Campus de São Carlos

**BIOFILMES ANAERÓBIOS:
DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA
USANDO A HIBRIDAÇÃO IN SITU COM
SONDAS FLUORESCENTES**

Juliana Calábria de Araujo

ORIENTADOR: Profa. Dra. Rosana F. Vazoller

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 01 / 06 / 01

Ass.: Guilherme

**BIOFILMES ANAERÓBIOS:
DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA
USANDO A HIBRIDAÇÃO *IN SITU* COM
SONDAS FLUORESCENTES**

Juliana Calábria de Araujo

DEDALUS - Acervo - EESC

31100017504

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

São Paulo, 27 de Março de 2001

Class.	TESE
Cutt.	0375
Tombo	T0119/01

1185 046

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

A663b

Araujo, Juliana Calábria de

Biofilmes anaeróbios : desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes / Juliana Calábria de Araujo. -- São Carlos, 2001.

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

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosana Filomena Vazoller.

1. Biofilmes anaeróbios. 2. Hibridação *in situ*. 3. Metanogênicas. 4. Robins device modificado. 5. Sondas de oligonucleotídeos. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: Bióloga **JULIANA CALÁBRIA DE ARAUJO**

Tese defendida e aprovada em 11-05-2001
pela Comissão Julgadora:

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

Prof. Titular **JOSÉ ROBERTO CAMPOS**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)

Prof. Doutor **RENÉ PETER SCHNEIDER**
(Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)

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

Profa. Doutora **ANA FERNANDEZ SCAVINO**
(Universidad de La Republica Uruguay)

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

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

Aos meus pais,

Joilce (*in memoriam*) e Sandra

“ A Vida é o bem mais precioso do ser humano, mas a vida sem liberdade não tem qualquer significado, nem dignidade.”

(Autor desconhecido).

AGRADECIMENTOS

À Professora Rosana Filomena Vazoller pela amizade, apoio, orientação, pela paciência, pelo envio das VEJAs em todo período que estive fora, mas principalmente, pelo incentivo antes e durante a elaboração deste trabalho.

Ao Professor José Roberto Campos pelo apoio, incentivo, amizade e obtenção de verba junto à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

Ao Professor Alexander Zehnder pela oportunidade concedida de estagiar seis meses no EAWAG (Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology) de Dübendorf, Suíça, onde pude aprender várias técnicas de biologia molecular e desfrutar de um ambiente de pesquisa extremamente produtivo e agradável.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de doutorado através do processo n.96/09982-3.

Ao Professor Renato Mortara do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, UFESP, pelas observações das amostras sob microscopia confocal de varredura a laser, pelas sugestões e ajuda com os artigos a serem publicados.

Aos pesquisadores do EAWAG, do departamento de Microbiologia, Dr. Hauke Harms, Jan Roelof van der Meer, Mary Power, pelos

ensinamentos, discussões, críticas e pelo apoio durante todo o tempo em que estive em Dübendorf .

Ao Dr. Kevin Purdy, da unidade de biologia molecular do Museu de História Natural de Londres pela ajuda no tratamento dos dados e pelas críticas e sugestões durante a preparação do manuscrito.

Ao Donato Seiji Abe, do Instituto Internacional de Ecologia de São Carlos, pela sua boa vontade em vir tirar dúvidas no período que estava iniciando as minhas hibridações e por compartilhar sua experiência com o FISH.

À Paula Kover, minha amiga do Fundão (UFRJ), pela sua boa vontade em corrigir o primeiro manuscrito, pela força de sempre nos constantes momentos de crise com a ciência, pelo apoio nos EUA quando fui ao congresso em Chicago e acima de tudo pela amizade.

Ao Gunther, pela amizade, companheirismo no laboratório e pela super ajuda com o MRD, “cuidando” dos experimentos nos finais de semana.

Ao Dr. Gilson Manfio, da Fundação André Tosello de Campinas, por me permitir trabalhar no lab da Fundação assim que voltei da Europa e por dar todas as informações com relação aos locais para compra de reagentes e das sondas de oligonucleotídeos; e, às pesquisadoras da Fundação, Valéria, Cathia, Susy, Lyrian, Manuela, e a amiga Graziela pela ajuda e amizade durante esse período.

Ao professor Fazal Chaudhry pela disponibilidade com que sempre me ajudou, seja com o inglês dos manuscritos ou com as dúvidas de estatística.

Ao grande amigo Austin Andrade, estudante de doutorado do EAWAG, pelo apoio, carinho, pelas conversas regadas a chá que me ajudaram a passar o inverno, pelos sanduiches de salmão que inúmeras vezes me garantiram o almoço, mas principalmente por ter me acolhido junto aos seus familiares, Tony, Raphael e Susy, de modo que passei a ter uma família na Europa.

Ao casal Gaudenz e Elizabeth Hübscher pelo carinho e hospitalidade durante minha permanência em Wangen.

Aos colegas do EAWAG, Roald, Winfried, Christopher, Phillip, Marco, Caroline, Vladimir, Jtika, Michael, pela amizade, discussões e ajuda no laboratório.

À todos os amigos do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidraulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, pela amizade, pelas sugestões, pela ajuda nas horas difíceis quando o reator vazava, pela paciência quando tive que usar por longos períodos o microscópio de fluorescência, e principalmente pelo convívio agradável nesses anos de São Carlos.

Ao Ademir, funcionário da UFSCar, pela pronta ajuda na confecção do sistema MRD em acrílico, dos cupons, e de todas as outras “peçinhas” usadas no sistema experimental.

À Flavinha, da contabilidade, pela presteza e paciência com que sempre me atendeu e ajudou.

Às secretárias do departamento de Hidraulica e Saneamento, Cecília, Márcia, Vaderez, Pavi e Sá, pela presteza no atendimento e na ajuda.

Ao casal Sílvia e Orlando Fatibello pela amizade e carinho nos momentos que saía do laboratório desanimada.

Ao casal Fernanda e Pedro Caballero pela amizade, apoio e por tornarem a estadia em São Carlos mais agradável.

Aos meus avós Newlia e Danilo Calábria pelo amor, carinho e apoio incondicional em todos os meus projetos, mas principalmente, por tornarem viável a construção do meu “cantinho” em São Carlos.

À minha mãe, Sandra, e meus irmãos Rogério Augusto e Álvaro Ricardo, pelo carinho e apoio de sempre, mas principalmente pela compreensão da minha ausência durante todo esse tempo.

À Rogério, meu amor e amigo, pelo carinho, paciência, pelo tempo de espera e pela compreensão das longas horas que optei pelas bactérias e pelo micro.

À Todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e à DEUS, o meu sincero MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	viii
Lista de abreviaturas, siglas e glossário	ix
Lista de símbolos	x
Resumo	xi
Abstract	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1. Tratamento Anaeróbio	7
3.2. Definição de Biofilmes	14
3.2.1. Desenvolvimento do biofilme	15
3.3. Processos que governam a formação do biofilme	15
3.3.1. Processos relacionados a deposição	16
3.3.1.1. Aderência	16
3.3.1.2. Pré-condição de superfície	22
3.3.2. Processos de remoção do biofilme	25
3.4. Modelos conceituais sobre biofilmes	26
3.5. Robbins device, um dispositivo para estudar biofilmes	30
3.6. Uso do RNAr 16S em estudos de filogenia e identificação de células procarióticas	31
3.7. Taxonomia das <i>Archaeae</i> metanogênicas	33
3.8. Hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH)	38
3.9. Técnicas moleculares, incluindo o FISH, para avaliar comunidades microbianas naturais e de biorreatores operados para o tratamento de resíduos	43

3.10. Limitações da técnica FISH	73
4. MATERIAL E MÉTODOS	78
4.1. Sistema para o desenvolvimento de biofilmes e condições de operação	78
4.2. Desenvolvimento dos biofilmes e condições de cultivo	80
4.3. Descrição dos meios de cultura	86
4.4. Coloração dos polímeros extracelulares	90
4.5. Caracterização filogenética da comunidade microbiana através da técnica de hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes	90
4.6. Hibridações controles utilizando culturas puras	100
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
5.1. Introdução aos Resultados e Discussão	102
5.2. Experimentos com as três culturas puras em conjunto, CP1 e CP2	104
5.2.1. Experimento CP1	104
5.2.2. Experimento CP2	110
5.3. Experimentos com os lodos anaeróbios	122
5.3.1. Experimento LG1	122
5.3.2. Experimento LG2	129
5.3.3. Experimento LG3	131
5.3.3.1. Formação dos biofilmes em superfícies de vidro e polipropileno	144
5.3.3.2. Conclusões do experimento LG3	154
6. CONCLUSÕES GERAIS	157
7. PERSPECTIVAS	160
8. ANEXOS	162
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1- Representação esquemática da seqüência de etapas na colonização de superfícies por microrganismos (van LOOSDRECHT et al., 1990).	17
FIGURA 3.2- Energia de Gibbs da interação entre uma esfera e uma superfície plana apresentando carga de mesmo sinal, de acordo com a teoria DLVO (Rutter & Vincent apud van LOOSDRECHT et al., 1990). Representação esquemática para condições de força iônica (A)- baixa, (B) intermediária e (C) alta. Os símbolos indicam : G_E , interação eletrostática; G_A , interação de Van der Waals; G_{TOT} , interação total; H , distância mínima de separação entre duas superfícies (van LOOSDRECHT et al., 1990).	20
FIGURA 3.3- Interação repulsiva entre superfícies cobertas por polímeros (a) e interação do tipo ponte de polímeros entre superfícies (b). G_A , interação de Van der Waals; G_E , interação eletrostática; G_S , interação estereo; G_B , interação de “ponte”; G_{TOT} , interação total; H , distância entre duas superfícies; g , espessura média da cobertura de polímeros. Para distinguir entre os polímeros ligados à superfície sólida daqueles ligados à célula, eles foram desenhados em espessuras diferentes (van LOOSDRECHT et al., 1990).	22
FIGURA 3.4- Uma possível relação entre as concentrações prevalentes de substrato e os tipos de biofilmes (WIMPENNY & COLASANTI, 1997).	27
FIGURA 3.5- Modelo conceitual da arquitetura de um biofilme (formado por uma única espécie) baseado na observação de biofilmes vivos com o microscópio confocal a laser (CSLM). (Fonte: COSTERTON et al. 1995).	28
FIGURA 3.6- Modelo de biofilme em mosaico heterogêneo de acordo com KEEVIL et al. (1992).	29
FIGURA 3.7- Sistema do biofilme denso. Placa dentária (com duas semanas de desenvolvimento) de três indivíduos diferentes apresentando estrutura densa, microcolonias e algumas associações celulares (Fonte: NYVAD & FEJERSKOV apud WIMPENNY & COLASANTI, 1997).	30
FIGURA 3.8- Desenho esquemático do Robbins Device. (Fonte:	31

BLENKINSOPP & COSTERTON, 1991).	
FIGURA 3.9 - A árvore da vida com os três Domínios baseada na comparação de seqüências de nucleotídeos do RNAr 16S (PACE, 1996).	36
FIGURA 3.10- Desenho esquemático da hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes. (Fonte: modificado de uma palestra ministrada pelo Dr. Martin Embley, pesquisador do Museu de História Natural de Londres).	40
FIGURA 3.11 - Esquema demonstrativo do método que permite a combinação direta do FISH com microautoradiografia e observação ao microscópio confocal de varredura a laser (CSLM). (Fonte: LEE et al., 1999).	66
FIGURA 4.1- Esquema do MRD e frasco-reservatório.	80
FIGURA 4.2- Fotografia do sistema experimental MRD e frasco-reservatório.	80
FIGURA 4.3- Fotografia de uma lâmina de vidro coberta com teflon usada no FISH.	95
FIGURA 4.4- Fotografia de uma lâmina de vidro coberta com teflon usada no FISH.	95
FIGURA 4.5 - Micrografia de fluorescência com células de <i>Methanospirillum hungatei</i> (DSM 864). Lado esquerdo: Coloração com DAPI. Lado direito: FISH realizado com a sonda ARC915 específica para Domínio <i>Archaea</i> (mesmo campo microscópico).	101
FIGURA 5.1- Micrografia de fluorescência das células presentes no frasco reservatório após 24 horas de experimento.	108
FIGURA 5.2- Micrografia de fluorescência do biofilme formado sobre cupom de polipropileno após 2 dias de experimento. As células foram coradas com DAPI.	108
FIGURA 5.3- Micrografia de fluorescência do biofilme formado sobre o cupom de polipropileno após 2 dias de experimento.	108
FIGURA 5.4- Micrografia de fluorescência do biofilme formado sobre cupom de polipropileno após 14 dias de experimento.	109
FIGURA 5.5- Micrografia de fluorescência do biofilme formado sobre cupom de polipropileno após 14 dias de experimento.	109
FIGURA 5.6- Micrografia de fluorescência de células de <i>Methanobacterium</i>	109

formicicum (DSM 1535).

FIGURA 5.7- Composição da comunidade microbiana (células planctônicas) presente no frasco-reservatório no tempo 0, e após 2, 7 e 9 dias de experimento.	111
FIGURA 5.8- Micrografia de fluorescência das células presentes no frasco-reservatório no tempo zero do experimento.	112
FIGURA 5.9- Micrografia de fluorescência das células presentes no frasco-reservatório após 2 dias de experimento.	112
FIGURA 5.10- Composição da comunidade microbiana dos biofilmes após 7 e 9 dias de experimento, formados sobre os cupons de vidro e de polipropileno.	115
FIGURA 5.11- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 2 dias de experimento sobre o cupom de vidro.	117
FIGURA 5.12- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 2 dias de experimento evidenciando as espécies de <i>Archaeae</i> metanogênicas colonizando o cupom de polipropileno.	117
FIGURA 5.13- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 7 dias de experimento, colonizando o cupom de vidro.	117
FIGURA 5.14- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 7 dias de experimento, colonizando o cupom de vidro.	118
FIGURA 5.15- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 9 dias de experimento colonizando o cupom de vidro.	118
FIGURA 5.16- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 9 dias de experimento colonizando o cupom de vidro.	118
FIGURA 5.17- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 9 dias de experimento evidenciando as espécies de <i>Archaea</i> metanogênicas colonizando o cupom de polipropileno.	119
FIGURA 5.18- Composição da comunidade microbiana presente no inóculo e nos biofilmes formados após 2, 4, 9 e 11 dias de experimento.	126
FIGURA 5.19- Micrografia do biofilme formado após 11 dias de experimento sobre cupom de polipropileno. Amostra corada com DAPI e observada ao microscópio confocal de varredura a laser.	128

FIGURA 5.20- Composição da comunidade microbiana presente no frasco-reservatório (células planctônicas) ao longo do tempo experimental.	135
FIGURA 5.21- Micrografia de contraste de fase (lado esquerdo) e fluorescência (lado direito), do mesmo campo microscópico, das células presentes no frasco reservatório no 16 ^o dia de experimento.	136
FIGURA 5.22- Micrografia de fluorescência das células planctônicas provenientes do frasco reservatório amostradas no 9 ^o dia.	136
FIGURA 5.23- Micrografia de fluorescência das células do frasco-reservatório no 9 ^o dia de experimento.	136
FIGURA 5.24- Composição da comunidade microbiana presente nos biofilmes formados sobre os cupons de polipropileno após 5, 9, 15 e 22 dias de experimento.	139
FIGURA 5.25- Composição da comunidade microbiana presente nos biofilmes formados sobre os cupons de vidro após 6 e 9 dias de experimento.	140
FIGURA 5.26 –Micrografia de fluorescência do biofilme intacto formado sobre o cupom de polipropileno após o 1 ^o dia de experimento.	141
FIGURA 5.27-Micrografia do biofilme no 5 ^o dia hibridado com a sonda EUB338 (específica para o Domínio <i>Bacteria</i>) e observado ao microscópio confocal de varredura a laser.	142
FIGURA 5.28- Micrografia de contraste de fase do biofilme formado sobre o cupom de vidro após 6 dias de experimento, mostrando dois campos microscópicos distintos do mesmo cupom.	150
FIGURA 5.29- Micrografia de um biofilme formado sobre o cupom de polipropileno após 14 dias de experimento.	150
FIGURA 5.30- Micrografia de contraste de fase do biofilme formado após 1 dia de experimento sobre cupom de polipropileno. A amostra foi corada com Azul de Alcian 0,02% (pH 2,5), para identificação dos polímeros ácidos	150
FIGURA 5.31- Micrografia de contraste de fase do biofilme formado sobre cupom de vidro após 7 dias de experimento.	151
FIGURA 5.32 - Fotografia dos cupons de polipropileno e vidro observados a “olho nu”.	151
FIGURA 5.33- Fotografia do sistema MRD evidenciando o material	151

floculento no interior do mesmo.

FIGURA 5.34- Micrografia de fluorescência do material floculento. As 153
células apresentam autofluorescência devido ao fator F_{420} indicando que são
Archaeae metanogênicas.

FIGURA 5.35- Micrografia de fluorescência do material floculento. As 153
células apresentam autofluorescência devido ao fator F_{420} indicando que são
Archaeae metanogênicas.

FIGURA 5.36- Micrografia de fluorescência das células presentes no 153
material floculento.

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Substratos utilizados pelas <i>Archaeae</i> metanogênicas	35
TABELA 3.2- Sondas de oligonucleotídeos específicas para as metanogênicas.	46
TABELA 3.3- Relação das sondas complementares ao RNAr 16S usadas, com o nome, seqüência, o sítio alvo, e o Td definido experimentalmente. As sondas MB314 e MS1242 não tiveram bons resultados, e o Td não foi determinado.	47
TABELA 3.4- Sondas com o grupo alvo e respectivas referências da literatura.	49
TABELA 3.5- Sondas usadas para estudar a composição microbiana de lodos anaeróbios	53
TABELA 3.6- Nomes, posições alvo, seqüências, e especificidade das sondas usadas na detecção de bactérias nitrificantes	56
TABELA 3.7- Sondas de oligonucleotídeos usadas para a detecção de BRS	60
TABELA 3.8 - Seqüências e sítios alvo do RNAr 16S detectados pelas sondas EUB338, EUB338-II e EUB338-III	68
TABELA 4.1- Preparação dos inóculos para cada experimento	85
TABELA 4.2- Características de cada experimento	86
TABELA 4.3- Meios de cultura descritos pela DSMZ.	88
TABELA 4.4- Sondas de oligonucleotídeos usadas na hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH)	92
TABELA 4.5- Características Relevantes das sondas específicas para as <i>Archaeae</i> metanogênicas	93
TABELA 4.6- Concentração estoque e concentração final de cada sonda.	93
TABELA 4.7 - Protocolos de hibridação	97
TABELA 4.8- Hibridações controles	101
TABELA 5.1- Número de células/mm ² de cupom	130
TABELA 5.2- Número de células/mm ² de cupom	146

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E GLOSSÁRIO

DAPI	-4',6-diamidino-2phenilindol (corante fluorescente específico ao DNA)
DNAr	DNA ribossomal, qualquer região do DNA que codifica os componentes do RNA ribossomal.
EDTA	-ácido etilenodiamino tetracético
FISH	-fluorescence <i>in situ</i> hybridization – hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes;
Hybridization ou hibridação	hibridação é o pareamento de duas fitas cujas seqüências de nucleotídeos são complementares
Nucleotídeo	-uma das unidades monoméricas a partir das quais os polímeros de DNA e RNA são formados, consistindo de uma base púrica ou pirimidínica, uma ribose e um grupo ácido fosfórico.
Oligonucleotídeo	-uma seqüência linear de até 20 nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster
PBS	-phosphate saline buffer; tampão salino de fosfato
PCR	-Polymerase Chain Reaction = reação em cadeia da polimerase; ou amplificação <i>in vitro</i> de um pedaço do DNA, resultando em várias cópias do fragmento alvo
RNA _m	-RNA mensageiro
RNA _r	-RNA ribossomal
RDP	-Ribosomal Database Project: banco de dados contendo informações sobre espécies válidas de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> descritas, inclusive seqüências de moléculas de RNA _r .
SDS	-sodium dodecyl sulfate; dodecil sulfato de sódio
E.P.	-erro padrão= (desvio-padrão/raiz quadrada (<i>n</i>))
<i>n</i>	-tamanho da amostra= n^0 de campos microscópicos observados

LISTA DE SÍMBOLOS

ARC915	-sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr de membros do Domínio <i>Archaea</i>
EUB338	-sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr das bactérias membros do Domínio <i>Bacteria</i>
MB310	-sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr das <i>Archaeae</i> metanogênicas da família <i>Methanobacteriaceae</i>
MB1174	-sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr das <i>Archaeae</i> metanogênicas da família <i>Methanobacteriaceae</i>
MC1109	-sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr das <i>Archaeae</i> metanogênicas da família <i>Methanococcaceae</i>
MG1200	-sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr das <i>Archaeae</i> metanogênicas da ordem <i>Methanomicrobiales</i> (“ <i>Methanogenium</i> relatives”)
MSMX860	-sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr das <i>Archaeae</i> metanogênicas da família <i>Methanosarcinaceae</i>
SRB385	-sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr das bactérias redutoras de sulfato, mesofílicas, gram negativas, da subdivisão delta da classe <i>Proteobacteria</i>
NON338	-sonda de oligonucleotídeo utilizado como controle negativo (não complementar ao RNAr bacteriano)
N ₂	-gás nitrogênio
H ₂ : CO ₂	-mistura de gases hidrogênio e gás carbônico
N ₂ : CO ₂	-mistura de gases nitrogênio e gás carbônico
NaCl	-cloreto de sódio
μM	-micromolar (micromol por Litro)
μL	-microlitro (10 ⁻⁶ Litro)

RESUMO

ARAÚJO, J.C. *Biofilmes Anaeróbios: Desenvolvimento e Caracterização filogenética usando a hibridação in situ com sondas fluorescentes*. São Carlos, 2001. 189 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Neste trabalho investigou-se o desenvolvimento de biofilmes anaeróbios em um sistema de laboratório chamado de “modified robbins device” (MRD). O objetivo específico foi o de comparar a organização das células anaeróbias, particularmente daquelas que são comuns em lodos de esgoto, sobre superfícies hidrofílicas (vidro) e hidrofóbicas (polipropileno). A hibridação *in situ* com sondas fluorescentes complementares ao RNAr 16S específicas para Domínio e grupos e a microscopia confocal de varredura a laser foram utilizadas para verificar a composição microbiana dos biofilmes, bem como do inóculo. Foram realizados dois tipos de experimentos, um com culturas puras de metanogênicas e outro com células oriundas de lodo granulado anaeróbio. As culturas puras de metanogênicas, *Methanobacterium formicicum* (DSM 1535), *Methanosaeta concilii* (DSM 3671) e *Methanosarcina barkeri* (DSM 800) foram usadas como inóculo para a formação dos biofilmes no interior do MRD durante 9 dias. Os resultados mostraram que as três espécies colonizaram ambas as superfícies após o 2^o e 7^o dia de ensaio. No segundo experimento, o MRD foi inoculado com um consórcio microbiano anaeróbio e a formação do biofilme foi estudada durante 22 dias. As amostras dos biofilmes bem como aquelas retiradas do frasco-reservatório de células apresentaram composição microbiana semelhante, ambas foram dominadas por *Archaeae* metanogênicas hidrogenotróficas relacionadas com membros da família *Methanobacteriaceae*, já que foram detectadas com a sonda MB1174. Este grupo contribuiu com cerca de 44 a 90% do total de células coradas com DAPI e foi morfológicamente semelhante à *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*. As células detectadas com a sonda específica para membros da ordem *Methanomicrobiales* (MG1200) representaram cerca de 2 a 18,0% do total de células coradas com DAPI no frasco-reservatório e de

0,1 a 2,0% nas amostras dos biofilmes. Estas células foram morfologicamente semelhantes à *Methanospirillum*, também uma metanogênica hidrogenotrófica. Não foram detectadas células pertencentes à família *Methanosarcinaceae*, pois a hibridação com a sonda MSMX860 foi negativa. Células que hibridaram com a sonda específica para o Domínio *Bacteria* (EUB338) representaram cerca de 3 a 18% do total de células coradas com DAPI. Os resultados mostraram que as *Archaeae* metanogênicas hidrogenotróficas que foram predominantes no inóculo também dominaram os biofilmes que se desenvolveram em ambas as superfícies, vidro e polipropileno. Os dados desse trabalho sugerem que a hidrofobicidade do material suporte não influenciou o desenvolvimento e a composição microbiana dos biofilmes anaeróbios, considerando as condições específicas dos ensaios realizados.

Palavras-chave: Biofilmes anaeróbios; hibridação *in situ*; metanogênicas; Robbins device modificado; sondas de oligonucleotídeos.

ABSTRACT

ARAUJO, J.C. *Anaerobic Biofilms: Development and Phylogenetic Characterization using Fluorescence in situ hybridization*. São Carlos, 2001. 189p. Ph.D. thesis. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

In this study the development of anaerobic biofilms using a laboratory system called modified robbins device (MRD) were investigated. We were especially interested in comparing the organization of anaerobic cells, particularly those that are very common in domestic sewage sludge, in a hydrophilic (glass) versus a hydrophobic (polypropylene) surface. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with domain and group specific probes that target intracellular 16S rRNA and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were used to investigate the microbial composition of both the inoculum and anaerobic biofilms. Two sets of experiments were carried, one with pure methanogenic organisms and the other with cells from a mesophilic anaerobic granular sludge. The pure methanogenic cultures, *Methanobacterium formicicum* (DSM 1535); *Methanosaeta concilii* (DSM 3671) and *Methanosarcina barkeri* (DSM 800) were used to seed the MRD to allow the development of biofilms over 9 days. The results showed that all the three species were colonizing both surfaces after 2 and 7 days of experimental period. In the second experiment, the biofilm reactor was seeded with a microbial anaerobic consortium and biofilm formation was studied during 22 days. Biofilm and culture vessel samples showed nearly the same microbial composition, both were dominated by hydrogenotrophic methanogenic *Archaea* related to the *Methanobacteriaceae* as detected by the specific probe (MB1174). This group accounted for 44 to 90% of the DAPI-stained cells and morphologically resembled *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter*. Cells detected with the *Methanomicrobiales* specific probe (MG1200) accounted for 2 to 18.0% of the DAPI-stained cells in the culture vessel and 0.1 to 2.0% in the biofilm samples. These cells were morphologically similar to *Methanospirillum*, also a hydrogenotrophic methanogen. No cells were detected by the *Methanosarcinaceae* specific probe (MSMX860). Cells which hybridized to the *Bacteria* specific probe

(EUB338) accounted for the remaining 3 to 18% of the DAPI-stained cells. The results showed that the hydrogenotrophic methanogenic *Archaea* cells predominated in the inoculum and the biofilms that developed on both surfaces, glass and polypropylene. Our data suggest that the hydrophobicity of the support material did not influence the development and the microbial composition of anaerobic biofilms, considering specific conditions of the experiments.

Keywords: anaerobic biofilms; *in situ* hybridization; methanogens; modified robbins device; oligonucleotide probes.

1 INTRODUÇÃO

Os atuais rumos das ciências biológicas mostram que os estudos sobre ecologia microbiana são de importância inequívoca, pois revelam a enorme diversidade do mundo dos microrganismos que ainda resta a ser caracterizada. Embora o equilíbrio químico da Biosfera dependa dos microrganismos, pouco se conhece sobre a dinâmica e composição dos ecossistemas microbianos. Uma das dificuldades para o desenvolvimento rápido e seguro desse conhecimento pode ser devida aos procedimentos clássicos empregados nas pesquisas para identificação dos microrganismos. Até pouco tempo atrás, usualmente, apenas espécies cultivadas e isoladas poderiam ser identificadas. Além disso, foi também verificado que parcela muito pequena dos microrganismos na natureza, menor que 1%, pode ser facilmente isolada e cultivada através das técnicas tradicionais padronizadas em laboratórios. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante (ou engenharia genética) e da filogenia molecular, foi possível ultrapassar as muitas limitações das técnicas de cultivo de células, o que permitiu o acesso à quase todos os microrganismos existentes (PACE, 1996).

Os microrganismos crescem espacialmente organizados na maioria dos sistemas naturais e de engenharia, desde que estes possuam suprimento suficiente de nutrientes (COSTERTON et al., 1995). Ao estudar estes sistemas, a ecologia microbiana se preocupa em determinar a estrutura e dinâmica da população, bem como a distribuição espacial e função das espécies dentro das comunidades, as quais são caracterizadas por várias interações célula-célula e por pronunciada heterogeneidade química e de arquitetura (CALDWELL et al., 1992; COSTERTON et al. 1994; MASSOL-DEYÁ et al

1995). Boa parte dos resultados desses estudos referem-se ao conjunto do recente conhecimento compilado no tema “biofilmes microbianos”.

Os métodos microbiológicos tradicionais de cultivo são aplicados nas pesquisas sobre ecologia dos microrganismos, e a ocorrência de desagregação da biomassa é um procedimento comum a vários desses métodos, o que conduz, invariavelmente, a perda da informação espacial da comunidade em seu habitat de origem. Além disso, alguns resultados gerados são, atualmente, considerados tendenciosos fracassando, portanto, em não detectar os membros microbianos dominantes da comunidade. A determinação de propriedades fisiológicas e bioquímicas de uma única espécie numa cultura pura de laboratório pode também levar a interpretações erradas do fenótipo, já que a expressão gênica é fortemente influenciada pelas condições ambientais e pelo modo de crescimento das células. Uma vez que se tem conhecimento de que as linhagens isoladas se adaptam geneticamente às condições ambientais em que se desenvolvem, sob práticas laboratoriais de cultivo, elas podem não ser geneticamente representativas daquela outra parte da população que ficou no ambiente (LEE et al., 1999).

Com o advento das técnicas moleculares na ecologia microbiana, em especial da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes complementares ao RNAr 16S, se tornou possível avaliar quantitativamente, usando métodos que não requerem o cultivo das células, a dinâmica e estrutura de comunidades microbianas complexas (AMANN et al., 1995). A detecção dos sinais fluorescentes devido a hibridação com as sondas usando a microscopia confocal de varredura a laser permitiu verificar a arquitetura de agregados microbianos naturais (LAWRENCE et al., 1998), de grânulos anaeróbios mesofílicos e termofílicos (SEKIGUCHI et al., 1999; IMACHI et al., 2000), bem como caracterizar populações microbianas em sistemas de lodos ativados (DAVENPORT et al., 2000; MANZ et al., 1998; SNAIDR et al., 1997) e verificar o arranjo espacial de espécies microbianas em diferentes habitats (HARMSSEN et al., 1996; POWER et al., 1999; SCHRAMM et al., 1999; WAGNER et al., 1994).

Idealmente, relações evolutivas entre os microrganismos podem ser determinadas comparando-se seqüências de nucleotídeos dos seus respectivos genomas, especialmente dos genes do RNA ribossomal 16S. Tipicamente, genes homólogos de diferentes organismos são comparados e, assim, é determinado o número de seqüências de nucleotídeos diferentes. Quanto maior o número de diferenças entre os genes, mais distantes evolutivamente estão os pares de organismos.

Conhecendo-se as seqüências específicas de nucleotídeos de um determinado grupo de microrganismos é possível construir sondas de oligonucleotídeos complementares ao RNAr 16S, e através de técnicas de hibridação, tais como “southern-blot”, hibridação *in situ*, entre outras, detecta-se o grupo diretamente no ambiente, evitando-se as práticas de isolamento e cultivo das células microbianas. Em outras palavras, através da extração do DNA total da amostra ou da fixação das células íntegras, como no caso da hibridação *in situ*, identifica-se e caracteriza-se o tipo microbiano em questão.

À medida que o conhecimento avança na área de biofilmes microbianos, a complexidade desse tipo de organização celular se torna mais aparente. Biofilmes representam uma forma comum do crescimento das células microbianas em vários ambientes naturais ou biorreatores tecnológicos. Em alguns casos, como no campo do tratamento de resíduos, e da bioremediação, os biofilmes são benéficos, enquanto que em outros, sua presença é bastante prejudicial, como por exemplo, na colonização bacteriana de catéteres hospitalares e da placa dentária, ou no processo de biocorrosão de dutos petrolíferos.

O avanço das técnicas moleculares somado aos exames microscópicos de elevada magnitude tem sido essencial para os estudos de biofilmes. A hibridação *in situ* com sondas fluorescentes, por exemplo, permite estudar de forma rápida e precisa sob microscopia, a composição bacteriana do biofilme nas suas diferentes camadas. Além disso, pode-se relacionar a presença de determinados gêneros e/ou espécies microbianas

presentes num determinado sistema de tratamento biológico com o tipo de resíduo que está sendo tratado. Em termos práticos, é uma forma dos microbiologistas monitorarem biorreatores aplicados ao tratamento de resíduos, e por conseguinte, é um modo de correlacionar a estrutura microbiana e a função dos microrganismos em termos de atividade metabólica com o tipo de resíduo a ser tratado.

A presente tese de doutorado é uma contribuição em relação ao estudo de biofilmes microbianos anaeróbios em biorreatores, empregando-se a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes. O sistema de reação escolhido para monitorar e estudar a formação de agregados celulares foi o "Modified Robbins Device" (MRD, um dispositivo padronizado para o estudo de biofilmes microbianos, no qual os suportes são acondicionados na base de parafusos removíveis). Nessas condições, buscou-se analisar a ocorrência de formação dos biofilmes anaeróbios em suportes específicos, verificando-se quais os principais gêneros microbianos que atuaram na colonização do suporte desde a etapa de aderência inicial das células até a completa formação e crescimento em espessura do biofilme. O sistema MRD foi operado em circuito fechado sob condições de anaerobiose. O grupo das *Archaeae* metanogênicas foi o mais amplamente estudado.

A pesquisa integrou o Projeto Temático da FAPESP no Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, "*Estrutura, Composição, Crescimento e Dinâmica de Biofilmes em Sistemas Mistos Anaeróbios e Aeróbios de Tratamento de Águas residuárias*" e o PRONEX, "*Desenvolvimento e otimização de sistemas não convencionais de tratamento de águas residuárias constituídos de reatores biológicos e físico-químicos dispostos em séries*". Contou-se com o apoio dos pesquisadores da Fundação André Tosello em Campinas no que se referiu às informações necessárias para a implantação e funcionamento do laboratório de biologia molecular no departamento de Hidráulica e Saneamento, e com a Escola Paulista de Medicina, através da orientação do Prof. Dr. Renato Mortara, durante os exames das células sob Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM).

Os resultados desta tese, obtidos nos experimentos CP2 e LG1, foram publicados no periódico *Wat. Sci. Tech.* (2000), 41(12): 69-77. Os resultados do experimento LG3 e parte dos resultados do experimento CP2 foram organizados sob a forma de dois artigos, “Comparison of anaerobic biofilms microbial composition developed on two different surfaces using fluorescence *in situ* hybridization” e “Development of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces”, submetidos para publicação nos periódicos *Appl. Environ. Microbiol.* e no *Appl. Microbiol. Biotechnology*, respectivamente. As cópias desses artigos estão no item Apêndices.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar a dinâmica e composição microbiana de biofilmes anaeróbios formados sobre suportes de hidrofobicidades diferentes acondicionados no sistema denominado "Modified Robbins Device" (MRD), através da técnica molecular de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) e exames microscópicos.

Objetivos específicos:

- Verificar quais os grupos microbianos predominantes nos biofilmes formados sobre dois suportes, um hidrofílico (vidro) e outro hidrofóbico (polipropileno), fixados no MRD operado sob condições pré-estabelecidas; ou seja, a pergunta a ser respondida neste item foi: "a hidrofobicidade do material suporte tem influência na aderência das células metanogênicas ?" ;
- Através da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes associada à microscopia confocal de varredura a laser, verificar a arquitetura do biofilme formado e a localização espacial dos microrganismos presentes sob as condições de operação do sistema;
- Avaliar a importância de cada grupo trófico anaeróbio: acidogênico, acetogênico, *Archaeae* metanogênicas acetotróficas e hidrogenotróficas, na formação do biofilme.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Tratamento Anaeróbio

O tratamento anaeróbio de águas residuárias pode representar o método central para uma proteção sustentável do meio ambiente e para a tecnologia de conservação dos recursos. O conceito de tratamento anaeróbio de águas residuárias só foi implementado em larga escala a partir da década de 80 utilizando os reatores anaeróbios de alta taxa desenvolvidos na década de 70. Atualmente, mais de 1700 reatores anaeróbios estão em operação no mundo inteiro, tratando ampla variedade de águas residuárias (Biothane-Systems-International, 1998).

Comparado ao processo de tratamento aeróbio convencional, a tecnologia anaeróbia oferece as seguintes vantagens: (1) Taxas de carregamento orgânico cerca de 10 vezes maior podem ser aplicadas com eficiência de remoção da matéria orgânica mesmo sob temperatura baixa (LETTINGA & HULSHOFF POL, 1991; REBAC et al., 1997); (2) Investimentos e custos de operação associados à energia e bombeamento são substancialmente reduzidos (HICKEY et al., 1991; SPEECE, 1983); (3) o resíduo é convertido num combustível utilizável, o gás metano, o qual em muitos casos pode ser empregado no próprio local ou sistema (WILSON et al., 1998); (4) Pouca produção de lodo biológico em excesso, sendo este estabilizado (LETTINGA, 1995); (5) o lodo anaeróbio pode ser estocado por longo período de tempo sem ser alimentado e, ainda assim, mantém capacidade metabólica razoável (WU et al., 1995).

Em biorreatores anaeróbios, a matéria orgânica é removida da água residuária pela ação combinada de vários grupos de microrganismos (OUDE ELFERINK et al. 1998). Em geral, polímeros como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, e lipídios são hidrolizados à monômeros como açúcares, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos

graxos e glicerol pelas bactérias fermentadoras primárias. Estas bactérias, posteriormente, fermentam os monômeros resultantes à acetato, dióxido de carbono, hidrogênio e produtos reduzidos como alcoóis, lactato e ácidos graxos voláteis. Para a degradação de produtos da fermentação como ácidos graxos com mais de dois átomos de carbono, alcoóis maiores que um átomo de carbono, e cadeias ramificadas e ácidos graxos aromáticos, são necessárias as bactérias fermentadoras secundárias ou as acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio. Estas fermentadoras secundárias convertem seus substratos à acetato, dióxido de carbono, hidrogênio e talvez formiato, os quais são posteriormente usados pelas archaeas metanogênicas. As archaeas metanogênicas são especializadas na conversão de um número limitado de substratos (ZINDER, 1993), como o acetato, os gases CO_2 e H_2 em conjunto, formiato e outros compostos de um carbono tais como metanol, metiltiols e metilaminas (BLAUT, 1994).

A biomassa responsável pela degradação anaeróbia pode ser colocada em uma grande variedade de configurações de processos. A seleção de uma configuração apropriada é crítica para o sucesso da operação. Cada configuração diferente tem implicações sobre a razão tempo de residência celular (θ_c)/ tempo de residência hidráulica (θ_h). O tempo de residência celular é um parâmetro de projeto fundamental em sistemas biotecnológicos. Um valor máximo de θ_c é desejável para a estabilidade do processo e produção mínima de lodo. Diminuindo-se o θ_h , diminui-se o volume do reator, reduzindo-se os custos. A biomassa suspensa é facilmente arrastada no efluente do processo. Há, então, a necessidade de bombas de reciclo para o sucesso do processo anaeróbio. Esse fato tem motivado o desenvolvimento de configurações de reatores utilizando células imobilizadas. A primeira geração de reatores utilizada na biotecnologia anaeróbia aplicada à digestão de resíduos domésticos consistia de reatores de mistura sem reciclo de sólidos. Portanto, a razão θ_c/θ_h era igual a 1. Subsequentemente, o reciclo de sólidos foi incorporado para aumentar tal relação. Reatores com células imobilizadas (biofilmes) e/ou autoimobilizadas (grânulos) são configurações que fornecem altas razões θ_c/θ_h e, por esse motivo, têm sido muito estudados (SPEECE, 1983). Esses reatores apresentam redução de volume e eliminação

de decantadores secundários, de bombas de recirculação e de leitos de secagem, resultando em substancial economia para o processo (ANNACHHATRE & KHANNA¹ apud ZAIAT, 1996).

O histórico dos reatores anaeróbios para o tratamento de águas residuárias de alta taxa e elevada retenção celular se inicia com o primeiro protótipo de filtro anaeróbio. Este sistema de escoamento ascendente foi posteriormente substituído por escoamento descendente para evitar problemas de entupimento. A história passa pela concepção do reator de leito fluidificado, pelo grande avanço obtido pelo desenvolvimento do reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) e, finalmente, pela concepção do reator anaeróbio de chicanas (SPEECE, 1983).

Geralmente, os sistemas anaeróbios são operados em temperatura mesofílica (30 à 35 °C) e são aplicados para o tratamento de águas residuárias, como as provenientes da agro-indústria e de indústrias de alimentos (GONZALEZ-GIL, 2000). Associado à fácil construção, operação e manutenção, o reator UASB desenvolvido por LETTINGA et al. (1980), atualmente, é o mais amplamente empregado. Cerca de 61% dos reatores anaeróbios são do tipo UASB (Biothane-Systems-International, 1998).

As diversas concepções de reatores acomodam biomassa imobilizada, biofilmes, em uma grande variedade de suportes ou, até mesmo, biomassa auto-imobilizada, na forma de grânulos. O aumento da densidade populacional proporcionado pela formação dos biofilmes favorece o co-metabolismo e a transferência de hidrogênio inter-espécies, podendo estimular o desenvolvimento de micro-colônias (PEREZ-RODRIGUES et al., 1989a).

Segundo ZAIAT (1996), o desenvolvimento de reatores anaeróbios contendo células imobilizadas tem sido realizado, geralmente, utilizando-se critérios empíricos. Entretanto, tais critérios são, na maioria das vezes, pouco efetivos para concepção de unidades otimizadas. Portanto, estudos devem ser realizados visando a obtenção de parâmetros que garantam o estabelecimento de bases científicas para o projeto de tais

¹ ANNACHHATRE, A.P.; KHANNA, P. (1987) Methane recovery from water hyacinth through whole-cell immobilization technology. *Biotechnology and Bioengineering*, v.29, p. 805-818 apud ZAIAT (1996). Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas

biorreatores. Ainda, de acordo com ZAIAT (1996), os trabalhos apresentados na literatura reafirmam as grandes vantagens dos reatores utilizando células imobilizadas sobre sistemas contendo biomassa em suspensão para tratamento anaeróbio de águas residuárias. Quando comparados aos sistemas utilizando bactérias auto-imobilizadas (na forma de grânulos), a utilização de suporte inerte para a formação de biofilmes (ou seja, imobilização da biomassa) representa uma garantia de retenção dos microrganismos dentro do biorreator. Entretanto, poucos trabalhos apresentam propostas de concepções para acomodar de forma adequada a biomassa.

ZAIAT (1996) propôs a configuração de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo utilizando como suporte, para a imobilização da biomassa, espuma de poliuretano. O autor verificou que a conformação espacial dos microrganismos dentro do suporte diferiu claramente da conformação observada em grânulos (formados em reator de manta de lodo e fluxo ascendente), nos quais a biomassa é estruturada em três camadas diferentes (GUIOT et al, 1991). A distribuição espacial observada na espuma de poliuretano, segundo ZAIAT (1996), pode ser um fator importante para gerar curtos períodos de partida, resultando em utilização ótima de substratos primários e produtos intermediários. Portanto, a utilização de espuma de poliuretano para imobilização de biomassa anaeróbia pode resultar em condições ambientais ideais para ocorrência de relações sintróficas entre as várias espécies. Segundo VARESCHE et al. (1997), acompanhando a distribuição celular dos microrganismos na espuma de poliuretano, o arranjo das células ocorreu como micro-grânulos retidos mecanicamente nos poros da espuma e aderidos ao suporte como células dispersas aderidas à partícula. As duas últimas formas de imobilização observadas indicam que os microrganismos se aderiram firmemente à espuma de poliuretano, provavelmente por alguma espécie de ligação. Esse resultado contrasta com aqueles obtidos por HUYSMAN et al. (1983), que concluíram que a biomassa metanogênica se encontrava mecanicamente e não eletrostaticamente retida dentro dos poros de tal material.

A aderência microbiana ou granulação, ou seja, quando uma célula adere a superfície ou a outra célula, pode ser definida em termos da energia envolvida na formação. A formação do biofilme tem sido intensivamente estudada, mas o processo de granulação não tem sido totalmente esclarecido. Entretanto, o lodo granulado pode ser caracterizado como um biofilme esférico e existem semelhanças entre a formação do biofilme e do grânulo (SCHMIDT & AHRING, 1996).

A organização interna de vários grupos tróficos nos grânulos parece depender da composição da água residuária e dos passos catabólicos dominantes no grânulo. A orientação espacial muitas vezes é observada em grânulos crescendo em substratos com águas residuárias complexas, ao contrário dos grânulos crescendo em substratos simples, como por exemplo, acetato. Em grânulos formados em reatores operados com águas residuárias mais complexas, a organização interna pode ser benéfica para uma ótima degradação do substrato e seus intermediários. Um agregado estruturado apresenta arranjo metabólico estável que mantém condições ótimas para todos seus membros (SCHMIDT & AHRING, 1996). Em alguns estudos sobre grânulos crescendo em sistemas com substratos complexos (GROTEHUIS et al., 1991), não foi observada uma organização interna evidente, provavelmente em razão do substrato complexo ser degradado diretamente à acetato, com pouca ou nenhuma produção de outros intermediários, tais como butirato e propionato (SCHMIDT & AHRING, 1996).

FANG et al. (1995), analisaram a microestrutura de grânulos de reatores UASB tratando águas residuárias contendo formiato, acetato, propionato, butirato, peptona, sacarose, amido, benzoato, resíduos de cervejaria e glutamato monossódico. Os resultados indicaram que a microestrutura dos grânulos foi fortemente dependente da cinética de degradação dos substratos. Para substratos tais como carboidratos, nos quais o passo inicial da degradação foi consideravelmente mais rápido em relação à degradação subsequente dos intermediários, os grânulos desenvolveram-se com microestrutura em camadas. Entre eles, grânulos degradando butirato e benzoato apresentaram microestrutura em duas camadas, enquanto os grânulos degradando sacarose, amido e carboidratos de águas residuárias de cervejaria apresentaram estrutura em três camadas. Por outro lado, para substratos tais como proteínas, nos quais o passo

inicial foi o limitante, os grânulos desenvolveram-se com microestrutura uniforme. Grânulos degradando formiato, acetato, propionato, peptona e glutamato monossódico também apresentaram microestrutura uniforme.

No artigo de FANG et al. (1995), mostrou-se ainda, que nos grânulos degradando formiato predominaram filamentos de bacilos associados à *Methanobacterium formicicum*, em acetato predominaram filamentos associados à *Methanosaeta* spp. e cachos de vesículas espalhados associados à *Methanosarcina* spp., em propionato verificou-se a presença de microcolônias dispersas associadas à *Methanosaeta* spp. e microcolônias sintróficas justapostas, em peptona observaram-se diferentes morfologias não havendo predominância de espécies de células, sendo encontradas microcolônias compostas de células metanogênicas associadas aos gêneros *Methanosaeta* spp. e *Methanosarcina* spp. e bactérias sintróficas observadas no interior do grânulo, e em glutamato monossódico desenvolveram-se microestruturas complexas, porém uniformes.

THAVEESRI² et al. apud OLIVEIRA (1997) observaram que em reator UASB alimentado somente com ácidos graxos voláteis desenvolveram-se dois tipos de grânulos, pretos e brancos. Em outro sistema alimentado com 90% de ácidos graxos voláteis e 10% de sacarose foram observados três tipos de grânulos, pretos, brancos e cinzas, e em um reator alimentado com 70% de ácidos graxos voláteis e 30% de sacarose observou-se somente grânulos brancos e cinzas. Testes de atividade metanogênica específica (AME) destes grânulos revelaram que os grânulos pretos apresentaram elevada AME e baixa atividade acidogênica específica (AAE), os grânulos brancos possuíram AME muito alta e AAE baixa e os grânulos cinza tinham AAE alta e AME considerável. Medidas da coenzima F420 revelaram que os grânulos pretos consistiam, predominantemente, de células metanogênicas acetoclásticas.

GROTEHUIS et al. (1991) observaram que grânulos crescendo em águas residuárias de refinaria de açúcar ou etanol não exibiram orientação espacial das

² THAVEESRI et al. (1995c) Different types of sludge granules in UASB reactors treating acidified wastewaters. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 68, p.329-337 apud OLIVEIRA, R.A. (1997). Efeito da concentração de sólidos suspensos do afluente no desempenho e características do lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo tratando águas residuárias de suinocultura. São Carlos. Vol I e II. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

bactérias, enquanto grânulos crescendo em propionato apresentaram dois tipos de agrupamentos. Um agrupamento consistia de células imunologicamente associadas à *Methanosaeta soehngenii*. O outro agrupamento consistiu de duas espécies de células, uma imunologicamente associada à *Methanobrevibacter arboriphilicus* AZ e a outra foi identificada como bactéria oxidadora de propionato imunologicamente não associada à *Syntrophobacter wolinii*. Ambos os tipos de agrupamentos encontravam-se distribuídos aleatoriamente ao longo dos grânulos.

Com relação ao processo de granulação, LETTINGA³ apud OLIVEIRA (1997) afirmou que uma das bases essenciais do processo está no fato de o crescimento bacteriano ser restrito a um número limitado de núcleos de crescimento. Alguns aspectos devem ser observados no sentido de entender as razões pelas quais a granulação ocorre e se mantém:

- núcleos apropriados de crescimento, tais como, materiais suporte orgânicos inertes e inorgânicos devem estar presentes no lodo de inóculo;
- a retenção de material finamente disperso, incluindo material microbiano viável, será diminuída, uma vez que a velocidade superficial do líquido e do gás aumenta, e como resultado a formação do filme e/ou agregado então é intensificada;
- O tamanho dos agregados e/ou a espessura do biofilme são limitados, isto é, dependem da resistência intrínseca das forças de ligação, do grau de entrelaçamento dos microrganismos e das forças externas exercidas sobre as partículas ou filmes, por exemplo, cisalhamento. Entretanto, com o tempo os filmes/partículas se desintegram, originando uma próxima geração. A primeira geração de agregados, citados por HULSHOFF POL et al. (1983a,b) como grânulos

³ LETTINGA (1995) apud OLIVEIRA, R.A. (1997). Efeito da concentração de sólidos suspensos do afluente no desempenho e características do lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo tratando águas residuárias de suinocultura. São Carlos. Vol I e II. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

“filamentosos”, consistem principalmente de longos filamentos bacterianos multicelulares, especialmente de bacilos, desde que na presença de ácidos graxos voláteis. Eles são completamente volumosos, e, de fato, mais floculentos do que propriamente granulados;

- o núcleo secundário de crescimento retido crescerá em tamanho novamente, mas também em densidade microbiana. O crescimento celular, não limitado à região externa, ocorrerá também dentro do agregado. Devido ao tempo, eles se desintegram novamente, originando uma terceira geração etc;
- os grânulos amadurecem gradualmente, como resultado desse processo de envelhecimento; os grânulos filamentosos volumosos, desaparecem e são substituídos por grânulos densos compostos por bacilos. Num lodo granulado amadurecido, geralmente, estão ausentes grânulos filamentosos.

3.2 Definição de biofilmes

Várias são as definições para biofilme, uma das mais aceitas foi aquela descrita segundo a CONFERÊNCIA em DAHLEM (1984) SOBRE ADERÊNCIA MICROBIANA E AGREGAÇÃO apud BRYERS (1988), em que *“biofilme, é uma coleção de microrganismos e produtos extracelulares associados a uma superfície sólida, viva ou inanimada”*. Mais recentemente (COSTERTON et al. 1995), os biofilmes foram definidos como populações microbianas, presas numa matriz de polissacarídeos, que podem se aderir umas às outras e/ou à superfícies ou interfaces. Esta definição inclui os agregados (ou grânulos) e flocos microbianos e também populações que possam se aderir dentro de espaços porosos (como por exemplo, células aderidas em espuma de poliuretano).

3.2.1 Desenvolvimento do biofilme

De acordo com BRYERS (1988), uma comunidade de biofilme inicia-se quando uma superfície “limpa” é exposta a um ambiente aquoso e se torna condicionada pela presença de constituintes químicos do meio. Os microrganismos se associam à superfície, aderem e, então, fixam-se firmemente. Uma vez que essa colonização primária acontece, a atividade da comunidade é dependente do metabolismo e crescimento das condições de superfície. Tais atividades metabólicas incluem consumo de substrato, replicação celular e síntese de exopolímeros. A formação de uma matriz extracelular do biofilme ocorre, e essa acumula-se na superfície do suporte atuando como aprisionador de nutrientes e, num sistema de cultura mista, favorece diferentes microrganismos a participarem da comunidade do biofilme. Sucessivas microcomunidades desenvolvem nichos dentro de determinadas camadas quando o biofilme aumenta. Eventualmente a espessura do biofilme atinge um estado de equilíbrio dinâmico, em que os processos de produção de filmes microbianos são contrabalanceados pelos processos que reduzem ou removem o biofilme. A conversão contínua de substrato produz excesso de biomassa e produtos metabólicos que são arrastados para o fluido circundante, o que pode contribuir para atrair outras formas de vida, já que tem alimento sobre a superfície do suporte, dando início então a um processo de sucessão ecológica.

3.3 Processos que governam a formação do biofilme

BRYERS (1988) sugeriu que a formação do biofilme é o resultado dos seguintes processos: - deposição; - metabólico; - remoção. Dentre os processos de deposição, destacam-se aderência e pré-condição de superfície do suporte. Os metabólicos incluem consumo de substrato, crescimento celular e replicação, manutenção do biofilme, produção de polímeros extracelulares e influência da aderência no metabolismo

microbiano. Os processos de remoção envolvem a predação, cisalhamento, abrasão e o desprendimento.

3.3.1 Processos relacionados com a deposição

3.3.1.1 Aderência

Em geral, a fase inicial da formação do biofilme se constitui na aderência dos microrganismos às superfícies por interações físico-químicas não específicas. Essas interações são governadas pelas cargas elétricas e hidrofobicidade específicas dos microrganismos e dos materiais envolvidos (MARSHALL, 1986). As células procarióticas e a maioria das superfícies naturais e artificiais investigadas até o momento são carregadas negativamente (HANCOCK⁴; LODER & LISS⁵; NEU & MARSHALL⁶; NORDE & LYKLEMA⁷; van LOOSDRECHT⁸ et al. apud JUCKER et al., 1996). Portanto, a aderência ocorrerá somente quando a repulsão eletrostática resultante for superada pelas forças de atração, como por exemplo, forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas entre os polímeros da superfície bacteriana e a superfície sólida (MARSHALL, 1986; RIJNAARTS et al, 1995). A hidrofobicidade da superfície e a mobilidade eletroforética podem ser considerados indicadores das propriedades de aderência da célula (van LOOSDRECHT et al., 1987).

⁴HANCOCK, I.C. (1991) Microbial cell surface architecture. In: MOZES, N.; HANDELY, P.S.; BUSSCHER, H.J.; ROUXHET, P.G. ed. *Microbial Cell surface Analysis*. VCH Weinheim, Weinheim, Germany. p. 21-59 apud JUCKER, B.A.; HARMS, H.; ZEHNDER, A.J.B. (1996). Adhesion of the Positively Charged Bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to Glass and Teflon. *Journal of bacteriology*, v.178, n.18, p.5472-5479.

⁵ LODER, T.C.; LISS, P.S. (1985) Control by organic coatings of the surface charge of estuarine suspended particles. *Limnol. Oceanogr.*, v.30, p.418-421.

⁶ NEU, T.R.; MARSHALL, K.C. (1990) Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *J. Biomater. Appl.*, v.5, p.107-133.

⁷ NORDE, W.; LYKLEMA, J. (1989) Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: a colloid chemical approach. *Colloids Surf.*, v. 38, p.1-13.

⁸ van LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J.B. (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.53, p.1893-1897.

No presente texto será discutido genericamente o tema aderência microbiana, e não somente aquela que leva à formação do biofilme. Para tanto, serão necessários alguns esclarecimentos sobre a interação célula procariótica-superfície.

Considerações Gerais

A colonização microbiana de uma interface sólido-líquido pode ocorrer na seqüência (van LOOSDRECHT et al., 1990) apresentada na Figura 3.1.

FIGURA 3.1- Representação esquemática da seqüência de etapas na colonização de superfícies por microrganismos (van LOOSDRECHT et al., 1990).

Na Figura 3.1 observam-se quatro etapas. Primeiramente, ocorre o transporte das células até a superfície. A célula procariótica pode alcançar uma superfície de três formas diferentes:

- (a) transporte por difusão molecular: o organismo exibe um movimento browniano não-desprezível, com média de deslocamento de $40 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$

(MARSHALL⁹ apud van LOOSDRECHT et al., 1990), que pode ser observado ao microscópio; esse movimento é responsável pelo contato ao acaso dos microrganismos com a interface, mesmo sob condições quiescentes, e é responsável pela transposição de qualquer camada difusa através da qual nenhuma convecção ocorre; o transporte por difusão é pequeno quando comparado ao transporte por fluxo convectivo ou ao transporte de células móveis; sob condições quiescentes, a sedimentação pode contribuir significativamente com o transporte microbiano, e representar a única forma da célula entrar em contato com a superfície;

- (b) transporte convectivo de células: está associado ao fluxo do líquido e é mais rápido em várias ordens de magnitude do que o transporte por difusão; podem existir situações em que a parte final da rota para a superfície, passagem através da sub-camada difusa, seja controlada pela difusão;
- (c) movimento ativo: uma vez que um organismo móvel está na vizinhança de uma superfície, ele pode encontrá-la ao acaso ou responder por quimiotaxia à qualquer gradiente de concentração que possa existir na região de interface.

A fase seguinte ao transporte das células à superfície, é a aderência inicial, a qual é fundamentalmente um processo físico-químico. A aderência pode ser reversível ou irreversível. A distinção não é muito clara, mas, para fins práticos, define-se satisfatoriamente a aderência reversível como a deposição das células à uma superfície, mesmo sob movimento browniano, e que ficam sujeitas a pronta remoção por forças suaves ou devido a sua própria mobilidade. As células que se aderem de modo irreversível não apresentam movimento browniano e não podem ser removidas, a menos que nela atuem forças de cisalhamento muito fortes. O processo de aderência inicial será discutido com mais detalhes a seguir.

Após a aderência inicial, tem-se a aderência firme. A célula microbiana deposita-se na superfície sólida e estruturas especiais da superfície celular, como por

⁹ MARSHALL, K.C. (1976) Interfaces in microbial ecology. Harvard University Press, Cambridge, Mass. apud van LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE W.; ZEHNDER, A.J.B. (1990) Influence of

exemplo, fibrilas ou exopolímeros, devem formar ligações fortes entre a célula e a superfície sólida. Os polissacarídeos parecem ser essenciais no desenvolvimento dos filmes de superfície, mas não para a aderência inicial microbiana (ALLINSON¹⁰ et al. apud van LOOSDRECHT et al., 1990).

O último passo nas etapas da aderência microbiana é a colonização da superfície. Uma vez que as células aderidas firmemente começam a se duplicar, e as células novas formadas permanecem aderidas umas às outras, tem-se, então, o desenvolvimento das microcolônias ou dos biofilmes.

Aderência Inicial

Uma suspensão microbiana pode ser interpretada como um sistema coloidal vivo, e as etapas iniciais da aderência podem, em primeira aproximação, serem descritas pela teoria química dos colóides, tal como a teoria DLVO. Essa teoria descreve a variação na energia de Gibbs como sendo função da distância entre dois corpos. Se efeitos estereos¹¹ (“steric effects”) não estão presentes, a energia total de Gibbs é obtida pela resultante das forças de Van der Waals e de interações eletrostáticas. As forças de Van der Waals são usualmente atrativas e a interação eletrostática é geralmente repulsiva, e essa situação de forças está associada às cargas das células procarióticas e das superfícies. Na Figura 3.2 são apresentadas as energias de interação de Gibbs, eletrostáticas (G_E), Van der Waals (G_A) e total (G_{TOT}), como função da distância de separação (H) entre uma célula e a superfície sólida, para diferentes forças iônicas.

interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* v.54, n.1, p.75-87.

¹⁰ ALLINSON, D.G.; SUTHERLAND, I.W. (1987) The role of exopolysaccharides in adhesion of fresh water bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, v. 133, p. 1319-1327 apud van LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE W.; ZEHNDER, A.J.B. (1990) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, v.54, n.1, p.75-87.

¹¹ efeitos estereos são efeitos que dependem da conformação molecular; neste caso refere-se à interação espacial entre uma molécula de proteína presente na superfície da bactéria e outra molécula de proteína presente na superfície do suporte.

FIGURA 3.2- Representação do comportamento da energia de Gibbs da interação entre uma esfera e uma superfície plana apresentando carga de mesmo sinal, de acordo com a teoria DLVO (RUTTER & VINCENT¹² apud van LOOSDRECHT et al., 1990). Representação esquemática para condições de força iônica (A)- baixa, (B) intermediária e (C) alta. Os símbolos indicam : G_E , interação eletrostática; G_A , interação de van der Waals; G_{TOT} , interação total; H , distância mínima de separação entre duas superfícies (van LOOSDRECHT et al. , 1990).

Sob condições de força iônica pequena, $G_{TOT}(H)$ possui um máximo positivo que constitui uma barreira para a aderência no mínimo primário (aderência à curta distância ou irreversível) (Figura 3.2.A). O máximo na $G_{TOT}(H)$ é menor com o aumento da força iônica, associado à redução da amplitude da energia de repulsão G_E (Figura 3.2.B). Para determinados valores intermediários da força iônica, o máximo é tão pequeno que uma fração das partículas pode conter energia térmica suficiente para transpor a barreira, ou seja, acontece uma pequena aderência irreversível. E, mesmo com uma força iônica mais alta (Figura 3.2.C), quando a $G_{TOT}(H)$ é igual a 0, todas as partículas podem alcançar o mínimo primário.

À distâncias maiores de separação (poucos nanômetros), existe um outro mínimo, (mais fraco) na G_{TOT} , conhecido como mínimo secundário (aderência à longa distância ou aderência reversível). Ele é mais pronunciado em condições intermediárias de força iônica e é mais profundo para sistemas que possuem uma atração de van der

¹² RUTTER, P.R.; VINCENT, B. (1984) Physicochemical interactions of the substratum, microorganisms and the fluid phase. In: MARSHALL K. C. (ed.), Microbial adhesion and aggregation. Springer-Verlag, Berlin, p.21-38. apud van LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE W.; ZEHNDER, A.J.B. (1990) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* v.54, n.1, p.75-87.

Waals grande, e para partículas maiores (van LOOSDRECHT et al., 1989). Neste contexto, as células microbianas são consideradas como partículas grandes. Se a profundidade do mínimo secundário não exceder valores além de poucos Kt por partícula ($1 Kt = 4 \times 10^{-21} \text{ J} \times \text{célula}^{-1}$), em que K é a constante de Boltzmann e t é a temperatura em graus Kelvin), a célula microbiana se adere reversivelmente. Para pequenas distâncias de separação, por exemplo, com $H < 1 \text{ nm}$, as interações de curta distância (ligação de hidrogênio, formação de pares iônicos, etc.) são efetivas, além dos efeitos estereos, pois elas determinam a força de aderência no mínimo primário.

A teoria DLVO é capaz de prever se a aderência no mínimo primário poderá ocorrer, mas não pode quantificar a amplitude desse mínimo. Na presença de polímeros extracelulares da célula ou da superfície, ou ambas, pode ocorrer um obstáculo estereo (Figura 3.3.a.) ou uma ponte de polímeros (Figura 3.3.b.), além das interações já descritas pela teoria DLVO. No caso do obstáculo estereo, tem-se uma barreira sólida promovida pela não interação entre os polímeros da célula e aqueles presentes na superfície, e que não permite a aproximação entre a célula e a superfície. Desse modo, a energia total resultante (G_{TOT}) é negativa, porém muito pequena, representando uma interação repulsiva ou “fracamente” atrativa. Com relação à interação por ponte de polímeros (Figura 3.3.b), pode-se verificar que a energia resultante desta é negativa e grande, representando, portanto, uma energia de atração forte.

Em suma, a aderência microbiana inicial é um processo reversível, que geralmente, acontece no mínimo secundário (van LOOSDRECHT et al., 1989). Isto implica em não haver contato direto entre a célula e a superfície.

FIGURA 3.3- Interação repulsiva entre superfícies cobertas por polímeros (a) e interação do tipo ponte de polímeros entre superfícies (b). G_A , interação de Van der Waals; G_E , interação eletrostática; G_S , interação estereo; G_B , interação de “ponte”; G_{TOT} , interação total; H , distância entre duas superfícies; g , espessura média da cobertura de polímeros. Para distinguir entre os polímeros ligados à superfície sólida daqueles ligados à célula, eles foram desenhados em espessuras diferentes (van LOOSDRECHT et al., 1990).

3.3.1.2 Pré-condição de superfície

A pré-condição de superfície depende, principalmente, do tipo de suporte, portanto, suas características químicas são importantes.

VERRIER et al. (1988) verificaram a aderência inicial de quatro culturas puras de células metanogênicas em superfícies poliméricas [politetrafluoretileno (PTFE), polipropileno (PP), polietileno (PE), PVC, poliacetal (PAC) e poliamida 6 (PAM)], sob condições anaeróbias de cultivo. As espécies responderam diferentemente em relação ao suporte estudado, a *Methanosarcina mazei* não aderiu em nenhum dos suportes, a *Methanothrix soehngenii* (célula hidrofóbica) aderiu preferencialmente a polímeros hidrofóbicos (PTFE, PP e PE), a *Methanospirillum hungatei* (célula hidrofílica) preferiu superfícies hidrofílicas (PAC e PVC) e a *Methanobrevibacter arboriphilicus* (célula mais hidrofóbica) aderiu sobre todas as superfícies. O acúmulo de biomassa foi rápido

no polipropileno em relação ao PVC, e foi lenta na poliamida, revelando a vantagem de superfícies hidrofóbicas para a aderência celular. A hidrofobicidade do material foi testada verificando-se o ângulo de contato com a água. Quanto maior o ângulo de contato, maior a hidrofobicidade. Os autores ainda verificaram que a atividade metanogênica acetoclástica foi muito rápida para os dois primeiros dias de colonização dos suportes PP e PVC, e foi sete vezes maior para o PP (suporte hidrofóbico) em relação ao PVC (suporte hidrofílico). Nos oito dias posteriores de colonização dos suportes, a atividade metanogênica acetoclástica apresentou um leve aumento. A atividade metanogênica específica foi então máxima nos dois primeiros dias e depois foi diminuindo lentamente, confirmando que o crescimento do biofilme e o desenvolvimento das células metanogênicas não estavam relacionados; o que pode sugerir que outros grupos tróficos (acidogênicas, acetogênicas e/ou metanogênicas hidrogenotróficas) contribuem em graus diversos para a formação do biofilme e isso em função das características do suporte. Assim sendo, os autores (VERRIER et al., 1988) afirmaram que a hidrofobicidade do material suporte influenciou na aderência das células metanogênicas e no desenvolvimento inicial de biofilmes anaeróbios. Entretanto, ressaltaram que são vários os parâmetros que influenciam a formação inicial do biofilme em sistemas anaeróbios de tratamento de resíduos, como por exemplo, a porosidade e rugosidade do material suporte, a composição do meio, a taxa de carregamento orgânico, entre outros. Está claro que a fonte de carbono determina o equilíbrio microbiológico e a composição mineral influencia na aderência tanto direta, através dos cátions, quanto indiretamente, pela formação de precipitados que se constituem em novos sítios de aderência. Entretanto, quando o meio a ser tratado é muito diluído ou contem poucos sólidos em suspensão, por exemplo, águas residuárias de indústrias farmacêuticas, químicas, de polpa e de papel, o suporte tem sempre influência significativa na partida e eficiência do processo. Portanto, de acordo com os resultados de VERRIER et al. (1988), a escolha do suporte para a aderência e imobilização de biomassa em biorreatores deve considerar as características hidrofóbicas do mesmo.

LA MOTTA et al. (1982) observaram os efeitos da adição de polímeros naturais e sintéticos, usados como pré-condicionantes de superfície, na taxa de aderência e

crescimento do biofilme. Os autores mostraram que uma pré-cobertura do suporte com polímeros sintéticos (polímeros catiônicos), pode acelerar o desenvolvimento de um filme. Entretanto, o desenvolvimento do biofilme e a conversão do substrato foi mais efetiva quando polímeros naturais foram utilizados.

Outro fator importante na formação do biofilme é a presença de elementos como o cálcio e fósforo no meio circundante. HARVEY et al. (1984), através de análises morfológicas da estrutura microbiana do biofilme em três reatores anaeróbios, dois de filme fixo e um de mistura intermitente, verificaram a presença de precipitados cristalizados ao redor do material suporte. Esses precipitados aumentavam em quantidade com o passar do tempo. Através de análise de raio X por energia dispersiva mostraram que a matriz extracelular continha cálcio e fósforo em concentrações 92 e 28 vezes maiores, respectivamente, em relação ao material intracelular. Concluíram, então, que a integridade do biofilme é mantida por polissacarídeos carregados que constituem o glicocálix, e que devem servir como trocadores de íons nos quais os grupos iônicos são interligados pelo cálcio. Portanto, pôde-se afirmar que o cálcio é importante para manter o biofilme aderido ao material suporte. Ainda, foi verificado que adicionando-se um quelante específico ao cálcio, bis-etilenoglicol (B-amino-etiléter) N-N-ácido tetraacético (EGTA) promoveu-se o desprendimento do biofilme.

HULSHOFF POL¹³ et al. apud GUIOT et al. (1988) afirmaram que cátions bivalentes como o cálcio podem efetuar uma ponte entre grupos negativamente carregados nas superfícies de células procarióticas. É o caso de organismos gram-positivos e gram-negativos que possuem superfícies negativamente carregadas pela presença de grupos carboxila e fosfatos. Além disso, observaram que concentrações de cálcio na faixa de 25 a 100 mg/litro aumentaram a capacidade de floculação de lodos anaeróbios e a taxa de granulação do lodo.

¹³ HULSHOFF POL, L.; van der WORP, J.J.M.; LETTINGA, G.; BEVERLOO, W.A. (1986). Physical characterization of anaerobic granular sludge. In: Proc. of the NVA-EWPCA Conf. On water treatment: Anaerobic treatment. A grown-up technology. Aquatec' 86, Amsterdam, The Netherlands, Industrial presentations (Europe) Schiedam, B.V., The Netherlands, p. 89-101. apud GUIOT, S.R.; GORUR, S.S.; KENNEDY, K.J. (1988). Nutritional and Environmental Factors Contributing to Microbial Aggregation During Upflow Anaerobic Sludge Bed-Filter (UFB) Reactors Start-up. In: Proc. of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion, 22-26 May, Bologna, Italy. HALL, E.R.; HOBSON, P.N. eds. Pergamon Press, Oxford, UK, p. 47-53.

Não existem evidências, entretanto, de que o cálcio possa induzir a granulação de lodos em suspensão e pouco ativos.

3.3.2 Processos de remoção do biofilme

O biofilme pode ser removido de uma superfície por uma das seguintes formas: predação, cisalhamento, abrasão e desprendimento (BRYERS, 1988). Detalhando-se:

PREDACÃO: É comum a ocorrência da predação do biofilme por protozoários, porém é um dos processos de remoção que vem sendo completamente ignorado nos modelos matemáticos.

CISALHAMENTO: Vários trabalhos mostraram que o material do biofilme é removido continuamente à medida que o biofilme vai se desenvolvendo. Resultados de alguns estudos (TRULEAR¹⁴ apud BRYERS, 1988) mostraram que uma quantidade significativa de biomassa suspensa é removida continuamente do biofilme e as taxas de remoção do biofilme são proporcionais à quantidade de biofilme presente até uma certa espessura. RITTMANN¹⁵ apud BRYERS (1988), baseado em dados de TRULEAR (1979), e usando uma expressão de primeira ordem na quantidade de biofilme, encontrou uma correlação linear entre a taxa de perda do biofilme e a massa de biofilme presente.

Entretanto, experimentos indicaram que a taxa de remoção não é uma função simples, mas altamente dependente, dentre outros fatores, da hidrodinâmica do sistema. Uma vez que a espessura do biofilme excede a subcamada basal do sistema, o estresse por cisalhamento (a uma mesma velocidade) aumenta significativamente, o que por outro lado, aumenta a taxa de remoção do biofilme.

¹⁴ TRULEAR, M.G. (1979) Rate of biofilm development in a turbulent flow field. M.S. thesis, Rice University, Houston apud BRYERS, J.D. (1988) Modeling biofilm accumulation. In: BAZIN, J.B. & DROSSEN, J.F. (eds) *Physiological Models in Microbiology*. v. II CRC Press, cap. 11, p.109-144.

¹⁵ RITTMANN, B.E. (1983) The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnol. Bioeng.*, v.24, p.501. apud BRYERS, J.D. (1988) Modeling biofilm accumulation. In: BAZIN, J.B. & DROSSEN, J.F. (eds) *Physiological Models in Microbiology*. v. II CRC Press, cap. 11, p.109-144.

ABRASÃO: Ocorre quando a biomassa capturada nos interstícios do material suporte, por exemplo esferas de polietileno, sofre agitação de modo que as partículas colidam e a abrasão resultante, continuamente, remove o excesso de biomassa.

DESPRENDIMENTO: A soltura ou desprendimento é um evento através do qual grandes quantidades, ou seções inteiras, do biofilme deixa a superfície suporte e entra no meio circundante. Ao contrário da remoção por cisalhamento, o desprendimento é uma ocorrência periódica. Não existem explicações claras para o desprendimento, a mais provável compõem-se de várias causas específicas a cada sistema. O desprendimento está relacionado com a ocorrência de atividade anaeróbia na região interna do biofilme aeróbio muito espesso. Assim, associado às limitações de transferência de oxigênio em tais casos, camadas profundas do biofilme se tornam anaeróbias produzindo ácidos voláteis, baixando o pH e talvez produzindo gases insolúveis, os quais enfraquecem a estrutura do biofilme. Entretanto, esta premissa não explica o desprendimento de biofilmes estritamente anaeróbios. HARREMOËS¹⁶ et al. apud BRYERS (1988) associaram o desprendimento com a formação de bolhas de nitrogênio, em um sistema piloto de filme fixo usado para a desnitrificação. As bolhas provocavam o desprendimento localizado do biofilme.

3.4. Modelos conceituais sobre biofilmes

WIMPENNY & COLASANTI (1997) fizeram ampla revisão sobre a estrutura básica dos biofilmes microbianos encontrados na natureza e em sistemas artificiais, e revelaram que existem pelo menos três modelos conceituais de biofilmes : (i) biofilme em mosaico heterogêneo; (ii) biofilme penetrado por canais ("water-channel model"); (iii) biofilme denso confluyente. Os autores (opt. cit.) afirmaram que quando se avalia os efeitos das fontes de crescimento sobre a formação do biofilme, pode-se considerar que

¹⁶ HARREMOËS, P.; JANSEN, J. la Cour; KRISTENSEN, G.H. (1980) Practical problems related to nitrogen bubble formation in fixed film reactors. *Prog. Water Technol.*, v.12, p.253 apud BRYERS, J.D. (1988) Modeling biofilm accumulation. In: BAZIN, J.B. & DROSSEN, J.F. (eds) *Physiological Models in Microbiology*. v. II CRC Press, cap. 11, p.109-144.

as três formas são corretas, mas encerram condições diferentes de concentração de substrato, ou seja, cada tipo de biofilme se desenvolve em ambientes com concentração baixa, média e alta de nutrientes, respectivamente.

Pesquisas experimentais com colônias microbianas de organismos procarióticos e modelos computacionais vêm confirmando este ponto de vista. A utilização de modelos computacionais para modelar o crescimento de biofilmes vem fornecendo resultados que sugerem ser a estrutura do biofilme amplamente determinada pela concentração do substrato (Figura 3.4).

FIGURA 3.4- Uma possível relação entre as concentrações prevalentes de substrato e os tipos de biofilmes (WIMPENNY & COLASANTI, 1997).

A descrição de cada modelo é dada a seguir:

- (i) **Modelo “water-channel”** (COSTERTON et al., 1995), esse modelo apresenta a formação de microcolônias, que após colonizarem a superfície, sofrem mudanças fenotípicas e produzem, entre outras moléculas estruturais, exopolissacarídeos

(Figura 3.5). Algumas microcolônias formam estruturas em forma de cone; à medida que o filme vai se formando são vistas também estruturas em forma de cogumelos, fixadas na superfície pelos polímeros, e microrganismos. Estes podem se juntar deixando canais de água que penetram quase que toda a base do filme; canais bem pequenos também podem ser vistos dentro das microcolônias. A descrição desse tipo de biofilme é consistente com observações de outros grupos de pesquisa (KEEVIL & WALKER¹⁷; WOLFAARDT¹⁸ et al.; MASSOL-DEYA¹⁹ apud LEWANDOWSKI et al., 1998). Esse tipo de biofilme pode ocorrer em ambientes com concentração média e baixa de nutrientes, como por exemplo, em sistemas de tratamento de efluentes.

FIGURA 3.5- Modelo conceitual da arquitetura de um biofilme (formado por uma única espécie) baseado na observação de biofilmes vivos com o microscópio confocal de varredura a laser (CSLM). (Fonte: COSTERTON et al. 1995).

- (ii) **Modelo do mosaico heterogêneo** (KEEVIL et al., 1992). Este modelo é uma forma extrema do modelo “water-channel”. Os autores verificaram a estrutura de biofilmes formados em sistema de distribuição de água, através da utilização de microscópio diferencial de contraste de interferência, pelo qual forma-se uma imagem com ampla faixa de foco. Nessas condições, foi possível avaliar a estrutura do biofilme como um todo. A visão desses biofilmes é de microcolônias

¹⁷ KEEVIL, C.W.; WALKER, J.T. (1992) Nomarski DIC microscopy and image analysis of biofilms. *Binary*, v.4, p. 93-95 apud LEWANDOWSKI, Z.; WEBB D.; HAMILTON M.; HARKIN G. (1998). Quantifying biofilm structure. In: MICROBIAL ECOLOGY OF BIOFILMS: CONCEPTS, TOOLS AND APPLICATIONS. IAWQ Specialty Conference., Illinois, 1998. *Anais*, p. 95-102.

¹⁸ WOLFAARDT, G.M.; LAWRENCE, J.R.; ROBARTS, R.D.; CALDWELL D.E. (1994) Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, p.434-446.

¹⁹ MASSOL-DEYA (1994) MASSOL-DEYÁ, A.A.; WHALLON, J.; HICKEY, R.F.; TIEDJE, J.M. (1994). Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, p.769-777.

que formam uma torre de células, presas ao substrato pela base, mas, geralmente, bem separadas de seus vizinhos (Figura 3.6). Frequentemente existem, além das torres, uma base de células individuais aderidas à superfície formando um filme muito fino. A principal diferença entre este modelo e o descrito anteriormente, é que as torres observadas estão bem separadas entre si e são circundadas pela fase aquosa; neste caso não pode-se afirmar que existam canais entre as estruturas. Esse tipo de biofilme ocorre em ambientes com baixíssima concentração de nutrientes.

FIGURA 3.6- Modelo de biofilme em mosaico heterogêneo de acordo com KEEVIL et al. (1992).

- (iii) **Modelo do biofilme denso.** A presença deste tipo de biofilme é comum na área clínica, como os biofilmes da placa dentária, que se desenvolvem em ambiente rico em nutrientes, e aqueles presentes no interior de catéteres utilizados em hospitais. Nestes biofilmes não existem evidências de canais (Figura 3.7).

FIGURA 3.7- Sistema do biofilme denso. Placa dentária (com duas semanas de desenvolvimento) de três indivíduos diferentes apresentando estrutura densa, microcolônias e algumas associações celulares (Fonte: NYVAD & FEJERSKOV²⁰ apud WIMPENNY & COLASANTI, 1997).

3.5 “Robbins Device”, um dispositivo para estudos de biofilmes

O “Robbins Device” (RD) é um dispositivo para amostragem de biofilmes que foi desenvolvido por McCOY et al. (1981). Consiste de uma série de “parafusos” (T) (Figura 3.8) que podem ser de metal ou de plástico, dispostos ao longo de um tubo. Na base dos parafusos encontram-se cupons, suportes esféricos ou quadrados também chamados de corpo de prova ou “biofilm probe”, que ficam expostos ao líquido que contém os microrganismos e que está passando no tubo. Após a formação do biofilme sobre a superfície dos cupons, os “parafusos” podem ser removidos assepticamente, e os cupons podem ser retirados sem provocar qualquer dano no biofilme formado. Posteriormente, o biofilme pode ser analisado e quantificado usando técnicas apropriadas. Note que o RD simula uma tubulação por onde passa, por exemplo, água de resfriamento de caldeira, na qual geralmente são detectados problemas de biocorrosão. Então, com esse dispositivo que simula uma situação real, os autores puderam centrar

²⁰ NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. (1989) Structures of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res.*, v.23, p.151-158 apud WIMPENNY, J.W.T.; COLASANTI, R. (1997). A Unifying hypothesis for the structure of Microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol Ecology*, v.22, p.1-16.

esforços em estudos sobre biofilmes, bactérias redutoras de sulfato e sua implicação na corrosão de metais, e, como fazer para evitar ou minimizar a corrosão.

FIGURA 3.8- Desenho esquemático do Robbins Device. (Fonte: BLENKINSOPP & COSTERTON, 1991).

É importante mencionar alguns trabalhos que utilizaram o Robbins Device no estudo de biofilmes. No trabalho de RUSESKA et al. (1982), os autores utilizaram este dispositivo para testar diferentes tipos de biocidas contra bactérias redutoras de sulfato que provocam corrosão em metais. LARSEN et al. (1997) utilizaram um dispositivo modificado do Robbins device (chamado “modified Robbins Device” - MRD), que possui somente um lado contendo os parafusos, diferindo do RD que contem parafusos nos dois lados, conforme apresentado na Figura 3.8, para verificar a suscetibilidade de biofilmes formados por *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces naeslundii* à diferentes concentrações de cloro (chlorhexidine). POWER et al. (1999) utilizaram o MRD para monitorar a presença de bactérias redutoras de sulfato em biofilmes heterotróficos aeróbios.

A formação de biofilmes no sistema MRD nunca foi testada unicamente com microrganismos anaeróbios, de acordo com a literatura consultada, notadamente os anaeróbios estritos. Esse sistema foi então escolhido para estudar a formação dos biofilmes anaeróbios, como proposto por POWER et al. (1999).

3.6 Uso do RNAr 16S em estudos de filogenia e identificação de células procarióticas

Avanços recentes nas técnicas moleculares vêm permitindo aos pesquisadores estudarem a diversidade microbiana, em nível molecular, nos mais diversos

ecossistemas terrestres, aquáticos, artificiais, etc. Os genes do RNAr 16S são úteis para tais estudos uma vez que estão presentes em todas as células procarióticas. O gene contém tanto regiões conservadas, as quais podem ser usadas para desenhar primers para amplificação usando o PCR como também, regiões variáveis que podem ser usadas para distinguir seqüências umas das outras. A extração do DNA total de uma amostra seguido de amplificação dos genes do RNAr 16S, deve gerar uma mistura de fragmentos de DNA representando todas as espécies ou as mais abundantes presentes na amostra. O sucesso desse método não depende do estado fisiológico das células das quais o DNA é extraído. O único pré-requisito é que as células sejam lisadas através do método de extração empregado, e que todos os genes do RNAr 16S estejam igualmente acessíveis para a amplificação.

Após a etapa anterior, as seqüências do RNAr 16S podem ser digeridas por enzimas de restrição e analisadas por eletroforese em gel; esse método é chamado de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA – “amplified ribossomal DNA restriction analysis”) (SMITH et al., 1997). Alternativamente, os genes do RNAr 16S amplificados podem ser analisados por clonagem e digestão com enzimas de restrição ou seqüenciamento; neste sentido, um banco genético, refletindo a comunidade microbiana, pode ser obtido. A vantagem do ARDRA é que flutuações na comunidade microbiana podem ser detectadas através da análise dos padrões de bandas. Informações mais detalhadas podem ser obtidas por análises de restrição dos genes do RNAr 16S (SMITH et al., 1997).

Os princípios dos métodos baseados na comparação de seqüências de nucleotídeos do RNAr 16S são também aplicáveis à subunidade maior do RNAr (RNAr 23S). RASKIN et al. (1994), afirmaram que métodos baseados na comparação de seqüências de nucleotídeos do RNAr 23S serão muito mais utilizados no futuro, uma vez que o conteúdo de informação disponível nesta sub-unidade é maior. No momento, seu uso é relativamente pequeno em relação aos métodos usando o RNAr 16S, devido ao banco de seqüências disponíveis ser muito menor para esta subunidade.

Extensa análise comparativa de seqüências do RNAr 16S, representando ampla diversidade de microrganismos, vem revelando que diferentes regiões da molécula

variam na conservação da seqüência. Essas regiões permitem a elaboração de sondas de oligonucleotídeos para hibridação, gerais e específicas. Oligonucleotídeos complementares a regiões universalmente conservadas do RNAr 16S são úteis para quantificar o RNAr de qualquer amostra, constituindo as sondas universais, enquanto que, oligonucleotídeos complementares à regiões de seqüências mais variáveis, ou seja, únicas para microrganismos específicos ou grupo de microrganismos, são usados como sondas seletivas, aquelas específicas para espécie, gênero, ou para grupo filogenético.

O trabalho de AMANN et al. (1990) descreveu a utilização da técnica de amplificação do RNAr 16S em conjunto com a técnica de citometria de fluxo para analisar populações microbianas mistas. A citometria de fluxo ("flow cytometry") é um método bem estabelecido para a medida de características químicas e físicas selecionadas de células individuais. Parâmetros múltiplos, como por exemplo, emissão de fluorescência em comprimentos de onda de interesse e dispersão da luz à 90⁰ podem ser determinados individualmente para um grande número de células num curto período de tempo, até para cerca de 1.000 células/segundo.

Ainda, no trabalho de AMANN et al. (1990), os autores utilizaram três espécies de bactérias cuja seqüência do RNAr 16S são conhecidas: *Escherichia coli* TB1; *Desulfovibrio gigas* e *Desulfobacter hydrogenophilus*. Foram utilizadas três sondas, uma para BRS (bactérias redutoras de sulfato), outra para o Domínio *Bacteria* (EUB338) e outra para o Domínio *Eucarya*. Quando utilizou-se a sonda de BRS, esta sonda é complementar à uma região do RNAr 16S de *D. gigas*, mas possui 3 nucleotídeos trocados com a região correspondente de *E. coli*, pôde-se distinguir entre as células alvo, que eram de *D. gigas*, e as não-alvo, células de *E.coli*. O valor da intensidade de fluorescência detectada na citometria foi de 60 e 2,9, referente à *D. gigas* e *E. coli*, respectivamente.

3.7 Taxonomia das *Archaeae* metanogênicas

Morfologicamente as *Archaeae* metanogênicas se constituem num grupo diverso, entretanto, fisiologicamente são extremamente similares já que todas são organismos anaeróbios estritos, e compartilham a capacidade metabólica comum de produzir

metano. A incerteza acerca das relações sistemáticas refletiu-se na antiga classificação taxonômica, que inicialmente distribuiu as metanogênicas entre grupos bem caracterizados de acordo com seus aspectos morfológicos (ZEHNDER et al., 1982). Mais tarde, BARKER (1956) enfatizou a fisiologia extremamente particular de cada grupo e então reuniu as metanogênicas numa única família, a *Methanobacteriaceae*. Embora o reagrupamento de Barker tenha sido considerado na edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” de 1974, o método ainda fornecia informações limitadas sobre as relações entre as várias espécies de metanogênicas. A principal razão foi o conhecimento limitado, na época, acerca das propriedades metabólicas, bioquímicas e moleculares desses microrganismos. O dilema imposto por características aparentemente contraditórias – mesma fisiologia versus morfologia variada (Tabela 3.1) – não foi resolvido até que FOX et al. (1977) fizeram uma análise comparativa de seqüências do RNAr 16S de várias metanogênicas. Desde então, os organismos metanogênicos se apresentaram como um grupo único e coerente, porém filogeneticamente distante tanto das bactérias típicas, quanto dos eucariotos (FOX et al., 1980; WOESE 1981). Estudos sobre a estrutura do DNA, metabolismo intermediário e composição dos lipídios conduziram a uma revisão da classificação e nomenclatura das metanogênicas apresentada por BALCH et al. (1979).

Baseado na comparação de seqüências do RNAr 16S de diversos organismos procariotos, e, com as pequenas subunidades correspondentes do RNAr de eucariotos, Woese e colaboradores, reclassificaram os organismos em três Domínios: *Eucarya* (eucariotos), *Bacteria* (*Eubacteria*) e *Archaea* (anteriormente *Archaeobacteria*) (WOESE 1981). Os organismos procariotos foram localizados em dois grupos filogeneticamente distintos ou Domínios, *Eubacteria*, que consiste do grupo tradicional de bactérias incluindo as bactérias fotossintéticas, bactérias azuis-verdes, bactérias formadoras de esporos, actinomicetos, e spiroquetas e *Archaea* que compreendem as células metanogênicas, as halófilas e as termófilas extremas. A classificação filogenética baseada nos genes do RNAr propiciaram ampla visão da evolução dos organismos, já que estas informações puderam ser organizadas numa árvore filogenética (Figura 3.9)

(PACE, 1996). As distâncias evolutivas dos organismos, baseada no número de variações das seqüências entre eles são lidas ao longo de segmentos lineares, veja a barra de escala na Figura 3.9. Algumas das lições tiradas a partir desta árvore da vida contradizem crenças antigas. Por exemplo, a divergência evolutiva entre *Archaea* e *Bacteria* rompe com a ideia intrínseca de que existe uma unidade evolutiva entre os procariotos (PACE, 1996).

TABELA 3.1. Substratos utilizados pelas *Archaeae* metanogênicas.

Substratos	Organismos
H ₂	<i>Methanobacterium bryantii</i> , <i>M. formicicum</i> , <i>M. thermoautotrophicum</i> ; <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> , <i>M. ruminantium</i> , <i>M. smithii</i> ; <i>Methanococcus mazei</i> , <i>M. vanniellii</i> , <i>M. voltae</i> ; <i>Methanomicrobium mobile</i> ; <i>Methanogenium cariaci</i> , <i>M. marisnigri</i> ; <i>Methanospirillum hungatei</i> ; <i>Methanosarcina barkeri</i> .
HCOOH	<i>M. formicicum</i> , <i>M. ruminantium</i> , <i>M. smithii</i> , <i>M. vanniellii</i> , <i>M. voltae</i> , <i>M. mobile</i> , <i>M. cariaci</i> , <i>M. marisnigri</i> , <i>M. hungatei</i>
CO	<i>Methanosarcina barkeri</i>
CH ₃ OH	<i>Methanosarcina mazei</i> , <i>Methanosarcina barkeri</i>
CH ₃ NH ₂ , (CH ₃) ₂ NH, (CH ₃) ₃ N	<i>Methanosarcina mazei</i> , <i>Methanosarcina barkeri</i>
CH ₃ CH ₂ -N(CH ₃) ₂	<i>Methanosarcina barkeri</i>
CH ₃ COOH	<i>M. mazei</i> , <i>M. barkeri</i> , <i>Methanosaeta</i> (antes <i>Methanothrix</i>) <i>soehngenii</i>

Fonte: ZEHNDER et al. (1982)

FIGURA 3.9 – A árvore da vida com os três Domínios baseada na comparação de seqüências de nucleotídeos do RNAr 16S (PACE, 1996). A barra de escala (0.1 variações por nucleotídeo) representa a distância evolutiva. As seqüências usadas nesta árvore são representativas da maioria dos grupos. As linhas com nomes representam organismos cultivados; linhas com número e letras representam seqüências de populações naturais.

Segundo JONES et al. (1987), os dados e conceitos de Woese trouxeram senso de harmonia e clareza para o estado confuso da sistemática microbiana da época. Embora muitas espécies de bactérias “não-usuais” já tivessem sido muito bem estudadas antes da proposta de Woese, e também tivessem sido consideradas como excepcionais, a sua afiliação filogenética com outros organismos era incerta. Por exemplo, o gênero *Halobacterium* (Archaea) foi previamente classificada junto com os bacilos de bactérias verdadeiras (Eubacteria) gram-negativos e aeróbios, tais como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, e *Acetobacter*. Entretanto, mesmo naquela época já se sabia que o gênero

Halobacterium possuía características distintas dos bacilos aeróbios gram-negativos, incluindo a maioria das diferenças na estrutura da parede celular e nos lipídios de membrana compostos de C₂₀ glicerol isopropenoide diéters; então, fornecendo evidências para o conceito do Domínio *Archaea* que existiu há quase 20 anos antes da proposta de WOESE (1987).

De acordo com JONES et al. (1987), as coenzimas encontradas nas metanogênicas são: F₄₂₀, Metanopterina e F₄₃₀. A coenzima F₄₂₀ e os derivados de metanopterina são os responsáveis pela autofluorescência das metanogênicas (sob condições oxidantes). Este composto possui absorção máxima em 420 nm e foi encontrado em todas as células de metanogênicas como *Methanobrevibacter* e *Methanobacterium*, exceto em *Methanosaeta* que não fluoresce. A absorbância é perdida após a redução. A metanopterina é um composto azul, que em *Methanobacterium thermoautotrophicum* foi chamado de fator F₃₄₂ (em função da sua absorbância máxima em 342 nm). O F₃₄₂ é um componente da via de redução do dióxido de carbono à metano. Este fator pode ser reduzido à dihidrometanopterina, que também é azul brilhante fluorescente e pode se ligar ao CO₂. A necessidade de níquel no crescimento de *Methanobacterium thermoautotrophicum* conduziu à descoberta de que o maior “sequestrador” desse metal era o composto amarelo, e não fluorescente, F₄₃₀. Estudos biossintéticos e estruturais conduziram à proposta de que o composto era um anel tetrapirrólico contendo um átomo de níquel no centro da molécula. O composto F₄₃₀ é necessário na etapa final da produção de metano, já que é um cofator na atividade da enzima desidrogenase do monóxido de carbono (CO), catalizando a reação de CO com metil tetrahidrofolato.

As células metanogênicas constituem-se num grupo filogeneticamente coerente dentro do Reino *Euryarchaeota*, o qual, juntamente com o reino *Crenarchaeota* fazem parte do Domínio *Archaea* (WOESE, 1990). As metanogênicas foram o primeiro grupo microbiano a ter sua taxonomia baseada na filogenia inferida através da comparação do RNAr 16S (BALCH et al., 1979). A distribuição filogenética limitada das

metanogênicas sugeriu que um banco de dados de seqüências do RNAr 16S poderia ser a base para o desenvolvimento de sondas, complementares à região do RNAr 16S, compreendendo a maioria dos membros do grupo. RASKIN et al. (1994a) desenvolveram e caracterizaram uma coleção de sondas gerais para as metanogênicas. A classificação baseada na filogenia foi utilizada para selecionar os diferentes grupos alvos para o desenvolvimento das sondas. O uso das mesmas na quantificação de grupos metanogênicos em reatores biológicos anaeróbios foi descrito no trabalho de RASKIN et al. (1994b) e serão apresentadas no item 3.9 desta tese.

3.8 Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes ou “Fluorescent *in situ* hybridization”- FISH

A hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) é um método direto que permite identificar células individuais presentes em ecossistemas complexos e que para isso utiliza sondas de oligonucleotídeos, que são seqüências curtas de DNA contendo de 17 a 34 nucleotídeos (AMANN et al., 1990; AMANN et al., 1995; GIOVANNONI et al., 1988; HARMSSEN et al., 1997). Cada célula “ativa” contém entre 10^3 e 10^5 ribossomos e parte desses, são os RNAs ribossomais (RNAr 5S, RNAr 16S e RNAr 23S) (van der MEER et al., 1998). Algumas regiões dos RNAs ribossomais estão acessíveis para a hibridação, que significa que é possível ligar a sonda de oligonucleotídeo, complementar à uma certa região do RNAr 16S, nessa porção do RNAr. Dependendo das sondas utilizadas, o FISH pode ser usado para detectar microrganismos de diferentes níveis filogenéticos.

O FISH consiste na determinação de uma seqüência alvo específica do RNA ribossomal presente em células morfologicamente intactas, ou seja, a célula é hibridada sem que para isso seja necessário romper a mesma (hibridação com a célula íntegra). Esse é o valor e a elegância da técnica, já que as células podem ser detectadas, visualizadas e quantificadas em seus microhabitats naturais sem a necessidade de

cultivá-las (AMANN et al., 1995). Com esta técnica pode-se não somente determinar a morfologia da célula de um organismo não-cultivado e a sua abundância, como também, analisar a sua distribuição espacial *in situ*. Portanto, no caso de biofilmes essa técnica é muito valiosa, pois pode-se identificar, com os biofilmes fixados no suporte, as células microbianas presentes em cada camada do mesmo. Além disso, pode-se com os biofilmes em suspensão, nos quais as células foram removidas do suporte, concentradas e suspensas em meio líquido, quantificar os principais grupos microbianos.

O uso do FISH para contagem e identificação de microrganismos foi proposto por OLSEN et al. (1986) e DeLONG et al. (1989). A identificação microscópica de células individuais com sondas de oligonucleotídeos específicas para o RNAr foi primeiramente realizada com sondas marcadas radioativamente (AMANN et al., 1995). Depois da hibridação das células fixadas, a sonda marcada radioativamente (com S^{35}) era visualizada através de microautoradiografia. Esta etapa não apenas necessitou um tempo adicional, como também resultou na formação de grânulos de prata de alguns micrômetros distante das células alvo, o que prejudicou a exata localização *in situ* de pequenos agregados de células. Embora esse problema pudesse ter sido solucionado com o uso de isótopos marcados menos energéticos (como o H^3), o trabalho para a resolução de 1 μm teria um aumento no tempo necessário para a autoradiografia, que seria de algumas semanas ou meses.

De acordo com AMANN et al. (1995), demonstrou-se há vários anos atrás que as sondas fluorescentes fornecem ótima resolução espacial e podem ser detectadas instantaneamente através da microscopia de fluorescência. Primeiro as células são fixadas e posteriormente são hibridadas. Os RNAs ribossomais alvos fluorescentemente marcados com as sondas permitem identificar as células individualmente (Figura 3.10). Esse tipo de resposta demonstra que a hibridação *in situ* é uma ferramenta adequada para estudos sobre determinação e filogenia em Microbiologia Ambiental. A etapa de fixação é de extrema importância, pois como na hibridação as células são sujeitas a altas temperaturas e concentração de formamida, isto permite manter a integridade da mesma (especialmente a quantidade de ribossomos). Além disso, esta etapa promove uma permeabilização na membrana da célula necessária para que a sonda possa penetrá-la e

se ligar ao RNA ribossomal. De acordo com AMANN et al. (1995), esse protocolo foi muito bem testado para bactérias gram-negativas, já as gram-positivas podem apresentar problemas de permeabilidade à sonda. Neste caso, pode-se usar outra forma de fixação, com etanol por exemplo, ou usar tratamento com lizosima e EDTA antes da hibridação, ou ainda, fixar as células por período curto em mistura de álcool/formaldeído. Segundo o mesmo autor (opt.cit.), a penetração da sonda em células de *Methanococcus* pôde ser aumentada quando a concentração de SDS (dodecil sulfato de sódio) no tampão de hibridação foi aumentada para 1%.

FIGURA 3.10- Desenho esquemático da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes. (Fonte: modificado de uma palestra ministrada pelo Dr. Martin Embley, pesquisador do Museu de História Natural de Londres).

A abordagem do RNAr para a identificação filogenética e para a detecção de microrganismos *in situ* é frequentemente usada de uma forma seqüencial, na qual as amostras são primeiro caracterizadas pelas seqüências homólogas do DNAr (transcrição reversa) (AMANN et al., 1995). Na segunda fase, a abundância de determinados clones e seqüências específicas de RNAr são quantificadas utilizando-se sondas de oligonucleotídeos altamente específicas numa colônia, “dot blot”, ou na hibridação *in*

situ. Embora as abordagens que utilizam o PCR sejam extremamente úteis, a análise de comunidades complexas é bastante trabalhosa e demanda muito tempo, o que força os pesquisadores a eliminarem algumas etapas. Mesmo quando várias centenas de clones são examinados, populações pequenas não podem ser detectadas. Entretanto, existe uma necessidade para um caminho alternativo até a completa caracterização molecular das amostras ambientais. Está bem estabelecido, que em vários níveis taxonômicos, grupos filogenéticos são caracterizados pelas suas semelhanças em certas partes do RNAr, as conhecidas assinaturas ou “fingerprintings”.

As sondas de oligonucleotídeos são bastante adequadas para um “screening” de rotina das assinaturas, quando comparadas com o seqüenciamento. As sondas vêm sendo desenvolvidas para os níveis taxonômicos mais altos, os Domínios *Archaea*, *Bacteria*, e *Eucarya*; para os níveis intermediários, por exemplo, para as bactérias gram negativas redutoras de sulfato; para as subclasses Alfa-*Proteobacteria*, Beta-*Proteobacteria* (grupo abundante de organismos em ecossistemas de água doce e em sistemas de tratamento de efluentes) e Gama-*Proteobacteria* (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pertencem à este grupo); para os aglomerados bacterianos do filo CFB (citofago-flavobacterium), para os dois reinos do Domínio *Archaea*: *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*; para as ordens *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* e *Methanococcales* das metanogênicas; e para os taxa menores, gêneros, espécies, e sondas específicas para subespécies (AMANN et al., 1995).

Um importante aspecto a ser comentado a respeito das sondas está relacionado a sua aplicação em paralelo com subamostras, numa abordagem do geral para o específico, inicialmente usando-se uma sonda universal e três sondas Domínio-específicas, seguidas por outras bem mais específicas (a nível de espécie, por exemplo). Assim, aumenta-se o refinamento da informação sobre a diversidade da comunidade e a composição é obtida rapidamente pelos métodos de hibridação *in situ* ou por “dot blot”. Nesta abordagem, a informação sobre as sondas de alto nível taxonômico, ou seja, as mais gerais, são usadas para selecionar quais os grupos de sondas a serem utilizadas para o próximo e mais baixo nível taxonômico. Por exemplo, se as sondas Domínio-específicas revelam dominância de *Archaea*, as sondas que distinguem entre os dois

grupos de *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* são aplicadas na próxima etapa, antes de serem usadas sondas para as principais ordens de *Euryarchaeota*.

Estudos anteriores (SCHAECHTER et al., 1958), demonstraram que existe correlação entre o conteúdo de RNA ribossomal bacteriano e a taxa de crescimento. Com isso, posteriormente, POULSEN et al. (1993), concluíram que era possível medir a atividade metabólica de uma célula individual através da quantificação do sinal fluorescente obtido com a hibridação *in situ*. Os mesmos autores demonstraram que a diminuição na intensidade do sinal fluorescente, do sinal de hibridação, estava relacionada com o conteúdo de RNAr da célula procariótica e não com a permeabilidade celular, ou mesmo com problemas na hibridação *in situ*. Através do uso combinado de várias sondas, específicas para diferentes populações de interesse e marcadas com diferentes corantes fluorescentes, a posição espacial de diferentes membros da comunidade microbiana também foi estudada (POULSEN et al., 1993). Essa abordagem é de particular interesse quando se quer definir associações sinérgicas entre as populações, como é o caso dos biofilmes.

ALM et al. (1996) criaram um banco de dados para sondas de oligonucleotídeos (OPD- “Oligonucleotide Probe Database”) na tentativa de facilitar a descrição detalhada das condições usadas para sondas e primers existentes na literatura. O OPD reúne informações específicas para que se possa desenvolver e utilizar as sondas de oligonucleotídeos e os primers. A maioria das sondas já catalogadas neste banco de dados são específicas para o RNAr, mas também podem ser encontradas (ou podem ser depositadas) sondas específicas para outros genes. O acesso à OPD pode ser conseguido via internet no seguinte endereço, <http://www.cme.edu/OPD>. No artigo, os autores (opt. cit.) criaram um padrão de nomenclatura para as sondas, de modo que pelo nome da sonda pode-se identificar a especificidade da mesma, ou seja, se é uma sonda que detecta família, gênero, espécie, etc.

3.9- Técnicas moleculares, incluindo o FISH, para avaliar comunidades microbianas de ambientes naturais e de biorreatores operados para o tratamento de resíduos

Um dos trabalhos mais relevantes sobre o emprego das técnicas moleculares para avaliação da composição de comunidades microbianas mistas foi o de AMANN et al. (1992). Neste artigo, os autores (opt. cit.) comentaram sobre o futuro promissor da aplicação desses procedimentos para a identificação de microrganismos presentes em biofilmes. Os resultados apresentados no artigo mostraram a identificação, através de análises moleculares e do FISH, de espécies de bactérias redutoras de sulfato (BRS) presentes em biofilmes, desenvolvidos sobre lâminas de vidro incubadas em um biorreator. Sob microscopia de contraste de fase constatou-se que os biofilmes se desenvolveram sobre as superfícies de vidro em algumas horas, e, com aproximadamente 24h de incubação, verificou-se a formação de uma monocamada completa de células. Após 3 semanas se estabeleceram multicamadas com 5 a 10 μm de espessura. Através do FISH observou-se que membros da população organizados como aglomerados celulares nas camadas dos biofilmes foram semelhantes à espécie *Desulfovibrio vulgaris*, enquanto que outros, semelhantes ao gênero *Desulfomonas* spp. foram encontrados distribuídos mais uniformemente. Os autores (opt.cit.) também concluíram que as informações obtidas refletiram a influência de alguns fatores do meio sobre os biofilmes formados, tais como limitação nutricional de substrato, assim como na organização espacial das células, ou seja na mobilidade diferencial de cada membro dentro da matriz do biofilme, muito embora essas informações necessitassem ser quantificadas. Ainda, como recomendação, o artigo reforçou a necessidade do aprimoramento da técnica FISH no sentido de avaliar a penetração das sondas em biofilmes espessos e de se utilizar simultaneamente sondas marcadas com diferentes fluorocromos, a fim de se definir as relações espaciais entre populações, uma vez que a organização espacial deverá refletir associações metabólicas obrigatórias ou preferenciais entre as espécies, dado o caráter de consórcio microbiano dos biofilmes e a dependência de muitos microrganismos entre si.

Posteriormente ao trabalho de AMANN et al. (1992), RASKIN et al. (1994a) publicaram resultados sobre o desenvolvimento e a caracterização de 8 sondas de oligonucleotídeos, complementares ao RNAr 16S de várias espécies de *Archaea* metanogênicas, para o uso como sondas de hibridação em estudos de microbiologia ambiental e de detecção de microrganismos. A especificidade com o grupo alvo e a temperatura de dissociação para cada sonda foi caracterizada. No geral, as sondas foram bem específicas para as *Archaea* metanogênicas alvo e não hibridaram com os RNAs ribossomais de grupos não-alvo. Juntas, as oito sondas (Tabela 3.2) englobaram as *Archaea* metanogênicas representadas até então, em cultura pura, com exceção dos membros da família *Methanothermaceae*. A classificação das metanogênicas, conforme apresentada na Tabela 3.2, foi realizada por VOGELS²¹ et al. apud RASKIN et al. (1994a). Das oito sondas, duas foram específicas para as ordens *Methanobacteriales* e uma para a ordem *Methanococcales*. A quarta sonda reconheceu três famílias pertencentes à ordem *Methanomicrobiales*, a terceira ordem dentro da atual classificação. A quinta sonda foi específica para a última família dentro desta ordem, a *Methanosarcinaceae*. Três sondas adicionais incluíram gêneros diferentes dentro da família *Methanosarcinaceae*.

A Tabela 3.3 apresenta a relação das sondas utilizadas por RASKIN et al. (1994a), específicas para metanogênicas e outros membros do Domínio *Archaea*. Com relação às sondas e o metabolismo único dos tipos microbianos estudados, os autores fizeram as seguintes considerações:

- (1) As sondas para o Domínio *Archaea* (ARC915 e ARC314) também foram complementares à muitos grupos de *Archaea*, mas não-metanogênicos, como os gêneros afiliados do reino *Crenarchaeota* e das ordens *Thermoplasmatales*, *Archaeoglobales*, *Thermococcales*, e dos halófilos extremos, os quais, junto com as metanogênicas, constituem o reino *Euryarchaeota*;

²¹ VOGELS, G.D.; KELTJENS, J.T.; DRIFT, C.v.d. (1988) Biochemistry of methane production. In: ZEHNDER, A.J.B. ed. *Biology of Anaerobic microorganisms*. New York, John Wiley & Sons, Inc. p. 707-770 apud RASKIN, L.; STROMLEY, J.M.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994a). Group-specific 16S rRNA hybridization Probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, p.1232-1240.

- (2) Um objetivo específico no desenvolvimento das sondas foi o de diferenciar entre as metanogênicas consumidoras de acetato e aquelas consumidoras de H_2 e CO_2 . Desse modo, várias sondas foram desenvolvidas para identificar diferentes grupos dentro da família *Methanosarcinaceae*, cujos membros utilizam o acetato;
- (3) Os membros da família *Methanosarcinaceae*, como aqueles do gênero *Methanosarcina*, podem formar metano a partir de acetato, mas, preferencialmente, formam metano via rotas energeticamente mais favoráveis quando outros substratos tais como, H_2 e CO_2 , metanol, ou metilaminas estão disponíveis; as sondas MS1414, MS1242 e MS821 são específicas para detectar membros do gênero *Methanosarcina*, porém, como a sonda MS1242 não hibridou eficientemente, a sonda MS821 foi a preferida para detectar espécies de *Methanosarcina*. Além das espécies de *Methanosarcina*, a sonda MS1414 englobou os gêneros, *Methanococcoides*, *Methanlobus*, e *Methanohalophilus*, todos os quais podem usar metanol e metilaminas como substrato. Dentro dessa família, as espécies de *Methanosaeta* podem usar somente o acetato como substrato e foram detectadas pela sonda MX825.
- (4) A sonda MB314 englobou a ordem *Methanobacteriales*, exceto pela família *Methanothermaceae*; uma vez que essa sonda não teve o rendimento esperado, duas sondas novas (MB310 e MB1174) foram desenvolvidas para detectar as metanogênicas pertencentes à esta ordem; a sonda MC1109 é específica para a ordem *Methanococcales*, e apresentou um nucleotídeo trocado em relação à sequência de *Methanococcus jannaschii*;

Ainda, de acordo com RASKIN et al. (1994a), quando várias sondas estão sendo desenvolvidas para a hibridação *in situ*, é condição preferencial que elas tenham valores de Td (temperatura de dissociação) relativamente próximos um do outro. Com frequência é desejável utilizar duas ou mais sondas em uma mesma amostra. Por exemplo, dupla hibridação, isto é, uso de duas sondas marcadas com o mesmo fluorocromo reconhecendo regiões diferentes no RNAr 16S e englobando o mesmo grupo filogenético, que pode ser usada para aumentar a intensidade do sinal e diminuir

problemas de pouco conteúdo de RNAr ou reduzida disponibilidade do alvo. Duas ou mais sondas com diferentes marcadores podem ser usadas para estudar a ocorrência de diferentes grupos alvos na mesma amostra. Quando os valores de Td das diferentes sondas são parecidos, as condições de hibridação podem ser otimizadas para ambos.

TABELA 3.2- Sondas de oligonucleotídeos específicas para as metanogênicas.

ORDEM	SONDA
Ordem I: <i>Methanobacteriales</i> Família I: <i>Methanobacteriaceae</i> Gênero I: <i>Methanobacterium</i> Gênero II: <i>Methanobrevibacter</i> Gênero III: <i>Methanosphaera</i> Família II: <i>Methanothermaceae</i> Gênero I: <i>Methanothermus</i>	MB310 MB1174
Ordem II: <i>Methanococcales</i> Família I: <i>Methanococcaceae</i> Gênero I: <i>Methanococcus</i>	MC1109
Ordem III: <i>Methanomicrobiales</i> Família I: <i>Methanomicrobiaceae</i> Gênero I: <i>Methanomicrobium</i> Gênero II: <i>Methanogenium</i> Gênero III: <i>Methanoculleus</i> Gênero IV: <i>Methanospirillum</i> Família II: <i>Methanocorpusculaceae</i> Gênero I: <i>Methanocorpusculum</i> Família III: <i>Methanoplanaceae</i> Gênero I: <i>Methanoplanus</i> Família IV: <i>Methanosarcinaceae</i> Gênero I: <i>Methanosarcina</i> Gênero II: <i>Methanococcoides</i> **** Gênero IV: <i>Methanolobus</i> Gênero V: <i>Methanohalophilus</i> Gênero III: <i>Methanosaeta</i>	MG1200 ----- MS821* / MS1414** / MSMX860*** ----- MX825: só pode usar o acetato

* MS821: pode usar acetato e outros substratos (H_2 / CO_2 , metanol, e metilaminas); sonda específica ao gênero *Methanosarcina*.

** MS1414: sonda específica aos gêneros *Methanosarcina*, *Methanococcoides*, *Methanolobus* e *Methanohalophilus*.

*** MSMX860: esta sonda detecta todos os membros da família *Methanosarcinaceae*.

**** podem usar metanol e metilaminas

Fonte: RASKIN et al. (1994a).

TABELA 3.3- Relação das sondas complementares ao RNAr 16S, nome, sequência, o sítio alvo, e o Td definido experimentalmente. As sondas MB314 e MS1242 não tiveram bons resultados, e o Td não foi determinado.

Sonda	Sequência (5'→3')	Sítio alvo ***	Td(°C)**
MC1109	GCAACATAGGGCACGGGTCT	1128-1109	55
MB314	GAACCTTGTCTCAGGTTCCATC	335-314	--
MB310	CTTGTCTCAGGTTCCATCTCCG	331-310	57
MB1174	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	1195-1174	62
MG1200	CGGATAATTCGGGGCATGCTG	1220-1200	53
MSMX860	GGCTCGCTTCACGGCTTCCCT	880-860	60
MS1414	CTCACCCATACCTCACTCGGG	1434-1414	58
MS1242	GGGAGGGACCCATTGTCCCATT	1263-1242	---
MS821	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC	844-821	60
MX825	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	847-825	59
ARC915*	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	934-915	56
ARC344*	TCGCGCCTGCTGCTCCCCGT	363-344	54

* ARC915 e ARC344 são complementares ao RNAr 16S de membros do domínio *Archaea* (são sondas genéricas)

** Td, é a temperatura de dissociação; significa a temperatura no ponto médio de transição entre a estrutura duplex (oligonucleotídeo ligado à sequência complementar) e a fita simples-alvo dissociada.

*** sítio alvo da sonda em relação à numeração do RNAr 16S de *Escherichia coli*.

Fonte: RASKIN et al. (1994a).

Em suma, RASKIN et al. (1994a) afirmaram que as técnicas moleculares baseadas no RNAr se aplicam muito bem ao estudo dos consórcios metanogênicos considerando que:

- (1) As *Archaeae* metanogênicas podem ser identificadas e quantificadas em níveis filogenéticos diferentes, uma vez que a sua classificação foi baseada na comparação de seqüências de nucleotídeos do RNAr 16S e as sondas desenvolvidas, apresentadas nas Tabelas 3.2 e 3.3, para o estudo das mesmas abrangem vários níveis taxonômicos do Domínio *Archaea*, como ordem, família e gênero; sondas espécie-específicas podem ser desenvolvidas;
- (2) As *Archaea* metanogênicas ainda não-descritas poderão ser identificadas e quantificadas pelas técnicas moleculares que estão atualmente padronizadas, como a amplificação seletiva do RNAr 16S ou DNAr de grupos alvo de ácidos nucleicos com o uso do PCR, clonagem e seqüenciamento comparativo do DNA clonado; relacionando-se as seqüências recém obtidas com aquelas de RNAr 16S de um

banco de dados, pode-se então desenvolver sondas adicionais específicas para os organismos não-cultivados;

- (3) O FISH pode ser usado para se estimar *in situ* a taxa de crescimento das *Archaea* metanogênicas em populações naturais, uma vez que o conteúdo ribossômico celular e, conseqüentemente, a concentração de RNAr varia com a taxa de crescimento;
- (4) O consórcio metanogênico pode ser estudado de forma intacta através do FISH, permitindo que membros individuais da comunidade possam ser identificados e quantificados em suas posições espaciais naturais. A caracterização das relações espaciais é útil em estudos de colonização de superfícies, estudos de reatores com filme-fixo, e sobre a formação de consórcios granulares, por exemplo, em reatores de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB).

Em trabalho posterior, RASKIN et al. (1995) utilizaram técnicas moleculares para estudar a variação da comunidade microbiana presente em biofilmes de quatro reatores anaeróbios de filme fixo. Dois reatores (SA e SB) foram operados sob condições sulfidogênicas, devido a presença de sulfato, e os outros dois sob condições metanogênicas (MA e MB). Como esperado, os grupos de reatores sulfidogênicos e metanogênicos apresentaram consórcios microbianos capazes de reduzir o sulfato a sulfeto e produzirem metano, respectivamente. Após cerca de 17 meses de operação contínua dos reatores MA e SA, e de 11 meses para os reatores MB e SB, o sulfato foi adicionado ao reator MB e retirado do reator SB. Os resultados deste trabalho indicaram que o uso de sondas em combinação com análises químicas foi bem adequado para o estudo da composição e metabolismo das comunidades microbianas anaeróbias, uma vez que determinou-se que a presença de bactérias redutoras de sulfato a sulfeto (BRS), especialmente células de *Desulfovibrio*, não foi dependente da presença do sulfato, sugerindo que estas espécies atuaram como acetogênicas nos sistemas metanogênicos, e que espécies da Ordem *Methanobacteriales* foram as principais competidoras das BRS pelo hidrogênio na ausência do sulfato. Além do uso das várias sondas descritas na Tabela 3.4 pelos autores (opt.cit.), identificou-se um membro da comunidade do

biofilme através da amplificação seletiva com PCR, usando os primers UNIV907 e SRB385, clonagem dos fragmentos amplificados e seqüenciamento comparativo. O organismo encontrado foi relacionado com a espécie *Desulfovibrio vulgaris* linhagem PT-2, e o desenvolvimento de uma sonda de RNAr complementar à essa linhagem permitiu sua visualização e detecção nos biofilmes através do FISH, bem como o enriquecimento e isolamento da espécie. A obtenção da linhagem PT-2 em cultura pura permitiu o estabelecimento de uma relação entre o conteúdo de RNAr celular e a taxa de crescimento desta cultura. Usando esta relação, determinou-se que a taxa de crescimento da linhagem PT-2 foi significativamente maior em biofilmes jovens quando comparados com biofilmes maduros. Sem dúvida, foi também demonstrado com esses resultados, que a determinação da variação do conteúdo ribossômico celular constitui uma ferramenta valiosa para avaliar a taxa de crescimento de microrganismos em ambientes complexos.

TABELA 3.4- Sondas com o grupo alvo e respectivas referências da literatura.

Sonda	Grupo alvo	Referência
MC1109	<i>Methanococcales</i>	RASKIN et al., 1994b
MB310	<i>Methanobacteriales</i>	RASKIN et al., 1994b
MG1200	<i>Methanogenium</i> "relatives"	RASKIN et al., 1994b
MSMX860	<i>Methanosarcinaceae</i>	RASKIN et al., 1994b
MS821	<i>Methanosarcina</i>	RASKIN et al., 1994b
MX825	<i>Methanosaeta</i>	RASKIN et al., 1994b
SRB385* (p/ BRS)	BRS mesofilicas gram-negativas	AMANN et al., 1990
687	<i>Desulfovibrio</i>	DEVEREUX et al., 1992
660	<i>Desulfobulbus</i>	DEVEREUX et al., 1992
129	<i>Desulfobacter</i>	DEVEREUX et al., 1992
221	<i>Desulfobacterium</i>	DEVEREUX et al., 1992
814	<i>Desulfococcus</i> + <i>Desulfosarcina</i> + <i>Desulfobotulus</i>	DEVEREUX et al., 1992
ARC915	<i>Archaea</i>	STAHL e AMANN, 1991
ARC344	<i>Archaea</i>	RASKIN et al., 1994b
EUB338	<i>Bacteria</i>	AMANN et al., 1990
EUK515	<i>Eucarya</i>	AMANN et al., 1990
UNIV1392	Em princípio todos os organismos conhecidos	PACE et al., 1986

* várias seqüências não-alvo dividem a seqüência alvo desta sonda (AMANN et al., 1992)

Fonte: RASKIN et al. (1995).

RASKIN et al. (1996), apresentaram análises mais detalhadas da composição dos biofilmes retirados dos quatro reatores (descritos anteriormente em RASKIN et al., 1995). A determinação da estrutura populacional foi feita através das sondas citadas na Tabela 3.4. Os autores verificaram que o reator metanogênico, antes da adição de sulfato, apresentou cerca de 25% de células metanogênicas e 15% de BRS, sendo representantes predominantes, respectivamente, espécies da ordem *Methanobacteriales* e o gênero *Desulfovibrio* spp. . A presença de BRS, principalmente os gêneros *Desulfovibrio* spp. e *Desulfobacterium* spp. na ausência de sulfato pode ser explicada pela sua capacidade em atuar como organismos acetogênicos redutores de prótons e/ou fermentadores. A redução de sulfato iniciou imediatamente após a adição do mesmo no reator metanogênico, e foi consistente com o nível significativo de BRS presentes nesse reator. Além disso, os níveis de BRS aumentaram de 30 para 40%; coincidentemente, as concentrações de acetato no efluente diminuíram. Notadamente, alguns gêneros de BRS, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, e *Desulfobotulus* foram os mais competitivos na ausência do sulfato. A produção de metano diminuiu imediatamente após a adição do sulfato; este fato foi posteriormente seguido de uma diminuição na concentração relativa das metanogênicas, de 25% para 8%. Já no reator sulfidogênico, quando a este foi adicionado um meio sem sulfato, não foi verificada uma alteração rápida na sulfidogênese, tampouco houve favorecimento da metanogênese; muito pelo contrário, um aumento significativo no nível das metanogênicas e na produção de metano só foram observados após cerca de 50 dias da adição do meio sem sulfato.

Os autores (opt.cit.) ainda ressaltaram que apesar da obtenção de uma resposta imediata sobre a diminuição da atividade de populações microbianas através da utilização de métodos baseados no RNAr não ser simples, os resultados indicaram que aumentos nas atividades das populações correlacionaram-se bem com aumentos da fluorescência no momento da hibridação. As observações indicaram que os métodos baseados no RNAr podem beneficiar em muito o monitoramento de populações microbianas em sistemas de tratamento de resíduos, particularmente para

microrganismos de difícil identificação e/ou quantificação pelas técnicas clássicas de microbiologia.

HARMSSEN et al. (1996a) utilizaram o FISH para detectar e localizar microrganismos em grânulos provenientes de dois reatores de fluxo ascendente e manta de lodo. Cada reator foi alimentado por vários meses, um com sacarose e outro com uma mistura de ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico). Os grânulos foram cortados em camadas e seções dos mesmos foram hibridadas com sondas específicas para os Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915), sondas específicas para grupos metanogênicos e duas sondas específicas (MPOB e KOPROP1) que detectam linhagens sintróficas de bactérias oxidadoras de propionato. Os resultados revelaram que células da linhagem KOPROP1 não foram detectadas em ambos os tipos de grânulos. Por sua vez, as hibridações dos grânulos alimentados com sacarose apresentaram uma camada externa constituída principalmente de microcolônias com diferentes morfologias celulares e na parte mais interna dos grânulos detectou-se uma camada de microcolônias com diferentes tipos de *Archaea* metanogênicas sobrepostas com agregados da linhagem sintrófica MPOB (oxidadoras de propionato). Os agregados de MPOB se encontraram associados às *Archaea* metanogênicas utilizadoras de H₂ ou formiato, indicando o seu crescimento sintrófico. Os grânulos alimentados com ácidos graxos voláteis, por sua vez, apresentaram uma camada externa constituída principalmente de bactérias e logo em seguida, uma camada espessa de *Archaea* metanogênicas, quase sem a presença de bactérias, semelhantes à *Methanosaeta* spp. . Logo abaixo dessa camada, observou-se uma camada de *Archaeae* metanogênicas misturadas com microcolônias da linhagem sintrófica MPOB. O centro de ambos os grânulos, oriundos cada um de um reator diferente, consistiu da presença de cavidades, materiais inorgânicos e de microcolônias de *Archaea* metanogênicas. Estes resultados, segundo os autores, indicaram a existência de justaposição de bactérias sintróficas e *Archaea* metanogênicas, fornecendo, portanto, evidência adicional para afirmações anteriores sobre a arquitetura microbiana do lodo granular anaeróbio consistir-se de camadas.

É ainda interessante tecer algumas considerações sobre o trabalho de HARMSEN et al. (1996a). As bactérias presentes na superfície do grânulo alimentado com sacarose cresceram também em meio com glicose ou frutose e produziram ácidos orgânicos, como acético, butírico e propiônico. Sob essas condições, parece que elas cresceram como uma camada solta na superfície do grânulo, ao invés de integrá-lo. As bactérias presentes na superfície dos grânulos alimentados com ácidos voláteis cresceram melhor no interior dos mesmos e foram os microrganismos mais abundantes. Além disso, como cresceram próximas às células de MPOB, que são oxidadoras de propionato, é provável que fossem bactérias sintróficas oxidadoras de butirato. Além disso, sabe-se que a oxidação do butirato também requer pressão parcial de H_2 pequena e a oxidação do butirato logo na parte interna do grânulo permitiria um crescimento com as *Archaea* metanogênicas consumidoras de H_2 ou formiato. O acetato seria degradado pelas *Archaea* metanogênicas acetoclásticas presentes abundantemente nos dois tipos de grânulos. É possível que o acetato, depois de se difundir para o interior dos grânulos alimentados com ácidos voláteis, fosse consumido primeiramente na camada espessa logo abaixo da superfície em maior parte pelas células de *Methanosaeta* spp. abundantes neste local, antes do propionato ser degradado na próxima camada. Tal fato é reforçado pela presença de microcolônias de células de *Methanosarcina* spp. nesta camada. *Methanosarcina* spp. tem menor afinidade pelo acetato em comparação com *Methanosaeta* spp. e, portanto, só poderia estar presente se a concentração deste ácido fosse suficientemente alta (JETTEN²² et al. apud HARMSEN et al., 1996a). Nos grânulos alimentados com sacarose, a camada espessa logo abaixo da superfície estava ausente e, portanto, o acetato só foi produzido no interior do grânulo. Segundo esses autores, este é um exemplo claro de como a arquitetura do grânulo é modificada em função dos substratos utilizados pelo mesmo. Sendo assim, os resultados deste trabalho

²² JETTEN, M.S.M.; STAMS, A.J.M.; ZEHNDER, A.J.B. (1992) Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.88, p.181-198 apud HARMSEN, H.J.M.; KENGEL, H.M.P.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M.; de VOS, W.M. (1996a). Detection and Localization of Syntrophic Propionate-Oxidizing bacteria in granular sludge by in situ Hybridization using 16S rRNA- based oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, n.5, p.1656-1663.

indicaram que o uso do FISH em lodo granular é uma ferramenta poderosa para se estudar as relações de estrutura e função *in situ* dos microrganismos.

Em trabalho posterior, HARMSEN et al. (1996b) descreveram os efeitos do sulfato na dinâmica populacional e na localização de uma bactéria oxidadora de propionato. Para tanto foram estudados dois reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo, um metanogênico, alimentado com propionato e outro sulfidogênico, alimentado com propionato mais sulfato. Os autores (opt. cit.) verificaram que o cultivo do lodo granulado em meio contendo propionato e/ou propionato mais sulfato resultou na formação de grânulos bastante diferentes. A diferença mais importante foi o enriquecimento de uma espécie nova de bactéria, a SYN7 no reator metanogênico. Por sua vez, no reator sulfidogênico, a bactéria enriquecida foi *Desulfobulbus* spp.. Os resultados claramente indicaram que o gênero *Desulfobulbus* spp. não utilizou o propionato sintroficamente neste lodo, ao contrário do que foi sugerido anteriormente para outros tipos de lodos anaeróbios. Além disso, mostrou-se que a linhagem SYN7, embora sendo capaz de crescer em propionato através da redução de sulfato, não pôde competir com *Desulfobulbus* spp. quando em presença de sulfato. As sondas utilizadas neste trabalho, encontram-se listadas na Tabela 3.5.

TABELA 3.5- Sondas usadas para estudar a composição microbiana de lodos anaeróbios

Sonda	Grupo alvo	Sequência
EUB338	<i>Bacteria</i>	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT
ARC915	<i>Archaea</i>	5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT
UNIV1392	Todos os organismos conhecidos	5'-ACGGGCGGTGTGT(G/A)C
177	SYN7	5'-AGAAGTCATGCAGTATTATTCGG
S223	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	5'-ACGCAGACTCATCCCCGTG
MPOB1	MPOB	5'-ACGCAGGCCCATCCCCGAA
KOP1	<i>Syntrophobacter pfeniggii</i>	5'-TCAAGTCCCCAGTCTCTTCGA
D687	<i>Desulfovibrio</i> spp.	5'-TACGGATTTCACCTCT
D660	<i>Desulfobulbus</i> spp.	5'-GAATTCCACTTTCCCCTCTG
MX825	<i>Methanosaeta</i> spp.	5'-TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC
MG1200	<i>Methanomicrobiales</i>	5'-CGGATAATTCGGGGCATGCTG
MB310	<i>Methanobacteriaceae</i>	5'-CTTGTCTCAGGTTCCATCTCCG

Fonte: HARMSEN et al. (1996b)

Um trabalho muito interessante que também utilizou técnicas moleculares para a detecção de microrganismos em ambientes aquáticos foi o de WEISS et al. (1996). Os autores (opt. cit.) analisaram com sondas fluorescentes associações microbianas de agregados macroscópicos presentes no lago Constance, Alemanha. As sondas eram específicas para reconhecer organismos do Domínio *Bacteria* e para as subclasses α , β e γ da classe *Proteobacteria*. Os agregados do lago foram coletados *in situ* por mergulhadores, ou com coletores de sedimento até 50 m de profundidade ou, ainda, foram formados no interior de cilindros imersos num sistema com água proveniente do lago, de modo a simular as condições do local. No caso desses últimos agregados, o tempo de colonização microbiana também foi acompanhado. Os agregados naturais e aqueles formados no cilindro eram compostos de material orgânico particulado presente no lago e, portanto, refletiram a composição da comunidade planctônica do ambiente. Todos os tipos de agregados do lago analisados eram fortemente colonizados por células microbianas e continham entre $0,5 \times 10^6$ e $2,0 \times 10^6$ células por agregado. Cerca de 55 a 100 % das células hibridaram com a sonda para o Domínio *Bacteria*. Na maioria das amostras, as bactérias da subclasse β -*Proteobacteria* dominavam a comunidade microbiana, constituindo cerca de 27 a 42 % das células totais, independente da composição dos agregados. Durante o tempo de experimento, os agregados formados no laboratório apresentaram aumento da fração de bactérias da subclasse β -*Proteobacteria*. Exceto por algumas poucas amostras, as bactérias das subclasses α e γ *Proteobacteria* foram menos abundantes em relação às β -*Proteobacteria*, constituindo 11 a 25 % e 9 a 33 % do total de células, respectivamente. Portanto, os autores assumiram que uma comunidade microbiana adaptada a agregados específicos foi desenvolvida. Uma vez que a composição microbiana dos agregados naturais e dos agregados formados em laboratório foi similar, os autores (opt. cit.) concluíram que os agregados formados nos cilindros constituíram um bom modelo para verificar a formação e a colonização microbiana de agregados orgânicos macroscópicos, ainda que as taxas de cisalhamento e a turbulência no sistema tenham sido diferentes das condições existentes no lago.

MOBARRY et al. (1996) usaram o FISH na detecção de bactérias nitrificantes em estudos ambientais. Os autores desenvolveram 5 sondas complementares ao RNAr 16S para grupos filogenéticos definidos de bactérias autotróficas oxidadoras de amônia e de nitrito. Foi determinada a aplicação ambiental das sondas através de hibridação quantitativa via “slot-blot” e FISH de amostras oriundas de sistemas de lodos ativados e biofilmes. Os resultados obtidos com ambas as técnicas sugeriram a ocorrência de populações novas de bactérias oxidadoras de amônia. Experimentos usando o FISH revelaram que espécies de *Nitrobacter* spp. e de *Nitrosomonas* spp. ocorriam em grupos, e freqüentemente estavam em contato umas com as outras dentro dos flocos do lodo. Além disso, foi demonstrada uma associação física muito próxima entre *Nitrosomonas* spp. e *Nitrobacter* spp. através da hibridação com duas sondas, NEU e NIT3. Verificou-se que as células de *Nitrobacter* formaram pequenos aglomerados que, usualmente, estavam em contato com aglomerados de células de *Nitrosomonas* spp. A organização espacial sugeriu uma associação sintrófica entre *Nitrosomonas* spp. e *Nitrobacter* spp. Assim, a toxicidade do nitrito para os oxidadores de amônia e o pouco rendimento energético da oxidação do nitrito pode fazer com que associações de *Nitrosomonas* spp. e *Nitrobacter* spp. representem uma vantagem competitiva desse consórcio sobre a ocorrência solitária das espécies. Notou-se que as bactérias oxidadoras de amônia as quais produzem nitrito se desenvolveram primeiro como microcolônias e depois foram colonizadas pelos agregados de *Nitrobacter* spp., consumidoras de nitrito. As sondas utilizadas por MOBARRY et al. (1996) encontram-se listadas na Tabela 3.6

TABELA 3.6- Nomes, posições alvo, seqüências, e especificidade das sondas usadas na detecção de bactérias nitrificantes.

Sonda	Posição em relação ao RNAr 16S de <i>E. coli</i>	Seqüência	Especificidade
Nb1000	1000-1012	5'-TGCGACCGGTCATGG-3'	<i>Nitrobacter</i> spp.
NIT3	1035-1048	5'-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3'	<i>Nitrobacter</i> spp.
NEU	653-670	5'-CCCCTCTGCTGCACTCTA-3'	membros halófilos e halotolerantes do gênero <i>Nitrosomonas</i>
Nso190	190-208	5'-CGATCCCCTGCTTTTCTCC-3'	<i>Proteobacteria</i> - β oxidadoras de amônia
Nso1225	1225-1244	5'-CGCGATTGTATTACGTGTGA-3'	<i>Proteobacteria</i> - β oxidadoras de amônia
Nsm156	156-174	5'-TATTAGCACATCTTTCGAT-3'	<i>Nitrosomonas</i> C-56, <i>Nitrosomonas europea</i> , <i>Nitrosomonas eutropha</i> , e <i>Nitrosococcus mobilis</i>
Nsv443	444-462	5'-CCGTGACCGTTTCGTTCCG-3'	<i>Nitrosolobus multiformis</i> , <i>Nitrospira briensis</i> , e <i>Nitrosovibrio tenuis</i>

Fonte: MOBARRY et al. (1996).

WAGNER et al. (1996) usaram FISH para detectar bactérias nitrificantes em diversas amostras, tais como lodos ativados, água de rio, biofilmes epifíticos de pântanos eutrofizados, biofilmes oligotróficos e biofilmes nitrificantes de reator cilíndrico. Baseados na comparação de seqüências do RNAr 16S de linhagens de *Nitrobacter* sequenciadas até o momento, os autores desenvolveram três sondas específicas para o gênero *Nitrobacter*. As sondas foram aplicadas em conjunto com uma sonda que detecta membros do gênero *Nitrosomonas*. O uso combinado de várias sondas permitiu identificar simultaneamente bactérias oxidadoras de amônia e as oxidadoras de nitrito em amostras ambientais e de sistemas de engenharia. As sondas desenvolvidas foram:

- NIT1 – 5'-CACCTCTCCCGAACTCAA- 3' – específica para alguns membros da subclasse alfa de *Proteobacteria*, incluindo todas as espécies de *Nitrobacter*;
- NIT2 – 5'-CGGGTTAGCGCACCGCCT-3'
- NIT3- 5'- CCTGTGCTCCATGCTCCG- 3' – ambas complementares à uma certa região do RNAr 16S de todas as espécies de *Nitrobacter* sequenciadas até o momento.

Ainda, segundo WAGNER et al. (1996), de todas as amostras hibridadas com as três sondas (NIT1, NIT2 e NIT3) somente a sonda NIT1 hibridou células em algumas das amostras. Com as outras duas sondas, não se observou qualquer sinal de hibridação. As possíveis razões para a não detecção *in situ* de células de *Nitrobacter* usando as sondas, seriam:

- o número de células de *Nitrobacter* presente nas amostras seria muito baixo e/ou estaria abaixo do limite de detecção da técnica, que é de 10^4 células. ml^{-1} (AMANN et al., 1995). Em concentrações baixas como esta, membros do gênero *Nitrobacter* não poderiam ser responsáveis pela maior parte da oxidação de nitrito nos sistemas de tratamento de esgotos estudados;
- O conteúdo de RNAr das células de *Nitrobacter* nas amostras seria tão baixo para a identificação *in situ*, ou seja, as poucas moléculas de RNAr hibridadas com a sonda resultariam em sinal fluorescente muito fraco, impossível de ser detectado; uma vez que células de *Nitrobacter* fisiologicamente ativas possuem alto conteúdo de RNAr por célula, um baixo conteúdo celular de RNAr indicaria baixa atividade fisiológica da célula (SCHAECHTER et al., 1958; DE LONG et al., 1989);
- As células de *Nitrobacter* presentes nas amostras poderiam estar impermeáveis as sondas. Isto é pouco provável já que todas as culturas puras de *Nitrobacter* analisadas foram perfeitamente

permeabilizadas pelo método de fixação utilizado (fixação com paraformaldeído 4,0 %).

Assim sendo, os autores concluíram sobre a possibilidade de que outras bactérias oxidadoras de nitrito, que não aquelas do gênero *Nitrobacter*, estariam presentes em grande número e com atividade maior nas amostras analisadas. Estas bactérias poderiam ser: membros dos gêneros *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrospira*; bactérias heterotróficas oxidadoras de nitrito ou oxidadoras de nitrito ainda não descritas e, portanto, desconhecidas.

O trabalho de JURETSCHO et al. (1998) avaliou a utilização do FISH para detecção de bactérias nitrificantes em lodos ativados. Os autores (opt.cit.) usaram uma abordagem polifásica, ou seja, utilizaram diferentes técnicas moleculares e métodos convencionais de cultivo de células para estudar e avaliar populações oxidadoras de amônia e de nitrito em sistema de lodos ativados para o tratamento de esgoto com elevadas concentrações de amônia. A hibridação *in situ* com várias sondas específicas para as bactérias oxidadoras de amônia revelou a predominância de bactérias semelhantes à *Nitrosococcus mobilis*. A afiliação filogenética sugerida pelo FISH foi confirmada quando se isolou *N. mobilis* como a oxidadora de amônia numericamente dominante e com as análises subsequentes de comparação de seqüências do gene do RNAr 16S e de hibridação DNA-DNA. A análise molecular mais refinada da população oxidadora de amônia foi feita com uma parte da seqüência do gene que codifica o sítio ativo da enzima amônia monooxigenase (amoA), que foi amplificada a partir do DNA total extraído dos isolados de bactérias oxidadoras de amônia e da amostra de lodo ativado. Através da análise comparativa das seqüências de clones do gene amoA obtidos da amostra de lodo ativado, constatou-se a similaridade entre as mesmas e com fragmentos do gene amoA de *Nitrosomonas europaea*, da linhagem Nm50 e de isolados de *N. mobilis*. A inesperada similaridade entre as seqüências de pedaços do gene amoA de *N. mobilis* e *N. europaea* indicou a ocorrência de possível evento de transferência de genes lateral. Embora tenha se isolado uma linhagem de *Nitrobacter*, bactérias

oxidadoras de nitrito do gênero *Nitrobacter* não foram detectadas na amostra de lodo ativado através do FISH. Portanto, para verificar a abundância de outros gêneros bem conhecidos de bactérias oxidadoras de nitrito, os autores amplificaram o gene do RNAr 16S, clonaram os fragmentos e seqüenciaram os clones obtidos. Através da análise comparativa de seqüências, 2 dos 60 clones selecionados ao acaso puderam ser relacionados com a bactéria oxidadora de nitrito do gênero *Nitrospira*. Baseado nas seqüências desses clones, desenvolveu-se uma sonda específica. Aplicando-se o FISH na amostra de lodo ativado com a sonda desenvolvida no estudo, os autores verificaram que bactérias semelhantes à *Nitrospira* estavam presentes em número considerável, 9% do total de bactérias contadas e frequentemente ocorriam em microcolônias co-agregadas com *N. mobilis*.

LIN et al. (1997) utilizaram sondas de oligonucleotídeos para avaliar a estrutura de uma comunidade bacteriana presente no trato gastrointestinal de diversos animais domésticos. Usando sondas específicas para *Archaea* metanogênicas, os autores (opt.cit.) detectaram a presença no trato gastrointestinal de ruminantes de grupos pertencentes às famílias *Methanobacteriaceae* e *Methanococcaceae* e às ordens *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*. No trato digestivo de porcos, verificaram níveis baixos, mas detectáveis, de organismos pertencentes à estes grupos. Comentaram que se todos os grupos metanogênicos presentes nos ruminantes fossem detectados pelas sondas existentes, e o Domínio *Archaea* das amostras fosse exclusivamente composto por populações metanogênicas, então a soma dos grupos metanogênicos quantificados deveriam corresponder ao valor obtido com a sonda para *Archaea*. Neste trabalho, em algumas amostras analisadas não foi verificada tal equivalência. A justificativa dos autores para este fato foi a possível existência nas amostras de organismos ainda não descritos pertencentes ao Domínio *Archaea*.

PURDY et al. (1997) utilizaram a hibridação em membrana com sondas específicas para o RNAr16S marcadas com ^{32}P , a fim de avaliar a ocorrência e seleção de BRS presentes em sedimentos marinhos e de estuário no Japão. Verificaram que ao adicionar propionato ao lodo, o sinal proveniente da sonda específica para detectar *Desulfobulbus* spp foi maior em ambos os sedimentos. A resposta da sonda desenhada

para detectar *Desulfobacter* sp. aumentou com a adição de acetato no lodo proveniente do sedimento marinho. A resposta à sonda específica para o grupo das BRS também aumentou, sugerindo que grupos ainda não caracterizados também foram enriquecidos a partir do sedimento marinho. Os dados desse trabalho sugerem que o gênero *Desulfobulbus* sp deve ser um importante consumidor de propionato no sedimento do estuário, enquanto que o gênero *Desulfobacter* sp. é responsável pela utilização de acetato no sedimento marinho. Os resultados foram compatíveis com o conhecimento sobre a fisiologia de *Desulfobulbus* sp e *Desulfobacter* sp, e suportaram a utilização de sondas de oligonucleotídeos em estudos de comunidades microbianas. As sondas utilizadas neste artigo estão apresentadas na Tabela 3.7.

TABELA 3.7- Sondas de oligonucleotídeos utilizadas para a detecção de BRS.

Sonda	Especificidade	Referência
p-338	Domínio <i>Bacteria</i>	AMANN et al. 1990a
p-129	<i>Desulfobacter</i>	DEVEREUX et al. 1992
p-221	<i>Desulfobacterium</i>	DEVEREUX et al. 1992
p-660	<i>Desulfobulbus</i>	DEVEREUX et al. 1992
p-687	<i>Desulfovibrio</i>	DEVEREUX et al. 1992
p-804	<i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobacterium</i> , <i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfococcus</i> e <i>Desulfobotulus</i> .	DEVEREUX et al. 1992
p-814	<i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfococcus</i> e <i>Desulfobotulus</i>	DEVEREUX et al. 1992

Fonte: PURDY et al. (1997)

OUDE ELFERINK et al. (1998a) combinaram métodos microbiológicos clássicos com métodos de biologia molecular para caracterizar e estudar a composição microbiana de lodo anaeróbio. A presença de sulfato em reatores anaeróbios pode levar a interações competitivas e sintróficas entre vários grupos de microrganismos tais como BRS, metanogênicas e acetogênicas. A fim de conduzir o reator na direção do processo de sulfidogênese ou metanogênese, é essencial que se conheça a dinâmica de população destes grupos de microrganismos frente às variações nas condições de operação do reator. Existem vários métodos para caracterizar e quantificar a composição microbiológica do lodo. Dentre os métodos clássicos, os autores (opt. cit.) citaram aqueles baseados em meios seletivos de crescimento, exames microscópicos do lodo, e NMP (número mais provável). Este último fornece informações úteis sobre o número de

microrganismos que são capazes de crescer em meio artificial. Entretanto, segundo os autores, é importante ter em mente que o NMP irá subestimar o número daqueles microrganismos que estão aderidos à partículas sólidas ou que estão associados uns aos outros como por exemplo, as bactérias filamentosas como *Methanosaeta* sp. Outro grupo que provavelmente deve ter seu número subestimado pelo NMP são as bactérias que crescem em consórcios sintróficos, tais como as acetogênicas que degradam propionato e/ou butirato, pois o seu parceiro sintrófico pode não estar presente em alta proporção. Adicionando-se uma metanogênica consumidora de hidrogênio ao meio de diluição do NMP pode auxiliar o resultado do método (VISSER²³ et al ; WU²⁴ et al. apud OUDE ELFERINK et al., 1998a). Estudos com lodo granulado de reator anaeróbio degradando água residuária de indústria de papel, mostrou que o número de acetogênicas degradadoras de propionato foi subestimado em pelo menos 1000 vezes, quando não foi adicionada uma metanogênica consumidora de hidrogênio no NMP. Acetogênicas degradadoras de butirato foram subestimadas, pelo menos, da ordem de 100 vezes (OUDE ELFERINK et al., 1998a).

Quanto aos recentes métodos moleculares para caracterização do lodo, os autores (opt. cit.) relacionaram aqueles que permitem a identificação direta dos microrganismos utilizando, por exemplo, biomarcadores, anticorpos específicos, ou sondas de oligonucleotídeos (FISH, amplificação do DNA via PCR e DGGE (“denaturing gradient gel electrophoresis” ou eletroforese em gel com gradiente desnaturante). Comentaram que métodos de imunodeteção são ferramentas importantes para a identificação de microrganismos do lodo, pois geralmente são muito específicos e aplicáveis às análises quantitativas. Entretanto, deve-se levar em consideração que os anticorpos podem apresentar reação cruzada com outras espécies não-relacionadas e,

²³ VISSER et al. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulfate concentrations. *Appl. Microbiol. Technol.*, v.40, p.549-556 apud OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VAN LIS, R.; HEILIG, H.G.H.J.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M. (1998a). Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Biodegradation*, v.9, p.169-177.

²⁴ Wu et al. (1992). Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.38, p.282-290 apud OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VAN LIS, R.; HEILIG, H.G.H.J.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M. (1998a). Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Biodegradation*, v.9, p.169-177.

além disso, o método não é muito flexível já que necessita de uma cultura pura bacteriana para se desenvolver anticorpos específicos. Com relação ao FISH os autores fizeram os seguintes comentários: a) a localização de determinados microrganismos no lodo pode fornecer informação valiosa para as condições de operação do reator. Além disso, o uso combinado de sondas marcadas com diferentes corantes fluorescentes oferece possibilidades interessantes para se estudar a ecologia de determinadas linhagens dentro de uma comunidade de organismos relacionados; b) células dormentes ou inativas apresentam conteúdo de RNAr insuficiente, de modo que não apresentam sinal fluorescente após a hibridação; c) a quantificação do número de microrganismos pode ser um problema quando as células apresentam formas irregulares ou quando formam cadeias de células ou micro-colônias compactas; d) insuficiente permeabilidade das células pode ser uma limitação para a técnica; embora bactérias gram-negativas sejam usualmente permeabilizadas com substâncias químicas de rotina (etanol, paraformaldeído, etc), as gram-positivas requerem tratamento enzimático adicional; e) o limite de detecção do FISH não somente é determinado pelo uso do exame microscópico, como também pelo tamanho relativo da população alvo, ou seja, são necessárias no mínimo 10.000 células. ml⁻¹ para se detectar 1 célula ao microscópio, e a quantidade de partículas autofluorescentes.

Ainda, de acordo com OUDE ELFERINK et al. (1998a), a caracterização e quantificação de microrganismos em reatores anaeróbios é difícil, mas essencial para otimizar os processos que ocorrem no reator. As técnicas baseadas no RNAr e no DNAr vêm proporcionando novas oportunidades para análises de espécies e da estrutura espacial de lodos presentes em reatores. Em geral, a população metanogênica de um lodo pode agora ser relativamente bem caracterizada. Entretanto, para a população sulfidogênica e acetogênica do lodo, a caracterização ainda é difícil. O estudo desses grupos de microrganismos não só é prejudicado pela presença de várias espécies não-identificadas no lodo, como também pela falta de sondas disponíveis para aqueles microrganismos que já foram isolados. Portanto, pesquisas futuras devem certamente utilizar técnicas clássicas de isolamento e estudos de caracterização, mas também é

essencial o desenvolvimento de mais sondas para a hibridação. Por exemplo, sondas para o grupo das BRS gram-positivas e para as degradadoras de butirato sintróficas seriam extremamente úteis neste contexto.

STOFFELS et al. (1998) utilizaram o FISH para avaliar a dinâmica de uma comunidade bacteriana presente num biorreator de leito fixo alimentado com uma mistura de compostos aromáticos (Solvesso 100). A cultura que serviu de inóculo para o biorreator foi desenvolvida em um fermentador alimentado com água residuária proveniente de pintura de carro e Solvesso 100 como única fonte de carbono. Avaliando a comunidade bacteriana presente no fermentador e no biorreator, os autores verificaram que ocorreram duas mudanças significativas na estrutura da comunidade. O inóculo original proveniente da água residuária da indústria de carro era rico em bactérias pertencentes às subclasses alfa e beta de *Proteobacteria*, enquanto que a cultura que foi enriquecida no fermentador era dominada por bactérias relacionadas às espécies de *Pseudomonas putida* ou *Pseudomonas mendocina*, sendo que ambas pertencem à subclasse gama de *Proteobacteria*. A segunda mudança significativa foi observada quando a cultura do fermentador foi transferida como inóculo para o biorreator. Nessas condições, a comunidade no biorreator gradualmente retornou para uma estrutura de maior complexidade, com predominância de *Proteobacteria* das subclasses alfa e beta, enquanto que a população de *Proteobacteria* da subclasse gama diminuiu drasticamente. A população adaptada ao poluente Solvesso 100 não foi a mesma que predominou no biorreator. Ao longo dos experimentos, foram desenhadas três novas sondas específicas para a região do RNAr 16S e 23S de *Proteobacteria* da subclasse beta, sonda SUBU 1237 para os gêneros *Burkholderia* sp. e *Sulturella* sp., sonda ALBO34a para os gêneros *Alcaligenes* sp. e *Bordetella* sp., e sonda Bcv13b para *Burkholderia cepacia* e *Burkholderia vietnamienses*. As bactérias que hibridaram com a sonda Bcv13b representaram a principal população responsável pela degradação do Solvesso 100 no reator.

ABE (1998) utilizou o FISH para caracterizar filogeneticamente bactérias de vida livre e aderidas às partículas no hipolímnio do lago Kizaki, Japão. Usando o FISH obteve eficiência de hibridação de somente 50% em relação ao total de células coradas

com DAPI. Segundo o autor (opt. cit.), isso se deveu ao fato de as bactérias que vivem em ambientes oligotróficos e mesotróficos lacustres possuírem, em geral, quantidade reduzida de cópias de RNAr em suas células se comparadas, por exemplo, às células que se desenvolvem em ambientes eutróficos, visto que a quantidade de ribossomos, na maioria das vezes, está relacionada à atividade metabólica das células (AMANN et al., 1995). Havendo poucas moléculas de RNAr na célula o número de hibridações e, conseqüentemente, a quantidade de fluorocromo no interior da célula serão também pequenos, dificultando a sua visualização ao microscópio. Ainda, segundo ABE (1998), o uso da câmara colorida de alta resolução (Hamamatsu C58110) acoplada a um analisador de imagens foi de fundamental importância para a melhoria da detecção das células hibridadas. Com este equipamento tornou-se possível aumentar a captação da emissão do sinal fluorescente das células hibridadas, com o aumento do tempo de exposição da imagem e o armazenamento desta na memória do computador. Isto possibilitou análise minuciosa e prolongada no monitor de vídeo, sem a preocupação com o problema de foto decaimento (“photobleaching”) que normalmente ocorre durante contagens feitas observando-se diretamente a lâmina ao microscópio de epifluorescência.

O trabalho de SEKIGUCHI et al. (1999) é extremamente importante para a área de saneamento, pois através do FISH os autores comprovaram o modelo de GUIOT et al. (1991) para a distribuição dos microrganismos presentes em grânulos. Assim, foi utilizado o FISH em conjunto com exames microscópicos sob microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) para elucidar a distribuição espacial de *Archaea* metanogênicas presentes em grânulos termofílicos e mesofílicos oriundos de reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo, alimentados com sacarose, acetato e propionato. Para verificar a organização espacial dos microrganismos, os grânulos foram cortados, e os cortes ultra-finos foram hibridados com sondas específicas para diferentes grupos filogenéticos. Os resultados do FISH usando sondas específicas para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*, revelaram que os grânulos termofílicos e mesofílicos possuíam estruturas em camadas, sendo que a camada mais externa possuía principalmente células do Domínio *Bacteria*, enquanto que a parte mais interna consistia

de células do Domínio *Archaea*. Células similares ao gêneros *Methanosaeta* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanospirillum* sp. e *Methanosarcina* sp. foram detectadas com sondas específicas, e foram encontradas na parte interna dos grânulos. O gênero *Methanosaeta* sp. predominou em ambos os tipos de grânulos.

LEE et al. (1999) desenvolveram um método microscópico para a determinação simultânea *in situ* das identidades, atividades e consumo de substrato específico de células bacterianas individuais presentes em comunidades microbianas complexas, através do uso combinado do FISH e da microautoradiografia (Figura 3.11). Esse método foi avaliado usando misturas definidas de *Escherichia coli* e *Herpetosiphon aurantiacus* sob condições aeróbias de incubação na qual adicionou-se glicose marcada com H^3 . Posteriormente, os autores puderam demonstrar o potencial do método através da visualização do consumo de substratos orgânicos marcados radioativamente como por exemplo, acetato [C^{14}], butirato [C^{14}], bicarbonato [C^{14}] e P^{33} por populações hibridadas com sondas específicas provenientes de comunidades presentes em lodos ativados através do uso de condições de incubação aeróbia e anaeróbia, com e sem nitrato. As sondas usadas foram específicas para o Domínio *Bacteria* e para o grupo das oxidadoras de amônia halofílicas e halotolerantes pertencentes à subclasse β de *Proteobacteria*. Para ambas as amostras o método se mostrou útil para a identificação simultânea e análise do consumo dos substratos marcados, sob as diferentes condições experimentais usadas. Os melhores resultados foram obtidos quando a hibridação *in situ* foi feita antes do procedimento de revelação da microautoradiografia. Para obter resolução de uma única célula do FISH e dos sinais de microautoradiografia dentro dos flocos de lodos ativados, o material foi cortado por criofratura, em fatias de 5 a 10 μm , e depois observado em microscópio confocal de varredura a laser (CLSM). O uso combinado das técnicas de FISH, criofratura, microautoradiografia e CLSM permitiu obter informações sobre a estrutura e função das comunidades bacterianas sem que fosse necessário fazer o cultivo das células.

Ainda, segundo LEE et al. (1999), apesar da microautoradiografia não fornecer dados quantitativos, as informações obtidas de experimentos que usaram as duas técnicas combinadas, FISH e microautoradiografia, podem ajudar a identificar grupos

microbianos com funções importantes e que estão ativos no ambiente. As possíveis aplicações variam desde estudos fundamentais em ecologia microbiana até a identificação de bactérias envolvidas em processos biotecnológicos, tais como tratamento de esgotos e bioremediação. Além disso, informações a respeito da fisiologia *in vivo* de novas *taxa* bacterianas identificados através de técnicas moleculares devem facilitar o desenvolvimento de técnicas apropriadas de isolamento para muitos dos microrganismos não-cultivados até o momento.

FIGURA 3.11 - Esquema demonstrativo do método que permite a combinação direta do FISH com microautoradiografia e observação ao microscópio confocal de varredura a laser (CLSM). (Fonte: LEE et al., 1999).

DAIMS et al. (1999) chamaram a atenção para o fato de que nem todos os organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* possuem a sequência-alvo da sonda EUB338, que é específica para esse domínio. Assim sendo, alguns organismos não são detectados com essa sonda e, conseqüentemente, quando a mesma foi usada para estimar a porcentagem de células do Domínio *Bacteria* em relação ao total de células coradas com o DAPI (corante de DNA), a porcentagem encontrada foi menor que 100%. Os autores indicaram que organismos membros dos fila *Planctomycetales* e *Verrucomicrobia* não são detectados pela sonda EUB338. Assim sendo, eles desenvolveram duas versões suplementares da sonda EUB338, chamadas de EUB338-II e EUB338-III (Tabela 3.8). A hibridação *in situ* de uma amostra complexa de biofilmes com as três sondas de EUB338, demonstrou que os organismos detectados com as sondas EUB338-II e EUB338-III estavam presentes em números significantes. Todos os organismos detectados com a sonda EUB338-II apresentaram morfologia de cocos ou células arredondadas ovóides, e ocorreram com maior frequência como aglomerados celulares ou cadeias de células. As células hibridadas com a sonda EUB338-III apresentaram morfologia mais diversificada. Verificou-se a presença de cocos que ocorriam em cadeia ou livres, pares de células com morfologia alongada, bacilos curtos e filamentos finos. De acordo com os resultados, a aplicação conjunta das três sondas de EUB338 deverá permitir uma quantificação mais precisa dos organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* em estudos de ecologia molecular.

Em uma amostra de biofilmes proveniente de um sistema de tratamento de águas residuárias (STOFFELS et al., 1998), verificou-se que cerca de 68 a 90% do total de células coradas com DAPI pertenciam ao Domínio *Bacteria*, pois foram detectadas com a sonda EUB338. Portanto, o restante, cerca de 10%, poderiam ser organismos pertencentes aos filos *Verrucomicrobia* e *Planctomycetales* que não são detectados com a sonda EUB338, ou pertencer ao Domínio *Archaea*, por suposição, uma vez que a sonda ARC915 específica para detectar membros desse Domínio não foi utilizada pelos autores.

TABELA 3.8 - Sequências e sítios alvo do RNAr 16S detectados pelas sondas EUB338, EUB338-II e EUB338-III.

Sonda	Sequência (5' - 3')	Sítio alvo** (posições do RNAr 16S)
EUB338*	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355
EUB338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	338-355
EUB338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	338-355

*AMANN et al. (1990)

** Numeração de *E. coli* (BROSIOUS et al., 1981).

Fonte: DAIMS et al.(1999).

ZEPP FALZ et al. (1999) utilizaram a técnica de FISH juntamente com outras análises moleculares e químicas para verificar a distribuição e atividade de *Archaea* metanogênicas em sedimento anóxico do lago Rotsee (Suíça). Os autores (opt. cit.), através de clonagem, seqüenciamento, e análise filogenética identificaram dois grupos distintos de seqüências e mais quatro clones separados. As seqüências do grupo 1 compreendiam o grupo da *Methanosaeta* spp, e a seqüência do grupo 2, era semelhante à de uma metanogênica endossimbionte de *Plagiopyla nasuta*. Com o objetivo de detectar *in situ* esses grupos, os autores desenvolveram 4 sondas novas: Rotcl1 (relacionada à *Methanosaeta concilii*); Rotcl2 (específica para os endossimbiontes de *P. nasuta*); Rotpl3 (específica ao clone Rotp 13), e Rotpl7 (específica ao clone Rotp 17). Os resultados da hibridação *in situ* e da contagem feita com o DAPI revelaram que a maior densidade populacional estava localizada nas camadas mais superficiais do sedimento e que ainda nesta camada, 16% das células pertenciam ao Domínio *Bacteria*, pois as células hibridaram com EUB338 e, 6% pertenciam ao Domínio *Archaea*, pois hibridaram com ARC915. Somente 4% das células hibridaram com a sonda Rotcl1 e eram semelhantes à *Methanosaeta* spp., que estavam presentes ao longo de toda a camada de 12 cm do sedimento. Por outro lado, somente 0,7% das células hibridaram com a sonda Rotcl2 e estas estavam localizadas exclusivamente nos 2 cm superficiais do sedimento. As sondas Rotpl3 e Rotpl7 não detectaram qualquer célula. A distribuição espacial das duas populações de metanogênicas foi coerente com as taxas de produção

de metano encontradas, determinadas através da incubação com ^{14}C -acetato ou ^{14}C -bicarbonato. A formação de metano a partir do acetato foi responsável por quase toda a produção de metano, o que corroborou com a predominância da população acetoclástica semelhante à *Methanosaeta* spp., que representou cerca de 91,0% de toda a população de *Archaea*.

HESSELMANN et al. (1999) utilizaram FISH juntamente com a clonagem e seqüenciamento de fragmentos dos genes do RNAr 16S para analisar filogeneticamente comunidades presentes em sistema de lodos ativados que promoviam a remoção biológica de fosfato (EBPR- “enhanced biological phosphate removal”). Dois reatores seqüenciais em batelada anaeróbio-aeróbio foram operados com duas fontes diferentes de carbono durante três anos e apresentaram ciclos aeróbio-anaeróbio de polihidroxibutirato (PHB) e características de acúmulo de fosfato de sistemas EBPR. A hibridação *in situ* mostrou que o reator alimentado com acetato era dominado por bactérias filogeneticamente relacionadas ao grupo *Rhodocyclus* dentro da subclasse β -*Proteobacteria* (81% das células coradas com DAPI). O reator alimentado com o meio complexo também apresentou predominância desse grupo filogenético embora em menor porcentagem (23% das células coradas com DAPI). Informação taxonômica mais detalhada sobre a bactéria dominante no reator alimentado com acetato foi obtida através da elaboração de uma biblioteca de clones de fragmentos do DNAr 16S. Dois clones diferentes do tipo *Rhodocyclus* (R1 e R6) foram recuperados. O seqüenciamento direto do RNAr e a hibridação tipo específica revelaram que o clone R6 era do tipo da bactéria dominante. Coloração específica para grânulos de polifosfato e PHB confirmou que a bactéria do tipo R6 acumulava PHB e polifosfato tais como previsto nos modelos metabólicos para EBPR. Fragmentos do DNAr 16S apresentando grande similaridade com outros lodos de EBPR sugeriram que organismos tipo R6 estavam presentes e devem ter função importante nos sistemas EBPR em geral. Embora a bactéria do tipo R6 estivesse intimamente relacionada ao gênero *Rhodocyclus*, ela não cresceu fototroficamente. Em consequência, foi proposto um novo gênero e espécie : *Candidatus Accumulibacter phosphatis*.

FICKER et al. (1999) usaram FISH para identificar microrganismos presentes num consórcio metanogênico capaz de degradar o tolueno. Este consórcio, obtido de um aquífero contaminado com creosoto, foi enriquecido por 10 anos com tolueno como fonte de carbono e energia. As espécies presentes no consórcio foram caracterizadas usando a seguinte abordagem molecular, isolou-se o DNA genômico total da amostra e através do PCR os genes do RNAr 16S foram amplificados usando primers específicos para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Um total de 90 clones de *Bacteria* e 75 de *Archaea* foram obtidos através da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP – “restriction fragment length polymorphism”). Através da mesma, foram encontradas seis seqüências de *Bacteria* e 2 de *Archaea* como sendo as mais abundantes. A abundância relativa de cada suposta espécie foi estimada usando o FISH, e a presença das espécies foi determinada qualitativamente através da hibridação em membrana (“slot-blot”) do DNA da amostra. As duas espécies de *Archaea* e duas das seis espécies de *Bacteria* foram detectadas nos experimentos com FISH e com “slot-blot”. A análise filogenética desses quatro grupos dominantes sugeriu que as duas espécies de *Archaea* estavam relacionadas aos gêneros *Methanosaeta* e *Methanospirillum*. Uma das espécies de *Bacteria* estava relacionada ao gênero *Desulfotomaculum*, enquanto que a outra espécie não relacionou-se a qualquer gênero descrito previamente. Por eliminação, os autores propuseram que esse organismo, não identificado, provavelmente deveria iniciar a quebra da molécula de tolueno.

CROCETTI et al. (2000) utilizaram o FISH para avaliar a proporção dos microrganismos presentes num sistema de lodos ativados e identificar os organismos responsáveis pela remoção de fosfato no sistema. Aumentando-se a concentração de fósforo no afluente dos reatores seqüenciais, conseguiu-se fazer o enriquecimento dos organismos acumuladores de polifosfatos (PAOs-“polyphosphate accumulating organisms”). Utilizou-se o FISH com sondas específicas para Domínio, divisão e subdivisão. O lodo A, com alto desempenho para a remoção de fósforo, era composto por aglomerados grandes de cocobacilos contendo polifosfato. Através do FISH, verificou-se que 80% da população do lodo A pertencia à subclasse β -2 de

Proteobacteria e estavam arranados em aglomerados de cocobacilos, sugerindo fortemente que esse grupo continha PAO responsáveis pela remoção biológica de fósforo. O segundo grupo dominante no lodo A foi *Actinobacteria*. Foram preparadas bibliotecas de clones dos genes do RNAr 16S de 3 lodos apresentando remoção biológica de fosfato, e os clones pertencentes à subclasse β -2 de *Proteobacteria* foram sequenciados. Um grupo distinto de clones apresentando identidade de sequência $\geq 98\%$ relacionado à *Rhodocyclus* spp. (94 a 97% de identidade) e *Propionibacter pelophilus* (95 a 96% de identidade) foi identificado como o candidato mais provável a PAOs. Foram desenvolvidas três sondas específicas para o grupo PAO e elas hibridaram especificamente com os aglomerados de PAOs do lodo A, coincidindo exatamente com aqueles hibridados com a sonda β -2 *Proteobacteria*. Fazendo em sequência FISH e a coloração para polifosfatos, demonstrou-se claramente que as células que hibridaram com as sondas específicas para os PAO continham polifosfatos. Os autores (opt. cit.) sugeriram, que um grupo importante de PAO, presente nos lodos que promovem remoção biológica de fosfato, devem ser bactérias altamente relacionadas aos gêneros *Rhodocyclus* e *Propionibacter*.

DAVENPORT et al. (2000) usaram o FISH quantitativo, que consiste em não só verificar quais as células que hibridaram com a sonda, mas também mede-se a quantidade de sinal fluorescente das células hibridadas, para verificar a relação entre Actinomicetos contendo ácido micólico e o fenômeno de formação de espuma em sistemas de lodos ativados. A formação de espuma densa em tanques de aeração e clarificadores secundários é frequentemente atribuída a presença de actinomicetos contendo ácido micólico (*Mycolata*). A fim de verificar a relação entre o número de mycolata e o fenômeno de formação de espuma, desenvolveu-se uma sonda grupo específica complementar à uma região do RNAr 16S de mycolata, um protocolo para permeabilizar mycolata, e um método estatístico para quantificação. O método de permeabilização de células de *Mycolata* foi o da lipase, pois a fixação convencional usada para o FISH não foi adequada. Amostras do líquido e da espuma revelaram que a maioria dos *Mycolata* foram cocos e bacilos, e que pelo menos cinco campos

microscópicos foram necessários para fornecer uma amostragem quantitativamente representativa. A formação de espuma ocorreu quando o número de *Mycolata* excedeu o valor limite estimado em 2×10^6 células. mL⁻¹ ou 4×10^{12} células. mL⁻¹. A mistura do sistema afetou a formação de espuma sem afetar o número de *Mycolata*. O valor limite para reatores sem mistura deve ser maior que este. Os resultados obtidos forneceram evidências do papel dos actinomicetos do gênero *Mycolata* no fenômeno de formação de espuma. Filamentos característicos de *M. parvicella* também foram observados no líquido do sistema.

IMACHI et al. (2000) utilizaram a técnica de FISH em conjunto com a microscopia confocal de varredura a laser para identificar, quantificar e localizar uma bactéria sintrófica oxidadora de propionato presente em lodo anaeróbio granulado proveniente de reator UASB termofílico. Para estudar esse microrganismo, os autores fizeram enriquecimento e cultivo das células presentes no lodo anaeróbio em meio contendo propionato como única fonte de carbono à 55°C. Depois de subcultivos sucessivos, isolaram o microrganismo termófilo, sintrófico e oxidador de propionato, designado de linhagem SI. Este organismo foi isolado tanto em cultura pura quanto em co-cultura com *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Sob condições termofílicas (55°C), a linhagem SI oxidou propionato, etanol e lactato em cocultura com *M. thermoautotrophicum*. A cultura pura conseguiu fermentar o piruvato. Análises de seqüências do DNAr 16S revelaram que a linhagem estava filogeneticamente relacionada ao gênero *Desulfotomaculum*, mas estava distantemente relacionada à qualquer espécie conhecida; além disso, verificou-se que essa linhagem não exibiu habilidade em reduzir sulfato. Para avaliar a abundância e a distribuição dos organismos relacionados com a linhagem SI dentro dos grânulos do lodo, desenvolveu-se uma sonda de oligonucleotídeo complementar ao RNAr 16S, e esta foi aplicada em cortes ultrafinos dos grânulos. A observação dos grânulos hibridados com o FISH sob microscopia confocal de varredura a laser revelou que células com morfologia de bacilos estavam presentes nas camadas interna e intermediária dos grânulos e que se encontravam em associação com *Archaea* metanogênicas hidrogenotróficas. Aplicando o FISH em

células provenientes dos grânulos verificou-se que o microrganismo sintrófico compreendia cerca de 1,1% do total de células presentes no lodo. Os resultados demonstraram que a linhagem SI isolada representou uma das populações importantes do grânulo e que era responsável pela oxidação de propionato no lodo granulado metanogênico. As células da linhagem SI apresentaram morfologia de bacilos com 1,7 a 2,8 µm de comprimento e 0,7 a 0,8 µm de largura e a coloração de gram foi negativa.

3.10- Limitações da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes -FISH

Como qualquer outro método de análise, o FISH também apresenta algumas limitações (OUDE ELFERINK et al., 1998a). Desse modo, estudos que utilizaram e/ou utilizarão a técnica levaram, ou devem levar, isso em consideração. A seguir são apresentados alguns trabalhos que mencionaram estas limitações.

AMANN et al. (1995), WAGNER et al. (1996) e OUDE ELFERINK et al. (1998a), comentaram sobre o limite de detecção da técnica de FISH, que é de 10^4 células. mL⁻¹. Portanto, deve-se ter em mente que populações que estiverem presentes na amostra abaixo desta concentração não serão detectadas com essa técnica.

Segundo FUCHS et al. (2000), a questão da inacessibilidade da região alvo (parte do RNAr 16S) à sonda, é um dos problemas mais significativos do FISH. Variações na ligação da sonda com a região alvo complementar à ela estão relacionadas com a estrutura espacial do ribossomo, que inclui interações RNAr-RNAr bem como interações do RNAr com proteínas ribossomais. Infelizmente, a região inacessível compreende locais de maior variação de seqüências do RNAr 16S, as quais seriam altamente valiosas para desenvolver sondas específicas à nível de gênero e/ou espécie. Ainda nesse trabalho, os autores (opt. cit.) apresentaram resultados de hibridações feitas com oligonucleotídeos sem marcação fluorescente chamados de “helpers” em conjunto com as sondas fluorescentes, que buscam melhorar o sinal de hibridação de sondas que normalmente apresentam pouca hibridação em células de *Escherichia coli* (DSM

30083). Os oligonucleotídeos “helpers” eram complementares à região adjacente ao local alvo da sonda ou apresentavam a mesma sequência da sonda marcada. O uso dos “helpers” aumentou em pelo menos 4 vezes o sinal fluorescente das seis sondas usadas (Eco84, Eco603, Eco474, Eco585, Eco621 e Eco639). Em um caso, o sinal da sonda Eco474 foi aumentado em 25 vezes com o uso de um único “helper” (H440-2). Em outro caso, quatro “helpers” usados em conjunto com a sonda Eco585, aumentaram o sinal fluorescente da mesma (anteriormente considerada uma sonda que apresentava sinal fraco) ao nível das sondas mais brilhantes disponíveis para *E. coli*. A ação do “helper” é baseada na ligação sequência-específica, e existe então um potencial estreitamento do grupo alvo que deve ser considerado quando se está desenvolvendo os “helpers”. Assim, concluiu-se que os “helpers” podem abrir regiões do RNAr inacessíveis às sondas fluorescentes usadas no FISH e, portanto, contribuirão para melhorar a aplicabilidade da técnica para a identificação *in situ* de microrganismos.

De LONG et al. (1999) usou o FISH, mas com sondas de poliribonucleotídeos com múltiplas marcações fluorescentes para detectar células planctônicas marinhas pertencentes aos Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Sondas de poliribonucleotídeos são geradas a partir de amplicons de PCR que contém um promotor T7 de RNA polimerase na extremidade 5', e possuem cerca de 100 nucleotídeos, enquanto que as sondas de oligonucleotídeos usadas no FISH convencional contêm cerca de 20 a 23 nucleotídeos. Os autores (opt. cit.) comentaram que optaram pelo uso dessas sondas maiores, pois em amostras naturais o sinal fluorescente obtido a partir da hibridação com oligonucleotídeos freqüentemente não é detectável, principalmente, entre a fluorescência de fundo de muitas células. A abordagem melhorou sensivelmente a aplicabilidade e sensibilidade do FISH em amostras de águas marinhas, permitindo a identificação e quantificação precisa de células planctônicas para profundidades oceânicas de até 3.400 m. Experimentos usando as sondas de poliribonucleotídeos conseguiram hibridação de 90 à 100% do total de células coradas com DAPI para a maioria das amostras.

De acordo com De LONG et al (1999), as dificuldades freqüentemente encontradas quando se aplicam sondas de oligonucleotídeos complementares ao RNAr

16S e FISH para amostras ambientais complexas podem ser: ligação ou hibridação variável da sonda à diferentes regiões do RNAr-alvo, amostra altamente fluorescente ou com muita fluorescência de “background”, e, baixo conteúdo de RNAr inerente à muitas células que ocorrem naturalmente. Em amostras aquáticas, a proporção de células visualizadas com sondas de oligonucleotídeos contendo somente um marcador fluorescente pode ser altamente variável. Vários trabalhos que utilizaram FISH com sucesso para visualizar picoplancton e nanoplancton já foram realizados. Entretanto, em muitas amostras aquáticas, a porcentagem de células detectadas com sondas de oligonucleotídeos e FISH foram significativamente menores em relação à contagem total de células procarióticas. O sinal fluorescente apresentado pelas culturas naturais quando hibridadas com a sonda geralmente se apresenta abaixo do limite de detecção usando oligonucleotídeos com única marcação e a microscopia padrão de epifluorescência. Em amostras marinhas, grupos alvos de *Archaea* que não puderam ser visualizados com sondas de oligonucleotídeos foram fácil e rotineiramente visualizados e quantificados com sondas de poliribonucleotídeos.

Segundo RAMSING et al. (1996), existem três possíveis problemas quando sondas de oligonucleotídeos complementares ao RNAr são usadas na área de ecologia microbiana: (a) falsos negativos, (b) falsos positivos e (c) conclusões falsas sobre a fisiologia do organismo detectado. Estes problemas surgem em razão do comprimento limitado da sequência da sonda bem como do tamanho limitado da molécula alvo e parece que são mais difíceis de resolver quando se utilizam sondas gerais, que supostamente detectam grupos filogenéticos diversificados, mas que compartilham alguns aspectos comuns, como por exemplo a sonda SRB385, específica ao grupo das BRS dentro do grupo delta de *Proteobacteria*. Essa sonda foi originalmente descrita para detectar a maioria dos grupos de BRS pertencentes ao grupo delta de *Proteobacteria*. Entretanto, quando usada em condições estridentes de hibridação com 35% de formamida no tampão, ela não hibrida com todas as BRS. Todos os membros conhecidos dos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, e *Desulfomonas* contem a sequência alvo inteira; entretanto, alguns membros dos gêneros *Desulfobacter* e

Desulfomicrobium e todos os membros conhecidos dos gêneros *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacula*, *Desulfococcus*, *Desulfoarculus*, e *Desulfomonile* contêm pelo menos um nucleotídeo trocado dentro da sequência alvo, mais frequentemente um A ao invés de um G na posição 395 da sequência do RNAr 16S, o qual reduzirá a intensidade do sinal fluorescente, como foi verificado com as linhagens referências listadas acima. A sonda também não irá hibridar com BRS que não pertencem ao grupo delta de *Proteobacteria*, tais como membros do gênero *Desulfotomaculum*, formadoras de esporo contendo baixo conteúdo de GC, do grupo gram-positivo e *Archaeoglobus*, que é uma *Archaea* termofílica.

Ainda, de acordo com a experiência de RAMSING et al. (1996), as condições estridentes de hibridação usadas para a sonda SRB385 reduziu o grupo alvo de detecção para um subgrupo das BRS dentro do grupo delta de *Proteobacteria*; entretanto, as condições estridentes foram necessárias para reduzir a possibilidade de falsos positivos. Não obstante, algumas bactérias que não são do grupo das BRS possuem a sequência alvo completa, e, portanto, não podem ser excluídas. Uma busca no banco de dados de sequências do RNA ribossomal ("Ribosomal Database Project"), o qual contém mais de 3000 sequências do RNAr 16S, usando o programa CHECK_PROBE revelou que os falso positivos potenciais, segundo RAMSING et al. (1996) pertencem a: - bactérias do grupo delta de *Proteobacteria* que não são BRS, ou seja, algumas myxobactérias do gênero *Chondromyces* e *Polyangium*; - actinomicetos do grupo gram-positivo com alto conteúdo de GC, dos gêneros *Frankia* e *Actinopolyspora*; - membros do gênero *Thermoanaerobacter* e três espécies de *Clostridium* (*C. fervidum*, *C. stercorarium* e *C. thermolacticum*) grupo com baixo conteúdo de GC do grupo das bactérias gram-positivas. Myxobactérias do gênero *Chondromyces* e *Polyangium* colonizam os excrementos dos herbívoros e a casca de árvores com raízes e não cresce na água do mar. *Frankia* spp. são fixadoras de nitrogênio endossimbiontes de raízes de plantas. As espécies de *Thermoanaerobacter* e as três espécies de *Clostridium* ocorrem em áreas vulcânicas, solos aquecidos, e excrementos de gado. Assim sendo, os autores concluíram que as células que hibridaram com a sonda SRB385 estavam

filogeneticamente relacionadas com as BRS conhecidas e membros do grupo delta de *Proteobacteria*. Para uma hibridação mais precisa das populações bacterianas, a melhor estratégia parece ser aquela que usa a sonda SRB385 juntamente com as sondas específicas para os diferentes gêneros de BRS (descritas por DEVEREUX et al., 1992).

Pelo exposto, RAMSING et al. (1996) fizeram algumas sugestões no momento de se utilizar a técnica FISH. Recomendaram fazer hibridações controles, controle positivo usando linhagens de referência e controle negativo. Como controle negativo para a sonda de SRB385 usaram a sonda denominada control-R, cuja sequência é complementar e contrária à sequência da sonda SRB385, portanto, ela não detecta qualquer célula. Além disso, os autores comentaram que é importante tentar evitar uma possível avaliação subjetiva por parte do observador da amostra, o ideal seria ter dois observadores contando as mesmas amostras em separado e depois comparar e avaliar os resultados.

FICKER et al. (1999) usaram o FISH para identificar microrganismos presentes num consórcio metanogênico que estava degradando tolueno. Os autores fizeram importante consideração quanto ao uso de sondas marcadas com fluoresceína em amostras que se tem organismos metanogênicos presentes. Muitas das *Archaea* metanogênicas possuem altos níveis do cofator F_{420} , um transportador de elétrons, e portanto apresentam autofluorescência azul-esverdeada, com comprimento de onda de 420 nm, quando são submetidos à luz ultravioleta (EDWARDS & McBRIDE, 1975; MINK & DUGAN, 1977); sendo assim, quando se tem esses organismos na amostra e a mesma é observada sob o microscópio de epifluorescência usando o mesmo filtro para fluoresceína, as células fluorescem apresentando sinal verde mesmo quando não se aplica qualquer sonda. Portanto, o ideal é que nesses casos só sejam usadas sondas marcadas com rodamina e/ou Cy3, pois assim evita-se a interferência das células autofluorescentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sistema para o desenvolvimento de biofilmes e condições de operação

Para o desenvolvimento de biofilmes foi utilizado um sistema composto de um dispositivo denominado “Modified Robbins Device”- MRD (Mc COY et al., 1981; RUSESKA et al., 1982) conectado a um frasco reservatório de células, formando um circuito fechado, como pode ser observado na Figura 4.1. O volume útil do frasco-reservatório foi de 1 L e do MRD, cujas dimensões foram de 80,0 cm de comprimento por 5,2 cm de largura, foi de 120,0 mL. O MRD foi confeccionado em acrílico e possuiu dispositivos do tipo parafusos com 5,0 cm de comprimento e 1,1 cm de diâmetro, na base dos quais foram inseridos os suportes para formação dos biofilmes, aqui denominados cupons, como se observa na Figura 4.1. Os cupons estudados tinham 8 mm de diâmetro.

A operação do sistema consistiu do bombeamento das células, cultivadas em suspensão no frasco-reservatório, para o interior do MRD numa vazão de 9,6 mL/minuto. ^{0,157 L/h} Após cerca de 13 minutos, tempo de detenção hidráulico do MRD, as células não aderidas ao suporte retornavam ao frasco-reservatório, fechando dessa forma o circuito entre os dois componentes do sistema para formação de biofilmes. Em todos os experimentos, o MRD foi mantido de “cabeça-para-baixo” (Figura 4.2) pois assim permitia-se que as células que estavam em suspensão, no líquido que passava pelo MRD, se depositassem sobre os cupons. Desse modo, as células não tinham que vencer a força de gravidade para se aderirem à superfície dos mesmos. No início de cada experimento, as células foram bombeadas do reservatório para o MRD e após 20

minutos, a bomba (Ismatec IPC4-ICM760, Zurique, Suíça) foi desligada por 2 horas. Esse procedimento tinha o objetivo de propiciar o início da aderência das células sobre o suporte já que o fluxo era zero. Após esse tempo, a bomba era religada e o experimento tinha início. O sistema experimental, MRD e frasco-reservatório, foi operado por cerca de 10 a 22 dias, dependendo de cada experimento realizado. Em intervalos de 2 a 5 dias os cupons contendo os biofilmes foram amostrados. Os cupons foram de dois tipos, confeccionados de polipropileno e vidro. Escolheu-se o polipropileno, em função de ser um material hidrófobo cujo ângulo de contato com a água é de $93 \pm 2^\circ$ (VERRIER et al., 1987 e 1988) e, segundo os mesmos autores, superfícies hidrofóbicas são colonizadas mais rapidamente pelas *Archaeae* metanogênicas. O vidro foi utilizado em função de ser um material hidrofílico, cujo ângulo de contato com a água é de $12 \pm 2^\circ$ (JUCKER et al., 1996). Portanto, foi feita a comparação sobre a formação de biofilmes em duas superfícies de hidrofobicidades diferentes.

Na atmosfera livre do frasco-reservatório a mistura gasosa de $N_2:CO_2$ (na proporção de 70:30) foi introduzida, em intervalos de 2 a 3 horas, de modo a manter a anaerobiose no sistema. Em todos os experimentos, o MRD, o frasco reservatório e as mangueiras foram mantidos à $33 (\pm 3)^\circ C$, em uma câmara incubadora. As mangueiras que ligavam o frasco-reservatório ao MRD, e vice-versa, foram recobertas com filme plástico do tipo “parafilm” de modo a minimizar a entrada de oxigênio. As conexões utilizadas para unir as mangueiras foram confeccionadas de vidro. Os cupons foram retirados sob condições de assepsia (limpando o local com etanol 100%) e anaerobiose, pois no momento da retirada e colocação do “parafuso” mantinha-se ligado ao lado do MRD um fluxo da mistura gasosa de $N_2:CO_2$ (70:30), que foi introduzido no MRD no momento que o “parafuso” estava sendo retirado e colocado. Após a retirada, os cupons contendo os biofilmes foram imediatamente fixados, segundo o protocolo de fixação a ser descrito no item 4.5.

FIGURA 4.1- Esquema do sistema experimental para o desenvolvimento de biofilmes composto pelo MRD e frasco-reservatório de células.

FIGURA 4.2- Fotografia do sistema experimental MRD e frasco-reservatório, mostrando como o MRD era colocado de “cabeça-para-baixo” de modo a permitir a aderência das células sobre os cupons. Essa fotografia foi feita durante o experimento LG3.

4.2-Desenvolvimento dos biofilmes e condições de cultivo

Foram realizadas duas séries distintas de experimentos com o objetivo de monitorar a formação dos biofilmes. As séries foram denominadas cultura pura (CP) e

lodo granulado (LG), em função da origem dos inóculos utilizados para a formação dos biofilmes. As amostras CP e LG antes de serem empregadas nos experimentos para a formação de biofilmes foram cultivadas em frascos contendo meios e condições específicas, chamados frascos-mãe e posteriormente sub-cultivadas em frascos-inóculo.

Na série CP, utilizou-se como inóculo três culturas puras de *Archaeae* metanogênicas adquiridas da coleção de culturas de células alemã DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha. As culturas puras testadas foram: *Methanosarcina barkeri* (DSM800), *Methanobacterium formicicum* (DSM1535) e *Methanosaeta concilii* (DSM3671). Elas foram primeiro cultivadas individualmente, seguindo as instruções da DSMZ, e somente depois misturadas e sub-cultivadas juntas em meio de cultura basal Zinder (ZINDER & KOCH²⁵ apud VAZOLLER, 1995) acrescido das fontes de carbono acetato de sódio 30mM, formiato de sódio 10mM e metanol 10mM, sob atmosfera da mistura gasosa de H₂:CO₂ (80:20), à 30⁰ ± 3⁰ C. Os frascos utilizados foram Belco de 15 mL ou de antibiótico de 30 mL. As condições de anaerobiose para os sub-cultivos nos frascos-mãe foram as descritas por VAZOLLER (1995).

As culturas foram inoculadas com seringas, previamente esterilizadas, de 5 ou 10 mL no meio de cultura (meio basal Zinder) contido no frasco-reservatório e acrescido das fontes de carbono, acetato de sódio 30mM, formiato de sódio 10mM e metanol 10mM. Ao longo do experimento, o reservatório de células foi alimentado a cada 3 ou 4 dias com as mesmas fontes de carbono e nas mesmas concentrações descritas anteriormente. A alimentação foi feita por meio de seringas esterilizadas, previamente lavadas com atmosfera gasosa de 100% N₂, garantindo-se assim a retirada das alíquotas das soluções estoque dos compostos orgânicos sob condições de anaerobiose. Nesta

²⁵ ZINDER, S. H.; KOCH, M. (1984). No-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, v.138, p.263-272 apud VAZOLLER, R. F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos. p.259. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

série foram realizados dois experimentos denominados CP1 e CP2. A descrição detalhada da preparação dos inóculos para cada um dos experimentos, bem como as características relativas a cada um deles são apresentadas nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

Na segunda série de experimentos, denominada LG, utilizou-se como inóculo células anaeróbias oriundas de lodos granulados anaeróbios mesofílicos. Nesta série foram feitos três experimentos denominados LG1, LG2 e LG3. No experimento LG1, o lodo utilizado foi proveniente de um reator anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (UASB), operado em escala de laboratório com esgoto sanitário bruto. Nos outros dois experimentos, LG2 e LG3, o lodo foi proveniente de um reator sequencial em batelada degradando esgoto sanitário sintético (CALLADO, 2001).

Os lodos granulados foram macerados previamente à inoculação dos subcultivos, de modo a romper os grânulos e soltar as células, a fim de obter-se maior número possível de células em suspensão. Assim, volumes de 150,0 a 200,0 mL de lodo foram acondicionados em uma cápsula de porcelana para maceração, realizada manualmente com auxílio de um bastão de cerâmica (em condições aeróbias). Posteriormente, a cápsula de porcelana e a amostra foram lavadas em tampão fosfato de sódio, as células e pedaços dos grânulos foram transferidos para um becker de 500,0 mL. A seguir, após sedimentação das partículas sólidas, a fração líquida contendo as células em suspensão foi retirada com pipeta de 20,0 mL invertida e transferida (sob condições anaeróbias) para frascos de 2,0 L, chamados frascos-mãe LG1 e LG2. Para o experimento LG3, foi utilizado parte do conteúdo do frasco-mãe LG2, conforme descrito na Tabela 4.1. Os frascos continham previamente de 800,0 a 850,0 mL de meio de cultura basal Zinder

(ZINDER & KOCH²⁶ apud VAZOLLER, 1995), descrito no item 4.3, acrescido das fontes de carbono: acetato de sódio 10mM, formiato de sódio 10mM, butirato de sódio 10mM, etanol 10mM e metanol 10mM, no caso do experimento LG1. Para os experimentos LG2 e LG3 as fontes de carbono foram: acetato de sódio 20 mM, formiato de sódio 10mM, butirato de sódio 10mM, etanol 10mM, metanol 10mM e propionato de sódio 10mM. Os frascos mãe LG1 e LG2 foram mantidos fechados sob atmosfera da mistura gasosa de N₂:CO₂ (70:30) e incubados à 30⁰C ± 3⁰ C por 30 a 40 dias. A inoculação foi realizada de maneira diferente para cada experimento. Na tabela 4.1 apresenta-se a descrição detalhada de como os inóculos foram preparados. Ao longo dos experimentos, o frasco-reservatório foi alimentado com as fontes de carbono nas mesmas concentrações descritas acima. A alimentação foi feita a cada 3 ou 4 dias, dependendo do experimento, e as fontes foram injetadas por meio de seringas esterilizadas, previamente “lavadas” com 100% N₂.

Como pode-se verificar na Tabela 4.1, algumas vezes as células foram transferidas sob fluxo de N₂:CO₂ do frasco-inóculo para o frasco reservatório, outras vezes o próprio frasco-inóculo serviu como frasco-reservatório bastando para isso trocar a tampa, ou seja, retirar a tampa de borracha e colocar outra contendo as várias saídas conectadas às mangueiras, sempre sob fluxo da mistura gasosa de N₂:CO₂.

A anaerobiose do sistema composto pelo frasco-reservatório de células e MRD foi controlada em todos os experimentos fluxionando-se a mistura gasosa de N₂:CO₂ (70:30) na atmosfera livre do frasco-reservatório, em intervalos de 2 ou 3 horas. Em todos os experimentos, exceto no CP1 e LG1 foram utilizados cupons de polipropileno e vidro como suportes para a formação dos biofilmes. Nos experimentos CP1 e LG1, foram utilizados somente cupons de polipropileno. Para os experimentos CP2, LG2 e LG3, o MRD foi esterilizado com óxido de etileno (Acecil- Central de Esterilização Comércio e

²⁶ ZINDER, S. H.; KOCH, M. (1984). No-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, v.138, p.263-272 apud VAZOLLER, R. F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos. p.259. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Indústria Ltda, Campinas, SP) de modo a evitar a contaminação por outros microrganismos que não aqueles pertencentes ao inóculo.

Em todos os experimentos, CP1, CP2, LG1, LG2 e LG3, os frascos-mãe LG1 e LG2 e o frascos-inóculo CP1, CP2, LG1 e LG3 foram monitorados ao longo do período de incubação através da determinação da concentração do gás metano presente no biogás, realizada por cromatografia gasosa, cromatógrafo Gow Mac com detector de condutividade térmica (serie 150), conforme descrito em ARAUJO (1995). O exame das células foi feito sob microscopia de contraste de fase e epifluorescência, bem como a determinação da concentração celular. A concentração celular no frasco-mãe LG2 e nos frascos-inóculo CP1, CP2, LG1 e LG3 foi determinada antes do início de cada experimento através de contagem em câmara hemacitômetro Improved Neubauer, de acordo com KRUSE & PATTERSON (1973). O objetivo foi o de verificar se o número de células presente no inóculo era suficiente para iniciar os experimentos. Quando a concentração do gás metano, presente na atmosfera do frasco-inóculo e/ou do reservatório de células atingiu cerca de 0,01 a 0,03 mmoles, o inóculo (contendo as células anaeróbias) foi considerado propício para fornecer as condições de operação para o MRD, e então os experimentos foram iniciados, conectando-se o frasco-reservatório ao MRD. As características de cada experimento são apresentadas na Tabela 4.2.

TABELA 4.1- Preparação dos inóculos para cada experimento

Experimento	Preparação do inóculo
CP1	Foi preparado 200,0 mL de inóculo contendo: 20,0 mL de cada uma das três espécies metanogênicas (previamente cultivadas por 30 dias) + 140,0 mL de meio de cultura basal Zinder acrescido das fontes de carbono. Essas células foram cultivadas por 4 semanas sob atmosfera de $H_2:CO_2$ (80:20), à $30^0 \pm 3^0$ C. Após esse tempo, os 200,0 mL, contidos no frasco-inóculo CP1, foram adicionados no frasco reservatório que já continha previamente 600,0 mL de meio zinder acrescido das fontes de carbono (descritas anteriormente), sob atmosfera da mistura gasosa de $H_2:CO_2$ (80:20).
CP2	O inóculo foi preparado adicionando-se 30,0 mL de cada uma das três espécies metanogênicas (previamente cultivadas por 30 dias) em 410,0 mL de meio de cultura basal Zinder acrescido das fontes de carbono (descritas anteriormente). Essas células foram cultivadas por 30 dias sob atmosfera de $H_2:CO_2$ (80:20), à $30^0 \pm 3^0$ C. Após esse tempo, os 500,0 mL do frasco-inóculo CP2 foram transferidos (sob condições de assepsia e anaerobiose) para o frasco reservatório, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ (80:20).
LG1	A partir do frasco mãe LG1 e após incubação de 30 dias, fez-se o frasco inóculo LG1. Para isso, 200,0 mL foram retirados e incubados em 800,0 mL de meio de cultura basal Zinder por cerca de 75 dias, sob atmosfera de $N_2:CO_2$ (70:30). Após esse tempo, 400,0 mL somente da fração líquida do meio, foram retiradas do frasco-inóculo LG1 e adicionadas no frasco reservatório que já continha previamente 200,0 mL de meio de cultura basal Zinder acrescido das fontes de carbono (descritas anteriormente), sob atmosfera de $N_2:CO_2$ (70:30). Portanto, o frasco reservatório continha no tempo zero do experimento 600,0 mL de células anaeróbias em suspensão.
LG2	A partir do frasco mãe LG2 e após incubação de 42 dias, 500,0 mL foram retirados (sob condições anaeróbias e de assepsia) e incubados no frasco reservatório que continha previamente 200,0 mL de meio de cultura basal Zinder acrescido das fontes de carbono (descritas anteriormente), sob atmosfera de $N_2:CO_2$ (70:30). Portanto, o frasco reservatório continha no tempo zero 700,0 mL de células em suspensão.
LG3	A partir do frasco mãe LG2 e após incubação de 105 dias, 500,0 mL foram retirados e incubados num frasco esterilizado contendo 5 gramas de pérolas de vidro (1g para cada 100,0 mL de lodo). Após agitação manual por 20 minutos, o líquido foi separado das pérolas de vidro e do material particulado por filtração em coador de pano. Após esse procedimento, que objetivou separar mais as células das partículas sólidas, 400,0 mL do líquido contendo as células em suspensão foi inoculado (sob condições anaeróbias e de assepsia) em outro frasco (chamado de frasco-inóculo LG3) contendo previamente 400,0 mL de meio de cultura basal Zinder. O frasco-inóculo LG3 foi incubado por 38 dias à $30^0C \pm 3^0$, sob atmosfera de $N_2:CO_2$ (70:30). Na véspera do início do experimento, 720,0 mL do frasco-inóculo LG3 foram transferidos, sob condições de anaerobiose e assepsia para o frasco reservatório (previamente esterilizado).

TABELA 4.2- Características de cada experimento

Experi- mento	Volume do sistema (reservató- rio de células+ MRD)	Concentração celular no sistema (células/mL)	Duração do experimen- to (d)	Dias de alimentação do frasco reservatório	Tempo de amostragem das células do frasco reservatório	Tempo de amostra- gem dos cupons contendo o biofilme	Produção de metano do frasco inóculo no dia anterior ao início do experimento (mmoles)
CP1	800,0 mL	$7,5 \times 10^6$	14	Tempo zero e no 13 ^o dia	Tempo zero, 1 ^o e 14 ^o dia	No 2 ^o e 14 ^o dia	0,0120
CP2	500,0 mL	$2,7 \times 10^7$	9	Tempo zero, 3 ^o e 7 ^o dia	Tempo zero, 2 ^o , 7 ^o e 9 ^o dia	No 7 ^o e 9 ^o dia	0,0046
LG1	600,0 mL	$1,1 \times 10^4$	11	Tempo zero, 3 ^o e 9 ^o dia	Tempo zero.	No 2 ^o , 4 ^o , 9 ^o e 11 ^o dia	0,019
LG2	700,0 mL	$1,1 \times 10^9$	19	12 h antes do início do experiment o, 3 ^o , 8 ^o , 12 ^o e no 15 ^o dia.	Tempo zero, 1 ^o , 3 ^o , 7 ^o , 14 ^o e 19 ^o dia	No 1 ^o , 3 ^o , 7 ^o , 14 ^o e 19 ^o dia	0,033
LG3	720,0 mL	$4,6 \times 10^8$	22	Tempo zero, 3 ^o , 8 ^o , 14 ^o e no 20 ^o dia.	Tempo zero, 1 ^o , 9 ^o , 15 ^o , 20 ^o e 22 ^o dia	No 1 ^o , 5 ^o , 6 ^o , 9 ^o , 14 ^o , 15 ^o e 22 ^o dia	0,031

4.3 Descrição dos meios de cultura

As culturas puras de *Archaeae* metanogênicas testadas, *Methanosarcina barkeri* (DSM800); *Methanobacterium formicicum* (DSM1535) e *Methanosaeta concilii* (DSM3671), foram primeiramente cultivadas em meio específico indicado pela DSMZ e posteriormente sub-cultivadas, em meio de cultura basal Zinder (ZINDER & KOCH²⁷ apud VAZOLLER, 1995). Os meios de cultura indicados pela DSMZ encontram-se descritos na Tabela 4.3.

²⁷ ZINDER, S. H.; KOCH, M. (1984). No-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, v.138, p.263-272 apud VAZOLLER, R. F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos. p.259. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A cultura pura usada como controle positivo nas hibridações controle (a ser descrito no item 4.6) também foi adquirida da DSMZ, a *Methanospirillum hungatei* (DSM 864). A cultura não foi utilizada nos experimentos com o MRD. Essa espécie foi cultivada diretamente em meio de cultura basal Zinder acrescido das fontes de carbono acetato de sódio (1,7mM) e formiato de sódio (4,4 mM) em atmosfera de H₂:CO₂ (80:20).

No sub-cultivo das culturas puras utilizou-se o meio de cultura basal Zinder descrito a seguir, e para a redução do mesmo foi empregada solução redutora de cisteína-Na₂S (6,25 g de cisteína-HCl + 6,25 g de Na₂S.9H₂O em 0,5 L de água milli Q) (VAZOLLER, 1995). A esterilização dessa solução foi feita por filtração em filtros Millipore de 0,45 µm. Adicionou-se 2,0 mL da solução redutora a cada 100,0 mL de meio. Como as metanogênicas requerem um potencial redox muito baixo ($E_h < -400$ mV) para poder crescer (OREMLAND 1988), a adição de agentes redutores como a solução de cisteína-Na₂S e/ou a solução de sulfeto de sódio 5,0% foram importantes para manter o meio de cultura reduzido. A solução de resazurina utilizada nos meios de cultura, tanto da DSMZ quanto no meio Zinder, é um indicador do potencial redox do meio. Ela vai de azul à rosa (ou roxo) até completamente incolor quando o potencial redox está em torno de -100mV. Quando reoxidada, a resazurina se torna rosa mas não volta a ficar azul. Portanto, um meio contendo resazurina sem a cor rosa é uma boa garantia da anaerobicidade do mesmo, apesar de não indicar a presença de potencial redox de -330mV necessário ao crescimento de muitos microrganismos anaeróbios (LJUNGDAHL & WIEGEL, 1986).

As fontes de carbono utilizadas para o cultivo de cada espécie, bem como o tipo de gás usado na atmosfera dos frascos foram descritos na Tabela 4.3. Para evitar contaminação das culturas após os sucessivos sub-cultivos, adicionou-se no meio uma solução de penicilina (0,1 mg/mL). Para tanto preparou-se uma solução estoque de penicilina (penicilina G potássica) (10mg/mL). A mesma foi esterilizada por filtração e distribuída, sob fluxo estéril de N₂ (100%) em frascos de antibiótico esterilizados (BADRA, 1993).

TABELA 4.3- Meios de cultura indicados pela DSMZ.

Espécie	Composição do meio de cultura
<i>Methanobacterium formicicum</i> (DSM1535)	Meio 825 composto de: NH_4Cl (1,0 g/L); K_2HPO_4 (0,3 g/L); KH_2PO_4 (0,3 g/L); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1g/L); KCl (0,1 g/L); NaCl (0,6g/L); solução traço de metais (10,0mL/L) (usou-se a mesma do meio Zinder- descrita a seguir); solução de resazurina 0,1% (0,5 mL/L para obter concentração final de 0,0005g/L); cisteína-HCl x H_2O (0.5g/L). O meio foi preparado com água milli Q e depois de autoclavado a atmosfera do frasco foi trocada para $\text{H}_2:\text{CO}_2$ (80:20). Após essa etapa, e antes de inocular a cultura, adicionou-se: solução de bicarbonato de sódio 10,0% (10,0mL/L), solução de vitaminas (10,0 mL/L) (usou-se a mesma solução do meio 141 da DSMZ, descrita a seguir); solução de extrato de levedura 2,0% (50 mL/L, de modo que a concentração final foi de 1,0g/L); acetato de sódio (0,5 g/L); solução de sulfeto de sódio 5,0% (6,0mL/L, para obter concentração final de 0,3g/L). O pH final foi 7.
<i>Methanosarcina barkeri</i> (DSM800)	Meio 318 composto de: NH_4Cl (1,0 g/L); KH_2PO_4 (0,3 g/L); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,08g/L); NaCl (0,6g/L); tripticase (BBL) (0,5g/L) solução traço de metais (10,0mL/L) (usou-se a mesma do meio Zinder- descrita a seguir); solução de resazurina 0,1% (1,0mL/L, para obter concentração final de 0,001g/L); cisteína-HCl x H_2O (0.3g/L). O meio foi preparado com água milli Q e depois de autoclavado a atmosfera do frasco foi trocada para $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (70:30). Após essa etapa, e antes de inocular a cultura, adicionou-se: solução de bicarbonato de sódio 10,0% (10,0mL/L), solução de vitaminas (10,0 mL/L) (usou-se a mesma solução do meio 141 da DSMZ, descrita a seguir); solução de extrato de levedura 2,0% (25 mL/L, de modo que a concentração final foi de 0,5g/L); metanol (5,0ml/L, concentração final de 10mM); solução de sulfeto de sódio 5,0% (6,0mL/L, para obter concentração final de 0,3g/L). O pH final foi 6,8.
<i>Methanosaeta concilii</i> (DSM3671)	Utilizou-se o meio 318 sem extrato de levedura, tripticase, e metanol. Adicionou-se acetato de sódio 6,8 g/L (concentração final de 50mM). O pH final foi 7.

O meio de cultura basal Zinder (ZINDER & KOCH²⁸ apud VAZOLLER, 1995) usado nos sub-cultivos das culturas puras e no cultivo do lodo foi composto de: NH_4Cl

²⁸ ZINDER, S. H.; KOCH, M. (1984). No-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, v.138, p.263-272 apud VAZOLLER, R. F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos. p.259. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

(0,5 g/L); K_2HPO_4 (0,4 g/L); $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,1 g/L); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,05 g/L); solução de resazurina 0,1% (1,0 mL/L); solução traço de metais (10,0 mL/L). Após a dissolução dos reagentes em água Milli Q, na ordem descrita, homogeneizou-se a solução e introduziu-se um fluxo de N_2 (100%), por 30 minutos. Após esse tempo, o meio foi então distribuído nos frascos, ou mantido em um único frasco, sob fluxo do mesmo gás. Depois os frascos foram fechados e autoclavados à 120^0 C e a 1 atm de pressão, por 20 minutos. Antes da adição das células, a atmosfera do frasco foi substituída pela mistura gasosa de $N_2:CO_2$ (70:30) ou de $H_2:CO_2$ (80:20), sob condições de assepsia. A seguir, as seguintes soluções-estoque foram adicionadas: solução de bicarbonato de sódio 10,0% (10 mL/L), solução de vitaminas (10,0 mL/L), as fontes de carbono a serem utilizadas, solução de extrato de levedura 2,0% (5,0 mL/L) e, por último, a solução redutora de sulfeto de sódio ($Na_2S \cdot 9H_2O$) 5,0% (10 mL/L). A adição das soluções-estoque foi feita sob condições de assepsia e por meio de seringas de 1,0 mL esterilizadas. Antes da retirada do líquido do frasco contendo a solução estoque, as seringas foram “lavadas” com N_2 (100%), cerca de dez vezes. Na última vez, o gás permaneceu na seringa e foi introduzido no frasco antes do líquido ser retirado. Todas as soluções estoque foram preparadas e mantidas sob condições de anaerobiose estrita (atmosfera de 100% N_2), na ausência de luz e à temperatura ambiente.

A composição da solução traço de metais usada nos meios de cultivo foi a seguinte: NTA (ácido nitrilo acético) (4,5 g/L); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,556 g/L); $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,086 g/L); $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,17 g/L); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,21 g/L); H_3BO_3 (0,19 g/L); $NiCl_2$ (0,02 g/L); $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,01 g/L). O NTA foi primeiramente dissolvido em 200 ml de água milli Q e o pH da solução foi acertado para 6,5 com KOH 10N. Posteriormente, a solução foi vertida em 600 mL de água Milli Q, e então procedeu-se a adição dos demais sais, na ordem apresentada. O volume final da solução traço de metais foi de 1 L. O fluxo de N_2 (100%) foi introduzido na solução durante 20 minutos; e então alíquotas foram distribuídas em frascos de antibiótico de volume igual a 30 mL, sob fluxo do mesmo gás. A solução foi então esterilizada por autoclavação, e armazenada sob refrigeração, na ausência de luz.

A solução de vitaminas usada foi aquela descrita no meio 141 da DSMZ. Essa solução era composta de: biotina (0,002 g/L); ácido fólico (0,002 g/L); tiamina-HCl (0,005 g/L); riboflavina (0,005 g/L); ácido nicotínico (0,005 g/L); pantotenato de cálcio (0,005 g/L); piridoxina-HCl (0,010 g/L); vitamina B12 (0,0001 g/L); ácido lipóico (0,005 g/L) e ácido para-aminobenzoico (0,005 g/L). Esta solução foi esterilizada por filtração (sistema Millipore com filtros de 0,22 µm) e distribuída sob fluxo estéril de N₂ (100%), com auxílio do filtro “sterile acrodisc” (Corning), em frascos de antibiótico previamente esterilizados. Posteriormente, era estocada sob refrigeração e na ausência de luz.

4.4- Coloração dos polímeros extracelulares

No experimento LG3 utilizou-se o método colorimétrico de PASSOW & ALLDREDGE (1995) para identificar polímeros ácidos. O método consistiu em aplicar sobre a amostra, no caso os biofilmes formados sobre os cupons de polipropileno e vidro retirados do MRD, 500 µL de uma solução aquosa de Azul de Alcian 0,02% em 0,06% de ácido acético (pH 2,5) por 2 segundos. Uma vez que o corante pode coagular, a solução foi previamente filtrada (em filtro Millipore de 0,2 µm) antes de ser usada. Depois de corada, a amostra foi lavada com água destilada, gentilmente, e em seguida observada ao microscópio de contraste de fase. A observação de regiões azuladas na amostra indicou a presença de polímeros ácidos.

4.5- Caracterização filogenética da comunidade microbiana através da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes - FISH

Para a caracterização filogenética da comunidade microbiana presente nos biofilmes e no inóculo colocado no frasco reservatório utilizou-se no presente trabalho sondas de oligonucleotídeos²⁹ específicas ao RNAr 16S dos seguintes grupos: Domínio

²⁹ Sondas de oligonucleotídeos são oligômeros curtos de fita simples contendo cerca de 15 a 40 nucleotídeos, que podem ser sintetizados quimicamente.

Bacteria, Domínio *Archaea*, - bactérias redutoras de sulfato mesofílicas; - *Archaea* metanogênicas pertencentes à ordem *Methanomicrobiales*, famílias *Methanosarcinaceae*, *Methanococcaceae*, e, *Methanobacteriaceae*. As sondas específicas para as *Archaea* metanogênicas foram escolhidas segundo estudos anteriores (RASKIN et al., 1994a e b e HARMSSEN et al., 1996a), nos quais verificou-se que essas sondas detectam a maioria das metanogênicas presentes em digestores de lodo de esgoto mesofílico. As seqüências, posição de hibridação do RNAr e a especificidade das sondas estão descritas na Tabela 4.4. Todas as sondas foram marcadas com o corante fluorescente rodamina, na extremidade 5'; exceto pela sonda MSMX860 que foi marcada com Cy3. As sondas, com exceção da MSMX860, foram adquiridas comercialmente da Gibco Life Technologies, MD, USA, cujo representante no Brasil é a Ultrachem produtos químicos (Ribeirão Preto-SP). A sonda MSMX860 foi adquirida da Bio-Synthesis, Inc., USA, cujo representante no Brasil é a Promicro- Produtos Biológicos, SP. Todas as sondas foram purificadas via HPLC (cromatografia líquida de alta performance) segundo dados do fabricante.

A sonda NON338, comprovadamente incapaz de hibridar-se ao RNAr bacteriano (MANZ et al., 1992) foi utilizada como controle negativo visando quantificar a porcentagem de hibridações não-específicas. A hibridação não-específica refere-se àquela que ocorre entre a sonda e uma porção do RNAr bacteriano não complementar a este. Isso pode ocorrer em função do uso de temperaturas inadequadas, ou devido à secagem indevida do tampão de hibridação e das células durante o processo de hibridação, ou mesmo da secagem do tampão de lavagem.

Na Tabela 4.5 são apresentadas as características das sondas específicas para as *Archaea* metanogênicas, o conteúdo da tabela é importante para poder identificar quais os grupos metabólicos que as sondas detectam (metanogênicas hidrogenotróficas, acetotróficas, etc). Na Tabela 4.6, são apresentadas as concentrações estoque e concentração final das sondas utilizadas neste trabalho.

TABELA 4.4- Sondas de oligonucleotídeos usadas na hibridação *in situ* (FISH)

Sonda	Especificidade	Sequência (5' → 3')	Sítio do RNAr 16S'	Referência
NON338	controle negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	338-355	MANZ et al. 1992
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355	AMANN et al. 1990a
SRB385**	Bactérias redutoras de sulfato, mesofílicas, gram negativas, da subdivisão delta de <i>Proteobacteria</i>	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	385-402	AMANN et al. 1990a
ARC915	Domínio <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	915-934	STAHL & AMANN 1991
MC1109	<i>Methanococcaceae</i>	GCAACATAGGGCACGGGTCT	1109-1128	RASKIN et al. 1994a
MB1174	<i>Methanobacteriaceae</i>	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	1174-1195	RASKIN et al. 1994a
MB310	<i>Methanobacteriaceae</i>	CTTGTCTCAGGTTCATCTCCG	310-331	RASKIN et al. 1994a
MG1200	<i>Methanomicrobiales</i>	CGGATAATTCGGGGCATGCTG	1200-1220	RASKIN et al. 1994a
MSMX860	<i>Methanosarcinaceae</i>	GGCTCGCTTCACGGCTTCCT	860-880	RASKIN et al. 1994a

* Numeração baseada no RNAr 16S de *E. coli*, de acordo com BROSIUS et al. (1981).

** Vários organismos não-alvo apresentam a sequência complementar à essa sonda (AMANN et al., 1992 e RAMSING et al., 1996), enquanto que alguns organismos alvo (como por exemplo, *Desulforhabdus amnigenus*) apresentam vários nucleotídeos trocados em relação à sequência da sonda (OUDE ELFERINK et al., 1998b).

TABELA 4.5- Características Relevantes das sondas específicas para as *Archaeae* metanogênicas

Sonda	Grupo Alvo	Características
MC1109	<i>Methanococcaceae</i> Gênero I: <i>Methanococcus</i>	A maioria utiliza H ₂ e CO ₂ e formiato
MB1174 e MB310	<i>Methanobacteriaceae</i> Gênero I: <i>Methanobacterium</i> Gênero II: <i>Methanobrevibacter</i> Gênero III: <i>Methanosphaera</i>	A maioria utiliza H ₂ e CO ₂ ; alguns utilizam H ₂ e CO ₂ e formiato.
MG1200	<i>Methanomicrobiales</i> Gênero I: <i>Methanomicrobium</i> Gênero II: <i>Methanogenium</i> Gênero III: <i>Methanoculleus</i> Gênero IV: <i>Methanospirillum</i>	A maioria utiliza H ₂ e CO ₂ e formiato.
MSMX860	<i>Methanosarcinaceae</i> Gênero I: <i>Methanosarcina</i> Gênero II: <i>Methanococcoides</i> Gênero IV: <i>Methanolobus</i> Gênero V: <i>Methanohalophilus</i> Gênero III : <i>Methanosaeta</i>	Todos utilizam metanol e metilaminas; alguns utilizam acetato e H ₂ e CO ₂ .

Fonte: modificado de RASKIN et al. (1994a e b).

TABELA 4.6- Concentração estoque e concentração final de cada sonda.

Sonda	Concentração estoque*	Concentração final (sonda diluída) usada na hibridação
NON338	543,5 ng/μL	54,3 ng/μL
EUB338	500 ng/μL	50,0 ng/μL
SRB385	727,3 ng/μL	36,4 ng/μL
ARC915	984,04 ng/μL	32,8 ng/μL
MC1109	775,9 ng/μL	38,8 ng/μL
MB1174	493,0 ng/μL	49,4 ng/μL
MB310	799,4 ng/μL	40,0 ng/μL
MG1200	556,0 ng/μL	55,6 ng/μL
MSMX860	292,0 ng/μL	29,2 ng/μL

* A sondas adquiridas da GIBCO Life Technologies vieram liofilizadas e foram reconstituídas em volume tal de água MilliQ estéril de modo que a concentração estoque ficou em torno de 100 μMolar. Para ter certeza da concentração estoque determinou-se a absorbância em 260 nm;

A concentração da sonda em μg/mL é igual a Abs (260nm) x peso da sonda por densidade ótica (a Gibco forneceu este valor) x fator de diluição.

A técnica de hibridação³⁰ *in situ* com sondas fluorescentes compreendeu três etapas, a saber: - fixação das células; - preparação da lâmina e hibridação; - observação da lâmina hibridada ao microscópio de epifluorescência e contagem das células.

Fixação das amostras

Cerca de 1,0 a 3,0 mL das amostras provenientes do reservatório de células e dos frascos com as culturas puras foram centrifugadas (1 minuto a 13.000 rpm, em centrífuga para “eppendorf” – FANEM mod. 212, SP, Brasil), lavadas 2 vezes em 300,0 µL de tampão fosfato salino (PBS; 130mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄; pH 7,2), e depois resuspendidas em 200 µL de PBS e mais 600 µL de tampão de fixação com paraformaldeído 4% em PBS por no mínimo 3 horas no gelo, ou 12 horas à 4° C. As amostras foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS (e/ou em PBS com 0,1% de detergente Nonidet P-40, Sigma) e estocadas em 500 à 1000 µL de 50% etanol/ PBS à – 20° C, até serem utilizadas. O tampão de fixação foi preparado através da adição de 2 g de paraformaldeído, 15 µL de NaOH 10N, 5 ml de PBS 10X em 45 mL de água MilliQ previamente aquecida à 60 °C. Depois do paraformaldeído ter sido dissolvido, a solução foi resfriada em banho de gelo, o pH ajustado para 7,2 e posteriormente, estocada na geladeira até ser utilizada. O prazo máximo dessa solução era de 2 dias, a partir do qual novo tampão era sempre preparado.

No caso das amostras dos biofilmes, os mesmos foram fixados diretamente sobre o cupom, usando o tampão de fixação mencionado anteriormente. Após a fixação os cupons foram imersos em solução de PBS (por 5 minutos), essa etapa foi repetida por mais 2 vezes. Posteriormente, os biofilmes foram desidratados em solução de etanol 50%, 80% e 100% (3 minutos em cada) e por fim estocados (secos) a –20° C até que fossem feitas as hibridações para posterior observação sob microscopia confocal de varredura a laser. Algumas vezes os biofilmes não foram hibridados com as sondas, mas corados com uma solução de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, SIGMA) que é um corante para DNA, cuja concentração era de 10 µg. mL⁻¹, e observados ao microscópio

³⁰ O termo hibridação, usado neste trabalho, se refere à marcação do RNAr bacteriano com a sonda fluorescente (que é complementar à uma certa região do seu RNAr).

de epifluorescência. Em cada tempo de amostragem foram retirados cerca de 2 a 3 cupons do MRD, dois foram usados nas análises do biofilme intacto, e um cupom foi usado para analisar o biofilme suspenso e posteriormente fazer contagem dos grupos bacterianos através do FISH. No último caso, o biofilme após fixação e lavagem em PBS foi removido do cupom por meio de raspagem mecânica com uma espátula e posteriormente as células eram suspensas em 100 μ L de solução 0,1% de pirofosfato de sódio em PBS. Depois levadas ao ultrassom (Thorton-Inpec eletrônica Ltda, SP, Brasil) por 10 minutos, centrifugadas, e posteriormente resuspendidas em cerca de 50 à 200 μ L de 50% etanol/ PBS e estocadas à -20° C até serem utilizadas nas hibridações *in situ*.

Hibridação

1,0 μ L da amostra proveniente do reservatório de células, das culturas puras ou dos biofilmes em suspensão foi colocado sobre o pocinho da lâmina de vidro coberta com teflon (H.T.C. red, Dynatec, com 30 pocinhos, Figura 4.3; ou a Paul Marienfelder KG, Bad Mergentheim, Alemanha, Figura 4.4). Depois a mesma foi levada à estufa por 20 minutos a 45° C, permitindo assim que as células se fixassem na lâmina. Após essa etapa, a lâmina foi imersa para desidratação em uma série gradativa de etanol, 50%, 80% e 100%, por 3 minutos cada.

FIGURA 4.3- Fotografia de uma lâmina de vidro coberta com teflon usada no FISH. Cada poçinho tem cerca de 4mm de diâmetro.

FIGURA 4.4- Fotografia de uma lâmina de vidro coberta com teflon usada no FISH. Cada poçinho tem cerca de 8mm de diâmetro.

A hibridação iniciou quando foram adicionados 9,0 μL de tampão de hibridação, previamente aquecido na temperatura de hibridação, em cada poçinho, ou 18,0 μL sobre o cupom no caso do biofilme íntegro, na presença de concentrações apropriadas de formamida para a estringência de cada sonda (Tabela 4.7). As sondas foram adicionadas, cerca de 1,0 μL , para concentração final de 25 a 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, e as hibridações foram feitas em câmara úmida (tubos falcon com papel umedecido em tampão de hibridação, que tinha a função de evitar a secagem das células e manter a concentração do tampão de hibridação inalterada) na temperatura e tempo apropriados para a estringência de cada sonda (Tabela 4.7). Foram realizadas hibridações duplas, ou seja, colocava-se duas sondas no mesmo poçinho, somente nos experimentos LG2 e LG3. Esse procedimento foi realizado com as sondas MB1174 e ARC915 para melhorar a intensidade do sinal fluorescente e diminuir problemas oriundos do baixo conteúdo de RNA ribossômico, ou de reduzida disponibilidade das seqüências alvo. Nesse caso, a sonda que necessitou de maior concentração de formamida para alta estringência (MB1174) foi hibridada e lavada primeiro, seguida da segunda sonda (ARC915).

A temperatura de hibridação de cada sonda, corresponde à temperatura de dissociação, isto é, temperatura na qual a dupla hélice da molécula de RNAr se dissocia em duas cadeias monocatenárias. A dissociação é necessária para que a sonda fluorescente tenha acesso à porção da cadeia livre de RNAr com seqüência de bases complementar a sua cadeia. Esta temperatura depende de outros fatores, como a composição de bases (CG ou AU) da seqüência a qual se deseja hibridar, do comprimento da cadeia, etc. Se a temperatura de dissociação for ultrapassada, ocorre a desnaturação da molécula de RNAr (STAHL & AMANN 1991). A formamida usada no tampão de hibridação tem a função de reduzir a temperatura de dissociação da molécula de RNAr, evitando-se portanto, a sua desnaturação.

Após a hibridação, iniciou-se a etapa de lavagem das lâminas, no mesmo tampão de hibridação ou em tampão semelhante, mas sem formamida e com menor concentração de NaCl (Tabela 4.7). Após esta etapa as lâminas foram lavadas com um leve jato de água destilada para remoção dos sais, secadas ao ar, e coradas com 10 ou 20 μL (por poçinho) de uma solução de DAPI (4',6-diamidino-2-fenil indol) (Sigma), 10 a

20 µg/mL, por 10 minutos à temperatura ambiente. As células coradas com DAPI, que é um corante para DNA, serviram para enumerar o total de células.

TABELA 4.7 - Protocolos de hibridação

Sonda	Temperatura de hibridação	Tampão de Hibridação	Temperatura de lavagem	Tampão de lavagem	Referência
ARC915	45° C por 2 h	0,9 M NaCl, 20mM TrisHCl, 1mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48° C por 20 minutos	20mM TrisHCl, 1mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) com 225mM de NaCl.	HAHN et al. 1992
SRB385	45° C por 2 h	0,9 M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 30% formamida	48° C por 20 minutos	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) com 80mM NaCl.	HAHN et al. 1992
EUB338 e NON338	46° C por 1 h e 30 minutos	0,9 M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2), com 20% de formamida	48° C por 15 minutos	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) com 225mM de NaCl.	ABE, 1998
MB1174, MB310, MSMX860, MG1200 e MC1109	37° C por 4 h	0,9 M NaCl, 20mM TrisHCl, 0,1% SDS (pH 7,2) + 40% formamida.	37° C por 30 minutos	igual ao tampão de hibridação	RASKIN et al. 1994b

Observação e contagem das células

As lâminas foram montadas em um montante de glicerol/PBS (80/20;v/v) pH maior que 8,5, cobertas com lâminulas e visualizadas em microscópio de epifluorescência, Olympus BH2-RFCA, equipado com os seguintes filtros: UG-1 (com excitação na região UV do espectro) para visualizar células coradas com DAPI; BP-545 (excitação na região verde do espectro), específico para rodamina e Cy3 e, BP-490 (excitação na região azul do espectro), usado para visualizar a autofluorescência (em 420 nm) das *Archaeae* metanogênicas (EDWARDS & McBRIDE, 1975; MINK & DUGAN, 1977). As contagens das células foram realizadas após a captura da imagem, na tela de 17 polegadas do computador, usando câmera colorida digital Olympus U-PMTUC e

tempos de exposição de 0,08 segundos para o contraste de fase e de 0,5 a 4 segundos para a fluorescência. O software usado para aquisição das imagens foi o Image pro-plus versão 3.0.1. A microscopia de contraste de fase foi usada para ajustar o foco da imagem antes de aplicar a luz ultravioleta. Foram feitas imagens digitais do mesmo campo microscópico, observando primeiro com o filtro para DAPI e depois com o filtro para rodamina (Figura 4.5- exemplo). Essas imagens foram temporariamente congeladas na tela do computador e só depois realizou-se as contagens nas mesmas. Dessa forma, evitou-se problemas de perda de fluorescência durante as contagens e permitiu-se comparar as imagens de DAPI e rodamina através de sobreposição das mesmas, o que melhorou a identificação das células distinguindo-se células de partículas abióticas, que, as vezes, também apresentavam fluorescência com a sonda. O número total de células nas amostras foi determinado contando-se o número de células coradas com o DAPI. Para cada amostra e para cada poçinho, contou-se cerca de 500 a 1.000 células coradas com DAPI, de 10 a 20 campos microscópicos escolhidos ao acaso. A porcentagem de células hibridadas com as sondas, em cada campo microscópico, foi calculada em relação ao total de células coradas com DAPI. A média e o erro padrão das porcentagens foram calculados após os valores serem corrigidos pela transformação do arcosseno (ZAR, 1996; PURDY et al., 1997).

No caso dos biofilmes intactos, o número total de células sobre o suporte foi determinado observando-se 20 campos microscópicos (área do campo microscópico foi $3,2 \text{ mm}^2$) escolhidos ao acaso em cada cupom. Portanto, determinou-se o número médio de células por campo microscópico e, através de regra de três, determinou-se o número de células na área de cada cupom (vidro: $63,5 \text{ mm}^2$, polipropileno: $50,24 \text{ mm}^2$). No caso dos biofilmes suspensos, que foram removidos do cupom, o número de células foi calculado contando-se o número de células na área do campo microscópico; depois através de regra de três simples determinou-se o número de células na área do poçinho da lâmina ($12,56 \text{ mm}^2$). Esse valor foi referente ao número de células presentes em $1,0 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra (volume de amostra colocado no poçinho), e assim, através de regra de três, calculou-se o número de células em função do volume no qual as células do biofilme foram suspensas, por exemplo, em $100 \text{ }\mu\text{L}$ (50% PBS e 50% etanol). Esse

último valor foi referente ao número de células sobre o cupom. Para determinar o número de células aderidas sobre o cupom, tanto de polipropileno quanto de vidro, utilizou-se o valor médio do número de células encontrado em dois cupons, um com o biofilme intacto e outro com o biofilme retirado e ressuspenso.

Para cada amostra foram feitos dois controles negativos: um deles aplicando a sonda NON338, para verificar a proporção de ligação não-específica e o outro, no qual não se usou qualquer sonda, para verificar a porcentagem de células autofluorescentes. As porcentagens de hibridação com cada sonda, representando a porcentagem de cada grupo na amostra, foram expressas após subtrair a porcentagem de células detectadas pelo controle negativo (NON338) e a porcentagem de células autofluorescentes. As vezes os valores dos controles negativos foram iguais à zero. Os controles negativos foram importantes pois verificou-se que células com morfologia semelhante à *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. apresentaram algum sinal fluorescente quando observadas sem sonda e com o filtro para rodamina. Além disso, sabe-se que naturalmente as *Archaeae* metanogênicas, com exceção daquelas pertencentes ao gênero *Methanosaeta* sp. apresentam autofluorescência a 420 nm quando observadas com o filtro BP-490, que também é o filtro para fluoresceína. Por esta razão foram usadas neste trabalho somente sondas marcadas com os corantes fluorescentes rodamina e Cy3.

Como método de contagem usado no FISH considerou-se para as células semelhantes à *Methanosaeta* sp., cada filamento (contendo vários bacilos de *Methanosaeta* sp.) como sendo uma única célula. No caso das células semelhantes à *Methanosarcina* sp., geralmente estavam dispostas em aglomerados e nestes casos considerou-se, através da observação do limite de separação entre os aglomerados, cada “cacho” de células (que deve conter quatro células), como sendo uma única célula. Mas, quando as células de *Methanosarcina* sp. encontravam-se soltas, contava-se um coco como uma célula.

Estudos de profundidade foram realizados somente com os biofilmes intactos formados sobre os cupons de polipropileno. Os biofilmes intactos hibridados com as sondas, ou às vezes, somente corados com DAPI foram analisados utilizando-se microscopia confocal de varredura a laser (CSLM), sistema confocal da BioRad MRC

1024UV acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert usando objetiva planapocromática de imersão a óleo de 100x 1.4 NA. Imagens seriadas no sentido vertical (eixo Z) foram obtidas através da média de Kalman em 5 “frames” (512x512 pixels), em passos de 0,18 a 0,36 μm usando abertura máxima do diafragma de 2,0 mm. O software usado para aquisição e processamento das imagens foi o lasersharp (versão 2.1a). O CLSM foi utilizado sob a orientação do Prof. Dr. Renato Mortara do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Estado de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.

4.6 Híbridações controles utilizando culturas puras

Foram usadas 4 culturas puras de *Archaeae* metanogênicas, anteriormente indicadas, e uma cultura de *Escherichia coli* (ATCC 11229, gentilmente cedida pelo projeto DBAA- Determinação de Biodegradabilidade e Atividade Antimicrobiana da UFSCar) como organismos de referência para testar a especificidade das sondas que foram adquiridas e checar os protocolos de hibridação para cada uma delas. Nesse sentido, as espécies *Methanosarcina barkeri*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanosaeta concilii*, e *Methanobacterium formicicum* foram usadas como controles positivos para as sondas específicas para o Domínio *Archaea* (ARC915), para a ordem *Methanomicrobiales* (MG1200), para as famílias *Methanosarcinaceae* (MSMX860) e *Methanobacteriaceae* (MB1174 e MB310), respectivamente (Tabela 4.8). Células de *Escherichia coli*, foram usadas como controle negativo para as sondas de *Archaeae* metanogênicas e como controle positivo para a sonda EUB338, específica para o Domínio *Bacteria* (Tabela 4.8). Células de *Methanosaeta concilii* apresentaram sinal com a sonda NON338 (controle negativo) e com a sonda MB1174 (específica para a família *Methanobacteriaceae*). Isto não chegou a ser um problema, pois quando aplicou-se uma sonda com a qual os bacilos de *Methanosaeta concilii* não deveriam hibridar, no momento da contagem os mesmos não foram considerados, ou seja, o sinal foi considerado ligação não-específica. O mesmo aconteceu com *Methanosarsina barkeri* que apresentou sinal com a sonda MB1174, sem ser pertencente à família *Methanobacteriaceae* e sem possuir a sequência alvo complementar a sonda. Portanto,

essa ligação foi considerada não-específica. A partir desta observação, tomou-se sempre o cuidado de não contar células de *Methanosarcina* sp. quando as sondas aplicadas não eram específicas para este grupo. Células de *Methanobacterium formicicum* apresentaram sinal com a sonda ARC915 específica para o Domínio *Archaea*, mas não com a sonda MB310 específica para a família *Methanobacteriaceae*, à qual pertence. Portanto, a sonda MB1174 também específica para a família *Methanobacteriaceae* foi usada nos experimentos com o MRD, exceto no experimento CP1.

TABELA 4.8- Híbridações controles

Espécie	NON338	EUB338	ARC915	MSMX860	MG1200	MB310	MB1174
<i>Methanosaeta concilii</i> (DSM 3671)	+ ligação não-específica	—	+	+	—	—	+ ligação não-específica
<i>Methanosarcina barkeri</i> (DSM 800)	—	—	+	+	—	—	+ ligação não-específica
<i>Methanobacterium formicicum</i> (DSM 1535)	—	—	+	—	—	—	+
<i>Methanospirillum hungatei</i> (DSM 864)	—	—	+ (Figura 4.5)	—	+	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	+	—	—	—	—	—

+ (positivo)

— (negativo)

FIGURA 4.5 - Micrografia de fluorescência com células de *Methanospirillum hungatei* (DSM 864). Lado esquerdo: Coloração com DAPI. Lado direito: FISH realizado com a sonda ARC915 específica para Domínio *Archaea* (mesmo campo microscópico).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Introdução aos Resultados e Discussão

O sistema experimental “modified robbins device”- MRD e frasco-reservatório foi usado para o desenvolvimento de biofilmes anaeróbios por ser possível fazer a amostragem de forma não-destrutiva, ou seja, os biofilmes foram retirados de forma intacta do MRD, ainda fixados nos suportes, e puderam ser analisados diretamente sob o microscópio. A autora da presente tese teve experiência na manipulação do MRD para o desenvolvimento de biofilmes aeróbios, mas com a presença de bactérias redutoras de sulfato, quando estagiou no EAWAG (Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology) sob a supervisão dos pesquisadores Mary Power, Hauke Harms e Jan Roelof van der Meer.

Até onde se tem conhecimento esta tese representa o primeiro trabalho que utilizou o MRD para o desenvolvimento e estudo de biofilmes anaeróbios. A forma como os experimentos foram desenvolvidos, usando meio anaeróbio Zinder para o cultivo das culturas puras de metanogênicas e do lodo granulado, fluxionando a mistura de gases $N_2:CO_2$ (70:30) na atmosfera do frasco-reservatório, foi conduzida de acordo com os protocolos de rotina e condições disponíveis no laboratório. Assim, não foi possível dispor de uma câmara anaeróbia de modo que o MRD pudesse ser manipulado dentro dela. Não obstante, como será apresentado a seguir acredita-se que os resultados alcançados não foram prejudicados por isso.

A caracterização filogenética da comunidade microbiana presente nos biofilmes foi realizada usando a técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes -FISH, e a distribuição espacial dos grupos microbianos bem como a estrutura tridimensional do biofilme foi analisada usando a técnica de FISH associada à microscopia confocal de

varredura a laser. A técnica de FISH se constitui num avanço para as pesquisas na área de ecologia microbiana, pois rapidamente pode-se quantificar a presença de diferentes grupos microbianos presentes na amostra, sem que seja necessário cultivá-los previamente. Não obstante, alguns problemas freqüentemente são encontrados devido a ligação não-específica (da sonda com a células), presença de células autofluorescentes, como no caso das metanogênicas, e de partículas abióticas que também podem corar com a sonda. Na presente tese, conforme apresentado a seguir, deparou-se com alguns dos problemas mencionados anteriormente, mas estes foram contornados de modo que tem-se segurança com relação à qualidade dos dados aqui apresentados.

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos 5 experimentos realizados na presente tese de doutorado. Dividiu-se os resultados de acordo com o tipo de inóculo utilizado para a formação dos biofilmes no sistema experimental MRD. Assim, os experimentos que utilizaram como inóculo três culturas puras de *Archaeae* metanogênicas são descritos no item 5.2., e os experimentos que utilizaram como inóculo células anaeróbias oriundas de lodo granulado, mesofílico, anaeróbio são apresentados no item 5.3.

5.2 Experimentos com as três culturas puras em conjunto, CP1 e CP2

5.2.1 Experimento CP1

No dia anterior ao início do experimento, a concentração de metano na atmosfera do frasco-inóculo estava em torno 0,012 mmoles de metano. Isso evidenciou que as *Archaeae* metanogênicas estavam ativas e, portanto, em condições de serem testadas na colonização dos suportes confeccionados de polipropileno.

A composição microbiana do inóculo no primeiro experimento com culturas puras foi estimada baseada na amostra retirada do frasco reservatório no tempo zero do ensaio. O inóculo era composto de 17,0% de *Methanosarcina barkeri*, 1,0% de *Methanosaeta concilii*, ambas detectadas com a sonda MSMX860 (específica para família *Methanosarcinaceae*), e 82,0% de *Methanobacterium formicicum*, que não foram detectadas com a sonda MB310 específica para a família *Methanobacteriaceae*. Como as células de *Methanobacterium formicicum* não apresentaram sinal com a sonda MB310, a proporção das mesmas foi estimada através de contagem baseada na sua morfologia e coloração com DAPI. Após 24 horas de experimento, verificou-se que a composição das células presentes no frasco reservatório havia mudado significativamente. A proporção de *Archaea* metanogênicas diminuiu de 100 para 69,0%, pois foram detectadas com a sonda EUB338, cerca de 31,0% de células pertencentes ao Domínio *Bacteria*. As células que apresentaram sinal com EUB338 foram contaminantes, relacionados provavelmente a uma das culturas puras de *Archaea* metanogênicas, pois nesse período de ensaio o sistema MRD não foi aberto.

Dentre as *Archaea* metanogênicas, a espécie *Methanobacterium formicicum* foi predominante, compondo 56,0% do total de células coradas com DAPI, e o restante, 12,0% correspondeu à espécie *Methanosarcina barkeri* e 1,0% à *Methanosaeta concilii* (Figura 5.1). Após 14 horas de experimento, verificou-se que o meio do frasco reservatório foi oxidando, indicado pela coloração rosa da resazurina na presença de oxigênio; ao fluxionar-se na atmosfera do frasco a mistura gasosa de N₂:CO₂ (70:30) a

cada 3 horas, o meio de cultura voltou a ficar reduzido. Esse procedimento foi feito durante todo o experimento, e uma vez que alterava-se a composição dos gases na atmosfera do frasco reservatório devido a essa troca, optou-se pela não determinação do gás metano ao longo do experimento. Entretanto, observações microscópicas das células presentes no frasco reservatório ao longo dos 14 dias revelaram que mesmo com oxidação do meio, as células de *Methanobacterium formicicum* e *Methanosarcina barkeri* apresentaram autofluorescência (devido ao fator F₄₂₀). A amostra retirada do frasco reservatório no 14^o dia de experimento apresentou fragmentos celulares, células lisadas e pouquíssimas células de *Methanobacterium formicicum* e *Methanosaeta concilii* de modo que não foi possível realizar as hibridações na mesma e, portanto, estimar a composição microbiana do frasco reservatório nesse tempo.

Quanto aos biofilmes formados sobre os cupons de polipropileno, foram observados somente os biofilmes intactos sobre o suporte. Não foram analisadas amostras dos biofilmes suspensos, pois as mesmas quase não apresentaram células, mesmo após terem sido concentradas e suspendidas em 20 µl de tampão fosfato de sódio. Portanto, não foi possível verificar a proporção de cada espécie de *Archaeae* metanogênica nos biofilmes.

A presença qualitativa das espécies metanogênicas sobre o suporte foi confirmada através da observação direta dos biofilmes ao microscópio. Tais observações revelaram que, após 2 dias de experimento, os biofilmes eram formados por poucas células aderidas sobre o suporte, sendo que estas se encontravam bem dispersas entre si, existindo ainda áreas completamente vazias. O biofilme era composto por células de *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* e pelos “bacilos contaminantes” (Figuras 5.2 e 5.3). Não foram encontradas células de *Methanosaeta concilii* colonizando o suporte após 2 dias de experimento. O biofilme formado após 14 dias de experimento apresentou regiões com aglomerados de células, mas áreas com poucas, ou mesmo sem células ainda foram encontradas. Não foi observado crescimento em espessura do biofilme.

Nesse período foram encontradas células de *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanosaeta concilii* colonizando o suporte (Figuras 5.4 e 5.5). O não crescimento em espessura do biofilme e o fato das células não terem colonizado todo o suporte talvez possa estar relacionado à questão da alimentação do frasco reservatório. Até o 13^o dia de incubação, nenhuma alimentação foi realizada, o que talvez justifique também as condições das células no frasco reservatório no mesmo período. A alimentação do frasco reservatório foi feita no 13^o dia com as fontes de carbono, acetato de sódio 30mM, metanol 10mM e formiato de sódio 10mM.

A intensidade e não detecção do sinal fluorescente na técnica de hibridação *in situ* usando sondas complementares ao RNAr depende do conteúdo ribossômico celular e vem sendo usada para determinar a atividade metabólica de uma população (POULSEN et al., 1993). Desse modo, a não hibridação das células de *Methanobacterium formicicum* com a sonda MB310, específica para a família *Methanobacteriaceae*, com a qual deveriam hibridar poderia ser consequência do baixo conteúdo de RNAr celular, e consequentemente baixa atividade metabólica das células. Não obstante, essas células apresentaram hibridação positiva e com sinal fluorescente forte com a sonda ARC915, e portanto, estavam ativas e poderiam ter hibridado com a sonda MB310, mas isso não ocorreu. Além disso, a observação direta dessas células, sob microscopia de fluorescência revelou que elas apresentavam autofluorescência (devido ao fator F₄₂₀), indicando estarem ativas.

Uma vez que o problema não foi em decorrência do baixo conteúdo de RNAr celular, considerou-se a possibilidade da sonda não estar penetrando na célula. Desse modo, para melhorar a permeabilidade da célula à sonda, foram feitos 7 ciclos de congelamento a -80 °C e descongelamento a 60° C por 5 a 10 min, após a amostra já ter sido fixada, de acordo com o trabalho de SEKIGUCHI et al. (1999) e comunicação pessoal deste mesmo autor. Mesmo após esse tratamento, as células de *Methanobacterium formicicum* não apresentaram sinal com a sonda MB310. Assim, concluiu-se que o problema deveria ser de disponibilidade do alvo ("target availability"),

ou seja, a região do RNAr 16S (posição 310-331) que está dentro da célula (e que, sendo complementar à sonda, deveria hibridar com a mesma), por motivos de conformação espacial da molécula de RNAr, a mesma não estava acessível para que a sonda se ligasse.

A solução encontrada para se poder detectar células pertencentes à família *Methanobacteriaceae* foi usar outra sonda, a MB1174, também específica para esta família, porém complementar à outra região do RNAr 16S (posição 1174-1195). Como esta sonda hibrida o RNAr das células de *Methanobacterium formicicum* em outra posição, não foi verificado qualquer problema com disponibilidade das seqüências-alvo ou com permeabilidade da célula ao oligonucleotídeo. A hibridação controle usando células de *Methanobacterium formicicum* com a sonda MB1174 foi positiva (Figura 5.6), e não foi necessário fazer qualquer modificação no protocolo de fixação das células, tampouco foram feitos os ciclos de congelamento-descongelamento. Entretanto, essa nova sonda foi aplicada somente nos outros experimentos.

Pelo exposto, considerou-se o experimento CP1 com resultados preliminares, porém de grande valor para o estabelecimento de procedimentos de cultivo e manipulação do MRD, bem como da sonda específica à membros da família *Methanobacteriaceae*. Outro experimento empregando-se as culturas puras de *Archaea* metanogênicas como inóculo para a formação dos biofilmes foi conduzido, chamado de CP2.

FIGURA 5.1- Micrografia de fluorescência das células presentes no frasco reservatório após 24 horas de experimento. Lado esquerdo: Coloração com DAPI, na qual observam-se os bacilos contaminantes (indicados com a seta) e células metanogênicas, *Methanosarcina barkeri* e *Methanobacterium formicicum*. Lado direito: FISH com a sonda MSMX860, específica para membros da família *Methanosarcinaceae*; evidenciando as células de *Methanosarcina barkeri* que hibridaram com a sonda (mesmo campo microscópico). A barra indica 5 µm.

FIGURA 5.2- Micrografia de fluorescência do biofilme formado sobre cupom de polipropileno após 2 dias de experimento. As células foram coradas com DAPI.

FIGURA 5.3- Micrografia de fluorescência do biofilme formado sobre o cupom de polipropileno após 2 dias de experimento. As células foram coradas com DAPI. Observam-se células de *Methanosarcina barkeri* e uma das morfologias contaminantes.

FIGURA 5.4- Micrografia de fluorescência do biofilme formado sobre cupom de polipropileno após 14 dias de experimento. As células foram coradas com DAPI.

FIGURA 5.5- Micrografia de fluorescência do biofilme formado sobre cupom de polipropileno após 14 dias de experimento. As células foram coradas com DAPI.

FIGURA 5.6- Micrografia de fluorescência de células de *Methanobacterium formicicum* (DSM 1535). Lado esquerdo: coloração com DAPI. Lado direito: FISH com a sonda MB1174, específica para membros da família *Methanobacteriaceae*. As células de *Methanobacterium formicicum* hibridaram com a sonda (mesmo campo microscópico). A barra indica 5 μm .

5.2.2 Experimento CP2

No dia anterior ao início do experimento, a concentração de metano na atmosfera do frasco-inóculo estava em torno de 0,0046mmoles de metano. Isso evidenciou que as *Archaeae* metanogênicas estavam ativas e, portanto, em condições de serem testadas na colonização dos suportes confeccionados de vidro e polipropileno.

A composição da comunidade microbiana presente no inóculo foi estimada baseada na amostragem das células planctônicas presentes no frasco reservatório no tempo zero (Figura 5.7). Verificou-se que o inóculo era composto por 85% de células de *Methanobacterium formicicum*, detectadas com a sonda MB1174, e 11.0% (erro padrão (E.P.)= 3.0%, $n= 15$) de células de *Methanosarcina barkeri* e *Methanosaeta concilii*, ambas detectadas com a sonda MSMX860 (Figura 5.8). A composição das células no frasco reservatório variou ao longo do experimento conforme apresentado na Figura 5.7. No início o inóculo era composto de 100% de *Archaea* metanogênicas. Após dois dias de experimento essa porcentagem diminuiu, já que foram detectadas cerca de 27% (E.P.=5,0%, $n=16$) de células pertencentes ao Domínio *Bacteria* com a sonda EUB338. O número de células de *Bacteria* continuou a aumentar até 89.0% (E.P.=6.0%, $n=14$) no 7^o dia. Por conseguinte, a proporção de *Archaea* metanogênicas detectadas com a sonda ARC915 diminuiu de 100% no tempo zero para 26,0% (E.P.=3,0%, $n= 4$) no 9^o dia. Uma vez que o MRD foi aberto desenroscando um dos parafusos de modo a poder amostrar os cupons contendo os biofilmes, é possível que a contaminação tenha sido proveniente dessa abertura, apesar de no momento da amostragem as circunvizinhanças do local do parafuso terem sido esterilizadas com etanol 100,0 % e o local da abertura estar sob fluxo da mistura de gases $N_2:CO_2$ (70:30), que passou pelo filtro “sterile acrodisc” (Corning), de modo a evitar a entrada de oxigênio no MRD. Outra possibilidade seria a de que uma das culturas de *Archaeae* metanogênicas, provavelmente a cultura de *Methanobacterium formicicum*, após os sucessivos subcultivos teria sido contaminada. No frasco reservatório a condição de anaerobiose não foi a mais adequada, ou seja, o meio de cultura oxidou, apesar de a cada 2 horas estar submetendo a atmosfera do frasco reservatório a um fluxo de $N_2:CO_2$ (70:30). Assim, as

células contaminantes podem ter encontrado condições propícias para se proliferarem (Figura 5.9), no caso anaeróbias facultativas.

FIGURA 5.7- Composição da comunidade microbiana presente no frasco reservatório (células planctônicas) no tempo 0, e após 2, 7 e 9 dias de experimento. Abundância relativa das células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338), *Archaea* (ARC915), às famílias *Methanobacteriaceae* (MB1174), *Methanosarcinaceae* (MSMX860) e à soma das células pertencentes aos dois Domínios (ARC915+EUB338). Os valores de abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro-padrão. Os valores das hibridações apresentados nesta Figura encontram-se descritos nos Anexos.

FIGURA 5.8- Micrografia de fluorescência das células presentes no frasco reservatório no tempo zero do experimento. Lado esquerdo: coloração com DAPI; evidenciando células de *Methanobacterium formicicum* e *Methanosaeta concilii*. Lado direito: FISH com a sonda MSMX860, específica para membros da família *Methanosarcinaceae* (mesmo campo microscópico). As células de *Methanosaeta concilii* hibridaram com a sonda. A barra indica 5 µm.

FIGURA 5.9- Micrografia de fluorescência das células presentes no frasco reservatório após 2 dias de experimento. As células foram coradas com DAPI. As células contaminantes estão indicadas com a seta.

De acordo com os dados obtidos através do FISH, verificou-se que os biofilmes desenvolvidos após 7 e 9 dias de experimento eram compostos principalmente de células de *Archaea* detectadas com a sonda ARC915 (Figura 5.10). Dentre essa população, as células de *Methanobacterium formicicum* detectadas com a sonda MB1174, predominaram em todos os biofilmes. A proporção dessas células variou de 42,0%

(E.P.=8,0%, $n=8$) (biofilme com 7 dias formado sobre o polipropileno) a 90,0% (E.P.=6,0%, $n=9$) (biofilme com 9 dias formado sobre o polipropileno).

As células detectadas com a sonda MSMX860, específica para membros da família *Methanosarcinaceae*, constituíram um grupo pequeno no biofilme. Esse grupo representou cerca de 1,0% do total de células coradas com DAPI, e foram observadas somente células de *Methanosaeta concilii*. Células de *Methanosarcina barkeri*, também detectadas com a sonda MSMX860, não estavam presentes no biofilme após 9 dias de experimento, embora tivessem sido observadas nos biofilmes após 2 dias (observação do biofilme intacto, Figura 5.11) e 7 dias sobre o cupom de vidro, em somente um campo microscópico (Figura 5.14). A ausência de células de *Methanosarcina barkeri* no biofilme com 7 e 9 dias pode ser explicada pelo fato desta espécie não ter sido mais facilmente encontrada no frasco reservatório no 7^o dia de experimento. Tal ausência pode estar relacionada com o fato desta espécie não apresentar qualquer tolerância ao oxigênio (KIENER & LEISINGER³⁴ apud KATO et al., 1993a) e, conforme mencionado anteriormente, a condição de anaerobiose no frasco reservatório não foi a mais adequada, mesmo sob fluxos constantes da mistura de gases N₂:CO₂ (70:30).

As células pertencentes ao Domínio *Bacteria*, detectadas com a sonda EUB338, também foram encontradas nos biofilmes, porém em porcentagens pequenas. Os valores variaram de 9,0% no biofilme com 7 dias formado sobre o vidro a 15,4% (E.P.=4,4%, $n=9$) no biofilme com 9 dias formado sobre o polipropileno, do total de células coradas com DAPI. Conforme mencionado anteriormente, as células detectadas com EUB338 não faziam parte do inóculo desse experimento, elas contaminaram, provavelmente, por duas razões, ou estavam presentes em um dos frascos das culturas de *Archaea* metanogênicas, ou durante a manipulação do MRD. Não obstante, a presença delas nos biofilmes pode indicar que uma vez presente no frasco reservatório elas puderam se estabelecer na comunidade dos biofilmes, tanto no vidro quanto no polipropileno.

³⁴ KIENER, A.; LEISINGER, T. (1983) Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.4, p.305-312 apud KATO, M.; FIELD, J.A.; LETTINGA, G. (1993a) High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, v.42, N.11, p. 1360-1366.

O princípio de “probe nesting” (RASKIN et al., 1994b) é demonstrado pelo uso combinado de várias sondas específicas e uma sonda geral. Por exemplo, a soma das porcentagens de células hibridadas com ARC915 (Domínio *Archaea*), com EUB338 (Domínio *Bacteria*) e com EUK516 (Domínio *Eucarya*) deve ser 100, já que todas as formas conhecidas de vida pertencem à um desses três Domínios (WOESE et al., 1990). Neste experimento não foi utilizada a sonda para eucariotos, pois o inóculo utilizado somente possuiu culturas puras de *Archaea*. Então, neste caso, a soma das porcentagens obtidas com as sondas ARC915 e EUB338 deveria ser de 100 %. Em algumas amostras do frasco reservatório após 2 dias de ensaio, e de biofilmes no polipropileno com 7 e 9 dias, isto não ocorreu, ou seja, a soma foi maior que 100%. Em outras amostras, como por exemplo, de biofilme no vidro com 9 dias de ensaio, a soma foi menor que 100%. Ainda, seguindo o princípio de “probe-nesting”, a soma das porcentagens obtidas com as duas sondas específicas para as metanogênicas (MB1174 e MSMX860) deveria ser igual ao valor encontrado com a sonda ARC915. Entretanto, este valor foi menor para todas as amostras, exceto para o inóculo. Neste caso, pode ser que as porcentagens de células de *Methanosarcina barkeri* detectadas com a sonda MSMX860 e *Methanobacterium formicicum* detectadas com a sonda MB1174 tenham sido subestimadas, uma vez que essas células, mesmo após vigorosa homogeneização da amostra, permaneceram agrupadas, dificultando a contagem exata das mesmas. Outra possível explicação para a baixa porcentagem de células hibridadas com a sonda MB1174, em relação aos valores obtidos com a sonda ARC915, seria a seguinte: as células foram hibridadas somente com a sonda MB1174, não foi feita dupla hibridação (com as sondas MB1174 e ARC915 na mesma amostra), que geralmente melhora a intensidade do sinal fluorescente. Portanto, é provável que algumas células semelhantes à *Methanobacterium* tenham apresentado sinal fluorescente fraco com a sonda MB1174, que não foi detectado e, conseqüentemente, a porcentagem de células hibridadas com esta sonda deve ter sido subestimada. Então, é razoável acreditar que os valores corretos para MB1174 sejam iguais àqueles encontrados para a sonda ARC915.

Com relação aos dois tipos de suportes estudados, não foi verificada diferença entre ambos no que se refere à colonização do biofilme. As três espécies de

metanogênicas estavam presentes em ambos os suportes e o número médio de células por mm^2 de cupom foi próximo após 7 dias de experimento: $1,4 \times 10^2$ células/ mm^2 de cupom de vidro (D.P.= $2,8 \times 10$) e $2,0 \times 10^2$ células/ mm^2 de cupom de polipropileno (D.P.= $9,5 \times 10$). Após 9 dias de experimento, o número de células aderidas em cada um dos cupons foi de : $2,7 \times 10^2$ células/ mm^2 de cupom de vidro (D.P.= $4,4 \times 10$) e $2,0 \times 10^2$ células/ mm^2 de cupom de polipropileno (D.P.= $2,8 \times 10$). Portanto, no cupom de polipropileno o biofilme formado se estabilizou por volta do 7º ou 9º dia. Já, no suporte de vidro, como o número de células quase dobrou, pode ser que o biofilme colonizando esse suporte ainda não estava totalmente formado e, no intervalo de 2 dias, mais células se aderiram.

FIGURA 5.10- Composição da comunidade microbiana dos biofilmes após 7 e 9 dias de experimento, formados sobre os cupons de vidro e de polipropileno. Abundância relativa das células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338), *Archaea* (ARC915), às famílias *Methanobacteriaceae* (MB1174) e *Methanosarcinaceae* (MSMX860), e a soma das células pertencentes aos dois Domínios (ARC915+EUB338). Os valores de abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células, em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro-padrão. Os valores das hibridações apresentados nesta Figura encontram-se descritos nos Anexos.

As observações realizadas do biofilme intacto sob microscopia de fluorescência estão comentadas nos itens a seguir, considerando-se a idade dos biofilmes nos suportes testados:

Biofilme com 2 dias: Após 2 dias de experimento verificou-se que as 3 espécies de *Archaea* metanogênicas estavam aderidas sobre os suportes, tanto de vidro (superfície hidrofílica) quanto de polipropileno (superfície hidrofóbica), respectivamente apresentado nas Figuras 5.11 e 5.12. Observou-se também que a morfologia contaminante, células pertencentes ao Domínio *Bacteria* detectadas com EUB338, estavam sobre o suporte. O biofilme nesse tempo era irregular existindo regiões com aglomerados de células, que às vezes se sobrepunham formando mais de uma camada, e, outras áreas vazias. De modo geral, a maior parte do suporte era coberto por células bem espaçadas entre si.

Biofilme com 7 dias: Nesse período, o biofilme se apresentou sob a forma de uma monocamada de células que quase cobriu todo o suporte de vidro (Figura 5.13), mas áreas vazias ainda foram observadas. Verificou-se novamente a presença das 3 espécies de *Archaea* metanogênicas sobre o suporte. Entretanto, células de *Methanosarcina barkeri* foram raras. Dentre dez campos microscópicos observados, somente em um verificou-se a presença de um aglomerado com 8 células (Figura 5.14). As células contaminantes também foram observadas sobre o suporte de vidro.

Biofilme com 9 dias

Suporte de vidro: O biofilme foi também formado por uma camada de células que quase cobriu todo o suporte (Figura 5.15). Entretanto, nas extremidades do mesmo, as células estavam bem espaçadas entre si (Figura 5.16). Essa camada apresentou as células contaminantes e a espécie de *Methanobacterium formicicum*, identificadas através de sua morfologia. Foram observadas poucas células de *Methanosaeta concilii* e não foram encontradas células de *Methanosarcina barkeri*.

Suporte de polipropileno: A colonização do suporte ocorreu de modo mais uniforme, e foram iguais na extremidade e centro do suporte. As células contaminantes estavam presentes, mas não formaram uma monocamada compacta. Estas estavam mais espaçadas. Várias células de *Methanobacterium formicicum* se aglomeraram, umas por

cima das outras, contribuindo assim para o aumento da espessura do biofilme em pontos específicos. Foram observadas poucas células de *Methanosaeta concilii* sobre o suporte (Figuras 5.17).

FIGURA 5.11- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 2 dias de experimento sobre o cupom de vidro. As células foram coradas com DAPI. As células contaminantes estão indicadas pela seta.

FIGURA 5.12- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 2 dias de experimento evidenciando as espécies de *Archaea* metanogênicas colonizando o cupom de polipropileno. As células contaminantes estão indicadas pela seta. As células foram coradas com DAPI.

FIGURA 5.13- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 7 dias de experimento, colonizando o cupom de vidro. As células contaminantes estão indicadas pela seta. As células foram coradas com DAPI.

FIGURA 5.14- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 7 dias de experimento, colonizando o cupom de vidro. As células contaminantes estão indicadas pela seta. As células foram coradas com DAPI.

FIGURA 5.15- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 9 dias de experimento colonizando o cupom de vidro. As células foram coradas com DAPI.

FIGURA 5.16- Micrografia de fluorescência do mesmo biofilme da Figura 5.15, porém evidenciando outro campo microscópico. As células contaminantes estão indicadas pela seta. As células foram coradas com DAPI.

FIGURA 5.17- Micrografia de fluorescência do biofilme formado após 9 dias de experimento evidenciando as espécies metanogênicas colonizando o cupom de polipropileno. As células contaminantes estão indicadas pela seta. As células foram coradas com DAPI.

A manutenção de condições estritas de anaerobiose no sistema experimental frasco-reservatório e MRD não foi adequada. No experimento CP1 isso também ocorreu. Em ambos os ensaios, CP1 e CP2, como resultado, verificou-se o crescimento de bactérias contaminantes que hibridaram com EUB338, portanto pertencentes ao Domínio *Bacteria*, tanto no frasco-reservatório quanto no biofilme. Novamente, pode-se relacionar a origem dos contaminantes a dois fatores: - uma das culturas adquiridas, sofreu contaminação após os sucessivos subcultivos; - durante a operação do sistema frasco-reservatório e MRD, pois este último foi aberto no momento da amostragem dos cupons e o meio líquido presente no mesmo, circulava posteriormente no frasco reservatório.

A cultura contaminante poderia ser bactéria facultativa ou mesmo aeróbia que no frasco reservatório se proliferou e passou a coexistir no mesmo meio e condições destinadas às espécies de *Archaeae* metanogênicas.

A existência de anaeróbios facultativos em ecossistemas anaeróbios é comum, devido fundamentalmente a presença de oxigênio residual no sistema. A coexistência de bactérias anaeróbias estritas (*Bifidobacteria*) com organismos aeróbios estritos (fungos) foi relatado anteriormente (OMAR e AMPE, 2000). Segundo os mesmos autores, esse

fenômeno também já foi observado em digestores anaeróbios nos quais organismos aeróbios estritos foram encontrados. Os organismos aeróbios provavelmente consomem rapidamente o oxigênio disponível, o que em alguns casos, faz parecer que a concentração de oxigênio seja zero.

Fato semelhante foi relatado por KATO et al. (1993a), estudando a tolerância das metanogênicas, presentes em lodo granulado, ao oxigênio. Os autores verificaram que as metanogênicas foram altamente tolerantes ao oxigênio quando em culturas mistas; e isso se deveu em primeiro lugar à ação das bactérias facultativas, que sem dúvida alguma consumiram o oxigênio quando na presença de seus substratos. Em outro trabalho (KATO et al., 1993b), os autores verificaram que mesmo após o lodo ter sido exposto por 18 dias ao oxigênio, ainda foi encontrada uma população de metanogênicas saudáveis.

Apesar da condição de anaerobiose não ter sido total no presente experimento, observações microscópicas revelaram que células de *Methanobacterium formicicum* e *Methanosarcina barkeri* (no 3^o dia de experimento) estavam autofluorescendo (devido ao fator F₄₂₀), e portanto, supõe-se que a presença do oxigênio no frasco reservatório não tenha sido prejudicial à elas. Além disso, alguns estudos demonstraram que apesar das metanogênicas serem consideradas organismos anaeróbios estritos, e portanto, não possuírem a enzima superóxido dismutase, que é usual no metabolismo aeróbio (MORRIS³⁵, PIRT³⁶, PFENNING³⁷ apud KATO et al., 1993a), algumas espécies apresentam tolerância a este composto. Espécies de *Methanobrevibacter thermoautotrophicum* e *Methanobrevibacter arboriphilicus* foram capazes de sobreviver por horas na presença de ar sem qualquer diminuição no número de unidade formadora

³⁵ MORRIS, J.G. (1979) Nature of oxygen toxicity in anaerobic microorganisms. In: SHILO, M. ed. *Strategies of microbial life in extreme environments*. Verlag Chemie, Weinheim, p. 149-162. apud KATO, M.; FIELD, J.A.; LETTINGA, G. (1993a) High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, v.42, N.11, p. 1360-1366.

³⁶ PIRT, S.R. (1975) Effects of oxygen on microbial cultures. In: *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific, Oxford, UK, p. 104-116.

³⁷ PFENNING, N. (1978) Formation of oxygen and microbial processes establishing and maintaining anaerobic environment. In: SHILO, M. ed. *Strategies of microbial life in extreme environments*. Verlag Chemie, Weinheim, p. 137-148.

de colônias (KIENER & LEISINGER³⁸ apud KATO et al., 1993a). Culturas enriquecidas de *Methanotrix* (*Methanosaeta*) puderam ser expostas por período de até 48 horas sem causar a morte das células (HUSER³⁹ et al. apud KATO et al., 1993a). A presença de metanogênicas em lodos ativados (HUSER et al. apud KATO et al., 1993a) sugere a existência de micro-nichos anaeróbios mesmo em ambientes altamente aerados.

Não foram detectadas diferenças entre os biofilmes formados sobre os suportes de vidro (superfície hidrofílica) e de polipropileno (superfície hidrofóbica). Em termos de número de células/mm² de suporte, ambos apresentaram números muito semelhantes em torno de $2,0$ a $2,7 \times 10^2$ células/mm² de cupom, respectivamente de polipropileno e vidro após 9 dias. Neste experimento, assim como no CP1, ao contrário do que foi observado por VERRIER et al. (1988), foram detectadas células de *Methanosarcina barkeri* e de *Methanosaeta concilii* colonizando ambos os suportes, tanto no biofilme com 2 dias, quanto nos biofilmes com 7, 9 e 14 dias de idade (esta última amostra refere-se ao experimento CP1). Os autores (VERRIER et al., 1988) verificaram que *Methanosarcina mazei* não aderiu em nenhum dos seis suportes testados, politetrafluoretileno, polipropileno, polietileno, PVC, poliacetal e poliamida 6, e a espécie *Methanotrix soehngenii* (*Methanosaeta concilii*), célula hidrofóbica (segundo as condições e medidas realizadas por VERRIER et al., 1988) aderiu preferencialmente às superfícies hidrofóbicas. Além disso, resultados do mesmo trabalho indicaram que a espécie *Methanosarcina mazei* não esteve diretamente envolvida na aderência inicial de suportes em reatores de filme fixo, e como o acúmulo da biomassa foi mais rápido no polipropileno em relação ao PVC e quase não ocorreu na poliamida, os autores concluíram que as superfícies hidrofóbicas são mais vantajosas ao processo de aderência celular.

De acordo com os resultados obtidos nos experimento CP1 e CP2, todas as três espécies de *Archaeae* metanogênicas utilizadas estavam envolvidas na formação inicial do biofilme tanto em superfícies hidrofóbicas (polipropileno) quanto nas hidrofílicas

³⁸ KIENER, A.; LEISINGER, T. (1983) Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.4, p.305-312.

³⁹ HUSER, B.A.; WUHRMANN, K.; ZEHNDER, A.J.B. (1982) *Methanotrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non hydrogen oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, v. 132, p.1-9.

(vidro). Não houve uma espécie em particular considerada pioneira na colonização dos suportes. As três espécies aderiram ao mesmo tempo, ou seja, no biofilme com 2 dias foram encontradas as três espécies de *Archaeae* metanogênicas colonizando o suporte.

5.3 Experimentos com os lodos anaeróbios

5.3.1 Experimento LG1

No dia anterior ao início do experimento, a atmosfera do frasco-inóculo LG1 apresentou concentração de metano de 0,019 mmoles. Portanto, as células metanogênicas estava ativas e conseqüentemente aptas a serem testadas na colonização dos cupons de polipropileno.

A composição inicial do inóculo foi estimada baseada na amostragem das células presentes no frasco reservatório no tempo zero do experimento. O inóculo foi composto de 13,0% (E.P.= 1,0%, $n=11$) de células pertencentes ao Domínio *Bacteria* e 95,0% (E.P.=3,0%, $n=12$) de células pertencentes ao Domínio *Archaea*, detectadas com as sondas EUB338 e ARC915, respectivamente (Figura 5.18). A porcentagem de células detectadas com a sonda SRB385, específica para o grupo das bactérias redutoras de sulfato, mesofílicas, gram negativas, foi muito similar ao valor obtido com a sonda EUB338. Portanto, as células pertencentes ao Domínio *Bacteria* encontradas eram bactérias anaeróbias redutoras de sulfato (BRS). Entretanto, no biofilme amostrado no 11^o dia, não foram detectadas BRS com a sonda SRB385; apesar do número de células detectadas com EUB338 ter representado 11,0% (E.P.=2,0%, $n= 11$) do total de células coradas com DAPI. Nesse caso, a não detecção de BRS pode ter sido conseqüência da amostragem na soltura do biofilme, e não necessariamente, significou que as BRS desapareceram do biofilme, pois foram detectadas nos biofilmes até o 9^o dia. OUDE ELFERINK et al. (1998b) utilizando a técnica de hibridação com a sonda SRB385 estimaram que a proporção de BRS em um lodo anaeróbio proveniente de reator alimentado com sacarose na ausência de sulfato foi de 19 a 21%, e para um lodo presente em reator alimentado com ácidos graxos voláteis, também na ausência de sulfato, foi de 35 a 39%. Portanto, a proporção de 13,0% de BRS presentes no inóculo desse experimento, que não continha sulfato, e cujas células foram oriundas de lodo

granulado anaeróbio proveniente de reator UASB tratando esgoto sanitário, apresenta-se próxima da faixa de valores encontrados na literatura para lodos anaeróbios.

É importante ressaltar que a sonda SRB385 hibrida especificamente com BRS pertencentes aos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, e, com espécies de *Desulfobulbus*; porém não detecta a maioria das BRS pertencentes à família *Desulfobacteriaceae*, ao gênero *Desulfotomaculum* (bactérias gram-positivas formadoras de esporos) (RAMSING et al., 1996), *Desulfobacula*, *Desulfococcus* e, espécies de *Desulfonema* (RABUS et al., 1996). Portanto, a porcentagem de células hibridadas com a sonda SRB385 deve subestimar a quantidade real de BRS presente na comunidade. Não obstante, alguns trabalhos (RASKIN et al., 1996, OUDE ELFERINK et al., 1998b e SANTEGOEDS et al., 1999) verificaram que *Desulfobacter* (um dos membros da família *Desulfobacteriaceae*) não é importante para a degradação de acetato em reatores anaeróbios, pois bactérias pertencentes à esse gênero precisam de concentrações altas de cloreto de sódio e magnésio para se desenvolverem (RASKIN et al., 1996). Levando isso em consideração e mais a morfologia das células que hibridaram com a sonda SRB385, que eram semelhantes a *Desulfovibrio* sp., acredita-se que a porcentagem de BRS encontrada neste experimento esteve próxima da concentração real.

A presença de BRS em reatores anaeróbios durante a degradação da matéria orgânica é muito comum, uma vez que em conjunto com as *Archaea* metanogênicas, elas catalisam as etapas finais da degradação anaeróbia dos compostos orgânicos (RASKIN et al., 1996). Alguns trabalhos (RASKIN et al., 1996 e OUDE ELFERINK et al., 1998b) encontraram ampla população de BRS em reatores anaeróbios que não continham sulfato no afluente. RASKIN et al. (1996) verificaram que as principais BRS presentes em reatores com e sem sulfato eram pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* e *Desulfobacterium*. OUDE ELFERINK et al. (1998b) verificaram que *Desulfobulbus* sp. foi a bactéria redutora de sulfato gram-negativa predominante na maioria dos lodos estudados, e a *Desulfobacterium* sp. somente foi detectada em reatores que continham sulfato. Nesses estudos, a atividade das BRS pode estar relacionada à redução de prótons e à produção de acetato através da fermentação e, portanto, elas podem crescer

sintroficamente com as *Archaea* metanogênicas consumidoras de hidrogênio ou formiato. É sabido que *Desulfobulbus* sp. pode ser o organismo degradador de propionato dominante em biorreatores anaeróbios (HARMSEN et al., 1996b). Entretanto, na presença de sulfato, as BRS podem competir com as *Archaea* metanogênicas por substratos comuns, tais como hidrogênio ou formiato. No presente trabalho, já que o meio de cultura não continha sulfato, as BRS semelhantes à *Desulfovibrio* sp. presentes possivelmente agiram como acetogênicas ou redutoras de prótons. Neste caso, o sintrofismo entre as BRS e as *Archaea* metanogênicas prevaleceu. A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* sp. oxidam de forma incompleta compostos orgânicos tais como o lactato à acetato e CO₂ (MANUAL BERGEY, 1984).

A maioria das *Archaeae* metanogênicas presente no inóculo, cerca de 75,0% (E.P.=3,0%, *n*=9), foram membros da família *Methanobacteriaceae*, uma vez que hibridaram com a sonda MB1174 e apresentaram morfologia semelhante a *Methanobacterium* sp. Cerca de 1,0% (E.P.=1,0%, *n*=10) das *Archaeae* metanogênicas hibridaram com a sonda MSMX860, sendo que somente células semelhantes à *Methanosarcina* sp. foram observadas. Células de *Archaeae* metanogênicas semelhantes à *Methanococcus* sp. e *Methanospirillum* sp. não foram verificadas no inóculo ou nos biofilmes formados, uma vez que as hibridações com as sondas MC1109 e MG1200 específicas, respectivamente, para a família *Methanococcaceae* e ordem *Methanomicrobiales* foram negativas.

Com relação aos biofilmes, eles também foram predominantemente formados por *Archaea* metanogênicas hidrogenotróficas pertencentes à família *Methanobacteriaceae* e com morfologia semelhante à *Methanobacterium* sp. Conforme detectado pela sonda MB1174, a abundância relativa desse grupo variou de 76,0% (E.P.=3,0%, *n*=11) nos biofilmes formados após 2 dias de ensaio, até 86,0% (E.P.=3,0%, *n*=10) nos biofilmes formados após 11 dias (Figura 5.18). Com relação aos membros da família *Methanosarcinaceae* detectados com a sonda MSMX860, houve diminuição desta população ao longo da formação dos biofilmes. Nos biofilmes com 2 e 4 dias a proporção deste grupo foi de cerca de 4,0% (E.P.= 2,0%, *n*=10) do total de células

coradas com DAPI, depois diminuiu para 2,0% (E.P.= 1,0%, $n=10$) e 1,0% (E.P.= 1,0%, $n=11$) nos biofilmes com 9 e 11 dias de idade, respectivamente (Figura 5.18).

Uma possível explicação para este declínio seria a de que as células semelhantes à *Methanosarcina* sp. estariam situadas nas primeiras camadas do biofilme e no momento de promover a raspagem do mesmo durante a amostragem do biofilme suspenso nos tempos de 9 e 11 dias esta não teria sido totalmente eficiente e, portanto, só foram retiradas aquelas células de *Methanosarcina* sp. que estariam mais na parte externa do biofilme e não as da base. Ainda pode-se supor que após 4 dias de formação do biofilme tenha ocorrido soltura de algumas células de *Methanosarcina* sp. e, portanto, na amostragem dos biofilmes com idade superior detectou-se quantidade menor das mesmas. Células pertencentes ao Domínio *Bacteria*, detectadas com a sonda EUB338, estavam presentes nos biofilmes formados após 2 e 11 dias, nas proporções de 27,0% (E.P.= 3,0%, $n=10$) e 11,0% (E.P.=2,0%, $n= 11$) do total de células coradas com DAPI, respectivamente (Figura 5.18).

O princípio de “probe nesting” (RASKIN et al., 1994b) é demonstrado pelo uso combinado de várias sondas específicas e uma sonda geral. A soma das porcentagens obtidas com as sondas ARC915 (Domínio *Archaea*), EUK516 (Domínio *Eucarya*) e EUB338 (Domínio *Bacteria*) deve ser de 100%, já que todas as formas de vida conhecidas pertencem à um desses três Domínios (WOESE et al., 1990). Seguindo o mesmo raciocínio, a soma das porcentagens obtidas com as sondas para as metanogênicas: MB1174 (*Methanobacteriaceae*), MSMX860 (*Methanosarcinaceae*), MG1200 (*Methanomicrobiales*) e MC1109 (*Methanococcaceae*) deveria ser igual à porcentagem obtida com ARC915. Neste experimento, o princípio geral do “probe nesting” (soma de ARC915+EUB338 deve ser de 100%) foi razoavelmente alcançado nas amostras dos biofilmes com 9 e 11 dias de incubação (Figura 5.18). Entretanto, para as amostras do inóculo, e biofilmes formados após 2 e 4 dias de experimento, a soma foi maior que 100%. Possivelmente, a proporção de *Archaea* detectada com a sonda ARC915 pode ter sido superestimada no caso das amostras inóculo e biofilme com 2 dias de idade. Por algum artefato consequente da técnica, células que não apresentavam

seqüência de RNAr 16S complementar à seqüência da sonda ARC915 apresentaram ligação não-específica, emitindo sinal fluorescente com a mesma e, portanto, foram contadas.

FIGURA 5.18- Composição da comunidade microbiana presente no inóculo (células planctônicas) e nos biofilmes formados após 2, 4, 9 e 11 dias de experimento. Abundância relativa das células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915), ao grupo das BRS (SRB385), às famílias *Methanosarcinaceae* (MSMX860) e *Methanobacteriaceae* (MB1174), à soma dessas duas porcentagens (ARC915+EUB338). Os valores de abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células, em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro-padrão. Os valores das hibridações apresentados nesta Figura encontram-se descritos nos Anexos.

De acordo com busca realizada no banco de seqüências do RNAr 16S do “Ribossomal Database Project” (RDP) (MAIDAK et al., 2000) com o programa CHECK_PROBE, verificou-se que não existem organismos não-alvos para a sonda ARC915; ou seja, somente membros do Domínio *Archaea* apresentam a seqüência alvo complementar à esta sonda. Além disso, essa provável superestimativa da porcentagem de *Archaea* pode ser confirmada quando verifica-se que a soma das porcentagens

obtidas com as quatro sondas de metanogênicas (MB1174 + MSMX860 + MC1109 + MG1200), que compreendem todas as metanogênicas mesofílicas presentes em biorreatores anaeróbios (RASKIN et al., 1994b), para as duas amostras mencionadas anteriormente de inóculo e biofilme com 2 dias, foi menor em relação ao valor encontrado com ARC915. Considerando-se que as condições ambientais não favoreceram o crescimento de *Archaea* não-metanogênicas, tais como os halófilos extremos, termoacidófilos, os *Archaeoglobales*, os *Termococcales*, e os termófilos posicionados no Reino *Crenarchaeota*, a presença de outras células de *Archaea* que não as metanogênicas era improvável neste experimento, bem como no lodo granulado anaeróbio usado como inóculo. No caso da amostra do biofilme com 4 dias, como a soma das porcentagens obtidas com as 4 sondas de metanogênicas (91,0%) foi quase igual ao valor encontrado com a sonda ARC915 (93,0%), é provável que a porcentagem de *Archaea* esteja correta. Então, para essa amostra, o fato da soma dos valores encontrados com EUB338 e ARC915 ter sido maior que 100% pode ter sido em decorrência de uma superestimativa da proporção de células detectadas com a sonda EUB338, ou seja, pode ter ocorrido ligação não-específica com essa sonda.

Com relação às outras amostras de biofilmes com 9 e 11 dias, verificou-se que a soma das porcentagens obtidas com as 4 sondas de metanogênicas foi maior que o valor encontrado com a sonda ARC915. Neste caso pode ter havido superestimativa da proporção de células que apresentaram sinal com a sonda MB1174. Novamente, isso somente poderia ter ocorrido em consequência de algum problema metodológico, pois não existem organismos não-alvos para a sonda MB1174. Segundo busca realizada no “Ribosomal Database Project” (MAIDAK et al., 2000) com o programa CHECK_PROBE, somente organismos pertencentes à família *Methanobacteriaceae* apresentam sequência complementar a sonda. Portanto, a ligação não-específica entre organismos não-alvos e a sonda MB1174 poderia ter ocorrido em função da secagem indevida do tampão de hibridação ou do tampão de lavagem da sonda. Neste trabalho, a sonda EUK516 (específica para eucariotos) não foi usada, já que é sabido que células de eucariotos não são comuns ou podem estar presentes em baixíssimas concentrações em lodos granulados anaeróbios.

Observações microscópicas revelaram que o biofilme se iniciou através de aglomerados celulares que se encontravam distribuídos ao acaso ao longo da superfície do cupom. Os biofilmes desenvolvidos após 11 dias de experimento apresentaram espessura irregular, sendo verificadas áreas com somente uma camada de células, outras em que não haviam células e ainda, outras regiões nas quais a espessura do biofilme chegou a atingir de 7 a 9 μm , segundo observação ao microscópio confocal de varredura a laser (Figura 5.19). Os biofilmes foram predominantemente formados por *Archaea* metanogênicas hidrogenotróficas semelhantes à *Methanobacterium* sp., provavelmente não só porque esse grupo era o mais abundante do inóculo, mas também indicando que essas células estavam envolvidas na colonização inicial do suporte. Resultados obtidos por RASKIN et al. (1996) sugeriram que dentro do grupo das metanogênicas consumidoras de hidrogênio (ou formiato), membros da ordem *Methanobacteriales* apresentam vantagem competitiva sobre membros das ordens *Methanococcales* e *Methanomicrobiales* quando não há sulfato no meio e portanto, na ausência de redução de sulfato. Uma possível causa para esse padrão de competição é a diferença nos padrões cinéticos de utilização do hidrogênio (ou formiato) pelos diferentes grupos de metanogênicas. Portanto, a predominância de células semelhantes à *Methanobacterium* sp. no inóculo, e no lodo granulado anaeróbio pode ser explicada por esse padrão de competição, já que em ambos os casos o meio de cultura não continha sulfato.

FIGURA 5.19- Micrografia do biofilme formado após 11 dias de experimento sobre cupom de polipropileno. Amostra corada com DAPI e observada ao microscópio confocal de varredura a laser. A barra é igual a 10 μm .

5.3.2- Experimento LG2

No dia anterior ao início do experimento, a concentração de metano na atmosfera do frasco inóculo (frasco-mãe) estava em torno de 0,033 mmoles. Isso evidenciou que as *Archaeae* metanogênicas estavam ativas e, portanto, em condições de serem testadas na colonização dos suportes confeccionados de vidro e polipropileno. Após 12 horas do início do experimento, o reservatório de células apresentou produção de metano de 0,0023 mmoles. Após esse tempo a produção de metano do frasco reservatório não foi mais medida, pois quando notava-se que o meio estava ficando levemente oxidado, fluxionava-se $N_2:CO_2$ (70:30) a cada 2 ou 3 horas, na atmosfera desse frasco. Consequentemente, isso alterava a composição dos gases conforme anteriormente comentado.

A observação dos biofilmes em conjunto com a contagem das células aderidas sobre o suporte revelaram que após 14 dias de experimento o número de células aderidas por mm^2 de cupom era igual e/ou menor ao número de células aderidas no 1^o dia (Tabela 5.1), ou seja, não houve aumento no número de células aderidas ao longo do tempo experimental. Comparando-se os valores obtidos na Tabela 5.1 com aqueles observados no experimento CP2, no qual cerca de 200 a 270 células/ mm^2 de suporte, respectivamente de polipropileno e vidro, estavam presentes após 7 e 9 dias de ensaio, verifica-se que realmente não estava ocorrendo formação do biofilme no experimento LG2 ao longo do tempo de ensaio.

A provável causa para este fato foi relacionada a condições do inóculo no frasco reservatório, pois partículas sólidas derivadas de pedaços dos grânulos anaeróbios que foram macerados foram observadas. Neste experimento, após o 1^o dia, o MRD foi colocado na posição invertida ao usual, ou seja ao contrário da forma de operação do sistema (apresentada na Figura 4.2), a fim de evitar que as partículas sólidas presentes no frasco reservatório entrassem em contato com os cupons deixando, portanto, a superfície dos mesmos livre para ser colonizada. Não obstante, as células nessa situação tinham que vencer a força da gravidade para chegar até a superfície do suporte e devido a isso a colonização dos mesmos, e, conseqüentemente a formação dos biofilmes foi

prejudicada. Quando esse fato foi constatado, decidiu-se terminar o experimento e realizar outro. Desse modo o experimento seguinte, LG3, foi feito somente com células em suspensão e com o mínimo possível de material particulado no frasco reservatório.

TABELA 5.1- Número de células/mm² de cupom

Biofilme 1 ^o dia- polipropileno	Biofilme 3 ^o dia- polipropileno	Biofilme 3 ^o dia- vidro	Biofilme 7 ^o dia- vidro	Biofilme 14 ^o dia- polipropileno	Biofilme 14 ^o dia- vidro
15,0	11,0	7,1	10,5	13,9	7,1

É importante comentar ainda que o sistema experimental MRD em conjunto com o frasco reservatório de células, se constitui num dispositivo de grande valia para pesquisas na área de biofilmes e aderência celular. O MRD permite com que os biofilmes sejam amostrados de forma não-destrutiva, ou seja, eles são retirados do sistema intactos, não sendo removidos da superfície, e podem ser analisados diretamente sob microscopia de fluorescência ou confocal de varredura a laser. Não obstante, a aderência das células sobre a superfície dos cupons fixados na base dos parafusos depende unicamente da existência de contato entre a célula e o suporte. A ocorrência de material particulado, no meio líquido circundante no MRD, que pode se depositar sobre os suportes e impedir esse contato, é prejudicial para o estudo. Por esse motivo, os lodos granulados anaeróbios utilizados na presente tese foram macerados para que se pudesse obter um maior número de células livres e não mais associadas na forma de grânulos. Posteriormente estas células foram cultivadas nos frascos-mãe e subcultivadas nos frascos-inóculo de modo a tentar recuperar somente a fração líquida contendo as células em suspensão. Ainda assim, conforme comentado anteriormente, no experimento LG2 o frasco reservatório apresentava células em suspensão e um pouco de material particulado que foi o suficiente para impedir a continuação do ensaio.

De acordo com a literatura consultada, o MRD sempre foi utilizado com culturas em suspensão e aeróbias. Este trabalho se constitui no primeiro exemplo do uso do MRD para a formação de biofilmes anaeróbios. Portanto, os procedimentos realizados e as

dificuldades encontradas com relação à obtenção do inóculo anaeróbio adequado (como macerar o lodo granulado, filtrá-lo depois de macerado, etc), manutenção das condições de anaerobiose no MRD e no frasco reservatório foram baseados no bom senso e em experiência prévia da autora com a manipulação do MRD.

5.3.3- Experimento LG3

No dia anterior ao início do experimento, a concentração de metano na atmosfera do frasco inóculo foi de 0,031 mmoles e, no frasco reservatório, após algumas horas do início do experimento, foi de 0,002 mmoles. A presença de metano demonstra que as *Archaeae* metanogênicas estavam ativas e, portanto, aptas para serem testadas na colonização dos suportes confeccionados de vidro e polipropileno.

A caracterização filogenética realizada com o FISH permitiu verificar que o inóculo formado pelas células planctônicas do frasco reservatório, amostrado no tempo zero, foi composto por 3,0% (E.P.=1,0%, $n=13$) de células pertencentes ao Domínio *Bacteria* e 95,0% (E.P.=7,9%, $n=12$) de células pertencentes ao Domínio *Archaea*, conforme detectado com as sondas EUB338 e ARC915, respectivamente (Figura 5.20). A proporção de células de *Bacteria* detectadas com a sonda EUB338 variou durante o experimento de 3,0% (E.P.=1,0%, $n=13$) na fase inicial para 17,0% (E.P.=2,0%, $n=15$) no 9^o dia, e estabilizou em torno desse valor até o final do experimento, no 22^o dia. Dentre as *Archaea*, cerca de 44 a 78,0% do total de células coradas com DAPI, eram metanogênicas hidrogenotróficas, membros da família *Methanobacteriaceae* detectadas com a sonda MB1174 e apresentavam morfologia semelhante à *Methanobacterium* sp. e *Methanobrevibacter* sp. (Figura 5.21). As outras *Archaea* metanogênicas foram pertencentes à ordem *Methanomicrobiales*, detectadas com a sonda MG1200, e apresentavam morfologia semelhante à *Methanospirillum* sp., que também são metanogênicas hidrogenotróficas. Esse grupo estava presente nas proporções de 10,4% (E.P.=2,0%, $n=12$) no início do experimento e de 3,0% (E.P.=1,1%, $n=11$) no 22^o dia. Não houve hibridação de células com a sonda MSMX860, específica para *Methanosarcinaceae*, apesar de poquíssimas células semelhantes à *Methanosaeta* sp.

terem sido observadas no frasco reservatório. Portanto, estas células estavam presentes mas em número inferior ao limite de detecção do FISH, que é de 10^4 células/mL (AMANN et al., 1995). Células semelhantes à *Methanococcus* sp. não estavam presentes no frasco reservatório, já que a hibridação com a sonda MC1109, específica para a família *Methanococcaceae*, foi negativa e, portanto, não é apresentada na Figura 5.20.

A porcentagem de células detectadas com a sonda SRB385, específica para as bactérias redutoras de sulfato, mesofílicas, gram-negativas, não variou significativamente ao longo do experimento. A proporção de BRS em relação ao total de células coradas com DAPI foi de 5,0% (E.P.=1,0%, $n=10$) no início do experimento e de 3,0% (E.P.=1,0%, $n=11$) no 22^o dia. As bactérias que apresentaram sinal com a sonda SRB385 tinham morfologia de vibriões e bacilos espessos com 2,8 a 4,0 μm de comprimento e 0,8 a 1,0 μm de largura (Figura 5.22). Algumas células desses bacilos apresentaram esporos na posição terminal e subterminal, assemelhando-se à *Desulfotomaculum* sp. Entretanto, a sonda SRB385 não detecta membros do gênero *Desulfotomaculum* sp. (BRS formadoras de esporos pertencentes ao grupo gram-positivo, com baixo conteúdo de GC), *Desulfobacula*, *Desulfococcus*, espécies de *Desulfonema* e a maioria dos membros da família *Desulfobacteriaceae* (RAMSING et al., 1996; RABUS et al., 1996). As outras bactérias formadoras de esporos com morfologia de bacilos são membros dos gêneros *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp. Este último, não contém a sequência alvo complementar à sonda SRB385. Não obstante, ao realizar busca no banco de sequências de RNAr 16S do “Ribosomal Database Project” (MAIDAK et al., 2000) com o programa CHECK_PROBE verificou-se que várias bactérias que não são BRS apresentam a sequência alvo para essa sonda [como por exemplo, *Bilophila wadsworthia*, *Cytophaga* sp. str. BD3-8, *Nitrospira marina*, *Nitrospira moscoviensis*, *Magnetobacterium bavaricum*, *Flexistipes sinusarabici*, *Leptospira parva*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophomonas* MGB-C1 str. MGB-C1, *Caldicellulosiruptor owensensis*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, 14 membros do gênero

Thermoanaerobacter, *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*, *Anaerocellum thermophilum*, *Thermobrachium celer*, *Caloramator indicus*, *Caloramator proteolyticus*, *Caloramator fervidus*, myxobacteria (dos gêneros *Chondromyces* e *Polyangium*), bdellovibrios, actinomicetos (dos gêneros *Frankya* e *Actinopolyspora*), e espécies de *Clostridium*] e mais de 1500 espécies apresentam somente 1 nucleotídeo trocado na sequência alvo. Muitas dessas bactérias são anaeróbias (como por exemplo, *Clostridium* sp., *Pelobacter* sp., *Geobacter* sp.), as quais habitam os mesmos ecossistemas que as bactérias redutoras de sulfato (MANZ et al., 1998). Entretanto, outras, como por exemplo, *Caloramator fervidus*, *Clostridium stercorearium*, *Clostridium thermolacticum* e as espécies de *Thermoanaerobacter* ocorrem em áreas vulcânicas, solos com altas temperaturas, e em fezes de gado (BALLOWS et al., 1992). Grupos de mixobacteria colonizam excrementos de herbívoros, a casca e as raízes de plantas (BALLOWS et al., 1992) e não são comuns em lodos anaeróbios. O gênero *Frankya* spp. é fixador obrigatório de nitrogênio, endossimbiontes de raízes (BALLOWS et al., 1992). Portanto, as células com morfologia de bacilos espessos, com esporo na posição terminal, observadas nas amostras do frasco reservatório foram consideradas falsos-positivos para a sonda SRB385, ou seja, hibridaram com a sonda, mas não eram bactérias redutoras de sulfato. Por essa razão, a porcentagem de falsos-positivos foi subtraída da porcentagem de células hibridadas especificamente com a sonda SRB385. As porcentagens apresentadas nas Figuras 5.20, 5.24 e 5.25, para a sonda SRB385 só contém células verdadeiras, ou seja, que realmente são BRS.

A porcentagem de BRS foi bem menor em relação ao valor de células pertencentes ao Domínio *Bacteria* detectadas com a sonda EUB338, portanto, entre as células de *Bacteria* presentes no frasco reservatório existiram outros grupos filogenéticos além das BRS. Os bacilos espessos que apresentaram esporos na posição terminal hibridaram com EUB338 (Figura 5.23). Portanto, pertencem ao Domínio *Bacteria* e podem ser membros do gênero *Clostridium*, já que este inclui as espécies formadoras de esporos. Vale salientar que dentre várias espécies de *Clostridium*, *Clostridium aceticum* é reconhecidamente uma bactéria homoacetogênica (forma acetato

a partir de H_2 e CO_2) e foi isolada de lodo de esgoto (OHWAKI & HUNGATE⁴⁰ apud NOVAES, 1986).

Em estudo recente, IMACHI et al. (2000) isolaram uma bactéria gram-negativa, termofílica, sintrófica oxidadora de propionato que formava esporos quando crescidas em meio com propionato e em cultura tripla com *M. thermoautotrophicum* ΔH e *Methanosaeta thermophila*. As células apresentavam morfologia de bacilos espessos com 1,7 a 2,8 μm de comprimento e 0,7 a 0,8 μm de largura. Embora estivessem proximamente relacionados com membros do gênero *Desulfotomaculum*, baseado na comparação de seqüências do RNAr 16S, eles não utilizavam sulfato como aceptor final de elétrons na presença de etanol, lactato ou propionato.

Neste experimento, o princípio geral do “probe nesting” (RASKIN et al., 1994b), de que a soma das porcentagens de ARC915 + EUB338 deve ser igual a 100%, foi razoavelmente obtido para as amostras do frasco reservatório, com exceção daquelas no 9^o e 22^o dia. Para essas duas amostras, a soma foi menor que 100% (Figura 5.20). Neste caso pode ter havido subestimativa da população de *Archaea*, já que para as demais amostras a proporção de células detectadas com a sonda ARC915 representou cerca de 80 a 90% do total de células coradas com DAPI. Além disso, pode-se verificar que a soma das porcentagens obtidas com as quatro sondas específicas para as metanogênicas (MB1174+MSMX860+MC1109+MG1200), foi quase igual ao valor obtido com a sonda ARC915 para todas as amostras do frasco reservatório, exceto para aquela do 22^o dia (Figura 5.20). Assim, a porcentagem de células detectadas com MB1174 (77,6%) foi maior que a porcentagem obtida com ARC915 (48,3%), ou seja, algumas células apresentaram sinal com MB1174, mas não o fizeram com ARC915. Talvez isso tenha ocorrido porque algumas *Archaea* metanogênicas, com morfologia semelhante a *Methanobacterium* sp., apresentaram sinal fluorescente muito fraco quando hibridadas separadamente com ARC915 e com MB1174 e, às vezes, nem puderam ser contadas. Então, para tentar melhorar a intensidade do sinal fluorescente e eliminar a possibilidade

⁴⁰ OHWAKI, K.; HUNGATE, R.E. (1977). Hydrogen utilization by clostridia in sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.33, p. 1270-1274 apud NOVAES, R.F.V. (1986) Microbiology of anaerobic digestion, *Wat. Sci Tech.*, v.18, p. 1-14

de estar ocorrendo problemas com disponibilidade da sequência alvo, foram feitas hibridações duplas usando simultaneamente na mesma amostra as sondas, MB1174 (primeiro) e ARC915 (segundo). Portanto, todos os membros da família *Methanobacteriaceae* detectados com MB1174 foram contados. Mas para as células de *Archaea* hibridadas somente com uma única sonda (ARC915), a intensidade do sinal fluorescente não foi aumentada. Portanto, é provável que a proporção de células de *Archaea* presentes no frasco reservatório no 22^o dia seja igual ao valor determinado com a sonda MB1174 (77,6%, E.P.=8,7%, $n= 3$), e não ao valor encontrado com a sonda ARC915 (48,3%, E.P.=6,9%, $n= 10$).

FIGURA 5.20- Composição da comunidade microbiana presente no frasco reservatório (células planctônicas) ao longo do tempo experimental. Abundância relativa das células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338), à ordem *Methanomicrobiales* (MG1200) à família *Methanobacteriaceae* (MB1174), ao grupo das BRS (SRB385), e aos dois Domínios (ARC915+EUB338). Os valores de abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células, em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro-padrão. Os valores das hibridações apresentados nesta Figura encontram-se nos Anexos.

FIGURA 5.21- Micrografia de contraste de fase (lado esquerdo) e fluorescência (lado direito), do mesmo campo microscópico, das células presentes no frasco reservatório no 16^o dia de experimento. As células apresentando autofluorescência devido ao fator F₄₂₀ indicam serem *Archaea* metanogênicas. A barra é igual a 5 µm.

FIGURA 5.22- Micrografia de fluorescência das células planctônicas provenientes do frasco reservatório amostradas no 9^o dia. As células foram coradas com DAPI. Os bacilos espessos com esporo na posição terminal podem ser observados no canto superior esquerdo (indicados com a seta). A barra é igual a 5 µm.

FIGURA 5.23- Micrografia de fluorescência das células do frasco reservatório no 9^o dia de experimento. Lado esquerdo: Coloração com DAPI. Lado direito: FISH com a sonda EUB338 específica para Domínio *Bacteria* (mesmo campo microscópico). Os bacilos espessos, sendo que um deles apresentou esporo na posição terminal (indicado pela seta), hibridaram positivamente com EUB338.

Com relação à caracterização da comunidade microbiana presente nos biofilmes, verificou-se que eles também foram predominantemente formados por *Archaeae* metanogênicas hidrogenotróficas (Figura 5.24 e 5.25). Dentre a população de *Archaea*, células semelhantes à *Methanobacterium* sp. e *Methanobrevibacter* sp., detectadas com a sonda MB1174, predominaram em todos os biofilmes amostrados nos diferentes tempos. A abundância relativa desse grupo variou de 43,0% (E.P.=3,7%, $n=15$) no biofilme formado sobre o cupom de vidro após 6 dias de experimento (Figura 5.25), a 89,6% (E.P.=9,9%, $n=11$) do total de células coradas com DAPI no biofilme formado sobre o cupom de polipropileno no 22^o dia (Figura 5.24). Não ocorreu hibridação com a sonda MSMX860 específica para *Methanosarcinaceae*, apesar de pouquíssimas células semelhantes à *Methanosaeta* sp. terem sido observadas nos biofilmes. Portanto, estas células estavam presentes, mas em número inferior ao limite de detecção do FISH. Outra fração pequena da população de *Archaea*, cerca de 0,3%(E.P.=0,2%, $n=8$) à 2,2% (E.P.=0,7%, $n=10$), foi detectada com a sonda MG1200, específica para a ordem *Methanomicrobiales*, e era composta de células semelhantes à *Methanospirillum* sp.

A porcentagem de células pertencentes ao Domínio *Bacteria*, detectadas com a sonda EUB338, apresentou variação significativa ao longo do experimento. O biofilme formado após o 1^o dia sobre o cupom de polipropileno era composto por 19,0% (E.P.=1,4%, $n=20$) de células de *Bacteria*, enquanto que no biofilme formado sobre o vidro foram detectadas somente 3,2% (E.P.=0,8%, $n=16$). Esses valores foram determinados hibridando os biofilmes intactos sobre o cupom (Figura 5.26). Os biofilmes formados após 5 e 6 dias de experimento, respectivamente nos cupons de polipropileno e vidro, apresentaram as maiores proporções de células de *Bacteria*, 16,0% (E.P.=2,0%, $n=9$) e 14,5% (E.P.=3,0%, $n=9$) do total de células coradas com DAPI, em relação às outras amostras de biofilmes (Figuras 5.24 e 5.25).

Dentre a porcentagem de células de *Bacteria*, as bactérias redutoras de sulfato detectadas com a sonda SRB385 corresponderam a fração pequena nos biofilmes, que

variou de 4,0% biofilme formado após 6 dias sobre o vidro a 1,0% do total de células coradas com DAPI no biofilme formado após 22 dias sobre o polipropileno.

Exames microscópicos, sob microscopia confocal de varredura a laser (CSLM), da amostra do biofilme no 5^o dia formado sobre o cupom de polipropileno e hibridado com a sonda EUB338 revelaram que as células de *Bacteria* (coradas de vermelho) estavam localizadas ao longo de toda espessura do biofilme, que neste caso era de 2,8 μm , como pode ser observado na Figura 5.27. Ainda, nesta figura, pode-se notar que o biofilme não formou uma camada compacta de células que cobria toda a superfície, pois é evidente a presença de áreas vazias, como se fossem poros ou canais de água no biofilme.

Os biofilmes intactos formados sobre os cupons de polipropileno foram hibridados com as sondas EUB338, ARC915, SRB385 e MB1174 e posteriormente analisados no CSLM. Entretanto, exceto para a sonda EUB338 cujo resultado foi apresentado anteriormente (Figura 5.27), para as outras sondas não foram obtidos resultados, ou seja, o biofilme inteiro corou com a sonda não sendo possível fazer a distinção entre sinal específico e não-específico. Em aglomerados celulares com grande quantidade de material polimérico pode ocorrer a ligação da parte fluorescente da sonda, ou seja, somente o fluorocromo fica retido nos aglomerados corando não especificamente os mesmos. Fato semelhante também pode ocorrer em amostras de solo (AMANN et al., 1990b). Provavelmente essa é a explicação para o que ocorreu com os biofilmes intactos hibridados com as sondas SRB385, ARC915 e MB1174.

FIGURA 5.24- Composição da comunidade microbiana presente nos biofilmes formados sobre os cupons de polipropileno após 5, 9, 15 e 22 dias de experimento. Abundância relativa das células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338), à ordem *Methanomicrobiales* (MG1200), à família *Methanobacteriaceae* (MB1174), ao grupo das BRS (SRB385) e aos dois Domínios (ARC915+EUB338). Os valores de abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células, em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro-padrão. Os valores das hibridações apresentados nesta Figura encontram-se descritos nos Anexos.

FIGURA 5.25- Composição da comunidade microbiana presente nos biofilmes formados sobre os cupons de vidro após 6 e 9 dias de experimento. Abundância relativa das células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338), à ordem *Methanomicrobiales* (MG1200), à família *Methanobacteriaceae* (MB1174), ao grupo das BRS (SRB385) e aos dois Domínios (ARC915+EUB338). Os valores de abundância relativa indicam a porcentagem de um grupo específico de células, em relação à população total corada com DAPI. As barras indicam o erro-padrão. Os valores das hibridações apresentados nesta Figura encontram-se descritos nos Anexos.

FIGURA 5.26 –Micrografia de fluorescência do biofilme intacto formado sobre o cupom de polipropileno após o 1^o dia de experimento. Lado esquerdo: Coloração com DAPI. Lado direito: FISH realizado com a sonda EUB338 específica para o Domínio *Bacteria* (mesmo campo microscópico). A barra indica 5 µm.

FIGURA 5.27 (Figura na página seguinte) - Micrografia do biofilme no 5^o dia hibridado com a sonda EUB338 (específica para o Domínio *Bacteria*) e observado ao microscópio confocal de varredura a laser. A imagem mostra uma sequência, no eixo z, de planos transversais através do biofilme. O intervalo entre cada plano é de 0,1872 µm. Nessa série, a primeira imagem (0 µm) corresponde à extremidade do biofilme e a última imagem (2,808 µm), à base do biofilme (a primeira camada de células aderidas sobre a superfície do cupom de polipropileno). As células coradas de vermelho, que hibridaram com a sonda EUB338, são membros do Domínio *Bacteria*; as restantes, que coraram de azul (com o DAPI) são *Archaeae* metanogênicas (de acordo com os resultados apresentados na Figura 5.24).

Segundo DAIMS et al. (1999), a sonda EUB338 não detecta todas os microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria*. De acordo com recentes reavaliações desta sonda comparando a sequência da mesma com todas as sequências de RNAr 16S disponíveis nos bancos de dados, verificaram que membros dos filos *Planctomycetales* e *Verrucomicrobia*, bem como várias espécies de bactérias verdes não-sulfurosas (“green non-sulfur bacteria”) e membros do filo candidato OP11 não são detectados por esta sonda (DAIMS et al., 1999). Assim sendo, esses autores desenharam e testaram duas novas versões da sonda EUB338, chamadas de EUB338-II e EUB338-III. Ambas são específicas para os organismos daqueles filos, mencionados anteriormente, que não são detectados com EUB338. Em uma amostra de biofilme proveniente de um sistema de tratamento de águas residuárias, cerca de 68-90% do total de células coradas com DAPI foram detectadas com a sonda EUB338 (STOFFELS et al., 1998). Portanto, os 10% restantes, que não foram detectados, poderiam ser membros dos filos *Planctomycetales* e/ou *Verrucomicrobia* neste lodo específico ou, poderiam ser membros do Domínio *Archaea*, já que a sonda ARC915 não foi utilizada. Em outra amostra de biofilme proveniente de um sistema de tratamento de esgoto, DAIMS et al. (1999) verificaram que todas as células coradas com DAPI foram detectadas pela hibridação *in situ* quando se utilizou em conjunto as três sondas de EUB338 (EUB338, EUB338-II, EUB338-III).

Com relação à soma das porcentagens obtidas com as sondas ARC915 e EUB338, verificou-se que para as amostras do frasco reservatório no 9^o e 22^o dia, bem como para a amostra do biofilme após 6 dias esse valor foi inferior a 100%, ou seja, a porcentagem das células hibridadas com as duas sondas foi de 72,0, 84,0 e 62,7%, respectivamente (Figuras 5.20 e 5.25). Portanto, pode-se inferir que a porcentagem de células de *Bacteria* tenha sido subestimada já que a sonda EUB338 não detecta todas as células pertencentes a este Domínio (DAIMS et al., 1999). Assim sendo, membros dos filos *Planctomycetales* e *Verrucomicrobia* estariam presentes nas proporções de 16 à 37% do total de células coradas com DAPI. Não obstante, para todas as outras amostras do frasco reservatório bem como dos biofilmes, a soma das porcentagens obtidas com as sondas EUB338 e ARC915 foi igual ou maior que 100%. Desse modo, se bactérias

pertencentes àqueles dois filos não estavam presentes no inóculo e nem após 24 horas de experimento, é improvável que elas estivessem presentes no 9^o dia. Além disso, elas não poderiam estar presentes somente em uma única amostra do biofilme (biofilme no 6^o dia formado sobre o vidro). Portanto, acredita-se ser improvável que membros desses filos estivessem presentes neste experimento. Nesse sentido, o que provavelmente ocorreu nessas 3 amostras foi que a porcentagem de *Archaea* deve ter sido subestimada pelo fato de que nem todas as células metanogênicas estavam ativas e portanto, cerca de 16 a 37% não hibridaram com a sonda, uma vez que a técnica de FISH favorece a detecção de células metabolicamente ativas, com grande conteúdo de RNAr.

É importante mencionar ainda, que todas as espécies já descritas de *Planctomycetales* são bactérias de água doce ou marinhas (HIRSCH & MÜLLER, 1985; SCHLESNER, 1986) mas membros deste filo já foram detectados em lodos ativados (BOND et al., 1995; SNAIDR et al., 1997; NEEF et al., 1998) e em ambientes terrestres (LIESACK & STACKEBRANDT, 1992; ZARDA et al., 1997). Os membros do filo *Verrucomicrobia* ocorrem em ambientes aquáticos (STALEY et al., 1976; SCHLESNER, 1987; HIRNS et al., 1997; ZWART et al., 1998), nos sedimentos (WISE et al., 1997) e também em solos (LIESACK & STACKEBRANDT, 1992; JANSSEN et al., 1997; FELSKE et al., 1998).

5.3.3.1 Formação dos biofilmes em superfícies de vidro e polipropileno

Não foram verificadas diferenças significativas entre os cupons de vidro e polipropileno no que se refere à colonização dessas superfícies pelas células e posterior formação dos biofilmes, conforme apresentado na Tabela 5.2. A média do número de células por mm² de cupom não diferiu muito. Após 5 dias de experimento, observou-se cerca de $7,1 \times 10^2$ células por mm² de cupom de vidro e $9,9 \times 10^2$ células por mm² de cupom de polipropileno. Após 9 dias, verificou-se cerca de $6,3 \times 10^2$ células por mm² de cupom de vidro e $7,2 \times 10^2$ células por mm² de cupom de polipropileno. Entretanto, após o 1^o dia, um maior número de células $4,6 \times 10^2$ células por mm², foi observado colonizando a superfície de polipropileno em relação ao vidro, apenas 8,2 células por

mm², além de, no polipropileno, as células praticamente terem coberto toda a superfície do cupom. Ainda assim, não se pode afirmar que o polipropileno seja um material melhor no que se refere à formação do biofilme quando comparado com o vidro, pois outras características, como qualidade e composição química específica dos materiais suportes, rugosidade da superfície, bem como composição do meio de cultura (concentração de íons, que formará o filme condicionante sobre a superfície) e operação do sistema podem influenciar a aderência das células aos suportes.

Ainda, de acordo com os resultados da Tabela 5.2, nos primeiros 9 dias de experimento o número de células dos biofilmes formados sobre o vidro aumentou cerca de 77 vezes e no polipropileno, cerca de 16 vezes. Portanto, verifica-se que o vidro, superfície hidrofílica, foi colonizado mais rapidamente quando comparado com o polipropileno, superfície hidrofóbica, nas condições deste ensaio. Nos últimos 8 dias do ensaio (do 14^o ao 22^o dia), o número de células somente duplicou nos biofilmes formados sobre o polipropileno (não foram obtidos esses dados para os cupons de vidro). Isto pode indicar que a formação do biofilme sobre os cupons de polipropileno estava começando a se estabilizar após 9 dias de experimento, apesar de que até o 22^o dia mais células ainda se aderiram sobre os cupons. Resultados similares foram encontrados no experimento CP2, no qual o número de células/mm² de cupom não diferiu muito do 7^o para o 9^o dia de ensaio. Portanto, acredita-se que o tempo de duração dos ensaios realizados neste trabalho, que variou de 9 a 22 dias, foi adequado para o estudo de aderência das células e formação dos biofilmes anaeróbios.

Esses resultados contrariam observações feitas anteriormente por outros autores. VERRIER et al. (1988) verificaram em experimentos contínuos e com testes de aderência (colocando as superfícies diretamente num becker e analisando o número de células aderidas após 2 h) com culturas puras de metanogênicas alimentadas com meio complexo, que a colonização de superfícies hidrofóbicas, como o polipropileno e o polietileno foi muito mais rápida em relação às superfícies mais hidrofílicas como o PVC e poliacetal. Não obstante, os autores (opt.cit.) salientaram que vários parâmetros como por exemplo, rugosidade e porosidade do material usado, composição mineral do

substrato, disponibilidade de cátions no meio, taxa de carregamento orgânico, forças de cisalhamento, entre outras, podem influenciar na formação inicial do biofilme.

Comparando-se o número de células/mm² de cupom presentes nos experimentos CP2 e LG3, verifica-se que após 9 dias de ensaio maior número de células foi observado sobre os cupons do experimento LG3. Os valores foram cerca de 2 e 3,6 vezes maior para os cupons de vidro e polipropileno, respectivamente. Como as condições experimentais como vazão (9,6 mL/minuto), tempo de permanência das células no MRD (13 minutos), meio de cultivo Zinder, suportes estudados, temperatura (33°C), foram iguais para os dois experimentos supõe-se que tal fato seja consequência da concentração celular utilizada para cada um dos ensaios. No ensaio CP2 a concentração celular inicial foi de $2,7 \times 10^7$ células/mL e no LG3, foi de $4,6 \times 10^8$ células/mL. Além disso, deve-se levar em consideração que o experimento CP2 foi realizado com culturas puras de *Archaeae* metanogênicas enquanto que o LG3 continha células anaeróbias oriundas de lodo granulado, portanto, um inóculo “selvagem”. Geralmente as culturas puras de laboratório são mais suscetíveis às condições ambientais e, portanto, são competidoras menos eficientes quando comparas com as culturas “selvagens”, oriundas do próprio ambiente.

Tabela 5.2- Número de células/mm² de cupom

Tempo	Número de células/mm ² de cupom de vidro	Número de células/mm ² de cupom de polipropileno
1 ^o dia	8,2 (DP=5,0)	$4,6 \times 10^*$
5 ^o dia	$7,1 \times 10$ (DP=6,0 x 10)	$9,9 \times 10$ (DP=8,0 x 10)
9 ^o dia	$6,3 \times 10^2$ (DP= $4,2 \times 10^2$)	$7,2 \times 10^2$ (DP=9,2 x 10)
14 ^o dia	ND	$1,4 \times 10^3$ (DP=1,3 x 10 ²)
22 ^o dia	ND	$3,0 \times 10^3$ (DP=3,0 x 10 ²)

ND- não determinado; *valor obtido de um único cupom. DP, é o desvio-padrão.

Observações microscópicas revelaram que o biofilme se iniciou como aglomerados de células distribuídos ao acaso ao longo da superfície do cupom, como exemplo observar a Figura 5.28. Conforme apresentado na Figura 5.29, o biofilme com

14 dias de idade formado sobre o cupom de polipropileno apresentou espessura irregular com áreas com nenhuma cobertura celular, constituídas por poros e cavidades, e outras em que a espessura do biofilme atingiu cerca de 4,0 a 5,0 μm , conforme observação sob microscopia confocal de varredura a laser. Os biofilmes desenvolvidos após 9 dias apresentaram espessura de 7,0 a 15,0 μm , e aqueles com 22 dias de idade apresentaram a maior espessura, igual a 22,0 μm . Porém, outras regiões do biofilme com 22 dias apresentaram espessura de 7,0 μm . Os biofilmes foram formados predominantemente por metanogênicas hidrogenotróficas semelhantes à *Methanobacterium* sp. e *Methanobrevibacter* sp. (ambas detectadas com a sonda MB1174).

No trabalho de AMANN et al. (1992), os autores estudaram a presença de BRS em biofilmes anaeróbios multi-espécies formados sobre lâminas de vidro. Verificaram que o biofilme formado após 3 semanas era constituído por várias camadas de células com espessura de 5 a 10 μm . Portanto, o tamanho alcançado pelos biofilmes desenvolvidos neste experimento, 22,0 μm de espessura após 22 dias de ensaio, e no experimento LG1 (7,0 a 9,0 μm após 11 dias), encontram-se dentro dos valores descritos na literatura para biofilmes anaeróbios. Não obstante, é importante mencionar que os biofilmes passaram por etapas de desidratação, que fazem parte do protocolo de hibridação *in situ*, antes da observação sob microscopia confocal de varredura a laser. Portanto, os valores de espessura encontrados podem ter sido subestimados já que a desidratação provoca o colapso do biofilme. MOLLER et al. (1996), verificaram que a espessura de um biofilme completamente hidratado foi cerca de 6 a 7 vezes maior em relação à espessura observada nesse mesmo biofilme após a desidratação.

No caso de biofilmes aeróbios, como a velocidade de crescimento das células é muito maior em relação às anaeróbias, os biofilmes crescem muito mais rápido. POWER et al. (1999) verificaram que após 4 dias de experimento os biofilmes formados apresentavam espessura desigual com áreas nas quais a camada celular era mínima e outras, em que o biofilme atingiu 500 μm . No trabalho de RUSESKA et al. (1982) com o “robbins device” para o desenvolvimento de biofilmes e testes com biocidas,

verificou-se que após 41 dias de experimento o biofilme formado podia ser visto a “olho nu” como se fosse uma película fina de limo.

O uso do microscópio confocal de varredura a laser para a observação de biofilmes foi descrito anteriormente em outros trabalhos (CALDEIRA et al., 1999; CALDWELL 1992a; CALDWELL 1992b, COSTERTON et al., 1995, KORBER et al., 1994, LAWRENCE 1991, MASSOL-DEYA et al., 1995, MOLLER et al., 1996; STOODLEY et al., 1996). A microscopia confocal de varredura a laser se constitui num método não-destrutivo, ou seja, preserva a integridade da amostra e fornece informações detalhadas a respeito da organização estrutural dos biofilmes, bem como permite a quantificação de seus constituintes (CALDWELL 1992; MASSOL-DEYA et al., 1995; MOLLER et al., 1996).

Estudos anteriores (KORBER et al., 1994; DE BEER et al., 1994, COSTERTON et al., 1994, LAWRENCE et al., 1991), demonstraram que a maioria dos biofilmes bacterianos é composta por microcolônias de células imersas em uma matriz densa de exopolissacarídeos intermediadas por canais de águas. Tais observações levaram a elaboração do modelo conceitual de biofilmes chamado: modelo penetrado por canais (“water channel model”) (DE BEER et al., 1994; COSTERTON et al., 1994). De acordo com WIMPENNY & COLASANTI (1997), este modelo de estrutura de biofilmes, bem como os outros dois modelos conceituais mencionados pelos autores, devem estar relacionados com a concentração prevalescente de substrato no ambiente. Locais com alta concentração de recursos permitiriam o desenvolvimento de biofilmes densos. Por outro lado, na presença de baixas concentrações de nutrientes, as células formariam aglomerados com algumas áreas vazias entre elas (WIMPENNY & COLASANTI, 1997).

Observações sob microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes anaeróbios desenvolvidos neste experimento revelaram que eles apresentavam espessura irregular, eram heterogêneos ou seja, não eram compactos, e apresentaram áreas vazias semelhantes a poros como pode ser verificado nas Figuras 5.27 e 5.29.

A existência de um sistema intrincado de canais em biofilmes anaeróbios foi demonstrado previamente através de observações microscópicas sob microscopia

eletrônica utilizando cortes (transversais) ultra-finos dos biofilmes (ROBINSON et al., 1984). Biofilmes metanogênicos produzem grande quantidade de gás, o que pode ter causado a estrutura do tipo esponja (porosa) (DE BEER et al., 1994). Biofilmes desenvolvidos em partículas de carvão ativado revelaram que o biofilme maduro possuía uma rede de canais formada por longos espaços vazios ou preenchidos com estruturas poliméricas. A espessura total do biofilme na superfície de carvão ativado foi de aproximadamente 20 μm (CALDEIRA et al., 1999). Os canais e poros presentes nos biofilmes devem facilitar o transporte de nutrientes entre o meio líquido circundante e as camadas mais internas (DE BEER et al., 1994; LAWRENCE et al., 1994).

Nas Figuras 5.30 e 5.31 apresentam-se micrografias de contraste de fase dos biofilmes formados sobre cupons de polipropileno e vidro após 1 e 7 dias de experimento, respectivamente. Verifica-se em ambos os suportes uma região de coloração azul no meio das células. Esta coloração indica a presença de polímeros extracelulares ácidos. Portanto, demonstra-se a presença de polímeros extracelulares na formação dos biofilmes anaeróbios tanto no suporte hidrofóbico (polipropileno) quanto no suporte hidrofílico (vidro). Segundo COSTERTON et al. (1995), os polímeros extracelulares produzidos pelos biofilmes ligam as bactérias entre si e portanto, favorecem os processos de agregação e aderência. A aderência de bactérias às superfícies inertes é necessária para a formação inicial do biofilme. A aderência bacteriana depende das forças elétricas da dupla camada entre a célula e a superfície, das forças de London-van der Waals e de ligações químicas (ligações hidrofóbicas e iônicas); sendo que as duas últimas, são as forças predominantes que governam a interação atrativa entre as superfícies. Esta fase de aderência é considerada reversível. O processo de aderência permanente ou irreversível, usualmente requer nova síntese de polissacarídeos ácidos extracelulares que ligarão as células aderidas ao suporte (COSTERTON et al., 1981). A síntese de polissacarídeos, principalmente polímeros extracelulares, é um mecanismo crucial nas fases do crescimento bacteriano e da atividade metabólica, já que a síntese e o arranjo dos polímeros extracelulares é um processo dependente de energia (COSTERTON et al., 1987).

Na Figura 5.32 apresentam-se os cupons de vidro e polipropileno observados a

“olho nu” após 1 e 9 dias de experimento. É possível constatar uma “película escura”, que podem ser os biofilmes sobre os cupons.

FIGURA 5.28- Micrografia de contraste de fase do biofilme formado sobre o cupom de vidro após 6 dias de experimento, apresentando dois campos microscópicos distintos do mesmo cupom.

FIGURA 5.29- Micrografia de um biofilme formado sobre o cupom de polipropileno após 14 dias de experimento. Amostra corada com DAPI e observada sob microscopia confocal de varredura a laser. A barra indica 10.0 µm.

FIGURA 5.30- Micrografia de contraste de fase do biofilme formado após 1 dia de experimento sobre cupom de polipropileno. A amostra foi corada com Azul de Alcian 0,02% (pH 2,5), para identificação dos polímeros ácidos. A barra indica 5,0 µm.

FIGURA 5.31- Micrografia de contraste de fase do biofilme formado sobre cupom de vidro após 7 dias de experimento. A amostra foi corada com Azul de Alcian 0,02% (pH 2,5), para identificação dos polímeros ácidos. Cada painel representa um campo microscópico diferente do mesmo cupom. A barra indica 5,0 µm.

FIGURA 5.32- Fotografia dos cupons de polipropileno e vidro observados à “olho nu”.

FIGURA 5.33- Fotografia do MRD evidenciando o material flocculento no interior do mesmo.

Após 12 dias de experimento, observou-se no interior do MRD a presença de material floculento no canal por onde passava o meio líquido (Figura 5.33). Esse material pode representar “pedaço” de biofilme que se formou e soltou do interior das mangueiras que faziam a conexão do frasco-reservatório com o MRD. Ao término do experimento, esse material foi retirado do MRD e observado ao microscópio. A observação revelou que o mesmo era formado predominantemente por *Archaeae* metanogênicas, com morfologias semelhantes à *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp. e *Methanospirillum* sp., Figuras 5.34 e 5.35, respectivamente. Tal fato vem corroborar com os resultados obtidos nas hibridações *in situ*, nas quais verificou-se que as *Archaeae* metanogênicas hidrogenotróficas predominaram tanto na composição do inóculo quanto nos biofilmes. Aplicou-se a sonda ARC915, específica para o Domínio *Archaea*, nesse material para confirmar que haveria hibridação positiva dessas células com a sonda (Figura 5.36).

FIGURA 5.34- Micrografia de fluorescência do material floculento. As células apresentam autofluorescência devido ao fator F_{420} indicando que são *Archaeae* metanogênicas.

FIGURA 5.35- Micrografia de fluorescência do material floculento. As células apresentam autofluorescência devido ao fator F_{420} indicando que são *Archaeae* metanogênicas.

FIGURA 5.36- Micrografia de fluorescência das células presentes no material floculento. Lado esquerdo: Coloração com DAPI. Lado direito: FISH realizado com a sonda ARC915 específica para o Domínio *Archaea* (mesmo campo microscópico). A barra indica 5 μm.

5.3.3.2 Conclusão do experimento LG3

As amostras do frasco reservatório e dos biofilmes apresentaram quase a mesma composição microbiana conforme descrito nas Figuras 5.20, 5.24 e 5.25. Elas foram dominadas por *Archaeae* metanogênicas hidrogenotróficas, utilizadoras de hidrogênio ou formiato, semelhantes à *Methanobacterium* sp. e *Methanobrevibacter* sp., que hibridaram com a sonda MB1174, específica para a família *Methanobacteriaceae*. Este grupo contribuiu com cerca de 44 à 90% do total de células coradas com DAPI. Outro grupo de metanogênicas hidrogenotróficas foi detectado com a sonda MG1200, específica para a ordem *Methanomicrobiales*, e apresentou morfologia similar à *Methanospirillum* sp. Este grupo compreendeu cerca de 2 à 17,8% do total de células no frasco reservatório e de 0,1 à 2,2% do total de células coradas com DAPI nos biofilmes. *Archaeae* metanogênicas acetotróficas, não foram detectadas com a sonda MSMX860, específica para a família *Methanosarcinaceae*, apesar de terem sido observadas pouquíssimas células semelhantes à *Methanosaeta* sp. tanto no frasco reservatório quanto no biofilme. Portanto, é provável que elas estivessem presente em número inferior ao limite de detecção do FISH.

No trabalho de MACARIO & CONWAY de MACARIO (1988), os autores analisaram a composição microbiológica de 14 digestores anaeróbios através de ensaios imunoenzimáticos em lâmina e imunofluorescência indireta, e verificaram que células antigenicamente relacionadas à *Methanobrevibacter arboriphilicus* AZ e *Methanobacterium formicicum* MF foram as duas metanogênicas hidrogenotróficas mais freqüentes em todas as amostras. DUBOURGUIER et al. (1988) verificaram que uma porção significativa das células presentes nos grânulos era constituída por metanogênicas (cerca de 20 a 50%). HARMSSEN et al. (1996b) observaram que a proporção de *Archaea* metanogênicas em lodo granulado alimentado com propionato variou de 30 a 55%. Portanto, a composição microbiana encontrada neste experimento, bem como no LG1, usando como inóculo células oriundas de grânulos anaeróbios não diferiu tanto dos resultados descritos na literatura. No trabalho de RASKIN et al.

(1994b), utilizando sondas de oligonucleotídeos complementar ao RNAr 16S, verificou-se que a população de *Archaeae* metanogênicas em 4 digestores anaeróbios de lodo de esgoto compreendia cerca de 12 à 20% do RNAr 16S total da amostra. Dentre as metanogênicas, as mais abundantes foram aquelas que hibridaram com as sondas MG1200 (específica para a ordem *Methanomicrobiales*) e MSMX860 (específica para a família *Methanosarcinaceae*). Estes dois grupos representaram cerca de 5 a 7% e 10 a 13% do RNAr 16S total, respectivamente. É importante salientar que a composição microbiana presente em grânulos e biofilmes, bem como a organização interna dos vários grupos tróficos, no caso dos grânulos, depende da composição da água residuária e dos passos catabólicos dominantes (FANG et al., 1995; GROTENHUIS et al., 1991; SCHMIDT & AHRING, 1996).

Células de *Bacteria*, detectadas com a sonda EUB338, estavam presentes na proporção de 3 a 17% do total de células coradas com DAPI. Dentre estas, as bactérias redutoras de sulfato detectadas com a sonda SRB385 representaram cerca de 1 a 5% do total de células. O restante das células de *Bacteria*, que foram bacilos com esporo na posição terminal, poderiam ser bactérias redutoras de prótons obrigatórias, membros do gênero *Clostridium* sp., degradadoras de butirato ou propionato, ou consumidoras de formiato e/ou etanol (como p.ex, *Clostridium aceticum*), uma vez que estas fontes de carbono foram adicionadas ao frasco reservatório. Além disso, como a maior parte das *Archaea* foi composta por metanogênicas hidrogenotróficas, o hidrogênio poderia estar sendo consumido prontamente favorecendo, portanto, a oxidação do propionato e butirato que usualmente são reações termodinamicamente desfavoráveis. O $\Delta G'$ para a acetogênese a partir do propionato começa a se tornar favorável (- 5,3 KJ/ reação) em pressão parcial de hidrogênio de 10^{-4} Atm (DUBOURGUIER et al., 1988). Os princípios termodinâmicos da digestão anaeróbia, especialmente aqueles que são importantes para as conversões mutualísticas dos ácidos graxos e álcoois já foram extensivamente discutidos em outros trabalhos (BRYANT, 1979; ZEHNDER, 1978). Em ambas as amostras do frasco reservatório e biofilme, as bactérias hidrolíticas, que compreendem o grupo de organismos envolvidos na primeira etapa de degradação da matéria orgânica

em sistemas anaeróbios (ZEHNDER, 1978), não estavam presentes. Este fato pode ser explicado já que os frascos inóculo e reservatório, bem como o MRD, foram alimentados com ácidos graxos de cadeia curta tais como, butírico, propiônico, acético e fórmico, e álcoois, como metanol e etanol. Não foram usadas moléculas de carboidratos, proteínas e lipídeos como fontes de carbono. Não obstante, a presença dos bacilos espessos com esporos na posição terminal, que podem estar relacionados ao gênero *Clostridium* sp., indicou que bactérias fermentativas poderiam estar presentes.

Com relação ao número de células colonizando os cupons, não foram verificadas diferenças significativas entre os dois tipos de superfícies: hidrofílica (vidro) e hidrofóbica (polipropileno). Tal observação sugere que, nas condições testadas, não houve influência da hidrofobicidade dos suportes na formação dos biofilmes anaeróbios.

Tanto células de *Bacteria* quanto células de *Archaeae* metanogênicas foram encontradas colonizando ambas as superfícies, e estavam distribuídas ao acaso ao longo do biofilme. Além disso, a composição microbiana dos biofilmes formados sobre o vidro foi muito semelhante daqueles formados sobre o polipropileno; evidenciando que até em termos de proporção dos grupos de microrganismos, não existiram diferenças, e nem preferências, entre os suportes. Os biofilmes aqui formados não apresentaram estrutura definida em camadas, como ocorreu por exemplo com grânulos anaeróbios estudados por SEKIGUCHI et al. (1999). Esses autores fizeram hibridação *in situ* com sondas fluorescentes em cortes de grânulos anaeróbios mesofílicos e termofílicos alimentados com substrato sintético contendo sacarose, acetato, propionato e peptona ou extrato de levedura. Verificaram que os grânulos apresentavam estrutura microbiana disposta em camadas, em que a camada mais externa foi dominada por células de *Bacteria* e a parte interna consistiu, principalmente, de *Archaeae* metanogênicas. Não obstante, HARMSSEN et al. (1996b) verificaram que grânulos alimentados com propionato consistiram de uma mistura de microcolônias de metanogênicas acetotróficas e de microcolônias sintróficas formadas por metanogênicas e bactérias acetogênicas. Neste caso, os grânulos não apresentaram uma camada externa formada por células de *Bacteria*.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados desse trabalho demonstraram que o sistema experimental MRD juntamente com a técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes foram ferramentas adequadas para o estudo do desenvolvimento de biofilmes anaeróbios, pois permitiu a amostragem não destrutiva e posterior observação direta dos biofilmes ao microscópio. Além disso, a associação da técnica de hibridação *in situ* com a microscopia confocal de varredura a laser permitiu verificar a organização espacial da comunidade microbiana no biofilme.

Com relação aos principais gêneros microbianos que formaram os biofilmes desenvolvidos sobre os dois tipos de suportes, vidro (superfície hidrofílica) e polipropileno (superfície hidrofóbica), verificou-se nos experimentos com as culturas puras, que das três espécies de *Archaeae* metanogênicas utilizadas, todas estavam relacionadas com a formação inicial do biofilme e foram encontradas colonizando ambos os suportes. Não houve uma espécie em particular considerada pioneira na colonização das superfícies. As três espécies aderiram ao mesmo tempo, ou seja, no biofilme com 2 dias todas as três foram observadas colonizando o suporte.

Nos experimentos com células anaeróbias oriundas de lodo granulado mesofílico, verificou-se que as *Archaeae* metanogênicas hidrogenotróficas, especialmente membros da família *Methanobacteriaceae*, predominaram tanto no inóculo (no frasco-reservatório) quanto nos biofilmes formados ao longo do tempo experimental, portanto estavam envolvidas no processo de formação inicial do biofilme. Este grupo contribuiu com cerca de 44,0 à 90,0% do total de células coradas com DAPI e foi morfológicamente semelhante à *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*. Células

detectadas com a sonda específica para membros da ordem *Methanomicrobiales* (MG1200) representaram cerca de 2,0 a 18,0% do total de células coradas com DAPI no frasco-reservatório e de 0,1 a 2,0 % nas amostras do biofilme. Estas células foram morfológicamente semelhantes à *Methanospirillum*, também uma metanogênica hidrogenotrófica. Não foram detectadas células pertencentes à família *Methanosarcinaceae*, pois a hibridação com a sonda MSMX860 foi negativa. Células que hibridaram com a sonda específica para o Domínio *Bacteria* (EUB338) representaram cerca de 3,0 a 18,0% do total de células coradas com DAPI. Este grupo foi constituído de bactérias redutoras de sulfato e bactérias semelhantes ao gênero *Clostridium*, que também foram importantes no processo de formação dos biofilmes. Os resultados mostraram que as *Archaeae* metanogênicas hidrogenotróficas que foram predominantes no inóculo também dominaram os biofilmes que se desenvolveram em ambas as superfícies, vidro e polipropileno. Além disso, não foram verificadas diferenças significativas entre as superfícies de vidro e polipropileno, no que se refere ao número de células aderidas por mm² de cupom e a velocidade de colonização. Portanto, os dados desse trabalho sugerem que a hidrofobicidade do material suporte não influenciou o desenvolvimento e a composição microbiana dos biofilmes anaeróbios, considerando as condições específicas dos ensaios realizados.

Os biofilmes formados nos experimentos cobriram o suporte de forma irregular, ou seja, existiram áreas densamente colonizadas onde as células se sobrepuseram umas as outras contribuindo para o aumento da espessura do biofilme, e outras, com poucas células e até mesmo vazias, apresentando cavidades.

Com relação à importância de cada grupo metabólico, acidogênico, acetogênico e metanogênico, na formação inicial dos biofilmes, verificou-se, nas condições estudadas, que ambos os grupos acetogênicos (bactérias que hibridaram com a sonda EUB338 e que podem ser bactérias sintróficas degradadoras de propionato e butirato) e metanogênicas hidrogenotróficas foram importantes na colonização do suporte. Foi verificado também que os dois grupos tróficos encontrados no biofilme estiveram

dispostos de forma aleatória, ou seja, não existiu uma distribuição ordenada de camadas específicas contendo cada um dos grupos metabólicos.

A hibridação *in situ* com sondas fluorescentes se constituiu numa ferramenta útil para se estudar a composição microbiana de lodo anaeróbio e biofilmes. Entretanto, quando se aplica esta técnica deve-se ter em mente que a eficiência da mesma depende única e exclusivamente de se fazer a distinção entre células que hibridaram especificamente com a sonda daquelas que são autofluorescentes ou que apresentaram hibridação não-específica.

7 PERSPECTIVAS

O monitoramento dos microrganismos presentes em reatores anaeróbios é de extrema importância para se avaliar em que direção está indo o processo, por exemplo, se está ocorrendo metanogênese ou sulfidogênese.

A caracterização e quantificação dos microrganismos em reatores anaeróbios é difícil, mas essencial, para otimizar os processos que ocorrem no reator. Bons resultados vêm sendo obtidos combinando métodos clássicos de caracterização (p.ex, enriquecimento em meio seletivo, número mais provável, entre outros) com outros mais modernos baseados na biologia molecular. Especialmente técnicas baseadas no RNA ribossomal 16S usando sondas de oligonucleotídeos e no DNA ribossomal vêm proporcionando novas oportunidades para a identificação de espécies, bem como para a caracterização da estrutura espacial dos microrganismos presentes em lodos e biofilmes.

A utilização de técnicas de biologia molecular na área de saneamento se faz presente, há alguns anos, em diversos laboratórios de institutos de pesquisa e de universidades do mundo como por exemplo, no EAWAG (Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology), Wageningen Agricultural University-Holanda; Max Planck Institute for Marine Microbiology-Bremem, Alemanha; Technische Universitaet Muenchen-Alemanha, INRA-Laboratoire de Biotechnologie de L'Environnement-França; Northwestern University; University of Illinois at Urbana-Champaign; University of Idaho – E.U.A.; Hokkaido University – Japão, entre outras.

A criação do laboratório de Biologia molecular dentro do laboratório de Processos Biológicos do departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, com

o apoio da Fundação André Tosello, dentro de projetos temáticos da FAPESP e do PRONEX – CNPq, desde julho de 1998 se constituiu num grande avanço para as pesquisas na área de saneamento e tratamento de resíduos dentro do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da USP. Com o desenvolvimento de trabalhos integrados de engenharia e microbiologia poder-se-á monitorar e identificar até mesmo em nível de espécie os microrganismos responsáveis pela degradação de um determinado composto ou resíduo, de forma relativamente rápida e precisa utilizando as técnicas de biologia molecular disponíveis.

A utilização do sistema experimental MRD para o desenvolvimento de biofilmes anaeróbios neste trabalho, abre espaço para que outros estudos sobre aderência microbiana e biofilmes utilizem esse mesmo dispositivo. Nesse sentido, pesquisas futuras poderiam avaliar o efeito da variação da temperatura, ou outra condição de estresse, na aderência das células e formação do biofilme, bem como, na atividade metabólica das mesmas. Através da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes seria possível avaliar a quantidade de RNA ribossomal presente nas células e correlacionar esse dado com a variação de temperatura. Além disso, estudos sobre aderência e formação de biofilmes anaeróbios utilizando culturas puras de metanogênicas, em separado, e diferentes tipos de material suporte poderiam ser realizados. Essas seriam algumas sugestões para trabalhos futuros na área de biofilmes microbianos.

ANEXOS

Valores das hibridações *in situ* com sondas fluorescentes do experimento CP2 após a transformação do arcoseno (ZAR, 1996). E.P., representa o erro padrão. Os valores apresentados para cada uma das sondas já foram corrigidos subtraindo-se a porcentagem de ligações não-específicas obtidas com a sonda NON338 (controle negativo). Os valores representam porcentagens determinadas com uma sonda específica em relação ao total de células coradas com DAPI. Os valores dessa tabela estão apresentados nas Figuras 5.7 e 5.10.

Amostra	EUB338 <i>Bacteria</i>	ARC915 <i>Archaea</i>	MB1174 <i>Methanobacteriaceae</i>	MSMX860 <i>Methanosarcina ceae</i>	NON338 Controle negativo
Inóculo	0	100	85,0	11,0	0
(tempo zero)		EP=0	EP=0	EP=3,0	
2 dias	27,0 EP=5,0	88,0 EP=10,0	68,0 EP=10,0	2,0 EP=1,0	0
7 dias	89,0 EP=6,0	15,0 * EP=7,9	3,0 EP=1,0	0	0
9 dias	77,0 * EP=5,0	26,0 EP=3,0	6,0 EP=1,0	0	0
Biofilme 7 dias vidro	9 EP=0	95,0 EP=6,0	62,0 EP=9,0	1,0 EP=0	0
Biofilme 7 dias polipropileno	20,0 EP=0	88,0 EP=13,0	42,0 EP=8,0	0	0
Biofilme 9 dias Vidro	13,7 * EP=3,9	71,0 EP=8,0	50,0 EP=4,0	0	0
Biofilme 9 dias polipropileno	15,4 * EP=4,4	98,0 EP=4,0	90 EP=6,0	1,0 EP=0	0

* média dos valores brutos (conforme contagem ao microscópio) que não sofreram a transformação do arcoseno.

Valores das hibridações *in situ* com sondas fluorescentes do experimento LG1 após a transformação do arcosseno (ZAR, 1996). E.P., representa o erro padrão. Os valores apresentados para cada uma das sondas já foram corrigidos subtraindo-se a porcentagem de ligações não-específicas obtidas com a sonda NON338 (controle negativo). Os valores representam porcentagens determinadas com uma sonda específica em relação ao total de células coradas com DAPI. Os valores dessa Tabela estão apresentados na Figura 5.18.

Amostra	EUB338 <i>Bacteria</i>	SRB385 Bacterias redutoras de sulfato	ARC915 <i>Archaea</i>	MSMX860 <i>Methanosar cinaceae</i>	MB1174 <i>Methanobac teriaceae</i>	MC1109 <i>Methano coccaceae</i>	MG1200 <i>Methano microbia les</i>	NON338 Controle negativo
Inóculo (tempo zero)	13,0 EP=1,0	13,0 EP=1,0	95,0 EP=3,0	1,0 EP=1,0	75,0 EP=3,0	0	0	0
Biofilme 2 dias	27,0 EP=3,0	24,0 EP=2,0	98,0 EP=5,0	4,0 EP=2,0	76,0 EP=3,0	0	0	0
Biofilme 4 dias	16,0 EP=3,0	13,0 EP=3,0	93,0 EP=4,0	5,0 EP=2,0	86,0 EP=4,0	0	0	0
Biofilme 9 dias	16,0 EP=1,0	7,0 EP=1,0	78,0 EP=6,0	2,0 EP=1,0	83,0 EP=5,0	0	0	0
Biofilme 11 dias	11,0 EP=2,0	0	78,0 EP=5,0	1,0 EP=1,0	86,0 EP=3,0	0	0	0

Valores das hibridações *in situ* com sondas fluorescentes do experimento LG3 após a transformação do arcoseno (ZAR, 1996). E.P. representa o erro padrão. Os valores apresentados para cada uma das sondas já foram corrigidos subtraindo-se a porcentagem de ligações não-específicas obtidas com a sonda NON338 (controle negativo). Os valores representam porcentagens determinadas com uma sonda específica em relação ao total de células coradas com DAPI. Esses valores estão apresentados nas Figuras 5.20, 5.24 e 5.25.

Amostra	ARC915 <i>Archaea</i>	EUB338 <i>Bacteria</i>	MG1200 <i>Methanomi- crobiales</i>	MB1174 <i>Methanobac- teriaceae</i>	MSMX860 <i>Methanosar- cinaceae</i>	SRB385 Bactérias redutoras de sulfato	NON338 Controle negativo
Inóculo	95	3,0	10,4	75,8	0	5,0	0,3
(tempo zero)	EP=7,9	EP=1,0	EP=2,0	EP=8,6		EP=1,0	EP=0,1
1 dia	96,2	14,7	17,8	67,1	0	1,0	0,8
	EP=7,5	EP=1,8	EP=3,0	EP=4,6		EP=0	EP=0,3
9 dias	55,0	17,0	5,3	44,0	0	6,0	18,0
	EP=4,0	EP=2,0	EP=1,5	EP=3		EP=2,0	EP=1,1
15 dias	88,1	18,0	12,7	69,4	0	1	18,0
	EP=4,7	EP=2,0	EP=2,4	EP=2,5		EP=1,0	EP=1,1
20 dias	81,7	17,0	2,1	76,5	0	0,8	18,0
	EP=4,2	EP=3,0	EP=0,9	EP=4,8		EP=0,4	EP=1,1
22 dias	48,3	16,0	3,0	77,6	0	3,0	18,0
	EP=6,9	EP=3,0	EP=1,1	EP=8,7		EP=1,0	EP=1,1
Biofilme	48,2	14,5	1,2	43,0	0	4,0	18,0
6dias vidro	EP=4,0	EP=3,0	EP=0,6	EP=3,7		EP=0	EP=1,1
Biofilme 9dias	89,9	0	2,2	84,8	0	0	18,0
vidro	EP=4,8		EP=0,7	EP=4,2			EP=1,1
Biofilme 5dias	83,0	16,0	0,3	82,0	0	4,9	18,0
polipropileno	EP=5,8	EP=2,0	EP=0,2	EP=6,0		EP=1,2	EP=1,1
Biofilme 9dias	90,8	0	0,6	89,1	0	0	18,0
polipropileno	EP=5,0		EP=0,4	EP=5,6			EP=1,1
Biofilme	99,9	0	0,1	99,6	0	0	18,0
15dias	EP=2,1		EP=0,1	EP=2,8			EP=1,1
polipropileno							
Biofilme	99,2	7,6	0,7	89,6	0	1,0	18,0
22dias	EP=2,7	EP=2,3	EP=0,4	EP=9,9		EP=0	EP=1,1
polipropileno							

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, D.S. (1998). Desnitrificação e caracterização filogenética das bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas no hipolímnio do lago Kizaki, Japão. São Carlos. 106p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ALM, E.W., OERTHER, D., LARSEN N., STAHL, D.A., RASKIN, L. (1996). The Oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* v.62, p.3557-3559.
- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*, v.59, n.1, p.143-169.
- AMANN, R. (1995). In situ Hybridization of micro-organisms by whole cell Hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, v.3.3.6/10, p.1-15, Kluwer Academic Publishers.
- AMANN, R.I., BINDER B.G., OLSON R.J., CHRISHOLM S.W., DEVEREUX R., STAHL D.A. (1990a). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p.1919-1925.
- AMANN R.I., KRUMHOLZ L., STAHL D.A. (1990b). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, v.172, p.762-770.
- AMANN, R.I.; STROMLEY, J.; DEVEREUX R., KEY, R.; STAHL, D.A. (1992). Molecular and microscopic identification of sulphate-reducing bacteria in

multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p. 614-623.

ARAUJO, J.C. (1995) Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leite fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético. São Carlos. 158p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ARAUJO, J.C.; BRUCHA, G.; CAMPOS, J.R.; VAZOLLER, R.F. (2000). Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Water Science and Technology*, v.41, n.12, p.69-77.

BADRA, R.J. (1993). Isolamento e Caracterização de Bactérias Metanogênicas de um Aterro Sanitário Experimental. São Carlos. 175p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BALCH, W.E. et al. (1979). *Microbiol. Rev.*, v. 43, p. 260.

BALLOWS, A., TRÜPER, H.G., DWORKIN M., HARDER W., K.-H. SCHLEIFER (ed.). (1992). *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer Verlag, New York.

BARKER, H.A. (1956) Bacterial Fermentation. J. WILEY, New York. BIOTHANE-SYSTEMS-INTERNATIONAL (1998). In: 8th LICENSEE MEETING. Delft, The Netherlands.

BIOTHANE-SYSTEMS-INTERNATIONAL. Delft, The Netherlands. In: 8th Licensee meeting, 1998.

BLAUT, M. (1994). Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek.*, v.66, p. 187-208.

BLENKINSOPP, S.A. & COSTERTON, J.W. (1991). Understanding Bacterial Biofilms. *TIBTECH.* v. 9, p.138-143.

- BOND, P.L.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L. (1995). Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, p.1910-1916.
- BROSIUS, J.; DULL, T.L.; SLEETER, D.D.; NOLLER, H.F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, v. 148, p.107-127.
- BRYANT, M.P. (1979). *J. Anim. Sci.* , v.48, p. 193.
- BRYERS, J.D. (1988). Modeling Biofilm Accumulation. In: Bazin, J.B.& Drossen, J.F. (eds) *Physiological Models in Microbiology*. v.II. CRC Press, cap. 11. p. 109-144.
- CALDEIRA, M.; HEALD S.C.; CARVALHO M.F.; VASCONCELOS, I.; BULL, A.T.; CASTRO, P.M.L. (1999). 4-Chlorophenol degradation by a bacterial consortium: development of a granular activated carbon biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 52, p.722-729.
- CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAWRENCE, J.R. (1992a) Confocal laser microscopy and computer image analysis. In: MARSHALL K.C ed. *Advances in microbial ecology*. New York: Plenum. v.12, p. 1-67.
- CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAWRENCE, J.R. (1992b). Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion using scanning confocal laser microscopy. *J. Microbiol. Methods*, v.15, p.249-261.
- CALLADO, N. (2001) Reatores sequenciais em batelada tratando esgoto sanitário sintético. São Carlos. 212p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- CHRISTENSSON, M.; BLACKALL, L.L.; WELANDER, T. (1998) Metabolic transformations and characterization of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.49, p.226-234.
- COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T.; CHENG, K.J. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.35, p.299-324.
- COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESY, G.C.; LADD T.I.; NICKEL J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.*, v.41, p.435-464.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; DE BEER, D.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; JAMES, G.A. (1994). Biofilms: the customized microniche. *J. Bacteriol.*, v. 176, p. 2173-2142.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* v.49, p.711-745.
- CROCETTI, G.R.; HUGENHOLTZ, P.; BOND, P.L.; SCHULER, A.; KELLER, J.; JENKINS, D.; BLACKALL, L.L. (2000). Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.1175-1182.
- DAIMS, H.; BRUHL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.22, p.434-444.
- DAVENPORT, R.J.; CURTIS, T.P.; GOODFELLOW, M.; STAINSBY, F.M.; BINGLEY, M. (2000). Quantitative use of fluorescent in situ hybridization

- to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.1158-1166.
- DE BEER, D., STOODLEY P., ROE F., LEWANDOWSKI Z. (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transfer. *Biotechnol. Bioeng*, v.43, p.1131-1138.
- DE LONG, E.F.; WICKHAM, G.S.; PACE, N. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, v.243, p.1360-1363.
- DE LONG, E.F.; TAYLOR, L.T.; MARSH, T.L.; PRESTON, C.M. (1999). Visualization and enumeration of marine planktonic Archaea and Bacteria by Using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.5554-5563.
- DEVEREUX, R., KANE, M.D., WINFREY, J., STAHL, D.A. (1992). Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *System. and Appl. Microbiol.* v. 15, p.601-609.
- DUBOURGUIER, H.C.; ARCHER, D.B.; ALBAGNAC, G.; PRENSIER, G. (1988). Structure and metabolism of methanogenic microbial conglomerates. In: HALL, E.R.; HOBSON, P.N. ed. *Anaerobic Digestion 1988, 5th International Symposium on Anaerobic Digestion*. Pergamon Press, p.13-23.
- EDWARDS, T.; McBRIDE, B.C. (1975). A new method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.*, v.29, p.540-545.
- FANG, H.H.P.; KWONG, T.S. (1994) Degradation of starch particulates in a hybrid reactor. *Wat. Sci. Tech.*, v.30, n.4, p.97-104.

FANG, H.H.P.; CHUI, H.K.; LI, Y.Y. (1995) Effect of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules. *Wat. Sci. Tech.*, v.32, n.8, p. 165-172.

FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; VAN LIS, R.; AKKERMANS, A.D.L. (1998). Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse a grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.*, v.64, p. 871-879.

FICKER M., KRASTEL K., ORLICKY S. and EDWARDS E. (1999). Molecular characterization of a Toluene-Degrading methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.5576-5585.

FOX, G.E. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA v.74, p. 4537.

FOX, G.E. et al. (1980) *Science*, v.209, p. 457.

FUCHS, B.M.; GLOECKNER, F.O.; WULF, J.; AMANN, R. (2000). Unlabeled Helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p. 3063-3607.

GIOVANNONI, S.J.; DE LONG, E.F.; OLSEN, G.J.; PACE N.R. (1988). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.*, v.170, p.720-726.

GLOCKNER, F.O.; FUCHS, B.M.; AMANN, R. (1999). Bacterioplankton Compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.3721-3726.

GONZALEZ-GIL, G. (2000). Conversion of methanotrophic substrates in anaerobic reactors, metals, mass transfer, and toxicity. Doctoral Thesis. Wageningen University, The Netherlands, Pp157.

GROTENHUIS, J.T.C.; SMIT, M.; PLUGGE, C.M.; YUANSHENG, X.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; STAMS, A.J.M.; ZEHNDER, A.J.B. (1991). Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* v.57, p.1942-1949.

GUIOT, S.R.; GORUR, S.S.; KENNEDY, K.J. (1988). Nutritional and Environmental Factors Contributing to Microbial Aggregation During Upflow Anaerobic Sludge Bed-Filter (UFB) Reactors Start-up. In: *Proc. of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion Anaerobic Digestion, 22-26 May, Bologna, Italy*. HALL, E.R.; HOBSON, P.N. eds. Pergamon Press, Oxford, UK, p. 47-53.

GUIOT, S.R.; PAUSS A.; COSTERTON, J.W. (1991). A structured model of the anaerobic granule consortium. In: *Sixth International Symposium on Anaerobic Digestion*, São Paulo, 12-16 May, Paper prints, p. 1-8.

HAHN, D., AMANN, R.I., LUDWIG, W., AKKERMANS, A.D.L., SCHLEIFER, K.H. (1992). Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA target, fluorescent labeled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.*, v.138, p.879-887.

HANSEN, K.H.; AHRING B.K.; RASKIN, L. (1999). Quantification of syntrophic fatty acid- β -oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 4767-4774.

HARMSSEN, H.J.M.; KENGGEN, H.M.P.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M.; de VOS, W.M. (1996a). Detection and Localization of Syntrophic Propionate-Oxidizing bacteria in Granular Sludge by In Situ Hybridization Using 16S rRNA- Based Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.1656-1663.

- HARMSSEN, H.J.M.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M.; de VOS, W.M.M. (1996b). Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.2163-2168.
- HARMSSEN, H.J. M.; PRIEUR, D.; JEANTHON, C. (1997). Group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify thermophilic bacteria in marine hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.4061-4068.
- HARVEY, M.; FORSBERG, C.W.; BEVERIDGE, T.J.; POS, J.; OGILVIE, J.R. (1984). Methanogenic Activity and Structural Characteristics of The Microbial Biofilm on a Needle-Punched Polyester Support. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.48, p.633-638.
- HESELDMANN, R.P.X.; WERLEN, C.; HAHN, D.; VAN DER MEER, J.R.; ZEHNDER, A.J.B. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge system. *System. Appl. Microbiol.*, v.22, p. 454-465.
- HICKEY, R.F.; WU, M-W.; VEIGA, M.C.; JONES, R. (1991). Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Wat. Sci.Tech.*, v.24, n.8, p.207-255.
- HIORNS, W.D.; METHÉ, B.A.; NIERZWICKI-BAUER, S.A.; ZEHR, J.P. (1997). Bacterial Diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p. 2957-2960.
- HIRSCH, P.; MÜLLER, M. (1985). *Planctomyces limnophilus* sp. nov., a stalked and budding bacterium from freshwater. *System. Appl. Microbiol.*, v. 6, p.276-280.
- HULSHOFF POL, L.W. & LETTINGA, G. (1983). Granulation in UASB-reactors. *Wat. Sci. Tech.*, v.15, p.291-304.

- HUYSMAN, P.; VAN MEENEN, P.; VAN ASSCHE, P.; VERSTRAETE, W. (1983). Factors affecting the colonization of non porous and porous packing materials in model upflow methane reactors. *Biotechnol. Lett.* V.5, p.643-648.
- IMACHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. (2000). Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p. 3608-3615.
- JANSSEN, P.H.; SCHUHMANN, A.; MÖRSCHHELL, E.; RAINEY, F. A. (1997). Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the *Verrucomicrobiales* lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p.1382-1388.
- JONES, W.J.; WAGLE Jr, D.P.; WHITMAN, W.B. (1987). Methanogens and the diversity of Archaeabacteria. *Microbiological Reviews*, v.51, n. 1, p.135-177.
- JUCKER, B.A.; HARMS, H.; ZEHNDER, A.J.B. (1996). Adhesion of the Positively Charged Bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to Glass and Teflon. *Journal of Bacteriology*, v.178, n.18, p.5472-5479.
- JURETSCHKO, S.; TIMMERMAN, G.; SCHMID, M.; SCHLEIFER, K-H.; POMMERENING-ROSER, A.; KOOPS, H-P.; WAGNER, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira* -like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.64, p. 3042-3051.
- KALMBACH, S., MANZ, W., SZEWZYL, U. (1997). Dynamics of Biofilm formation in Drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential

of single cells accessed by formazan reduction and in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, v.22, p.265-279.

KATO, M.; FIELD, J.A.; LETTINGA, G. (1993a). High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, v.42, N.11, p. 1360-1366.

KATO, M.; FIELD, J.A.; LETTINGA, G. (1993b). Methanogenesis in granular sludge exposed to oxygen. *FEMS Microbiology Letters*, v.114, p. 317-324.

KEEVIL, C.W.; WALKER, J.T. (1992). Nomarski DIC microscopy and image analysis of biofilm. *Binary Comput. Microbiol*, v.4, p. 93-95.

KING, R.C.; STANSFIELD, W.D. (1997). *A Dictionary of Genetics*, 5. ed. New York, Oxford University Press.

KORBER, D.R.; JAMES, G.A.; COSTERTON, J.W. (1994). Evaluation of fleroxacin activity against established *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*, v.60, p.1663-1669.

KRUSE, P.F.Jr.; PATTERSON M.K. (1973) *Tissue Culture: Methods and Applications*. New York, Academic Press.

LA MOTTA, J.E. et al (1982). Effect of Polyelectrolytes on Biofilm Growth. *Journal of Environmental Engineering Division*, v. 108, n. EE6, p.1326-1341.

LARSEN, T., STOLTZE, K., FIEHN, N-E. (1997). Susceptibility of Biofilms of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces naeslundii* to chlorhexidine. *Biofilm Journal* (<http://www.bdt.org.br/bioline/bf>) v. 2, paper 1 (BF 97001).

LAWRENCE, J.R.; KORBER D.R.; HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W.; CALDWELL, D.E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol*, v.173, p. 6558-6567.

- LAWRENCE, J.R.; WOLFAARD, G.M.; KORBER, D.R. (1994). Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 60, p. 1166-1173.
- LAWRENCE, J.R.; WOLFAARDT G.M.; NEU, T.R. (1998). The study of biofilms using confocal laser scanning microscopy, p.431-465. *In*: Wilkinson M.H.F. & Schut F. (ed.), *Digital image analysis of microbes – imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications*. John Wiley & Sons. Chichester, United Kingdom.
- LEE, N.; NIELSEN, P.H.; ANDREASEN, K.H.; JURETSCHKO, S.; NIELSEN, J.L.; SCHLEIFER, K-H.; WAGNER, M. (1999). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.1289-1297.
- LETTINGA, G.; VAN VELSEN, A.F.M.; HOBMA, S.W.; de ZEEUW, W.; KLAPWIJK, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, v.22, p.699-734.
- LETTINGA, G.; HULSHOFF POL. L.W. (1991). UASB-process design for various types of wastewaters. *Wat. Sci. Tech.*, v.24, p.87-107.
- LETTINGA, G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie Leeuwenhoek*, v.67, p.3-28.
- LEWANDOWSKI Z., WEBB D., HAMILTON M., HARKIN G.(1998). Quantifying Biofilm Structure. *In: Microbial Ecology of Biofilms: Concepts, Tools and Applications.IAWQ Specialty Conference*. Illinois, 1998. Conference Proceedings, p.95-102.

- LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. (1992). Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.*, v.174, p. 5072-5078.
- LIN, C.; RASKIN, L.; STAHL, D.A. (1997). Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* v.22, p. 281-294.
- LJUNGDAHL, L.G.; WIEGEL, J. (1986). Working with anaerobic bacteria. In: DEMAIN, A.L. & SOLOMON, N.A. ed. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology Press. Cap. 8, p. 84-96.
- MACARIO, A.J.L.; CONWAY de MACARIO (1988). Quantitative immunologic analysis of the methanogenic flora of digestors reveals a considerable diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, p.79-86.
- MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; LILBURN, T.G.; PARKER Jr, C.T.; SAXMAN, P.R.; STREDWICK, J.M.; GARRITY, G.M.; LI, B.; OLSEN, G.J.; PRAMANIK, S.; SCHMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M. (2000) The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acid Res.*, v. 28, p. 173-174.
- MANUAL BERGEY DE SISTEMÁTICA BACTERIANA (1984), v. 1. KRIEG, N.R. & Holt, J.G. ed., Baltimore, Williams & Wilkins.
- MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.15, p.593-600.
- MANZ, W.; EISENBRECHER M.; NEU, T.R.; SZEWZYK, U. (1998). Abundance and spatial Organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in

activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*, v.25, p.43-61.

MANZ, W.; WENDT-POTTHOFF, K.; NEU, T.R.; SZEWZYL, U.; LAWRENCE, J.R. (1999). Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microbial Ecology*, v.37, p. 225-237.

MARSHALL, K.C. (1986). Adsorption and adhesion process in microbial growth at interfaces. *Adv.Colloid Interface Sci.*,v.25, p.59-86 .

MASSANA, R.; MURRAY, A.E.; PRESTON, C.M.; DE LONG, E.F. (1997). Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol*, v.63, p. 50-56.

MASSOL-DEYÁ, A.A.; WHALLON, J.; HICKEY, R.F.; TIEDJE, J.M. (1995). Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol*, v.61, p.769-777.

McCOY, W.F., BRYERS, J.D., ROBBINS, J., COSTERTON, J.W. (1981). Observations on Biofilm Formation. *Canadian Journal of Microbiology*, v.27, p.901- 917.

MINK, R.W.; DUGAN, P.R. (1977). Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.33, p.713-717.

MOBARRY, B.K.; WAGNER, M.; URBAIN, V.; RITTMAN, B.E.; STAHL, D.A. (1996). Phylogenetic Probes for Analyzing Abundance and Spatial Organization of Nitrifying Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, v.62, p.2156-2162.

- MOLLER, S.; PEDERSEN, A.R.; POULSEN, L.K.; ARVIN, E.; MOLLIN, S. (1996). Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 4632-4640.
- NEEF, A.; AMANN, R.; SCHLESNER, H.; SCHLEIFER K.-H. (1998). Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of Planctomycetes with 16S rRNA- targeted probes. *Microbiology*, v.144, p. 3257-3266.
- NOVAES, R.F.V. (1986). Microbiology of anaerobic digestion. *Wat Sci Tech.*, v.18, p.1-14.
- OHWAKI, K.; HUNGATE, R.E. (1977). Hydrogen utilization by clostridia in sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 33, p. 1270.
- OLIVEIRA, R.A. (1997). Efeito da concentração de sólidos suspensos do afluente no desempenho e características do lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo tratando águas residuárias de suinocultura. São Carlos. Vol I e II. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J.; PACE, N.R.; STAHL, D.A. (1986). Microbial Ecology and Evolution : a ribossomal RNA approach. *Annu.Rev. Microbiol*, v. 40, p. 337-365.
- OMAR, N.B.; AMPE, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol*, v.66,p.3664-3673.
- OREMLAND, R.S. (1988). Biogeochemistry of Methanogenic Bacteria. In: ZEHNDER, A.J.B. ed. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, Inc. Cap. 12, p. 641-705.

- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VAN LIS, R.; HEILIG, H.G.H.J.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M. (1998a). Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Biodegradation*, v.9, p.169-177.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; BOSCHER, H.T.S.; STAMS, A.J.M. (1998b). Identification of sulfate reducers and *Syntrophobacter* sp. in anaerobic granular sludge by fatty-acid biomarkers and 16S rRNA probing. *Geomicrobiology Journal*, v.15, p.3-17.
- PACE, N.R. (1996). New perspective on the natural microbial world : Molecular microbial ecology. *ASM News*, v. 62, n. 9, p. 463- 470.
- PÉREZ-RODRIGUEZ, J.L.; CARRETERO, M.I.; MAQUEDA, C. (1989a). Behaviour of sepiolite, vermiculite and montmorillonite as supports in anaerobic digesters. *Applied Clay Sciences*, v. 4, p. 69-82.
- PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. (1998). Discrete-Differential modelling of biofilm structure. *Microbial Ecology of Biofilms: Concepts, Tools and Applications*. IAWQ Specialty Conference. Illinois, Conference Proceedings , p.144-151.
- POULSEN, L.K.; BALLARD, G.; STAHL, D.A. (1993). Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*, v.59, p.1354-1360.
- POWER, M.E.; ARAUJO, J.C.; VAN DER MEER, J.R.; HARMS, H.; WANNER, O. (1999). Monitoring Sulfate-Reducing Bacteria in Heterotrophic Biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, v.39, n.7, p.49-56.
- PURDY, K.J.; NEDWELL, D.B.; EMBLEY, T.M.; TAKII, S. (1997). Use of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes to investigate the occurrence and selection of sulfate-reducing bacteria in response to nutrient addition to

sediment slurry microcosms from a japanese estuary. *FEMS – Microbiology Ecology*, v. 24, p.221- 234.

RABUS, R.; FUKUI, M.; WILKESS, H.; WIDDEL, F. (1996). Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 3605-3613.

RAMSING, N.B.; FOSSING, H.; FERDELMAN, T.G.; ANDERSEN F.; THAMDRUP B. (1996). Distribution of bacterial Populations in a stratified fjord (Mariager fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.1391-1404.

RASKIN, L.; STROMLEY, J.M.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994a). Group-specific 16S rRNA hybridization Probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, p.1232-1240.

RASKIN, L.; POULSEN, L.K.; NOGUERA, D.R.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1994b). Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, n.4, p.1241-1248.

RASKIN, L.; AMANN, R.I.; POULSEN, L.K.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1995). Use of ribosomal RNA-based molecular probes for characterization of complex microbial communities in anaerobic biofilms. *Wat. Sci. Tech.* v.31, p.261-272.

RASKIN, L.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. (1996). Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* v.62, p.3847-3857.

- REBAC, S.; VAN LIER, J.B.; JANSSEN, M.G.J.; DEKKERS, F.; SWINKELS K.T.M.; LETTINGA, G. (1997). High-rate anaerobic treatment of malting wastewater in a pilot-scale EGSB system under psychrophilic conditions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.68, p. 135-146.
- REIMER, M.F.; FOUTS, B.; TELANG, A.J.; SHEN, Y.; GEVERTS, D. (1996). Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, n.5, p.1623- 1629.
- RIJNAARTS, H.H.M.; NORDE, W.; BOUWER, E.J.; LYKLEMA, J.; ZEHNDER, A.J.B. (1995). Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids Surf. B: Biointerface*, v.4, p.5-22.
- RITTMAN, B.E.; MCCARTY, P.L. (1981). Substrate Flux into Biofilms of any Thickness. *Journal of the Environmental Engineering Division*, v.107, n.EE4, p.831-849.
- RITTMAN, B.E. ; MANEN, J.A. (1992). Development and Experimental Evaluation of a Steady - State, Multispecies Biofilm Model. *Biotechnology and Bioengineering*, v.39, n.9, p. 914-922.
- RITTMANN, B.E.; PETTIS, M.; REEVES, H.W.; STAHL, D.A. (1998). How Biofilm Clusters Affect substrate flux and ecological selection. *Microbial Ecology of Biofilms: Concepts, Tools and Applications*. IAWQ Specialty Conference. Illinois, 1998. Conference Proceedings , p.128-135.
- ROBINSON, R.W.; AKKIN, D.E.; NORDSTEDT, R.A.; THOMAS M.; ALDRICH H.C. (1984). Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.48, p. 127-136.

- RUSESKA, I.; ROBBINS, J.; COSTERTON, J.W. (1982). Biocide testing against corrosion-causing oil-field bacteria helps control plugging. *Oil & Gas Journal*, v. 8, p.253-264.
- SANTEGOEDS, C.M.; DAMGAARD, L.R.; HESSELINK, G.; ZOPFI, J.; LENS, P.; MUYZER, G.; DE BEER, D. (1999). Distribution of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensor and molecular analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 4618-4629.
- SCHAECHTER, E.; MAALOE, O., KJELDGAARD, N.O. (1958). Dependence on medium and Temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella Typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.*, v.19, p.592- 606.
- SCHLESNER, H. (1986). *Pirella marina* sp. Nov., a budding, peptidoglycan-less bacterium from brackish water. *System. Appl. Microbiol.*, v. 8, p. 177-180.
- SCHLESNER, H. (1987). *Verrucomicrobium spinosum* gen. Nov., sp. nov.: a fimbriated prosthecate bacterium. *System. Appl. Microbiol.*, v. 10, p. 54-56.
- SCHMIDT, J.E.; AHRING B.K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v.49, p. 229-246.
- SCHRAMM, A.; SANTEGOEDS, C.M.; NIELSEN, H.K.; PLOUG, H.; WAGNER, M.; PRIBYL, M.; WANNER, J.; AMANN, R.; DE BEER, D. (1999). On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.4189-4196.
- SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K.; OHASHI, A.; HARADA H. (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides Reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, n.3, p. 1280-1288.

- SMESTAD PAULSEN, B.; ASLAKSEN, T.; FREIRE-NORDI, C.S.; VIEIRA, A.A.H. (1998). Extracellular polyssaccharides from *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, v.34, p.638-641.
- SMITH, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K. (1997). Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, v.23, p.249- 261.
- SNAIDR, J.; AMANN, R.; HUBER, I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.63, p.2884-2896.
- SPEECE, R.E. (1983). Anaerobic Biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.*, v.17, p.416A-427A.
- STAHL, D.A.; AMANN, R.I. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, v. 8. John Wiley & Sons, Ltd., London, England, p. 207-248.
- STAHL, D.A.; AMANN, R.I.; POULSEN, L.; RASKIN, L. CAPMAN, W.C. (1995). Use of Fluorescent probes For determinative microscopy of methanogenic *Archaea*. In: SOWERS, K.R. & SCHREIER, H.J (ed.) *Archaea – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press.
- STALEY, J.T.; DE BONT, J.A.M.; DE JONGE, K. (1976). *Prostheco bacter fusiformis* nov. gen. Et sp., the fusiform caulobacter. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 42, p. 333- 342.
- STOFFELS, M.; AMMANN, R.; LUDWIG, W.; HEKMAT, D.; SCHLEIFER, K-H. (1998). Bacterial Community dynamics during start-up of a trickle-bed

bioreactor degrading aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol*, v.64, n.3, p. 930-939.

STOODLEY, P.; De BEER D.; LEWANDOWSKI, Z. (1994). Liquid flow in biofilm systems. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 60, p. 2711-2716.

TAVARES, C.R.G. (1992). *Tratamento Aeróbio de Efluentes em Bioreatores de Leito Fluidizado Trifásico*. Rio de Janeiro. 203 p.Tese (Doutorado). COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

THAVEESRI, J. et al. (1995c). Different types of sludge granules in UASB reactors treating acidified wastewaters. *Antoine van Leeuwenhoek*, v. 68, p.329-337.

VAN der MEER, J.R.; ZEPP, K.; EGGEN, R. (1998). Modern methods for detection of microorganisms and their activity. *Bio World (Umwelt-Biotechnologie)* 5, p.3-8.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J.B. (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol*, v.53, n.8, p.1893-1897.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J.B. (1987). Electrophoretic Mobility and Hydrophobicity as a Measure to Predict the Initial Steps of Bacterial Adhesion. *Appl. Environ. Microbiol*, v.53, n.8, p.1898-1901.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; ZEHNDER, A.J.B. (1989). Bacterial Adhesion: A Physicochemical Approach. *Microbial Ecology*, v.17, p. 1-15.

- VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; ZEHNDER, A.J.B. (1990). Influence of Interfaces on Microbial Activity. *Microbiological Reviews*, v.54, n.1, p. 75-87.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; EIKELBOOM, D.; GJALTEMA, A.; MULDER, A.; TIJHUIS, L.; HEIJNEN, J.J. (1995). Biofilm Structures. *Wat. Sci. Tech.*, v.32, p. 35-43.
- VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. (1997). Characterization of anaerobic biomass immobilized in polyurethane foam matrices from H AIS reactor by scanning electron microscopy. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v.48, p. 534-538.
- VAZOLLER, R. F. (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos. p.259. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VERRIER, D.; MORTIER, B.; ALBAGNAC, G. (1987). Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnol. Lett.*, v.9, p.735-740.
- VERRIER D.; MORTIER B.; DUBOURGUIER, H.C.; ALBAGNAC, G. (1988). Adhesion of Anaerobic bacteria to Inert Supports and Development of Methanogenic Biofilms. In: HALL, E.R.; HOBSON, P.N. eds. Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion, IAWR, Bologna, Italy. p. 61-69.
- WAGNER, M.; AMANN, R.; LEMMER, H.; SCHLEIFER, K.H. (1993). Probing activated sludge with oligonucleotides specific for *Proteobacteria*: inadequacy of culture- dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol*, v.59, p.1520-1525.
- WAGNER, M.; AMANN, R.; KAMPFER, P.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A.; HUTZLER, P.; SPRINGER, N.; SCHLEIFER, K.H. (1994). Identification and

in situ detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol*, v. 17, p.405-417.

WAGNER, M.; RATH, G.; KOOPS, H-P.; FLOOD, J.; AMANN, R. (1996). *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat. Sci. Tech.*, v.34, n.1- 2, p. 237-244.

WEISS, P.; SCHWEITZER, B.; AMANN, R.; SIMON, M. (1996). Identification in Situ And Dynamics of Bacteria on Limnetic Organic Aggregates (Lake Snow). *Appl. Environ. Microbiol*, v.62, n.6, 1998-2005.

WHITELEY, A.S.; BAILEY, M.J. (2000). Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol*, v.66, n.6, p.2400-2407.

WILSON, D.R.; PAGE, I.C.; COCCI, A.A.; LANDINE, R.C. (1998) Case hystory: two stage, low-rate anaerobic treatment facility for South American alchochemical /citric acid wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, v.38, n.4-5, p.45-52.

WIMPENNY, J.W.T.; COLASANTI, R. (1997). A Unifying hypothesis for the structure of Microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol Ecology*, v. 22, p.1-16.

WISE, M.G.; McARTHUR, J.V.; SHIMKETS, L.J. (1997). Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Appl. Environ. Microbiol*, v.63, p.1505-1514.

WOESE, C.R. (1981). *Sci. American*, v.244, n.6, p.94.

WOESE, C.R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, v.51, p.221-271.

- WOESE, C.R. ; KANDLER, O. ; WHEELIS, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, p.4576 - 4579.
- WU, W.; JAIN M.K.; THIELE J.H.; ZEIKUS, G. (1995). Effect of storage on the performance of methanogenic granules. *Water Res.*, v.29, p.1445-1452.
- ZAIAT, M. (1996). Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias. São Carlos. 157p. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ZAR, H.J. (1996) *Biostatistical Analysis*, 3rd edn. Prentice Hall, London, p.282-284.
- ZARDA, B.; HAHN, D.; CHATZINOTAS, A.; SCHÖNHUBER, W.; NEEF, A.; AMANN, R.I.; ZEYER, J. (1997). Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. *Arch. Microbiol.*, v. 168, p. 185-192.
- ZEHNDER, A.J.B. (1978). In: MITCHELL, R. ed. *Water Pollution Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, v. 2, p. 349-376.
- ZEHNDER, A.J.B.; INGVORSEN, K.; MARTI, T. (1982). Microbiology of Methane Bacteria. In: HUGHES et al. eds. *Anaerobic Digestion* 1981. Elsevier Biomedical Press B.V., p. 45-68.
- ZHENG, D.; RASKIN, L. (1998). Monitoring Granulation Process in Anaerobic Reactors Using Oligonucleotide Hybridization Probes. In: *Proceedings of the IAWQ Specialty Conference on Microbial Ecology of Biofilms*, Illinois, USA. 8-10 october. p. 69-76.
- ZINDER, S. H.; KOCH, M. (1984). No-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, v. 138, p. 263-272.
- ZINDER, S. H.; CARDWEL, S. C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M.

(1984a). Methanogenesis in a thermophilic (58⁰C) anaerobic digester: *Methanotherix* sp. as an important acetoclastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.47, p.796-807.

ZINDER, S. (1993). Physiological ecology of methanogens. In: FERRY, J.G. ed. *Methanogenesis*. Chapman & Hall, USA. p.128-206.

ZEPP FALZ, K. ; HOLLIGER, C.; GROSSKOPF, R.; LIESACK, W.;
NOZHEVNIKOVA, A. N.; MULLER, B.; WEHRLI, B.; HAHN, D. (1999).
Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee
(Switzerland). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p.2402-2408.

ZWART, G.; HUISMANS, R.; VAN AGTERVELD, M.P.; VAN de PEER, Y.; DE
RIJK, P.; EENHOORN, H.; MUYZER, G.; VAN HANNEN, E.J.; GONS,
H.J.; LAANBROEK, H.J. (1998). Divergent members of the bacterial
division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake. *FEMS
Microbiol. Ecol.*, v.25, p. 159-169.

ZWEIFEL, U.L.; HAGSTROM, A. (1995). Total counts of marine bacteria include
a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl. Environ
Microbiol.*, v.61, p.2180-2185.

APÊNDICES

Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy

J.C. Araujo, G. Brucha, J.R. Campos and R.F. Vazoller

Department of Hydraulics and Sanitation, University of São Paulo (USP), São Carlos School of Engineering, Av. Dr. Carlos Botelho, 1465 -São Carlos -SP, 13560-970, Brazil (E-mail: calabria@sc.usp.br)

Abstract In this study we investigated the development of anaerobic biofilm using a laboratory reactor. We were especially interested in comparing the organization of anaerobic cells (particularly those that are very common in domestic sewage sludge) in a hydrophilic (glass) versus a hydrophobic (polypropylene) surface. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with domain and group specific probes directed against 16S ribosomal RNA were used to quantify microbial composition in the biofilm. FISH and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were used to elucidate spatial distribution of microbes in the biofilms. Two experiments were carried out, one with pure methanogenic organisms and the other with a microbial anaerobic consortium. The pure methanogen cultures, *Methanobacterium formicicum* (DSM 1535); *Methanosaeta concilli* (DSM 3671) and *Methanosarcina barkeri* (DSM 800) were used to seed the modified Robbins Device (MRD) to allow the development of biofilms on polypropylene and glass surfaces during the 9-days experiment. The results showed that all the three species were colonizing both surfaces after two and nine days of experimental period. In another experiment, with polypropylene coupons only, MRD was seeded with a microbial anaerobic consortium and biofilm formation was studied during 11 days. At the end of this period, the biofilms generated were of uneven thickness with areas of minimal or no surface coverage and areas where the biofilm attained a thickness of 7.0 to 9.0 μm as revealed by CLSM. The results showed that the modified Robbins Device together with the fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy are suitable tools to study anaerobic biofilm development in different kinds of support materials.

Keywords Anaerobic biofilm; *in situ* hybridization; methanogens; oligonucleotide probes; Robbins device

Introduction

Bacterial biofilms represent a common mode of bacterial growth in many natural environments. Although it is acknowledged that complex interactions should exist between groups of bacteria, more information about specific relationships between different species of bacteria within biofilms is lacking.

Microbial ecology of biofilms and environmental microbiology has advanced rapidly in the past decade with the advent of molecular and microscopic tools, enabling researchers to characterize and locate bacteria in the environment. *In situ* hybridization techniques using oligonucleotide probes against the 16S rRNA have become common to detect and study microorganisms in their natural habitats (Amann *et al.*, 1995).

In this study we investigated the development of anaerobic biofilm using a laboratory reactor. We were especially interested in comparing the organization of anaerobic cells (particularly those that are very common in domestic sewage sludge) in a hydrophilic (glass) versus a hydrophobic (polypropylene) surface. Besides this we wanted to test the use of the modified robbins device (MRD) as a reactor to develop anaerobic biofilms. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH), with domain and group specific probes directed against 16S ribosomal RNA, were used to quantify microbial composition in the biofilm. FISH and confocal laser scanning microscopy were used to elucidate spatial distribution of microbes in the biofilms.

Methods

Culturing conditions

Two sets of experiments were carried out, one using three pure methanogen cultures as seed for the biofilm development and the other using cells from an anaerobic mesophilic granular sludge from an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB), used to treat domestic sewage.

The three pure methanogen cultures: *Methanobacterium formicicum* (DSM 1535); *Methanosaeta concilli* (DSM 3671) and *Methanosarcina barkeri* (DSM 800); were obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Germany). Stock cultures were cultivated according to DSM protocols (available on the internet) for 30 days. After this period, 30 ml of each culture were put together in a chemostat containing 410 ml of culture medium containing 0.5 g/L NH_4Cl , 0.4 g/L K_2HPO_4 , 0.1 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10.0 ml/L of a trace metal solution and 1.0 ml/L of a 0.1% resazurin solution. After autoclaving the media, 10.0 ml/L of a vitamin solution was added, plus 10 ml/L of a 5% $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ solution. These cells were incubated at 30°C for one month before beginning the experiment. The medium was enriched with 0.32 g/L methanol, 0.68 g/L sodium formate and 4.1 g/L sodium acetate. The trace metal solution contained: 4.5 g/L nitrilotriacetic acid, 0.556 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.086 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.17 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.21 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.19 g/L H_3BO_3 , 0.02 g/L NiCl_2 and 0.01 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. The vitamin solution was composed of 0.002 g/L biotin, 0.002 g/L folic acid, 0.005 g/L thiamine-HCl, 0.005 g/L riboflavin, 0.005 g/L nicotinic acid, 0.005 g/L D-Ca-pantothenate, 0.01 g/L piridoxin-HCl, 0.0001 g/L vitamin B_{12} , 0.005 g/L lipoic acid and 0.005 g/L p-aminobenzoic acid. The culture medium and anaerobic procedures were based on Zinder and Koch (1984) and Vazoller (1995). The chemostat was kept at $30 \pm 3^\circ\text{C}$ with a H_2/CO_2 (80:20) atmosphere.

The anaerobic granular sludge studied was ground before cultivation in order to obtain cells in suspension. These cells were inoculated in 800 ml of culture medium, under anaerobic conditions as described previously. The carbon sources were 1.36 g/L sodium acetate, 1.10 g/L sodium butyrate, 0.68 g/L sodium formate, 0.46 g/L ethanol and 0.32 g/L methanol. These cells were incubated at 30°C for one month before beginning the experiment.

Biofilm reactor and biofilm generation

Biofilms were grown on 8 mm diameter polypropylene and glass coupons inserted into the wall of a modified Robbins Device (MRD; Ruseska *et al.*, 1992). The MRD was connected in a closed loop to a chemostat containing the cells. In the chemostat headspace, N_2/CO_2 (70:30) was introduced from time to time to maintain anaerobic conditions. The chemostat was stirred and fed by adding the carbon sources every 4 days (with a syringe), according to each experiment. The flow rate through the MRD was 9.6 ml/min. In the first experiment, biofilms were grown by seeding the MRD with 1.3×10^{10} cells (containing the three pure methanogen cultures) in a total volume (MRD+chemostat) of 500 ml. Biofilm formation was followed for nine days. In the second experiment (with polypropylene coupons only), biofilms were formed by seeding the MRD with 6.6×10^6 cells of the anaerobic granular sludge in a total volume (MRD+ chemostat) of 600 ml. In this case, biofilm formation was followed for 11 days. Coupons were removed from the MRD and analysed on 7th and 9th days for the experiment with pure cultures, and on 2nd, 4th, 9th and 11th days for the second experiment. Planktonic cells from the chemostat were sampled at time zero, 2nd, 7th and 9th days (for the first experiment), and only at time zero for the second experiment. In both experiments the chemostat and MRD were maintained at $33 \pm 2^\circ\text{C}$.

Table 1 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for in situ hybridization

Probe name	OPD name*	Target group	References
EUB338	S-D-bact-0338-a-A-18	Bacteria domain	Amann <i>et al.</i> , 1990a
ARC915	S-D-Arch-0915-a-A-20	Archaea domain	Amann <i>et al.</i> , 1990b
SRB385	S-Srb-0385-a-A-18	SRB general group	Amann <i>et al.</i> , 1990a
MC1109	S-F-Mcoc-1109-a-A-20	Methanococaceae	Raskin <i>et al.</i> , 1994
MB1174	S-F-Mbac-1174-a-A-22	Methanobacteriaceae	Raskin <i>et al.</i> , 1994
MG1200	S-O-Mmic-1200-a-A-21	Methanomicrobiales	Raskin <i>et al.</i> , 1994
MSMX860	S-O-Msarc-860-a-A-21	Methanosarcinales	Raskin <i>et al.</i> , 1994

* OPD, oligonucleotide probe database (Alm *et al.*, 1996)

In situ hybridization

The oligonucleotide probes used in this study are listed in Table 1. Probes were 5' end labeled with rhodamine, except for the MSMX860 probe that was labeled with CY3.

Biofilm coupons removed from the MRD, planktonic cells removed from the chemostat and pure methanogen cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline solution (PBS; 0.13 M NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3 mM Na₂H₂PO₄; pH 7.2) for 12 h at 4°C. Samples were washed twice for 5 min in PBS and stored in 50% ethanol/PBS at -20°C before use. In order to analyse biofilm microbial composition using FISH, it was necessary to remove the biofilms from the coupons' surface. In this case biofilm samples were dispersed (henceforth called "dispersed biofilms") by resuspending the sample scraped from a coupon in 100 µl of 0.1% Na-pyrophosphate in PBS in a Thorton sonic bath (Thorton-Inpec eletronica Ltda, SP, Brazil) for 10 min, after fixation and washing. These samples were then stored in 50% ethanol/PBS as described above. Aliquots of 1 µl were spotted onto glass slides and dried for 20 min at 45°C. Coating of the glass slides with gelatin was omitted. For those biofilms that were fixed on the coupon (intact biofilms), before the hybridization, they were dried for 30 min at 45°C in order to increase adhesion to the coupon throughout the hybridization protocol. Then, all samples were dehydrated further in 50%, 80% and 100% ethanol for three minutes each. The pure methanogen cultures were hybridized with the four specific methanogenic probes in order to have the positive and negative controls for these probes.

For the EUB338, ARC915 and SRB385 probes, hybridizations were performed following the protocol of Hahn *et al.* (1992), in 9 µl of hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM EDTA, 0.01% SDS) and 1 µl of the probe (final concentration of 25 mM). The hybridizations were carried out in humid chambers at 45°C for 2 h. The hybridization stringency was adjusted by adding formamide to the hybridization buffer (20% for ARC915, 30% for SRB385, and 0% for EUB338). Washing was carried out for 20 min at 48°C in hybridization buffer (differing only in the NaCl concentration: 0.225 M for ARC915 and 0.08M for SRB385). For the methanogenic probes, hybridizations were performed following the protocol of Raskin *et al.* (1994), in 9 µl of hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.1% SDS+40% formamide). Washing was carried out at 37°C for 30 min in the same hybridization buffer. Slides were washed briefly in ddH₂O to remove salts, stained with 10 µl of a 20 µg/µl solution of DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, sigma), washed briefly in ddH₂O, air dried, and mounted with a glycerol/PBS (20/80) solution with a pH ≥8.5.

Samples were examined with an Olympus BH2-RFCA fluorescence microscope using filter set UG-1 for DAPI stained samples and filter BP545 for rhodamine and CY3 stained samples. Cell counts were done in accordance with Snaird *et al.* (1997). For each probe and sample, between 500 and 1,000 DAPI-stained cells and the respective hybridized cells in

10 to 20 independent microscopic fields were counted. Depth studies on intact biofilms hybridized in the above manner were carried out on a Biorad MRC-1024-UV with a Zeiss axiovert 1.4 100 $\times$ confocal laser-scanning microscope (CLSM). Serial confocal images were scanned at 0.18–0.36 μ m steps and saved as a digital image. The image software used was lasersnap (version 2.1a).

Results and discussion

First experiment

In the experiment using pure methanogen cultures the initial inoculum was estimated based on the chemostat composition in the first day (Figure 1). We found that the inoculum was composed of 85% *Methanobacterium formicicum* cells, detected with the MB1174 probe, and 15.2% ($\pm 26.4\%$) *Methanosaeta concilli* and *Methanosarcina barkeri* cells, both detected with the MSMX860 probe. The composition changed significantly. In the beginning the inoculum had 100% of archaeal cells. After two days this percentage decreased, since the EUB338 probe detected 33.3% ($\pm 23.9\%$) of bacterial cells. The number of cells detected with the EUB338 probe continued to increase to 76.2% ($\pm 24.4\%$) on day 7. Thus, archaeal cell numbers decreased in the chemostat from 100% (in the beginning) to 26.8% ($\pm 12.4\%$) on day 9. Since the MRD was open under asepsis condition, to remove the coupons, it is possible that the contamination came from one of the methanogen cultures.

Based on probe hybridization, it seems that the biofilms developed after seven and nine days are composed mainly of archaeal cells (Figure 2). In the archaeal population, *Methanobacterium formicicum* cells (detected with the MB1174 probe) predominated in all the biofilms. The relative abundance of these cells varied from 40% (biofilm on polypropylene coupon at day 7) to 87% (biofilm on polypropylene coupon at day 9). Cells hybridizing

Figure 1 Microbial community composition in the chemostat at time zero (inoculum), chemostat 2d, 7d and 9d (chemostat after 2, 7 and 9 days of experimental time), determined by *in situ* hybridization. Relative abundance of cell members of the domains *Bacteria* (EUB338) and *Archaea* (ARC915), the sum of these two percentages (ARC915)+(EUB338), and of two specific methanogenic probes: *Methanobacteriaceae* (MB1174) and *Methanosarcinales* (MSMX860). The relative abundance values indicate the percentage of one specific group of cells, relative to the total DAPI stained population. The error bars indicate the standard deviations

Figure 2 Microbial community composition in dispersed biofilms after seven and nine days of incubation time formed on polypropylene and glass coupon surfaces, determined by *in situ* hybridization. Relative abundance of cell members of the domains *Bacteria* (EUB338) and *Archaea* (ARC915), the sum of these two percentages (ARC915)+(EUB338), and of two specific methanogenic probes: *Methanobacteriaceae* (MB1174) and *Methanosarcinales* (MSMX860). The relative abundance values indicate the percentage of one specific group of cells, relative to the total DAPI stained population. The error bars indicate the standard deviations

to MSMX860 probe, which identified members of the order *Methanosarcinales*, represented a very small group in the biofilms. This group accounted for 0.3% to 2.4% of the DAPI-stained cells, and only *Methanosaeta concilli* cells were observed. *Methanosarcina barkeri* cells, also detected with the MSMX860 probe, were not present in the biofilms after seven and nine days of experimental time, but these cells were observed after two days of experiment in intact biofilms stained with DAPI. Bacterial cells were also found in the biofilms but in small percentages. This group accounted for 9.0% (biofilm on glass after day 7) to 15.4% (biofilm on polypropylene on day 9) of the DAPI-stained cells. As mentioned earlier, these bacterial cells did not belong to the original inoculum, they are contaminants probably derived from one of the pure methanogen cultures. However, their presence later in the experiment indicates that once in the chemostat they can establish themselves in the biofilms.

After nine days of experiment, the developed biofilms were thin, with only two layers of cells at some specific points, and did not cover the entire coupon surface. No complete monolayer covered the entire coupon, and areas free of cells could still be observed. All the three species (*Methanosarcina barkeri*, *Methanosaeta concilli* and *Methanobacterium formicicum*) found colonizing the surface at the beginning of the two days were also found at the end of the incubation period. In the few spots where thickness was observed it was due to the presence of *Methanobacterium formicicum* cells that agglomerated over each other contributing to increased biofilm thickness.

No difference was observed between polypropylene and glass coupons in terms of biofilm colonization. All the three species were found to colonize both surfaces and the average number of cells per coupon were very similar after seven days (1.0×10^4 cells per glass coupon and 1.4×10^4 cells per polypropylene coupon, according to cell-count in two coupons). After nine days the number of cells had not changed significantly (1.9×10^4 cells per glass coupons and 1.1×10^4 cells per polypropylene coupon) suggesting that biofilm

formation stabilizes after seven or nine days. However, to confirm this, longer experiments are needed.

Second experiment

In the experiment using cells of the anaerobic granular sludge the initial inoculum was estimated based on the first day sample. We found that the inoculum was composed of 13.7% ($\pm 7.7\%$) bacterial and 93.3% ($\pm 6.4\%$) archaeal cells as detected with the EUB338 and ARC915 probes, respectively (see Figure 3). The percentage of cells detected with the SRB385 probe was very similar to the value obtained with the EUB338 probe. Hence, bacterial cells found here belong to the sulfate reducing bacteria (SRB) group. However, for the dispersed biofilm sampled at 11 days, the SRB proportion (1.7%) was lower than the number of bacterial cells found (13.1%). SRB cells are very common in anaerobic reactors during organic matter degradation since, together with the methanogens, they catalyze the terminal stages of the anaerobic mineralization of organic compounds (Raskin *et al.*, 1996). Still, according to Raskin *et al.* (1996), recent studies have found large populations of SRB in sulfate-depleted environments. In those studies SRB activity can be related to proton reduction and acetate production and thus they can grow syntrophically with hydrogen- or formate-consuming methanogens, eliminating their need to reduce sulfate. However, in the presence of sulfate, SRB can lead to a competition with methanogen cells for common substrates, as hydrogen or formate. In the present study, since the culture medium did not contain sulfate, the SRB cells present were probably working as acetogens or proton reducers. In this case they were not competing with methanogens, but growing syntrophically. Most of the archaeal cells were members of the family *Metanobacteriaceae*, since most hybridized with MB1174 probe and were morphologically similar to *Methanobacterium* sp. Only 5.6% ($\pm 14.1\%$) of the archaeal cells hybridized with the MSMX860 probe, although only *Methanosarcina* sp. like cells were detected. *Methanococcus*-, *Methanospirillum*- and *Methanobrevibacter*- like cells were not present in the inoculum or in the developed

Figure 3 Microbial community composition in the inoculum and in the dispersed biofilms formed after two (biofilm 2 d), four (biofilm 4 d), nine (biofilm 9 d), and 11 (biofilm 11 d) days of experimental time, determined by *in situ* hybridization. Relative abundance of cell members of the domains *Bacteria* (EUB338) and *Archaea* (ARC915), the sum of these two percentages (ARC915+EUB338), SRB group (SRB385), and of four specific methanogenic probes, *Methanobacteriaceae* (MB1174), *Methanococcaceae* (MC1109), *Methanomicrobiales* (MG1200) and *Methanosarcinales* (MSMX860). The relative abundance values indicate the percentage of one specific group of cells, relative to the total DAPI stained population. The error bars indicate the standard deviations

biofilms since hybridization with MC1109 and MG1200 probes (specific for the family *Methanococcaceae* and order *Methanomicrobiales*, respectively) was negative.

Biofilms were also predominantly formed by members of the family *Methanobacteriaceae*. As detected by the MB1174 probe, the relative abundance of *Methanobacteriaceae* varied from 74.6% ($\pm 12.8\%$) in biofilms with two days of incubation time to 85.1% ($\pm 9.1\%$) in biofilms after 11 days of incubation time. Members of the order *Methanosarcinales*, detected by the MSMX860 probe, decreased in the biofilm during experimental time. This group accounted for 11.7% ($\pm 21.8\%$) of the DAPI-stained cells, in biofilms after two and four days of incubation, and decreased to 4.5% ($\pm 7.9\%$) and 3.8% ($\pm 9.9\%$) of the DAPI-stained cells in biofilms after 9 and 11 days of incubation time, respectively. Bacterial cells, detected by the EUB338 probe, accounted for 28.4% ($\pm 14.9\%$) to 13.1% ($\pm 9.1\%$) of the DAPI-stained cells, in the biofilms after 2 and 11 days of incubation time, respectively.

The principle of "probe nesting" (according to Raskin *et al.*, 1994) is demonstrated by the combined use of several specific probes and a general probe. The sum of percentages of ARC915 (*Archaea* domain), EUK516 (*Eucarya* domain) and EUB338 (*Bacteria* domain) should equal 100, since all known life forms belong to one of these three domains (Woese *et al.*, 1990). Also, the sum of the percentages of MB1174 (*Methanobacteriaceae*), MSMX860 (*Methanosarcinales*), MG1200 (*Methanomicrobiales*) and MC1109 (*Methanococcaceae*) should equal percentage of ARC915 (*Archaea*). In the present study, the general probe-nesting requirement (the sum of ARC915+EUB338 should equal 100%) was reasonably well met for biofilm samples after nine and 11 days of incubation. However, for samples of inoculum and biofilms after two and four days of incubation the sum was higher than 100%. A possible explanation is that some cells hybridized with ARC915 probe without being members of the *Archaea* domain. These are called false-positives and could have increased the ARC915 percentage. This hypothesis is confirmed by verifying that the sum of the percentages of the four specific methanogenic probes (MB1174+MSMX860+MC1109+MG1200), which circumscribe all known mesophilic methanogens for the three samples mentioned above, was lower than the value found with ARC915 probe. Since environmental conditions did not favor the growth of nonmethanogenic *Archaea* (extreme halophiles, thermoacidophiles, the *Archaeoglobales*, the *Thermococcales*, and the thermophiles placed in the *Crenarchaeota* Kingdom), no archaeal cells other than methanogens were expected to be present in this experiment (and in the anaerobic granular sludge used). An alternative hypothesis is that the percentage of cells hybridized with the four specific methanogenic probes is lower because unknown, non-methanogenic archaeal cells are present. Support for this hypothesis comes from the fact that a number of studies in diverse environments found a wide diversity of undescribed nonmethanogenic *Archaea* (as reviewed in Raskin *et al.*, 1996). The sum of the results obtained by using the four methanogenic probes was relatively close to the result obtained with the *Archaea*-specific probe for samples: inoculum and biofilms with two and four days of age. For biofilm samples taken after 9 and 11 days of incubation time, the percentage of MB1174 (*Methanobacteriaceae*) was higher than the value obtained with ARC915. Probably, in this case, the false-positives occurred, showing signal with the MB1174 probe. In this study, EUK516 probe was not used, since it was known that the anaerobic granular sludge could not contain (or would contain only a very small fraction of) eucaryotic cells.

Microscopic observations revealed that biofilms developed after 11 days of incubation period were of uneven thickness with areas of minimal or no surface coverage and other areas with biofilm thickness of 7.0 to 9.0 μm as can be seen in Figure 4 by using CLSM. Biofilms were predominantly formed by *Methanobacterium*-like cells, probably because this group was the most abundant in the inoculum and these cells were involved in the initial

Figure 4 Biofilm with 11 days formed over polypropylene coupon. Sample stained with DAPI and viewed by CLSM at a 1000-fold magnification

biofilm formation. Results obtained by Raskin *et al.* (1996) suggest that, within the group of hydrogen- (or formate-) utilizing methanogens, *Methanobacteriales* have a competitive advantage over *Methanococcales* and *Methanomicrobiales* when there is no sulfate reduction. A possible cause for this competition pattern is a difference in hydrogen- (or formate-) utilization kinetics for the different methanogenic groups. Thus, the predominance of *Methanobacterium*-like cells in the inoculum and in the anaerobic granular sludge, might be explained by this competition pattern since, in both cases, the growth medium did not contain sulfate.

Conclusions

Results showed that the three species studied, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosaeta concilli* and *Methanosarcina barkeri*, could colonize both glass and polypropylene surfaces, under MRD operation conditions. It was apparent that under the conditions of this experiment there were no differences between hydrophilic and hydrophobic surfaces concerning the methanogenic colonization by these three cultures that are very common in anaerobic bioreactors. Cells originated from granular sludge grown and formed biofilms over polypropylene coupons. The predominant Methanoarchaea was a *Methanobacterium*-like cell, as determined by *in situ* hybridization. The coupon surfaces in both experiments, even after 9 and 11 days, were not completely covered by cells, areas of minimal or no surface coverage being evident. However, biofilms attained in certain areas a thickness of 7.0 to 9.0 μm . Biofilm development started as isolated patches of cells randomly distributed over the coupon surface. The duration of our experiment did not allow the formation of a thick biofilm. The results showed that the modified Robbins Device together with the fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy are suitable tools to study anaerobic biofilm development in different kinds of support materials. Since the support material has a significant influence on the start-up and the efficiency of the anaerobic process in anaerobic fixed film reactors, we expect that this study provided a good perspective for the MRD use in studies of bacterial adhesion and initial development of anaerobic biofilms.

Acknowledgements

We thank FAPESP (São Paulo Research Support Foundation) for support of this research through grant No. 96/09982-3, Federal Medical School of São Paulo, particularly, Prof. Dr. Renato Mortara for the use of CLSM, Prof. Dr. Fazal H. Chaudhry and Dr. Paula Kover for their critical reading of the manuscript.

References

- Alm, E.W., Oerther, D., Larsen, N., Stahl, D.A. and Raskin, L. (1996). The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3557–3559.
- Amann, R.L., Binder, B.G., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl D.A. (1990a). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919–1925.
- Amann, R.L., Krumholz, L. and Stahl, D.A. (1990b). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**, 762–770.
- Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–169.
- Hahn, D., Amann, R.L., Ludwig, W., Akkermans, A.D.L. and Schleifer, K.H. (1992). Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 879–887.
- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A. (1994). Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1241–1248.
- Raskin, L., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A. (1996). Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3847–3857.
- Ruseska, I., Robbins, J. and Costerton, J.W. (1982). Biocide testing against corrosion-causing oil-field bacteria helps control plugging. *Oil & Gas Journal*, **8**, 253–264.
- Snaird, J., Amman, R., Huber, L., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1997). Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2884–2896.
- Vazoller, R.F. (1995). Microbial ecosystem evaluation of an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating vinasse under thermophilic conditions. PhD thesis, Department of Hydraulic and Sanitation, University of São Paulo, São Carlos School of Engineering. (in Portuguese).
- Zinder, S.H. and Koch, M. (1984). No-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, **138**, 263–272.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576–4579.

Comparison of anaerobic biofilms microbial composition developed on two different surfaces using Fluorescence *in situ* hybridization

Juliana C. Araujo,^{1*} Renato Mortara,² José R. Campos,¹ and
Rosana F. Vazoller¹

Departamento de Hidraulica e Saneamento, Universidade de São Paulo (USP), Escola de Engenharia de São Carlos, Av.
Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos-SP, 13566-590¹ and Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, UFESP, Rua Botucatu 862, São Paulo-SP, 04023-062,² Brazil.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with domain and group specific probes that target intracellular 16S rRNA and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were used to investigate the microbial composition of anaerobic biofilms developed on both polypropylene (hydrophobic) and glass (hydrophilic) surfaces. Cells from an anaerobic granular sludge, were used to seed an anaerobic biofilm reactor containing both surfaces and biofilms were allowed to develop for 22 days. Biofilm and inoculum samples showed nearly the same microbial composition, both were dominated by hydrogenotrophic methanogenic *Archaea* related to the *Methanobacteriaceae* as detected by the specific probe (MB1174). This group accounted for 44 to 90% of the DAPI-stained cells and morphologically resembled *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter*. Cells detected with the *Methanomicrobiales* specific probe (MG1200) accounted for 2–18.0% of the DAPI-stained cells in the inoculum and 0.1–2.0% in the biofilm samples. These cells were morphologically similar to *Methanospirillum*, also a hydrogenotrophic methanogen. No cells were detected by the *Methanosarcinaceae* specific probe (MSMX860). Cells which hybridized to the *Bacteria* specific probe (EUB338) accounted for the remaining 3–18% of the DAPI-stained cells. The results showed that the hydrogenotrophic methanogenic *Archaea* cells which predominated in the inoculum and also dominated the biofilms that developed on both surfaces (glass and polypropylene). Our data suggest that the hydrophobicity of the support material did not influence the development and the microbial composition of anaerobic biofilms.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Hidraulica e Saneamento, Universidade de São Paulo (USP), Escola de Engenharia de São Carlos, Av. Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos-SP, 13566-590, Brazil. E-mail: juli.calabria@ig.com.br.

Anaerobic microbial communities have been extensively investigated using conventional microbiological techniques, including selective enrichments, pure culture isolations, most probable number estimations, and phenotypic characterizations. However, the limitations of these techniques has meant that natural and engineered anaerobic systems remain poorly understood (39). More recently, molecular biology techniques have been used to circumvent some of these limitations.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes has become, over the past decade, a much-used tool to detect and study microorganisms in their natural habitats (5). The use of 16S and 23S rRNA sequences has been especially valuable since ribosomes are ubiquitous, may be present in high numbers, and sequence divergences reflect phylogenetic relationships. Thus, very general or very specific probes can be designed to target various taxonomic levels from domain to species. Molecular tools and particularly FISH, are valuable techniques in probing wastewaters treatment systems for their potential to identify and quantify microbial populations throughout the different layers of a biofilm in a rapid and precise way without cell cultivation. FISH has been previously used to detect specific groups of *Bacteria* and *Archaea* in order to characterize microbial populations in anaerobic biofilms (4, 6, 39) and anaerobic granular sludge (19, 20, 32, 45). FISH combined with confocal laser scanning microscopy have been used to examine the spatial distribution of cells in a variety of studies (6, 24, 35, 44).

In this study FISH was used to quantify the microbial community of anaerobic biofilms formed on polypropylene and glass surfaces in a biofilm reactor. We were particularly interested in comparing the biofilm microbial composition on a hydrophilic (glass) versus a hydrophobic (polypropylene) surface.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum preparation for biofilm development. Anaerobic cells were sampled from a mesophilic granular sludge from an anaerobic sequential batch reactor treating a synthetic wastewater which mimics sewage composition. Granular sludge (150.0 ml) was crushed before cultivation and inoculated in a serum bottle flask (2 liter capacity) with 850 ml of sterile culture medium as described elsewhere (49, 55). The trace metal and vitamin solutions were prepared as described previously (6). Culture medium contained 0.5 g/L NH_4Cl , 0.4 g/L K_2HPO_4 , 0.1 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10.0 ml/L of a trace metal solution, 1.0 ml/L of a 0.1% resazurin solution, 10.0 ml/L of a vitamin solution, 10 ml/L of a 5% $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ solution, and 10 ml/L of a 10% NaHCO_3 solution under $\text{N}_2\text{-CO}_2$ (70/30, vol/vol) atmosphere. The final pH was 7.0. Media was enriched with 2.7 g/L sodium acetate, 1.10 g/L sodium butyrate, 0.68 g/L sodium formate, 0.96 g/L sodium propionate, 0.46 g/L ethanol and 0.32 g/L methanol as carbon sources. The sludge flask cultivation was kept at $30 \pm 3^\circ\text{C}$ with a N_2/CO_2 (70:30) atmosphere for 143 days without shaking. During all the incubation period cells were fed once a week by adding the carbon sources (the same amount every time as mentioned above). Cells growth and activity were checked by measuring methane production in the biogas. On the day before beginning the experiment the anaerobic cell culture (720.0 ml) was transferred to a sterile culture vessel (1 liter capacity).

Biofilm reactor and biofilm generation. Biofilms were grown on 8 mm diameter coupons of polypropylene, a hydrophobic surface with the water contact angle of $93 \pm 2^\circ$ (50, 51) and glass, a hydrophilic surface with the water contact angle of $12 \pm 2^\circ$ (26), inserted into the wall of a biofilm reactor called “modified Robbins Device” (MRD; 31, 41) connected in a closed loop to a culture vessel containing the inoculum (Fig. 1). The MRD was seeded with 3.3×10^{11} cells in a total volume (MRD+culture vessel) of 720 ml. Media was pumped through the MRD at 9.6 ml/min. The culture vessel was stirred continuously, gassed

periodically with N_2/CO_2 (70:30) to maintain anaerobic conditions and additional carbon sources (as above) were added every 4 days. Both MRD and culture vessel were maintained at $33^{\circ}C$. Glass coupons were removed from the MRD and analysed on 1st, 6th and 9th days, while polypropylene coupons were taken at 1st, 5th, 9th, 15th and 22nd days. At each sampling day, two coupons were removed from the MRD and analysed; one biofilm was left intact and the other was removed from the coupon surface. Planktonic cells from the culture vessel were sampled at time zero and on 1st, 9th, 15th, 20th and 22nd days.

Oligonucleotides. The oligonucleotide probes used for FISH are listed in Table 1. Probes were 5' end labeled with rhodamine, except for the MSMX860 probe, specific for the family *Methanosarcinaceae* that was labeled with Cy3. For each sample, two negative controls were used: one of these controls was performed to assess nonspecific binding with rhodamine-labelled probe NON338, and the other, leaving out the probe, was used to monitor autofluorescence.

FISH. Biofilm coupons and planktonic cells from the culture vessel were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS; 130mM NaCl, 7mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 ; pH 7.2) for 12 h, at $4^{\circ}C$. Samples were washed three times for 5 min in PBS and stored in 50% ethanol/PBS at $-20^{\circ}C$ until used. In order to analyse and quantify biofilm microbial composition using FISH, it was necessary to remove the biofilms from the coupon surface. For this, biofilm samples were dispersed by suspending the sample scraped from each coupon in 100 μ l of 0.1% Na-pyrophosphate in PBS in a Thorton sonic bath (Thorton-Inpec eletronica Ltda, SP, Brazil) for 10 min, after fixation and washing. Aliquots of 1 μ l were spotted onto glass slides and dried for 20 min at $45^{\circ}C$. Coating of the glass slides with gelatin was omitted. For those biofilms that were fixed on the coupon, intact biofilms, before the hybridization, they were dried for 30 min at $45^{\circ}C$ in order to increase adhesion to the coupon throughout the hybridization protocol. Then, all samples were dehydrated further in 50%,

80% and 100% ethanol for three minutes each. For biofilms formed on glass and polypropylene coupons after the 1st day, the EUB338 values found were determined by hybridizing the intact biofilms on the coupon. Hybridizations were performed as described previously (6, 38). For the probe NON338 (an antisense EUB338 probe), hybridization was performed at 46⁰ C for 1.5 h with the same hybridization and washing buffers as that used for ARC915 probe (18). Double probing was performed using both MB1174 and ARC915 probes in the same well, to enhance signal intensity and minimize problems of low rRNA content or reduced target availability. In this case, the probe requiring a higher concentration of formamide (MB1174) for higher stringency was hybridized and washed first, followed by the probe for the second hybridization (ARC915). After hybridization, slides were stained with 10 μ l of a 10 μ g/ml solution of DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, sigma), washed briefly in ddH₂O, air dried, and mounted with a glycerol/PBS (20/80) solution with a pH $\geq$ 8.5.

Samples were examined on an Olympus BH2-RFCA fluorescence microscope using filter sets specific for DAPI or rhodamine (and Cy3). Cell counts were done after image capture on a 17-inch color screen using a color digital camera set (Olympus U-PMTUC) at exposure times of 0.08 s for phase-contrast and 0.5-4 s for epifluorescence. Digital images of rhodamine and DAPI-fluorescence from the same microscopic field were taken and temporarily stored before counting. For each sample, standard errors of the mean (SE) were calculated after arcsine transformation of the data (36, 53) based on enumerating at least 10 microscopic fields per well, or from 500 to 1,000 DAPI-stained cells. Counting results were always corrected by subtracting values obtained with the probe NON338. For the intact biofilms, total cell counts were done in 20 microscopic fields for each coupon. Depth studies on intact biofilms, hybridized or only DAPI-stained as described above, were done only for biofilms developed on polypropylene coupons. They were carried out on a BioRad MRC 1024UV confocal system coupled to a Zeiss Axiovert microscope using a 100x

Planapochromatic oil immersion 1.4 NA objective (CLSM). Serial confocal images were collected by Kalman averaging 5 frames (512x512 pixels) at 0.18 – 0.36 μm steps using an aperture (pinhole) of 2.0 mm maximum. The image acquisition and processing software was laserssharp (version 2.1a).

RESULTS

Culture vessel composition. On the day before beginning the experiment, the atmosphere of the sludge flask was measured and accounted for 73.0% of methane composition. Therefore, methanogenic *Archaea* cells in the culture vessel were active and thus were able to be tested in the MRD. The inoculum was composed of 3.0% (SE= 1.0%, $n=13$) bacterial and 95.0% (SE= 7.9%, $n=12$) archaeal cells as detected with the EUB338 and ARC915 probes, respectively (Fig. 2). The number of bacterial cells detected with EUB338 probe varied from 3.0% (SE=1.0%, $n=13$) on the beginning, to 17.0% (SE=2.0%, $n=15$) of the DAPI-stained cells on day 9 and stabilized around this value till the end of the experiment. The majority of the archaeal cells (around 44 to 90% of the DAPI-stained cells) were members of the family *Methanobacteriaceae* since most hybridized with MB1174 probe and morphologically resembled *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter*. The remaining archaeal cells were members of the order *Methanomicrobiales* (*Methanogenium* relatives) detected by MG1200 probe, comprising around 10.4% (SE= 2.0%, $n=12$) at the onset decreasing to 3.0% (SE=1.1%, $n=11$) of the DAPI-stained cells on day 22 and these cells resembled *Methanospirillum*. Using *Methanosarcinaceae* specific probe (MSMX860) cells were not detected, although very few cells morphologically similar to *Methanosaeta* were observed in the culture vessel. Probably they occurred under the FISH detection limit which is 10^4 cels.mL⁻¹ (5). The hybridization to the *Methanococcaceae* specific probe (MC1109) was negative for all samples and thus is not shown in Fig. 2. The percentage of cells detected with

the SRB385 probe, specific for the delta subdivision sulfate reducing and mesophilic bacteria (SRB-group), did not change significantly during experimental time. SRB group accounted for 5.0% (SE=1.0%, $n=10$) at the onset decreasing to 3.0% (SE= 1.0%, $n=11$) of the DAPI-stained cells on day 22. The remaining bacterial cells which hybridized with EUB338 probe were rod-shaped cells with terminal spore (Fig. 3).

Biofilm composition. Based on probe hybridization, the biofilms developed in the course of our experimental conditions are composed mainly of archaeal cells (Figures 4 and 5). The hydrogenotrophic methanogenic *Archaea* related to the *Methanobacteriaceae* prevailed in all the biofilms. This group accounted for 43.0% (SE=3.7%, $n= 15$) to 99.6% (SE=2.8%, $n= 9$) of the DAPI-stained cells and morphologically resembled *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter*. Another hydrogenotrophic methanogen were detected with *Methanomicrobiales* specific probe (MG1200). These cells were morphologically similar to *Methanospirillum* and represented around 0.3% (SE=0.2%, $n= 8$) to 2.2% (SE=0.7%, $n= 10$) of the DAPI-stained cells. No cells were detected with the *Methanosarcinaceae* specific probe (MSMX860), although very few cells resembled *Methanosaeta* were observed in biofilms developed after 5, 9 and 15 days of experimental time.

Bacterial cells percentages detected by the EUB338 probe changed significantly in the biofilms during the experimental time. The biofilm formed after the 1st day on polypropylene coupon was composed of 19.0% (SE=1.4%, $n=20$) of bacterial cells while in the biofilm on glass were detected only 3.2% (SE=0.8%, $n=16$) of the DAPI-stained cells. Biofilms developed after 5 and 6 days of experimental time, respectively for polypropylene and glass surfaces showed the greatest numbers for *Bacteria*, 16.0% (SE=2.0%, $n=9$) and 14.5% (SE=3.0%, $n=9$) of the DAPI-stained cells, respectively. For biofilms developed after 9 (on both polypropylene and glass surfaces) and 15 days no bacterial cells were detected, while in the 22 day old biofilms they accounted with 7.6% (SE=2.3%, $n=14$) of the DAPI-stained

cells. The SRB cells detected with SRB385 probe were present in the biofilms in small amount. They accounted for 4.0% of the DAPI-stained cells for biofilm developed after 6 days on glass surface to 1.0% of the DAPI-stained cells for biofilm on polypropylene at the 22nd day.

Biofilm examination. Microscopic exams revealed that biofilm development on both surfaces began as isolated patches of cells randomly distributed over the coupon. CLSM exams revealed that biofilms developed after 5, 9 and 14 days of incubation period were of uneven thickness with sites covered by a few cells next to areas where the biofilm attained a thickness of 2.8 μm , 7.0 to 15.0 μm and 4.0 to 5.0 μm , respectively. Furthermore, in the 5-day-old biofilm bacterial cells (detected with probe EUB338) were present over the whole biofilm depth (data not shown). Biofilms developed on polypropylene after 22 days were the thickest, which was around 22.0 μm , but areas with 7.0 μm were also observed in the same coupon (Fig. 6). Also, even after 22 days biofilms did not cover the entire surface and were not compact, empty spaces resembling pores were observed (Fig.6).

DISCUSSION

FISH procedure was very efficient to evaluate the microbial community of the culture vessel and biofilm samples developed over 22 days. Biofilm and culture vessel samples showed nearly the same microbial composition, both were dominated by hydrogenotrophic methanogenic *Archaea* related to the *Methanobacteriaceae* as detected by the specific probe (MB1174) (figures 2, 4 and 5). This group accounted for 44% to 90% of the DAPI-stained cells and morphologically resembled *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter*. Cells which hybridized to the *Bacteria* specific probe (EUB338) accounted for the remaining 3-18% of the DAPI-stained cells. These bacterial cells which are rod-shaped with a terminal spore (Fig. 3) could be members of the genera *Clostridium*, since it includes species of spore-

forming bacteria. They might be fermentative or obligate proton reducers bacteria oxidizing butyrate or propionate, since both organic compounds were added to the culture vessel.

The principle of “probe nesting” (38) is demonstrated by the combined use of several specific probes and a general probe. The sum of the percentages of MB1174 (*Methanobacteriaceae*), MSMX860 (*Methanosarcinaceae*), MG1200 (*Methanogenium* relatives) and MC1109 (*Methanococcaceae*), which circumscribe all known mesophilic methanogens, should be equal to percentage of ARC915 (*Archaea*). In the present study the sum of the percentages of the two specific methanogenic probes was relatively close to the result obtained with the probe ARC915 for all the culture vessel samples, except for the one obtained on day 22 (Fig.2). In this case, the sum (81%) was much higher than the ARC915 value (48.3%), indicating that some cells hybridized with MB1174 probe and did not hybridize with ARC915. This could be related to the fact that methanogenic *Archaea* cells, morphologically resembled *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter*, showed a very weak fluorescent signal with ARC915 and with MB1174 in separate hybridizations, and sometimes they could not be counted. However, in order to improve this signal and eliminate problems with target availability we did double probing using simultaneously MB1174 probe (first) and ARC915 (second); hence all the members of the family *Methanobacteriaceae* could be detected. But, for those archaeal cells hybridized only with ARC915 probe, the fluorescent signal could not be improved. Thus it is likely that the archaeal cells percentage for the 22nd day sample was similar to MB1174 percentage (77.6%, S.E.=8.7%)

For biofilm samples developed after 5, 6, 9, 15 and 22 days of incubation time the sum of the percentages of the two specific methanogenic probes (MB1174 + MG1200) was almost equal to the value found with ARC915 probe (Figures 4 and 5). Then, the principle of probe nesting (38) was reasonably well met for these samples. It is worth noting that the experimental conditions did not favor the growth of nonmethanogenic *Archaea* (extreme

halophiles, thermoacidophiles, the *Archaeoglobales*, the *Thermococcales*, and the thermophiles placed in the *Crenarchaeota* Kingdom). Thus, no archaeal cells other than methanogens were expected to be present in this experiment, or in the anaerobic granular sludge used as inoculum as well. It is also important to mention that probably not all bacterial cells were detected by the EUB338 probe. Recent reevaluations of probe EUB338 coverage based on all publicly available 16S rRNA sequences, indicated that important bacterial phyla, most notably the *Planctomycetales* and *Verrucomicrobia*, as well as several green non-sulfur bacteria and members of the candidate phylum OP11 are missed by this probe (12). All the *Planctomycetales* species already described are freshwater or marine bacteria (23, 42) but members of this phylum were detected in activated sludge (9, 33, 47) and in terrestrial habitats (28, 54). Members of the phylum *Verrucomicrobia* occur in aquatic environments (22,43,47,56), sediments (52) and also in soils (15, 25, 28). In a biofilm sample from a wastewater treatment plant (48) around 68-90% of the DAPI-stained cells were detected with the EUB338 probe. Thus, around 10% could be members of the phyla *Planctomycetales* and/or *Verrucomicrobia* in this specific sludge or could be members of the *Archaea* domain since ARC915 probe was not used in this study. In another biofilm sample from a sewage treatment plant, nearly all DAPI-stained cells were detected by in situ hybridization when the three probes, EUB338, EUB338-II, EUB338-III, were applied in combination (12). In the present study, except for samples: planktonic cells on days 9 and 22, biofilms on day 6 (developed on glass) and 9 (developed on both surfaces), for all the others the sum of the *Bacteria*- and *Archaea*- specific probe counts were around 100% or even greater (Figures 2, 4 and 5). Therefore might be unlikely that members of the phyla *Verrucomicrobia* and *Planctomycetales* were present in our samples, since in the inoculum and in the first two days of the experiment, 100% of the DAPI stained cells were detected with probes ARC915 and EUB338.

No significant difference was observed between hydrophobic (polypropylene) and hydrophilic (glass) surfaces in terms of biofilm microbial composition, as shown in Figure 4 and 5, respectively. The hydrogenotrophic methanogenic *Archaea* cells which predominated in the inoculum and also dominated the biofilms that developed on both surfaces (glass and polypropylene). Therefore, the hydrophobicity of the support material did not influence the development and the microbial composition of anaerobic biofilms as one could expect considering previous observations (50, 51) that hydrophobic surfaces favor adhesion of methanogenic cells. Attachment studies of tissue cells of several types (10, 21, 30) have indicated that many show a preference for negatively charged, hydrophilic surfaces, in contrast to what was found in reference (17) and contrary to what is expected if electrostatic and dispersion forces are the dominant factors in cell adhesion (17). Thus, our results are in agreement with the conclusions of other studies (7, 8) that showed that the initial processes in biofilm formation often depend more on the roughness than on hydrophobicity or the charge of the solid surface.

Both archaeal (hydrogenotrophic methanogens) and bacterial cells were colonizing the surfaces and were distributed throughout the biofilm. Thus, the structure of the anaerobic biofilms developed in this study is different and can not be compared with that observed for granules (44). They observed that mesophilic and thermophilic granules showed a multiple-microbial-layer structure in which the outer layer was dominated by bacterial cells and the inner layer consisted mainly of archaeal cells.

CLSM examinations of the anaerobic biofilms developed in this study revealed that they were of uneven thickness and had pores (Fig. 6) These features are consistent with the water channel model described by Costerton et al (11). The existence of an intricate system of channels has already been demonstrated in anaerobic biofilms through electron microscopy examinations using thin sectioning techniques (40). Methanogenic biofilms produce vast

amounts of gas, which might have caused the sponge-like structure (13). Channel structures in biofilms may facilitate the transport of nutrients between the bulk solution and the inner deep layers (13,27).

ACKNOWLEDGMENTS

We are sincerely grateful to Dr. Kevin Purdy (Molecular Biology Unit, Natural History Museum, London, UK) for critical reading of the manuscript.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP through the research grant 96/09982-3.

REFERENCES

1. Alm, E. W., D. Oerther, Larsen N., D. A. Stahl and L. Raskin. 1996. The Oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3557-3559.
2. Amann, R.I., B.G. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl. 1990a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
3. Amann, R.I., L. Krumholz, and D.A. Stahl. 1990b. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
4. Amann, R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key, and D.A. Stahl. 1992. Molecular and Microscopic Identification of Sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 614-623.
5. Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
6. Araujo, J.C., G. Brucha, J.R. Campos, and R.F. Vazoller. 2000. Monitoring the Development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Wat. Sci. Tech.* 41: 69-77.
7. Baker, J.H. 1984. Factors affecting the bacterial colonization of various surfaces in a river. *Can J. Microbiol.* 30: 511-515.
8. Beefink, H.H. and P. Staugaard. 1986. Structure and dynamics of anaerobic bacterial aggregates in a gas-lift reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1139-1146

9. **Bond P.L., P. Hugenholtz, J. Keller, and L.L. Blackall.** 1995. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1910-1916.
10. **Carter, S.B.** 1967. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature (London)* **213**: 256-260.
11. **Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, D. De Beer, and G. James.** 1994. Biofilms: the customized microniche. *J. Bacteriol.* **176**: 2137-2142.
12. **Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer, and M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444.
13. **DeBeer, D., P. Stoodley, F. Roe, and Z. Lewandowski.** 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transfer. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 1131-1138.
14. **Devereux, R., M.D. Kane, J. Winfrey, and D.A. Stahl.** 1992. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 601- 609.
15. **Felske A., A. Wolterink, R. Van Lis, and A.D.L. Akkermans.** 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse a grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 871-879.
16. **Ficker M., K. Krastel, S. Orlicky, and E. Edwards.** 1999. Molecular characterization of a Toluene-Degrading methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5576-5585.
17. **Fletcher, M., and G.I. Loeb.** 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine Pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 67-72.
18. **Hahn D., R. I. Amann, W. Ludwig, A. D. L. Akkermans, and K.H. Schleifer.** 1992. Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 879-887.
19. **Harmsen H.J.M., A.D.L. Akkermans, A.J.M. Stams, and W.M. de Vos.** 1996. Population Dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2163-2168.
20. **Harmsen H.J.M., H.M.P. Kengen, A.D.L. Akkermans, A.J.M. Stams, and W.M. de Vos.** 1996. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by *in situ* hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1656-1663.

21. Harris, A. 1973. Behaviour of cultured cells on substrata of variable adhesiveness. *Exp. Cell. Res.* 77: 285-297.
22. Hiorns W.D., B.A Methé, S.A. Nierzwicki-Bauer, and J.P. Zehr. 1997. Bacterial Diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2957-2960.
23. Hirsch P., and M. Müller. 1985. *Planctomyces limnophilus* sp. nov., a stalked and budding bacterium from freshwater. *System. Appl. Microbiol.* 6: 276-280.
24. Imachi H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. 2000. Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3608-3615.
25. Janssen P.H., A. Schuhmann, E. Mörschell, and F.A. Rainey. 1997. Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the *Verrucomicrobiales* lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1382-1388.
26. Jucker, B.A., H. Harms, and A.J.B. Zehnder. 1996. Adhesion of the Positively Charged Bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to Glass and Teflon. *Journal of bacteriology*, 178: 5472-5479.
27. Lawrence, J.R., G.M. Wolfaardt and D.R. Korber. 1994. Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Appl. Environ. Microbiol* 60: 1166-1173
28. Liesack W., and E. Stackebrandt. 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174: 5072-5078.
29. Manz W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
30. Maroudas, N.G. 1975. Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *J. Theor. Biol.* 49: 417-424.
31. McCoy, W.F., Bryers, J.D., Robbins, J., Costerton, J.W. 1981. Observations on Biofilm Formation. *Canadian Journal of Microbiology*. 27: 901-917.
32. Mobarry B.K., M. Wagner, V. Urbain, B.E. Rittman, D.A. Stahl. 1996. Phylogenetic probes for analysing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2156-2162.

33. Neef A., R. Amann, H. Schlesner, and K.-H. Schleifer. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of Planctomycetes with 16S rRNA- targeted probes. *Microbiology*. **144**: 3257-3266.
34. Oude Elferink S.J.W.H., H.T.S. Boschker, and A.J.M. Stams. 1998. Identification of sulfate reducers and Syntrophobacter sp. in anaerobic granular sludge by fatty acid biomarkers and 16S rRNA probing. *Geomicrobiol. J.* **15**: 3-17.
35. Power M.E., J.C Araujo, J.R. van der Meer, H. Harms, and O. Wanner. 1999. Monitoring sulfate-reducing bacteria in heterotrophic biofilms. *Wat Sci. Tech.* **39**: 49-56.
36. Purdy K.J., Nedwell, D.B., Embley T.M., and S. Takii. 1997. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the occurrence and selection of sulfate-reducing bacteria in response to nutrient addition to sediment slurry microcosms from a japanese estuary. *FEMS Microbiology Ecology*. **24**:221-234.
37. Raskin L., J.M. Stromley, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl. 1994a. Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1232-1240.
38. Raskin L., L.K. Poulsen, D.R. Noguera, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl. 1994b. Quantification of Methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1241-1248.
39. Raskin L., B.E. Rittmann, and D.A. Stahl. 1996. Competition and Coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3847-3857.
40. Robinson, R.W., D.E. Akkin, R.A. Nordstedt, M. Thomas, and H.C. Aldrich. 1984. Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 127-136.
41. Ruseska I., J. Robbins, and J.W. Costerton. 1982. Biocide testing against corrosion-causing oil-field bacteria helps control plugging. *Oil & Gas Journal*. **8**: 253-264.
42. Schlesner H. 1986. *Pirella marina* sp. Nov., a budding, peptidoglycan-less bacterium from brackish water. *System. Appl. Microbiol.* **8**: 177-180.
43. Schlesner H. 1987. *Verrucomicrobium spinosum* gen. Nov., sp. nov.: a fimbriated prosthecate bacterium. *System. Appl. Microbiol.* **10**: 54-56.
44. Sekiguchi Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada. 1999. Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and termophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 65: 1280-1288.
45. Snaidr J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2884-2896.
 46. Stahl D.A. and R.I. Amann. 1991. Development and application of nucleic acid probes. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, v. 8. John Wiley & Sons, Ltd., London, England, p. 207-248.
 47. Staley J.T., J.A.M. De Bont, and K. De Jonge. 1976. *Prostheco bacter fusiformis* nov. gen. Et sp., the fusiform caulobacter. *Antonie van Leeuwenhoek.* **42**: 333- 342.
 48. Stoffels, M., R. Amann, W. Ludwig, D. Hekmat, and K.-H. Schleifer. 1998. Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 930-939.
 49. Vazoller R.F. 1995. *Microbial ecosystem evaluation of an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating vinasse under thermophilic conditions*. PhD thesis, Departamento de Hidraulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos. (in Portuguese).
 50. Verrier, D., B. Mortier, and G. Albagnac. 1987. Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnol Lett.* **9**: 735-740.
 51. Verrier D., B. Mortier, H.C. Dubourguier, and G. Albagnac. 1988. Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilms. In: *Anaerobic Digestion 1988*, 5th International Symposium on Anaerobic Digestion, E.R. Hall & P.N. Hobson (ed.) Pergamon Press, pp.61-69.
 52. Wise M.G., J.V. Mc Arthur, and L.J. Shimkets. 1997. Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1505-1514.
 53. Zar, J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*, 3rd edn. Prentice-Hall, London.
 54. Zarda B., D. Hahn, A. Chatzinotas, W. Schönhuber, A. Neef, R.I. Amann, and J. Zeyer. 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. *Arch. Microbiol.* **168**: 185-192.
 55. Zinder, S. H. and M. Koch 1984. No-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology.* **138**: 263-272.

56. Zwart G., R. Huismans, M.P. Van Agterveld, Y. Van de Peer, P. De Rijk, H. Eenhoorn, G. Muyzer, E.J. Van Hannen, H.J. Gons, and H.J. Laanbroek. 1998. Divergent members of the bacterial division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake. FEMS Microbiol. Ecol. 25: 159-169.

Table 1. 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for *in situ* hybridization.

Probe name	OPD name*	Target group	Sequence (5' to 3')	Reference
NON338	S-D-bact-0338-a-S-18	Negative control	ACTCCTACGGGAGGCAGC	29
EUB338	S-D-bact-0338-a-A-18	<i>Bacteria</i> domain	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	2
ARC915	S-D-Arch-0915-a-A-20	<i>Archaea</i> domain	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	46
SRB385**	S- Srb-0385-a-A-18	Gram-negative SRB	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	2
MC1109	S-F-Mcoc-1109-a-A-20	<i>Methanococcaceae</i>	GCAACATAGGGCACGGGTCT	37
MB1174	S-F-Mbac-1174-a-A-22	<i>Methanobacteriaceae</i>	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	37
MG1200	S-O-Mmic-1200-a-A-21	<i>Methanomicrobiales</i> (<i>Methanogenium</i> relatives)	CGGATAATTCGGGGCATGCTG	37
MSMX860	S-F-Msarc-860-a-A-21	<i>Methanosarcinaceae</i>	GGCTCGCTTCACGGCTTCCCT	37

* OPD, oligonucleotide probe database (1).

**Several nontarget organisms share the target sequence of this probe for gram-negative sulfate-reducing bacteria (4), while some target organisms (e.g., *Desulforhabdus amnigenus*) have several mismatches with the probe (34).

FIG. 1. Modified robbins device and culture vessel.

FIG. 2. Microbial community composition of the planktonic cells in the culture vessel during the experimental time. Time zero shows the inoculum composition. Percentages of DAPI-stained cells detected by FISH with probes for *Archaea* (ARC915), *Bacteria* (EUB338), *Methanomicrobiales* relatives (MG1200), *Methanobacteriaceae* (MB1174), SRB group (SRB385) and the sum of the percentages of ARC915 and EUB338. Bars indicate standard error (n ranged from 10 to 15).

FIG. 3. Epifluorescence micrograph of the planktonic cells from the culture vessel at the 9th day. Cells were stained with DAPI. The rod-shaped cells with terminal spore can be observed in the upper left corner of the micrograph. Bar = 5 μ m.

FIG. 4. Microbial community composition in biofilms formed on polypropylene coupons. Percentages of DAPI-stained cells detected by FISH with probes for *Archaea* (ARC915), *Bacteria* (EUB338), *Methanomicrobiales* (MG1200), *Methanobacteriaceae* (MB1174), SRB group (SRB385) and the sum of the percentages of ARC915 and EUB338. Bars indicate standard error (n ranged from 9 to 14).

FIG 5. Microbial community composition in biofilms formed on glass coupons after six and nine days of experimental time. Percentages of DAPI-stained cells detected by FISH with probes for *Archaea* (ARC915), *Bacteria* (EUB338), *Methanomicrobiales* (MG1200), *Methanobacteriaceae* (MB1174), SRB group (SRB385) and the sum of the percentages of ARC915 and EUB338. Bars indicate standard error (n ranged from 9 to 15).

FIG.6. Confocal laser scanning micrograph of a 22-day-old biofilm formed on polypropylene coupon. Sample stained with DAPI. Bar indicates 10 μm . Biofilm thickness was about 6.0 to 7.0 μm as measured by CLSM.

DEVELOPMENT OF ANAEROBIC BIOFILMS ONTO HYDROPHOBIC AND HYDROPHILIC SURFACES

Juliana C. Araujo,^{1*} Renato Mortara,² José R. Campos,¹ and

Rosana F. Vazoller¹

Laboratório de Processos Biológicos, Departamento de Hidraulica e Saneamento,
Universidade de São Paulo (USP), Escola de Engenharia de São Carlos, Av. Trabalhador
São Carlense, 400, São Carlos-SP, 13566-590,¹ and Departamento de Microbiologia,
Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, UFESP,
Rua Botucatu 862, São Paulo-SP, 0402062,² Brazil.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Hidraulica e Saneamento, Universidade de São Paulo (USP), Escola de Engenharia de São Carlos, Av. Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos-SP, 13566-590, Brazil. Phone: 55-16-2739560. Fax: 55-16-2739550. E-mail: juli.calabria@ig.com.br.

Abstract The development of anaerobic biofilms using a modified robbins device was investigated. The attachment behavior of three methanogenic Archaea and others anaerobic cells to a hydrophobic (polypropylene) and a hydrophilic (glass) surfaces was compared. Two sets of experiments were carried out, one using three pure methanogen cultures as seed for the biofilm development, Methanosarcina barkeri, Methanosaeta concilii and Methanobacterium formicicum and the other using a mixed microbial population from an anaerobic mesophilic granular sludge. Methanosarcina barkeri and Methanosaeta concilii cells were found colonizing both hydrophobic and hydrophilic surfaces in the beginning (2-day-old biofilm) and at the end of the experiment (7- and 9-day-old biofilms). Furthermore, mixed culture biofilm development on polypropylene (hydrophobic) and glass (hydrophilic) coupons showed no differences between the two support materials concerning the number of cells attached and colonization time. The average number of attached cells/mm² was almost similar after 5 days, 7.1 x 10² cells/mm² of the glass coupon and 9.9 x 10² cells/mm² of the polypropylene coupon, and after 9 days, 6.3 x 10² cells/mm² of the glass coupon and 7.2 x 10² cells/mm² of the polypropylene coupon. Confocal laser scanning microscopy examinations of the mixed culture biofilms revealed that they were of uneven thickness, heterogeneous and had pores. Our data suggest that surface hydrophobicity has no major impact on the adhesion of methanogenic Archaea cells and on the development of anaerobic biofilms.

Introduction

Biofilms occur in virtually any system where microorganisms are present. Hence, scientists in rather different fields (biofouling, biocorrosion, bioconversion, medicine, limnology etc.) have been studying biofilm growth (Van Loosdrecht et al. 1995). In bioconversion field, biofilm formation inside reactors is very important in order to uncouple solid and liquid retention times enabling the treatment of more waste in a smaller space and within a short time. The performance of the reactors was shown to be

partly dependent on the support material (Coop and Kennedy 1983; Van den Berg and Kennedy 1981; Wilkie and Colleran 1984). When the substrate to be treated is diluted or contains few suspended solids (e.g. pharmaceutical, chemical, pulp and paper wastewaters), the support has always a significant influence on the start-up and the efficiency of the process, because the first bacterial layer may be of a major importance for further biofilm growth and stability (Verrier et al. 1988). Some factors (e.g. bacterial cell wall hydrophobicity, electrophoretic mobility, electric surface charges, etc.) influencing initial adhesion of bacteria to supports have been investigated (Van Loosdrecht et al. 1987a; Van Loosdrecht et al. 1987b; Van Loosdrecht et al. 1989). The influence of the hydrophobicity of the support material on the adhesion of methanogenic Archaea and initial development of anaerobic biofilms has already been shown (Verrier et al. 1987; Verrier et al. 1988; Mozes & Rouxhet, 1990). Also, a number of studies have been shown a greater tendency for marine bacteria (O'Neil and Wilcox 1971; Sechler and Gundersen 1972) and other aquatic organisms (Eiben 1976) to attach to hydrophobic surfaces, whereas one *in situ* investigation (Dexter et al. 1975) has demonstrated higher numbers of organisms on hydrophilic substrata.

The aim of this study was to develop anaerobic biofilms using the modified robbins device (MRD) in order to compare the adhesion of three methanogenic Archaea, usual species in anaerobic wastewater treatment systems, and other anaerobic cells to a hydrophobic (polypropylene) and hydrophilic (glass) surfaces. The non-destructive sampling of biofilm material was achieved by removable polypropylene and glass coupons inserted into the wall of the MRD. Subsequently, the development, structure of the anaerobic biofilms and number of cells attached over time were examined by microscopic techniques such as phase-contrast, epifluorescence and confocal laser scanning microscope (CLSM).

Materials and methods

Inoculum preparation for biofilm development

Two sets of experiments were carried out, one using three pure methanogen cultures as seed for the biofilm development and the other using a mixed culture, which were sampled from a anaerobic mesophilic granular sludge from an anaerobic sequential batch reactor treating a wastewater which composition mimics sewage.

The three pure methanogen cultures [*Methanobacterium formicicum* (DSM 1535), *Methanosaeta concilii* (formerly *Methanothrix*) (DSM 3671) and *Methanosarcina barkeri* (DSM 800)] were obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Germany). The culture medium and anaerobic procedures have been described before (Araujo et al. 2000). Granular sludge (150.0 ml) was crushed before cultivation and the cells were inoculated in a serum bottle flask (2 liter capacity) with 850 ml of sterile culture medium, as described previously (Araujo et al. 2000), enriched with 20mM sodium acetate, 10mM sodium butyrate, 10mM sodium formate, 10mM sodium propionate, 10mM ethanol and 10mM methanol. The sludge flask cultivation was kept at $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$ with a N_2/CO_2 (70:30) atmosphere for 143 days. During all the incubation period cells were fed once a week by adding the carbon sources (the same amount every time as mentioned above) and growth were checked by measuring methane production. On the day before beginning the experiment methane composition was 73.3% in the biogas. Then, the anaerobic mixed culture (720.0 ml) were transferred to a sterile culture vessel (1 liter capacity) and the experiment started-up.

Surfaces

Two surfaces were tested: polypropylene and glass. The first is a hydrophobic surface with the water contact angle of $93 \pm 2^\circ$ (Verrier et al. 1987; Verrier et al. 1988). The later one is a hydrophilic surface with the water contact angle of $12 \pm 2^\circ$ (Jucker et al., 1996). They were cut to obtain 8 mm diameter round coupons.

Biofilm reactor and biofilm development

Biofilms were grown on polypropylene and glass coupons inserted into the wall of a Modified Robbins Device (MRD; Ruseska et al. 1982, Power et al. 1999) connected in a closed loop to a culture vessel containing the cells (Figure 1). In the first experiment, biofilms were grown by seeding the MRD with 500 ml of 1.3×10^{10} of pure methanogen cells and biofilm development was monitored over 9 days. In the second experiment, the MRD was seeded with 720 ml of 3.3×10^{11} of mixed culture and biofilm formation was followed for 22 days. The culture medium containing the cells was pumped through the MRD at 9.6 ml/min. The culture vessel was stirred continuously, gassed periodically with N_2/CO_2 (70:30) to maintain anaerobic conditions and additional carbon sources were added every 4 days according to each experiment. The carbon sources were: 10mM methanol, 10mM sodium formate and 30mM sodium acetate for the pure cultures experiment and for the mixed culture, the same amount as mentioned above. Both MRD and culture vessel were maintained at $33^\circ C$. Coupons were removed from the MRD and analysed on days 7 and 9 for the experiment with pure cultures, and on days 1, 5, 6, 9, 14, 15 and 22, for the mixed culture experiment. At each sampling day, two coupons were removed from the MRD and analysed such as, one biofilm was left intact and the other was removed from the coupon surface.

(Figure 1)

Biofilm sampling and observation

Biofilms grown on coupons were removed from the MRD and immediately fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline solution (PBS: 130 mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7.2) for 12 h at 4°C. Coupons were washed two times for 5 min in PBS and thus, non-attached cells were lost with this procedure. Fixed biofilm samples were dispersed by suspending the sample scraped from each coupon in 100µl of 0.1% Na-pyrophosphate in PBS in a Thorton sonic bath (Thorton-Inpec eletronica Ltda, SP, Brazil) for 10 min. These biofilm cell suspension were then stored in 50% ethanol/PBS at -20⁰C until used. Aliquots of 1 µl were spotted onto glass slides and dried for 20 min at 45°C. All samples were dehydrated further by sequential immersions in 50%, 80%, and 100% ethanol for three minutes each. Subsequently, they were stained with 10µl or 20 µl of a 10 µg/ml solution of DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, sigma), washed briefly in ddH₂O, air dried, and mounted with a glycerol/PBS (20/80, v/v) solution with a pH ≥ 8.5. Samples were examined on an Olympus BH2-RFCA epifluorescence microscope using a filter set suitable for DAPI excitation/emission. Cell counts were done after image capture on a 17-inch color screen using a color digital camera set (Olympus U-PMTUC) at exposure times of 0.5-2s for epifluorescence. Digital images of DAPI-fluorescence from at least ten 3170 µm² microscopic fields were taken and temporarily stored before counting. For the intact biofilms, total cell counts were done in 10 to 20 randomly chosen fields for each coupon. To evaluate the number of adhered cells per coupon, the mean of total cell-count in two coupons was calculated based on cell numbers found in cell suspension and in intact biofilms. Depth studies on intact biofilms, from the experiment with mixed culture, were carried out on a BioRad MRC 1024UV confocal system coupled to a Zeiss Axiovert microscope using a 100x Planapochromatic oil immersion 1.4 NA objective (CLSM). Serial confocal images were collected by Kalman averaging 5 frames (512x512 pixels) at 0.18 – 0.36 µm steps using an aperture (pinhole) of 2.0 mm

maximum. The image acquisition and processing software was lasersharp (version 2.1a).

Alcian blue staining to determine acidic polysaccharides

Exopolymer structures (EPS) produced by procaryotic cells may have acidic polysaccharides. EPS are visualized by staining with alcian blue (copper-phthalocyanin with four methylene-tetramethyl-cisothiuronium-chloride sidechains), a hydrophilic cationic dye that complexes with anionic carboxyl or halfester-sulfate groups of acidic polysaccharides (Passow and Alldredge 1995). Intact mixed culture biofilms were removed from the MRD and immediately stained for 1 to 2 s with 500 μ l of a 0.02% aqueous solution of alcian blue in 0.06% acetic acid (pH 2.5) according Passow and Alldredge (1995). After staining, the coupons covered with biofilm were gently washed with distilled water to remove the excess dye, fixed onto standard microscopic slides (with Super Bond glue- Three Bond do Brasil Ind. e Com. Ltda.) and then examined under the phase-contrast microscopy (Olympus BH2-RFCA, with 100X objective) to check for the presence of blue stained areas.

Results

Development of pure methanogenic biofilms

After 9 days of experiment, the developed biofilms were thin, with only two layers of cells in some specific points, and did not cover the entire coupon surface. A full monolayer of cells covering the entire coupon could not be observed at this point and areas free of cells were observed. All three species tested, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosaeta concilii* and *Methanobacterium formicicum*, found colonizing the surface in the beginning of the experiment (Figure 2A) were also found at the end of the

incubation period. Few spots displaying some thickness was due to the presence of *Methanobacterium formicicum* cells that agglomerated over each other contributing to overall biofilm thickness increase (Figure 2B).

(Figure 2A and B)

No differences were observed between polypropylene and glass coupons with regard to biofilm colonization. All three species were found to colonize both surfaces and the average number of attached cells per mm² of the coupon were very similar after 7 days (1.4×10^2 (standard deviation, SD=28) cells per mm² of the glass coupon and 2.2×10^2 (SD=95) cells per mm² of the polypropylene coupon, according to cell-counts in two coupons). After 9 days, the number of cells had not significantly changed (2.7×10^2 (SD=44) cells per mm² of the glass coupons and 2.0×10^2 (SD=28) cells per mm² of the polypropylene coupon) suggesting that biofilm formation started to stabilize after 7 or 9 days.

Development of mixed culture biofilms

As shown in Table 1, no significant differences were observed on the biofilm colonization among the two surfaces tested. The average number of attached cells per mm² was almost similar after 5 days, 7.1×10 cells per mm² of the glass coupon and 9.9×10 cells per mm² of the polypropylene coupon, and after 9 days, 6.3×10^2 cells per mm² of the glass coupon and 7.2×10^2 cells per mm² of the polypropylene coupon. However, after the 1st day, a larger number of cells (4.6×10 cells per mm²) could be seen colonizing the polypropylene coupon comparing to the glass (8.2 cells per mm²) and in the polypropylene surface cells were almost covering the entire coupon.

(Table 1)

Microscopic observations revealed that biofilm development began as isolated patches of cells randomly distributed over the coupon surface (Figure 3A and B). Biofilms developed on polypropylene coupon after 14 days of incubation period were of uneven thickness with areas of minimal or no surface coverage next to areas with biofilm thickness of 4.0 to 5.0 μm , estimated by CLSM (Figure 4). Biofilms developed after 22 days showed the greatest thickness, which was around 22.0 μm , but areas with 7.0 μm were also observed (image not shown). Figure 4 also shows pores (or water channels) in the biofilms indicating that they were not dense and compact. By contrast, they were irregular and heterogeneous. Figures 5A and 5B show that EPS stained with alcian blue indicating the presence of acidic polysaccharides. EPS was produced in biofilms developed on polypropylene and glass surfaces after 1 day (image not shown) and 7 days of incubation (Figure 5A and B).

(Figure 3A and B)

(Figure 4)

(Figure 5A and B)

Discussion

Previous studies have indicated that the adhesion of methanogenic cells to inert supports is affected both by the bacterial surface and by support characteristics such as hydrophobicity (Verrier et al. 1987; Verrier et al. 1988). According the authors, adhesion tests (in vitro assays over 2 hours) with pure cultures suggested that hydrophobic surfaces favor adhesion of hydrophobic cells such as Methanothrix soehngenii. Moreover, no M. soehngenii cells were attached to more hydrophilic surface such as Polyamide 6 and Methanosarcina mazei did not adhere to any of the six surfaces tested and probably was not involved in the initial adhesion to supports in anaerobic fixed film reactors (Verrier et al. 1988). The authors also pointed out that, in continuous culture fed with a complex medium, the colonization of hydrophobic surfaces such as

polypropylene and polyethylene was faster than more hydrophilic surfaces ones such as PVC and Polyacetal. In the present study, we verified that the three pure culture of methanogenic Archaea, *M. barkeri*, *M. concilii* and *M. formicicum*, were involved in initial biofilm formation and were colonizing both hydrophobic and hydrophilic surfaces, despite slightly differences observed. As shown in Figure 2A, *M. concilii* and *M. barkeri* cells were observed on glass coupon. Furthermore, mixed culture biofilms on polypropylene (a hydrophobic surface) and glass (a hydrophilic surface) coupons showed no significant differences between the two support materials concerning the number of cells attached and time colonization. However, after 24 hours experiment, a larger number of cells (4.6×10 cells per mm^2) could be seen colonizing the polypropylene coupon comparing to the glass (8.2 cells per mm^2). In spite of these observations, it is not possible to presume that polypropylene is a better material, concerning anaerobic biofilm formation, than glass. Accordingly, in the first nine days cell numbers in the biofilm formed on glass increased 77 times and in the biofilm formed on polypropylene increased 16 times. On the other hand, in the last 9 days the number only duplicated. This may indicate that biofilm growth, in the polypropylene, started to stabilize after 9 days, reaching cell numbers comparable to glass coupons. Similar results were found in pure methanogenic biofilms.

It was also verified that microbial composition in the mixed culture biofilms was nearly the same in both surfaces, they were dominated by hydrogenotrophic methanogens morphologically resembled Methanobacterium and Methanobrevibacter (data not shown). Our data suggest that surface hydrophobicity has no major impact on the adhesion of methanogenic Archaea cells and on the development of mixed culture biofilms. Attachment studies of tissue cells of several types (Carter 1967; Harris 1973; Marroudas 1975) have indicated that many show a preference for negatively charged, hydrophilic surfaces, in contrast to what was found previously (Fletcher and Loeb 1979) and contrary to what is expected if electrostatic and dispersion forces are the

dominant factors in cell adhesion (Fletcher and Loeb 1979). Thus, our results are in agreement with the conclusions of other studies (Barker 1984; Beeftink and Staugaard 1986) that showed that the initial processes in biofilm formation often depend more on the roughness than on hydrophobicity or the charge of the solid surface.

The use of CLSM to examine biofilms has been previously described (Caldeira et al. 1999; Caldwell et al. 1992a; Caldwell et al. 1992b; Costerton et al. 1995; Korber et al. 1994; Lawrence et al. 1991; Manz et al. 1999, Massol-Deya et al. 1995; Moller et al. 1996; Stoodley et al. 1994). CLSM is a non-destructive method that provides a detailed insight into the structural organization of biofilms and allows the quantification of biofilm constituents (Caldwell et al. 1992b; Massol-Deya et al. 1995; Moller et al. 1996). Our results on CLSM examinations of the mixed culture biofilms (Figure 4) revealed that they were of uneven thickness, heterogeneous and had pores. These features are consistent with the water channel model described by Costerton et al. (1994). According to Wimpenny and Colasanti (1997), this biofilm model might be related to the prevailing substrate concentrations. In the presence of low concentrations of nutrients, cells would form agglomerates with some unfilled zones between them (Wimpenny and Colasanti 1997). Thus, biofilm structure observed in the present study might be related to the organic acids concentrations used (20mM sodium acetate, 10mM sodium butyrate, 10mM sodium formate, 10mM sodium propionate, 10mM ethanol and 10mM methanol) and to the flow velocity applied to the MRD (9.6ml/min). The existence of an intricate system of channels has already been demonstrated in anaerobic biofilms through electron microscopy examinations using thin sectioning techniques (Robinson et al. 1984). Channel structures in biofilms may facilitate the transport of nutrients between the bulk solution and the inner deep layers (De Beer et al. 1994; Lawrence et al. 1994).

Our results with alcian blue staining revealed that EPS was produced in mixed culture biofilms and these structures were composed of acidic polyssacharides (Figure

5A and B). It has been suggested that EPS bind bacteria together thus mediating aggregation and adhesion (Costerton et al. 1995). Also, an acidic surface polymer in a marine bacteria (*Pseudomonas* sp.) was suggested to be the attachment adhesive (Fletcher and Floodgate 1973).

Biofilm thickness, from 5- to 22- μm , verified in this study are within the range described in the literature for anaerobic biofilms. Amann et al. (1992), for instance, observed thickness around 5- to 10- μm studying sulfate-reducing bacteria biofilms with 3 weeks-old. However, it is important to mention that biofilms, in this and in a previous study (Araujo et al. 2000), were dehydrated before the CLSM examinations. Because of this, thickness measurements might have been underestimated since dehydration step causes collapse of the biofilm structure, as observed by Moller et al. (1996). These authors verified that a fully hydrated biofilm had a thickness around 6 to 7 times greater than the dehydrated one.

Our results show that the influence of the hydrophobicity of the support material on adhesion of methanogenic Archaea cells and on the development of anaerobic mixed culture biofilms may be questionable. *M. concilii* are hydrophobic cells, according Verrier et al. (1988), and it was observed that they were able to colonize glass coupons (hydrophilic surface) under MRD operation conditions.

Furthermore, the biofilm reactor (MRD) in combination with CLSM examinations provide a system tool that is well suited for the investigation of anaerobic biofilm development and architecture.

Acknowledgements

We thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the research grant N° 96/09982-3.

We hereby state that our research was done according to the current laws of Brazil.

References

- Amann RI, Stromley J, Devereux R, Key R, Stahl DA (1992) Molecular and Microscopic Identification of Sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 614-623
- Araujo JC, Brucha G, Campos JR, Vazoller RF (2000) Monitoring the Development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Wat. Sci. Tech.* 41: 69-77
- Baker JH (1984) Factors affecting the bacterial colonization of various surfaces in a river. *Can J. Microbiol.* 30: 511-515
- Beefink HH, Staugaard P (1986) Structure and dynamics of anaerobic bacterial aggregates in a gas-lift reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1139-1146
- Caldeira M, Heald SC, Carvalho MF, Vasconcelos I, Bull AT, Castro PML (1999) 4-Chlorophenol degradation by a bacterial consortium: development of a granular activated carbon biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 722-729
- Caldwell DE, Korber DR, Lawrence JR. (1992a) Confocal laser microscopy and computer image analysis. In: Marshall KC (ed.) *Advances in Microbial Ecology*, 12: 1-67. New York: Plenum
- Caldwell DE, Korber DR, Lawrence JR. (1992b) Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion using scanning confocal laser microscopy. *J. Microbiol. Methods* 15: 249-261
- Carter SB (1967) Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature (London)* 213: 256-260
- Coop G.H, Kennedy KJ (1983) Support materials for downflow stationary fixed film (DSFF) methanogenic reactors. *J. Ferment. Technol.* 61: 333-336
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, De Beer D, James G (1994) Biofilms: the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176: 2137-2142
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, De Beer D, Lappin-Scott HM (1995) Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745
- DeBeer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z (1994) Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transfer. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1131-1138
- Dexter SC, Sullivan D, Jr JD, Williams III J, Watson SW (1975) Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surfaces. *Appl. Microbiol.* 30: 298-308
- Eiben R (1976) Einfluss von Benetzungsspannung und Ionen auf die substratbesiedlung und das einsetzen der metamorphose bei Bryozoenlarven (*Bowerbankia gracilis*). *Mar. Biol.* 37: 249-254
- Fletcher M, Floodgate GD (1973) An electron microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J. Gen Microbiol.* 74: 325-334

- Fletcher M, Loeb GI (1979) Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonas* to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 67-72
- Harris A (1973) Behaviour of cultured cells on substrata of variable adhesiveness. *Exp. Cell. Res.* 77: 285-297
- Jucker BA, Harms H, Zehnder AJB (1996) Adhesion of the Positively Charged Bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to Glass and Teflon. *Journal of bacteriology* 178: 5472-5479
- Korber DR, James GA, Costerton JW (1994) Evaluation of fleroxacin activity against established *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1663-1669
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173: 6558-6567
- Lawrence JR, Wolfaardt GM, Korber DR (1994) Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1166-1173
- Lewandowski Z, Altobelli SA, Fukushima E (1993) NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms. *Biotechnol. Prog.* 9 : 40-45
- Manz W, Wendt-Potthoff K, Neu TR, Szewzyk U, Lawrence JR (1999) Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microbial Ecology.* 37: 225-237
- Maroudas NG (1975) Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *J. Theor. Biol.* 49: 417-424
- Massol-Deya AA, Whallon J, Hickey RF, Tiedje JM. (1995) Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 769-777
- Moller S, Petersen AR, Poulsen LK, Arvin E, Molin S (1996) Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4632-4640
- Mozes N, Rouxhet PG (1990) Microbial Hydrophobicity and Fermentation Technology. In: R.J. Doyle R.J., Mel Rosenberg (eds) *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. ASM Press, 1st Ed., pp.75-105
- O'Neil TB, Wilcox GL (1971) The formation of a 'primary film' on materials submerged in the sea at Port Hueneme, California. *Pac. Sci.* 25: 1-12
- Passow U, Alldredge AL (1995) A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnol. Oceanogr.* 40:1326-1335
- Power ME, Araujo JC, van der Meer JR, Harms H, Wanner O (1999) Monitoring sulfate-reducing bacteria in heterotrophic biofilms. *Wat Sci. Tech.* 39: 49-56

- Robinson RW, Akkin DE, Nordstedt RA, Thomas M, Aldrich HC (1984) Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 127-136
- Ruseska I, Robbins J, Costerton JW (1982) Biocide testing against corrosion-causing oil-field bacteria helps control plugging. *Oil & Gas Journal.* 8: 253-264
- Sechler GE, Gundersen K (1972) Role of surface chemical composition on the microbial contribution to primary films. In: Acker RF, Brown BF, DePalma JR, Iverson WP (eds) *Proceedings of the 3rd International Congress on marine Corrosion and Fouling.* Northwestern University Press, Evanston, Ill, pp 610-616
- Stoodley P, De Beer D, Lewandowski Z (1994) Liquid flow in biofilm systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2711-2716
- Van den Berg L, Kennedy KJ (1981) Support materials for stationary fixed film reactors for high-rate methanogenic fermentations. *Biotechnol. Lett.* 3: 165-170
- Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB (1987a) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1893-1897
- Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB (1987b) Electrokinetic potential and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1898-1901
- Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJB (1989) Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microb. Ecol.* 17: 1-15
- Van Loosdrecht MCM, Eikelboom D, Gjaltema A, Mulder A, Tjihuis L, Heijnen JJ (1995) Biofilm Structures. *Wat. Sci. Tech.* 32: 35-43
- Verrier D, Mortier B, Albagnac G (1987) Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnol Lett.* 9: 735-740
- Verrier D, Mortier B, Dubourguier HC, Albagnac G (1988) Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilms. In: Hall ER, Hobson PN (eds) *Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion, IAWR, Bologna, Italy,* pp.61-69
- Wilkie A, Colleran E (1984) Start-up of anaerobic filters containing different support materials using pig slurry supernatant. *Biotechnol. Lett.* 6: 735-740
- Wimpenny JWT, Colasanti R (1997) A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiology Ecology.* 22: 1-16

Table 1. Number of cells/mm² of the coupon (according cell-count in two coupons)

Time	Number of cells/mm ² of the glass coupon	Number of cells/mm ² of the polypropylene coupon
1 day	8.2 (SD=5.0)	4.6 x 10*
5 days	7.1 x 10 (SD=6.0 x10)	9.9 x 10 (SD= 8.0 x10)
9 days	6.3 x 10 ² (SD=4.2 x 10 ²)	7.2 x 10 ² (SD= 9.2 x 10)
14 days	ND	1.4 x 10 ³ (SD= 1.3 x 10 ²)
22 days	ND	3.0 x 10 ³ (SD= 3.0 x 10 ²)

ND- not determined; *value of one single coupon; S.D.- standard deviation

FIG. 1. Modified robbins device and culture vessel.

Fig. 2 Epifluorescence micrographs of a 2-day-old biofilm (A) and a 9-day-old biofilm (B) developed over the glass coupons. Cells were stained with DAPI.

A B
Fig. 3 Phase-contrast micrograph of a 6-day-old biofilm developed over the glass coupon. Panels A and B reveal a different microscopic field of the same coupon.

Fig. 4 Confocal laser scanning micrograph of a 14-day-old biofilm formed on polypropylene coupon. Sample stained with DAPI. Bar indicates 10.0 µm.

A B
Fig. 5 Phase-contrast micrograph of a 7-day-old biofilm developed over glass coupon. Panels A and B reveal a different microscopic field of the same coupon. Acidic polysaccharides are blue stained.