escala piloto encontrava-se em regime, sob condições metanogênicas. O exame microscópico dos lodos revelou marcante diversidade de morfologias microbianas. O lodo do reator UASB da indústria de reciclagem de papel apresentou, sob microscopias óptica, de contraste de fase e de epifluorescência, bacilos não fluorescentes de vários tamanhos, prováveis bactérias acidogênicas, bacilos curvos em formatos de víbrios, em geral relacionados a tipos de bactérias redutoras de sulfato, e filamentos longos, organizados em feixes, semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp., indicando a existência de atividade metanogênica acetoclástica. Além disso, sob exame microscópico para avaliar a ocorrência de autofluorescência do lodo, foram observados poucos bacilos fluorescentes, cuja morfologia realçou, segundo as orientações do Manual BERGEY (1989), prováveis grupos metanogênicos hidrogenotróficos, como os gêneros *Methanobrevibacter* sp. e *Methanobacterium* sp. Em 1996, BOLAÑOS (1996), estudando o enriquecimento de lodos e a degradação de PCP em frascos-reatores, em escala de laboratório, verificou morfologias semelhantes nos lodos de mesma origem.

---

[1] Informações da Indústria - São Carlos S/A Indústria de Papel e Embalagens

O lodo do reator UASB operado com esgotos sanitários em escala piloto revelou o predomínio de microrganismos em forma de filamentos semelhantes ao gênero metanogênico *Methanosaeta* sp. Foram também observados alguns cocos, diplococos e agrupamentos de cocos fluorescentes, sendo possível relacionar alguns aglomerados celulares, a partir das descrições do Manual BERGEY (1989), ao gênero *Methanosarcina* sp. A presença de bacilos delgados e cocobacilos fluorescentes foi também constatada, podendo-se supor a ocorrência de atividade hidrogenotrófica, em geral devida aos gêneros *Methanobacterium* sp. e *Methanobrevibacter* sp, cujas morfologias são semelhantes as respectivamente observadas.

Os tipos microbianos verificados nas amostras são comuns a lodos anaeróbios. ROBINSON *et al.* (1984) examinaram a estrutura de biofilmes de oito reatores anaeróbios tratando resíduo fresco de suínos diluído em água e observaram grande número de microrganismos metanogênicos microscópico de auto-fluorescência. Duas morfologias foram predominantes, uma semelhante ao gênero *Methanosaeta* sp. e outra ao gênero *Methanosarcina* sp. VARESCHE *et al.* (1997), estudando a composição microbiana de um reator anaeróbio de leito fixo horizontal com configuração igual à empregada na presente pesquisa e aplicado a estabilização de um substrato composto basicamente por glicose, verificaram a presença de agrupamentos de células semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp. e bacilos fluorescentes associados ao metabolismo hidrogenotrófico.

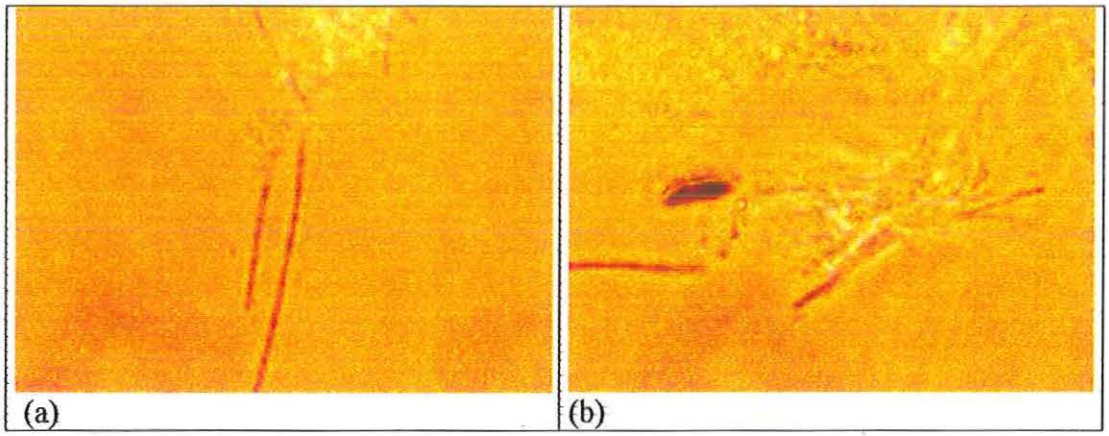
O meio suporte do RAHLF usado nesta pesquisa foi a espuma de poliuretano cortada em cubos com arestas de aproximadamente 3mm. Nos últimos anos, no LPB-EESC-USP, vem sendo realizada uma série de pesquisas sobre o tratamento anaeróbio de diferentes resíduos em RAHLFs preenchidos com esse tipo de espuma.

No caso da degradação anaeróbia de clorofenóis, o trabalho de DAMIANOVIC (1997) é um dos exemplos fundamentais. Em seu trabalho, DAMIANOVIC (1997) testou a mistura de lodos de origem semelhante à empregada na presente pesquisa a fim de avaliar a degradação de PCP em concentrações de até 8mg/L, sob condições metanogênicas. Os lodos foram imobilizados de acordo com ZAIAT *et al.* (1994), como já referido para a tese em discussão.

Baseados nos resultados de DAMIANOVIC (1997), os experimentos ora apresentados buscaram avaliar as condições para a degradação de maiores concentra-

ções de PCP, aprimorando-se o monitoramento dos tipos microbianos. A mistura de lodos foi previamente peneirada com a finalidade de adequação do tamanho das partículas. Para a imobilização dos lodos foi utilizado um recipiente de 5000mL, contendo 20,0g de espuma e 500mL da mistura de lodos cujo conteúdo de SSV era da ordem de 25g/L. A mistura de lodo e espuma permaneceu em repouso por 12 horas, à temperatura controlada de 30°C, antes do preenchimento do RAHLF. Após drenagem do excesso de líquido, a espuma impregnada de lodo foi então introduzida no reator. Todos os procedimentos utilizados na inoculação dos microrganismos foram semelhantes aos de ZAIAT *et al.* (1994) e DAMIANOVIC (1997) o conteúdo de sólidos suspensos voláteis foi praticamente o mesmo. O meio suporte permitiu uma boa imobilização dos microrganismos, com baixa perda de células, somente primeiros 15 dias de operação, verificada através da diferença de valores entre a $DQO_{filtrada}$ e DQO_{bruta}.

ZAIAT *et al.* (1994) comentaram a qualidade de imobilização de lodos anaeróbios em suporte de espuma de poliuretano, ressaltando que não foi observado arraste dos microrganismos durante a operação do reator. Em 1989, O'REILLY & CRAWFORD (1989) também imobilizaram microrganismos em espuma de poliuretano e alginato de cálcio para a degradação de PCP, porém utilizaram culturas puras de *Flavobacterium* sp. diluídas em meio de cultura. Nesse caso, o poliuretano foi a melhor matriz de imobilização em relação ao alginato de cálcio devido ao seu forte mecanismo de retenção e sua característica de não transferir oxigênio. A Figura 5.1 apresenta algumas morfologias microbianas encontradas na mistura dos lodos utilizados como inóculo.



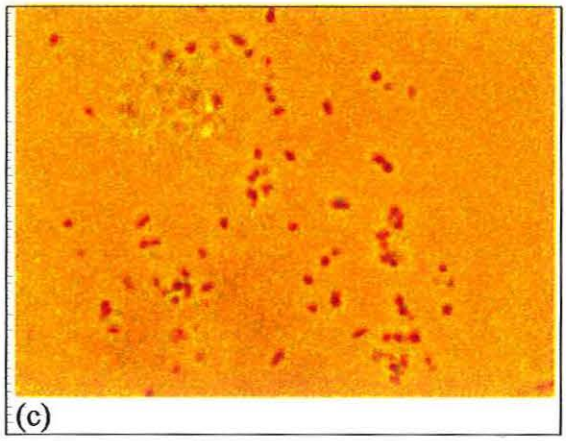


FIGURA 5.1 – Fotomicrografias referentes à mistura dos lodos, sob microscopia de contraste de fase (aumento de 1240x). (a) Feixe de células formadoras de filamentos relacionadas ao gênero *Methanosaeta sp.*. (b) Célula formadora de filamento relacionada ao gênero *Methanosaeta sp.* (c) Células em formato de bacilos curvos, retos, cocos e alguns diplococos

5.2 – Operação do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)

O reator RAHLF foi operado por 218 dias sob carga orgânica constante de 3000mg de DQO/L do meio de cultivo contendo os ácidos acético e fórmico e metanol, variando-se temporalmente apenas as concentrações de PCP, de 2, 5, 8, 10 e 13 mg/L. As condições de operação foram baseadas no trabalho de DAMIANOVIC (1997) como já mencionado, mas alterações significativas foram introduzidas, tais como adição de concentrações mais elevadas de PCP, utilização de inóculo sem adaptação prévia ao PCP e composição do meio de cultivo, fundamentalmente pela adição do metanol.

O meio de cultura para a operação do sistema foi o meio basal ZINDER, empregado por LARIZZATI (1997) no estudo sobre a degradação anaeróbia de PCP em frascos-reatores operados sob condições descontínuas, em escala de laboratório. A decisão em utilizar-se um meio de cultura que diferiu do usado por DAMIANOVIC (1997) ocorreu pela necessidade de maior controle de pH durante a operação, bem como pela constatação no trabalho de LARIZZATI (1997) de que a presença de metanol favoreceu à degradação de PCP em concentrações de até 5mg/L.

As fontes de carbono escolhidas foram baseadas em trabalhos de pesquisas anteriormente realizados sobre a degradação anaeróbia de PCP. A adição da glicose como fonte orgânica para os microrganismos foi baseada em resultados como os obtidos por DAMIANOVIC (1997) e sobretudo daqueles de HENDRIKSEN *et al.* (1992). HENDRIKSEN *et al.* (1992) estudaram a influência de fontes de carbono na desalogenação redutiva de PCP por lodos granulados anaeróbios e verificaram que glicose estimulou a velocidade de degradação de PCP. No trabalho (*opt.cit.*), dois reatores anaeróbios foram testados, diferindo apenas na alimentação com e sem glicose, e concentração de PCP da ordem de 1500 μg/L. Ao final de 61 dias de experimento o reator alimentado com glicose apresentou eficiência de remoção de PCP de 99,8%. Na ausência de glicose, a remoção de PCP foi da ordem de 50% no mesmo período. Certamente, pode-se afirmar que glicose foi fonte de equivalentes redutores para a desalogenação do composto, ou fonte energética para o crescimento de microrganismos que, provavelmente, foram capazes de desalogenar o PCP.

O uso de acetato foi também baseado em estudos de degradação de PCP em reatores anaeróbios alimentados com essa fonte de carbono, como os de NICHOLSON *et al.* (1992) e de WU *et al.* (1993).

O emprego do metanol para a solução de PCP foi baseado em LARIZZATI (1997), que utilizou esse composto como fonte energética para o crescimento de metanogênicas, especialmente do gênero *Methanosarcina* sp.

van EEKERT *et al.* (1998) relataram a importância das fontes de carbono empregadas na degradação de compostos clorados, que permitiram aos microrganismos metanogênicos capacidade de desalogenar compostos clorados através de reações mediadas por cofatores como corrinóides, vitamina B_{12} e F_{430}. Segundo os autores (*opt.cit.*), as concentrações desses cofatores são fortemente dependentes do tipo de fonte energética usada para o crescimento celular. Tal fato foi exemplificado no metabolismo do gênero *Methanosarcina barkeri*, que pode produzir de 40 a 70% de seus corrinóides quando alimentadas com metanol. Em seus ensaios, os autores (van EEKERT *et al.*, 1998) verificaram a não ocorrência da fase lag na rápida degradação de tetracloreto de carbono por lodo metanogênico não adaptado. Foi observado também que a degradação de tetracloreto de carbono com lodo autoclavado, o que su-

portou a hipótese de que cofatores como vitamina B_{12} estão envolvidos no processo de desalogenação de compostos clorados.

A temperatura empregada no presente trabalho seguiu as orientações de WU *et al.* (1993), DAMIANOVIC (1997) e LARIZZATI (1997) e, segundo os autores citados, bons resultados foram obtidos na temperatura de 30°C.

A colonização microbiana da matriz de poliuretano observada na figura 5.2.1 mostra que os microrganismos fixaram-se firmemente à espuma, observando-se também a formação do biolfilme microbiano no 42° dia de operação do reator.

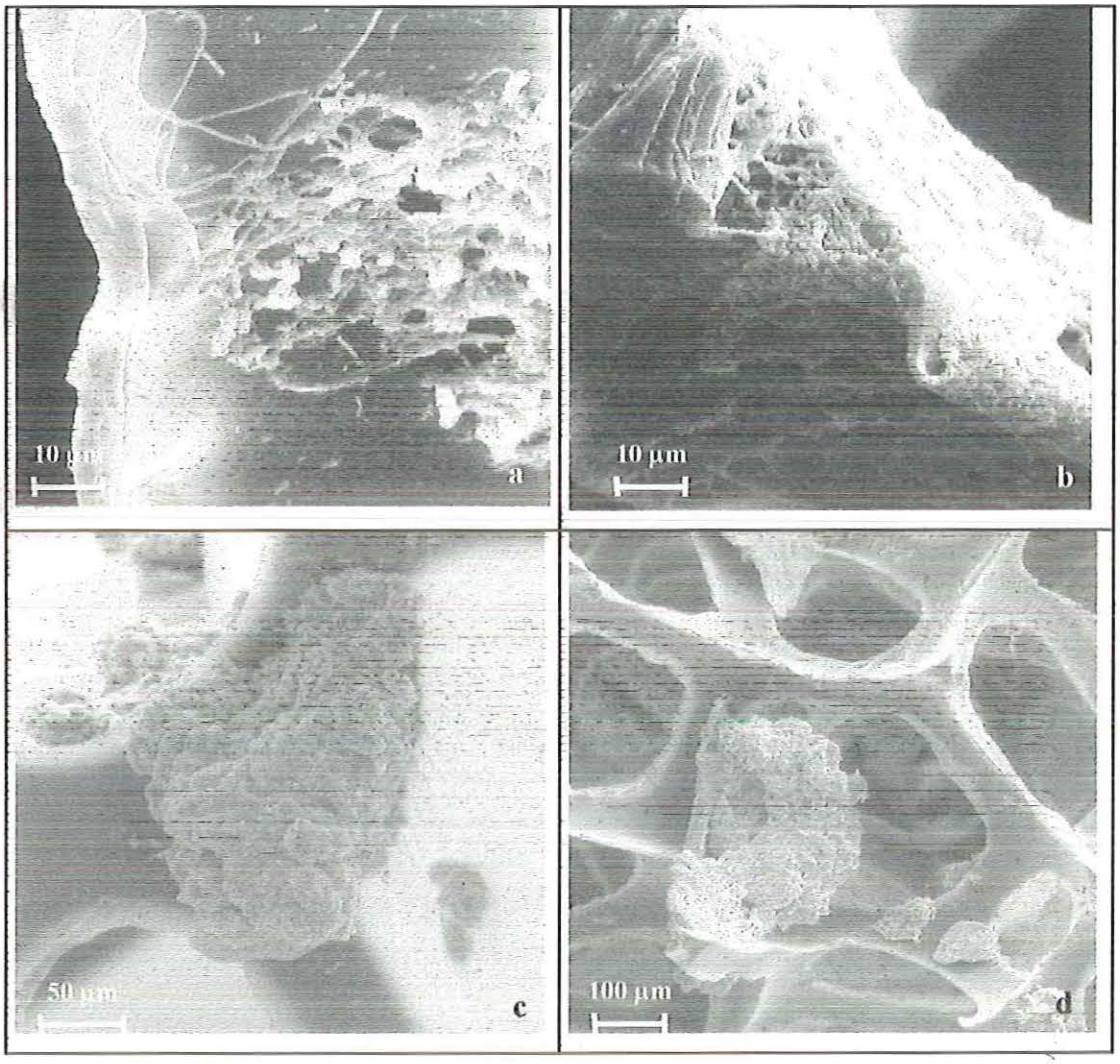


FIGURA – 5.2.1 – Três estágios diferentes na formação do biofilme na matriz de poliuretano no 42°. dias de operação do reator : a e b – Células aderidas a espuma de poliuretano formando um tapete, c – formação de micro-grânulo aderido à espuma, d - micro-grânulo na espuma de poliuretano

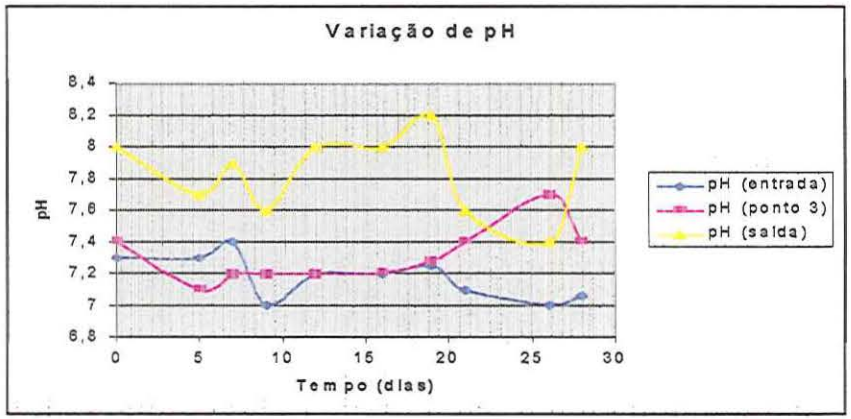
5.2.1- Estabelecimento das condições metanogênicas no RAHLF

O reator foi operado por aproximadamente 20 a 30 dias quando atingiu um estado estacionário, estabelecido pelas remoções de DQO e de ácidos orgânicos voláteis, produção de metano. A Figura 5.1.1 apresenta o comportamento dos valores dos parâmetros DQO, pH, ácidos orgânicos voláteis e metano nos primeiros trinta dias de operação do reator, antes da adição de PCP.

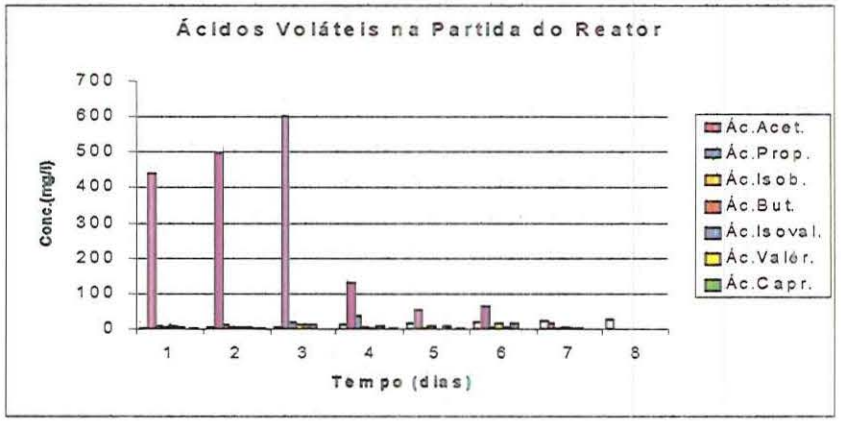
A Figura 5.1.1 a apresenta a remoção de DQO em relação ao tempo, podendo-se verificar que, a partir do 20° dia de operação, a eficiência em relação à DQO de entrada foi cerca de 90%. Na mesma Figura, esquema b, observa-se que o sistema apresentou um bom controle do pH , uma vez que as variações de pH foram baixas, considerando-se entrada, interior e saída do reator. O pH no interior foi analisado através de amostras coletadas no ponto 3, mantendo-se praticamente constante, em torno de 7,4. Os valores de pH indicaram que não houve acúmulo de ácidos orgânicos voláteis já que o pH de entrada, cerca de 7,2, sofreu um pequeno aumento para 7,4 , que se manteve constante no interior do reator. Na saída do sistema, após a estabilização das condições do reator, o aumento do pH foi atribuído ao consumo total dos ácidos orgânicos voláteis a partir do quarto dia de operação (Figura 5.1.1 c).

A Figura 5.1.1 c apresenta a variação dos teores de ácidos orgânicos voláteis. Em relação ao ácido acético, pode-se observar um período inicial de nove dias de possível absorção e baixíssima utilização. Segue-se um período em que o consumo do acético é completo sob concentração afluente de 600mg/L. Os demais ácidos podem ser provenientes da degradação da glicose ou de metabólitos celulares. Após 13 dias de operação, em que a produção de metano atingiu valores da ordem de 0,039 mmoles/L – o que corresponde a 76% de metano no ponto A (Figura 5.1.1d), os ácidos orgânicos voláteis foram rapidamente consumidos. Nesse tempo, a metanogênese se estabeleceu. A Figura 5.1.1 d apresenta o comportamento da concentração de metano nos pontos A, B e C. No ponto A, primeiros 52 cm do reator, os maiores valores foram determinados. As Tabelas referentes aos valores apresentados na Figura 5.1.1 estão apresentadas no Anexo A e as equações referentes às curvas de calibração do metano e dos ácidos orgânicos estão no Anexo B. A Figura 5.1.1 apresenta os parâmetros DQO, pH, ácidos orgânicos voláteis e metano nos primeiros trinta dias de operação do reator.

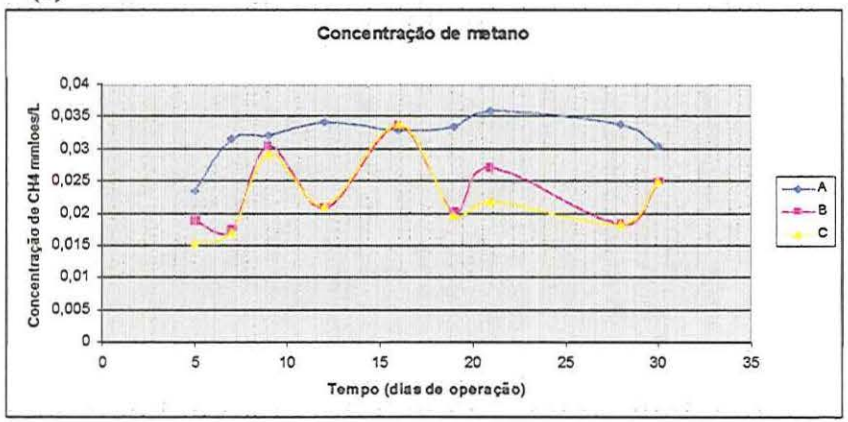
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 5.1.1 – Comportamento dos parâmetros DQO, pH, ácidos orgânicos voláteis e CH_4 nos primeiros trinta dias de operação do reator

Gráfico (a) - Concentração da DQO em função do tempo de operação de operação.

Gráfico (b) - Comportamento do pH na entrada, ponto 3 e saída do reator.

Gráfico (c) - Comportamento dos ácidos orgânicos voláteis no efluente, onde os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 correspondem ao tempo de operação de 2, 7, 9, 16, 21, 26 e 30 dias, respectivamente.

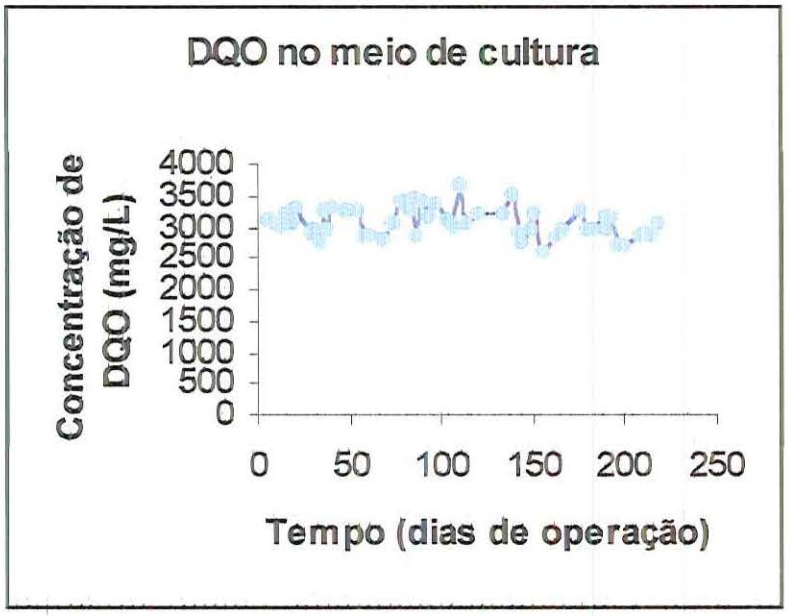
Gráfico (d) – Comportamento da concentração de CH_4, medida nos pontos A, B e C do reator, em mmoles/L.

De forma geral, verificou-se um discreto aumento na concentração do metano, caracterizando o estabelecimento de uma população metanogênica, além do desaparecimento dos ácidos orgânicos voláteis, leve elevação do pH e queda da DQO.

De acordo com BALDOCHI (1990), as concentrações de ácidos voláteis orgânicos refletem o balanceamento das reações bioquímicas mediadas pelas populações acidogênicas e acetogênicas, responsáveis pela produção dos ácidos orgânicos voláteis, e pelas metanogênicas, responsáveis pelo consumo do ácido acético, até o sistema atingir o equilíbrio.

5.2.2 – Operação do sistema RAHLF na presença de PCP

O reator foi operado por 218 dias consecutivos, em temperatura próxima a 30°C, com carga orgânica em torno de 3000 mgDQO/L (Figura 5.2.1A), divididos em períodos determinados pela concentração de PCP adicionada (Figura 5.2.1B) ao meio de cultivo. As concentrações de PCP foram acrescidas após o 72° dia de operação, iniciando-se com 2mgPCP/L e nos 133° , 175°, 190° e 207° dias, as adições foram, respectivamente, de 5,0, 8,0, 10,0 e 13,0mgPCP/L. As amostragens para o monitoramento dos perfis (nos 5 pontos de amostragens apresentados na Figura 4.1 do capítulo de Material e Métodos) foram realizadas imediatamente antes de cada alteração da concentração de PCP.



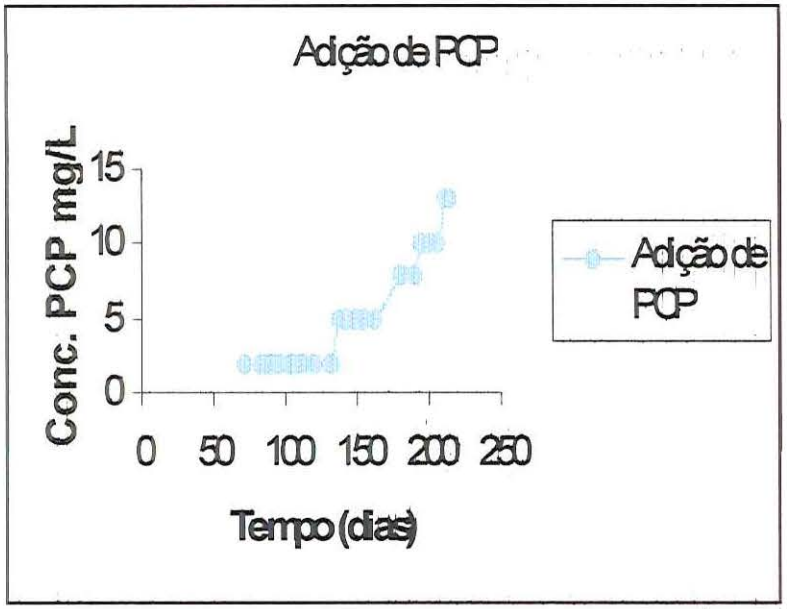


FIGURA 5.2.1 - (a) Concentração de DQO adicionada ao reator, mgDQO/L em relação ao período de operação; (b) Períodos das diferentes adições de PCP

A adição de PCP no sistema não interferiu no arranjo do biofilme formado, como pode ser observado na Figura 5.2.2, que apresenta o biofilme encontrado após a introdução desse organoclorado no 120° dia de operação do reator.

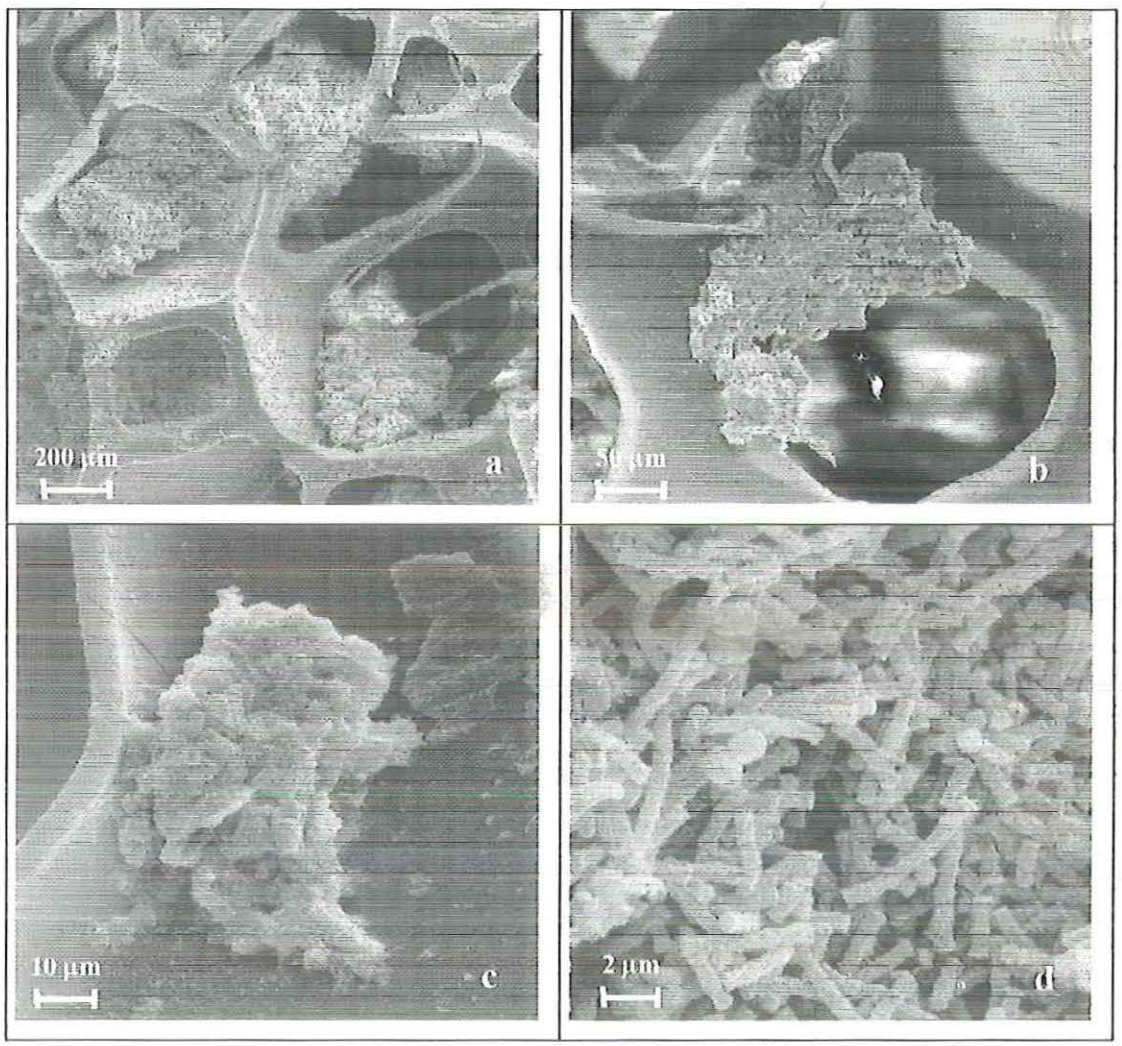


FIGURA – 5.2.2 – Diferentes estágios na formação do biofilme na matriz de poliuretano após a adição de PCP, no 120° dia de operação do reator : a, b e c – Três diferentes tamanho de micro-grânulos aderidos na espuma de poliuretano e d - células observadas na superfície do micro-grânulo

É possível observar, através da Figura 5.2.3, que a carga orgânica referente à DQO de entrada foi quase totalmente degradada na primeira terça parte do reator. Nota-se que as adições de PCP não provocaram efeitos inibitórios no sistema e também durante todo o experimento o sistema apresentou boas condições operacionais, sem caminhos preferenciais de escoamento e, portanto, sem ocorrência de curto-circuito no reator, como indicado por DAMIANOVIC (1997). Tais resultados podem ser atribuídos à forma de coleta de gás realizada neste trabalho, já que DAMIANOVIC (1997) citou a dificuldade de separação do biogás, com conseqüentes problemas operacionais.

As amostras para a realização dos perfis de DQO, ácidos orgânicos voláteis , fenol e PCP, foram coletadas através de uma agulha inserida na tampa de silicone em cada ponto e o procedimento foi por gotejamento. Este procedimento necessitou de um intervalo de tempo de aproximadamente vinte minutos para cada amostra, que foi coletada em frasco de vidro, tipo antibiótico, e armazenas em freezer, com exceção apenas das amostras de DQO que foram realizadas imediatamente.

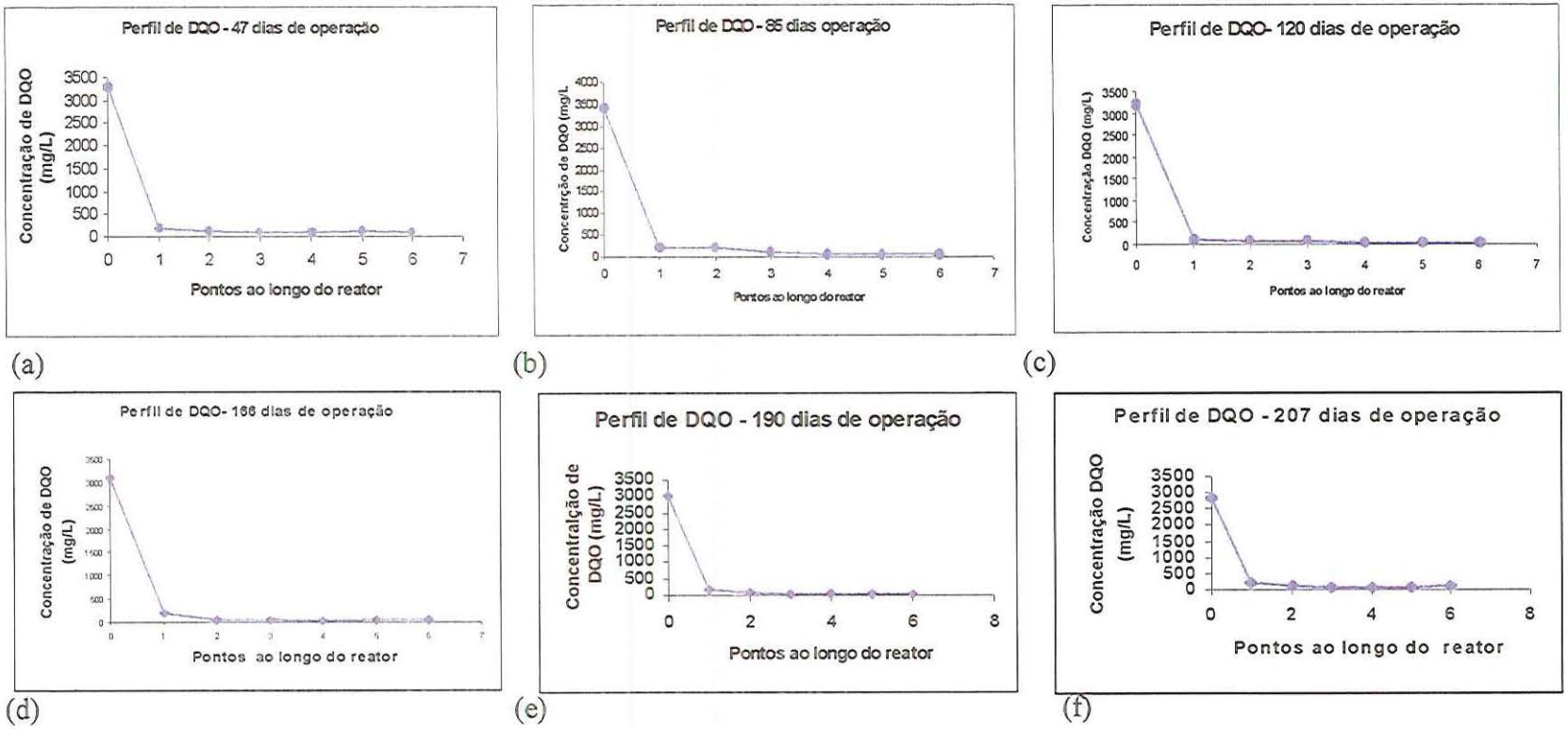


FIGURA 5.2.3 – Perfis de DQO (a): no 47° dia de operação, sem adição de PCP. (b) : no 85° dia de operação, logo após adição de 2mgPCP/L no meio de cultura. (c) : no 120° dia de operação com meio de cultura contendo de 2mgPCP/L. (d) : no 166° dia de operação com meio de cultura contendo 5mgPCP/L. (e) : no 190° dia de operação com meio de cultura contendo 8mgPCP/L. (f) : no 207° dia de operação com meio de cultura contendo 10mgPCP/L

As concentrações de ácidos voláteis observadas nos perfis permitiram, da mesma forma que as de DQO, verificar que toda a matéria orgânica foi degradada na parte inicial do reator, sem acúmulo de ácidos orgânicos voláteis. A Figura 5.2.4 apresenta a variação das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis ao longo do reator, quando submetido a concentrações crescentes de PCP (Tabelas 8.14 a 8.18 do Anexo E). Observa-se que o PCP não causou efeito inibitório, pois os ácidos orgânicos voláteis foram consumidos no início do reator de forma homogênea em todos os perfis realizados, indicando que nessa parte do reator, provavelmente, concentra-se uma população microbiana metanogênica responsável pelo consumo das fontes de carbono adicionadas, acetado, formiato e metanol.

O consumo total dos ácidos orgânicos voláteis pode indicar que a população metanogênica, ou de alguma forma uma população bacteriana estreitamente relacionada às arqueas metanogênicas, provavelmente degradaram tais ácidos e utilizaram os elétrons gerados na desalogenação redutiva de PCP. MOHN & KENNEDY (1992) usaram formiato como doador de elétrons na desalogenação redutiva de PCP. NICHOLSON *et al.* (1992) constataram que o acetato mediou a desalogenação redutiva do PCP por um consórcio metanogênico. WU *et al.* (1993) observaram a mineralização total do PCP em consórcio metanogênico usando metanol, ácido acético, propiônico e butírico. HOLLINGER & SCHUMACHER (1994) apresentaram o formiato e o acetato como substratos promissores para o enriquecimento de microrganismos promotores da desalogenação redutiva.

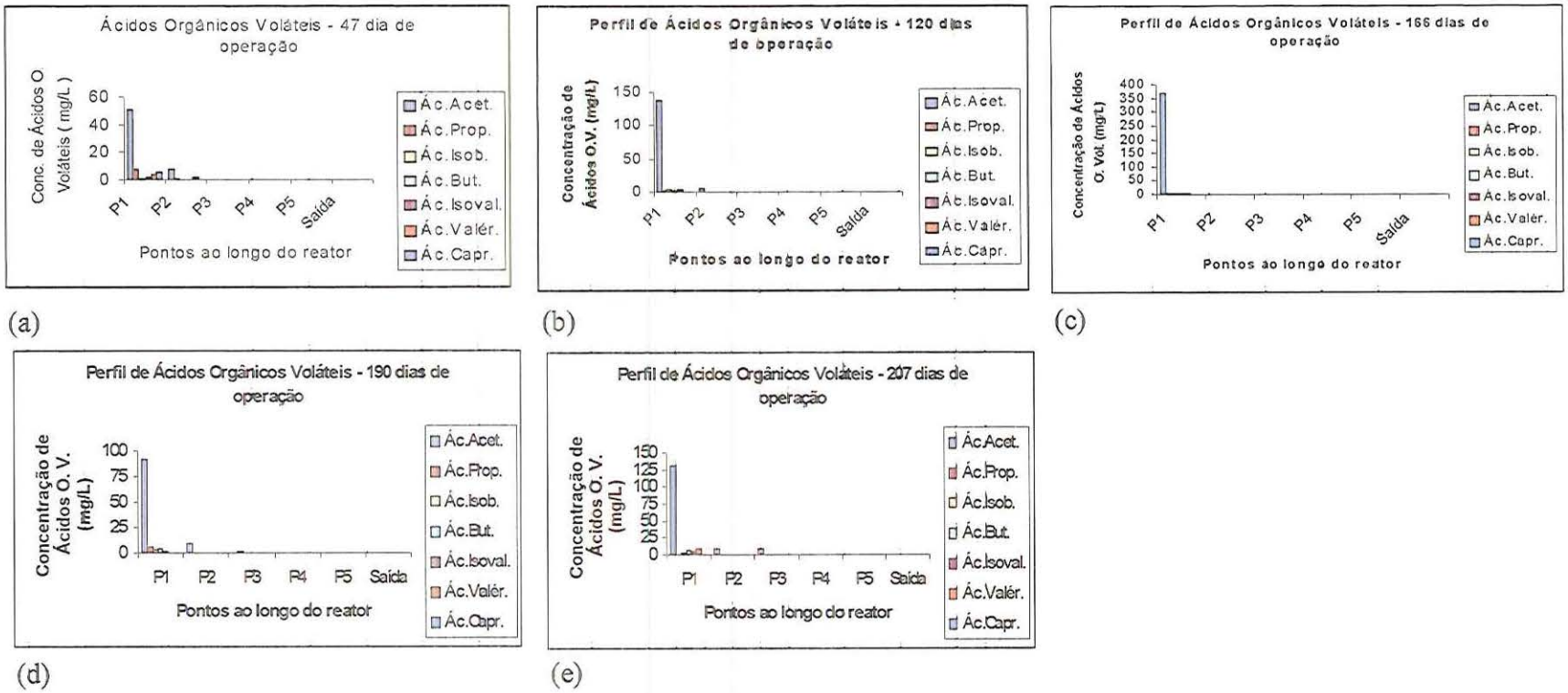


FIGURA 5.2.4 Perfis de Ácidos Orgânicos Voláteis- (a): no 47° dia de operação sem adição de PCP. (b) : no 120° dia de operação, em meio de cultura contendo 2mgPCP/L. (c) : no 166° dia de operação, em meio de cultura contendo 5mgPCP/L. (d) : no 190° dia de operação, em meio de cultura contendo 8mgPCP/L (e) : no 207° dia de operação, em meio de cultura contendo 10mgPCP/L

A Figura 5.2.5 apresenta o comportamento dos valores dos clorofenóis ao longo do reator e nas diferentes concentrações de PCP. As Tabelas com o valores referentes aos gráficos estão apresentadas no Anexo – E. Analisando-se os perfis de concentração de PCP verifica-se que o composto desapareceu na parte inicial do reator. Os metabólitos TCP e DCP e seus isômeros não foram detectados, ou em mínimas concentrações, abaixo do limite de detecção do método analítico usado.

A rota de degradação do PCP não foi determinada, mas autores como MIKSEEL & BOYD (1986), WU *et al.* (1993) e KENNES *et al.* (1996) utilizando ^{14}C, observaram que consórcios metanogênicos foram responsáveis pela mineralização de PCP a $^{14}CH_4$ e $^{14}CO_2$. LÉPINE *et al.* (1996) utilizando ^{14}C verificaram que a mineralização do fenol por consórcio metanogênico originou 68% de metano. WU *et al.* (1993) citam também que a degradação de fenol originou os ácidos capróico (que degrada para butírico), acético, succínico (que degradam para propiônico) e propiônico. Tal fato, provavelmente, pode explicar a presença desses ácidos, ainda que em concentrações muito baixas, e a ausência do fenol, não detectado na parte inicial do reator.

O fato do PCP ter sido degradado totalmente até o primeiro ponto de coleta do reator, somado ao aumento do gás metano, considerando que os valores de matéria orgânica permaneceram constantes, podem indicar que a população microbiana prevalecente, no caso, a população metanogênica, (*Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e *Methanospirillum* sp.) deve estar envolvida nas reações de degradação do PCP, com formação de metano. FATHEPURE & BOYD (1988) e MIKESELL & BOYD (1990) atribuíram à cultura do gênero *Methanosarcina* sp. a capacidade de desalogenação redutiva de compostos alifáticos clorados. WU *et al.* (1993) e JUTEAU *et al.* (1995) em trabalhos com grânulos e biofilme metanogênicos que degradavam PCP, observaram que as morfologias predominantes foram *Methanobacterium* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. Morfologias semelhantes foram obtidas por DAMIANOVIC (1997) e LARRIZZATI (1998) trabalhando em reatores anaeróbios que degradaram PCP. Considerando também o fato da introdução do PCP no sistema não inibir a população metanogênica e o conhecimento de que tais populações podem participar

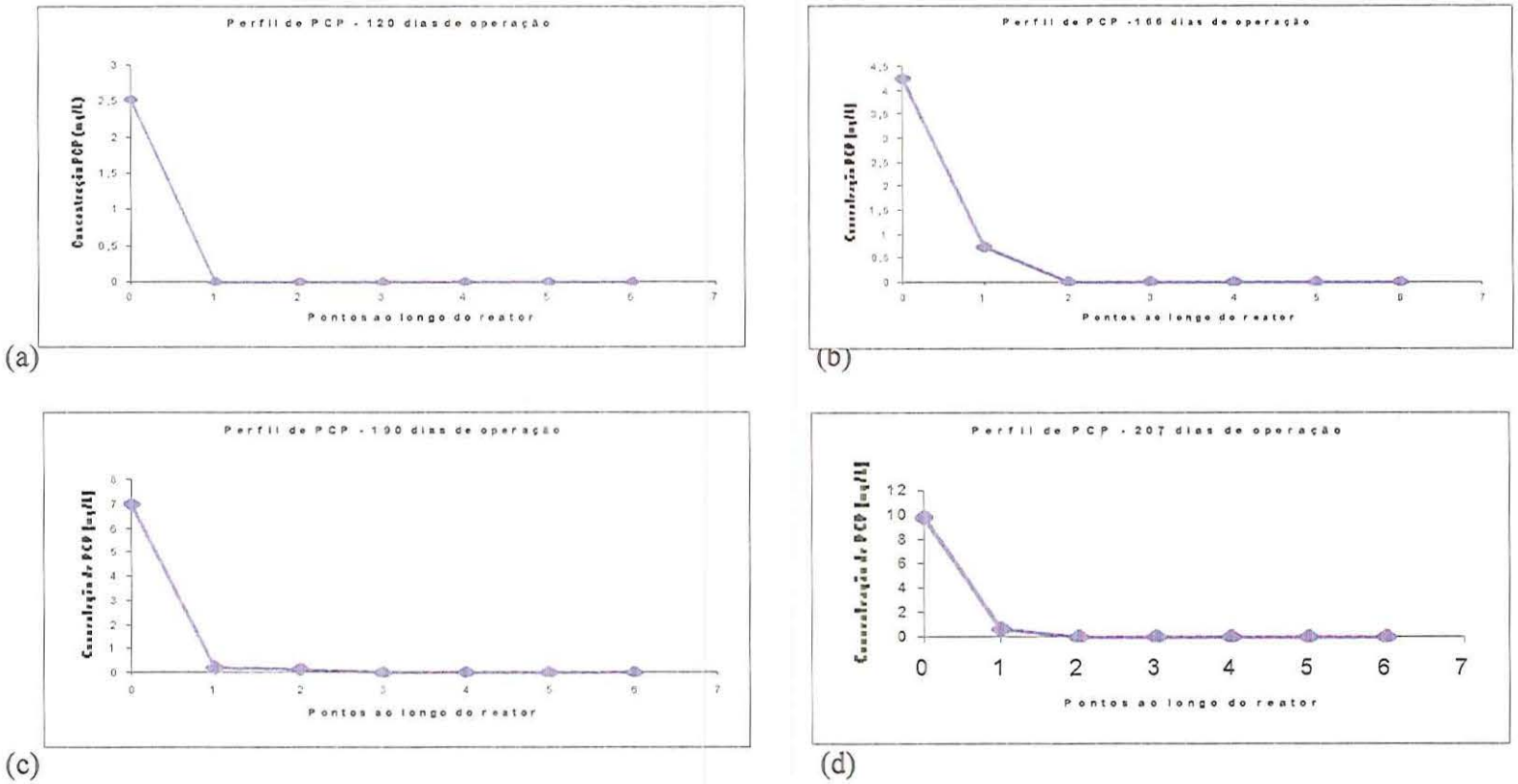


Figura 5.2.5: Perfis de PCP (a): no 120° dia de operação, com afluente contendo 2,0mgPCP/L. (b) : no 166° dia de operação, com afluente contendo 5,0mgPCP/. (c) : no 190° dia de operação, com afluente contendo 8,0mgPCP/L. (d) : no 207° dia de operação, com afluente contendo 10,0mgPCP/L

quer diretamente, através de reações específicas, ou indiretamente, através de reações não-específicas mediadas por cofatores como vitamina B_{12} e F_{430} descritas por van EEKERT *et al.* (1998) e também, ensaios com BESA inibindo a metanogênese e cessando a desalogenação realizados por YE *et al.* (1995) vêm fortalecer a hipótese que esta população seja bioquimicamente capaz de degradar PCP, levando-o a metano e dióxido de carbono, o que explicaria o aumento de gás metano obtido neste trabalho como apresenta a Figura 5.2.6.

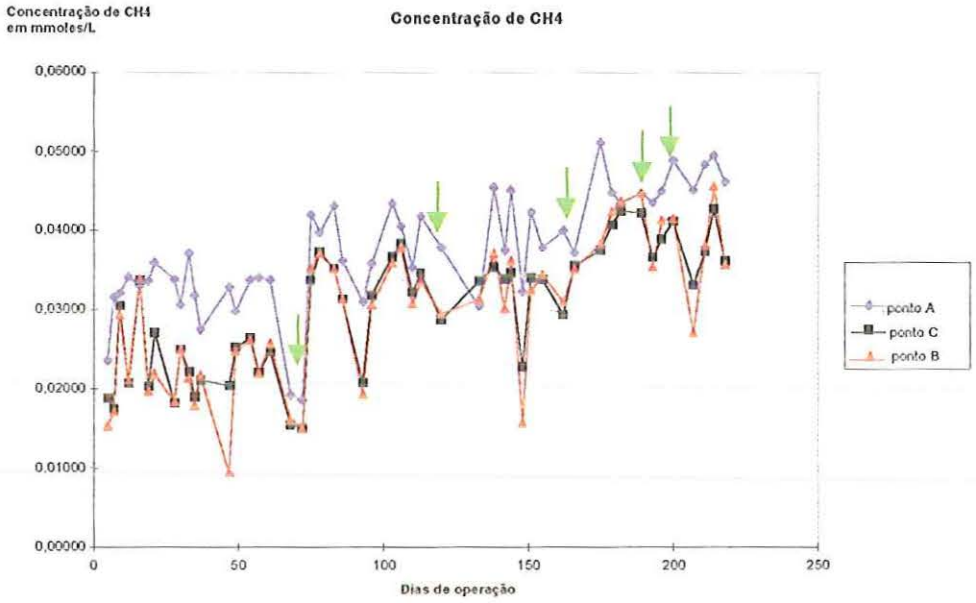


FIGURA 5.2.6 – Concentração de metano em função do tempo de operação. As setas indicam as adições de PCP: 2,0; 5,0; 8,0; 10,0 e 13,0mg/L nos dias de operação 72°, 133°, 175°, 193° e 207°

A Figura 5.2.7 apresenta a remoção de DQO (os valores de entrada e saída que representam afluentes e efluentes estão apresentados no Anexo B – Tabela 8.5) ao longo do período de operação do sistema antes e após a adição de PCP. O período de adição de PCP está indicado por setas. Nota-se que a remoção de DQO manteve-se praticamente constante, em torno de 98% de eficiência indicando que as adições

de PCP não provocaram um efeito inibitório no sistema, uma vez que a eficiência do reator não foi alterada.

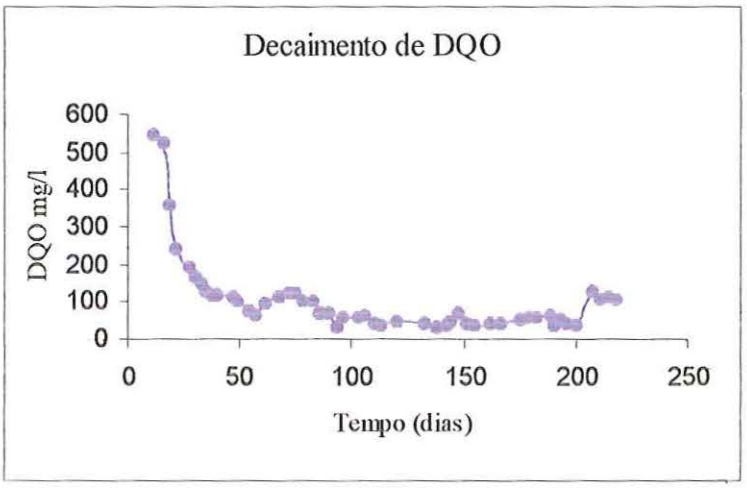


FIGURA 5.2.7 - Decaimento da DQO em função do tempo de operação. As setas indicam as adições de PCP nas concentrações: 2,0; 5,0; 8,0; 10,0 e 13,0 mg/L e dias de operação de: 72°, 133°, 175°, 193° e 207°

Neste trabalho foi possível superar alguns problemas relatados por DAMIANOVIC (1997), pois segundo essa autora, a adição inicial de PCP provocou uma diminuição na remoção de DQO, com decréscimo de eficiência de 97% para 85%. Problemas como diminuição da porcentagem de metano também foram relatados

Pode-se atribuir o melhor desempenho apresentado nessa pesquisa com o mesmo reator de DAMIANOVIC (1997) a dois fatores, primeiramente à nova forma de coleta de gás do reator segundo FORESTI[2] e ao meio de cultura Zinder empregado, que pode ter possibilitado maior adequação nutricional ao lodo microbiano, bem como melhor estabilidade do pH. Além disso, a adição da fonte metanol pode ter favorecido em muito os organismos responsáveis pela estabilidade do processo nas condições estudadas. Os microrganismos metanogênicos que predominaram no rea-

[2] Prof. Dr. Eugênio Foresti – Professor titular da Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento (COMUNICAÇÃO PESSOAL).

tor podem ter sido os responsáveis pelos bons resultados obtidos na degradação do PCP sem prejuízos para o sistema. JUTEAU *et al.* (1995) citaram que em reator anaeróbio, a degradação de PCP ocorreu somente após a adição de fontes de carbono que favoreceram o crescimento de microrganismos metanogênicos, fortalecendo a hipótese desses microrganismos participarem desses processos.

A espuma de poliuretano usada como suporte para o desenvolvimento do biofilme também foi um fator positivo para o sistema. Em culturas aeróbias puras de *Flavobacterium* sp, O'REILLY & CRAWFORD (1989) estudaram a degradação de PCP em reator aeróbio contínuo de filme fixo usando poliuretano como suporte para o biofilme. O poliuretano constituiu uma boa matriz de imobilização de microrganismos para tratamento de PCP por ligar-se reversivelmente ao poliuretano, mantendo uma concentração solúvel de PCP no meio líquido abaixo do nível tóxico. Entretanto, DAMIANOVIC (1997) realizou testes para verificar a remoção de PCP do lodo imobilizado e a adsorção pela espuma de poliuretano e observou que nesses casos essas parcelas são desprezíveis.

Com base nesses resultados, supõe-se que a remoção de PCP neste trabalho foi devida à ação biológica, a despeito de algum fator abiótico ter exercido alguma função. Verificou-se então a degradação do PCP nas concentrações de 2,0 a 13,0mgPCP/L em meio de cultura Zinder (ZINDER & KOCH, 1994), sem prévia adaptação do inóculo ao PCP e na presença de matéria orgânica constituída por glicose, ácidos (acético e fórmico) e metanol, perfazendo 3.000mg/L de DQO.

A degradação de PCP neste trabalho não pode ser constatada pela presença de elevadas concentrações de intermediários metabólicos, provavelmente pela rápida degradação do PCP na parte inicial do reator. Metabólitos intermediários foram anteriormente verificados por DAMIANOVIC (1997) e LARIZZATI (1998) sob condições metanogênicas o que suporta a hipótese da degradação do PCP por tais microrganismos.

5.3 – Análise das características morfológicas dos microrganismos presentes no biofilme do reator

As análises para a determinação das características morfológicas dos microrganismos presentes no biofilme do reator antes e após a introdução do PCP no sistema foram feitas por meio de microscopias óptica comum (contraste de fase e epifluorescência) e eletrônica de varredura.

De acordo com VARESCHE *et al.* (1998), a espuma de poliuretano usada no RAHLF em seus experimentos apresentou excelente condições para o desenvolvimento de biofilme anaeróbio e retenção dos microrganismos. VARESCHE *et al.* (1998) relataram que a conformação espacial do biofilme nesse reator foi diferente da normalmente comentada para reatores do tipo UASB, apresentando um baixo nível de organização microbiana.

O exame ao microscópico óptico e de varredura eletrônica das amostras revelou a presença de células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., bacilos filamentosos não fluorescentes semelhantes ao gênero *Methanosaeta* sp., bacilos pequenos fluorescentes relacionados ao gênero *Methanobrevibacter* sp., bacilos maiores que os anteriores, fluorescentes, relacionados ao gênero *Methanobacterium* sp. e células em formato de espiroquetas relacionadas ao gênero *Methanospirillum* sp.

As Tabelas 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3, 5.3.4 e 5.3.5 apresentam uma análise da freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados nos cincos pontos do reator sem PCP e quando da adição do composto nas concentrações de 2,0; 5,0; 8,0 e 10,0 mgPCP/L. As considerações semi-quantitativas apresentadas nas Tabelas e indicadas através de legenda específica estiveram de acordo com a percepção da examinadora em relação à presença dos grupos microbianos em campos microscópicos. Ou seja, o critério considerado para a avaliação do número de células microbianas por campo microscópico foi o de comparação, tendo como base para a maior densidade (++++), campos repletos com um determinado formato típico de célula em relação a outros e se fluorescente sob luz ultra-violeta. O predomínio dos tipos celulares metanogênicos

foi então determinado pela freqüência de aparecimento das morfologias em cada etapa experimental, que se relacionaram as crescentes adições de PCP.

Os gêneros foram indicados tomando-se como base nas descrições morfológicas encontradas para o Domínio *Archaea*, grupo metanogênico do Manual BERGEY de Sistemática Bacteriana (1988), VAZOLLER (1995), LARIZZATTI (1997) e pela presença de fluorescência celular, sob luz ultra-violeta (DODDEMA & VOGELS, 1978).

TABELA 5.3.1 – Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator sem adição de PCP, após cerca de 48 dias de operação

Morfotipos semelhantes aos gêneros	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Methanosarcina sp.	+++++	++++	+++	+++	+
Methanosaeta sp.	+++++	++++	+++	+++	+
Methanobacterium sp.	++	++	++	++	+
Methanobrevibacter sp.	++++	++++	++++	+++	++
Methanospirillum sp.	+	+	+	+	+

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

TABELA 5.3.2 - Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator na concentração de 2mg/L de PCP, após cerca de 120 dias de operação

Tipos metanogênicos	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Methanosarcina sp.	+++++	+++++	+++	+++	+
Methanosaeta sp.	+++++	+++++	+++	+++	+
Methanobacterium sp.	+	+	+	++	+
Methanobrevibacter sp.	++	++	+++	+++	++
Methanospirillum sp.	+	+	+	+	+

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

TABELA 5.3.3 – Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator na concentração de 5mg/L de PCP, após cerca de 166 dias de operação

Tipos metanogênicos	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Methanosarcina sp.	+++++	+++++	++	++	+
Methanosaeta sp.	+++++	+++++	++	++	+
Methanobacterium sp.	++++	++	+	++	+
Methanobrevibacter sp.	+++	+++	+++	+++	++
Methanospirillum sp.	+	+	+	+	+

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

TABELA 5.3.4 – Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator na concentração de 8mg/L de PCP, após cerca de 190 dias de operação

Tipos metanogênicos	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Methanosarcina sp.	+++++	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**
Methanosaeta sp.	+++++	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**
Methanobacterium sp.	+	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**
Methanobrevibacter sp.	++	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**
Methanospirillum sp.	+	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**	**N.D.**

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

Obs. A microscopia foi realizada somente no ponto1.

TABELA 5.3.5 – Freqüência dos gêneros metanogênicos encontrados no reator na concentração de 10mg/L de PCP, após cerca 207 dias de operação

Tipos metanogênicos	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Methanosarcina sp.	+++++	++++	++	++	+
Methanosaeta sp.	+++++	++++	++	++	+
Methanobacterium sp.	++++	++	++	++	+
Methanobrevibacter sp.	++++	+++	+++	+++	++
Methanospirillum sp.	+	+	+	+	+

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

Como descrito no capítulo Material e Métodos, as amostras analisadas foram diretamente dispostas em lâminas após serem liberadas de três cubos de espumas de poliuretano em 3 ml de água Milli-Q previamente fervida e homogeneizada em um frasco contendo 1,0 mL de pérolas de vidro. O uso da seringa de insulina sem agulha para a coleta da amostra homogeneizada e disposição na lâmina foi também adequado. No caso da MEV, as espumas recobertas pelos biofilmes fixadas em suporte específico foram mantidas íntegras mesmo após a aplicação do método de preparação das amostras.

A Figura 5.3.1 apresenta as fotomicrografias com as morfologias que predominaram sem a adição de PCP, relacionadas com os gêneros *Methanosarcinas* sp., *Methanosaeta* sp., *Methanobrevibacter* sp. e *Methanobacterium* sp. Os representantes com morfologias semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. foram constatados em todos os pontos do reator, destacando-se sua abundância nos pontos iniciais 1 e 2. As morfologias relacionadas aos gêneros *Methanobrevibacter* sp. e *Methonobacterium* sp. estiveram presentes em todos os pontos, destacando-se também nos pontos iniciais.

A Figura 5.3.2 apresenta as fotomicrografias com as morfologias predominantes na concentração de 2,0 mgPCP/L de. Foram relacionadas aos gêneros *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp., *Methanobrevibacter* sp. De forma geral, não foi observada alteração na comunidade microbiana com a introdução de 2,0 mgPCP/L. Na Figura 5.3.3, as fotomicrografias com as morfologias predominantes na concentração de 5,0 mgPCP/L foram relacionadas aos gêneros *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp., *Methanobrevibacter* sp. e *Methanobacterium* sp. Nesta concentração de PCP também não foram observadas mudanças na comunidade microbiana inicialmente presente. Sob a concentração de 8,0 mgPCP/L, o gênero *Methanosarcina* sp. foi predominante, como pode ser constatado através da Figura 5.3.4, além de bacilos visualizados sob microscopia de contraste de fase. As fotomicrografias foram realizadas apenas do ponto 1 por não ter sido verificada nenhuma alteração nos tipos microbianos

A Figura 5.3.5 apresenta as morfologias predominantes sob microscopia eletrônica de varredura na concentração de 10,0 mgPCP/L. Foram relacionadas aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.. As amostras também mostraram

uma grande quantidade bacilos, medindo aproximadamente 1,5 μm de comprimento e morfologia levemente espiralada, relacionada ao gênero *Methanospirillum* sp. Nesta concentração não foram também observadas alterações na comunidade microbiana. Sob microscopia óptica, morfologias semelhantes às do gênero *Methanosarcina* sp., *Methanobrevibacter* sp. e *Methanobacterium* sp. foram observadas.

Não foram constatadas diferenças na distribuição dos tipos morfológicos da população microbiana presente no reator ao longo do experimento. Apenas foram verificados aumentos das populações de células fluorescentes semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp., de não fluorescentes ao gênero *Methanosaeta* sp. e de bacilos fluorescentes. O meio de reação foi então propício ao crescimento desses grupos microbianos que não sofreram inibição metabólica pela presença do PCP.

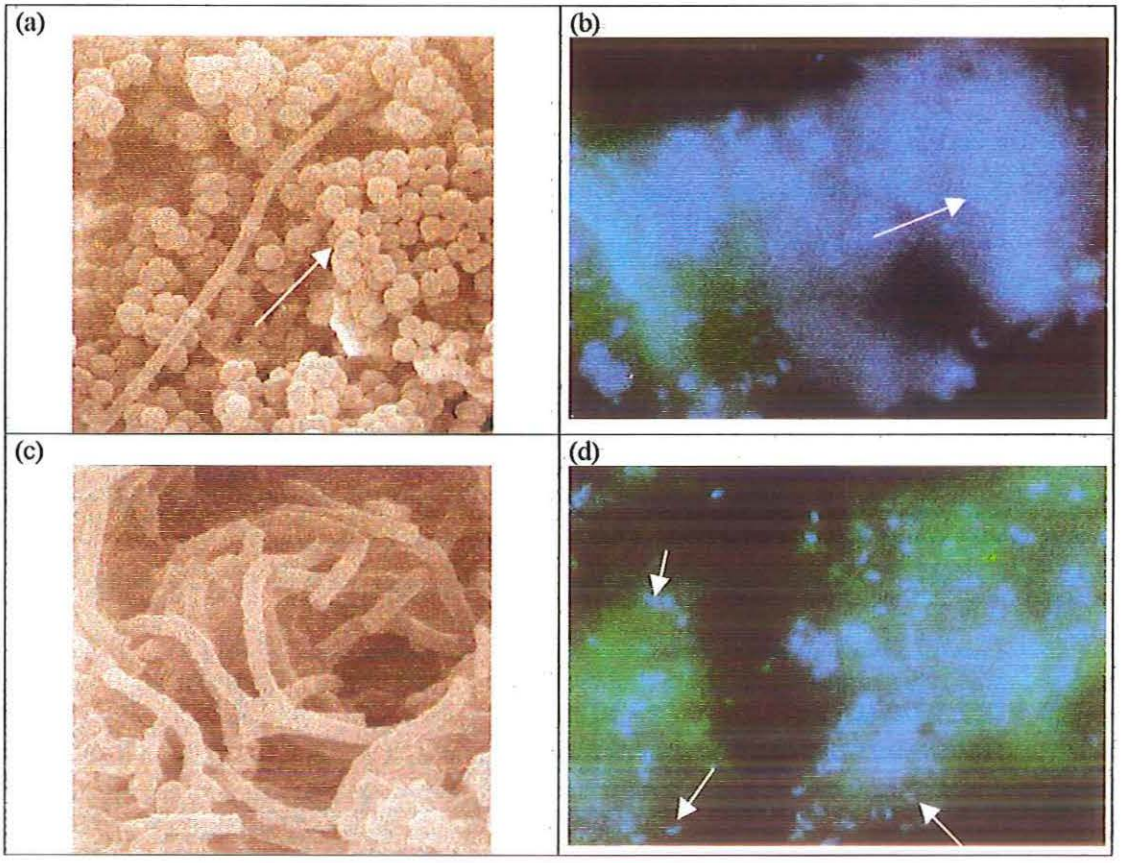


FIGURA 5.3.1 – Fotomicrografias (a) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 5000x)(seta indicando as sarcinas). (b) - Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1250x)(seta indicando as sarcinas). (c) – Células formadoras de filamentos, relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 5000x). (d) - Células em formato bacilos curtos, relacionadas ao gênero *Methanobrevibacter* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1250x))(seta indicando bacilo curto aos pares)

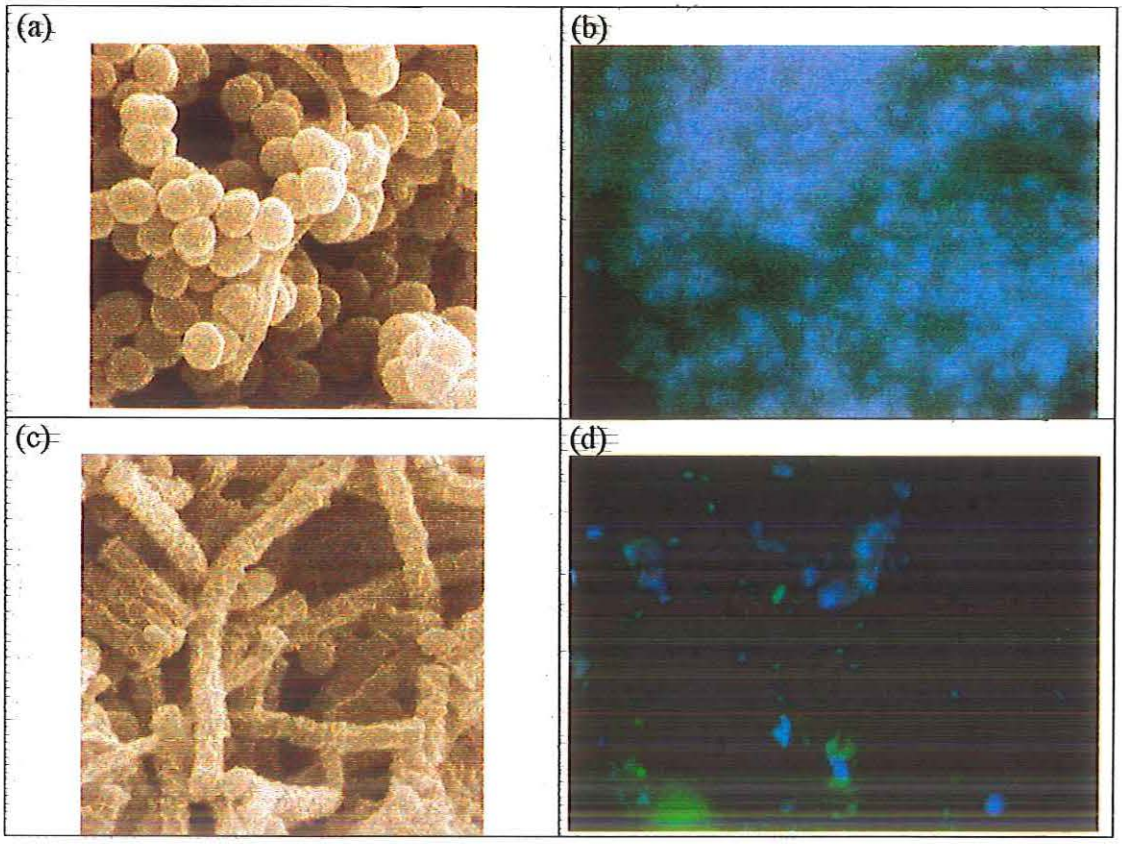


FIGURA 5.3.2 –Fotomicrografias (a) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 10000x). (b) – Células em formato de cocos fluorescentes, analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1250x). (c) – Células formadoras de filamentos, relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 10000x). (d) - Células em formato bacilos, relacionadas ao gênero *Methanobrevibacter* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1250x)

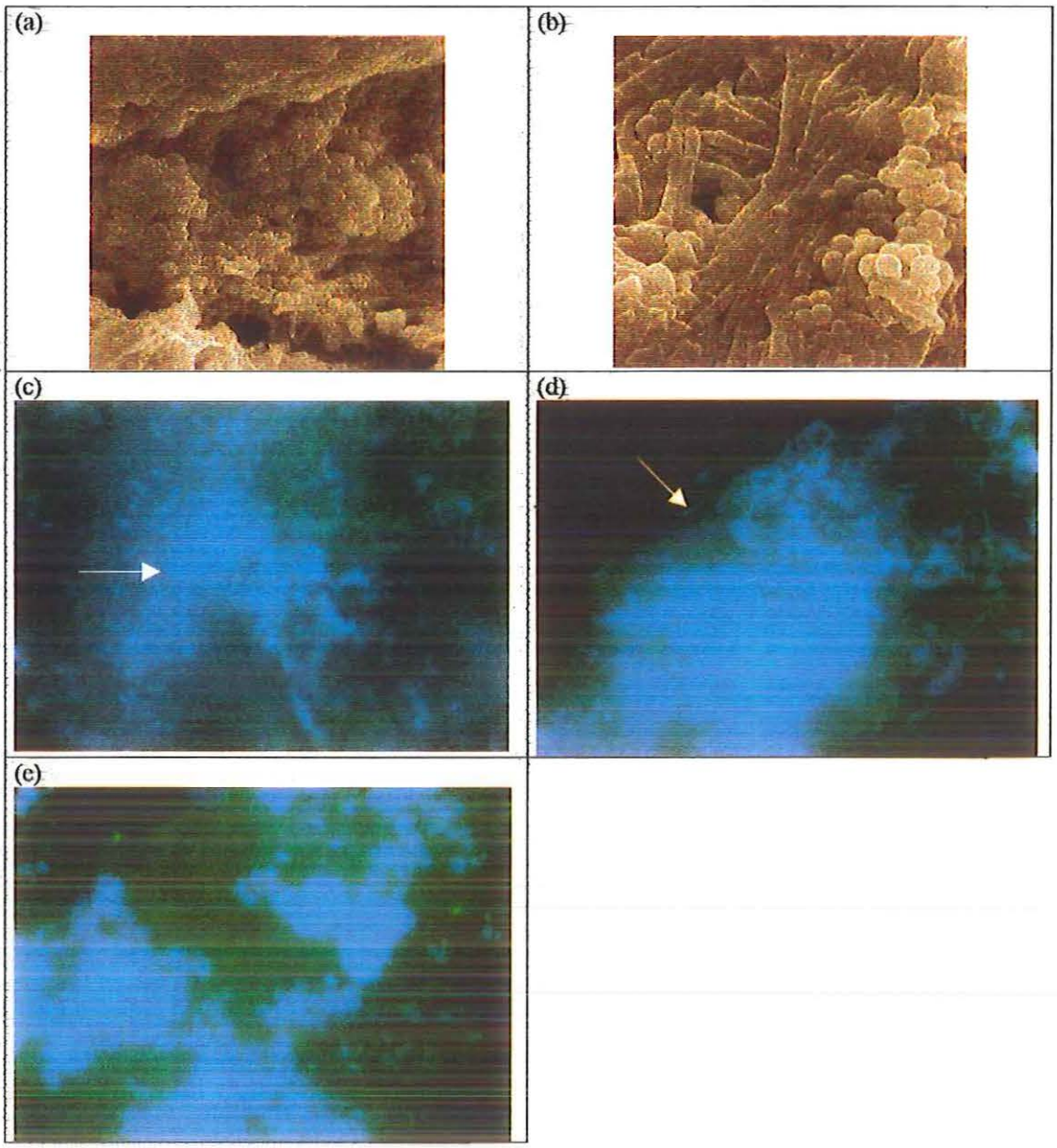


FIGURA 5.3.3 – Fotomicrografias (a) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 2000x). (b)- Células em formato de sarcinas, relacionadas aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 5000x). (c) – Células em formato bacilos curtos (cocobacilos fluorescentes), relacionadas ao gênero *Methanobrevibacter* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1240x))(seta indicando os bacilos curtos). (d) - Células em formato bacilos (aparentando formação de cadeias ou filamentos), relacionadas ao gênero *Methanobacterium* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1250x)(seta indicando os bacilos em filamentos). (e) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1250x)

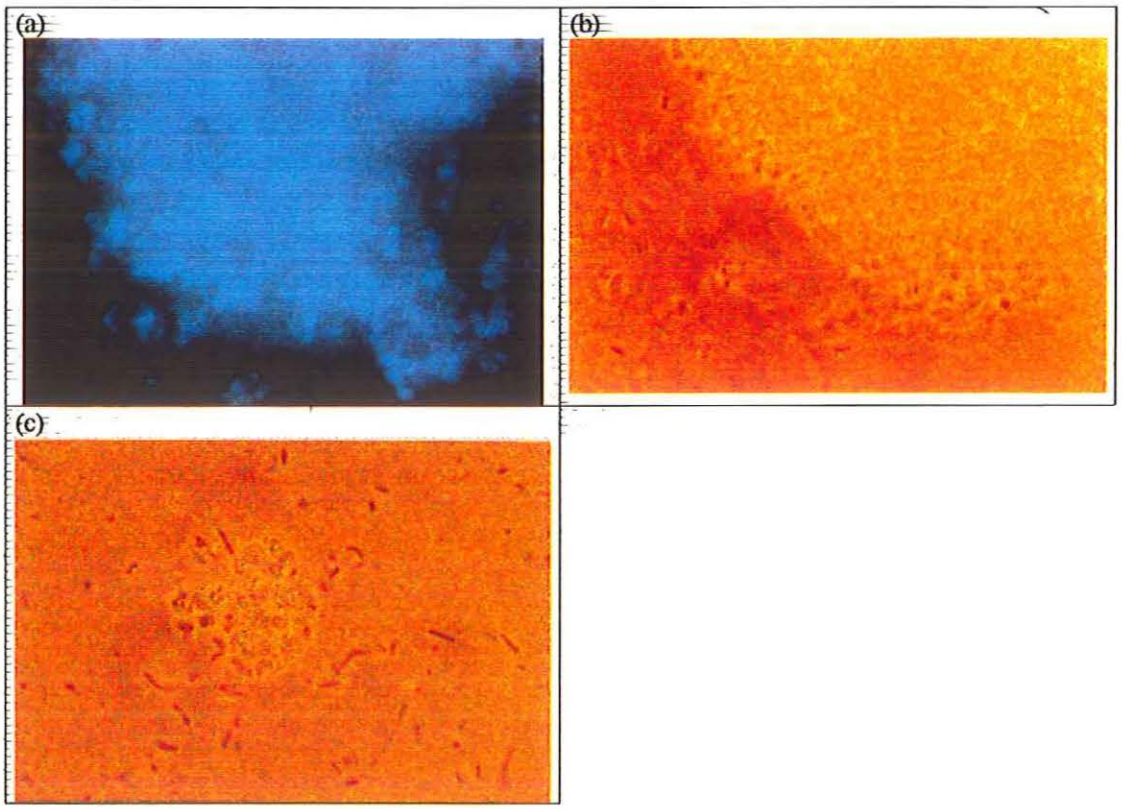


FIGURA 5.3.4 – Fotomicrografias (a) – Células em formato de cocos fluorescentes, analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento 1250x). (b) – Células em formato de cocos, analisadas sob microscopia contraste de fase (aumento 1250x). (c) - Células em formato de bacilos, analisadas sob microscopia de contraste de fase (aumento 1240x) com células em formato de sarcinas no centro.

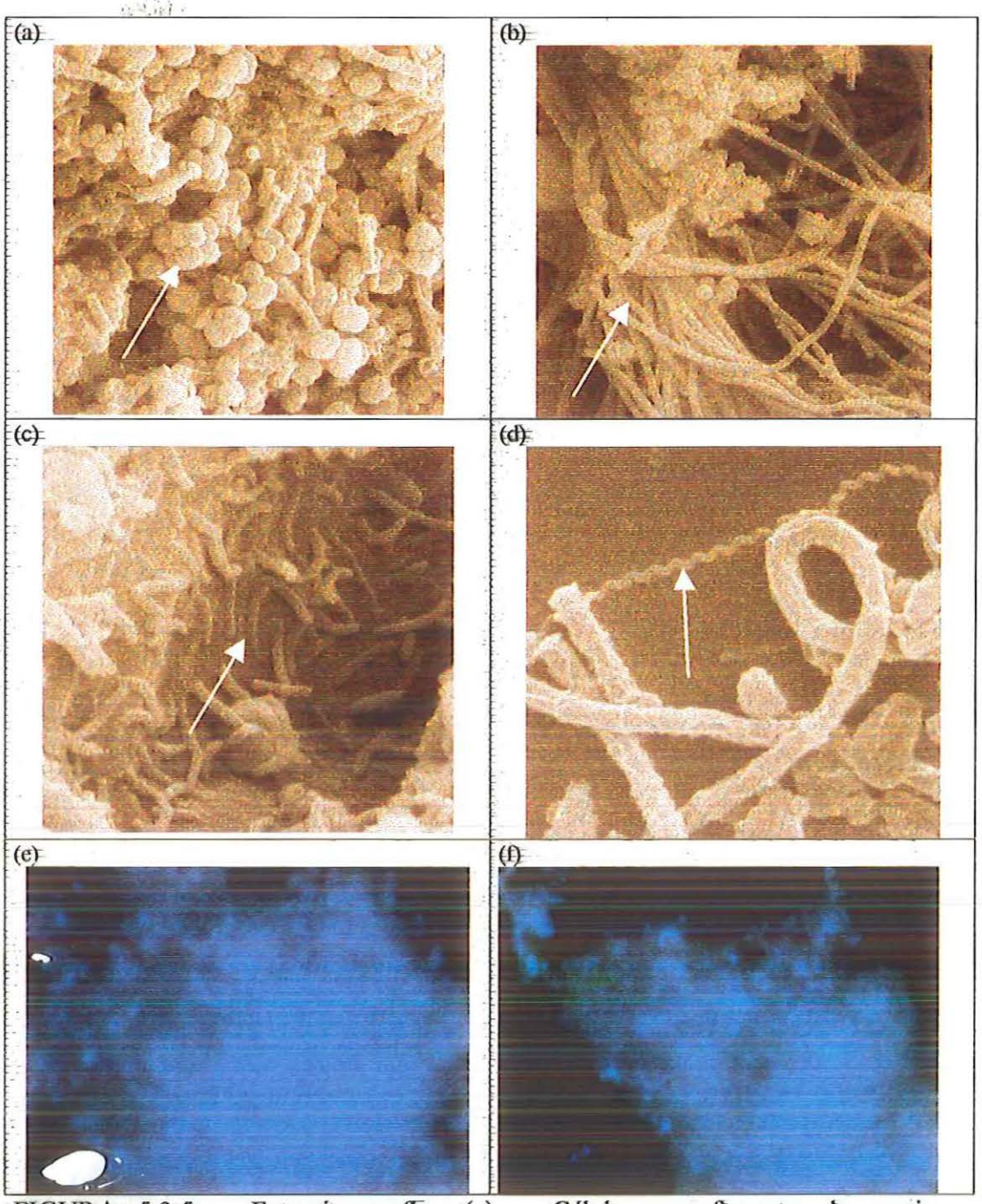


FIGURA 5.3.5 – Fotomicrografias (a) – Células em formato de sarcinas, relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento de 5000x). (b) – Células filamentosas formando feixes, relacionadas ao gênero *Methanosaeta* sp., analisadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento de 3000x). (c) – Células em formato de bacilos curtos, examinadas sob microscopia eletrônica de varredura (aumento de 10000x). (d) – Destacando célula em formato de espiroqueta, analisada sob microscopia eletrônica de varredura (aumento de 10000x). (e) – Aglomerado de células em formato de sarcinas relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp., analisadas sob microscopia fluorescência (aumento de 1240x). (F) – Aglomerado de células em formato bacilos, analisadas sob microscopia de fluorescência (aumento de 1250x).

As morfologias identificadas através das técnicas de microscopia óptica e de varredura eletrônica sugerem o predomínio de tipos metanogênicos acetoclásticos, com representação dos dois gêneros conhecidos, *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. Nos pontos iniciais do reator, as células apresentaram definição de contornos, bem regulares, sugerindo integridade da estrutura celular. Ao mesmo tempo, nos pontos finais do reator (3, 4 e 5) as células de morfologias semelhantes às descritas apresentavam-se com maior freqüência contornos irregulares, aparentando certa degeneração celular.

As fontes de carbono fornecidas como acetato de sódio e metanol, de acordo com BERGEY (1988), são importantes fontes para o metabolismo de obtenção de energia através da via de formação de metano, por microrganismos metanogênicos da Família *Methanosarcinaceae*, produzindo como metabólitos o CH_4 e CO_2. Outras condições fornecidas que favorecem esta Família são o pH, que permaneceu em torno de 7,4 no interior do reator, e a temperatura, em torno de 30°C. O gênero *Methanosarcina* é facilmente diferenciado dos outros por apresentar estrutura de agregados de cocos fluorescentes, que parecem empacotados. Entretanto, as espécies *M. mazei* (1,0-3,0 μm de diâmetro) e *M. acetivorans* (1,5-2,5 μm de diâmetro) também podem apresentar unidades de cocos individuais fluorescente, que também foram visualizados. A espécie *M. mazei* pode apresentar células individuais em formato de cocos, com 1,0-3,0 μm de diâmetro, e podem formar blocos de 20-100 μm de diâmetro, que agrupados, formam pacotes de 1000 μm ou mais de diâmetro. A figura 5.3.6 exemplifica tais morfologias. Para a espécie *M. mazei* as faixas de temperatura e pH ótimas de crescimento oscilam entre 30°C-40°C e de 5,5-8,0, respectivamente. Na mesma Família, o gênero *Methanosaeta*, relacionado neste trabalho, apresenta morfologia bem característica, com células em formato de bacilos com extremidades achatadas, formam filamentos flexíveis e longos, com tendência a agregarem-se em formato de feixes. Utilizam acetato e CO_2 como fontes de carbono, pH ótimo de crescimento em torno de 7,1-7,8 e, para as linhagens mesofílicas, a temperatura ótima é de 35-40°C.

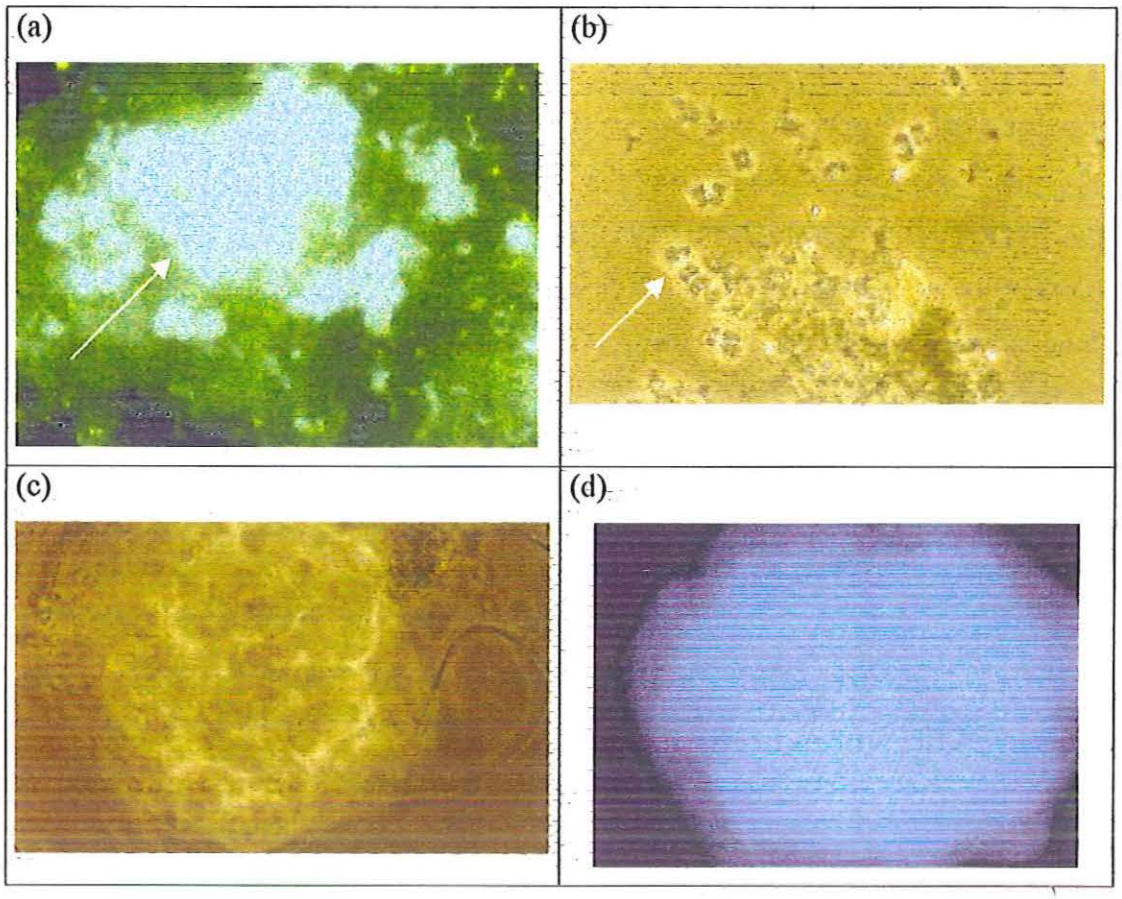


FIGURA 5.3.6- Fotomicrografias (a) Seta apontando o *gênero Methanosarcina sp.*, analisado sob microscopia de fluorescência (aumento de 1250 x). (b) Seta apontando o *gênero Methanosarcina sp.*, analisado sob microscopia de contraste de fase (aumento de 1240 x). (c) e (d) *Methanosarcina sp.* formando pacotes, analisado sob microscopia de contraste de fase e fluorescência (aumento de 1250 x)

Outra fonte de carbono utilizada no sistema foi o formiato de sódio. Segundo BERGEY (1988), esta fonte de carbono favorece o crescimento de metanogênicos da Família *Methanobacteriaceae*, gêneros *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*, capazes de oxidar formiato. Os gêneros *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter* apresentam, respectivamente, células em formato de bacilos, que podem ser pequenos ou longos e formar filamentos, e bacilos curtos com formato oval ou cocobacilos, normalmente ocorrem aos pares. No gênero *Methanobacterium*, das linhagens mesofílicas destaca-se a espécie *M. formicium* por utilizar formiato, que pode apresentar células longas e filamentosas, medindo 0,4-0,8 μm de largura por 2-15 μm de comprimento, não móveis, com temperatura ótima de crescimento entre

EESC - USP Biblioteca Campus de S. Carlos

37°C-45°C, condições encontradas neste trabalho. Tal morfologia está apresentada na figura 5.3.7. Em relação ao gênero *Methanobrevibacter*, destaca-se a espécie *M. smithii* por utilizar formiato, além de exigir acetato e vitaminas B como requerimentos nutricionais; as células podem ser em formato de bacilos ovais ou cocobacilos, medindo 0,6 a 0,7 μm de largura por cerca 1,0 μm de comprimento, e ocorrem freqüentemente aos pares ou em cadeias, não móveis, crescendo em temperatura ótima entre 37 a 39°C e de 30°C (ver morfologia semelhante na Figura 5.3.8) .

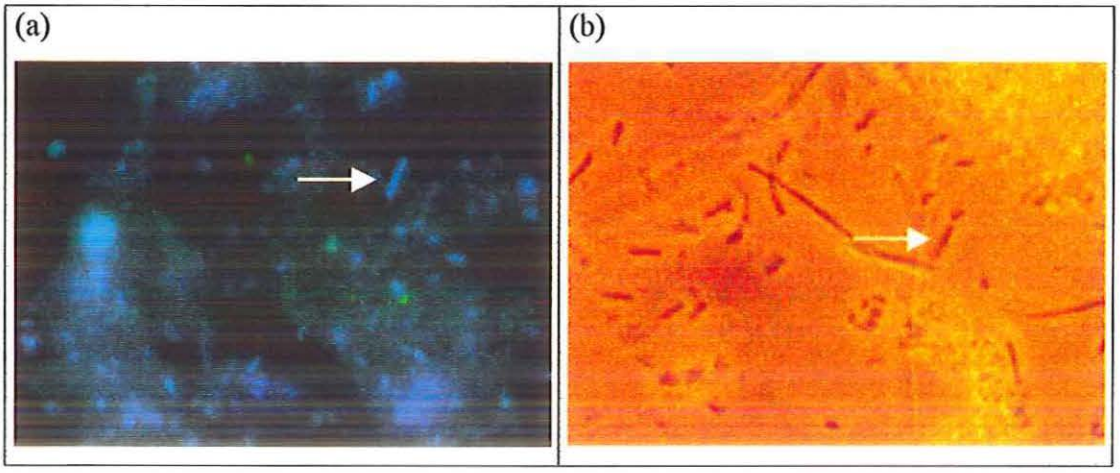


FIGURA 5.3.7- Fotomicrografias (a) e (b), As setas indicam a morfologia do provável gênero *Methanobacterium sp.* , sob microscopia de fluorescência e contraste de fase, respectivamente. Obs.: As fotomicrografias (a) e (b) foram ampliadas.

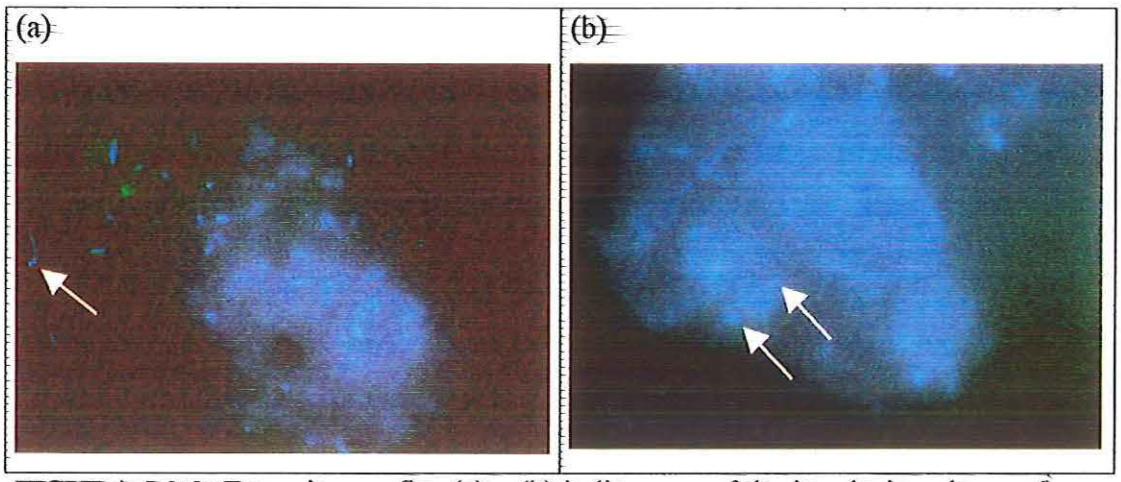


FIGURA 5.3.8- Fotomicrografias (a) e (b) indicam morfologia relacionada ao gênero *Methanobrevibacter* sp., sendo que a seta em (a) mostra formação em cadeia e, em (b), formações aos pares, sob microscopia de fluorescência (aumento 1250 x)

Outro tipo metanogênico evidenciado neste trabalho, porém em freqüência menor, foi semelhante ao gênero *Methanospirillum*, com morfologia bem característica, bacilo longo levemente espiralado, que utiliza formiato para crescimento e metanogênese, cuja a temperatura ótima de crescimento está na faixa entre 30 a 37°C. Mede de 0,4 a 0,5 µm de largura por 7,4 a 10 µm de comprimento (ver morfologia semelhantes Figura 5.3.9).

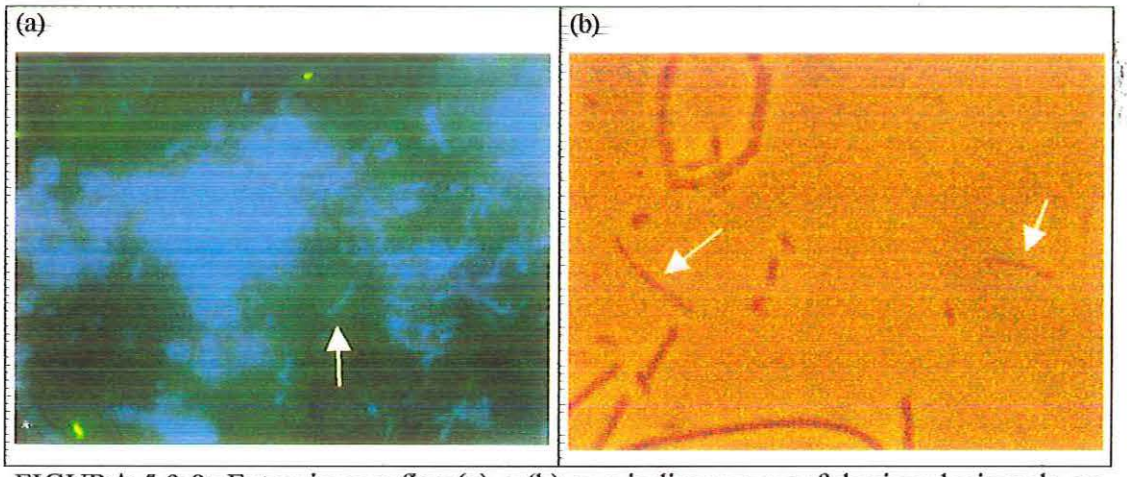


FIGURA 5.3.9- Fotomicrografias (a) e (b) que indicam a morfologia relacionada ao gênero *Methanospirillum sp.*, sob microscopia de fluorescência e contraste de fase, respectivamente, (aumento de 1250 x). Obs. A foto (b) foi ampliada, para melhor visualização.

As concentrações das fontes de carbono utilizadas neste trabalho foram iguais a 20 mM de formiato de sódio, 10 mM de acetato de sódio, 40 mM de metanol e 2 mM de glicose. Provavelmente, tais fontes promoveram o predomínio dos microrganismos metanogênicos descritos anteriormente, cujas presenças resultaram no consumo dos ácidos orgânicos voláteis, que promoveu estabilidade no sistema, com remoção total da DQO e estabilidade de pH. O desaparecimento total do PCP adicionado indicou que provavelmente tais microrganismos foram responsáveis por essa degradação.

Segundo WU *et al.* (1993), os gêneros metanogênicos que prevaleceram em reatores UASB com remoção de PCP foram *Methanobacterium* sp., *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.

JUNTEAU *et al.* (1995) estudaram a degradação de PCP em reator anaeróbio de filme fixo e também observaram que o consórcio microbiano presente apresentou predominância de *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e bacilos metanogênicos do gênero *Methanobacterium* sp.

DAMIANOVIC (1997), que trabalhou com dois reatores anaeróbios do tipo RAHLF para a degradação de PCP, utilizando o meio de cultivo Angelidak e as fontes de carbono glicose, acetato de sódio, formiato de sódio, com taxas de carregamento orgânico diferentes, 1,12 kgDQO/m^3 para o primeiro, e 1,71 kgDQO/m^3 para o segundo, observou predominância de gêneros diferentes entre eles. Para o reator, com taxa de carregamento orgânico menor, o gênero predominante foi semelhante à *Methanosaeta* sp. Para o outro reator, foi verificada a presença de morfologias semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., bem como de morfologias de cocobacilos vibriões, aos pares, as quais foram relacionadas a víbrios redutores de sulfato. Concluiu-se que os tipos morfológicos observados estaria de alguma forma relacionados à remoção do PCP no meio de reação. Morfologias como as citadas foram verificadas no presente trabalho de doutorado, porém algumas foram relacionadas ao gênero metanogênico *Methanobrevibacter* sp.

LARIZATTI (1997), estudando reatores anaeróbios descontínuos para a degradação de PCP e utilizando o meio de cultivo Zinder acrescido das fontes de carbono acetato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio e metanol, observou

que os gêneros metanogênicos que predominaram foram semelhantes à *Methanococcus* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp., *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. Da mesma forma, reconhece-se a presença de morfologias semelhantes à esses na presente pesquisa, com exceção daquela relacionada ao gênero *Methanococcus* sp.

BOLAÑOS (1996), que trabalhou com reatores anaeróbios descontínuos degradando PCP e utilizando o meio de cultura descrito por Angelidak e as fontes de carbono glicose, acetato de sódio, formiato de sódio, observou que os gêneros metanogênicos predominantes foram semelhantes à *Methanobacterium* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e *Methanospirillum* sp., além de ter verificado alguns bacilos em pares e víbrios não fluorescentes.

Nos experimentos dessa tese de doutorado, os exames microscópicos realizados revelaram o predomínio de tipos metanogênicos citados anteriormente, mas não buscou-se comprovar através do isolamento de culturas se os mesmos estavam envolvidos com a degradação específica de PCP. Entretanto, o aumento na concentração do metano ao longo das adições do composto PCP, sem aumento da carga de carregamento orgânico sugerem transformações anaeróbias em favor da metanogênese. Essa análise acrescida de informações da literatura como a ocorrência da desalogenação redutiva na presença de compostos como a vitamina B_{12}, presentes em elevadas concentrações em organismos metanogênicos do gênero *Methanosarcina* sp., (MOHN & TIEDJE, 1992; SMITH & WOODS, 1994; van EEVERT *et al.*, 1998), permitem supor o papel relevante neste trabalho das arqueas metanogênicas semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. no processo de desalogenação redutiva do PCP .

5.4 – Análises para caracterização dos microrganismos através de métodos da Biologia Molecular

Em função do tipo de amostra, foi inicialmente necessário estabelecer algumas adaptações para a aplicação das técnicas moleculares escolhidas, procurando-se evitar, por exemplo, problemas com a amplificação do material genômico das amostras, através do uso da reação de polimerase em cadeia (PCR). A baixa concentração de DNA encontrada após extração, purificação e reação de PCR, e visualizada pela formação de bandas fracas no gel de agarose, foi relacionada à possível inibição da reação de PCR pela presença de substâncias não identificadas nas amostras, à formação de bandas inespecíficas, à inibição total da reação sem formação de bandas ou à contaminação das soluções.

Após um longo período de tempo, foi possível estabelecer os procedimentos mais adequados, tendo-se realizado testes com a variação da concentração da enzima *taq*. DNA polimerase, solução de cloreto de magnésio e temperatura para extensão da fita do DNA (52, 55, 57, 60°C). Testes substituindo as soluções usadas na reação, uma a uma, também foram realizados a fim de detectar a contaminação.

5.4.1- Extração do DNA das amostras

As extrações foram realizadas conforme descrito anteriormente, no capítulo Material e Métodos. As amostras utilizadas foram referentes às concentrações de 2,0 e 10,0 mgPCP/L, e sem PCP. O rendimento de DNA extraído foi baixo, em torno de 10 ng/μL, possivelmente devido ao lodo do reator conter muito material interferente. Entretanto, amostras de DNA puderam ser utilizadas na reação de PCR, com resultados satisfatórios. A Figura 5.4.1 mostra os resultados das extrações nas concentrações citadas, após a purificação em gel de agarose, corado com brometo de etídio.

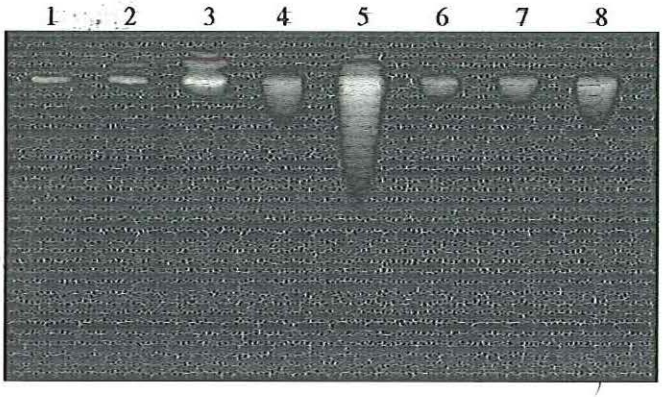


FIGURA 5.4.1. – Fotografia de gel de agarose corado com brometo de etídio, apresentando bandas de DNA extraídos de amostras de microrganismos presentes em biofilme de reator anaeróbio em ausência de PCP. A quantificação do DNA extraído de amostra do biofilme estão indicadas nas colunas 1, 2 e 3, e referem-se aos padrões de DNA de concentrações 15 ng, 30 ng e 100 ng, respectivamente. As linhas 4, 5, 6, 7 e 8 referem-se aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator

Foram utilizados 8 μL de amostra de DNA, de cada ponto do reator para obtenção da banda apresentada na Figura 5.4.1. Estimando-se que as concentrações de DNA referentes as linhas 4, 5, 6, 7 e 8 foram aproximadamente: 80 ng/L, 200 ng/L, 80 ng/L, 80 ng/L, 96 ng/L: então as concentrações estimadas para cada um dos pontos do reator- 1, 2, 3, 4 e 5- foram de: 10 ng/μL, 25 ng/μL, 10 ng/μL, 10 ng/μL, 12 ng/μL, respectivamente.

Foram utilizados os padrões da Figura 5.4.1 para estimar as concentrações de DNA da amostra 2,0 mgPCP/L (Figura 5.4.2). Estimou-se que as concentrações de DNA de cada ponto foram, aproximadamente 10 ng/μL, 10 ng/μL, 10 ng/μL, 8 ng/μL, 8 ng/μL para os pontos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

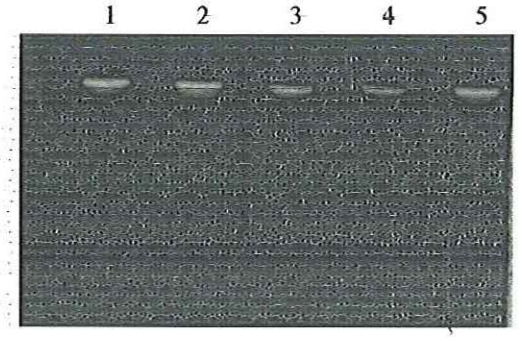
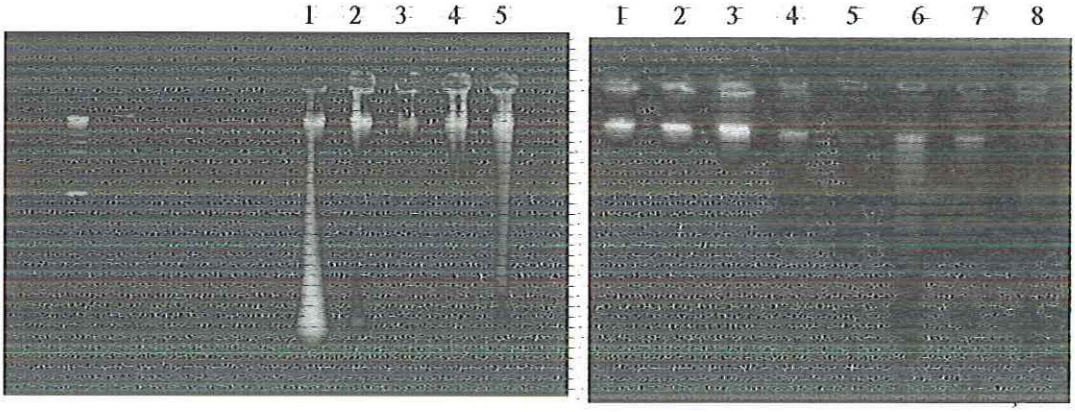


FIGURA 5.4.2 – Fotografia de gel de agarose corado com brometo de etídio, apresentando bandas de DNA extraídos de amostras de microrganismos presentes em biofilme de reator anaeróbio com adição de 2,0 mgPCP/L. As linhas 1, 2, 3, 4 e 5 referem-se aos respectivos pontos do reator

A Figura 5.4.3 apresenta a extração de DNA de amostras submetidas a 10,0 mgPCP/L, (a) observa-se a banda referente aos microrganismos presentes na amostra e, em (b), a mesma amostra após purificação e acompanhada de concentrações conhecidas do padrão.



(a) (b)

FIGURA 5.4.3 – Fotografias de géis de agarose corados com brometo de etídio, apresentando bandas de DNA extraídos de amostras de microrganismos presentes em biofilme de reator anaeróbio recebendo de 10,0 mgPCP/L. (a) Extração de DNA sem a purificação dos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator. (b) Concentrações de DNA da amostra de 10,0 mgPCP/L extraídos e purificados. As linhas 1, 2, 3, referem-se às concentrações de padrões de 15 ng, 30 ng e 50 ng, respectivamente e as linhas 4, 5, 6, 7 e 8, aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator

A purificação das amostras foi necessária para que possíveis efeitos inibitórios de substâncias fossem evitados. Porém, nota-se (Figura 5.4.3) que a purificação resultou em perda do DNA extraído, resultando nas baixas concentração observadas em (b).

As concentrações de DNA das amostras submetidas a 10,0 mgPCP/L, após a purificação, foram estimada comparando-se com os padrões, e através da observação das bandas obtidas por tais soluções. Foram empregados 2 μL de cada amostra de DNA, sendo estimadas as concentrações de 7 ng/μL, 4 ng/μL, 7 ng/μL, 7 ng/μL e 4 ng/μL de DNA, referentes, respectivamente, aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator.

O procedimento de extração foi adequado, mas a purificação das amostras levou a uma grande perda de DNA, resultando em baixa concentração final. Entretanto, as amostras foram submetidas a PCR e foram amplificadas satisfatoriamente.

5.4.2 – Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

As reações de PCR foram padronizadas após testes preliminares, com diferentes concentrações de MgCl de 3,0 mM, 4,0 mM e 5,25 mM e de enzima *Taq.* DNA polimerase de 2 U/μL e 4 U/μL. Diferentes temperaturas de extensão da fita do DNA também foram testadas, 52, 55, 57 e 60°C. A padronização permitiu obter uma reação de PCR sem bandas inespecíficas e amplificações com resultados satisfatórios para os *primers* universais e específicos para o Domínio *Archaea*, como mostram as Figuras 5.4.2.1 e 5.4.2.2, respectivamente.

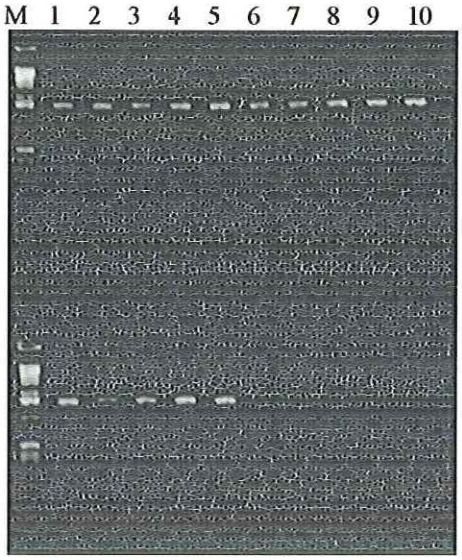


FIGURA 5.4.2.1 – Fotografia do gel de eletroforese após a reação de polimerase em cadeia 2,0 mgPCP/L e 10,0 mgPCP/L, e sem PCP. Na parte superior estão apresentados as amostras referentes aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator, para as amostras sem PCP e 2,0mgPCP/L e, na parte inferior, os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator da amostra 10,0 mgPCP/L. Nas duas partes, M refere-se a padrão de DNA, mostrando que o fragmento amplificado desta reação foi de 1,5 Kb referentes aos *primers* universais

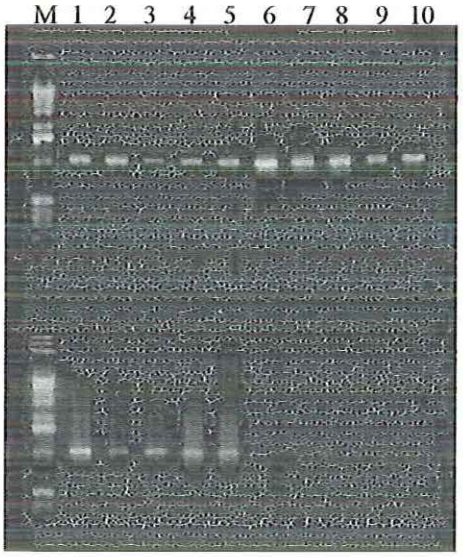


FIGURA 5.4.2.2 – Fotografia do gel de eletroforese após a reação de polimerase em cadeia submetidas a 2,0 mgPCP/L, 10,0 mgPCP/L e sem PCP. A parte superior refere-se às amostras referentes aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator para as amostras sem PCP e 2,0 mgPCP/L e na parte inferior os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 do reator, a 10,0 mgPCP/L. Nas duas partes M refere-se a padrão de DNA, mostrando que o fragmento amplificado desta reação foi de 1,0 Kb referentes aos *primers* específicos para o Domínio *Archaea*

As reações de PCR com os *primers* universais e específicos para *Archaea* foram padronizadas dentro das condições recomendadas por STEFFAN & ATLAS (1991), apenas diferindo na concentração da enzima *taq* polimerase. A concentração dessa enzima foi de 4 U/25µl de reação, sendo que os autores (*op.cit.*) recomendaram a faixa de 1,0 a 2,5 U/100 µl de reação, porém DIEFFENBACH & DVERKSLER (1995) relataram que tais recomendações podem ser otimizadas para diferentes seqüências de DNA e *primers*, e diferentes parâmetros podem ser ajustados, quando necessário, pois a PCR é uma tecnologia empírica.

5.4.3 – Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA)

O método ARDRA envolveu a amplificação (PCR) dos DNA das amostras, seguido pela digestão com enzimas de restrição. Os produtos resultantes da digestão, os fragmentos de DNA, foram submetidos à eletroforese. Diferentes tamanhos de fragmentos de DNA ocuparam diferentes posições no gel, dessa forma, podem ser visualizados através das bandas. Cada população microbiana presente em uma amostra resulta em uma determinada leitura de banda, chamada de padrão ARDRA. Assim, quando uma determinada população microbiana sofre mudanças, o padrão ARDRA também pode ser alterado. Portanto, a importância do método é a possibilidade de verificação rápida de mudança na estrutura microbiana da população presente em determinado local. O método é de fácil aplicação e fornece resultados com boa margem de segurança. Neste trabalho foram obtidos bons resultados reforçando a recomendação para o uso desse método em análise de população anaeróbia exposta a cargas de choque ou a substâncias inibidoras.

Os resultados obtidos pelo método ARDRA permitiram verificar mudanças na diversidade da comunidade microbiana presente no reator ao longo do experimento, provocadas pela presença de PCP. Os segmentos de DNA resultantes do corte pelas enzimas de restrição, que são conservados de acordo com o padrão filogenético de cada grupo, estão apresentados nas Figuras 5.4.3.1, 5.4.3.2 e 5.4.3.3.

A Figura 5.4.3.1 apresenta o resultado da digestão com a enzima *Dde*. As amostras submetidas ao método ARDRA foram inicialmente amplificadas pela

reação de PCR e o produto foi digerido com as enzimas de restrição: *AluI*, *RSA* e *Dde*. Inicialmente, utilizou-se a amplificação com *primers* universais, porém não foi possível verificar as diferenças de padrões dos segmentos dos DNA das amostras. Optou-se, então por realizar a análise de restrição dos DNA ribossômicos, amplificados com *primers* específicos para o Domínio *Archaea*, utilizando as seguintes enzimas: *Alu*, *RSA* e *Dde*. As Figuras 5.4.3.1, 5.4.3.2 e 5.4.3.3 apresentam os padrões ARDRA obtidos.

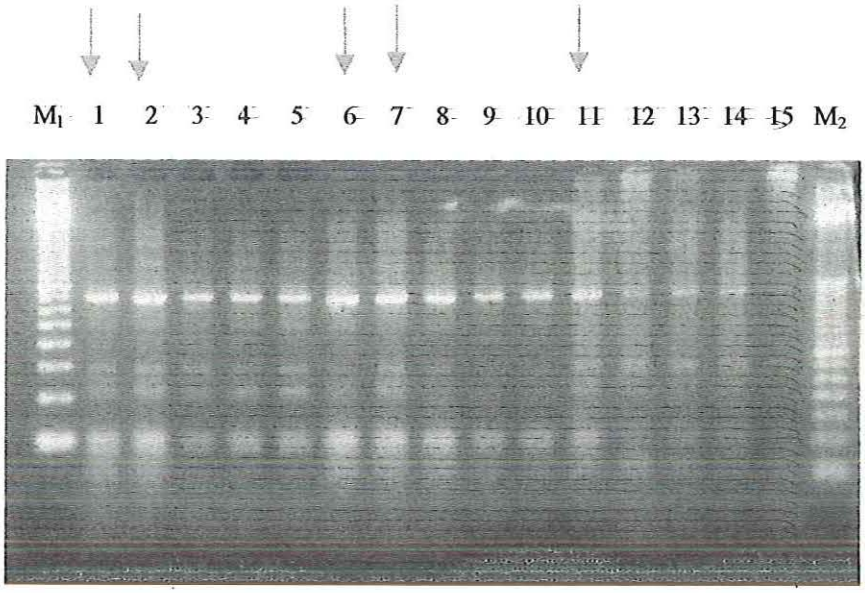


FIGURA 5.4.3.1 – Fotografia do gel com padrões ARDRA obtidos com a enzima de restrição *Dde* para as amostras submetidas a 2,0 mgPCP/L e 10 mgPCP/L, e sem PCP. As primeira e última linhas marcador de fragmentos de DNA sendo M_1, de 100 pb e a M_2, de 50 pb. As linhas 1, 2, 3, 4 e 5 representam as amostras sem PCP, as 6, 7, 8, 9 e 10 as amostras submetidas a 2,0 mgPCP/L e as 11, 12, 13, 14 e 15 as amostras submetidas a 10,0 mgPCP/L. Setas mostrando coluna com bandas mais fortes

Observa-se na Figura 5.4.3.1, que os padrões de DNA obtidos foram praticamente os mesmos ao longo do reator, nas diferentes concentrações de PCP, destacando-se apenas os pontos 1 e 2 nas amostras sem PCP, assim como os pontos 6 e 7 e o ponto 11 das amostras submetidas, respectivamente, a 2,0 mgPCP/L e a 10,

mgPCP/L, que parecem indicar uma maior quantidade de DNA, provavelmente por apresentarem maior concentração da população microbiana nestes pontos referentes à primeira parte do reator.

A Figura 5.4.3.2 apresenta o resultado da digestão com a enzima *AluI*. Observa-se que, nas amostras livres PCP, os padrões de banda nos pontos 1 e 2 são diferentes em relação às bandas obtidas nos pontos 3, 4 e 5. Os pontos iniciais apresentam maior número de bandas, indicando maior diversidade de grupos microbianos nesses pontos, que diminuem nos pontos finais. O mesmo fato pode ser visualizado para as amostras submetidas a 2,0 mgPCP/L. As setas na figura indicam as colunas. Nas amostras submetidas a 10,0 mgPCP/L não foi possível visualizar tais mudanças. Nota-se que, no início do reator, foi encontrada, uma maior concentração de DNA, podendo estar relacionada à uma maior atividade biológica nesses pontos. Outro fato interessante é a diferença de padrões entre as duas primeiras amostras, mostrando que após a adição de PCP no sistema, possivelmente, um grupo de microrganismos prevaleceu em relação aos demais, com formação de bandas bem mais fortes.

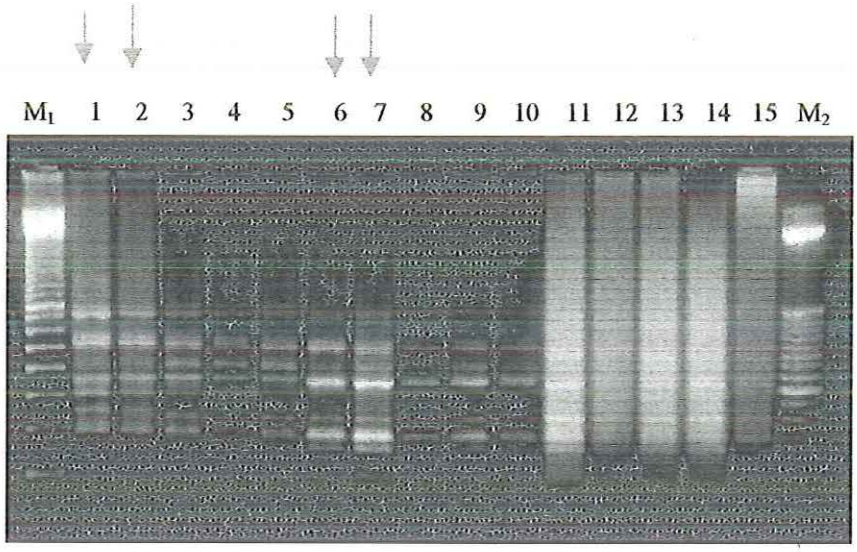


FIGURA 5.4.3.2 – Fotografia do gel com padrões ARDRA obtidos com a enzima de restrição *AluI* para as amostras 2,0 mgPCP/L, 10 mgPCP/L e sem PCP. As linhas M_1 e M_2 representam o marcador de fragmentos de DNA. de 100 pb e 50 pb, respectivamente. As linhas 1, 2, 3, 4 e 5 representam as amostras livres de PCP, as 6, 7, 8, 9 e 10 as amostras 2,0 mgPCP/L e as 11, 12, 13, 14 e 15 as submetidas a 10,0mgPCP/L. Setas mostrando colunas com maior números de bandas

A Figura 5.4.3.3 apresenta o resultado da digestão com a enzima *RSA*, onde é observado resultado semelhante ao obtido para a enzima *AluI*. Nas amostras livres de PCP, os padrões de banda nos pontos 1 e 2 são diferentes em relação às bandas obtidas nos pontos 3, 4 e 5. Os pontos iniciais apresentam mais bandas e de maiores intensidades que as dos pontos finais do reator. O mesmo fato pode ser visualizado para a mostra de 2,0 mgPCP/L. Amostras submetidas a 10,0 mgPCP/L foram prejudicadas, provavelmente, devido a uma baixa concentração inicial de DNA.

A diferença de padrões entre as duas primeiras amostras, mostrando que após a adição de PCP no sistema, possivelmente ocorreu predominância de um grupo de microrganismos, que pode ser evidenciada pela formação de bandas mais fortes. Nota-se que uma maior concentração de DNA no início do reator, foi encontrada podendo estar relacionada a uma maior atividade biológica nesses pontos.

Como os resultados obtidos confirmam os relatados anteriormente através dos exames microscópicos, concluiu-se que os padrões de ARDRA indicaram mudanças nas estruturas microbianas submetidas a PCP. Essas mudanças podem ser relacionadas à ocorrência de diminuição na diversidade microbiana após a introdução de PCP no sistema, prevalecendo em menor número de grupos microbianos. Pôde-se notar também diferenças nas estruturas microbianas da primeira parte do reator e da final.

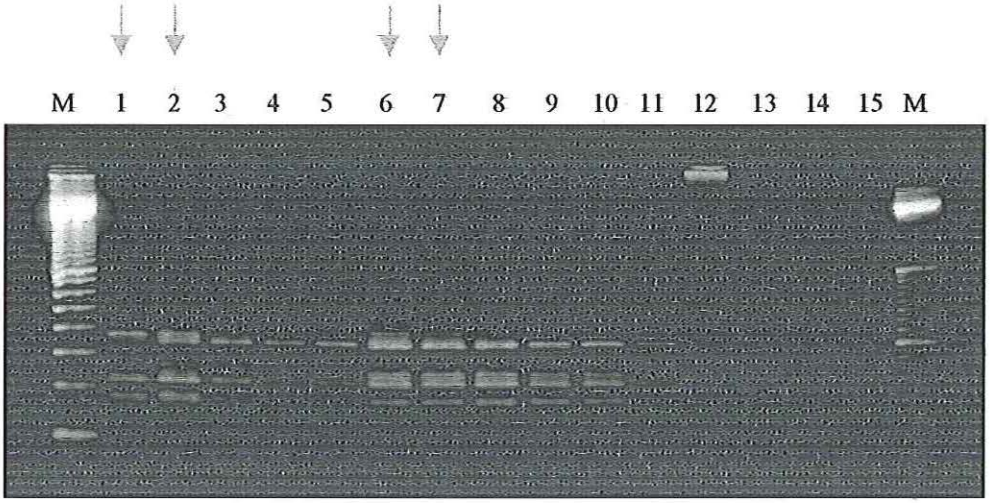


FIGURA 5.4.3.3 – Fotografia do gel com padrões ARDRA obtidos com a enzima de restrição *RSA* para as amostras 2,0 mgPCP/L, 10,0 mgPCP/L, e livre de PCP. M_1 e M_2 representam o marcador de fragmentos de DNA, com 100 pb e 50 pb, respectivamente. As linhas 1, 2, 3, 4 e 5 representam a amostra livre de PCP; as 6, 7, 8, 9 e 10, as amostras submetidas a 2,0 mgPCP/L e as 11, 12, 13, 14 e 15 as amostras submetidas a 10,0 mgPCP/L. Setas mostrando colunas com maior número de bandas

De acordo com LEHNINGER (1990), as enzimas de restrição são, substâncias que clivam, ambas as fitas de qualquer DNA, que apresentam seqüências de bases específicas, como exemplo a *HindIII* (uma enzima de restrição do *Hemophilus influenzae*) que corta o DNA quando encontra a seguinte seqüência: 5'-G-T-Py↓Pu-A-C-3', 3'-C-A-Pu ↓Py-T-G-5'. Dessa forma, cada enzima atuou em uma determinada seqüência do DNA.

Neste trabalho, o padrão ARDRA obtido com as enzimas *RSA* e *AluI* apresentaram mudanças entre as amostras livres ou não de PCP, demostrando que realmente ocorreu uma redução de grupos microbianos na população após a introdução desse pesticida, enquanto que a *Dde* não evidenciou diferenças nos padrões ARDRA entre as amostras, provavelmente por não apresentar sensibilidade entre os grupos microbianos presentes. A enzimas *AluI* apresentou maior número de

bandas e maior nitidez nos pontos iniciais do reator, podendo ser relacionados a uma maior atividade biológica nesses pontos.

O método ARDRA foi usado por MASSOL-DEYA *et al.* (1995) para estudar a estrutura de uma comunidade microbiana presente no biofilme de um reator de leito expandido. O biorreator, inicialmente inoculado com algumas linhagens de microrganismos, apresentou um padrão claramente alterado após a introdução de água subterrânea no sistema. Os autores (*opt.cit.*) ressaltaram também que esse método tem sido usado para examinar a estrutura de comunidades em biorreatores, em nível de espécies, e para verificar a abundância relativa de determinadas linhagens. WOOD *et al.* (1997) utilizaram o método para estudar a abundância da linhagem *Prevotella ruminicola* em ecossistemas anaeróbios do rúmen bovino. SMIT *et al.* (1997), também por este método, verificaram o efeito da contaminação do solo por cobre, na comunidade microbiana. O método permitiu verificar diferenças na comunidade e menor diversidade foi encontrada onde o solo foi contaminado em relação ao solo não contaminado.

A aplicação do método ARDRA no presente estudo foi muito importante, pois através dele pode-se confirmar as mudanças descritas anteriormente. As mudanças ocorridas em níveis discretos, de forma a não serem notadas nos exames microscópicos, foram detectados através do método ARDRA, bastante sensível. Além da sensibilidade, o método é simples, rápido e de fácil aplicação, podendo ser usado em monitoramento microbiológico de biorreatores anaeróbios de difícil monitoramento microbiano através de técnicas convencionais, como aquelas aplicadas ao estudo dos anaeróbios (VAZOLLER, 1995).

5.4.4 – Hibridação *Slot-Blot*

As hibridações *slot-blot* foram realizadas com o produto da PCR de *primers* universais (PU) e o Domínio específico *Archaea* (PA) .

Através das sondas utilizadas, foi possível identificar as seguintes populações: Domínio *Bacteria* (Bact) e *Archaea* (Arch). Dentro do Domínio *Bacteria* pesquisou-se as bactérias redutoras de sulfato (Srb) e no Domínio *Archaea* pesquisou-se a família *Methanobacteriaceae* (Mbact), gêneros *Methanobacterium e*

Methanobrevibacter e a ordem *Methanococcales* (Msar) Família *Methanosarcinaceae*, gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta*.

A Figura 5.4.4.2 apresenta o raio-X obtido no *slot-blot* das amostras livres de PCP e nas submetidas a 2,0 mgPCP/L e 10,0 mgPCP/L. Tentou-se estimar a porcentagem de cada grupo em relação ao total de microrganismos de acordo com o esquema abaixo (Figura 5.4.4.1):

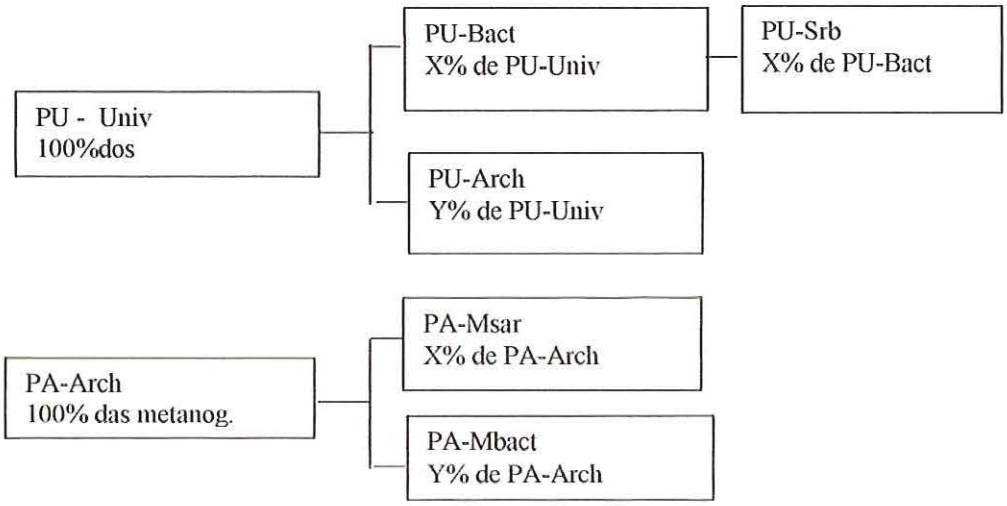


Figura 5.4.4.1 – Esquema elaborado para estimar as porcentagens dos grupos de microrganismos analisados pelo método *slot-blot*

A leitura da intensidade das bandas através do *Eagle-eye*, obtidas no raio X (Figura 5.4.4.2) poderia fornecer a porcentagem de cada grupo de microrganismo presente nas amostras analisadas e, desta forma, permitir semi-quantificar o material genético. Mas o resultado do *slot-blot* realizado não permitiu a leitura no *Eagle-eye*, talvez pela concentração insuficiente de material genético utilizado. A banda obtida foi de tamanho incompatível com a sensibilidade do aparelho. Conclui-se que o material genético extraído e amplificado não foi o suficiente para a análise de *slot-blot* apesar, de ter sido possível a hibridação, como apresentada na Figura 5.4.4.2.

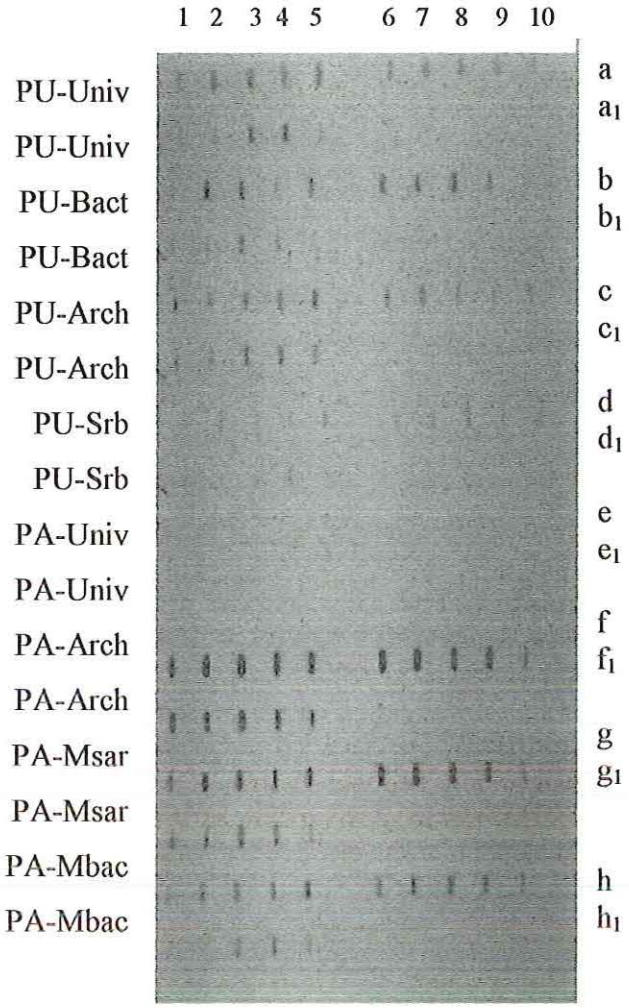


Figura 5.4.4.2 – Raio-X referente a análise *slot-blot* realizada para as amostras: livres de PCP (colunas: 1, 2, 3, 4 e 5 das linhas a, b, c, d, e, f, g e h), submetidas a 2,0 mgPCP/L (colunas: 6, 7, 8, 9 e 10 das linhas a, b, c, d, e, f, g e h); submetidas a 10,0 mgPCP/L (colunas: 1, 2, 3, 4 e 5 das linhas a_1, b_1, c_1, d_1, e_1, f_1, g_1 e h_1)

Apesar dos grupos não terem sido quantificados, o método permitiu afirmar, que os grupos analisados do Domínio *Bacteria* (Bact) e *Archaea* (Arch) estavam presentes, e que dentro do Domínio *Bacteria,* o grupo das bactérias redutoras de sulfato (Srb) apresentou-se em concentrações mínimas em relação `as metanogênicas representadas pelo Domínio *Archaea.* No Domínio *Archaea* observou-se que, da família *Methanobacteriaceae* (Mbact) e os gêneros

Methanobacterium e *Methanobrevibacter* estavam presentes em menores concentrações que os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta,* representados pela ordem *Methanococcales* (Msar) Família *Methanosarcinaceae.*

O método *slot-blot* tem a vantagem de obtenção de resultados exatos e precisos, porém é um método que exige mais tempo de trabalho, como por exemplo, o método ARDRA. Além de seguro o método permite a quantificação de grupos microbianos específicos e por isso tem sido empregado para o monitoramento de reatores e de comunidades microbianas. Autores como RASKIN *et al.* (1994a), (1995a e b) e (1996) e MOBARRY *et al.* (1996) usaram esta técnica para quantificar grupos microbianos específicos, em reatores anaeróbios e aeróbios. Entretanto, não foi verificado registro do uso desta técnica em reatores anaeróbios que degradam organoclorados.

Desta forma, os resultados obtidos nas análises de biologia molecular, com sondas moleculares - o *slot-blot*, mostraram que esta técnica pode proporcionar uma melhor caracterização das populações microbianas presentes, quando quantificadas, comparados com resultados baseados somente em morfologias ou método de cultivo. Além disso, o método ARDRA proporcionou a detecção de mudanças na população após a introdução do PCP e assim esta técnica pode ser usada com sucesso nos estudos da dinâmica de populações em reatores anaeróbios que degradam PCP para um melhor entendimento das condições de operação desses reatores.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- Nas condições estudadas e na ausência de PCP, a metanogênese do sistema RALHF foi estabelecida nos primeiros 30 dias de operação, com eficiência na remoção de DQO de 94%, sem ocorrer acúmulo de ácidos orgânicos voláteis e com pH próximo a 7,4. A produção de metano foi estabilizada em torno de 80 % (0,03054 μmol/L) no ponto A;

- A operação do sistema em presença de PCP, sem prévia adaptação do inóculo, não causou inibição na população microbiana, e a eficiência do reator na remoção de DQO foi em torno de 97% após adição de 2,0 a 13,0 mgPCP/L;

- O meio de cultivo (Zinder) e as fontes de carbono utilizados foram propícios ao crescimento dos grupos microbianos metanogênicos que predominaram no sistema;

- Os exames microscópicos não revelaram alterações significantes nas populações microbianas após a introdução do PCP;

- Os perfis de concentração de ácidos voláteis permitiram verificar que esses compostos foram consumidos na parte inicial do reator. Esses perfis também revelaram que o composto PCP não causou inibição no sistema de reação;

- Os perfis de concentração de PCP permitiram verificar que o esse composto desapareceu na parte inicial do reator. Os metabólitos TeCP, TCP e DCP foram detectados raramente, em concentrações mínimas, impossibilitando identificação da rota metabólica da degradação do PCP;

- Os tipos morfológicos microbianos presentes no reator, em ausência e em presença de PCP, examinados através das técnicas de microscopias foram semelhantes aos gêneros *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e *Methanospirilum* sp.;

- Na primeira terça parte do reator os tipos morfológicos predominantes, examinados através de técnicas microscópicas, foram semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.;

- A MEV permitiu verificar, nos pontos iniciais do reator 1 e 2, tanto na ausência e na presença de PCP, que os tipos metanogênicos acetoclásticos semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., apresentaram-se em maior número, com contornos bem definidos, sugerindo integridade das células, o que foi observado com menor freqüência pontos 3, 4 e 5;

- Os perfis bióticos e abióticos do reator permitiram concluir que, nas condições estudadas, a remoção da matéria orgânica, incluindo a de PCP, ocorreu na primeira terça parte do reator;

- Os ajustes do protocolo experimental para utilização do método da PCR com amostras oriundas do reator possibilitaram a amplificação do material genético da comunidade microbiana;

do número de bandas após a introdução de PCP, o que indica uma seleção de microrganismos presentes no reator;

- O método ARDRA também possibilitou a verificação de maior número de bandas nos pontos iniciais do reator (1 e 2) em relação aos outros pontos. A enzimas de restrição *AluI* foi responsável por maior número de bandas e melhor resolução nos pontos iniciais do reator, podendo estar relacionados a uma maior concentração de microrganismos, e portanto, à maior atividade biológica nesses pontos do reator em ausência e em presença de PCP;

- Através do método de hibridação *slot-blot* foi possível confirmar o predomínio Domínio *Archaea* em relação ao Domínio *Bacteria*. O Domínio *Archaea* foi representado, praticamente, pela ordem *Methanosarcinales* e esses resultados foram compatíveis com os dos exames microscópicos realizados, nos quais revelaram predominância de morfologias semelhantes aos gêneros *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.;

- Outro fato que confirma a remoção do PCP no RALHF, é que o reator recebeu uma carga total de aproximadamente 600 mg de PCP durante todo o experimento, o que proporcionaria uma saturação do meio suporte caso não fosse degradado e seria detectado no efluente.

Recomenda-se que:

- Nas condições estudadas, o tamanho do reator seja reduzido, em função da ocorrência das reações de degradação da matéria orgânica (inclusive PCP), e da integridade celular da população microbiana terem ocorrido na primeira terça parte do reator;

- Outras análises em Biologia Molecular a fim de maiores esclarecimentos em relação às espécies microbianas. Ainda, recomenda-se também a utilização do método ARDRA com determinados padrões microbianos a fim de detectar as populações presentes;

- Utilizar métodos complementares como ^{14}C para avaliar o metabolismo anaeróbio para a degradação de PCP em consórcios metanogênicos;

- Realizar estudos metabólicos de culturas puras de microrganismos do Domínio *Archaea*, oriundas de sistemas anaeróbios semelhantes ao estudado na presente tese, relacionadas com a degradação do PCP.

ANEXO A - TABELAS REFERENTES AOS VALORES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS, CH_4, PH E DQO NOS PRIMEIROS TRINTA DIAS DE OPERAÇÃO DO REATOR

TABELA 8.1 - Concentração de Ácidos Orgânicos Voláteis no efluente durante a partida do reator

Dias de Operação	Ác.Acet. mg/L	Ác.Prop. mg/L	Ác.Isob. mg/L	Ác.But. mg/L	Ác.Isoval. mg/L	Ác.Valér. mg/L	Ác.Capr. mg/L
2	441,9	12,4	6,3	12,5	6,8	0,2	2,1
7	498,8	13,4	8	6,5	7,6	3,4	2,5
9	603,6	21,8	15	13,3	14,6	0	0
16	131,9	41,3	8,1	3,1	9,5	1	2,5
19	56,4	5	9,4	1,4	11,7	1,1	2,1
21	65,3	8,3	17,3	8,4	16,9	0	0
26	18,4	2	5,8	2,3	5,4	1,1	0
30	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 8.2 - Concentração de metano nos pontos A, B e C durante a partida do reator

Concentração de metano			
Dias de operação	Ponto A – Conc.CH_4 . 10^{-3} moles/L	Ponto B– Conc.CH_4 . 10^{-3} moles/L	Ponto C– Conc.CH_4 . 10^{-3} moles/L
0	0	0	0
5	23,4	15	18,8
7	31,6	17	17,4
9	32	29,2	30,2
12	34	21	20,6
14	39,8	25,6	25,8
16	33	33,6	33,6
19	33,4	19,4	20,2
21	35,8	27	21,8
26	31,2	28,4	27,2
28	33,8	18,2	18,4
30	30,6	25	25

TABELA 8.3 - Variação de pH nos pontos: Entrada, ponto 3 ao longo do reator e saída, durante a partida do reator

Variação de pH			
Dias de operação	pH (entrada)	pH (ponto 3)	pH (saída)
0	7,3	7,4	8
5	7,3	7,1	7,7
7	7,4	7,2	7,9
9	7	7,2	7,6
12	7,2	7,2	8
16	7,2	7,21	8
19	7,25	7,28	8,2
21	7,1	7,4	7,6
26	7	7,7	7,4
28	7,06	7,4	8

TABELA 8.4 - Concentração de DQO e Eficiência de remoção durante a partida do reator

Dias de Operação	DQO de entrada (mg/L)	DQO de saída filtrada (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO (%)
0	3000	0	0
5	3119	1574	49
7	3119	1072	65
9	3070	1070	65
12	3047	547	82
16	3222	523	84
19	3074	360	88
21	3336	240	93
28	2934	191	93
30	2992	167	94

ANEXO B - EQUAÇÕES REFERENTES AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

1.) Equações referentes a curva de calibração de metano usadas

a) $[CH_4] = 6.10^{-5}$ x área do CH4 + 0,1371μmoles/ 0,5 mL
$[CH_4] = 6.10^{-5}$ x área do CH4 + $0,1371.10^{-6}$moles/ $0,5 .10^{-3}$L
$[CH_4]$ = moles/L

obs. utilizada até o 120 dias de operação do reator

b) $[CH_4]$ moles/ L = 5.10^{-8} x área CH4+ 6.10^{-5}/ $0,5.10^{-3}$
obs. utilizada até o final do trabalho

obs. $0,5.10^{-3}$ = volume de injeção = 0,5 mL = $0,5.10^{-3}$ L

2.) Equações referentes as curvas de calibração dos ácidos voláteis

a) Ácido acético:
[ác.acét.] mg/L = Fator de resposta + 0,0026/ 0,0039
Fator de resposta = Área do ácido acético/ Área do padrão interno (ácido crotônico)

b) Ácido propiônico:
[ác.prop.] mg/L = Fator de resposta + 0,0267/ 0,0247
Fator de resposta = Área do ácido propiônico/ Área do padrão interno (ácido crotônico)

c) Ácido isobutírico:
[ác.isobut.] mg/L = Fator de resposta + 0,1523/ 0,0485
Fator de resposta = Área do ácido isobutírico / Área do padrão interno (ácido crotônico)

d) Ácido butírico:
[ác.but.] mg/L = Fator de resposta + 0,1157/ 0,047
Fator de resposta = Área do ácido butírico / Área do padrão interno (ácido crotônico)

f) Ácido isovalérico:
[ác.isoval.] mg/L = Fator de resposta + 0,2164/ 0,0664
Fator de resposta = Área do ácido isovalérico / Área do padrão interno (ácido crotônico)

g) Ácidovalérico:
[ác.val.] mg/L = Fator de resposta + 0,1763/ 0,0674
Fator de resposta = Área do ácido valérico / Área do padrão interno (ácido crotônico)

f) Ácido capróico:

[ác.cap.] mg/L = Fator de resposta + 0,1457/ 0,0623

Fator de resposta = Área do ácido capróico / Área do padrão interno (ácido crotônico)

3.) Equações referentes as curvas de calibração do PCP

a) [PCP] mg/L = Área obtida. +1882723 / 2596612
obs. Equação usada para as amostras obtidas até 29/07

b) [PCP] mg/L = Área obtida. – 6389,62195 / $3,9913.10^6$
obs. Equação usada para todas as amostras obtidas à partir de 29/07

obs. As curvas para o triclorofenol e diclorofenol não foram apresentadas, pois os valores obtidos para esses intermediários foram descartados por ser muito baixos.

4.) Equações referentes as curvas de calibração da DQO

a) [DQO] mg/L = Absorbância – 0,0021/ 0,0004
obs. usada do inicio até o 93°. dia de operação do reator

b) [DQO] mg/L = 2380,95. Absorbância – 7,57
obs. usada do 93°. dia de operação do reator até 196°. dia de operação do reator

c) [DQO] mg/L = Absorbância – 0,00205/ 0,00041
obs. usada do 196°. dia até o final da operação do reator

ANEXO C – TABELAS REFERENTES AO ENSAIO EXPERIMENTAL DE CONCENTRAÇÕES DE DQO, METANO E PCP

TABELA 8.5: Concentração (mg/L) de DQO de entrada e saída no reator durante o período experimental.

Dias de operação do reator	*Concentração de PCP no afluente mg/l*	*$DQO_{afluente}$ mg/l*	*Média de $DQO_{afluente}$*	*$DQO_{efluente}$ mg/l*	*Média de $DQO_{efluente}$ (filtrada)*	*Eficiência do reator %*
0	0	3000 / 3002	3000	0	0	0
5	0	3119 / 3119	3119	1574/1574	1574	49
7	0	3119 / 3119	3119	1072/1072	1072	65
9	0	3070 / 3070	3070	1070/1070	1070	65
12	0	3097 / 2997	3047	547 / 547	547	82
16	0	3172 / 3272	3222	523 / 523	523	84
19	0	3072 / 3022	3074	364 / 357	360	88
21	0	3372 / 3300	3336	247 / 234	240	93
28	0	2947 / 2922	2934	194 / 189	191	93
30	0	2972 / 2992	2992	167 / 167	167	94
33	0	2722 / 2822	2772	147 / 149	148	95
35	0	3272 / 3247	3259	127 / 129	128	96
37	0	2947 / 2972	2959	122 / 119	120	96
40	0	3422 / 3272	3347	119 / 117	118	96
47	0	3297 / 3297	3297	111 / 111	111	97
49	0	3297 / 3272	3284	102 / 99	100	97
54	0	3284 / 3284	3284	87 / 64	75	98
57	0	2872 / 2922	2897	62 / 69	65	98
61	0	2822 / 2922	2872	97 / 102	99	96
68	0	2747 / 2922	2834	119 / 107	113	96
72	2	3097 / 3097	3097	124 / 122	123	96
75	2	3022 / 3122	3072	124 / 122	123	96
78	2	3422 / 3422	3422	97 / 109	103	97
83	2	3297 / 3297	3297	104 / 99	101	97
85	2	3397 / 3447	3472	72 / 69	70	98
86	2	2897 / 2897	2897	74 / 67	70	98
90	2	3322 / 3547	3434	72 / 72	72	98
93	2	3322 / 3072	3197	39 / 29	34	99
96	2	3322 / 3397	3359	64 / 57	60	98
103	2	3162 / 3138	3150	66 / 49	57	98
106	2	3067 / 2971	3019	59 / 66	62	98
110	2	3733 / 3686	3709	40 / 42	41	99
113	2	3067 / 3043	3055	37 / 35	36	99
120	2	3258 / 3210	3234	49 / 52	50	98
133	5	3253 / 3200	3226	44 / 47	45	99
138	5	3543 / 3543	3543	35 / 32	33	99
142	5	2900 / 2996	2948	38 / 42	40	99
144	5	2877 / 2662	2769	52 / 44	48	98
148	5	3067 / 2877	2972	71 / 66	68	98
151	5	3281 / 3162	3221	37 / 47	42	99
155	5	2686 / 2591	2638	37 / 42	40	98
162	5	2734 / 2996	2865	40 / 44	42	98
166	5	3091 / 2877	2984	47 / 44	45	98
175	8	3305 / 3258	3281	54 / 52	53	98

179	8	2972 / 2972	2972	63 / 52	57	98
182	8	2972 / 2972	2972	52 / 63	57	98
189	8	3205 / 3203	3204	54 / 75	64	98
190	8	3000 / 3000	3000	44 / 37	40	99
193	10	3091 / 3258	3174	56 / 54	55	98
196	10	2730 / 2681	2705	48 / 36	42	98
200	10	2730 / 2681	2705	43 / 38	40	98
207	10	2876 / 2876	2876	121 / 134	127	96
211	13	2925 / 2876	2900	109 / 104	106	96
214	13	2754 / 2998	2876	104 / 116	110	96
218	13	3193 / 2974	3083	102 / 114	108	96

TABELA 8.6: Concentração de CH_4 em mmol/L obtidos durante o período experimental

Dias de operação do reator	Concentração de PCP no afluente mg/l	Conc. A1 mmol/L	Conc. A2 mmol/L	Média - A mmol/L	Conc. B1 mmol/L	Conc. B2 mmol/L	Média - B mmol/L	Conc. C1 mmol/L	Conc. C2 mmol/L	Média - C mmol/L
5	0	0,02307	0,02394	0,02350	0,01845	0,01915	0,01880	0,01562	0,01491	0,01526
7	0	0,03154	0,03151	0,03153	0,01743	0,01756	0,01750	0,01748	0,01672	0,0171
9	0	0,03145	0,03258	0,03201	0,03045	0,03054	0,03050	0,02863	0,02996	0,0293
12	0	0,03424	0,03408	0,03416	0,02030	0,02114	0,02072	0,0215	0,02074	0,02112
16	0	0,03179	0,03416	0,03298	0,03411	0,03329	0,03370	0,03436	0,03339	0,03387
19	0	0,03287	0,03420	0,03353	0,02034	0,02021	0,02028	0,01993	0,01948	0,0197
21	0	0,03487	0,03700	0,03594	0,02672	0,02743	0,02708	0,02232	0,02139	0,02186
28	0	0,03371	0,03391	0,03381	0,01822	0,01827	0,01825	0,01856	0,01825	0,0184
30	0	0,03054	0,03057	0,03055	0,02467	0,02515	0,02491	0,02461	0,02528	0,02494
33	0	0,03740	0,03675	0,03708	0,02263	0,02165	0,02214	0,02126	0,02132	0,02129
35	0	0,03202	0,03153	0,03177	0,01873	0,01926	0,01899	0,0176	0,01801	0,0178
37	0	0,02682	0,02810	0,02746	0,02088	0,02130	0,02109	0,02162	0,02167	0,02165
47	0	0,03276	0,03279	0,03277	0,02062	0,02014	0,02038	0,00935	0,00927	0,00931
49	0	0,02931	0,03023	0,02977	0,02531	0,02520	0,02526	0,02465	0,02479	0,02472
54	0	0,03288	0,03460	0,03374	0,02728	0,02560	0,02644	0,02645	0,0257	0,02608
57	0	0,03336	0,03468	0,03402	0,02225	0,02193	0,02209	0,02231	0,02158	0,02194
61	0	0,03294	0,03457	0,03376	0,02425	0,02506	0,02466	0,02585	0,02546	0,02566
68	0	0,01866	0,01973	0,01919	0,01527	0,01560	0,01543	0,0158	0,01628	0,01604
72	2	0,01875	0,01839	0,01857	0,01542	0,01466	0,01504	0,01488	0,01507	0,01497
75	2	0,04263	0,04127	0,04195	0,03483	0,03260	0,03372	0,03447	0,03604	0,03525
78	2	0,03913	0,04021	0,03967	0,03743	0,03716	0,03730	0,03701	0,03707	0,03704
83	2	0,04277	0,04337	0,04307	0,03550	0,03476	0,03513	0,03541	0,03486	0,03514
86	2	0,03598	0,03632	0,03615	0,03161	0,03084	0,03122	0,03109	0,03144	0,03127
93	2	0,03025	0,03165	0,03095	0,02033	0,02120	0,02077	0,01891	0,0197	0,01931
96	2	0,03621	0,03549	0,03585	0,03193	0,03170	0,03181	0,03071	0,03037	0,03054
103	2	0,04336	0,04345	0,04341	0,03661	0,03674	0,03668	0,03581	0,03596	0,03589

106	2	0,04011	0,04096	0,04054	0,03843	0,03826	0,03834	0,03773	0,03791	0,03782
110	2	0,03491	0,03576	0,03533	0,03212	0,03223	0,03217	0,03068	0,03076	0,03072
113	2	0,04121	0,04227	0,04174	0,03450	0,03463	0,03457	0,03327	0,03389	0,03358
120	2	0,03806	0,03763	0,03785	0,02909	0,02843	0,02876	0,02943	0,02946	0,02945
133	2	0,03040	0,03049	0,03044	0,03432	0,03285	0,03358	0,03199	0,03047	0,03123
138	5	0,04749	0,04335	0,04542	0,03554	0,03526	0,03540	0,03692	0,03727	0,0371
142	5	0,03692	0,03803	0,03748	0,03459	0,03307	0,03383	0,03028	0,0299	0,03009
144	5	0,04495	0,04512	0,04503	0,03432	0,03498	0,03465	0,03602	0,03622	0,03612
148	5	0,03241	0,03207	0,03224	0,02212	0,02341	0,02276	0,01583	0,01545	0,01564
151	5	0,04218	0,04232	0,04225	0,03308	0,03488	0,03398	0,03172	0,03291	0,03232
155	5	0,03777	0,03786	0,03781	0,03394	0,03369	0,03382	0,03441	0,0344	0,03441
162	5	0,03911	0,04083	0,03997	0,02982	0,02886	0,02934	0,03026	0,03162	0,03094
166	5	0,03748	0,03691	0,03719	0,03538	0,03572	0,03555	0,03866	0,03157	0,03511
175	8	0,05011	0,05228	0,05120	0,03760	0,03748	0,03754	0,03825	0,03823	0,03824
179	8	0,04476	0,04480	0,04478	0,04073	0,04062	0,04068	0,04229	0,04241	0,04235
182	8	0,04256	0,04426	0,04341	0,04240	0,04253	0,04246	0,04371	0,04351	0,04361
189	8	0,04270	0,04673	0,04471	0,04268	0,04174	0,04221	0,04479	0,04457	0,04468
193	10	0,04361	0,04348	0,04354	0,03673	0,03654	0,03664	0,03551	0,03533	0,03542
196	10	0,04398	0,04592	0,04495	0,03900	0,03875	0,03887	0,04082	0,04155	0,04119
200	10	0,04897	0,04875	0,04886	0,04124	0,04109	0,04116	0,04174	0,04121	0,04147
207	10	0,04580	0,04443	0,04511	0,03390	0,03225	0,03307	0,02741	0,02664	0,02702
211	13	0,04541	0,05129	0,04835	0,03816	0,03648	0,03732	0,0378	0,03844	0,03812
214	13	0,04967	0,04928	0,04947	0,04318	0,04228	0,04273	0,04556	0,04563	0,0456
218	13	0,04723	0,04508	0,04616	0,03719	0,03515	0,03617	0,03503	0,03621	0,03562

TABELA 8.7: Concentração de PCP e seus metabólitos durante o período experimental

		Afluente	Afluente	Afluente	Efluente	Efluente	Efluente
Dias de operação do reator	Conc.teórica de PCP	Conc.PCP encontrada	Conc.Triclorofenol encontrada	Conc. Diclorofenol enconctrada	Conc.PCP encontrada	Conc.Triclorofenol encontrada	Conc. Diclorofenol enconctrada
72	2,0	3.02	0	0	0	0	0

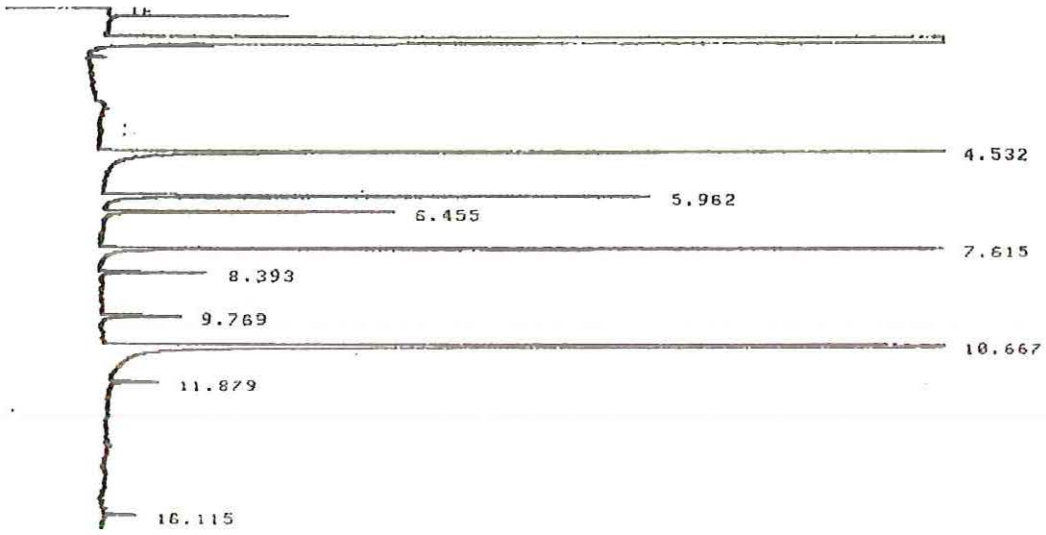
		2.89	0	0			
83	2	1.87	0	0	0	0	0
		1.85	0	0			
		1.81	0	0			
86	2	1.90	0	0	0	0	0
		2.02	0	0			
		1.81	0	0			
		1.76	0	0			
90	2	1.69	0	0	0	0	0
		2.05	0	0			
93	2	1.62	0	0	0	0	0
		1.91	0	0			
		1.87	0	0			
96	2	1.98	0	0	0	0.	0
		2.33	0	0			
		1.90	0	0			
		1.65	0	0			
103	2	2.59	0	0	0	0.	0
		2.38	0	0			
106	2	2.51	0	0	0	0	0
		2.28	0	0			
110	2	2.57	0	0	0	0	0
		2.58	0	0			
113	2	2.41	0	0	0	0	0
		2.17	0	0			
120	2	2.71	0	0	0	0	0
		2.33	0	0			
131	2	2.77	0	0	0	0	0
133	2	2.84	0	0	0	0	0
		2.82	0	0			
138	5	4.23	0	0	0	0	0
		4.00	0	0			
142	5	3.89	0	0	0	0	0
		3.89	0	0			

144	5	4.17	0	0	0	0	0
		3.99	0	0			
148	5	3.87	0	0	0	0	0
		3.99	0	0			
151	5	4.17	0	0	0	0	0
		4.06	0	0			
155	5	3.97	0	0	0	0	0
		3.90		0			
		3.89	0	0			
162	5	4.13	0	0	0	0	0
		4.24	0	0			
179	8	7.37	0	0	0	0	0
		7.25	0	0			
182	8	7.45	0	0	0	0	0
		7.79	0	0	0	0	0
189	8	9.7	0	0	0	0	0
		9.6	0	0	0	0	0
190	8	7.3	0	0	0	0	0
		7.2	0	0	0	0	0
193	10	11.2	0	0	0	0	0
		10.8	0	0			
		10.7	0	0			
		8.3	0	0			
196	10	8.1	0	0	0	0	0
		8.0	0	0			
200	10	9.7	0	0	0	0	0
		8.9	0	0			
207	10	13.3	0	0	0	0	0
		13.1	0	0			
211	13	13.3	0	0	0	0	0
		12.4	0	0			
214	13	12.7	0	0	0	0	0

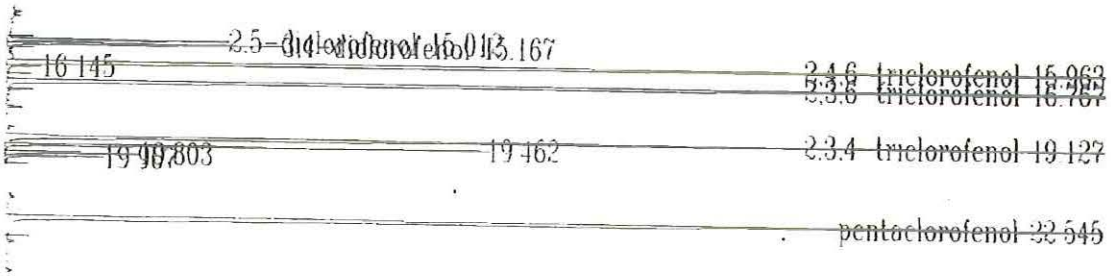
ANEXOS D – REFERENTE AOS CROMATOGRAMAS DE METANO, ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E PCP

a) Cromatograma CH_4

b) Cromatograma ácidos orgânicos voláteis



c) Cromatograma PCP



ANEXO E - TABELAS REFERENTES AOS PERFIS DE DQO, ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E PCP

Tabela 8.8 – Perfil de DQO no 47° de operação do reator, sem adição de PCP

Pontos no reator	*Concentração de DQO*
entrada	3297
1	177
2	127
3	111
4	109
5	119
saída	111

Tabela 8.9 – Perfil de DQO no 85° de operação do reator, com adição de 2mgPCP/L

Pontos no reator	*Concentarção de DQO*
entrada	3422
1	224
2	229
3	121
4	69
5	69
saída	69

Tabela 8.10 – Perfil de DQO no 120° de operação do reator, com adição de 2mgPCP/L

Pontos no reator	*Concentração de DQO*
entrada	3233
1	116
2	83
3	65
4	52
5	54
saída	49

Tabela 8.11 – Perfil de DQO no 166° de operação do reator, com adição de 5mgPCP/L

Pontos no reator	*Concentrção de DQO*
entrada	3095
1	185
2	54
3	46
4	41
5	47
saída	45

Tabela 8.12 – Perfil de DQO no 190° de operação do reator, com adição de 8mgPCP/L

Pontos no reator	*Concentração de DQO*
entrada	3000
1	189
2	70
3	58
4	50
5	44
saída	41

Tabela 8.13 – Perfil de DQO no 207° de operação do reator, com adição de 10mgPCP/L

Pontos no reator	*Concentração de DQO*
entrada	2876
1	232
2	153
3	80
4	80
5	92
saída	127

Tabela 8.14 – Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 47° de operação do reator, sem adição de PCP

	Ác.Acet.	Ác.Prop.	Ác.Isob.	Ác.But.	Ác.Isoval.	Ác.Valér.	Ác.Capr.
Entrada	480	0,81	0	0,4	0	0	5,63
P1	51	7,94	0,87	0,94	1,83	4,08	5,86
P2	7,83	0,99	0	0	0	1,83	0
P3	0	0	0	0	0	0	0
P4	0	0	0	0	0	0	0
P5	0	0	0	0	0	0	0
Saída	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 8.15 – Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 120° de operação do reator, com adição de 2mgPCP/L

	Ác.Acet.	Ác.Prop.	Ác.Isob.	Ác.But.	Ác.Isoval.	Ác.Valér.	Ác.Capr.
Entrada	606	10,5	5,3	9,7	3,8	3,2	2,3
P1	139	1,8	3,3	2,7	3,4	0	0
P2	6,2	0	0	0	0	0	0
P3	0	0	0	0	0	0	0
P4	0	0	0	0	0	0	0
P5	0	0	0	0	0	0	0
Saída	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 8.16 – Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 166° de operação do reator, com adição de 5mgPCP/L

	Ác.Acet.	Ác.Prop.	Ác.Isob.	Ác.But.	Ác.Isoval.	Ác.Valér.	Ác.Capr.
Entrada	620	3,48	1,93	11,77	2,08	0	0
P1	369	4,8	3,1	2,9	3,4	0	0
P2	0	0	0	0	0	0	0
P3	0	0	0	0	0	0	0
P4	0	0	0	0	0	0	0
P5	0	0	0	0	0	0	0
Saída	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 8.17 – Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 190° de operação do reator, com adição de 8mgPCP/L

	Ác.Acet.	Ác.Prop.	Ác.Isob.	Ác.But.	Ác.Isoval.	Ác.Valér.	Ác.Capr.
Entrada	648,1	0	0	0	0	0	0
P1	91,7	5,6	3,3	4,6	1,1	0	0
P2	9,2	0	0	0	0	0	0
P3	0	1,9	0	0	0	0	0
P4	0	0	0	0	0	0	0
P5	0	0	0	0	0	0	0
Saída	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 8.18 – Perfil de Ácidos orgânicos Voláteis (mg/L) no 207° de operação do reator, com adição de 10mgPCP/L

	Ác.Acet.	Ác.Prop.	Ác.Isob.	Ác.But.	Ác.Isoval.	Ác.Valér.	Ác.Capr.
Entrada	661	0	0	0	0	0	0
P1	130,7	0,8	3,5	7,1	3,9	9,5	0
P2	8,4	0	0	0	0	0	0
P3	8,7	0	0	0	0	0	0
P4	0	0	0	0	0	0	0
P5	0	0	0	0	0	0	0
Saída	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 8.19 – Perfil de PCP no 120° de operação do reator, com adição de 2mgPCP/L

Pontos do reator	*Conc.PCP mg/L*
Entrada	2,52
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
Saída	0

Tabela 8.20 — Perfil de PCP no 166° de operação do reator, com adição de 5mgPCP/L

Pontos do reator	*Conc.PCP mg/L*
Entrada	4,24
1	0,73
2	0
3	0
4	0
5	0
Saída	0

Tabela 8.21 – – Perfil de PCP no 190° de operação do reator, com adição de 8mgPCP/L

Pontos do reator	*Conc.PCP mg/L*
Entrada	7,01
1	0,205
2	0,175
3	0
4	0
5	0
Saída	0

Tabela 8.22 – – Perfil de PCP no 207° de operação do reator, com adição de 10mgPCP/L

Pontos do reator	*Conc.PCP mg/L*
Entrada	9,76
1	0,643
2	0
3	0
4	0
5	0
Saída	0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, E.W.; OERTHER, D.B.; LARSEN, N.; STHAL, D.A.; RASKIN, L. 1996 The oligonucleotide probe database *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n.10, p. 3557-3559.

AMERICAN PUBLIC ASSOCIATION, 1992 American Water Works Association, Water Polution Control Federation – *Standard Methodos for the Examination of Water and Wasterwater* 18.ed., Publication Office. American Public Association, Washington.

ANGELIDAKI, I.; PETERSEN S. P.; AHRING B.R. 1990 Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addtion of bentonite *Applied Microbiology Biotecnology*, n.33, p. 469 - 472.

BALDOCHI V. M. Z. 1990 *Comportamento dos ácidos voláteis no processo de estabilização anaeróbia dos resíduos sólidos urbanos em aterro sanitário*. São Carlos, 172p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BARKOVSKII, A. L. ; ADRIENS, P. 1996 Microbial dechloration of historically present and freshly spiked chlorinated dioxins and diversity of dioxin-dechlorination populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 12, p. 4556-4562.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY 1988 Archaeabacteria. 1°. ed (Eds) J.T.Stanley, M.P.Bryant, N.Pfenning, J.G. Holf.Baltimore, Willians & Wilkins,v.3.

BOLAÑOS ROJAS, M.L. 1996 *Estudo comparativo da capacidade de inóculos de diferentes fontes de degradar PCP sob condições anaeróbias*. São Carlos. 134p.

Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BOYD, S. A.; SHELTON, D. R. 1984 Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and aclimated sludge *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n.2, p. 272-277.

BRANCO, S.M. 1995 *O meio ambiente em debate* São Paulo, ed.Moderna, p.88.

BRYANT, F. O.; HALE, D. D.; ROGERS, J. E.; 1991 Regiospecific dechlorination of pentachlorophenol by dicorophenol-adaped microorganisms in freshwater, anaerobic sediment slurries *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.8, p. 2293-2301.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.; PAKER, J. 1994 *Biology of microorganisms* 7.ed. New Jersey, A Simon & Schuster Company Englewood Cliffs.

CHANAMA, S.; CRAWFORD, R.L. 1997 Mutation analysis of *pcp*A its role in pentachlorophenol degradation by *Sphingomonas (Flavobacterium) chorophenolica* ATCC 39723 *Applied and Environmental Microbiology*, v.63 n.12, p. 4833-4838.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z. 1997 *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLP)*. São Carlos, 174p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DENNIE, D.; GLADU I.; LÉPINE, F.; VILLEMUR, R.; BISAILLON, J. G.; BEAUDET, R. 1998 Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 *Applied and Environmental Microbiology*, v.64 n.11, p. 4603-4606.

DEWEERD, K. A.; MANDELCO, L.; TANNER R. S.; WOESE C.R.; SULFITA, J. M. 1990 *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov. a novel anaerobic dehalogenating, sulfate-reducing bacterium *Arch. Microbiol.*, n. 154, p.23-30.

DIETRICH, G.; WINTER, J. 1990 Anaerobic degradation of chlorophenol by na enrichment culture *Applied Microbiology Biotechnol.*, 34, p. 253-258.

DISTEFANO, T.D.; GOSSET, J.M. ; ZINDER, S. H. 1991 Reductive dechloration of high concentrations of tetrachlorethene to ethene by na anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.8, p. 2287-2292.

DIXON, B. 1996 Bioremediation: Can the public accept it? *Animalcules*, v. 62. n.9, p. 461-462.

DODDEMA, H.J.;VOGELS, G . 1978 Improved indentification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy *Appl. Environ. Microbiol.*,v.36, p.752-754.

DOLFING, J.; TIEDJE, J. M. 1986 Hydrogencycling in a threee-tiered food web growing on the methanogenic conversion of 3-chloro-benzoate *FEMS Microbiology Ecology* v.38, p.293-298

DOONG, R.; WU, S. 1995 Enhanced biodegrdation of carbon tetrachoride by the supplement of substrate and mineral ions under anaerobic condition *Water environment research* v.67, n.3, p.276-281.

DULFER, W. J. ; GOVERS, H. A. J. 1996 Membrane-water partitioning of polychlorinated biphenyls in small unilamellar resides of four saturated phosphatidylcholines *Environ. Sci. Technol*, v. 29, p. 2548-2554.

EMBLEY, M.; STACKEBRANDT, E. 1996 The use of 16S ribosomal RNA sequences in microbial ecology. In: PICKUP, R.W.; SAUNDERS. Molecular approaches to environmental microbiology J.R.Cambridge, Ellis Horwood Limited, Cap.3, p.39-62.

FANTROUSSI, S.E.; MAHILLON, J.; NAVEAU, H.; AGASTHOS, S.N. 1997 Introduction of anaerobic dechlorinating bacteria into soil slurry microcosms and nested-PCR monitoring *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n.2, p. 806-811.

FATHEPURE, B. Z. ; BOYD, S. A. 1988 Dependence of tetrachloroethyline dechlorination of methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina sp.* strain DCM *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n.12, p. 2976-2980.

FLEMING, B. I. 1995 Organochlorine in perspective Tappi proceedings, IN: *International Environmental conference proceedings* p.451 – 456.

FIELD, J. A. ; STAMS, A. J. M. ; KATO, M. ; SCHRAA, G. 1995 Enhanced biodegradaton of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 67, p. 47-77.

FLORENCIO, L. 1994 *The fate of methanol in anaerobic bioreactors* p.137 thesis Wageningen, van Landbouwuniversiteit te Wageningen

HEARD, I. M. 1998 Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology*, n. 144, p. 599-608.

HENDRIKSEN, H. V.; AHRING, B. K. 1992 Metabolism and Kinetics of pentachlorophenol transformation in anaerobic granular sludge *Applied and Microbiology Biotechnology*, v.37, p. 662-666.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K; WELLINGTON, E. M. H. 1997 Analysis of actinomycete commuities by gel-electrophoretic separation in denaturing gradients *Applied and environments microbiology* p. 3233-3241.

HOLLIGER, C. SCUMACHER, W. 1994 Reductive dehalogenation as a respiratory process *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 66, p. 239-246.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1987 World Heath Organization Pentachlorophenol, Genebra

JUTEAU, P.; BEAUDET, R.; MCSWEEN, G.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; BISAILLON, G. 1995 Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium *Applied Microbiology biotecchnology*, 44 , p.218-224.

KENNES, C. ; WU, W. M. ; BHATANAGAR, L. ; ZEIKUS, J. G. 1996 Anaerobic dechloration and mineralization of pentachlorophenol and 2, 4, 6-triclorophenol by methanogenic pentachlorophenol- degrading granules *Applied and Microbiology Biotechnology*, v. 44, p. 801-806.

KIM, I. G.; NAM,S.K.; SOHN,J.H.; RHEE, S.K.; NA,G.H.; LEE, S.H.; CHOI,E.S. 1998 Cloning of the ribossomal protein L41 gene of *phaffia rhodozyma* and its use as a drug resistance marker for transformation *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n.5, p. 1947-1949.

KIM, J.; RHEE, G. Y. 1997 Population dynamics of polychorinated biphenyl-dechorinating microorganisms in contaminated sediments *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n.5, p. 1771-1776.

LANE, D.J. 1991 *16S/23S rRNA Sequencing* In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. England, JOHN WILEY & SONS, Cap.6, p.115-147.

LARIZZATI, S. F. 1997 *Avaliação anaeróbia do pentaclorofenol por consórcios metanogênicos enriquecidos.* São Carlos. p. 138. Dissertação (mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

LEHNINGER, A. L. 1986 Short course biochemistry New York, Worth Publish, 452p.

LÉPINE, F.; BISAILLON, J.-G.; MILOT, S.; KHALILD, T. H.; BEAUDET,R.; VILLEMUR,R. 1996 Transformation of Phenol into Phenylalanine by a methanogenic consortium *Applied and environmental microbiology* n.3,v.62, p.809-814.

LÉVESQUE, M.J.; BEAUDET, R.; BISAILLON,J.G.; VILLEMUR, R. 1998 Quantification of *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 and *Clostridium*-like strain 6 in mixed bacterial populations by competitive polymerase chain reaction *Journal of microbiological methods* n.32,p.263-271.

LIN, C.; RASKIN, L.; STHAL, D.A. 1997 Microbial community struture in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes *FEMS Microbiology ecology* n.22, p.281-294.

MADSEN, T.; LIGHT, D. 1992 Isolation and characterization of na anaerobic chlorophenol transforming bacterium *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n.9, p. 2874-2878.

MAGNUSON , J. K.; STERN, R. V.; GOSSET, J. M.; ZINDER, S. H.; BURRIS, D. R. 1998 Reductive dechlorinationof tetrachloroethene to ethene

by a two component enzyme pathaway *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n.4, p. 1270-1275.

MANUAL BOEHRINGER MANNHEIM/BIOCHEMICA (1998).

MASSOL-DEYA, A. A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R.F.; TIEDJE, J. M. 1995 Bacterial community finger printing of amplified 16S and 16-235 ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA) *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.3.2; 1-8.

McALLISTER, K. A. ; LEE, H. ; TREVORS, J. T. 1996. Microbial degradation of pentacholophenol. *Biodegradation*, v. 7, p. 1-40.

MIGUEZ C.B.; SHEN, C.F.; BOURQUE, D.; GUIOT, S.R.; GROLEAU, D. 1998 Monitoring methanotrophic bacteria in hybrid anaerobic-aerobic reators with PCR and a catabolic gene probe *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n.2, p. 381-388.

MIKESELL, M. D.; BOYD, S. A. 1990 Dechloration of chloroform by *Methanosarcina* strains *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n.4, p. 1198-1201

MOBARRY, B. K.; WAGNER, M.; URBAIN, V.; RITTMANN, B.E.; STAHL,.D. A. 1996 Phylogenetic probes for analizing abundance and spatial organization of nytryfying bacteria *Applied and environments microbiology*. p. 2156-2162.

MOHN, W. W.; TIEDJE, J. M. 1992 Microbial reductive dehalogenation *Microbial Reviews*, v. 56, n. 3, p. 482-507.

MOHN, W. W.; KENNEDY, K. J. 1992 Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludge granules *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n.7, p. 2131-2136.

MURRAY, E. A.; HOLLYBANGH, J. T.; ORREGO, C. 1996 Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California Estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments *Applied and environments microbiology*. p. 2676-2680.

MUYZER, G; RAMSING, N.B. 1995 Molecular methodes to study the organization of microbial comunities *Wat. Sci. Tech.* v. 32, n. 8 p 1-9.

NICHOLSON, D. K. ; WOODS, S. L. ; ISTOK, J. D. ; PEEK D. C. 1992 Reductive dechloration of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n.7, p. 2280-2286.

NG, A.; MELVIN, W. T.; HOBSON, P. N. 1994 Identification of anaerobic digester using a polimerasechain reaction method *Bioresource Technology*. v. 73, p. 80.

OLIVEIRA, S. S. 1998 *Avaliação do pentaclorofenol de um lodo anaeróbio termófilo na biodegradação do composto pentaclorofenol (PCP)*. São Carlos, p. 130. Dissertação (mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

PACE, N.R.; 1996 New perspective on the natural microbial word: molecular microbial ecology *ASM News* v.62, n.9, p.463-470.

PACE, N.R. 1997 A molecular view of microbial diversity and the biosphere *Science* v.276, p.734-740.

PACE, N.R. 1999 Ecology microbial & diversity- the advent of modern microbiology *ASM Centennial,* v.65, n.5, p.328-333.

O'REILLY, K. T.; CRAWFORD, R. L. 1989 Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized Flavobacterium cells *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n.9, p. 2113-2118.

PELCZAR, M. J. 1981 Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, vol I.

RADEHAUS, P.M.;SCHIMIDT,S.K. 1992 Characterization of a novel Pseudomonas sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n.9, p. 2879-2885.

RASKIN, L.; AMANN, R I.; POULSEN, L.K.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. 1994 Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reators by oligonucleotide probe hibridization *Applied and environments microbiology*. p. 1241-1248.

RASKIN, L.; POULSEN, L. K.; NOGUERA, D.R.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. 1995 Use of ribosomal RNA- basead molecular probes for characterization of complex microbial comunities in anaerobic biofilms *Wat. Sci. Tech.* vol. 31, nº 1, p. 261-272.

RASKIN, L.; ZHENG, D.; GRIFFIN, M.E.; STROOT, P.G.; MISRA P. 1995 Characterization of microbial communities in anaerobic bioreators using molecular probes *Antonie van Leewenhoek* n.68, p.297-308.

RASKIN, L.; RITTNANN, B.E., STHAL D.A. 1996 Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaeroic biofilms *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n.10, p. 3847-3857.

RAVAN, R.; ZEHNDER, A. J. R.; van der MEER, J. R. 1998 Low-frequency horizontal transfer of na element containing the chlorocatecol degradation genes from *Pseudomonas sp.* strain B13 to *pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n.6, p. 2126-2132.

REYES, L. F.; RITTER, W.; RASKIN, L. 1997 Group-Specific Small-Subunit rRNA hibridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems *Applied and environments microbiology.* p. 1107-1117.

ROBISON, R. W.; AKIN, D. E. ; NORDSTEDT, R. A.; THOMAS, M. V.; ALDRICH, H. C. 1984 Light and eletron microscopic examinations of methane producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, n.1, p. 127-136.

ROSADO, A.S.; DUARTE, F. D.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D.V. 1997 Molecular microbial ecology: A Minireview. *Revista de microbiologia.* 28 : 135-147

SELENSKA-POBELL, S. 1995 Detection of mRNA and rRNA via reverse transcription and PCR in soil *Molecular Microbial Ecology Manual.* 2. 7. 5; 1-14.

SHELTON, D.R., TEIDJE,J.M. 1984 Isolation and partial characterization of bacteria in an naaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, p. 840-848

SMALA, K. 1995 Extraction of microbial DNA from sewage and manure slurries *Molecular Microbial Ecology Manual.* 1.1.3. 1-10.

SMITH, M.H.; WOODS, S.L. 1994 Regiospecificity of chlorophenol reductive dechlorination by vitamin B_{12s} *Applied and Environmental Microbiology*, v.60 n.11, p. 4111- 4115.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K.; 1997 Detection of in microbial community struture and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis *FEMS Microbiology ecology* n.23, p.249-261.

SPEECE, R. E. 1996 Toxicity response. In: *Anaerobic biotechnology- for industrial waste waters.* Nasville, Archa e Press, Cap. 10, p. 245-283.

STAHL, D.A.; FLESHER, B.; MANSFIELD, H.R.; MONTGOMERY, L. 1988 Use of phylogenetically basead hibridization probes for studies of ruminal microbial ecology *Applied and environments microbiology,* p. 1079-1084.

STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. 1991 Polimerase chain reaction: Applications in environmental microbiology *Annu. Rev. Microbiol.* n.45, p.137-161.

STOFFELS, M.; AMANN, R.; LUDWING, W.; HEKMAT, D.; SCHLEIFER, K.H. 1997 Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds *Applied and Environmental Microbiology*, v.64 n.3, p. 930-939.

STUART, S. L.; WOODS, S. L.; LEMMON T. L.; INGLE, J. D.; JR 1998 The effect of redox potencial changes on reductive dechloration of acetate by a mixed, methanogenic culture *Biotechnology and bioengineering* v.63, n.1, p.69-77.

TARTAKOVSKY, B. ; LEVESQUE, M. J. ; DUMORTIER, R.; BEAUDET, R.; GUIOT, S. R. 1999 Biodegradation of pentachlorophenol in a continuos anerobic reactor angmentd with *desulfitobacterium frappieri* PCP-1 *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n.10, p. 4357- 4362.

TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. 1996 Molecular identification of bacteria from cocultureby denaturing gradient gel electrophoresis os 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures *Applied and environments microbiology*. p. 4210-4215.

THE MERCK INDEX, 1976 Merck & CO., INC. Rahway, N.J., U.S.A. ed.09.

TOWNSEND, G. T. ; SUFLITA, J. M. 1996 Characterization of chloroethyline dehalogenation by cell extracts of *Desulfomonile tiedjei* and its relationship to chlorobenzenoato dehalogenation *Applieds and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 8, p. 2850-2853.

TOWNSEND, G. T.; RAMANAND, K.; SUFLITA, J. M. 1997 Reductive dehalogenation and mineralization of 3- chlorobenzoate in the presence of sulfate by microorganisms from a methanogenic aquifer *Applieds and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 7, p. 2785-2791.

UTKIN, I.; WOESE,C.; WIEGEL, J. 1994 Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov.,na anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds *International journal of bacteriology* v.44,n.4, p.612-619.

VAN DER EEKERT, M. H. A.; SCHRÖDER, T. J. ;STAMS, A. J. M.; SHRAA, G.;FIELD, J. A. 1998 Degradation and fate of carbon tetrachloride in unadapted methanogenic granular sludg. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 7, p. 2350-2356.

VAN DER MEER,J.R.;LEVEU,J.;WERLEN,C. 1994 Genetic adaptation of microrganisms to enviromental pollutants *Eawag News*, v.35E, p.8-15.

VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; VAZOLLER, R. F.; FORESTI, E. 1997 Microbial colonization of polyurethane foam matrices in

horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reator *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 48, p.534-538.

VAZOLEER, R. F. 1995 *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. São Carlos. 259p. Tese (doutorado).-Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

WARD, B.B.; VOYTEK, M.A.; WITZEL, K.P. 1996 Phylogenetic diversity of natural populations of ammonia oxidizers investigated by specific PCR amplification *Microbial ecology* n.33, p.87-96.

WIEGEL, J.; ZHANG, X.; WU, Q. 1999 Anaerobic dehalogenation of hydroxylated biphenyls by *Desulfitobacterium dehalogenans* *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n.5, p. 2217- 2221.

WOLFAARDT, G. M. ;LAWRENCE, J. R. ; ROBARTS, R. D. ; CALDWELL, D. E. 1995 Bioaccumulation of the herbicide diclofob in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during stareation *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 1, p. 152-158.

WOOD, J.M.; AUGUSTIN, G.; SCOTT, P. K.; FLINT, H. J. 1997 Assessment of the relative abundance of *Provotela ruminicola* strains in the rumen ecosystem by restriction enzime profiling of PCR products *Microbial physiology and gene regulation*. p. 100- 101.

WU, W.M.; HICKEY, R. F.; ZEIKUS, J. G. 1991 Characterization of metabolic performace of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.12, p. 3438-3449.

EESC - USP
Biblioteca
CAMPUS DE S. CARLOS

WU, W.M.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, J. G. 1993 Performace of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n.2, p. 389-397.

YE,D.; QUENSEN III,J.F.; TIEDJE, J.M.; BOYD, S.A. 1995 Evidence for *para* Dechlorination of polychorobiphenyls by methanogenic bacteria *Applied and Environmental Microbiology*, v.61 n.6, p.2166-2171.

YOUNG, L. Y. ; CERNIGLIA, C. E. 1995 Microbial transformation and degradation of toxic organic chimicals New York, Chichester, Brishane, Toronto e Singapore, A. John Wiley & Sons, Inc., Publication.

ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. 1994 Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia*. v. 11, n. 2, p. 33.

ZINDER, S.H.; CARDEWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. 1984 Metanogenisis in a thermophilic (58 °C) anaerobic digestor: Methanothrix sp as na important aceticlastic mehanagem. *Applied and Environmetal microbyology*. 47, p. 796-807.

APÊNDICE 1 - PADRONIZAÇÃO DE NOMENCLATURA DE SONDAS

A padronização de nomenclatura de sondas publicadas por ALM et al. (1996) incluiu na nomenclatura informações precisas a respeito das sondas e dos *primers*. Tal procedimento consiste em sete componentes combinados seqüencialmente apresentado na TABELA A1. e como exemplo têm-se a sonda : S-D-Bact-0338-a-A-18.

TABELA A.1 - Nomenclatura de sondas e *primers*, de acordo com ALM et al. (1996)

1) Indicação do gene alvo usa-se uma letra maiúscula. Adicionar um hífen.	Exemplo: "S" para a pequena (small) subunidade do rRNA	Exemplo de montagem do nome: S-
2) Indicação do grupo taxonomico que a sonda abrange: K:reino, D: domínio, P: filo, O: ordem, Sc: subclasse, F: família, G: gênero, S: espécie, Ss: subspecie e St: linhagem . Usa-se uma letra maiúscula seguida do hífen.	Sondas universais ou que não descrevem um grupo taxonomico coerente deverá apresentar o símbolo "*".	S-D-
3) Uma descrição abreviada, limitada de 3-5 letras, do grupo específico de gene, superfamília de gene ou grupo taxonomico ou filogenético que a sonda abrange, seguido do hífen.	Exemplo: "Bact" para o domínio Bateria	S-D-Bact-
4) Um número indicando a posição 5' no filamento do ácido nucleico no sentido complementar para o final 3' seguido do hífen. FIGURA X	Exemplo: 0338 obs. Para sondas de rRNA usa-se como número de referência o do nucleotídeo referente ao gene 16S rRNA da *Escherichia coli*.	S-D-Bact-0338
5) Uma letra minúscula que indica a versão da sonda, seguido do hífen.	Exemplo: a- "a" para a primeira versão, "b" para a segunda que é diferente da primeira.	S-D-Bact-0338-a-
6) Uma letra maiúscula indicando se a seqüência da sonda é identica ao sentido do DNA (S) ou o antisentido (A), seguido do hífen.	A-	S-D-Bact-0338-a-A-
7) O número de nucleotídeos da sonda	18	S-D-Bact-0338-a-A-18

APÊNDICE 2 – TABELAS REFERENTES A PREPARAÇÃO DAS SONDAS

TABELA 4.8 - Reação de marcação das sondas

Reagentes	Volume utilizado	Conc.final
tampão 10x	5 µl	1x
DIG-11-dUTp	2,5 µl	0,05 mM
Oligonucleotídeo	10 µl (2000 pmoles)	5µM
dATP (10 mM)	2,5 µl	0,5 mM
terminal transferase (18,6 v/µl)	5µl	1,86 v/µl
Água	25 µl	-
Volume total	50 µl	-

Fonte: BOEHRINGER MANNHEIM / BIOCHEMICA, 1998

TABELA 4.9 - Diluições das sondas marcadas

	TE	diluição
2 µl sonda marcada	98 µl	1:50
10 µl sol. acima	40 µl	1:250
10 µl "	40 µl	1:1250
10 µl "	40 µl	1:6250
10 µl "	40 µl	1:31250

Fonte: BOEHRINGER MANNHEIM / BIOCHEMICA, 1998

TABELA 4.10 - Diluições do DNA padrão

	TE	diluição
2 µl DNA padrão	38 µl	1:20
5 µl sol. acima	45 µl da sol. acima	1:200
5 µl sol. acima	45 µl da sol. acima	1:2000
5 µl sol. acima	45 µl da sol. acima	1:20000
5 µl sol. acima	45 µl da sol. acima	1:200000

Fonte: BOEHRINGER MANNHEIM / BIOCHEMICA, 1998