

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA
METANOGENICA EM REATORES UASB
TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO

Érika Ferreira de Abreu

Belo Horizonte

2007

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA
METANOGÊNICA EM REATORES UASB
TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO**

Érika Ferreira de Abreu

Érika Ferreira de Abreu

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA
METANOGÊNICA EM REATORES UASB
TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientador: Dra. Silvana de Queiroz Silva

Co-orientador: Prof. Carlos Augusto de L. Chernicharo

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2007

A162e

Abreu, Érika Ferreira de

Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário [manuscrito] / Érika Ferreira de Abreu – 2007. 93 f., enc. : il.

Orientadora: Silvana de Queiroz Silva.

Co-orientador: Carlos Augusto de Lemos Chernicharo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Departamento de Engenharia Hidráulica e Recursos Hídricos.

Inclui bibliografia

1. Saneamento - Teses 2. Microbiologia sanitária – Teses 3. Águas residuais – Teses 4. Lodo de esgoto – Teses 5. Reatores – testes de materiais - Teses 6. Microorganismos - Teses I. Silva, Silvana de Queiroz II. Chernicharo, Carlos Augusto de Lemos III. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia Hidráulica e Recursos Hídricos, Escola de Engenharia IV. Título.

CDU: 628.3 (043)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida e por me ensinar a valorizá-la, desenvolvendo e fortalecendo em mim Seus maiores dons: a fé e o amor;

À minha mãe Altina, meus irmãos Karla e Elias e à minha avó Geralda pelo amor, compreensão, paciência, apoio e motivação dedicados a mim durante todos esses anos de vida estudantil e acadêmica. Amo vocês!

À minha orientadora, Dra. Silvana de Queiroz Silva, não só pela orientação, mas também pela pessoa humana e sensível que é. Obrigada, Sil, pela sua dedicação e amizade. Agradeço também ao meu co-orientador, Professor Dr. Carlos Augusto de Lemos Chernicharo, pela oportunidade e por ter acreditado em mim desde o meu ingresso no Mestrado;

Aos meus amigos de fé: Patrícia Matias, Sheyla Christina, Patrícia Bragança, Karime Pataro, Indira, Vanessa Ferreira, José Eustáquio, Simone Gonçalves, Sandra Ambrósio, Graziella Patrício, Ana Maria e Norma pela amizade, companheirismo e admiração, compartilhando comigo momentos de felicidade e de lutas também. Vocês são a minha segunda família, mesmo quando estamos distantes... Guardo todos no meu coração!

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Adriana, Valéria, Juliana Calábria, Fernanda e Beatriz que foram e são testemunhas do incessante trabalho de biologia molecular. Além de tudo, obrigada principalmente pelo carinho, pela amizade e por toda a ajuda. Agradeço também ao Professor Dr. Sérgio, Lucilaine e Olívia pelo apoio nas análises cromatográficas;

Aos meus amigos e colegas do DESA, especialmente a Sílvia, dona Chica, Carla Rubinger, Maria Eugênia, Paulo Gustavo, Álisson Bragança, Fernando Moreira, Wagner Moravia, Fernando de Paula, Carolina Moreira, Suzy, Betânia Lara, etc., enfim, todos que em alguma ou em várias situações, partilharam momentos de amizade, de estudos, de confraternização ou simplesmente me ajudaram quando eu mais precisei. Espero que nos encontremos no futuro;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pelo ensino, dedicação e conhecimentos ministrados nas disciplinas do curso;

À FAPEMIG, CAPES, CNPq e PROSAB pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

A diversidade microbiana metanogênica do lodo anaeróbio de dois reatores UASB (denominados R1 e R2), tratando esgoto doméstico, foi avaliada por meio de técnicas moleculares (PCR-DGGE e FISH). Os reatores foram operados com aplicação de diferentes velocidades ascensionais: fase 1 (0,50m/h), fase 2 (0,71 m/h), fase 3 (1,10 m/h), fase 4 (0,50 m/h) e fase 5 (0,71 m/h). As amostras de lodo foram coletadas ao final de cada fase, em três diferentes alturas de cada reator. Os resultados das análises de PCR-DGGE mostraram que a comunidade de arqueias metanogênicas é constituída por cerca de 5 populações distintas, e que essa diversidade não foi alterada pela imposição de diferentes velocidades ascensionais. Porém, alterações foram observadas na intensidade das bandas, o que sugere diminuição na abundância destes microrganismos com o aumento da velocidade ascensional. Também não houve diferença na diversidade de arqueias entre os dois reatores, sugerindo que a existência de uma unidade de peneiramento forçado no R2 não alterou os tipos metanogênicos presentes no reator. Análises de FISH de amostras da fase 5 com a sonda ARC915 revelaram tipos morfológicos diferentes: dois similares a metanogênicas acetoclásticas típicas (filamentos do gênero *Methanosaeta* e agregados de cocos do gênero *Methanosarcina*) e outros dois filamentos, diferentes dos de *Methanosaeta*, provavelmente relacionados a metanogênicas hidrogenotróficas. As células semelhantes a *Methanosaeta* foram as mais observadas, chegando a $2,29 \times 10^8$ células/ mL e compreendendo 63 a 87% do total da comunidade de arqueias. Análises de FISH de testes de AME (atividade metanogênica específica) com lodo retirado dos mesmos reatores UASB, cultivado com substratos específicos, mostraram a predominância de *Methanosaeta* em dois substratos testado (acetato e formiato). A remoção de DQO filtrada foi similar em ambos os reatores, mostrando que a estabilidade da comunidade microbiana foi seguida pela estabilidade do desempenho dos mesmos. Os resultados sugerem que ambos os reatores apresentavam uma comunidade de arqueias similar, constituída principalmente por filamentos típicos de *Methanosaeta*, confirmando a importância e a predominância deste grupo microbiano na cadeia final de degradação anaeróbia em reatores UASB.

ABSTRACT

The methanogenic microbial diversity of anaerobic sludge in two UASB reactors (denominated R1 and R2), treating domestic wastewater, was evaluated by molecular techniques (PCR-DGGE and FISH). The reactors were operated under 5 operational phases, with application of different upflow velocities: phase 1 (0,50 m/h), phase 2 (0,71 m/h), phase 3 (1,10 m/h), phase 4 (0,50 m/h) and phase 5 (0,71 m/h). The sludge samples were collected at the end of each phase from three different heights of reactors. The results of PCR-DGGE analyses for all samples showed that the archaeal community was mainly constituted by 5 distinct populations and that this diversity was not altered by the imposition of different upflow velocities. However changes were observed in the intensity of the bands, which suggests that the abundance of these microorganisms decreased with the increase of upflow velocity. In addition, there was no difference in diversity of *Archaea* between the two reactors, indicating that the presence of a forced screening unit preceeding R2 did not alter the methanogenic types present in the reactor. FISH analyses of samples of phase 5 with ARC915 probe revealed four different morphological types: two were very similar to typical acetoclastic *Archaea* (rods or filaments of genus *Methanosaeta* and cocci aggregated of genus *Methanosarcina*) and other two filaments, different from those of *Methanosaeta*, probably related to hydrogenotrophic methogens. *Methanosaeta*-like cells were the most observed archaea and accounted up to $2,29 \times 10^8$ cells/mL, comprising about 63 to 87% of total archaeal community. FISH analyses of SMA tests (specific methanogenic activity) incubated with sludge of the same UASB reactors grown with specific substrates showed predominance of *Methanosaeta*-like cells in two tested substrates (acetate and formate). The filtered COD removal of both reactors was similar which indicates that the establiity of the microbial community was followed by establiity of reactors performance. The results suggest that both reactors showed a similar archaeal community, constituted mainly by typical rods of *Methanosaeta*, confirming the importance of this microbial group in the final chain of anaerobic degradation at UASB reactors.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 TRATAMENTO DE ESGOTOS E REATORES UASB	4
3.2 BIOQUÍMICA DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	7
3.2.1 <i>Processos de conversão bioquímica da matéria orgânica</i>	7
3.2.2 <i>Aspectos termodinâmicos e fisiológicos de arqueias e bactérias</i>	11
3.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO DOMÍNIO ARCHAEA	12
3.3.1 <i>Aspectos gerais</i>	12
3.3.2 <i>Classificação taxonômica</i>	13
3.3.3 <i>Fisiologia das arqueias metanogênicas</i>	13
3.4 DISTRIBUIÇÃO DAS ARQUEIAS METANOGÊNICAS EM SISTEMAS DE TRATAMENTO ANAERÓBIO	15
3.4.1 <i>Distribuição espacial em grânulos anaeróbios</i>	15
3.4.2 <i>Variações populacionais e estabilidade funcional da comunidade metanogênica em reatores tratando efluentes sintéticos</i>	18
3.4.3 <i>Estrutura e composição da comunidade de arqueias metanogênicas em sistemas anaeróbios em escala plena</i>	20
3.4.4 <i>Fatores que controlam a distribuição de metanogênicas em reatores anaeróbios</i>	22
3.4.5 <i>Distribuição de arqueias nos diversos sistemas de tratamento anaeróbio em escalas laboratorial e plena</i>	27
3.5 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NOS ESTUDOS DE ECOLOGIA MICROBIANA	34
3.5.1 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	35
3.5.2 <i>Eletoforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)</i>	36
3.5.3 <i>Hibridização in situ com oligonucleotídeos fluorescentes (FISH)</i>	38
4 METODOLOGIA	40
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS REATORES E PONTOS DE AMOSTRAGEM	40
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO DOS REATORES	41
4.3 DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA METANOGÊNICA	41
4.2.1 <i>Extração e purificação do DNA genômico</i>	42
4.2.2 <i>Amplificação dos genes DNAr 16S de arqueias por PCR</i>	43
4.2.3 <i>Separação dos produtos de PCR por DGGE</i>	44
4.2.4 <i>Determinação da abundância relativa e da concentração de arqueias por FISH</i>	46
4.2.5 <i>Análise de ácidos graxos voláteis</i>	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA METANOGÊNICA EM REATORES UASB POR MEIO DA TÉCNICA DE PCR-DGGE	49
5.1.1 <i>Extração e purificação do DNA genômico</i>	49
5.1.2 <i>Amplificação dos genes DNAr 16S de arqueias por PCR</i>	51
5.1.3 <i>Separação dos produtos de PCR por DGGE</i>	53
5.1.4 <i>Identificação das principais arqueias metanogênicas presentes nos reatores por meio de sequenciamento de DNA</i>	60
5.2 IDENTIFICAÇÃO DE MORFOLOGIAS DE ARQUEIAS METANOGÊNICAS TÍPICAS E DE INTERESSE PELA TÉCNICA DE FISH E DETERMINAÇÃO DE SUA ABUNDÂNCIA RELATIVA	62
5.2.1 <i>Morfotipos observados</i>	62
5.2.2 <i>Amostras dos reatores UASB</i>	65

5.2.3	<i>Amostras de lodo de testes de AME.....</i>	68
6	CONCLUSÕES	72
7	RECOMENDAÇÕES	74
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXOS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Etapas metabólicas e grupo de microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia	7
Figura 3.2 – Desnaturação e separação de fragmentos de DNA pela técnica de DGGE	36
Figura 4.1 – A e B: vista dos reatores R1 e R2. C: desenho esquemático dos pontos (perfis) de amostragem (cm)	40
Figura 4.2 – Esquema das etapas de análise molecular e identificação microbiológica das amostras de lodo	42
Figura 5.1 – Extrações de DNA das amostras dos reatores R1 e R2 coletadas em diferentes alturas e em diferentes fases operacionais	49
Figura 5.2 – Perfis de ST das amostras de lodo dos reatores R1 e R2 ao longo das fases 1 a 4	50
Figura 5.3 – Reação de PCR com amostras da fase 1.....	52
Figura 5.4 – Produtos de PCR das fases 1 a 4.....	52
Figura 5.5 – Imagem negativa de DGGE com as amostras das fases 1 a 4 (gradiente 45 a 65%)	55
Figura 5.6 – Produtos de PCR dos pontos H1 (reator R1) e H2 (reator R2) e comparação de perfil de bandas de DGGE	57
Figura 5.7 – Concentrações dos principais AGV nos perfis dos reatores R1 e R2 ao longo das fases operacionais.....	59
Figura 5.8 – DGGE das bandas purificadas	60
Figura 5.9 – Amplificação das bandas ARC (A); purificação e quantificação dos produtos de PCR (B)	61
Figura 5.10 – Principais morfotipos de arqueias observados nas amostras dos reatores e em testes de AME. Visualização em aumento de 1000 vezes	64
Figura 5.11 – Distribuição relativa dos principais morfotipos de arqueias observados em amostras da fase 5 dos reatores R1 e R2.....	67
Figura 5.12 – Comparação entre filamentos de <i>Methanosaeta</i> sp. em contraste de fase (A e B) e em coloração DAPI, aumento de 1000 vezes	69
Figura 5.13 – Distribuição relativa dos principais morfotipos de arqueias observados em amostras de testes de AME com diferentes substratos	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Comparação energética de algumas comuns na digestão anaeróbia	12
Tabela 3.2 – Principais grupos de arqueias metanogênicas encontrados em sistemas de tratamento anaeróbio	13
Tabela 3.3 – Vias metabólicas da metanogênese e arqueias associadas	15
Tabela 3.4 – Estudos da comunidade microbiana metanogênica em reatores anaeróbios em escala laboratorial usando técnicas moleculares	30
Tabela 3.5 – Estudos da comunidade microbiana metanogênica em reatores anaeróbios em escala plena usando técnicas moleculares	31
Tabela 3.6 – Estudos da comunidade microbiana metanogênica em reatores UASB usando técnicas moleculares	32
Tabela 4.1 – Principais características dos reatores UASB e condições operacionais	41
Tabela 5.1 – Número de unidades microbianas de arqueias observadas em 20 campos microscópicos nas amostras da fase 5 dos reatores R1 e R2	66
Tabela 5.2 – Estimativa da abundância dos principais morfotipos de arqueias por mL de amostra da fase 5 dos reatores R1 e R2	68
Tabela 5.3 – Número de unidades microbianas de arqueias observadas em 20 campos microscópicos nas amostras de testes de AME com diferentes substratos	70
Tabela 5.4 – Estimativa da abundância dos principais morfotipos de arqueias por mL de amostra de testes de AME com diferentes substratos.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGV: ácidos graxos voláteis

ARC: *Archaea*

ARDRA: *amplified ribosomal DNA restriction analysis* ou análise de restrição de DNA ribossomal amplificado

Bis: N, N'-metileno bis acrilamida

BRS: bactérias redutoras de sulfato

BSA: *bovine serum albumin* ou albumina de soro bovino

DAPI: 4, 6'-diamidino-2-fenilindol

DBO₅: demanda bioquímica de oxigênio no 5º dia (padrão)

ddH₂O: água duplamente destilada

DGGE: *denaturing gradient gel electrophoresis* ou eletroforese em gel de gradiente desnaturante

DNAr: DNA (gene) de RNA ribossomal

DQO: demanda química de oxigênio

EDTA: etileno amino tetraacetato de sódio diidratado [CH₂N(CH₂.COOH)CH₂.COONa]₂.2H₂O

FISH: *fluorescence in situ hybridization* ou hibridização *in situ* com sonda fluorescente

HPLC: *high performance liquid chromatograph* ou cromatografia líquida de alto desempenho

HTP: hidroxipatita

PBS: *phosphate buffer saline* ou solução salina tamponada com fosfato

PCR- RT-SSCP: transcriptase reversa – *single strand conformation polymorphism* ou polimorfismo de conformação de fita única – transcriptase reversa

PCR: *polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase

PVPP: polivinilpirrolidona

RFLP: *restriction fragment length polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SSCP: *single strand conformation polymorphism* ou polimorfismo de conformação de fita única

Taq: *Thermoaquaticus*

Tris: (hidroximetil) aminometano – C₄H₁₁NO₃

TEMED: N, N, N, N – tetrametil etileno diamina

UASB: *upflow anaerobic sludge blanket* ou reator de manta de lodo de fluxo ascendente

1 INTRODUÇÃO

O lançamento de esgotos domésticos e industriais *in natura* em corpos d'água tem sido um dos fatores mais importantes e preocupantes de interferência antrópica no ambiente, causando impactos extremamente nocivos à saúde humana e aos ecossistemas, notadamente os aquáticos. Tecnologias avançadas de tratamento têm sido pesquisadas, principalmente nos países desenvolvidos, com o intuito adicional de recuperação e reuso dos recursos hídricos. Nos países em desenvolvimento como o Brasil, tais pesquisas são essenciais para a mudança do quadro crítico sanitário.

Nas águas residuárias, especificamente nos esgotos domésticos, há uma enorme variedade de compostos orgânicos biodegradáveis. Desde o final do século XIX e início do século XX, tais águas têm sido tratadas, em ambiente confinado, por meio de processos biológicos aeróbios e/ou anaeróbios. No decorrer dos anos, diversas pesquisas resultaram em avanços importantes no tratamento biológico, com destaque a alguns tipos de tecnologias aeróbia e anaeróbia, como, respectivamente, sistema de lodos ativados e reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo, conhecidos como UASB.

Desenvolvidos em 1980 por Lettinga e colaboradores, os reatores UASB foram primeiramente concebidos para o tratamento de resíduos agro-industriais. Atualmente, é a tecnologia anaeróbia mais empregada no mundo e muito utilizada no tratamento de esgotos domésticos, especialmente em regiões de clima quente e em muitos países em desenvolvimento, como o Brasil. Como vantagens em relação aos processos aeróbios, eles não necessitam de aeração, apresentam reduzida produção de lodo excedente e o gás metano gerado pode ser reaproveitado como recurso energético. Entretanto, estes reatores apresentam eficiência um pouco menor que a dos processos aeróbios e seus efluentes, portanto, necessitam de um sistema de pós-tratamento para remoção de poluentes. Apesar de estarem amplamente distribuídos, os reatores UASB são projetados e monitorados com base em conhecimentos práticos, sendo pouco conhecida a ecologia microbiana dos processos biológicos envolvidos dentro destes ecossistemas.

Durante muitos anos, o conhecimento da microbiologia de processos biológicos ambientais, não só os envolvidos na digestão anaeróbia, foi e ainda é considerado como uma “caixa-preta”, principalmente devido às limitações de isolamento e cultivo de microrganismos, que são fastidiosas ou extremamente seletivas, subestimando a diversidade e dificultando a

compreensão de processos metabólicos envolvidos na degradação da matéria orgânica, os quais são influenciados por processos ecológicos, tais como simbiose e competição entre microrganismos. Atualmente, este problema tem sido grandemente diminuído e o conhecimento da microbiologia ambiental tem se estendido e muito com o uso e avanço das técnicas de biologia molecular, que são independentes do isolamento e cultivo de microrganismos e, muitas vezes, permitem o estudo dos mesmos no próprio ambiente.

Aliando-se o conhecimento sobre o processo de digestão anaeróbia em diversos sistemas de tratamento e o conhecimento das principais técnicas de biologia molecular envolvidas em estudos de ecologia microbiana, este trabalho buscou meios para se avaliar a diversidade microbiana metanogênica presente em reatores UASB, em escala de demonstração, tratando esgotos tipicamente domésticos e submetidos a diferentes condições operacionais. A observação da estrutura e do comportamento da microbiota frente a estas alterações poderia fornecer informações importantes para o monitoramento e a otimização das condições de operação dos reatores.

2 OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

Caracterizar a comunidade de arqueias metanogênicas presentes em lodos de reatores UASB tratando esgoto sanitário por meio de técnicas de biologia molecular.

2.2. *Objetivos específicos*

- Determinar e comparar a diversidade de arqueias metanogênicas, ao longo do perfil vertical de dois reatores UASB distintos, por meio de análise de fragmentos de DNA pelo método PCR-DGGE;
- Determinar e comparar a diversidade de arqueias metanogênicas nos reatores UASB submetidos a diferentes condições operacionais (tempo de detenção hidráulico e área útil do reator) por meio de análise de fragmentos de DNA pelo método PCR-DGGE;
- Determinar a abundância relativa de arqueias metanogênicas em amostras de lodo dos reatores UASB e em ensaios de atividade metanogênica pela técnica de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Tratamento de esgotos e reatores UASB

Desde o final do século XX, a sustentabilidade emergiu como um ponto importante a ser considerado em qualquer interferência antrópica no ambiente. Muitos centros de pesquisa no mundo vêm desenvolvendo sistemas de tratamento de águas residuárias, incluindo o tratamento de esgoto sanitário, baseando-se em conceitos de sustentabilidade, que objetivam tanto a proteção ambiental quanto a recuperação de recursos, com custos acessíveis às populações beneficiadas.

O tratamento dos esgotos é essencial devido ao seu potencial poluidor. Caso não seja dada destinação adequada aos esgotos, estes acabam poluindo o solo, contaminando águas superficiais e subterrâneas e passam a escoar a céu aberto, constituindo-se em perigosos focos de disseminação de doenças. Além disso, existe o risco do impacto ecológico ao serem lançados nos corpos receptores. Em alguns casos, o meio aquático demonstra ter condições de receber e decompor os contaminantes até um nível que não cause problemas ou alterações acentuadas que prejudiquem o ecossistema. Entretanto, nos casos de sobrecarga orgânica, os esgotos provocam total degradação do ambiente em decorrência do consumo excessivo do oxigênio dissolvido por microrganismos heterótrofos aeróbios (bactérias principalmente). A depleção do oxigênio resulta na morte dos organismos aquáticos. Segundo Campos *et al.* (1999), a disposição de esgotos brutos no solo ou em corpos receptores naturais é uma alternativa que foi e ainda é empregada de forma muito intensa.

Em 1893 e 1914 foram iniciadas as tecnologias de tratamento de esgotos em ambiente confinado conhecidas como tanques sépticos e lodos ativados, respectivamente. Durante muito tempo, acreditava-se que os esgotos poderiam ser tratados com alta eficiência somente por processos aeróbios, que exigem fornecimento de oxigênio, enquanto que o processo anaeróbio só se aplicava à digestão de lodo (CAMPOS *et al.*, 1999). Processos anaeróbios, por sua vez, eram empregados inicialmente como unidades únicas de separação de sólidos e digestão. Mais tarde, passaram a ser utilizados também como unidades separadas para digestão de lodos primário e secundário, oriundos de decantadores de estações baseadas em tratamento biológico aeróbio, como lodos ativados e filtros biológicos percoladores. Recentemente, os processos anaeróbios têm sido empregados como unidades principais para remoção de carbono orgânico de esgotos, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (FORESTI *et al.*, 2006).

Reatores de fluxo ascendente e manta de lodo, tipicamente conhecidos como UASB, foram um dos avanços mais importantes na tecnologia de digestão anaeróbia. Desenvolvidos por Lettinga *et al.* (1980), foram primeiramente empregados no tratamento de resíduos agro-industriais. Logo seu potencial para o tratamento de esgotos tornou-se aparente, especialmente em regiões de clima quente. A configuração deste reator tem sido aplicada com sucesso em estações de tratamento de esgoto (ETE) em escala plena em muitos países em desenvolvimento, tais como Brasil, Colômbia, México, Egito e Índia (VAN HAANDEL *et al.*, 2006). Segundo Sanz *et al.* (2005), atualmente, reatores UASB e configurações baseadas em seus principais aspectos constituem cerca de 2000 (75%) sistemas de tratamento anaeróbio no mundo.

A ampla difusão desta tecnologia anaeróbia no Brasil é resultante da demanda crescente por soluções simples e econômicas diante do déficit sanitário do país. Embora, nos últimos anos, sejam reconhecidas melhorias de alguns indicadores de cobertura da população por redes coletoras e por sistemas de tratamento de esgotos, ainda assim os índices são baixos, com cerca de 53% dos domicílios particulares urbanos conectados a redes coletoras (CHERNICHARO, 2007). Em relação ao tratamento de esgotos, pesquisas indicam apenas 31% dos esgotos gerados passam por alguma forma de tratamento. Além disso, as estações de tratamento apresentam eficiências reduzidas e problemas operacionais freqüentes. Estes fatores, aliados ao quadro epidemiológico e ao perfil sócio-econômico das comunidades brasileiras, vêm enfatizar a importância de se implantar sistemas simplificados de coleta e tratamento dos esgotos, que conjuguem baixos custos de implantação e operação, simplicidade operacional, índices mínimos de mecanização e sustentabilidade do sistema como um todo (CHERNICHARO, 2007).

Desde o surgimento e difusão dos reatores anaeróbios, entre as décadas de 1950 e 1980, eles se tornaram uma opção atrativa por serem compactos e dispensarem gastos com aeração, o que resultou em baixos custos de investimento. Além disso, a produção de lodo excedente é bem menor que a dos processos aeróbios e o gás metano produzido pode ser utilizado como fonte energética, inclusive para aquecimento de reatores em regiões de clima frio. Contudo, efluentes de reatores anaeróbios necessitam de pós-tratamento para remoção de poluentes, a fim de se alcançar os níveis de emissão exigidos pela legislação ambiental na maioria dos países. A tendência é a projeção de sistemas de tratamento com o reator anaeróbio como unidade principal, acoplado a unidades de pré e pós-tratamento, no intuito de se promover o polimento dos efluentes e uma eficiente recuperação dos recursos (FORESTI *et al.*, 2006).

Apesar da tecnologia dos reatores UASB estar amplamente difundida, seu projeto e operação são mais baseados em experiências empíricas ou práticas do que no conhecimento fundamentalmente científico do processo biológico, podendo levar ao super-dimensionamento dos volumes dos reatores e ao tratamento sub-ótimo ou instável (TAGAWA *et al.*, 2000; HORI *et al.*, 2006; O'FLAHERTY *et al.*, 2006). O uso no tratamento de esgoto sanitário e doméstico ainda é menos empregado pelo fato de informações experimentais serem escassas.

De acordo com Roest *et al.* (2005), apesar dos processos biológicos gerais que ocorrem em sistemas de tratamento anaeróbio serem bem conhecidos, a comunidade microbiana envolvida nas conversões bioquímicas é freqüentemente considerada como uma “caixa preta”. A principal dificuldade encontrada tem sido decorrente das limitações dos métodos disponíveis para identificação microbiana e avaliação de sua atividade metabólica que, até à década de 90, eram restritos às técnicas de isolamento e cultivo em laboratório. Na literatura, é consenso a falta do conhecimento fundamentalmente biológico sobre a natureza e a função dos consórcios microbianos anaeróbios, bem como a formação e o crescimento de biofilmes e bioagregados metanogênicos em sistemas de tratamento em escala plena. Tal dificuldade também é devida à natureza complexa das águas residuárias (O'FLAHERTY *et al.*, 2006). A compreensão detalhada dos fenômenos físico-químico-biológicos que governam o processo anaeróbio permitiria a identificação das causas de eventuais distúrbios, suas conseqüências a médio e longo prazo, assim como a adoção de medidas corretas de controle e prevenção de tais distúrbios (AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

3.2 Bioquímica da digestão anaeróbia

3.2.1 Processos de conversão bioquímica da matéria orgânica

Nas águas residuárias, há uma enorme variedade de compostos orgânicos biodegradáveis, o que resulta na existência de uma comunidade microbiana muito diversificada, responsável pela degradação dos diferentes compostos. Ao contrário da degradação aeróbia, na qual a matéria orgânica carbonácea é usualmente metabolizada diretamente à CO_2 , a degradação anaeróbia envolve 4 etapas distintas (Figura 3.1). Por se tratar de um material constituído de proteínas, carboidratos e lipídeos, vários são os caminhos metabólicos possíveis durante a conversão dos compostos a metano, realizados principalmente por microrganismos heterótrofos. Portanto, trata-se de um processo bioquímico complexo, composto de várias reações sequenciais, cada uma com determinadas populações microbianas.

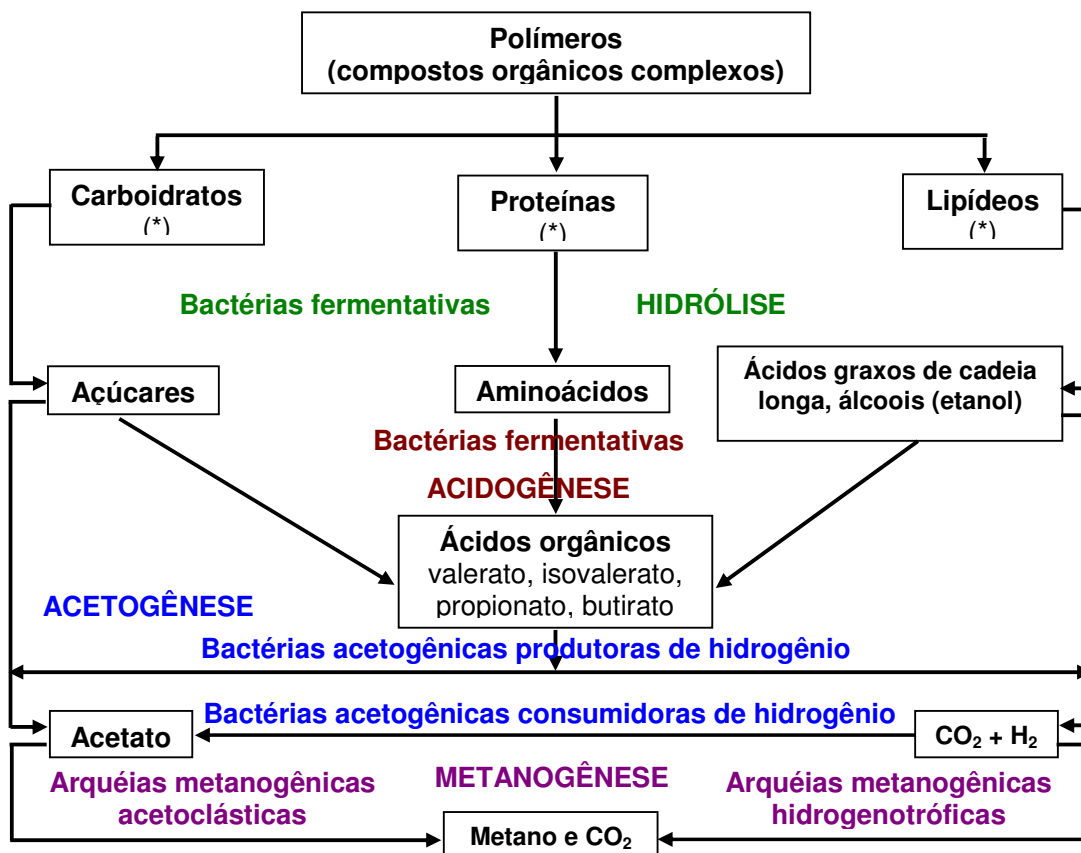


Figura 3.1 – Etapas metabólicas e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia

Fonte: adaptado de Mc Carty *et al.* (1982); Zehnder *et al.* (1982)

(*) exoenzimas que degradam carboidratos: celulase, hemicelulase, xilanase, amilase;
exoenzimas que degradam proteínas: proteases;
exoenzimas que degradam lipídeos: lipase, fosfolipase

3.2.1.1 Hidrólise

A hidrólise é a primeira etapa na degradação anaeróbia de polímeros complexos, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos, necessária para reduzir material particulado e dissolvido, a dimensões menores que 1 nm, que corresponde a pesos moleculares menores que 1.000 Da. Isso é necessário uma vez que as proteínas porinas, presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas, formam canais de aproximadamente 1 nm que permitem a entrada e saída da célula de substâncias hidrofílicas pequenas (MADIGAN *et al.*, 2003). Sendo assim, a hidrólise do material particulado, bem como de material solúvel de maior tamanho, é uma etapa essencial para aumentar a biodisponibilidade, ou seja, o acesso do substrato às células microbianas (AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

O material orgânico particulado é convertido em compostos dissolvidos de menor peso molecular por meio de exoenzimas, enzimas que são excretadas por bactérias fermentativas, também denominadas bactérias hidrolíticas. As proteínas são degradadas em (poli) peptídeos, os carboidratos em açúcares solúveis (mono e dissacarídeos) e os lipídeos, em ácidos graxos de cadeia longa (C₁₅ a C₁₇) e glicerol. Em certas situações, a alta complexidade do material orgânico pode resultar em uma baixa velocidade de hidrólise, tornando-a a etapa limitante de todo o processo de digestão.

Dentre os gêneros de bactérias hidrolíticas que se destacam no processo anaeróbio estão: *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, que são gêneros produtores de lipases para degradação de lipídeos à ácidos graxos; *Bacteroides*, *Butyivibrio*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Peptococcus* e *Bacillus*, que são gêneros produtores de proteases para degradação de proteínas à aminoácidos; e *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Acetivibrio*, *Eubacterium*, que são gêneros produtores de amilases para degradação de polissacarídeos à açúcares menores. A composição relativa e ativa destes microrganismos será refletida pelo tipo de substrato presente no sistema (ANDERSON *et al.*, 2003).

3.2.1.2 Acidogênese

Os compostos dissolvidos, gerados no processo de hidrólise, são absorvidos e metabolizados pelas bactérias fermentativas acidogênicas, que, por sua vez, excretam substâncias simples, como ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeia curta, alcoóis, ácido lático e compostos inorgânicos (CO₂, H₂, NH₃, H₂S, etc.). A acidogênese é realizada por um grupo diversificado de bactérias anaeróbias obrigatórias em sua maioria. Entretanto, algumas espécies são

facultativas e podem metabolizar a matéria orgânica por via oxidativa, utilizando oxigênio molecular (O_2) comoceptor de elétrons, removendo, eventualmente, resíduos de oxigênio dissolvido no sistema e, dessa forma, eliminando qualquer efeito tóxico aos microrganismos estritamente anaeróbios, dentre eles, as arqueias metanogênicas.

Dentre os gêneros de bactérias acidogênicas mais comuns em reatores anaeróbios estão *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, e *Escherichia*. Estima-se que este grupo ocorra em reatores anaeróbios em uma densidade que varia de 10^6 a 10^8 células por mL de lodo (ARCHER e KIRSOP, 1990). Os produtos metabólicos gerados pela atividade das bactérias acidogênicas são importantes substratos para as bactérias acetogênicas e para as arqueias metanogênicas.

3.2.1.3 Acetogênese

A principal função das bactérias acetogênicas na digestão anaeróbia é a produção de acetato, CO_2 e H_2 , substratos que são metabolizados pelas arqueias metanogênicas. Dois grupos distintos de acetogênicas podem ser distinguidos, baseados em seu metabolismo. O primeiro grupo é de bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio obrigatórias, também chamadas de acetogênicas redutoras de prótons, que produzem ácido acético, CO_2 e H_2 a partir de uma grande variedade de substratos, dentre eles: ácidos graxos intermediários (propionato e butirato), álcoois ou outros ácidos orgânicos maiores (valerato, isovalerato, palmitato).

Baseados em considerações termodinâmicas, especificamente da energia livre (ΔG) resultante da oxidação dos ácidos graxos, é previsto que estas bactérias sejam capazes de crescer apenas em ambientes sob baixas pressões de hidrogênio. Esta condição é alcançada quando microrganismos consumidores de hidrogênio estão presentes no sistema, tais como arqueias metanogênicas hidrogenotróficas ou bactérias redutoras de sulfato (BRS). A maioria dos ambientes metanogênicos mantém uma concentração de H_2 baixa (abaixo de 10^{-4} atm), que é suficiente para estimular o crescimento destas bactérias acetogênicas, evitando-se o acúmulo de ácidos (AQUINO e CHERNICHARO, 2005). A esta relação de dependência é dado o nome de sintrofia, e sabe-se que a presença de microrganismos sintróficos é essencial para um eficiente desempenho da digestão anaeróbia. Poucos microrganismos deste grupo têm sido isolados de lodos anaeróbios, sendo os gêneros *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter* e alguns gêneros de BRS os mais conhecidos.

O segundo grupo de bactérias acetogênicas são as homoacetogênicas, que são estritamente anaeróbias, catalisando a formação de acetato a partir de CO_2 e H_2 . Os gêneros mais conhecidos de bactérias homoacetogênicas são *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Butribacterium*, *Clostridium* e *Pelobacter*. A atividade metabólica destas bactérias independe das relações sintróficas mencionada acima, e por isso são mais facilmente isoladas de amostras de lodo anaeróbio. Assim como as metanogênicas, estas bactérias podem também contribuir para a manutenção de um ambiente com baixa pressão de H_2 . Uma estimativa destas bactérias em reatores anaeróbios sugere uma concentração de aproximadamente 10^5 células por mL de lodo (ARCHER e KIRSOP, 1990).

3.2.1.4 Metanogênese

O metano é produzido pelas arqueias metanogênicas por duas vias metabólicas principais: hidrogenotrófica e acetotrófica (ou acetoclástica). As arqueias hidrogenotróficas são autótrofas, reduzindo CO_2 a metano e usando H_2 como doador de elétrons, liberando H_2O . As arqueias acetoclásticas são heterótrofas, produzindo o metano e CO_2 a partir da redução do acetato (fermentação). Estas últimas têm grande importância em reatores anaeróbios, uma vez que é conhecido que cerca de 70% do metano produzido nestes sistemas é resultante da degradação de acetato (JETTEN *et al.*, 1992; CHERNICHARO, 2007; YU *et al.*, 2005). Maiores detalhes do processo de metanogênese serão descritos à frente.

3.2.1.5 Outros processos biológicos envolvidos na digestão anaeróbia

Além dos processos acima descritos que levam à produção de biogás, outros podem ocorrer nos reatores anaeróbios. Oxidantes alternativos ao O_2 , como nitrato (NO_3^-) e sulfato (SO_4^-), podem permitir o desenvolvimento de outras bactérias que usam catabolismo oxidativo. O nitrato pode ser reduzido a nitrogênio molecular (N_2) por bactérias desnitrificantes, enquanto que o sulfato pode ser reduzido a sulfeto (H_2S) por BRS. O último processo é mais importante, na prática, pelo fato do sulfato estar presente em concentrações consideráveis nos esgotos sanitários. No entanto, a redução de sulfato pode ser um processo indesejável, caso o objetivo seja a otimização da produção de metano, pois as BRS competem com as arqueias metanogênicas pelo consumo de acetato, H_2 e CO_2 , e o sulfeto formado, além de ser corrosivo, confere odor muito desagradável tanto à fase líquida quanto ao biogás, podendo ser tóxico para a metanogênese (FORESTI *et al.*, 1999).

3.2.2 Aspectos termodinâmicos e fisiológicos de arqueias e bactérias

Os aspectos termodinâmicos e cinéticos são cruciais na compreensão ecológica da complexa comunidade microbiana envolvida no processo de degradação anaeróbia. Os microrganismos envolvidos na acidogênese crescem rapidamente pelo fato das reações de fermentação terem rendimentos energéticos superiores aos das reações de formação do metano (Tabela 3.1). Segundo Rittmann *et al.* (2001), a partida e operação bem-sucedidas de um sistema anaeróbio requerem um balanço apropriado entre microrganismos hidrolíticos/fermentativos e metanogênicos. Mais ainda, Casserly *et al.* (2003) afirmaram que a capacidade de assimilação orgânica deste tipo de sistema depende da quantidade de biomassa ativa retida no reator, diretamente relacionada com a razão entre arqueias metanogênicas e bactérias acidogênicas metabolicamente ativas, necessária para a degradação anaeróbia de substratos biodegradáveis. Valores de constantes de cinéticas de Monod, com culturas anaeróbias, obtidos por Henze e Harremões em 1983 (*apud* FORESTI *et al.*, 1999), mostraram que a taxa máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) de bactérias acidogênicas é $2,0 \text{ d}^{-1}$, enquanto que a de arqueias metanogênicas é em torno de $0,4 \text{ d}^{-1}$. Pelo fato da taxa média de crescimento das arqueias ser muito mais baixa que a de bactérias, a taxa global do processo é controlada pela metanogênese. Respostas instáveis do sistema anaeróbio podem ser decorrentes de uma baixa atividade metanogênica em relação à de bactérias fermentativas, com reduzido uso de acetato, H_2 e CO_2 , causando acúmulo de AGV e acentuada diminuição do pH (CASSERLY *et al.*, 2003).

As equações dos processos bioquímicos envolvidos na digestão anaeróbia são mostradas na Tabela 3.1. AGV de cadeia curta são importantes intermediários no processo de degradação anaeróbia. A oxidação de propionato e butirato a acetato, CO_2 , H_2 e formiato são energeticamente desfavoráveis, sendo necessária a interação sintrófica entre arqueias metanogênicas e BRS (ou outros microrganismos consumidores de acetato e H_2). As BRS constituem um grupo polifilético de bactérias fisiologicamente versáteis, não restritas à redução de sulfato. A degradação de propionato e butirato pelas bactérias acetogênicas, por sua vez, é fortemente influenciada pela presença ou ausência de sulfato. Na ausência de sulfato, a conversão destes compostos é termodinamicamente possível somente sob baixa pressão parcial de hidrogênio e concentração de formiato, características de consórcio sintrófico. Na presença de sulfato, propionato e butirato podem ser convertidos à CO_2 pelas BRS sem a participação de metanogênicas (ROEST *et al.*, 2005).

Tabela 3.1 – Comparação energética de algumas reações comuns na digestão anaeróbia

Acidogênese		ΔG_0 (kJ/mol)
glicose → acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$	-206,0
glicose → propionato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	-358,0
glicose → butirato	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$	-255,0
Acetogênese		
bicarbonato → acetato	$2HCO_3^- + 4H_2 \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	-104,6
propionato → acetato	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + HCO_3^- + 3H_2$	+76,1
propionato → acetato	$CH_3CH_2COO^- + 2HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 3HCOO^-$	+72,2
butirato → acetato	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+48,1
etanol → acetato	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+9,6
lactato → acetato	$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + HCO_3^- + 2H_2$	-4,2
Metanogênese		
acetato → metano	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow HCO_3^- + CH_4$	-31,0
hidrogênio → metano	$H_2 + \frac{1}{4} HCO_3^- + \frac{1}{4} H^+ \rightarrow \frac{1}{4} CH_4 + \frac{3}{4} H_2O$	- 33,9
formiato → metano	$HCOO^- + \frac{1}{4} H_2O + \frac{1}{4} H^+ \rightarrow \frac{1}{4} CH_4 + \frac{3}{4} HCO_3^-$	-32,6
bicarbonato → metano	$HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135,6
Sulfetogênese		
sulfato → sulfeto	$SO_4^{2-} + 4H_2 + H^+ \rightarrow HS + 4H_2O$	-151,9

Fonte: adaptado de Foresti (1994), Lettinga *et al.* (1994) e Aquino e Chernicharo (2005)

3.3 Características gerais do domínio *Archaea*

3.3.1 Aspectos gerais

A descrição do Domínio *Archaea* iniciou-se na década de 1970, quando Woese *et al.* investigavam características genéticas e bioquímicas de vários microrganismos, inclusive dos metanogênicos. Os pesquisadores descobriram que os metanogênicos apresentavam diferenças na constituição química da parede celular e da membrana plasmática, além de possuírem RNA polimerases (enzimas responsáveis pela síntese de proteínas) mais complexas e vias metabólicas incomuns às demais bactérias. Inicialmente, estes microrganismos foram reunidos no grupo “Arqueobactéria” para distinguir das “Eubactérias” (bactérias verdadeiras). Atualmente, sabe-se que as características genéticas e celulares de arqueias são mais semelhantes às de organismos eucarióticos do que às de bactérias comuns. A reclassificação filogenética, elaborada por Woese e colaboradores, incluiu as arqueias em um Domínio à parte, denominado de *Archaea*.

As arqueias são, portanto, unicelulares e procarióticas, anaeróbias, apresentando uma ampla diversidade metabólica, atributos bioquímicos e estruturais únicos, os quais as adaptaram a viver em habitats considerados inóspitos aos demais seres vivos, tais como: fontes geotermiais (hipertermófilos), habitats com elevada salinidade (hiperhalófilos), solos e sistemas aquáticos altamente ácidos ou alcalinos (VAZOLLER *et al.*, 1999). Desde então, investigações têm sido

feitas sobre sua importância funcional nestes ecossistemas e sobre a atuação de tais microrganismos nos processos biogeoquímicos em ambientes não-extremos.

3.3.2 Classificação taxonômica

Conforme classificação taxonômica do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), atualmente o domínio *Archaea* compreende 4 filos: Crenarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota e Euryarchaeota. Segundo Vazoller *et al.* (1999), o filo *Crenarchaeota* compreende microrganismos capazes de crescer em temperaturas extremas (com ponto ótimo acima de 80°C), conhecidos como hipertermófilos. Foram inicialmente observados em amostras de solos e águas geotermiais contendo enxofre elementar e sulfetos; posteriormente, em fendas termais vulcânicas no leito oceânico, sob temperaturas a 100°C. O filo Korarchaeota engloba organismos hipertermófilos pouco conhecidos, identificados a partir de seqüências de DNAr 16S isoladas de fontes termais terrestres, porém ainda não cultivados em laboratório. O filo Nanoarchaeota também engloba arqueias hipertermófilas pouco conhecidas, de cerca de 400 nm de diâmetro, encontradas em associação com outras arqueias do gênero *Ignicoccus*, isoladas de fendas submarinas (HUBER *et al.*, 2002). Dentro do filo Euryarchaeota, os principais representantes são as arqueias metanogênicas. O filo inclui também um grupo distinto de organismos termo-acidófilos associados ao gênero *Thermoplasma*, que são caracterizados pela ausência de parede celular (VAZOLLER *et al.*, 1999).

Embora sejam microrganismos habitualmente encontrados em ambientes extremos, clones filogeneticamente mais próximos ao filo Crenarchaeota e ao gênero *Thermoplasma* têm sido detectados em diversos sistemas de tratamento anaeróbio, tais como digestor de resíduos da destilação de vinho (vinhaça) (GODON *et al.*, 1997), reator UASB tratando efluente de fábrica de papel (ROEST *et al.*, 2005), aterro sanitário (CARPENTIER *et al.*, 2006) e digestor de lodo (CHOUARI *et al.*, 2006). Porém o papel destes microrganismos no processo de digestão anaeróbia permanece desconhecido, uma vez que ainda não foram isolados e /ou cultivados.

3.3.3 Fisiologia das arqueias metanogênicas

As arqueias metanogênicas são os principais representantes do filo Euryarchaeota, compreendendo quatro classes: Methanobacteria, Methanococci, Methanopyri e Methanomicrobia com suas respectivas ordens: Methanobacteriales, Methanococcales,

Methanopyrales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales, sendo as duas últimas pertencentes à classe Methanomicrobia. São as espécies de arqueias mais conhecidas e estudadas. Estão amplamente distribuídas em ambientes anóxicos naturais, como sedimentos aquáticos profundos, pântanos, trato digestivo de ruminantes, animais endotérmicos e alguns insetos, digestores anaeróbios de tratamento de resíduos e de efluentes e aterros sanitários (VAZOLLER *et al.*, 1999). Na Tabela 3.2, são apresentados alguns grupos de arqueias encontrados em sistemas de tratamento anaeróbio, citados na literatura, bem como a morfologia típica de cada grupo.

Tabela 3.2 – Principais grupos de arqueias metanogênicas encontrados em sistemas de tratamento anaeróbio

Ordem	Família	Gênero	Morfologia (*)
Methanosarcinales	Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta</i>	Filamentos longos e finos
		<i>Methanosarcina</i>	Agregados de cocos irregulares
	Methanosarcinaceae		Dois ou quatro cocos
		<i>Methanomethylovorans</i>	irregulares, formando agregados
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	Filamentos curtos ou longos
		<i>Methanobrevibacter</i>	Filamentos curtos
		<i>Methanosphaera</i>	Cocos
Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobium</i>	Filamentos curtos
		<i>Methanogenium</i>	Cocos irregulares
		<i>Methanoplanus</i>	Células formam placas finas
		<i>Methanoculleus</i>	Cocos irregulares
	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	Espirilos
	Methanocorpusculaceae		
		<i>Methanocorpusculum</i>	Cocos irregulares

Fonte: (*) Whitman *et al.* (1992); Madigan *et al.* (2003)

De acordo com o tipo de substrato para o crescimento e formação de metano, as arqueias metanogênicas podem ser classificadas, conforme mostrado na Tabela 3.3, em três grupos fisiológicos: metanogênicas metilotróficas, que utilizam compostos metilados como metilaminas, metanol e metanotiol; metanogênicas hidrogenotróficas (maioria das espécies), que utilizam o gás carbônico e o hidrogênio, formiato ou alguns álcoois; metanogênicas acetotróficas ou acetoclásticas, que utilizam acetato (WHITMAN *et al.*, 1992).

Tabela 3.3 – Vias metabólicas da metanogênese e arqueias associadas

Via metabólica	Ordem	Reação	ΔG_o (kJ/mol de CH ₄)
Acetoclástica	Methanosarcinales (<i>Methanosaeta</i> , <i>Methanosarcina</i>)	$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-31,0
	Methanosarcinales (<i>Methanosarcina</i>)		
Hidrogenotrófica	Methanobacteriales	$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-135,6
	Methanococcales	$4\text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130,1
	Methanomicrobiales		
	Methanopyrales		
Metilotrófica	Methanosarcinales	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-104,9
	(<i>Methanosarcina</i>)	$4\text{CH}_3\text{NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_3$	-75,9

Fonte: Carpentier *et al.* (2006)

Dentre as cinco ordens, somente a Methanosarcinales inclui os únicos dois gêneros conhecidos de arqueias acetoclásticas: *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. O primeiro, único da família Methanosaetaceae, é constituído por espécies que formam filamentos longos e finos, importantes na formação da trama microbiana presente nos grânulos de reatores anaeróbios. É especialista, tendo uma alta afinidade pelo acetato, mas uma taxa de crescimento específico relativamente baixa (tempo de duplicação celular de 3,5 a 9 dias) (JETTEN *et al.*, 1992). Os membros do gênero *Methanosarcina*, pertencente à família Methanosarcinaceae, formam cocos que se agregam, formando “pacotes”, e são generalistas (seus membros podem apresentar os três tipos de metabolismo). Têm uma taxa de crescimento específico maior (24 horas de tempo de duplicação celular), quando comparada ao da *Methanosaeta*, entretanto, apresenta uma baixa afinidade pelo acetato (JETTEN *et al.*, 1992).

3.4 Distribuição das arqueias metanogênicas em sistemas de tratamento anaeróbio

3.4.1 Distribuição espacial em grânulos anaeróbios

A biogranulação envolve interações célula-célula que incluem os fenômenos físico-químico-biológicos. Os grânulos constituem-se de densos consórcios microbianos com diferentes espécies. São capazes de alta retenção de biomassa, tipicamente contendo milhões de organismos por grama e podem tratar efluentes com alta carga orgânica ou resistir a eventuais choques de carga no tratamento de outros tipos de águas residuárias (LIU *et al.*, 2004).

A composição microbiana dos grânulos metanogênicos tem sido extensamente estudada no que diz respeito à sua estrutura interna e distribuição espacial dos microrganismos por vários

grupos de pesquisadores (SEKIGUCHI *et al.*, 1998; TAGAWA *et al.*, 2000; CHAN *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2002; BATSTONE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; DÍAZ *et al.*, 2006). O modelo de distribuição de microrganismos em grânulos mostra que microrganismos metanogênicos localizam-se no interior, enquanto que as bactérias predominam na região periférica do grânulo (SEKIGUCHI *et al.*, 1998). Esta separação espacial dos microrganismos parece estar relacionada à disponibilidade de substrato, ou seja, substratos orgânicos são degradados a medida que penetram no grânulo o que faz com que substratos precursores de metano estejam disponíveis apenas no interior do grânulo.

De acordo com Batstone *et al.* (2004), um ótimo desempenho de reatores UASB depende de um lodo granular bem desenvolvido. Certas propriedades, tais como alta resistência a choques físicos e a toxinas e alta velocidade de sedimentação, são desejáveis nos grânulos e devem ser fortemente influenciados por suas estruturas microbiana e física. Os estudos realizados em microscopia eletrônica e FISH por esses pesquisadores sobre a estrutura e composição microbiana de grânulos de quatro tipos de reatores UASB, em escala plena, revelaram resultados interessantes. Um dos reatores tratava efluente de fábrica de conservas (rico em sacarídeos solúveis), o segundo reator tratava efluente de matadouro (rico em proteínas solúveis, proteínas e ácidos graxos particulados) e os dois últimos tratavam efluentes de cervejarias. A diversidade microbiana foi maior nos grânulos de proteínas, enquanto que nos outros, foram vistos apenas 3 a 4 grupos principais. Os grânulos que tratavam efluente rico em proteínas se caracterizavam por uma baixa densidade de microrganismos, apesar da maior diversidade, e pela ausência de uma estrutura interna em camadas, como vista comumente nos outros tipos de grânulos. A razão pode ser a natureza particulada do efluente que, com baixa carga orgânica disponível, oferece uma hidrólise limitada dos substratos. Há indícios de que os grânulos desse tipo são mais densos e crescem 50% menos do que os outros.

Segundo Díaz *et al.* (2006), em vários estudos, tanto com reatores em escala plena, quanto em escala laboratorial, freqüentemente observam-se grânulos com diferentes tamanhos (de centenas de micrômetros a poucos milímetros) e com diferentes cores. Em seus estudos de caracterização de grânulos de um reator UASB tratando efluente de cervejaria, diferentes técnicas de biologia molecular (FISH, DGGE e clonagem), além de microscopia eletrônica, foram combinadas para elucidar a relação de estrutura-função nos diferentes grânulos. Seus resultados mostraram grânulos com diferentes tamanhos e taxas de sedimentação, com cores que variavam de preto, cinza e marrom. Na visualização por microscopia eletrônica, verificou-se que os grânulos pretos eram pequenos e compactos, os marrons, menos

compactos e porosos e os cinzas, compostos por várias camadas definidas e concêntricas de microrganismos.

No estudo conduzido por Diaz *et al.* (2006), a localização de bactérias e arqueias nos grânulos anaeróbios foi feita por meio de FISH. Nos grânulos pretos, as bactérias apareciam na parte externa, enquanto que as arqueias formavam densos agrupamentos dentro dos grânulos, entretanto, com baixa atividade. Bactérias Gram-negativas eram as bactérias mais abundantes em grânulos pretos e cinzas, porém, ausentes em grânulos marrons. Com respeito ao domínio *Archaea*, em todos os três tipos de grânulos, o gênero *Methanosaeta* foi predominante (75 a 96% do total de células de arqueias). As bandas mais intensas do DGGE de arqueias foram excisadas, analisadas por meio de clonagem e seqüenciadas, estando mais próximas filogeneticamente de *Methanosaeta concilii*, *Methanosarcina mazei* e *Methanospirillum hungatei*. Segundo os autores, os resultados são indicações de que os diferentes tipos de grânulos refletiriam diferentes passos no desenvolvimento do lodo e na degradação metanogênica e, recentemente, tem sido proposto um modelo para explicar esse fenômeno (PICIOREANU *et al.*, 2005).

Grânulos pretos seriam grânulos jovens e que bactérias Gram-negativas (principalmente α -proteobactéria) e arqueias dos gêneros *Methanosarcina* e *Methanospirillum* seriam os microrganismos pioneiros. Como consequência dos problemas de difusão e da perda de nutrientes, o crescimento ocorreria principalmente na periferia do grânulo, formando multicamadas. Bactérias metabolicamente ativas colonizariam a superfície dos grânulos, enquanto que compostos no meio são ativamente degradados e arqueias metanogênicas desenvolveriam-se no interior dos grânulos, formando grandes colônias. É provável que relações sintróficas sejam estabelecidas entre bactérias acetogênicas redutoras de prótons e arqueias consumidoras de hidrogênio. Os grânulos cinzas têm uma forma esférica ou elipsóide e correspondem à maioria dos grânulos presentes no lodo. Os microrganismos predominantes nestes grânulos foram as bactérias Gram-positivas e as arqueias do gênero *Methanosaeta*. Os grânulos marrons seriam os grânulos velhos, relativamente grandes, que possuem uma estrutura leve e fofa, cheia de áreas e canais entre as camadas e no interior do grânulo, que teriam surgido devido a problemas de difusão. Hibridização com sondas fluorescentes mostrou que a parte interna de grânulos marrons e cinzas exibe pouca ou nenhuma atividade microbiana. Somente os grânulos pretos parecem abrigar microrganismos ativos no seu interior (DÍAZ *et al.*, 2006).

3.4.2 Variações populacionais e estabilidade funcional da comunidade metanogênica em reatores tratando efluentes sintéticos

Pelo fato da decomposição anaeróbia se tratar de um processo biológico lento e complexo, susceptível a várias interferências externas ou ambientais, grande parte dos experimentos são conduzidos com efluentes sintéticos sob condições controladas, durante vários meses ou anos. Reatores em escala laboratorial são relativamente pequenos, com pouca capacidade (1,4 a 16 L) e com controle de parâmetros tais como pH (7,0 – 7,2), alcalinidade, DQO afluente. Geralmente, são mantidos sob agitação contínua e em temperatura mesofílica (35°C). Alguns estudos são conduzidos em temperatura termofílica (55°C).

Um dos primeiros estudos de caracterização microbiana de sistemas anaeróbios foi o de Raskin *et al.* (1994) usando a técnica de hibridização em membrana com RNAr. Em seus estudos com 2 frascos de cultivo anaeróbio, submetidos a alimentação com glicose (8 e 11 meses) e, depois, com acetato (10 e 7 meses), como única fonte de carbono, mostraram que, em ambas as situações, verificou-se uma redução significativa da porcentagem de bactérias (3,4% e 3,0% do RNAr total) e aumento na porcentagem de arqueias (86% e 96%). Análises de FISH mostraram um predomínio de agregados multicelulares de *Methanosarcina* (família Methanosarcinaceae) enquanto filamentos de *Methanosaeta* foram virtualmente ausentes. O predomínio de membros de *Methanosarcina* pode ter sido favorecido por causa das concentrações relativamente altas de acetato presentes nos frascos (100 a 200 mg/L).

Resultados foram encontrados por Fernández *et al.* (2000) e Hashsham *et al.* (2000), que mostraram que nem sempre uma alta diversidade de microrganismos significa maior estabilidade do sistema diante de condições perturbadoras ou desequilíbrios no meio. O aparato experimental de ambos os estudos constituía-se de oito reatores anaeróbios mesofílicos, alimentados com solução de glicose enriquecida e tamponada. Quatro reatores foram submetidos ao suprimento de glicose durante 200 dias e os outros quatro, por 60 dias. Análise microbiana feita por microscopia de contraste de fase e biologia molecular indicou que os reatores operados por mais tempo continham uma elevada abundância de microrganismos, porém com baixa diversidade, com alta quantidade de espiroquetas, denominado de *high-spirochete* (HS), enquanto que os reatores operados em menos tempo (mais jovem) continham uma biomassa mais diversa, porém menos abundante, com menor quantidade de espiroquetas, chamados *low-spirochete* (LS). Apesar desta significativa diferença em termos de abundância e diversidade microbiana, ambos os reatores apresentaram

a mesma eficiência de remoção, indicando que a estabilidade funcional pode não depender de uma estabilidade na estrutura microbiana.

No estudo de Fernández *et al.* (2000) foram detectados baixos níveis de RNAr de bactérias (2 a 4%), semelhantes aos encontrados por Raskin *et al.* (1994). Apesar de restrita e pequena, a comunidade de bactérias era mais diversa e sofreu maiores alterações que a de arqueias frente ao choque orgânico. O fato da comunidade de bactérias ser consideravelmente mais diversa e estar sujeita a maiores variações populacionais que a de arqueias é uma informação consenso em diversos trabalhos descritos na literatura (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; CASSERLY *et al.*, 2003; LECLERC *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005a; BUZZINI *et al.*, 2006; HORI *et al.*, 2006). Hori *et al.* (2006) chegam a inferir que a comunidade de arqueias seria mais influenciada pela concentração de AGV e a de bactérias, pela variação de pH e, provavelmente, no tipo de efluente a ser tratado.

Nos estudos de Fernández *et al.* (2000) e Hashsham *et al.* (2000), embora com uma baixa variabilidade de arqueias, houve uma notável diferença entre o predomínio de populações desta comunidade em cada conjunto de reatores. Nos reatores HS, onde houve acúmulo de ácidos orgânicos, membros de arqueias acetoclásticas, pertencentes ao gênero *Methanosarcina*, foram predominantes (mais de 61% do RNAr total de arqueias), seguidos de *Methanomicrobiales* (menos de 20%), *Methanosaeta* (11 a 19%), *Methanobacteriales* (6 a 12%). Em contraste, nos reatores LS, houve o predomínio de arqueias hidrogenotróficas da ordem *Methanomicrobiales* (mais de 60%); seguidas de *Methanosaeta* (20 a 38%); *Methanosarcina* (cerca de 1%), *Methanobacteriales* (menos de 1%).

Provavelmente, as diferenças observadas nas populações de arqueias no estudo de Fernández *et al.* (2000) e Hashsham *et al.* (2000) foram diretamente influenciadas pela comunidade de bactérias, uma vez que estas são as que produzem os substratos precursores metanogênicos. Isto foi comprovado nos experimentos conduzidos por Sanz *et al.* (2005) com reatores anaeróbios (UASB) submetidos a vários tipos de efluentes sintéticos, previamente inoculados com lodo de outro reator UASB que tratava efluente de cervejaria. Os pesquisadores observaram que a porcentagem de arqueias em relação ao número de procariontes era em torno de 58 a 59% em grânulos tratando substratos complexos, atingindo mais de 90% em grânulos tratando efluentes ricos em AGV, como acetato e propionato, e até 100%, no tratamento de formiato. O gênero *Methanosarcina* e membros de *Methanobacteriales* eram maioria em grânulos cultivados em altas concentrações de acetato e formiato,

respectivamente, enquanto que o gênero *Methanosaeta* predominou na presença de substratos complexos ou em baixas concentrações de acetato.

Outra informação importante obtida nos estudos de Fernández *et al.* (2000), é que, mesmo após o choque orgânico, o desempenho dos reatores foi uniforme, (remoção de DQO em torno de 93%), apesar da variação observada na estrutura da comunidade microbiana, indicando que houve uma replicação da função, sem, no entanto, a replicação da estrutura da comunidade, ou seja, outros grupos microbianos estavam presentes, desenvolvendo as mesmas funções metabólicas. Resultados das análises microbiológicas e químicas indicaram que o reatores HS consumiram a glicose de modo paralelo (glicose a acetato, glicose a butirato, etc) em 10 horas, enquanto que os reatores LS consumiram a glicose de modo serial (glicose a lactato; lactato a butirato; butirato a acetato) em 20 horas. Isto resultou numa recuperação do conjunto HS (16 a 24 dias) ao estado constante (*steady-state*), similar àquele antes do choque, mais rápida do que a do conjunto LS (cerca de 40 dias).

Fernandez *et al.* (2000) e Hashsham *et al.* (2000) concluíram que as funções ecológicas de comunidades microbianas similares são replicáveis dentro de sistemas complexos. Entretanto, a estabilidade de um sistema ecológico pode estar mais ligada a uma comunidade mais flexível quanto à sua capacidade de deslocar, de maneira eficiente, vias metabólicas alternativas do que propriamente a uma maior diversidade de microrganismos. Dependendo das populações microbianas envolvidas, a presença de um grupo menor, mas importante, pode definir essas vias metabólicas. Além disso, redução na diversidade não significou, necessariamente, redução na estabilidade do sistema; em outras palavras, estabilidade funcional não implicou em estabilidade na estrutura da comunidade microbiana envolvida.

3.4.3 Estrutura e composição da comunidade de arqueias metanogênicas em sistemas anaeróbios em escala plena

Leclerc *et al.* (2004) avaliaram a diversidade de arqueias em 44 sistemas anaeróbios, em escala laboratorial ou plena, localizados em diferentes países (França, Espanha, Austrália, México, Canadá, Irlanda, Alemanha e Reino Unido), de diferentes configurações (reator de filme fixo, reator de leito fluidizado, tanque de mistura completa, reator sequencial em batelada, reator UASB e lagoa anaeróbia), tratando resíduos sólidos municipais e efluentes de agricultura, de indústrias de processamento de alimento, de petroquímica, de fábrica de polpa de papel, de cervejarias e de matadouros. Por meio de análise de PCR-SSCP, eles encontraram 4 a 6 picos distintos de arqueias em cada tipo de reator. Todas as seqüências

genéticas foram relacionadas ao filo Euryarchaeota, sendo que as mais freqüentes estavam mais próximas à espécie *Methanosaeta concilli* e ao gênero *Methanobacterium* (freqüência de 84% e 73%, respectivamente). O estudo mostrou também outras seqüências, próximas aos gêneros *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus*, *Methanospirillum*, *Methanocorpusculum*, *Methanosarcina* e *Methanomethylovorans*. Um grande número de seqüências, entretanto, foi relacionado a clones com propriedades fisiológicas ainda desconhecidas, que têm sido obtidas de ecossistemas diferentes de reatores anaeróbios (CASSERLY *et al.*, 2003; CHOUARI *et al.* 2005; ROEST *et al.*, 2005; KEYSER *et al.*, 2006). Nos estudos de Chouari *et al.* (2005), a maioria dos clones de arqueias encontrados (66,6%) foi reunida em um grupo ainda não identificado.

Leclerc *et al.* (2004) afirmaram que, além de parâmetros ambientais, a origem do inóculo e a configuração dos reatores podem influenciar na ocorrência e na distribuição das espécies de arqueias. Os reatores em escala laboratorial apresentaram uma diversidade ligeiramente menor que a dos reatores em escala plena. Dentre os tipos de reatores, os de mistura completa parecem abrigar uma diversidade considerável, com grande freqüência de clones ainda desconhecidos, significando que os outros reatores devem impor maior pressão seletiva. Outro aspecto é que a freqüência de *Methanosarcina frigus* parece ser mais alta nos reatores de filme fixo e de mistura completa, enquanto que é ausente ou muito baixa em reatores UASB. *Methanosarcina frigus* foi freqüentemente isolada de reatores onde *Methanosaeta concilli* não era predominante, o que sugeriu uma exclusão mútua entre as espécies, confirmando assim a competição entre as mesmas. Os reatores UASB parecem favorecer a presença do gênero *Methanosaeta*, o que pode refletir sua grande importância na estabilização dos grânulos.

Resultados de Casserly *et al.* (2003) mostraram uma brusca alteração funcional da comunidade microbiana, provavelmente, em resposta à adaptação ao efluente, caracterizada pelo aumento da atividade de arqueias em relação à de bactérias, com o conseqüente deslocamento de uma população sintrófica, constituída por microrganismos oxidadores de acetato e arqueias hidrogenotróficas para o predomínio de uma população de arqueias acetoclásticas. Estes resultados corroboram com os de Delbès *et al.* (2001) e Leclerc *et al.* (2001) que monitoraram um reator anaeróbio, em escala de bancada, alimentado com glicose.

Roest *et al.* (2005) avaliaram a diversidade microbiana de um reator UASB mesofílico, estável, tratando efluente de fábrica de papel na Holanda. Perfis de DGGE foram feitos em vários momentos e comparados, não sendo verificada nenhuma mudança significativa na

diversidade microbiana, somente leves flutuações populacionais. Por meio de clonagem e sequenciamento de fragmentos obtidos de DGGE, os autores determinaram que a microbiota do reator consistia de múltiplas espécies e gêneros de microrganismos com propriedades fisiológicas similares e que a estabilidade temporal da comunidade sugeria que um equilíbrio funcional havia sido alcançado, uma redundância funcional que reforça a elasticidade do grânulo mesofílico. Tal hipótese corrobora com alguns estudos feitos em reatores, em escala de bancada, tratando efluentes sintéticos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000; HASHSHAM *et al.*, 2000).

3.4.4 Fatores que controlam a distribuição de metanogênicas em reatores anaeróbios

Em todos os sistemas biológicos de tratamento de efluentes, a remoção efetiva de poluentes depende não apenas do potencial metabólico dos microrganismos, mas também de condições ambientais apropriadas para tais atividades. As características fisiológicas dos microrganismos metanogênicos, tais como o baixo crescimento inerente e a alta susceptibilidade a variações nas condições externas (pH, temperatura ou substratos químicos), tornam o processo de tratamento anaeróbio sensível a mudanças ambientais. Estes desequilíbrios podem levar ao acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV), com reduzida produção de metano no biogás, levando a uma redução na eficiência dos reatores, causando colapso no processo ou, pelo menos, longos períodos para sua recuperação (DELBÈS *et al.*, 2001; AQUINO e CHERNICHARO, 2005; HORI *et al.*, 2006,).

Fatores como composição e concentração de nutrientes, temperatura, pH, intensidade de mistura, toxicidade têm sido amplamente investigados. Em particular, a eficiência de reatores UASB está relacionada a vários fatores ambientais e operacionais incluindo o TDH, a velocidade ascensional, a carga orgânica aplicada, a DQO afluente, a temperatura de operação, a presença de inibidores e de compostos xenobióticos, bem como a configuração do reator (LETTINGA, 1995).

Análises minuciosas da estrutura e da atividade da comunidade microbiana envolvida na digestão anaeróbia em situações de estresse, desequilíbrio ou estabilidade dos reatores, sob diferentes condições operacionais, têm sido intensivamente realizadas, no intuito de se compreender o processo biológico e, conseqüentemente, o desempenho de reatores anaeróbios em escala plena. Na literatura, há vários estudos de caracterização da estrutura da comunidade microbiana e monitoramento de suas dinâmicas populacionais em reatores, em escala laboratorial, tratando efluentes sintéticos constituídos de substratos prontamente utilizáveis,

tais como glicose e acetato, além de nutrientes (RASKIN *et al.* 1994; SEKIGUCHI *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ *et al.*, 2000; HASHSHAM *et al.*, 2000; DELBÈS *et al.*, 2001; LECLERC *et al.*, 2001; SANZ *et al.* 2005; HORI *et al.*, 2006).

Segundo Leitão *et al.* (2006), em reatores UASB as variações na carga hidráulica afetam especificamente a dinâmica da manta de lodo, devido sua expansão ou contração, determinados pelo equilíbrio entre a velocidade ascensional e a velocidade de sedimentação do lodo. Dessa forma o aumento da carga hidráulica aplicada pode resultar em um aumento na concentração de sólidos suspensos no efluente devido ao arraste de biomassa mais leve, à redução na capacidade de filtragem da manta de lodo em altas velocidades ascensionais, e à desintegração dos grânulos ou flocos (YANG e ANDERSON, 1993; LEITÃO *et al.*, 2006). Além desses efeitos físicos, o aumento na velocidade ascensional (devido ao aumento da vazão) causará um aumento da carga orgânica aplicada, o que pode resultar, a depender da ecologia microbiana presente no reator antes do choque de carga, em acúmulo de ácidos graxos voláteis. O acúmulo de AGV associado ao aumento da produção de CO₂ pelas bactérias acidogênicas, consumirá alcalinidade do meio e pode levar à redução do pH a depender da capacidade de tamponamento do sistema. A queda no pH e o acúmulo de AGV contribuem para inibições de ordem termodinâmica e cinética dentro dos reatores anaeróbios, resultando em queda na produção de metano e falha do sistema de tratamento como um todo.

Essa série de eventos está intimamente relacionada às espécies microbianas predominantes nos reatores, e por isso é importante se estudar a dinâmica de população em reatores UASB submetidos a choques de carga orgânica e hidráulica. Segundo Fernández *et al.* (1999) a estabilidade funcional de um reator não necessariamente implica em estabilidade na comunidade microbiana, uma vez que uma comunidade dinâmica pode ser desenvolvida no ecossistema. Também é suposto que a instabilidade de um sistema e a queda na sua eficiência estejam intrinsecamente relacionadas a flutuações na comunidade microbiana e à predominância de determinados grupos. Portanto, mais investigações envolvendo a estrutura e dinâmica de populações durante a operação de reatores, principalmente em sistemas reais de tratamento, associadas à caracterização química detalhada, devem ser realizadas para que os processos de degradação biológica da matéria orgânica em reatores sejam melhor compreendidos.

Leitão *et al.* (2006) observaram que a inibição da metanogênese, acarretada pelo aumento da carga aplicada (aumento da vazão), foi relacionada à uma mudança na comunidade

microbiana do grânulo, de uma biomassa predominantemente metanogênica para uma biomassa não-metanogênica constituída principalmente for longos filamentos.

O grau e o tipo de mistura também afetam a taxa de crescimento e a distribuição dos microrganismos na manta de lodo, além de ditarem a disponibilidade de substrato e as taxas de sua utilização, influenciam na granulação e na produção de biogás. Em reatores do tipo UASB, uma mistura adequada entre lodo e a água residuária é alcançada principalmente pelo sistema de distribuição do afluente associado a uma velocidade ascensional mínima (LETTINGA, 1995). Segundo este autor, uma mistura inadequada causada por altos valores de TDH, levaria a um elevado tempo de contato entre o substrato e a biomassa, em particular dos ácidos graxos produzidos, os quais podem inibir a atividade microbiana dependendo da sua concentração. Por outro lado, a redução excessiva do TDH pode resultar em diminuição da eficiência de tratamento devido a não conversão de substrato afluente, que vai depender dos parâmetros cinéticos vigentes.

De acordo com Speece (1996) muitas substâncias inibidoras podem entrar em contato com a biomassa ou por estarem presentes no afluente do reator, ou porque são produzidas durante o metabolismo microbiano. Tais substâncias inibidoras, que podem diminuir a taxa da digestão ou levar a uma falha no tratamento, incluem metais pesados, AGV, oxigênio, amônia, e sulfeto. Em particular, a inibição por AGV ocorre por questões termodinâmicas, pela conseqüente redução do pH do meio, e também pela toxicidade direta dos ácidos, que na forma protonada (não ionizada) tem maior facilidade de atravessar a membrana plasmática das células (HAJARNIS e RANADE, 1994).

O efeito da temperatura no desempenho geral do reator depende não só do seu valor absoluto, mas também da duração do choque, ou seja, no tempo em que o reator será operado fora da faixa de temperatura ideal. Além disso, o efeito causado pela mudança na temperatura de operação dependerá das características do lodo bem como da dinâmica de população que pode suceder àquela mudança ambiental. Em temperaturas que excedam a taxa máxima de crescimento microbiano, a taxa de decaimento celular excederá a taxa de crescimento microbiano e conseqüentemente ocorrerá um decréscimo na atividade específica do lodo e a eficiência do reator (VAN LIER *et al.*, 1990). Geralmente o efeito de um choque de temperatura gera um desbalanço na digestão anaeróbia devido a diferentes respostas dos vários grupos metabólicos de microrganismos. Um exemplo direto do efeito da temperatura na estrutura da comunidade microbiana é com relação às bactérias oxidadoras de propionato,

que geralmente são os microrganismos mais sensíveis ao aumento da temperatura, assim uma diminuição de sua atividade metabólica poderia levar a um acúmulo de propionato no sistema. As arqueias metanogênicas são mais sensíveis às mudanças na temperatura do que as bactérias acidogênicas. Dessa forma a mudança de temperatura pode comprometer a eficiência do sistema de tratamento pelo aumento indireto na pressão de hidrogênio no ambiente (VAN LIER *et al.*, 1990). Entretanto, se a mudança de temperatura permanecer por um longo tempo, uma nova população ativa de microrganismos adaptados à condição imposta irá ser formada, e uma boa eficiência do tratamento poderá ser alcançada.

A partida ainda é um passo crítico na operação da digestão anaeróbia. Vários fatores são considerados importantes, como quantidade de inóculo, fonte de microrganismos, tipo de efluente, suporte e fixação da biomassa. Os dois principais estágios limitantes do processo são: o estágio inicial de hidrólise de compostos complexos e recalcitrantes e a metanogênese. Com o objetivo de investigar a composição e a dinâmica de atividade metabólica da comunidade de arqueias e bactérias durante a partida de um reator e ao longo de sua operação, especialmente em situação de excesso de carga orgânica, Delbès *et al.* (2001) e Leclerc *et al.* (2001) monitoraram um digestor anaeróbio mesofílico durante 497 dias, alimentado com glicose. O inóculo foi obtido de lodos coletados de uma lagoa anaeróbia e dois digestores em escala industrial, todos tratando resíduos de destilaria. Análises da diversidade e da atividade microbiana, por meio de PCR-RT-SSCP, mostraram que a sequência genética da arqueia predominante era mais próxima a *Methanosaeta concilli*, indicando que o inóculo abrigava arqueias acetoclásticas como espécies dominantes. A microbiota de arqueias incluía também sequências isoladas de outros ambientes, tais como digestores termofílicos, e outros grupos fisiológicos, como hidrogenotróficos e consumidores de formiato, relacionadas a *Methanocorpusculum parvum*, *Methanoculleus palmeoli*, *Methanocalculus halotolerans* e um clone próximo a *Methanobacterium*.

O reator apresentou desempenho variado durante o estudo, apresentando alterações populacionais em decorrência da concentração de substratos intermediários. A carga orgânica foi aumentada de 0,5 a 2,0 g de DQO/ L.d durante a partida. A produção de metano aumentou até 55% nos primeiros 20 dias, com rápido consumo de glicose até o dia 40. Houve um período (compreendido entre os dias 55 e 80) marcado pelo acúmulo de AGV (70% de acetato e 18% de propionato). Isso significa que a degradação de acetato não acompanhou a produção de tal substrato, uma vez que a taxa de crescimento das arqueias acetoclásticas é muito menor em comparação com a taxa de bactérias. Análises da diversidade e da atividade microbiana,

por meio de PCR-RT-SSCP, mostraram a predominância de arqueias hidrogenotróficas mais próximas a *Methanobacterium formicium*. No dia 70, a alimentação do reator foi interrompida e suplementos (FeCl_3 , MgSO_4 e extrato de levedura) foram adicionados para favorecer a degradação do acetato, o que levou ao aumento de metano no biogás (73%). A maior crise ocorreu entre os dias 170 e 250, nos quais a concentração de acetato excedeu 1500 mg/L com acúmulo de pequenas quantidades de propionato (300 mg/L). O dia 245 marcou o início de uma importante mudança fisiológica no digestor, período de degradação do acetato, quando ocorreu um notável deslocamento populacional de arqueias hidrogenotróficas para acetoclásticas, com predomínio de *Methanosaeta concilii*. No dia 271, um novo ecossistema foi restabelecido, com o predomínio de arqueias acetoclásticas e bactérias espiroquetas.

Em situações nas quais a concentração de acetato é alta, especialmente durante partida de reatores, seria de se esperar a presença de *Methanosarcina* como espécie acetoclástica predominante. Há a sugestão de que outros fatores poderiam influenciar na competição entre *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, tais como diferenças no rendimento de ATP e requisitos nutricionais (RASKIN *et al.*, 1994; LECLERC *et al.*, 2001). Diante dos resultados, Leclerc *et al.* (2001) concluíram que o funcionamento estável de um biorreator parece estar ligado a uma microbiota mínima metanogênica, constituída por arqueias hidrogenotróficas e acetoclásticas. Tal observação é consenso em outros estudos (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; LECLERC *et al.*, 2004).

Resultados diferentes dos de Leclerc *et al.* (2001) foram obtidos por Hori *et al.* (2006), que analisaram amostras de um reator termofílico inoculado com lodo de um processo termofílico de tratamento de resíduo sólido, também alimentado com glicose, durante 90 dias. A taxa de produção de biogás e concentração de AGV foram constantemente monitorados. O pH foi mantido a 7,1 com adição de NaOH a partir do 45º para recuperação da condição deteriorativa induzida pela acidificação. A concentração de AGV aumentou e a taxa de produção de biogás diminuiu nos 6 dias subseqüentes. Nos dias 51 a 56, período marcado pela degradação do acetato acumulado, os pesquisadores verificaram, por análise de PCR-SSCP, que arqueias acetoclásticas mais próximas a *Methanosarcina thermophila* eram predominantes. *Methanoculleus thermophilicus* predominou ou cresceu favoravelmente em baixas concentrações de acetato (menor que 1 mM ou 59 mg/L) nos primeiros 30 dias, no dia 90 e nos dias 56 a 78. *Methanothermobacter thermoautotrophicus* tornou-se a metanogênica hidrogenotrófica predominante durante o acúmulo de propionato (maior que 1,4 mM). O

crescimento de *Methanoculleus* spp. é conhecido ser preferível a *Methanothermobacter* spp. em baixas concentrações de hidrogênio.

3.4.5 Distribuição de arqueias nos diversos sistemas de tratamento anaeróbio em escalas laboratorial e plena

Na maioria dos estudos com digestão anaeróbia, que se encontram apresentados nas Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6, independente da configuração do reator, da temperatura, do efluente ou resíduo tratado e da técnica de análise molecular escolhida, as arqueias predominantes em reatores em escala plena e laboratorial são as metanogênicas acetoclásticas, mais relacionadas à família *Methanosaetaceae* ou ao gênero *Methanosaeta*, sendo mais comumente próximas filogeneticamente a *Methanosaeta concilii*. Microrganismos deste gênero chegam a constituir mais de 50% da atividade metabólica ou da densidade de arqueias nos mais diferentes ecossistemas. O segundo grupo predominante é o de arqueias hidrogenotróficas. Dentre estas, duas ordens são intensamente detectadas: Methanobacteriales e Methanomicrobiales, porém com indicações de que são competidoras entre si. Dentro da ordem Methanobacteriales, clones mais próximos a *Methanobacterium formicium* são os mais frequentemente identificados.

Entretanto, a composição química dos resíduos tratados é um fator importante na definição da biodiversidade microbiana como um todo. Durante a partida e evolução dos reatores, observa-se que a composição e a diversidade da microbiota do lodo variam intensamente de acordo com a água residuária ou resíduo que está sendo tratado. O lodo utilizado como inóculo, geralmente, é obtido de ecossistemas complexos (lagoas anaeróbias, reatores anaeróbios em escala plena), onde há presença de várias fontes de carbono poliméricas. Reatores em escala de bancada são operados, normalmente, em condições estéreis, com glicose ou acetato como única fonte de carbono, ou uma mistura de AGV de cadeia curta constituindo o efluente a ser tratado. A abundância de bactérias diminui em reatores tratando efluentes simples, enquanto que a de arqueias sofre alterações populacionais bruscas, podendo chegar a constituir mais de 90% da atividade metabólica ou das células microbianas (RASKIN *et al.*, 1994; SANZ *et al.* 2005). Na maioria dos casos, há coexistência de arqueias acetoclásticas e hidrogenotróficas, contudo a prevalência de um dos grupos parece depender da concentração de AGV, principalmente de acetato.

Em contrapartida, em alguns sistemas de tratamento anaeróbio em escala plena (Tabela 3.5), cujas condições não são totalmente controladas, tais como digestores de lodo e aterros sanitários, análises moleculares indicam que a atividade ou a diversidade de arqueias é menor que a de bactérias (menos de 10% da atividade microbiana ou menos de 20% da diversidade microbiana total, respectivamente). Entretanto, em outros sistemas em escala plena, por exemplo, reatores UASB tratando efluente de cervejaria (Tabela 3.6), a comunidade de arqueias é bastante expressiva, chegando a constituir mais de 78% da comunidade microbiana (DÍAZ *et al.* 2006). Isto pode ser devido ao fato de que reatores UASB em escala industrial ou laboratorial são, usualmente, submetidos ao monitoramento constante de pH, de alcalinidade e ao controle da entrada de carga orgânica, evitando-se o colapso do sistema e mantendo-se estável seu funcionamento, com altas eficiências de remoção de DQO (variando de 75 a 90%).

Há indícios de que as arqueias hidrogenotróficas se proliferam em situações de sobrecarga orgânica ou durante a partida de reatores anaeróbios, quando ocorre acúmulo de substratos da fase acidogênica, resultantes da intensa atividade de bactérias fermentativas (AGV, H₂, CO₂, formiato). Outro fator que pode influir na comunidade metanogênica é a concentração de nitrogênio amoniacal, uma das substâncias tóxicas mais comuns encontradas no tratamento anaeróbio de resíduos contendo proteínas, tais como o lixiviado. Dentre outros efeitos, sua influência principal está na fase metanogênica. Dentre as arqueias, parece que as acetoclásticas são mais sensíveis a elevados níveis de amônia livre que as hidrogenotróficas. Em alguns estudos, verificou-se que os níveis inibitórios estão em torno de 700 e 1200 mg/L de amônia livre para acetoclásticas e hidrogenotróficas respectivamente. Dentre as acetoclásticas, membros de *Methanosaeta* são mais sensíveis que os de *Methanosarcina* (CALLI *et al.*, 2005).

Após a partida de reatores anaeróbios e alcance de desempenho estável e satisfatório, a tendência é uma adaptação do inóculo, com diminuição da diversidade de arqueias e aumento da abundância relativa de determinados grupos, com transição de uma população hidrogenotrófica para uma população essencialmente acetoclástica. Em reatores bem-operados, predominam arqueias acetoclásticas do gênero *Methanosaeta*. Arqueias acetoclásticas da família Methanosaetaceae ou do gênero *Methanosaeta* predominam em situações estáveis e com baixa concentração de AGV, casos observados no tratamento em escala plena de lodo ou esgoto sanitário (YU *et al.* 2005; ZHANG *et al.* 2005b).

O fato de a diversidade microbiana ser alterada nos sistemas anaeróbios nem sempre quer dizer alteração na eficiência de tais sistemas. Uma comunidade microbiana muito diversa pressupõe a existência de várias espécies ou gêneros que desempenhem funções ecológicas semelhantes. A depleção de um ou mais grupos poderia ser suprida por outros metabolicamente semelhantes, sem prejuízo do funcionamento do sistema. Entretanto, há populações que são essenciais, mesmo que em menor número, que poderiam, inclusive, definir a rota metabólica principal num ecossistema, como é o caso das populações de arqueias metanogênicas.

Tabela 3.4 – Estudos da comunidade microbiana metanogênica em reatores anaeróbios em escala laboratorial usando técnicas moleculares

Alimento do reator	Configuração do reator	Remoção de DQO	Técnica (s) molecular(es)	% arqueias em relação ao total de células	Grupos de arqueias detectados	Referência
Efluente sintético com glicose e, depois, acetato	Frascos de cultivo anaeróbio	-	Hibridização <i>dot blot</i>	> 86% do RNA total	Ordem Methanobacteriales e gênero <i>Methanosarcina</i>	Raskin <i>et al.</i> (1994)
Resíduo sólido municipal em solução tamponada	2 reatores de mistura completa, um mesofílico e outro termofílico	-	Hibridização <i>dot blot</i>	-	Ordem Methanobacteriales; gêneros <i>Methanosaeta</i> e <i>Methanosarcina</i> em baixíssimos níveis	
Resíduos de destilaria de vinho	Reator de leito fluidizado, mesofílico	-	PCR – clonagem	14% do total de clones	<i>Methanosarcina barkeri</i> , <i>Methanosarcina frigus</i> e <i>Methanobacterium formicium</i>	Godon <i>et al.</i> (1997)
Efluente sintético com mistura de AGV (acetato, propionato, butirato)	Reator híbrido mesofílico	> 90%	PCR – clonagem	-	<i>Methanosaeta</i> (56,7% dos clones de arqueias), <i>Methanococcus</i> (43,3%)	McHugh <i>et al.</i> (2003)
Efluente rico em melado	Reator híbrido termofílico				<i>Methanosaeta</i> (51,5%); Methanobacteriales (45,5%); <i>Methanosarcina</i> (3,0%)	
Efluente sintético com glicose e peptona como fontes de carbono	Reator híbrido psicrófilo				<i>Methanosaeta</i> (72,5%); Methanobacteriales (17,5%); Methanomicrobiales (5,0%); <i>Methanosarcina</i> (2,5%); <i>Methanococcus</i> (2,5%)	
Efluente sintético com glicose e solventes (efluente farmacêutico)	Reator de mistura completa	> 90%	DGGE	-	<i>Methanosaeta concilii</i> ; <i>Methanobacterium formicium</i>	Akarsubasi <i>et al.</i> (2005)
Efluente sintético com propionato, butirato, metanol e etanol	Reator de mistura completa e fluxo contínuo	-	PCR em tempo real	-	Ordem Methanosarcinales, principalmente família Methanosarcinaceae	Yu <i>et al.</i> (2005)
Efluente sintético com soro e extrato de levedura						
Efluente sintético com soro e NH ₄ Cl	UASB, filtro anaeróbio e reator de leito híbrido, mesofílicos	75 a 95%	PCR – DGGE; FISH	-	Gênero <i>Methanosaeta</i>	Calli <i>et al.</i> (2006b)
Lixiviado suplementado com ácido fosfórico						
Lixiviado com substratos metanigênicos, com e sem extrato de levedura	Frascos de cultivo anaeróbio	-	FISH	-	Gênero <i>Methanosarcina</i> e ordem Methanomicrobiales	Carpentier <i>et al.</i> (2006)

Tabela 3.5 – Estudos da comunidade microbiana metanogênica em reatores anaeróbios em escala plena usando técnicas moleculares

Alimento do reator	Configuração do reator	Remoção de DQO	Técnica (s) molecular(es)	% arqueias em relação ao total de células	Grupos de arqueias detectados	Referência
Resíduos de lodos ativados	Digestores de lodo fase única	-	Hibridização <i>dot blot</i>	8 a 12%	Ordem Methanosarcinales (*) (38 a 68%), principalmente gênero <i>Methanosaeta</i>	Raskin <i>et al.</i> (1995)
	Digestores de lodo de duas fases			Primeira fase: níveis bem baixos; Segunda fase: 8,2%	Ordens Methanosarcinales (*) (principalmente <i>Methanosarcina</i>), Methanomicrobiales e Methanobacteriales	
	Digestores de lodo	-	Hibridização <i>dot blot</i> I	15 a 20%	Gêneros <i>Methanosaeta</i> e <i>Methanogenium</i>	Raskin <i>et al.</i> (1994)
		-	PCR em tempo real	-	Ordem Methanosarcinales (60%), principalmente família Methanosaetaceae	Yu <i>et al.</i> (2005)
Efluente de produção de ácido cítrico e melado	Reator de leite preenchido	> 90%	PCR – clonagem	-	<i>Methanosaeta</i> (51,5% dos clones de arqueias), Methanobacteriales (39,4%), <i>Methanosarcina</i> (6,1%), <i>Methanococcus</i> (3,0%)	McHugh <i>et al.</i> (2003)
Efluente de processamento de leite (lactose, proteínas e lipídeos)	Filtro anaeróbio de fluxo descendente				<i>Methanosaeta</i> (48,1% dos clones de arqueias), Methanobacteriales (27,0%), <i>Methanosarcina</i> (21,6%)	
Efluente de processamento de batata (rico em amido)	Reator de recirculação interna				<i>Methanosaeta</i> (51,4% dos clones de arqueias), <i>Methanococcus</i> (40,7%) Methanobacteriales (11,2%)	

(*) Família Methanosarcinaceae (classificação antiga). Atualmente, a família cresceu em nível de ordem. O que era família Methanosarcinaceae é ordem Methanosarcinales.

Tabela 3.6 – Estudos da comunidade microbiana metanogênica em reatores UASB usando técnicas moleculares

Alimento do reator	Características do reator	Remoção de DQO	Técnica (s) molecular(es)	% arqueias em relação ao total de células	Grupos de arqueias detectados	Referência
Esgoto sanitário bruto					<i>Methanosaeta concilii</i>	
Efluente sintético	Escala laboratorial	-	PCR - DGGE	-	<i>Methanosaeta concilii</i> ; 1 clone de arqueia não-cultivada e desconhecida	Zhang <i>et al.</i> (2005b)
Efluente com AGV, extrato de levedura e altos níveis de amônia	5 reatores em escala laboratorial mesofílicos	77 a 96%;	PCR – DGGE, FISH; clonagem	-	Gêneros <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanobacterium</i> e <i>Methanospirillum</i>	Calli <i>et al.</i> (2005)
Efluente sintético com glicose, AGV e peptona ou extrato de levedura	Escala laboratorial mesofílico (13 L)	90-97%	PCR – clonagem; FISH	19% do total de clones; 37% das células microbianas (FISH)	<i>Methanosaeta concilii</i> ; Ordem Methanobacteriales	Sekiguchi <i>et al.</i> (1998)
	Escala laboratorial termofílico (13 L)			22% do total de clones; 42% das células microbianas (FISH)	<i>Methanosaeta thermophila</i> ; Ordem Methanobacteriales	
Efluente contendo fenol	Escala laboratorial (2,8 L)	-	PCR – clonagem; FISH	74% do total de clones	Família Methanosaetaceae (54%); ordens Methanomicrobiales (14%) e Methanobacteriales (3%)	Zhang <i>et al.</i> (2005a)
Efluente escuro de fábrica de polpa de papel kraft adicionado de extrato de levedura e etanol	Escala laboratorial mesofílico (15 L)	80 a 86%; 75 a 78% (com recirculação do efluente)	Microscopia eletrônica e de contraste de fase; DGGE	59,5% (análise de FISH do inóculo)	Gêneros <i>Methanosarcina</i> e <i>Methanosaeta</i>	Buzzini <i>et al.</i> (2006)
Lixiviado suplementado com ácido fosfórico	Escala laboratorial mesofílico	75 a 95%	PCR – DGGE; FISH	-	Gênero <i>Methanosaeta</i>	Calli <i>et al.</i> (2006b)

Alimento do reator	Características do reator	Remoção de DQO	Técnica (s) molecular(es)	% arqueias em relação ao total de células	Grupos de arqueias detectados	Referência
Efluente de cervejaria	Escala plena mesofílico	-	Hibridização <i>dot blot</i> ; FISH	62,9% do RNA total (hibridização <i>dot blot</i>)	Ordens Methanosarcinales (*) (<i>Methanosaeta</i> , 34,2%), Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanococcales	Liu <i>et al.</i> (2002)
	Escala plena mesofílico	80%	FISH; PCR – DGGE; clonagem; microscopia eletrônica	51 a 78% das células microbianas (FISH)	Ordens Methanosarcinales (<i>Methanosaeta</i> : 75 a 96%), Methanobacteriales, Methanococcales e Methanomicrobiales	Díaz <i>et al.</i> (2006)
	Escala plena mesofílico	-	PCR – DGGE	-	<i>Methanosaeta concilli</i> , <i>Methanosaeta thermophila</i> , <i>Methanobacterium formicium</i> , 2 clones de arqueias não-cultivadas e desconhecidas	Keyser <i>et al.</i> (2006)
Efluente de fábrica de queijos	Escala plena mesofílico	95%	Hibridização <i>dot blot</i>	Partida: 24,1% do RNA total Após 9 meses: 46,7% do total de RNA	Partida: ordem Methanococcales Após 9 meses: família Methanosarcinaceae (*), principalmente <i>Methanosarcina</i> , e ordem Methanobacteriales	Cassery <i>et al.</i> (2003)
Efluente de fábrica de papel, rico em carboidratos (amido) e AGV	Escala plena mesofílico	-	Hibridização <i>dot blot</i>	63% do RNA total	Gênero <i>Methanosaeta</i> (> 40%), <i>Methanobacterium formicium</i> , alguns clones de arqueias não-cultivadas e desconhecidas, filo Crenarchaeota	Roest <i>et al.</i> (2005)
Efluente de destilaria de álcool	2 reatores em escala plena mesofílicos	55 e 90%	PCR – DGGE	-	<i>Methanosaeta soehngenii</i> , <i>Methanobacterium formicium</i>	Akarsubasi <i>et al.</i> (2006)
Efluente de vinícola	Escala plena mesofílico	-	PCR – DGGE	-	<i>Methanosaeta concilli</i> , <i>Methanosarcina mazei</i> , clone de arqueia não-cultivada e desconhecida	Keyser <i>et al.</i> (2006)
Efluente de fábrica de pêssego em conserva					3 clones de arqueias não-cultivadas e desconhecidas	Keyser <i>et al.</i> (2006)

(*) Ordem Methanomicrobiales incluía a Família Methanosarcinaceae (classificação antiga). Atualmente, existem as Ordens Methanomicrobiales e Methanosarcinales.

3.5 Técnicas de biologia molecular nos estudos de ecologia microbiana

Por muitos anos, investigações microbiológicas em diversos ambientes foram feitas exclusivamente por microscopia e técnicas de cultivo em meios de cultura enriquecidos. No entanto, essas técnicas convencionais oferecem limitações quanto a análise da diversidade microbiana de um ecossistema, pois podem falhar ao simular as condições ambientais naturais que os microrganismos exigem para proliferação. Além disso, muitos microrganismos não são detectáveis por microscopia convencional por permanecerem ligados a partículas de sedimentos (MUYZER *et al.*, 1993), e muitos não são cultiváveis por exigirem condições ambientais difíceis de serem mantidas em laboratórios. Amann *et al.* (1995) estimaram que aproximadamente 99% dos microrganismos não podem ser isolados de seus habitats naturais em culturas puras.

Desde meados de 1980, tem sido possível o estudo da diversidade e ecologia de microrganismos em ambientes naturais por meio de técnicas de biologia molecular, alcançando-se, assim, novas oportunidades para a análise da estrutura e da composição de espécies de comunidades microbianas nos mais diversos ecossistemas (HEAD *et al.*, 1998).

Um dos métodos moleculares aplicados com sucesso é o uso de biomarcadores, moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e regiões variáveis, específicas de cada um. As regiões variáveis podem ser consideradas a *impressão digital* de um organismo (PACE *et al.*, 1986). Um biomarcador comumente utilizado para inferir identidade de organismos é a molécula de RNA ribossomal, biomarcador denominado RNAr. O RNAr é parte integrante do ribossomo, uma estrutura celular responsável pela síntese de proteínas que está presente em todas as células e, por isso, é considerado um biomarcador ideal. A região 16S compõe a subunidade menor dos ribossomos presentes em organismos procariontes (bactérias e arqueias). A variação genética do RNAr 16S tem sido bem explorada para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos e para “desenhar” sondas nucleotídicas específicas para a detecção de grupos microbianos individuais em habitats naturais. Estas técnicas são aplicáveis também para se determinar a diversidade genética de comunidades microbianas e identificar mesmo os microrganismos não-cultiváveis (MUYZER *et al.*, 1993).

Por questões de manipulação laboratorial, trabalha-se mais frequentemente com a sequência do DNA que codifica a região 16S do RNAr (DNAr 16S). Isto porque o DNA é uma molécula mais estável e mais fácil de se manipular do que o RNA. A amplificação e análise do gene

DNAr, portanto, têm sido utilizadas comumente para investigar a biodiversidade e a estrutura da comunidade microbiana de diversos ambientes, inclusive de reatores anaeróbios.

Dentre as várias técnicas utilizadas nos estudos de ecologia microbiana, destacam-se algumas de caráter qualitativo e semi-quantitativo: PCR-RFLP, PCR-SSCP, PCR-ARDRA, nas quais fragmentos de DNAr 16S da comunidade microbiana em estudo são amplificados por PCR e os produtos são digeridos em locais específicos por enzimas de restrição. Após, segue-se a etapa de clonagem dos fragmentos para posterior isolamento e sequenciamento dos fragmentos. Soma-se a estes a técnica de PCR-DGGE, descrita em detalhes à frente. O uso combinado das técnicas de biologia molecular PCR-DGGE tem sido bastante aplicado para avaliar a diversidade microbiana em vários ambientes (MUYZER, 1999), inclusive na análise de grânulos de reatores UASB tratando esgoto municipal ou industrial, (CHAN *et al*, 2001; LIU *et al*, 2002; PASSIG *et al*, 2005).

As técnicas de hibridização são de caráter quantitativo e podem ser úteis na avaliação da atividade metabólica de determinados microrganismos no ambiente. Existem dois tipos: hibridização em membrana, mais comumente conhecida como *dot blot*, que requer a extração total do RNA microbiano da amostra. O RNA extraído e purificado é aplicado em membranas de *nylon* e hibridizado com sondas de oligonucleotídeos específicos marcadas com ^{32}P ; o segundo tipo é a hibridização em célula inteira ou FISH que será descrito posteriormente.

Apesar dos resultados das análises genéticas não gerarem informações fisiológicas dos microrganismos, as similaridades das espécies detectadas com espécies fisiologicamente conhecidas, permite fazer inferências sobre o papel ecológico e funcional de um microrganismo específico durante o tratamento dos esgotos sanitários.

3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para investigação da diversidade microbiana de um ambiente utilizando a maioria das técnicas descritas acima, é necessária a obtenção de um grande número de moléculas de DNA dos diferentes microrganismos presentes na amostra. Para isso, realiza-se a amplificação da região do DNA de interesse, como por exemplo, o DNAr 16S por meio de uma reação enzimática chamada de PCR. A região do DNA a ser amplificado é determinada pelo par de *primers* ou iniciadores, que são pequenas seqüências de nucleotídeos (oligonucleotídeos) de DNA, construídas artificialmente, complementares e específicas a duas regiões distintas no DNA microbiano de interesse.

Cada ciclo de replicação *in vitro* de DNA envolve três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação (normalmente a 94 °C) ocorre a separação da dupla-fita de DNA para exposição dos sítios-alvo. Na segunda etapa, com a diminuição da temperatura (por exemplo, a 55 °C) ocorre o anelamento dos *primers* em regiões específicas de cada fita de DNA separada, que serve como molde, delimitando, assim, a região inicial e a região final da sequência genética a ser amplificada. Finalmente, na etapa de extensão, ocorre a síntese de DNA complementar à fita-molde e; geralmente, é feita em uma temperatura em torno de 72°C. Em 25 a 40 ciclos, é possível produzir em poucas horas milhões de cópias específicas de DNA, até mesmo quando a amostra de partida contém apenas uma única sequência alvo original (WALKER *et al.*, 1999).

3.5.2 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante ou DGGE, desenvolvida por Muyzer *et al* (1993), é uma técnica que permite a separação de fragmentos amplificados de DNA de mesmo tamanho, mas que têm diferenças na sua constituição química. Seu princípio baseia-se na diferença de estabilidade das fitas duplas de DNA, que depende principalmente do conteúdo das bases nitrogenadas guanina (G) e citosina (C) dentro de um gradiente de desnaturação. A migração diferenciada dos produtos de PCR amplificados gera um perfil de bandas (Figura 3.2). Geralmente cada banda separada é interpretada como sendo de um organismo presente no ambiente estudado. Por ter caráter qualitativo e semi-quantitativo, esta técnica é particularmente útil para examinar séries temporais e dinâmicas populacionais, comparando partida e evolução de sistemas de tratamento.

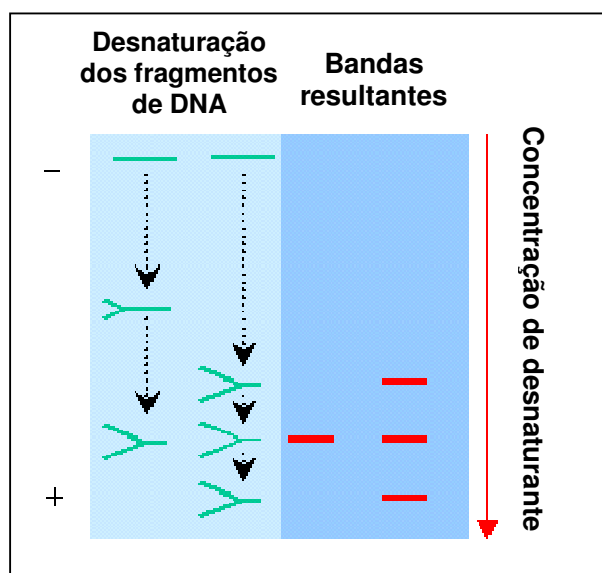


Figura 3.2 – Desnaturação e separação de fragmentos de DNA pela técnica de DGGE

A técnica de DGGE tem sido intensamente utilizada, em vários estudos, para investigar biodiversidade microbiana nos mais variados ambientes, tais como aquíferos contaminados, campos de plantio de arroz, sedimentos de lagos, reatores anaeróbios e aterros sanitários (CASAMAYOR *et al.*, 2000; CASSERLY *et al.*, 2003; AKARSUBASI *et al.*, 2005 e 2006; CALLI *et al.*, 2005, 2006a e b; WATANABE *et al.*, 2004; KLEIKEMPER *et al.*, 2005; ROEST *et al.*, 2005; BUZZINI *et al.*, 2006; DEARMAN *et al.*, 2006; DÍAZ *et al.*, 2006; KEYSER *et al.*, 2006; SASAKI *et al.*, 2006).

Segundo Head *et al.* (1998), a principal limitação dos métodos moleculares é a quantidade de ácidos nucleicos recuperada das amostras ambientais, sendo difícil assegurar uma eficiente recuperação por qualquer técnica de extração. Há sempre perdas de ácidos nucleicos durante o processo e, além disso, alguns microrganismos apresentam estrutura celular difícil de ser rompida (esporos, células Gram-positivas, por exemplo). Para minimizar tais problemas é necessário utilizar um método de extração de DNA eficiente para todos os tipos de células presentes na amostra, bem como realizar várias extrações de uma mesma amostra para garantir a homogeneidade do DNA extraído.

A amplificação por PCR de genes de RNAr é uma outra fonte de erros que podem afetar os resultados de avaliação da diversidade por outras técnicas moleculares subsequentes. Por causa de sua alta sensibilidade, a técnica de PCR pode apresentar falhas ou efeitos indesejáveis se houver DNA em excesso na amostra de partida ou qualquer contaminação cruzada com outra amostra, gerando resultados falso-positivos (WALKER *et al.*, 1999). Desta forma é fundamental que a manipulação das amostras seja feita sob cuidado e em locais livres de contaminação.

Dentre os estudos pesquisados na literatura, algumas limitações foram observadas na técnica de DGGE. Por exemplo, mais de uma banda presente no gel pode estar relacionada a um mesmo microrganismo; como é uma técnica semi-quantitativa, bandas pouco visíveis são mais difíceis de serem detectadas, sendo somente possível a identificação das bandas mais intensas, o que corresponderia aos microrganismos mais frequentes na comunidade em estudo.

Apesar das desvantagens mencionadas acima, técnicas de biologia molecular ainda são as melhores ferramentas disponíveis para estudo da diversidade microbiana em amostras naturais e em biorreatores.

3.5.3 Hibridização *in situ* com oligonucleotídeos fluorescentes (FISH)

Informações morfológicas sobre os microrganismos, abundância relativa ou distribuição espacial no ambiente não podem ser fornecidas pelas técnicas descritas acima. Tais informações têm sido obtidas por meio de técnicas de hibridização com sondas fluorescentes de oligonucleotídeos, pequenas seqüências de ácidos nucleicos, que são específicas e complementares a moléculas-alvo, como DNA e RNA.

Para a realização da hibridização *in situ* com oligonucleotídeos fluorescentes ou FISH, o RNA não é extraído, mas permanece dentro das células microbianas. Estas são fixadas em solução de paraformaldeído para preservação e formação de poros para penetração da sonda fluorescente. As células são, então, tratadas com tampão contendo formamida e NaCl e incubadas numa temperatura entre 45 a 48°C para hibridização da sonda em regiões específicas do RNAr 16S. A sonda de oligonucleotídeo é marcada com cromóforo que fluoresce quando excitada por uma luz de um determinado comprimento de onda (normalmente, luz ultravioleta). A detecção é feita por microscopia de fluorescência, na qual a amostra hibridizada é iluminada com a luz excitante e a luz emitida é observada com o auxílio de filtros específicos. A emissão de sinal é diretamente proporcional à quantidade de ribossomos do microrganismo, indicando sua atividade metabólica potencial no ecossistema estudado. Pelo fato das células não serem destruídas, esta técnica permite a visualização morfológica, a contagem e estimativa da abundância, a localização e a distribuição espacial dos microrganismos na amostra (AMANN *et al.* 1995).

A técnica de FISH é outra ferramenta molecular que tem sido extensivamente utilizada em estudos de investigação e avaliação de microrganismos específicos, fornecendo informações valiosas sobre sua ocorrência, abundância e importância fisiológica nos mais variados ambientes e no monitoramento de sistemas de tratamento anaeróbio como reatores UASB (LIU *et al.*, 2002; BATSTONE *et al.*, 2004; CALLI *et al.*, 2005 e 2006b; SANZ *et al.*, 2005; DÍAZ *et al.*, 2006), digestores de resíduos sólidos (CHOUARI *et al.*, 2005; HORI *et al.*, 2006) e aterros sanitários (CALLI *et al.*, 2006a; CARPENTIER *et al.*, 2006).

Quanto à técnica de FISH, problemas estão associados à permeabilidade das células microbianas, acessibilidade, especificidade e sensibilidade da sonda nucleotídica ao sítio-alvo do RNAr. A permeabilização das células é essencial para que seja garantida a entrada e hibridização da sonda nucleotídica. Algumas células microbianas (esporos, células Gram-positivas) necessitam de tratamento adicionais para eficiente permeabilização da parede

celular. Além disso, a acessibilidade da sonda ao sítio-alvo depende da posição deste no RNAr, que pode apresentar interações com estruturas secundárias, dificultando a hibridização. A sensibilidade da sonda está relacionada à emissão do sinal fluorescente, que só será forte se as células microbianas, no momento da coleta e fixação, estiverem metabolicamente ativas, com grande número de ribossomos. Para resolver este problema, em alguns estudos empregam-se mais de uma sonda para se intensificar a emissão do sinal. Por causa das regiões variáveis no RNAr diferirem em poucas posições nucleotídicas dentre os grupos taxonômicos, é possível a hibridização com células não-relacionadas à sonda, gerando falsos-positivos. Para superar tais problemas, é comum utilizar-se múltiplas sondas específicas com sítios-alvo diferentes na molécula de RNAr com diferentes fluorocromos (HEAD *et al.*, 1998).

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização dos reatores e pontos de amostragem

Neste estudo, foram utilizados dois reatores UASB, R1 e R2 (Figura 4.1), que estão localizados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, implantado junto à ETE Arrudas, em Belo Horizonte.. Ambos os reatores eram idênticos e estavam em escala de demonstração, porém o R2 era precedido de uma unidade de peneiramento forçado, que impedia a entrada de sólidos com dimensões maiores que 1 mm. Os reatores foram objetos de estudo de um mestrado e um doutorado, envolvidos especificamente na operacionalidade e comparação da eficiência de remoção de diversos poluentes, bem como na efeito do peneiramento forçado no processo de digestão anaeróbia.

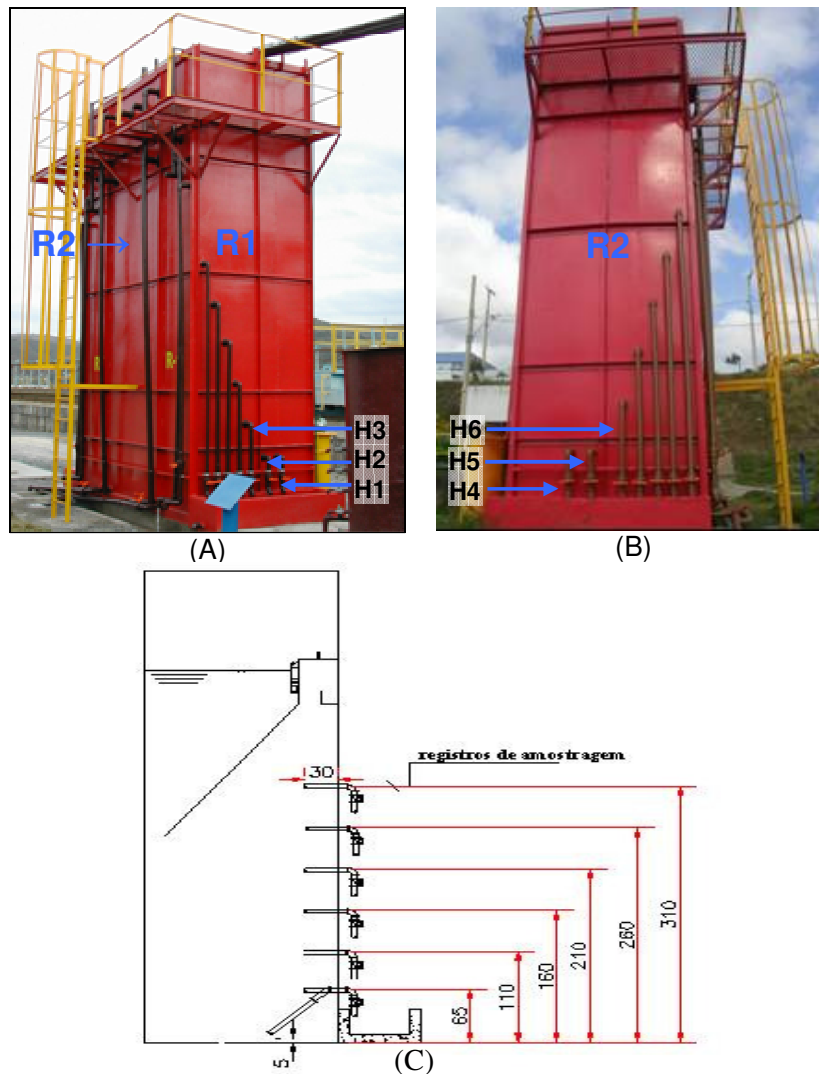


Figura 4.1 – A e B: vista dos reatores R1 e R2. C: desenho esquemático dos pontos (perfis) de amostragem (cm). Legenda: R1: perfis H1, H2 e H3; R2: perfis H4, H5 e H6

As principais características dos reatores, bem como as condições operacionais a que foram submetidas nas 5 fases operacionais estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Principais características dos reatores UASB e condições operacionais

Fase operacional	Duração (dias)	Seção transversal (m)	Vazão (m ³ /h)	Características do reator		
				Altura (m)	TDH (h)	Velocidade ascensional (m/h)
1	70	1,75 x 1,75	1,53	4,5	9,0	0,50
2	64	1,75 x 1,75	2,19	5,0	7,0	0,71
3	53	1,75 x 1,75	3,37	5,5	5,0	1,10
4	77	1,50 x 1,50	1,13	4,5	9,0	0,50
5	91	1,50 x 1,50	1,61	5,0	7,0	0,71

Fonte: Teixeira (2007)

4.2 Caracterização do inóculo dos reatores

Ambos os reatores foram inoculados, na partida do sistema, com lodo proveniente de reatores UASB do CePTS UFMG/COPASA, já adaptado ao tratamento de esgotos domésticos. Ao término de cada fase, todo o lodo era retirado de cada reator e estocado separadamente em leitos de secagem, forrados e cobertos por lonas plásticas para proteção das intempéries e possível secagem do lodo. Conforme descrito por Teixeira (2007), alterações físicas nos reatores eram, então, realizadas para modificações das condições operacionais (TDH, vazão e velocidade ascensional), como estão mostradas na Tabela 4.1. O lodo reservado era reintroduzido nos reatores e a quantidade inoculada era estimada com base na carga biológica mínima, segundo descrição de De Paula (2007).

4.3 Determinação da diversidade microbiana metanogênica

Amostras de lodo foram coletadas ao final de cada fase operacional (Tabela 4.1) e em três diferentes alturas do compartimento de digestão dos reatores, chamadas de perfis, conforme mostrado na Figura 4.1. Aproximadamente 300 mL de amostras de lodo das fases 1 a 4 foram coletados e levados ao laboratório. Para as análises de PCR-DGGE, alíquotas de 50mL de cada amostra foram inicialmente centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos para separação da fração líquida. O material sedimentado (biomassa) foi lavado solução de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄ 120mM, pH 8,0 – Anexo 2.1.2) para remoção de ácidos nucleicos extracelulares, alíquotado em porções de 3 g, e armazenadas a – 20°C para posterior análise. A fração líquida obtida foi também armazenada a – 20 °C para futuras análises de AGV.

As amostras de lodo das fases 1 a 4 foram submetidas aos processos de análise molecular (com exceção do FISH) esquematizadas na Figura 4.2. As amostras da fase 5 foram submetidas somente à análise de FISH.

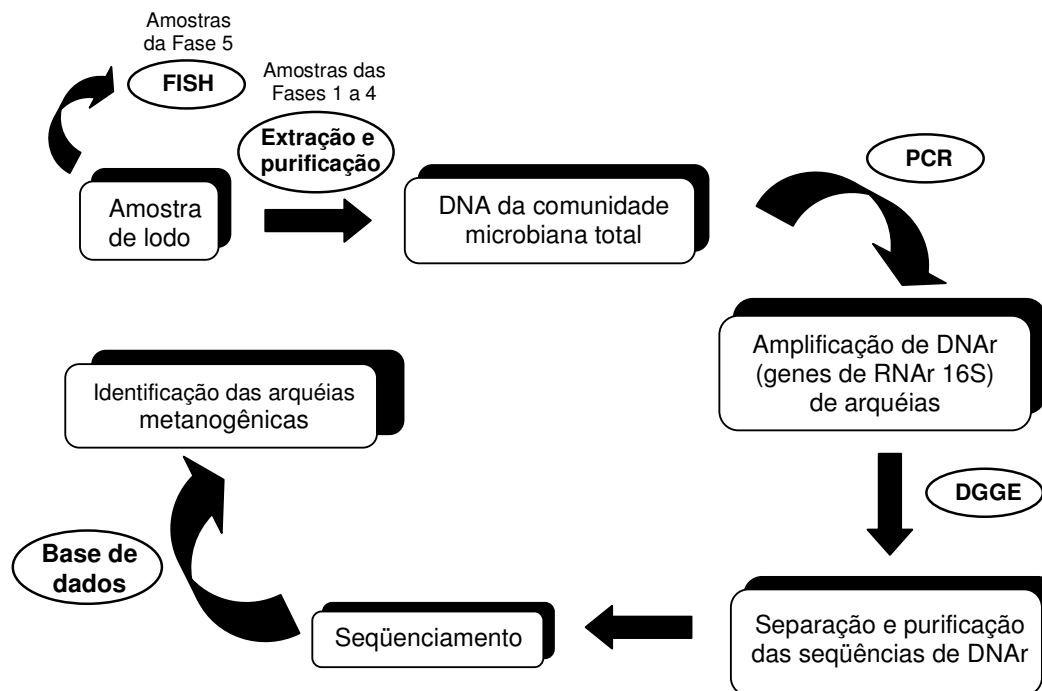


Figura 4.2. – Esquema das etapas de análise molecular e identificação microbiológica das amostras de lodo

4.2.1 Extração e purificação do DNA genômico

Para cada amostra de lodo congelada (fases 1 a 4), foram feitas três extrações a fim de se garantir uma quantidade suficiente de DNA que fosse representativa da comunidade microbiana presente na amostra. As amostras foram, então, submetidas ao processo de extração do DNA microbiano total, segundo protocolo descrito por Purdy *et al.* (1996). Numa primeira etapa, 0,5 g de lodo foi adicionado a um tubo contendo pérolas de vidro de 0,1 mm de diâmetro, 700 µL de solução de Na₂HPO₄ (120 mM, pH 8,0) com 1% de polivinilpirrolidona (PVPP) (Anexo 2.1.3), 500 µL de fenol equilibrado com tampão Tris (pH 8,0) (*Sigma*) e 50 µL de solução de SDS 20% (Anexo 2.1.8).

As células microbianas foram lisadas (rompidas) por agitação mecânica em um microdesmembrador ou *mini-beadbeater* (*Biospec Products*) a 2.500 rpm por 30 segundos e mantidas no banho de gelo por mais 30 segundos. Esta operação foi realizada três vezes. Cerca de 700 µL do lisado de células foi, então, adicionado a uma coluna constituída de

hidroxiapatita (HTP – Anexo 1.1.1), uma matriz de coluna cromatográfica, que separa ácidos nucleicos de proteínas. A coluna de HTP, com a amostra, foi centrifugada a 700 rpm por 4 minutos. A operação foi repetida até terminar todo o volume da amostra. A coluna de HTP foi lavada 4 vezes com 600 µL de solução de Na₂HPO₄ (120mM, pH 7,2 – Anexo 2.1.5) e centrifugada a 700 rpm (3 vezes por 4 minutos e 1 vez por 7 minutos). Finalmente, a amostra foi eluída da coluna com 400 µL de solução fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄ 500 mM, pH 7,2 – Anexo 2.1.7) a 700 rpm durante 7 minutos. Para dessalinização dos ácidos nucleicos, o material eluído foi pipetado no centro de uma coluna de Sephadex G-75 pré-condicionada (Anexo 1.1.2) que, por sua vez, foi centrifugada a 2.700 rpm por 17 min. O eluente foi recolhido em um microtubo estéril e mantido sob banho de gelo.

Após passagem pela coluna de Sephadex G-75, o material eluído (cerca de 400 µL) foi purificado e concentrado com 800µL de etanol absoluto gelado e 40 µL de solução de acetato de sódio (C₂H₃O₂Na 3M – Anexo 2.1.4). Para cada volume de amostra, utilizou-se 2 volumes de etanol absoluto gelado e 0,1 volume de acetato de sódio, deixando-se a solução a -20°C durante 30 minutos ou 24 horas. A solução foi submetida à centrifugação (13.400 rpm por 10 minutos); o sobrenadante foi descartado, sem tocar no *pellet*. Adicionou-se 100 µL de etanol gelado (70%) para ressuspensão do *pellet* e novamente a solução foi centrifugada (13.400 rpm por 3 minutos). Removeu-se o sobrenadante e deixou-se o *pellet* secar à temperatura ambiente durante aproximadamente 50 minutos. O *pellet* contendo ácidos nucleicos foi ressuspensionado em 40 µL de solução TE (Anexo 2.1.9) ou ddH₂O estéril.

Alíquotas de 5,0 µL de cada amostra extraída foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,0% (Anexos 2.2.1 e 2.2.13) a 75 V por 40 minutos ou 85 V por 34 minutos. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (Anexo 2.2.2) e visualizado sob luz ultravioleta para verificação da extração do DNA microbiano total (acima de 10.000 pares de bases) das amostras. O extrato total de cada amostra foi adicionado em géis de agarose 0,8%, submetidos a eletroforese (75 V por 50 minutos) e o DNA total presente no gel foi purificado utilizando-se o kit *Wizard DNA Clean-Up System (Promega)*, de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.2 Amplificação dos genes DNAr 16S de arqueias por PCR

Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas à amplificação específica dos genes que codificam a região 16S do RNA ribossomal (DNAr 16S) de arqueias. Para a amplificação, foram utilizados o par de iniciadores ou *primers*: *primer foward* ARC 344 (5'

ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA 3') com "cauda" GC (5' CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G 3') e o *primer reverse* ARC 915 (5' GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3'), descritos por Casamayor *et al.* (2000). O programa de amplificação adotado para produtos de DGGE, descritos no artigo, foi modificado várias vezes. As condições que ofereceram melhores resultados de amplificação consistiam das seguintes etapas: 5 minutos a 94°C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 1 minuto a 94° (desnaturação), 30 segundos a 56°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão); e, finalmente, 30 minutos a 72° (extensão final). A extensão final é para minimizar "rastros" no DGGE (JANSE *et al.*, 2004). A reação ocorreu em volumes de 50 µL, contendo 32,5 µL de H₂O ultra-pura (*Milli-Q*), 5,0 µL de tampão da PCR 10X (IO, *Phoneutria*), 1,75 µL MgCl₂ (50 mM, *Phoneutria*), 1,25 µL de cada *primer* (10pmol/µL, *Invitrogen*), 1,0 µL de dNTP (25 mM, *Fermentas*), 6,0 µL de albumina de soro bovino (BSA 2,5 mg/µL, *Sigma*), 0,25 µL de enzima *Taq* polimerase (5,0 u/µL, *Phoneutria*) e 1,0 µL de amostra de DNA extraído e purificado (diluída ou não). As reações de PCR foram desenvolvidas em termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf*. Para a observação dos amplicons (fragmentos de DNA amplificados) e verificação do seu tamanho, foi feita eletroforese em gel de agarose 1,0% com marcador de peso molecular de 1 kb (*Fermentas*).

4.2.3 Separação dos produtos de PCR por DGGE

Os produtos de PCR obtidos a partir das amostras foram submetidos à eletroforese vertical em gel de gradiente desnaturante. A solução do gel foi feita segundo protocolo de Muyzer *et al.* (1996). Alguns testes foram feitos a fim de se obter um gradiente que oferecesse a melhor separação dos fragmentos de DNA contidos nos produtos de PCR (entre 40 a 80%). Para formação de 14 mL de gel, utilizaram-se duas soluções denominadas de *low* (com baixa porcentagem de desnaturante) e *high* (com alta porcentagem de desnaturante). Para a formação de cada solução, outras duas soluções eram misturadas: uma denominada de 100%, que continha formamida e uréia (agentes desnaturantes) e outra sem tais substâncias, denominada de 0%. As soluções 100% e 0% e a tabela de gradientes para o preparo das soluções *low* e *high* estão descritas no Anexo 2.2.

Antes das soluções *low* e *high* serem misturadas e de ser confeccionado o gel com o gradiente desnaturante desejado, eram adicionados, em cada solução, 156 µL de tampão TAE 50X, 67,8 µL de solução de persulfato de amônio 10% (Anexo 2.2.7) e 5,4 µL de TEMED (*Bio Agency*). Os dois últimos reagentes são catalisadores, importantes na polimerização do gel. O gel foi

montado conforme instruções contidas no Anexo 2.2.14, utilizando-se o aparato *DCode™ System Bio Rad*. No presente trabalho, o gradiente escolhido para a confecção dos géis de DGGE foi o de 45 a 65%. Desta forma, a solução *low* tinha 45% de desnaturante (7,6 mL de solução 0% e 6,4 mL de solução 100%), enquanto que a solução *high* tinha 65% de desnaturante (4,8 mL de solução 0% e 9,2 mL de solução 100%)

Um pouco da solução 0% foi utilizada na formação dos “poços” ou canaletas para aplicação dos produtos de PCR (a esta camada dá-se o nome de *stacking gel* – Anexo 2.2.12). Foram aplicados 10 a 30 µL de produto de PCR das amostras, dependendo da concentração da amostra. A “corrida” ao longo do gel se processou a 60°C e 80 V, em cerca de 7 L de tampão TAE 0,5X (Anexo 2.2.5) durante aproximadamente 17 horas.

Ao final da eletroforese, o gel foi corado de 15 a 40 minutos em solução de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Imagens do gel foram documentadas usando um sistema de captura digital de imagem (*Launch Doc ITLS – UVP*, versão 5.0). As bandas de interesse foram excisadas e introduzidas em tubos de rosca contendo pérolas de vidro e 500 µL de ddH₂O, que foram agitados em microdesmembrador a 4.800 rpm durante 3 minutos e armazenados a 4 °C (*overnight*). Após este período, os tubos foram centrifugados a 2.800 rpm por 3 minutos e o sobrenadante, contendo os fragmentos de DNA, foi coletado e armazenado em microtubos a – 20 °C.

Testes preliminares de PCR foram realizados com alíquotas variadas dos fragmentos extraídos do gel (1 a 10 µL), diluídos ou não, no intuito de se obter uma amplificação intensa, mas sem “rastros” (bandas inespecíficas). Novos produtos de PCR foram “corridos” em DGGE para verificação da pureza das bandas. Algumas tiveram que ser novamente submetidas à excisão e purificação.

4.2.3.1 Preparação dos amostras para seqüenciamento

As bandas purificadas dos géis de DGGE foram reamplificadas com o mesmo par de *primers* citado anteriormente, porém sem a “cauda” GC. O programa de ciclos de PCR adotado foi semelhante, com exceção da etapa de extensão final, que foi reduzida para 5 minutos. Cerca de 90 µL de produtos de PCR de cada banda extraída foram novamente purificados utilizando-se o kit *Wizard DNA Clean-Up System (Promega)*. Alíquotas de 2,0 µL foram aplicadas em gel de agarose 2%, juntamente com *low mass ladder (Invitrogen)* a fim de se determinar sua massa molecular. Este *ladder* consiste de uma mistura de fragmentos de DNA

de 100 a 2000 pb com massa conhecida. A eletroforese de 2,0 µL deste *ladder* resulta em 6 bandas contendo 100, 60, 40, 20, 10 e 5 ng de DNA, respectivamente, que são utilizadas como um padrão comparativo para estimar a quantidade e a concentração de DNA de uma amostra extraída ou de um produto de PCR.

Os produtos de PCR das bandas, uma vez purificados e quantificados, foram enviados ao Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP) para sequenciamento (www.genoma.ib.usp.br). As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o *Mega BACE 1000*, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (com *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*) código US81090. As sequências foram analisadas pelo software *Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron 3.12*.

4.2.4 Determinação da abundância relativa e da concentração de arqueias por FISH

Dois tipos de amostras foram analisados pela técnica FISH: amostras de lodo coletadas nos reatores UASB acima descritos durante a fase operacional 5 (Tabela 4.1) e amostras de lodo presentes em testes de AME (atividade metanogênica específica) realizados para a determinação da atividade metanogênica do lodo dos reatores UASB na presença de acetato, formiato, glicose e sem substrato (ensaio realizados por Souto, 2007).

As amostras da fase 5 e de testes de AME foram preservadas segundo o protocolo de fixação de amostras para FISH descrito por Amann *et al.* (1990). Um volume de 375 µL de cada amostra foi transferido em microtubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 1.125 µL de tampão de fixação (paraformaldeído 4% – Anexo 2.3.5), preparada até 4 dias antes do uso, e mantida a 4°C por 4 a 16 horas. A mistura foi centrifugada a 7.600 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* (sedimento), lavado em 375 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X – Anexo 2.3.4) por duas vezes. O *pellet* foi ressuspensionado em 300 µL de PBS 1X e 300 µL de etanol absoluto (100%) e mantido a -20°C.

As amostras fixadas foram submetidas a agitação em microdesmembrador com pérolas de vidro (4.800 rpm por 10 segundos) para desintegração dos grânulos do lodo. Foi necessária a diluição de 5 ou 10 vezes das amostras da fase 5. Aplicou-se, então, 1,0 µL de cada amostra em lâminas de teflon contendo 10 pocinhos de 8 mm de diâmetro (*MP Biomedicals*). As lâminas foram secadas a 45°C por 20 minutos e desidratadas por imersão serial em soluções de etanol 50, 80 e 100% (3 minutos cada). Após a secagem das lâminas à temperatura

ambiente, 9,0 µL de tampão de hibridização com 20% de formamida (Anexo 2.3.8) e 1,0 µL de sonda ARC915, marcada com o cromóforo Cy3, foram aplicados e homogeneizados em cada pocinho.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 46°C por duas horas. Posteriormente, foram mergulhadas em tampão de lavagem (Anexo 2.3.9) a 48°C durante 20 minutos e, rapidamente, em ddH₂O para remoção de sais e SDS. Após a secagem das lâminas no escuro e à temperatura ambiente, foram aplicados e misturados 9,0 µL de ddH₂O e 1,0 µL de solução de DAPI (*Sigma*) a 0,001% nos pocinhos. As lâminas foram incubadas durante 5 a 10 minutos no escuro. As lâminas foram novamente lavadas em ddH₂O e secas no escuro. Aplicou-se sobre cada amostra, antes de se colocar a lamínula, 8,0 µL de solução contendo 80% de glicerol e 20% de PBS 1X (v/v). As lâminas foram mantidas no escuro a 4°C.

As lâminas foram observadas em microscópio Olympus BX-50 no aumento de 1.000 vezes sob epifluorescência e contraste de fase. Primeiramente, a microscopia de contraste de fase foi utilizada para ajustar o foco da imagem, antes da aplicação da luz ultravioleta. Foram utilizados filtros específicos com espectro de absorção entre 510 a 550 nm e de 330 a 385 nm para captação de emissões de fluorescência da sonda, marcada com Cy3, e do DAPI respectivamente. As imagens visualizadas foram registradas em filme fotográfico ISO 400 (*Kodak, Fujifilm, AGR*), sendo a maioria de contraste de fase e de DAPI, pois as imagens observadas com a sonda resultavam em fotos pouco nítidas. Vinte campos microscópicos foram analisados, sendo que apenas os microrganismos que se hibridizaram com a sonda ARC915, ou seja, as arqueias, foram contados.

Para a contagem dos filamentos semelhantes aos do gênero *Methanosaeta* (Figura 5.10A), um fragmento contendo 2 a 4 células foi considerado como uma unidade. Fragmentos maiores foram considerados como 2, 3 ou 4 unidades dependendo do seu comprimento. Os agregados de cocos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* (Figura 5.10B) foram contados da seguinte maneira: uma unidade correspondendo a cerca de 4 células; agregados maiores foram considerados como 2, 3 ou 4 unidades. Os morfotipos 3 (Figura 5.10C) e 4 (Figura 5.11D) eram filamentos bem mais finos que os de *Methanosaeta*, curvos ou levemente curvos; cada filamento foi contado como uma unidade.

Para cada amostra, foi feita uma estimativa da abundância unidades de arqueias por mL de lodo. Esta estimativa foi baseada na contagem de unidades de arqueias obtida de 20 campos

microscópicos. Para isso, foi necessário calcular a área do campo microscópico (ou campo de visão), cujo diâmetro é determinado da seguinte forma:

$$\frac{\text{número de campo da ocular}}{\text{ampliação da objetiva}} = \frac{22}{100} = 0,22 \text{ mm}$$

Sabendo-se que o diâmetro, a olho nu, de cada pocinho é de cerca de 8 mm, a partir destes valores, foi possível determinar a área do campo microscópico ($0,038 \text{ mm}^2$) e a área de cada pocinho ($50,24 \text{ mm}^2$). Através de regra de três simples, determinou-se o número de arquêias na área total do poço, portanto, em $1 \mu\text{L}$ de amostra. Os resultados encontrados levaram em consideração o fator de diluição 10^3 (para transformar os valores de μL para mL) e estão expressos na Tabela 5.3.

4.2.5 Análise de ácidos graxos voláteis

Aproximadamente 15 mL do sobrenadante de cada amostra coletada foram filtrados em membrana de fibra de vidro (*Scheleicher & Schuell*) de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade. Uma alíquota de cada amostra (cerca de 2 mL), sem diluição, foi analisada em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – *Perkin Elmer Series 200*), equipada em coluna Aminex HPX – 87H ($300 \times 7,8 \text{ mm}$) e conectada a um detector de absorbância de UV/ VIS a 210 nm. A fase móvel utilizada foi uma solução de 0,01M de H_2SO_4 , em um fluxo de $0,8 \text{ mL/min}$ a 50°C . A solução de lavagem da coluna continha 0,005M de H_2SO_4 e 5% de acetonitrila, sendo aplicada durante 2 minutos após análise cromatográfica de cada amostra. Os AGV presentes nas amostras foram identificados pelos seus respectivos tempos de retenção, comparados com aqueles obtidos em curvas-padrão. Para desenvolvimento das curvas-padrão, foram utilizadas soluções sintéticas de ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico em diferentes concentrações. A faixa de concentração de cada ácido foi de 5 a 75 mg/ L.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB por meio da técnica de PCR-DGGE

5.1.1 Extração e purificação do DNA genômico

Amostras de lodo foram coletadas ao final de cada fase operacional e nas três diferentes alturas do compartimento de digestão dos reatores chamadas de perfis. O inóculo foi denominado como In e coletado apenas nas fases 1 e 2. Nas fases 3 e 4 só foi possível coleta de lodo nos pontos H1, H2 e H4; em virtude do aumento da velocidade ascensional durante a fase 3, que provocou o arraste de sólidos. Dessa forma, não houve biomassa suficiente para análise nos pontos H3, H5 e H6.

As extrações de DNA, que representam o DNA genômico de todos os microrganismos presentes nas amostras, foram realizadas com sucesso nas amostras de lodo coletado em diferentes alturas do reator e ao final de cada fase operacional. As triplicatas obtidas para cada amostra foram individualmente misturadas e purificadas, gerando uma única amostra para cada ponto de amostragem como mostrado na Figura 5.1. O DNA genômico é caracterizado por bandas maiores que 10.000 pares de bases, conforme mostrado pelo marcador de tamanho molecular (*ladder*). Muitas amostras apresentaram “rastros”, que podem ser sais ou outros contaminantes que sobraram durante o processo de extração.

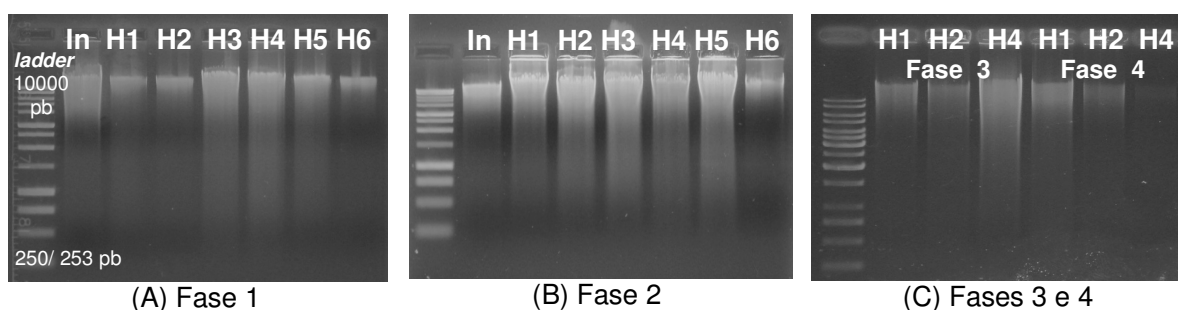


Figura 5.1 – Extrações de DNA das amostras dos reatores R1 e R2 coletadas em diferentes alturas e em diferentes fases operacionais.

Legenda das amostras descritas na Figura 4.1

Com o objetivo de se compreender melhor o desenvolvimento da biomassa e o desempenho dos reatores UASB em estudo, dados de análises de perfil de sólidos totais (ST) (Figura 5.2), obtidos por De Paula *et al.* (2007), foram comparados com os resultados de extração de DNA. As análises de ST mostraram que, durante o período de coleta das amostras e em todos os

perfis, houve a predominância de sólidos totais voláteis (STV) em relação aos sólidos totais fixos (STF), o que significa que no lodo havia predominância de fração orgânica, representada principalmente pela biomassa. Além disso, os perfis mais baixos (H1 e H4) apresentaram maior concentração de STV em relação aos outros pontos (H2 e H3 no reator R1 e H5 e H6 no reator R2), especialmente nas fases 3 e 4, quando os reatores tiveram concentrações muito baixas ou quase nulas de ST nos pontos superiores. Os perfis H1 e H4 correspondem, respectivamente, aos pontos de amostragem mais baixos do reator R1 e do reator R2. Seria coerente que amostras retiradas dos perfis mais baixos apresentassem maior concentração de DNA, uma vez que, em cada da fase operacional, são os pontos que apresentam maior concentração de STF e de STV.

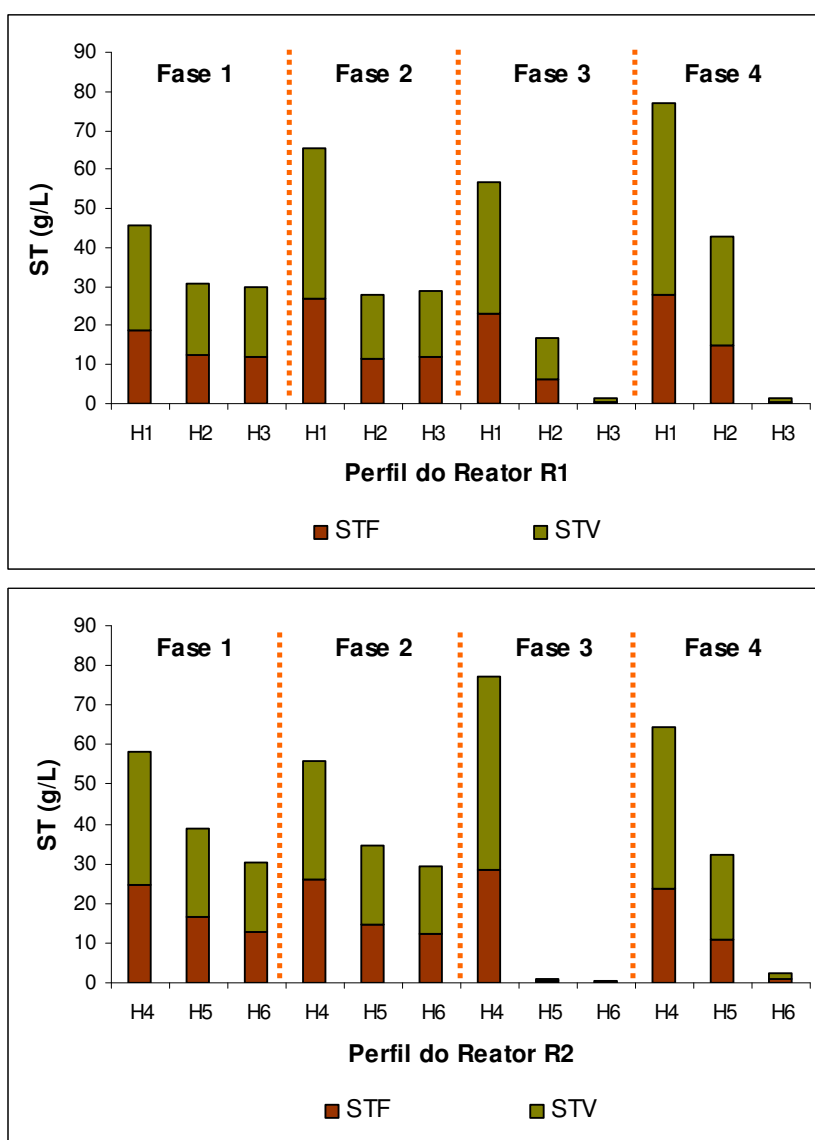


Figura 5.2 – Perfis de ST das amostras de lodo dos reatores R1 e R2 ao longo das fases 1 a 4

Uma elevada concentração de DNA (entendida pela intensidade do brilho das bandas) foi recuperada na maioria das amostras, como pode ser visto na Figura 5.1. Entretanto, no ponto H4 da fase 4, a concentração foi bem mais fraca, num período em que este ponto apresentou uma das maiores concentrações de SV durante todas as fases operacionais. Como o volume total de amostra analisada, para todos os pontos, foi o mesmo (50 mL), é provável que perdas de DNA tenham ocorrido durante o processo de extração e purificação das amostras, como, por exemplo, retenção de DNA nas colunas cromatográficas (HTP, Sephadex G-75), o que explicaria tal fato. Segundo Head *et al.* (1998), uma das principais dificuldades e limitações de qualquer técnica de extração é assegurar uma eficiente recuperação de DNA de amostras ambientais por não se saber *a priori* a quantidade total de DNA microbiano ou, talvez, por não se conseguir uma lise eficaz de todas as células presentes nas amostras. Pesquisar métodos alternativos ou complementares para extração de DNA de amostras é importante para que se possa potencializar a ruptura das células, evitando-se as perdas e aumentando-se o rendimento de ácidos nucleicos.

5.1.2 Amplificação dos genes DNAr 16S de arqueias por PCR

Após extração e purificação de DNA das amostras, procedeu-se a etapa de amplificação dos genes DNAr 16S, primeiramente, com o par de *primers* ARC915 e ARC344 com a “cauda” GC. Para verificação da especificidade dos *primers* de arqueias, utilizou-se como controle negativo amostra de DNA extraída de uma cultura *Escherichia coli*, amostra de referência da ATCC 25922, cedida gentilmente pelo laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do ICB/ UFMG. O resultado da amplificação foi negativo, o que significou que os *primers* não se anelaram ao DNA bacteriano, confirmando a sua especificidade.

Testes iniciais foram feitos com o programa de PCR sugerido por Casamayor *et al.* (2000), sem se obter, no entanto, sucesso nos resultados. Os produtos de PCR apresentavam “rastros”, conforme mostrado na Figura 5.3, além da banda de interesse. Isso significa que havia amplificação inespecífica de DNA, gerando fragmentos maiores que o de interesse (de 571 pares de bases).

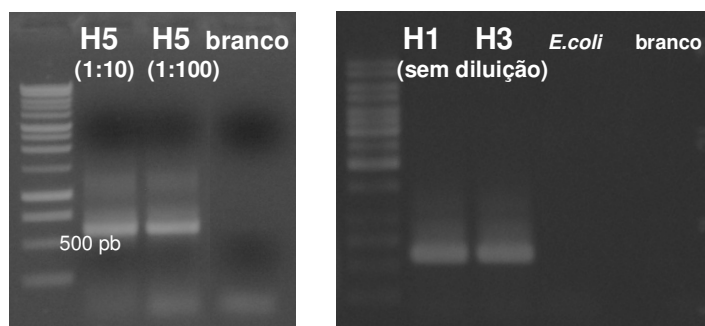


Figura 5.3 – Reação de PCR com amostras da fase 1.

Legenda das amostras descritas na Figura 4.1

Como mencionado na metodologia, foram necessárias várias modificações no programa e no protocolo com o objetivo de se conseguir melhores resultados de amplificação dos genes presentes nas amostras. A melhoria da qualidade dos produtos de PCR foi alcançada nas condições descritas na metodologia, resultando em produtos similares aos da Figura 5.4. Os fatores que foram importantes na minimização das bandas inespecíficas foram as alterações no programa de ciclos de temperatura, a concentração de reagentes e a quantidade de DNA *template* ou DNA-molde. Para se alcançar as concentrações ideais de DNA-molde, testes empíricos foram feitos, utilizando-se 1,0μL de alíquota de amostra de DNA extraído, diluída 10 ou 100 vezes. Algumas amostras apresentaram boa amplificação na diluição de 100 vezes. Na maioria das amostras, a diluição empregada foi a de 10 vezes. Os resultados da PCR eram diretamente influenciados pela concentração de alíquota empregada; tais diferenças de concentração nas amostras podem estar relacionadas com a quantidade de DNA recuperada em cada uma. Além disso, observou-se que, em algumas amostras, após sucessivos descongelamentos e congelamentos, foi necessário aplicar mais de 1,0μL para se obter um bom produto de PCR, mostrando que fatores externos, como a própria preservação ou o manejo freqüente das amostras, podem provocar perdas de DNA.

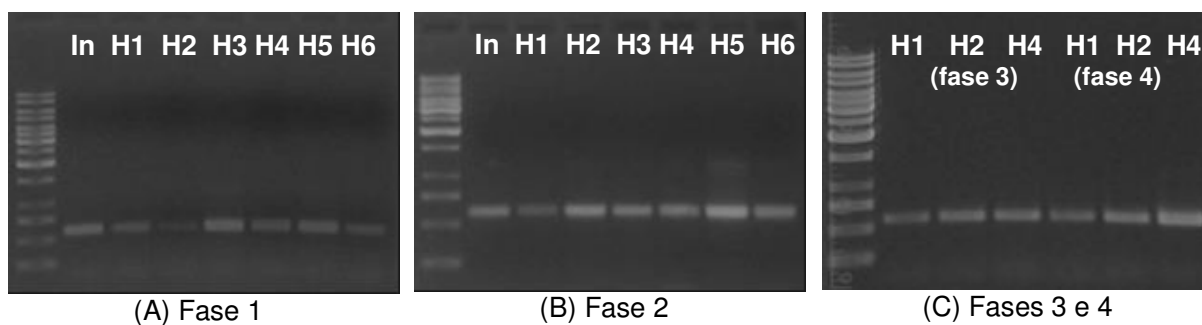


Figura 5.4 – Produtos de PCR das fases 1 a 4

5.1.3 Separação dos produtos de PCR por DGGE

Na busca de se obter resultados que pudessem mostrar um perfil representativo da diversidade e possíveis flutuações populacionais das arqueias presentes nas diferentes alturas e fases operacionais dos reatores, alguns testes de DGGE foram realizados em diferentes gradientes de desnaturação. Os melhores perfis de bandas foram obtidos no gradiente de 45 a 65% e estão apresentados nas figuras abaixo (gel de poliacrilamida 6%: Figuras 5.5A, B e D; poliacrilamida 8%: Figura 5.5C).

Algumas bandas, localizadas nas extremidades superior e inferior dos géis, delimitadas por uma elipse (Figura 5.5), foram observadas ocasionalmente. Janse *et al.* (2004) relatam que bandas duplas ou “rastros” são problemas comuns, inerentes à técnica de PCR-DGGE, freqüentemente discutidos entre os pesquisadores. Em seus experimentos de PCR, um maior tempo de incubação na etapa de extensão final (30 minutos) foi o suficiente para remover as bandas adicionais. A mesma medida foi tomada para os experimentos de PCR-DGGE do presente trabalho após alguns testes iniciais, promovendo uma melhora nos resultados (resultados não mostrados).

Os fragmentos contidos nos produtos de PCR tinham aproximadamente 570 pares de bases. Cinco bandas foram observadas e relacionadas à diversidade microbiana, das quais somente duas bandas eram de visualização bem nítida. O tamanho dos fragmentos pode ter prejudicado a mobilidade e separação das bandas dentro do gel de gradiente desnaturante, o que levou a um resultado de difícil visualização. Watanabe *et al.* (2004) também encontraram resultados similares com o par de *primers* ARC915 + ARC357 com “cauda” GC e acreditam que a dificuldade de separação entre as bandas seja devido ao longo comprimento dos fragmentos amplificados (próximos a 600 pb). Outra hipótese para explicar a difícil visualização seria uma alta similaridade na composição nucleotídica das bandas de DNA (o que significa uma alta proximidade filogenética entre as arqueias presentes nos reatores), o que permitiria que as bandas ficassem muito próximas, com uma separação bem restrita mesmo em um gradiente de 45-65%.

A presença de apenas cinco bandas visíveis revelou que a diversidade de arqueias era pequena em relação à de bactérias (dados do domínio *Bacteria* não-mostrados). Tais bandas foram nomeadas como ARC1, ARC2, ARC3, ARC4 e ARC5 e estão indicadas na Figura 5.5. De fato, tal resultado corrobora com os de diversos estudos na literatura com lodo granular obtido de reatores UASB tratando diversos tipos de efluentes. Os pesquisadores encontraram de 3 a 7

bandas visíveis ou predominantes nos perfis de géis de DGGE da comunidade microbiana metanogênica (CHAN *et al.*, 2001; BUZZINI *et al.*, 2005; PASSIG *et al.*, 2005; ROEST *et al.*, 2005; AKARSUBASY *et al.*, 2006; CALLI *et al.*, 2006b; DÍAZ *et al.*, 2006; KEYSER *et al.*, 2006). Na maioria destes estudos, *Methanosaeta* foi o gênero de arqueia predominante, especialmente *M. concilii*. Dentre outros gêneros detectados, freqüentemente são descritos *Methanosarcina* e outros de arqueias hidrogenotróficas: *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*. Entretanto, tanto nos estudos com amostras de lodo de reatores quanto com amostras ambientais, é comum a ocorrência de várias seqüências de DNA não relacionadas ou com baixa similaridade com espécies conhecidas, correspondendo a microrganismos ainda não-cultivados e, portanto, desconhecidos.

Em outros estudos com amostras ambientais, a diversidade é variável. Casamayor *et al.* (2000) encontraram 3 bandas ao analisarem amostras de sedimento de lagos sulfurosos na Espanha. Dentre as arqueias identificadas, metanogênicas e não-metanogênicas (gênero *Thermoplasma* e filo Crenarchaeota). Em estudos com amostras de aquífero contaminado com petróleo, Kleikemper *et al.* (2005) detectaram 15 a 20 bandas nos perfis de DGGE, sendo que duas foram identificadas e relacionadas a gêneros de arqueias metanogênicas conhecidas (*Methanosaeta* e *Methanospirillum*), enquanto que outras três foram relacionadas a clones de arqueias ambientais não-cultivadas. Watanabe *et al.* (2004) encontraram uma diversidade significativa de arqueias em amostras de sedimento obtidas de áreas alagadas de cultivo de arroz no Japão. Os pesquisadores testaram três pares de *primers* diferentes para verificar qual deles gerava um melhor perfil de DGGE. Ao todo, eles excisaram e seqüenciaram 41 fragmentos de DNA. Em cada amostra, foram encontradas mais de 7 bandas de DNA. Os fragmentos analisados foram identificados como de arqueias metanogênicas, sendo afiliados a membros da ordem Methanosarcinales, especialmente *Methanosaeta concilii*, e da ordem Methanomicrobiales (arqueias hidrogenotróficas).

Os resultados apresentados na figura 5.5A e 5.5B indicaram que os inóculos abrigavam outros grupos de arqueias que só surgiram após um período de adaptação dos mesmos às condições operacionais e dinâmicas dos reatores. Isto pode ser comprovado pela melhor visualização de bandas (ARC2, ARC3 e ARC4) nas amostras retiradas dos perfis ao final de cada fase, especialmente H1, H3, H4 e H5 (fases 1 e 2). Nos vários testes de DGGE realizados, algumas bandas, ARC5 especialmente, apareciam com intensidades bem diferentes, sendo muitas vezes de difícil visualização.

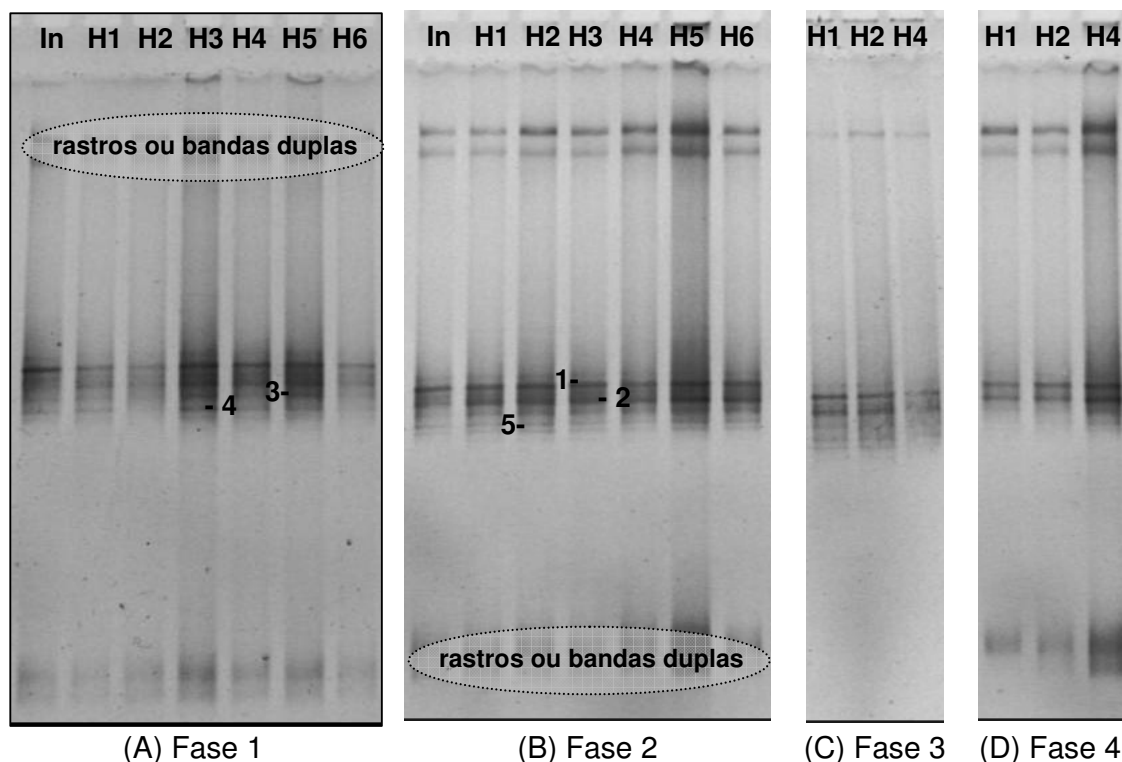


Figura 5.5 – Imagem negativa de DGGE com as amostras das fases 1 a 4 (gradiente 45 a 65%)

A banda ARC1 nitidamente ocorreu em todas as amostras, sendo a mais evidente nos inóculos. Isso pode significar que, no momento da partida dos reatores, a arqueia representada pela banda ARC1 seria a predominante nos inóculos analisados das fases 1 e 2. A banda ARC2 também foi bem freqüente nas amostras, contudo com menos intensidade na fase 1. Ambas as bandas, ARC1 e ARC2, são as mais evidentes e se destacam das outras, principalmente durante as fases 3 e 4, como pode ser verificado nas Figuras 5.5C e D. A maior intensidade destas duas bandas poderia indicar uma possível prevalência de determinada(s) população(ões) na maioria dos períodos amostrados.

Conforme mostrado na Figura 5.2, a concentração de sólidos foi diferente entre os perfis ou alturas em cada reator. A concentração de sólidos poderia influenciar no desenvolvimento microbiano, uma vez que maior quantidade de substrato estaria disponível nos perfis mais baixos. Visualizando a Figura 5.5, entretanto, verifica-se não houve diferença significativa na diversidade de arqueias entre os perfis de cada reator (H1, H2 e H3 no reator R1; H4, H5, H6 no reator R2), sugerindo que os mesmos microrganismos metanogênicos estavam presentes nos diferentes perfis dos dois reatores.

Quanto à conversão biológica em cada reator, era esperado que o peneiramento forçado favorecesse a etapa de hidrólise, facilitando a degradação dos substratos complexos e otimizando as etapas seguintes de conversão biológica, resultando em maior produção de acetato e num maior desenvolvimento de microrganismos metanogênicos. Para confirmar esta hipótese dois pontos foram escolhidos para comparação do perfil de bandas entre as fases. Tais pontos correspondiam ao leito de lodo dos reatores (H1 no reator R1 e H4 no reator R2).

Conforme mostrado na Figura 5.6, não se pode afirmar com certeza que houve alterações nos perfis populacionais de arqueias, uma vez que os perfis de bandas foram muito similares em cada fase operacional. Embora fosse observada uma tendência de bandas menos intensas durante as fases 3 e 4, que poderiam indicar leves flutuações populacionais, seria necessária uma padronização da quantidade de DNA aplicada nos géis de DGGE para permitir tal comparação. Como cada amostra apresentava diferentes rendimentos de fragmentos de DNA (mostrados pela intensidade da banda do produto quando corridos em géis de agarose – Figura 5.4), é possível que as variações no perfil de bandas sejam decorrentes da qualidade dos produtos de PCR e não, necessariamente, da diversidade de arqueias presentes em cada ponto amostrado dos reatores. Para verificar tal hipótese, mais experimentos de PCR-DGGE seriam necessários, padronizando-se a quantidade de DNA amplificado de cada amostra nos géis.

Análises de DQO dos afluentes e efluentes dos reatores, realizadas por De Paula (2007), mostraram que os mesmos apresentaram queda de eficiência de remoção de DQO total durante a transição entre as fases 2 e 3 de 67% (R1) e 63% (R2) para 31 e 36%, respectivamente, com perda de biomassa em decorrência do aumento da velocidade ascensional. Nas fases 4 e 5, esse valor aumentou para 51 a 58%. Entretanto, a remoção de DQO filtrada se manteve estável, apresentando em todas as fases valores em torno de 71 a 82% em ambos os reatores. Foi verificado também aumento da atividade metanogênica específica na fase 3. Isto significa que os reatores mantiveram-se estáveis em termos de remoção biológica. Tais resultados corroboram com os perfis de DGGE, que mostraram uma tendência de bandas menos intensas nesta fase. A prevalência das bandas ARC1 e ARC2, bem como o aumento de sua intensidade, sugerem que estas arqueias eram as mais ativas na fase 3.

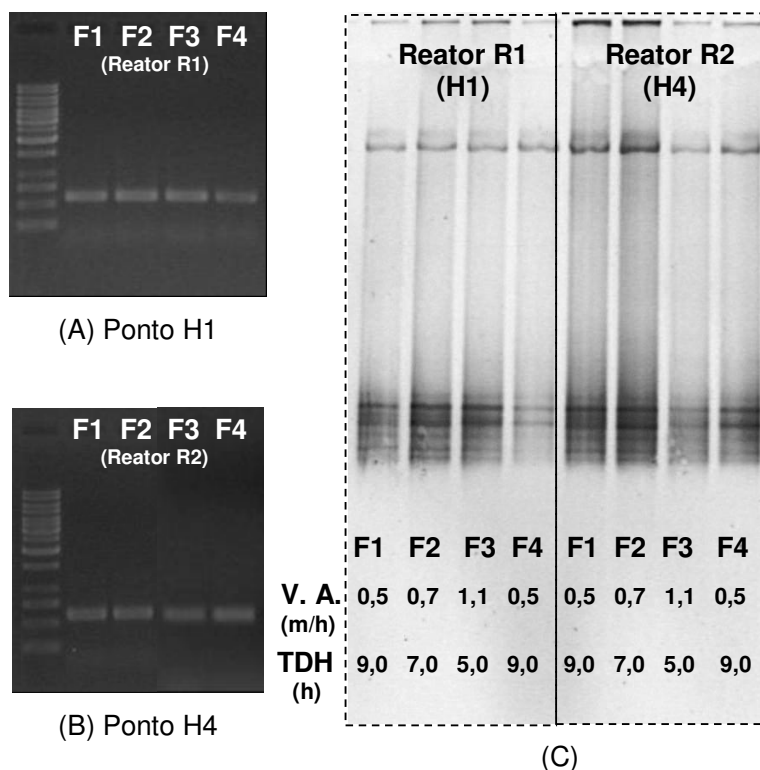


Figura 5.6 – Produtos de PCR dos pontos H1 (reator R1) e H4 (reator R2) e comparação do perfil de bandas de DGGE ao longo das fases.

F1: fase 1; F2: fase 2; F3: fase 3; F4: fase 4; V. A.: velocidade ascensional

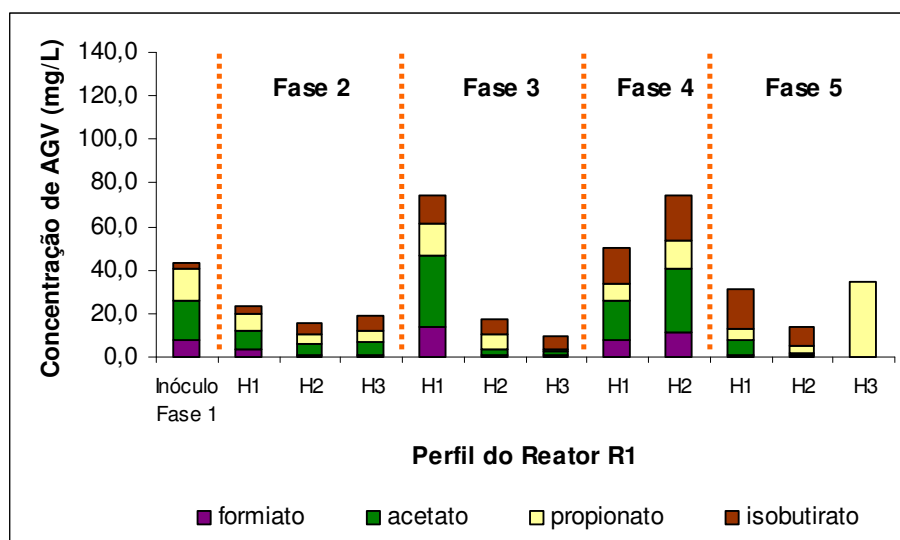
Era esperado um colapso dos reatores durante a fase 3 em face à grande perda de biomassa, porém isso não foi observado. Os resultados do monitoramento dos reatores mostraram que houve apenas uma pequena queda na eficiência, enquanto que os resultados moleculares mostraram que os mesmos tipos de arqueias permaneceram no sistema. Todavia, alguns trabalhos na literatura, citados por Liu *et al.* (2004), reportam que uma alta velocidade ascensional do líquido e um curto TDH exerceriam uma pressão seletiva sobre a comunidade microbiana, induzindo à granulação e removendo os microrganismos que não são competentes a tal processo. Isto aumentaria a eficiência biológica dos reatores. Apesar de não ter sido observada a ocorrência de granulação nos reatores R1 e R2, devido ao curto período de tempo a que foram submetidos ao estresse hidráulico, é possível que a abundância de arqueias dos dois reatores tenha sido levemente alterada, como mostrado nos perfis de DGGE das fases 3 e 4. Porém esta biomassa aparentemente menos abundante apresentou uma alta atividade biológica mantendo uma boa eficiência de remoção de DQO.

Durante a fase 3, caracterizada pelo aumento da carga biológica, os reatores mantiveram-se estáveis, mesmo com baixa quantidade de lodo conforme mostrado na Figura 5.2. Segundo

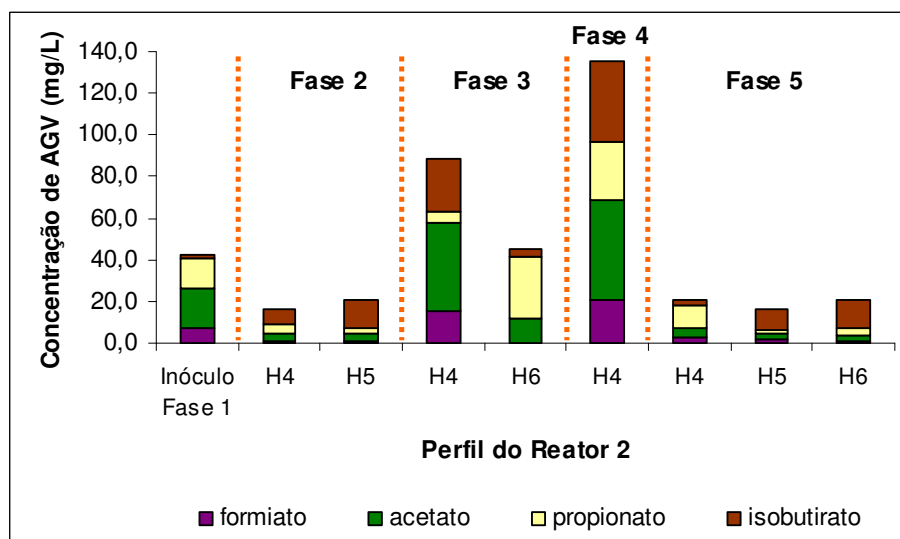
Liu *et al.* (2004), uma alta taxa de carga orgânica mantém o crescimento microbiano, sem que ocorra inanição, sendo um dos fatores mais importantes a serem considerados durante a partida de reatores. Entretanto, se a taxa de carga orgânica for muito alta durante a partida, a taxa de produção de biogás aumenta a ponto de causar turbulência hidrodinâmica, lavando o lodo do reator. No caso dos reatores em estudo, parece que o aumento da carga biológica na fase 3 favoreceu o desenvolvimento da biomassa durante a fase 4. Nesta fase, as perdas biomassa no efluente foram reduzidas, uma vez que as condições operacionais (velocidade ascensional e TDH) retornaram àquelas da fase 1 (Figura 5.2).

Os resultados das análises de AGV no lodo mostraram também que as maiores concentrações foram detectadas durante as fases 3 e 4, notadamente nos perfis mais baixos H1 e H4 (Figura 5.7). As concentrações não excederam a 80 mg/L no reator R1 e 140 mg/L no reator R2. Tais concentrações foram consideradas baixas, como esperado, uma vez que os esgotos são águas residuárias diluídas, com baixa concentração de matéria orgânica. Isto comprova que a degradação biológica se processou de maneira eficiente, ao longo das fases, sem acúmulo de substratos intermediários.

Em ambos os reatores, na maioria dos perfis, acetato estava presente, mas em concentrações em que não excediam a 50 mg/L. Em ambientes onde a concentração de acetato inferior é a 1 mM (59 mg/L), o desenvolvimento de arqueias acetoclásticas do gênero *Methanosaeta* é favorecido, pelo fato destas terem maior afinidade por acetato que as do gênero *Methanosarcina*. Membros deste último gênero só apresentam vantagem competitiva em situações onde a concentração de acetato é maior que 59 mg/L (JETTEN *et al.*, 1992; ANDERSON *et al.*, 2003; BUZZINI *et al.* 2006; HORI *et al.* 2006).



(A)



(B)

Figura 5.7 – Concentrações dos principais AGV nos perfis dos reatores R1 e R2 ao longo das fases operacionais

Destaca-se a diferença de concentração de AGV entre os perfis em cada reator. Nos perfis mais baixos, onde há a entrada de esgoto bruto, é esperado que haja vários tipos de AGV, resultante das etapas de hidrólise, acidogênese e acetogênese. À medida que se sobe no perfil, a matéria orgânica contida na água é degradada, de tal forma que nos perfis mais altos há menor concentração de AGV (efluente ou esgoto tratado). As maiores concentrações de AGV foram detectadas na fase 4. Os perfis H1 e H4 nas fases 3 e 4 foram os que apresentaram maior concentração de sólidos e de biomassa também (STV), conforme verificado na Figura 5.2. Entretanto, tais diferenças de concentração de AGV, especialmente de acetato e formiato,

não foram suficientes para alterar a comunidade de arqueias, como mostrado nos padrões de bandas de DGGE.

5.1.4 Identificação das principais arqueias metanogênicas presentes nos reatores por meio de seqüenciamento de DNA

5.1.4.1 Purificação de bandas de DGGE amplificadas e seqüenciamento

Após análise e observação cuidadosa dos géis, as bandas ARC1, ARC2, ARC3, ARC4 e ARC5 foram excisadas, purificadas do gel de poliacrilamida e vários testes de PCR foram feitos para melhoria das condições da reação de amplificação das bandas. Para amplificação, foi utilizado o par de *primers* ARC 915 + ARC 344 com cauda GC, cujos produtos foram novamente “corridos” em DGGE com o objetivo de se verificar a pureza das bandas como mostrado na Figura 5.8.

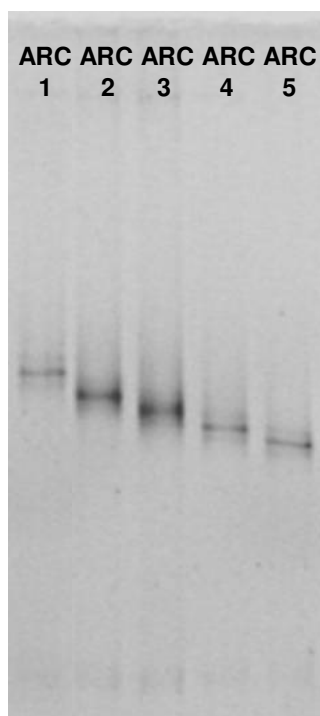


Figura 5.8– DGGE das bandas purificadas

Uma vez verificado que as bandas estavam isoladas, novos produtos de PCR foram gerados a partir do uso do par de *primers* ARC915 + ARC344 sem a cauda GC para análise de seqüenciamento. A Figura 5.9A mostra uma das reações de amplificação das bandas. Foram feitas várias reações de PCR com cada banda, cujos respectivos produtos foram submetidos à

purificação de DNA para remoção de reagentes residuais (enzima, nucleotídeos, tampão, etc.). Alíquotas de 2 μL dos produtos purificados de cada banda foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (2%), juntamente com 2 μL de *mass ladder* (Figura 5.9B).

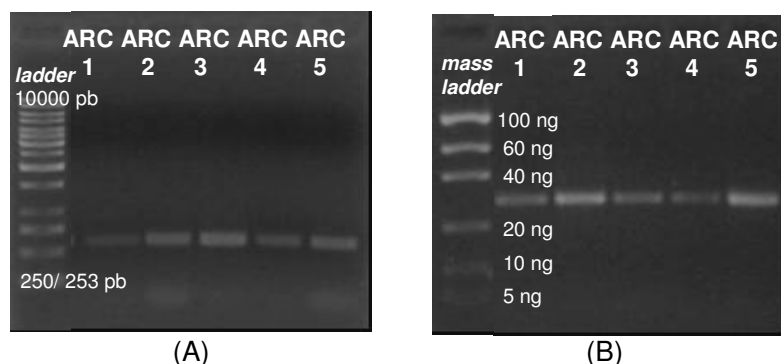


Figura 5.9 – Amplificação das bandas ARC (A);
purificação e quantificação dos produtos de PCR (B)

Análise comparativa com o perfil de bandas geradas pelo *mass ladder*, feita para estimar a quantidade de DNA presente nos produtos de PCR de cada banda extraída, mostrou um rendimento de cerca de 20 ng (10 ng/ μL) para as bandas ARC1, ARC3 e ARC4 e 30 ng (15 ng/ μL) para as bandas ARC2 e ARC5.

As bandas purificadas foram encaminhadas ao Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP). Os resultados do sequenciamento, porém, não foram satisfatórios, e indicaram incertezas na composição de nucleotídeos nas fitas de DNA. Isto indica que, possivelmente, cada banda de DGGE não continha apenas seqüências de um único tipo, mas talvez fosse formada por diferentes seqüências. Muitos estudos que envolveram PCR–DGGE incluíram etapas experimentais posteriores de clonagem das bandas excisadas e, somente após esta etapa, foi que se processou o sequenciamento (ROEST *et al.*, 2005; CALLI *et al.*, 2005 e 2006b; KLEIKEMPER *et al.*, 2005; DÍAZ *et al.*, 2006). A etapa de clonagem permite um melhor isolamento das diferentes seqüências que podem, eventualmente, estar constituídas em uma única banda. Porém esta etapa experimental requer o uso de reagentes de alto custo, não previsto no orçamento do projeto do qual este estudo fez parte e, por isso, não foi realizado.

5.2 Identificação de morfologias de arqueias metanogênicas típicas e de interesse pela técnica de FISH e determinação de sua abundância relativa

5.2.1 Morfotipos observados

Todas as arqueias detectadas pela sonda ARC915 foram consideradas metanogênicas, partindo-se do pressuposto de que as condições ambientais dos reatores e digestores anaeróbios não favorecem o crescimento de outras que não sejam metanogênicas (RASKIN *et al.*, 1994). Entretanto, como mostrado na revisão bibliográfica, diversos estudos atualmente têm detectado a presença de arqueias não-metanogênicas, próximas ao gênero *Thermoplasma* e ao filo Crenarchaeota, por outras técnicas moleculares em ambientes anaeróbios (GODON *et al.*, 1997; ROEST *et al.*, 2005; CARPENTIER *et al.*, 2006; HOUARI *et al.*, 2006).

A sonda, bem como o controle negativo (β -proteobactéria: *Bulkhoderia cepacia*) utilizados neste estudo foram doados gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. A amostra bacteriana foi submetida à análise de FISH com a sonda ARC915 e não emitiu sinais de fluorescência, indicando resultado negativo, confirmando a especificidade da sonda para o domínio *Archaea*.

Testes preliminares de FISH com as amostras da fase 5 mostraram que os filamentos do gênero *Methanosaeta* (Figura 5.10 A) foram a única morfologia de arqueias observadas e que, devido à natureza floculenta das amostras, havia a necessidade de um tratamento prévio para rompimento dos grânulos. Em todas as amostras, foi encontrada alta densidade de células, tornando-se necessárias diluições de 5 ou 10 vezes. Alguns trabalhos na literatura sugerem a sonicação das amostras para desintegração dos grânulos e separação das células microbianas (RASKIN *et al.*, 1994; PLUMB *et al.*, 2001; DÍAZ *et al.*, 2006).

Após o tratamento das amostras com pérolas de vidro e subsequente diluição, outros testes foram realizados e indicaram a presença de mais 3 morfotipos que se hibridizaram com a sonda, dentre eles, agregados de cocos semelhantes ao gênero *Methanosarcina*, todos mostrados na Figura 5.10. Nos testes preliminares, tais microrganismos permaneciam dentro dos grânulos associados a outros, o que dificultava sua visualização.

Devido à morfologia extremamente variada e a dificuldade de visualização de células individuais, especialmente àquelas relacionadas ao gênero *Methanosaeta*, as arqueias foram

classificadas em morfotipos. Filamentos de *Methanosaeta* (Figura 5.10A) são constituídos por um conjunto de várias células enfileiradas, onde cada uma é circuncidada por uma bainha nas extremidades, semelhantes a um “bambu”. Frequentemente, estes filamentos são encontrados formando uma trama dentro dos grânulos. Com o rompimento dos grânulos, foram observados centenas de fragmentos destes filamentos, de tamanhos variados.

Segundo Whitman *et al.* (1992), os agregados de *Methanosarcina* (Figura 5.10B) frequentemente são formados por cocos irregulares, envolvidos por uma membrana ou parênquima; dentro desta, as células parecem possuir uma proteína na parede celular, adjacente à membrana plasmática, que permite a comunicação entre elas.

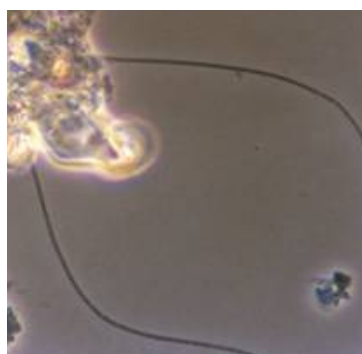
Os outros morfotipos identificados eram bem definidos em sua morfologia, embora fossem de difícil visualização. Tais filamentos eram bem mais finos que os de *Methanosaeta*, difíceis de serem observados na coloração de DAPI, denominados de morfotipos 3 e 4 (Figuras 5.10C e D). Destaca-se que o cromóforo DAPI é um composto que cora o DNA microbiano, enquanto que a sonda fluorescente se hibridiza no RNA ribossomal. Provavelmente, esse DNA permanece condensado em algumas regiões da célula, enquanto que o RNA ribossomal encontra-se espalhado em toda a sua extensão. Isso talvez explique porque a visualização da morfologia da célula dos microrganismos é melhor na captação de luz emitida pela sonda do que pelo DAPI. O morfotipo 3 era um filamento curvo, em forma de “arco”. O morfotipo 4 eram filamentos finos, em forma de “S” ou levemente curvos. Muitos destes filamentos foram observados com frequência dentro de fragmentos de grânulos e o seu número pode ter sido subestimado. Ambos morfotipos podem estar relacionados a gêneros de arqueias hidrogenotróficas. Estes gêneros são mais facilmente detectados, na maioria dos trabalhos, por análise de PCR-DGGE. Plumb *et al.* (2001) descreveram os microrganismos do gênero *Methanospirillum* como filamentos finos simples e curtos.



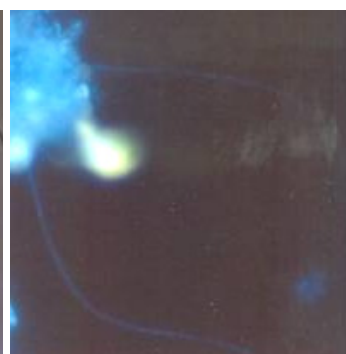
contraste de fase



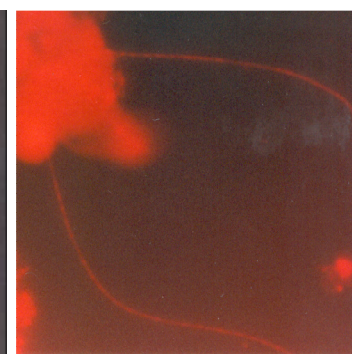
coloração com DAPI



contraste de fase



coloração com DAPI

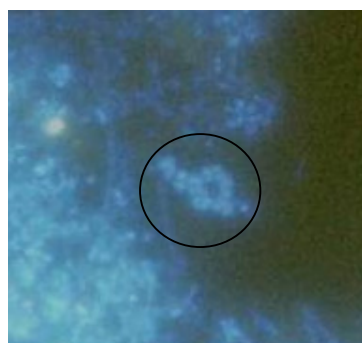


coloração com a sonda ARC915

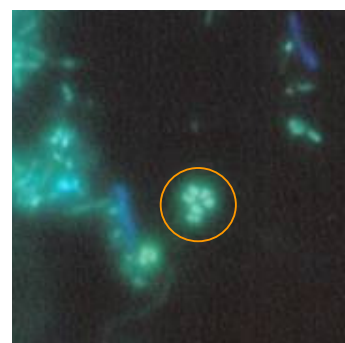
(A) Morfotipo 1: células semelhantes a *Methanosaeta* sp.



contraste de fase



coloração com DAPI



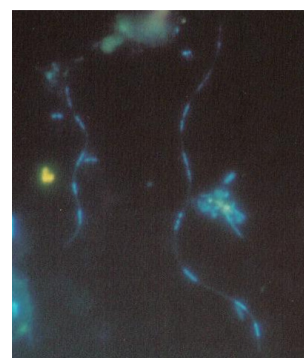
(B) Morfotipo 2: células semelhantes a *Methanosarcina* sp.



contraste de fase



contraste de fase



coloração com DAPI

(C) Morfotipo 3

(D) Morfotipo 4

Figura 5.10 – Principais morfotipos de arqueias observados nas amostras dos

reatores e em testes de AME. Visualização em aumento de 1000 vezes

Calli *et al.* (2005) observaram que os sinais de hibridização emitidos pelos gêneros *Methanospirillum* e *Methanobacterium* eram escassos e fracos, mesmo com sondas específicas (MB1174 e MG1200) para tais grupos. Para se aumentar a intensidade de emissão de sinal, diversos estudos descritos na literatura utilizaram dois tipos de sonda para hibridização (ARC915 e outra específica do grupo de arquea em estudo). Sondas específicas para detecção *Methanosaeta* e *Methanosarcina* são muito utilizadas, provavelmente, pela importância destes dois gêneros na produção de metano a partir do acetato. No uso da sonda universal ARC915, as morfologias destes gêneros foram as mais frequentemente identificadas. *Methanosaeta* têm sido a mais encontrada nos reatores anaeróbios, sendo a sua predominância confirmada por outras análises moleculares (PLUMB *et al.*, 2001; KLEIKEMPER *et al.*, 2005; CALLI *et al.*, 2006; DÍAZ *et al.*, 2006). Díaz *et al.* (2006) comentam que este gênero constituía cerca de 75 a 96% do total de células de arqueias. Os autores relatam também que o gênero *Methanosarcina* não foi detectado por FISH em um dos tipos de grânulos, somente por análise de DGGE e clonagem.

5.2.2 Amostras dos reatores UASB

A Tabela 5.1 apresenta um número estimado dos principais morfotipos de arqueias observados nas amostras dos reatores da fase 5, que se hibridizaram com a sonda e foram contados em 20 campos microscópicos. Os resultados evidenciaram uma alta quantidade de arqueias nas amostras. Considerando que todas as amostras foram processadas de forma idêntica (volumes amostrados e analisados) pôde-se realizar uma comparação entre os resultados. Interessante mostrar que a quantidade destes microrganismos foi maior, praticamente o dobro, nos perfis mais baixos de ambos os reatores (pontos H1 e H4). Certamente, estes pontos compreendem o leito de lodo mais denso, em termos de biomassa, em relação ao lodo menos denso, representada pelos pontos H2 e H3 (reator R1), H5 e H6 (reator R2). Estes resultados indicam que uma maior quantidade de arqueias, e possivelmente também de bactérias, estão presentes no leito do reator. É nesta região do reator que concentra-se uma maior disponibilidade de substratos precursores de metano, como mostrado nas Figuras 5.2 (concentração de sólidos) e 5.7 (concentração de AGV), o que justifica, portanto, o elevado número de células de arqueias contadas nas amostras H1 e H4.

Tabela 5.1 – Número de unidades microbianas de arqueias observadas em 20 campos microscópicos nas amostras da fase 5 dos reatores R1 e R2

Amostra	Gênero <i>Methanosaeta</i>	Gênero <i>Methanosarcina</i>	Arquéias hidrogenotróficas		Total de arqueias (unidades)
	Morfotipo 1 (unidades)	Morfotipo 2 (unidades)	Morfotipo 3 (unidades)	Morfotipo 4 (unidades)	
H1	3470	95	575	110	4250
H2	1790	85	310	40	2225
H3	1510	15	160	50	1735
H4	3225	60	735	80	4100
H5	1625	25	420	40	2110
H6	1500	40	725	110	2375

Por se tratar de um estudo de caráter exploratório, o presente trabalho objetivou apenas estimar a abundância relativa dos morfotipos de arqueias observados, sem se preocupar com a contagem total de microrganismos (bactérias inclusive). Os resultados da contagem de arqueias são mostrados na Tabela 5.1. O número de células encontrado nos 20 campos microscópicos foi muito alto, mesmo após as diluições. Alguns trabalhos na literatura recomendam a contagem de 10 campos microscópicos que contenham 500 a 1000 células totais coradas com DAPI (SANZ *et al.*, 2005; DÍAZ *et al.*, 2006). Em estudos de FISH com lodo anaeróbio de reatores UASB, Díaz *et al.* (2006) recomendam a diluição de 50 vezes para a amostra de lodo já preservada e fixada para contagem do total de microrganismos (coloração com DAPI) e 5 vezes para contagem de microrganismos específicos (coloração com sonda).

Os resultados da distribuição relativa das arqueias observadas estão apresentados na Figura 5.11. O morfotipo 1 foi o predominante em ambos os reatores, constituindo cerca de 63 a 87% da comunidade de arqueias. Estes resultados corroboram com os de Díaz *et al.* (2006), que encontraram uma grande predominância de membros de *Methanosaeta* (em torno de 75 a 96% do número total de células de arqueias detectadas também com a sonda ARC915) em grânulos de reatores UASB tratando efluente de cervejaria.

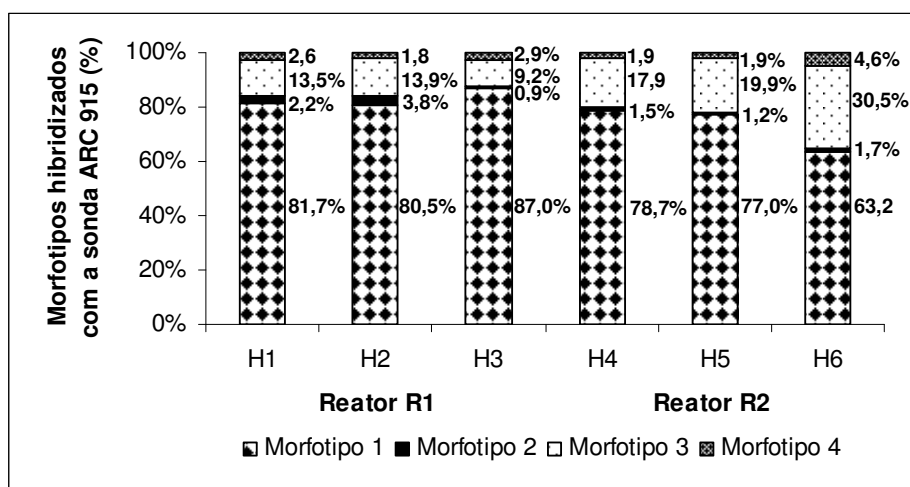


Figura 5.11 – Distribuição relativa dos principais morfotipos de arqueias observados em amostras da fase 5 dos reatores R1 e R2

A Tabela 5.3 apresenta uma estimativa da abundância de arqueias, que se situou entre $1,15$ e $2,81 \times 10^8$ células por mL de lodo. Até o momento, há poucos trabalhos na literatura com resultados quantitativos de microrganismos presentes em lodo anaeróbio de reatores UASB. Sanz *et al.* (2005) quantificaram, por meio de FISH e utilizando a sonda ARC915, bactérias e arqueias presentes em grânulos de reatores UASB tratando diversos efluentes sintéticos. Neste estudo a quantidade de arqueias variou de $4,81 \times 10^9$ a $1,91 \times 10^{10}$ células por grama de lodo anaeróbio. Díaz *et al.* (2006) também encontraram, pela mesma técnica e utilizando o mesmo tipo de sonda, uma alta densidade de arqueias ($8,8 \times 10^9$ a $1,9 \times 10^{10}$ células/ grama de lodo) em grânulos de reatores UASB tratando efluente de cervejaria. Comparando os resultados apresentados na literatura com os do presente trabalho, verifica-se que os números estão acima dos encontrados nos reatores R1 e R2 (10 a 100 vezes maiores). Isto porque neste trabalho, não foram contadas as células microbianas individuais, mas sim pequenos grupos, que continham cerca de 2 a 4 células.

Tabela 5.2 – Estimativa da abundância dos principais morfotipos de arqueias por mL de amostras da fase 5 dos reatores R1 e R2

Amostra	Gênero <i>Methanosaeta</i>	Gênero <i>Methanosarcina</i>	Arquéias hidrogenotróficas		Total de arqueias (unidades/mL)	Concentração de acetato (mg/L)	Concentração de formiato (mg/L)
	Morfotipo 1 (unidades/mL)	Morfotipo 2 (unidades/mL)	Morfotipo 3 (unidades/mL)	Morfotipo 4 (unidades/mL)			
H1	$2,29 \times 10^8$	$6,28 \times 10^6$	$3,80 \times 10^7$	$7,27 \times 10^6$	$2,81 \times 10^8$	6,5	1,2
H2	$1,18 \times 10^8$	$5,62 \times 10^6$	$2,05 \times 10^7$	$2,64 \times 10^6$	$1,47 \times 10^8$	1,0	0,8
H3	$1,00 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$1,06 \times 10^7$	$3,31 \times 10^6$	$1,15 \times 10^8$	0,0	0,0
H4	$2,13 \times 10^8$	$3,97 \times 10^6$	$4,86 \times 10^7$	$5,29 \times 10^6$	$2,71 \times 10^8$	4,5	2,6
H5	$1,00 \times 10^8$	$1,65 \times 10^6$	$2,78 \times 10^7$	$2,64 \times 10^6$	$1,39 \times 10^8$	2,7	1,6
H6	$1,00 \times 10^8$	$2,64 \times 10^6$	$4,79 \times 10^7$	$7,27 \times 10^6$	$1,57 \times 10^8$	3,5	0,5

A predominância do gênero *Methanosaeta* em diversos sistemas anaeróbios, descritos na literatura, aliada aos resultados de concentração de AGV (acetato e formiato) das amostras analisadas neste trabalho, mostrados na Tabela 5.3, cujas concentrações foram bem inferiores a 59 mg/L, confirmam a hipótese de que morfotipo 1 seja uma arqueia acetoclástica pertencente a este gênero. Membros de *Methanosaeta* são bastante detectados por meio de PCR-DGGE. Alguns trabalhos na literatura identificaram uma ou mais bandas pertencentes ao gênero, ou a uma mesma espécie, frequentemente, *Methanosaeta concilii* (CHAN *et al.* 2001; WATANABE *et al.* 2004; AKARSUBASI *et al.* 2005; KLEIKEMPER *et al.* 2005; ROEST *et al.* 2005; AKARSUBASI *et al.* 2006; CALLI *et al.* 2006; DÍAZ *et al.* 2006; KEYSER *et al.* 2006). Provavelmente, este gênero esteja relacionado também a uma das bandas mais frequentemente encontradas – ARC1 ou ARC2 – nos padrões de DGGE.

5.2.3 Amostras de lodo de testes de AME

Os testes de AME foram realizados por Souto (2007) com lodos anaeróbios provenientes de cada um dos reatores e alguns resultados são mostrados no Anexo 4. Segundo Chernicharo (2007), na prática, o teste de AME consiste em se avaliar a capacidade das arqueias metanogênicas em converter o substrato orgânico em metano e gás carbônico. A partir das quantidades conhecidas de biomassa (g de STV) e de substrato (g de DQO), e sob condições estabelecidas e controladas, avalia-se a produção de metano ao longo do período dos testes (g de DQO_{CH4}/d) com substratos específicos.

Os mesmos princípios para a análise e contagem dos morfotipos de arqueias observados nas amostras dos reatores foram utilizados nos estudos das amostras de lodo de testes de AME

com diferentes substratos. Os resultados indicaram que as amostras dos testes de AME apresentaram uma baixa densidade de microrganismos, especialmente no cultivo com formiato, além de sinais de endogenia, como pode ser verificado na Figura 5.12, na qual filamentos de *Methanosaeta* apresentam espaços vazios e parcialmente desintegrados, bem diferentes dos filamentos encontrados nas amostras dos reatores.

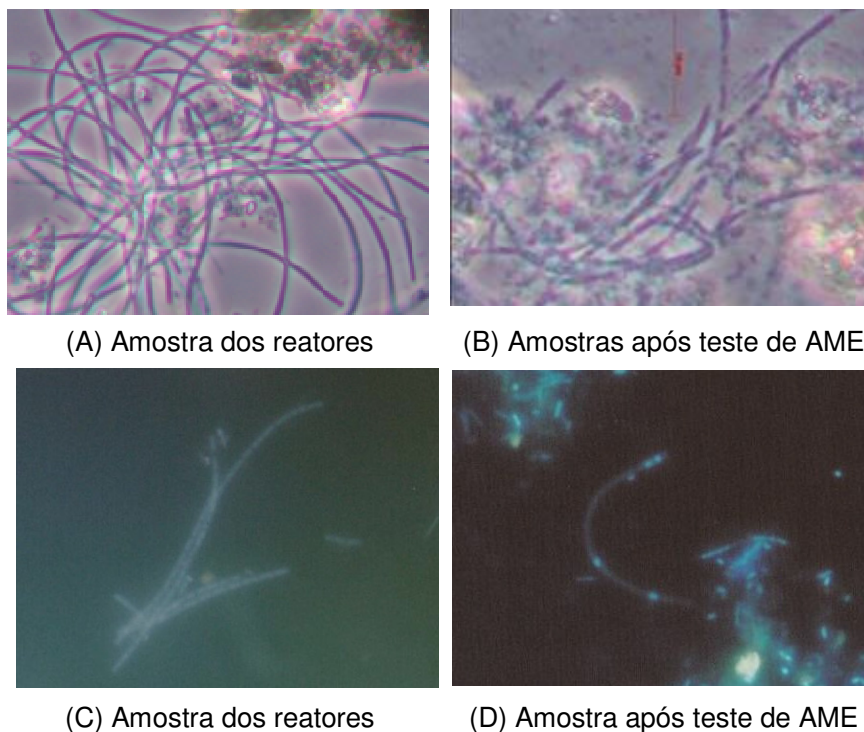


Figura 5.12 – Comparação entre filamentos de *Methanosaeta* sp. em contraste de fase (A e B) e em coloração DAPI (C e D), aumento de 1000 vezes

A Tabela 5.3 apresenta a abundância dos principais morfotipos identificados nos testes de AME. A Figura 5.13 apresenta uma comparação da abundância relativa dos quatro morfotipos encontrados nas amostras. Analisando-se os resultados de FISH (gráfico da Figura 5.13) com aqueles obtidos nos testes de AME (gráficos do Anexo 4), verifica-se que os cultivos com acetato e com formiato foram os que apresentaram as maiores eficiências de produção de metano, como esperado. O morfotipo 1, semelhante ao gênero *Methanosaeta*, foi encontrado em todos os cultivos, sendo predominante no cultivo com acetato e com formiato. O morfotipo 2, semelhante a *Methanosarcina*, foi detectado apenas no cultivo com formiato, estando ausente na maioria das amostras.

Tabela 5.3 – Número de unidades microbianas de arqueias observadas em 20 campos microscópicos de amostras de testes de AME com diferentes substratos

Substrato	Gênero <i>Methanosaeta</i>	Gênero <i>Methanosarcina</i>	Arquéias hidrogenotróficas		Total de arqueias (unidades)
	Morfotipo1 (unidades)	Morfotipo 2 (unidades)	Morfotipo 3	Morfotipo 4	
Acetato	133	0	14	10	157
Formiato	75	3	6	2	86
Glicose	29	0	102	35	166
Branco	34	0	81	8	123

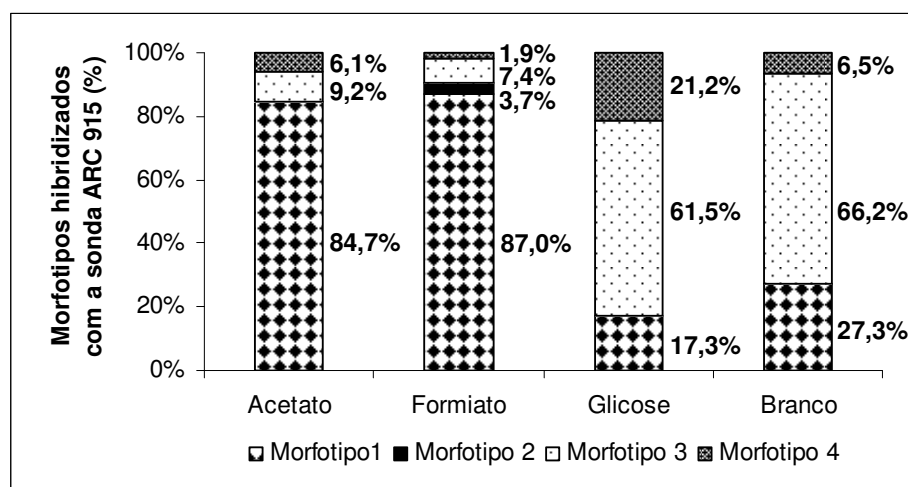


Figura 5.13 – Distribuição relativa dos principais morfotipos de arqueias observados em amostras de testes de AME com diferentes substratos

A predominância de filamentos de *Methanosaeta* já era esperada no cultivo com acetato, o que foi confirmado com as análises de FISH. No cultivo com formiato, porém, era esperada a predominância de arqueias hidrogenotróficas, uma vez que estas utilizam CO₂ e H₂ como precursores metanogênicos. Diferentemente do esperado, filamentos de *Methanosaeta* também foram predominantes no cultivo com formiato, que foi o que apresentou menor quantidade de microrganismos, mais baixa inclusive que o branco (cultivo de lodo sem substrato). Isto poderia ser explicado pelo fato de tais filamentos já estarem presentes em alta quantidade no inóculo e seu crescimento pode ter sido propiciado pela presença de acetato eventualmente produzido por bactérias homoacetogênicas, que utilizam como substrato compostos constituídos por um só carbono, tais como o formiato. Segundo Sanz *et al.* (2005), lodos crescidos em formiato são casos extremos, nos quais bactérias ativas estão praticamente ausentes, uma vez que tal composto é degradado predominantemente por arqueias que apresentam metabolismo hidrogenotrófico ou generalista (gênero *Methanosarcina*).

A Tabela 5.4 que apresenta uma estimativa da abundância de arqueias por mL de amostra dos testes de AME, comparando-se também a produção de metano acumulada no período e a eficiência de produção. Os cultivos com acetato e com formiato foram os que apresentaram maiores eficiências de produção (70%), enquanto que o cultivo com glicose apresentou baixa eficiência (19%). Neste caso, o baixo pH, resultante da atividade acidogênica, pode ter sido o fator responsável pelo baixo desenvolvimento das arqueias acetoclásticas.

Tabela 5.4 – Estimativa da abundância dos principais morfotipos de arqueias por mL de amostra de testes de AME com diferentes substratos

Substrato	Gênero <i>Methano-saeta</i>	Gênero <i>Methano-sarcina</i>	Arqueias hidrogenotróficas		Total de arqueias (unidades/mL)	Volume acumulado de CH ₄ (mL)	Eficiência de produção de CH ₄ (%)
	Morfotipo 1 (unidades/mL)	Morfotipo 2 (unidades/mL)	Morfotipo 3 (unidades/mL)	Morfotipo 4 (unidades/mL)			
Acetato	8,79 x 10 ⁶	0	9,25 x 10 ⁵	6,61 x 10 ⁵	1,04 x 10 ⁷	122	70
Formiato	4,96 x 10 ⁶	2,60 x 10 ⁵	3,97 x 10 ⁵	1,32 x 10 ⁵	5,68 x 10 ⁶	40	70
Glicose	1,92 x 10 ⁶	0	6,74 x 10 ⁶	2,31 x 10 ⁶	1,10 x 10 ⁷	33	19
Branco	2,25 x 10 ⁶	0	5,35 x 10 ⁶	5,29 x 10 ⁵	8,13 x 10 ⁶	12	-

Obs.: valores de volume acumulado de CH₄ e eficiência de produção foram obtidos por Souto (2007) e estão no Anexo 4.

O cultivo com glicose apresentou a predominância dos morfotipos 3 e 4. O baixo pH, resultante da atividade acidogênica, pode ter sido o fator responsável pelo baixo desenvolvimento das arqueias acetoclásticas. Nesta amostra, foi observada também uma alta quantidade de bacilos ou diplococos, que não se hibridizaram com a sonda ARC915 e que poderiam representar bactérias fermentativas. Tais microrganismos foram observados também nas amostras dos reatores, mas com uma frequência muito menor. Outro fato observado foi que os morfotipos 3 e 4 apresentavam-se muito maiores, provavelmente devido ao favorecimento de suas condições de crescimento. Em estudos de Fernández *et al.* (1999) com reator anaeróbio alimentado com glicose, os pesquisadores observaram a dominância de arqueias hidrogenotróficas próximas a *Methanobacterium formicium* durante vários meses. Em outros estudos de Fernández *et al.* (2000) com dois tipos de reatores anaeróbios também alimentados com glicose, foi verificada alta prevalência de arqueias hidrogenotróficas da ordem Methanomicrobiales em um dos tipos de reatores e do gênero *Methanosarcina* no outro, constatando uma menor frequência do gênero *Methanosaeta*.

6 CONCLUSÕES

Com base no objetivo geral e nos objetivos específicos desta pesquisa, foi possível caracterizar a diversidade microbiana metanogênica de ambos os reatores UASB, concluindo-se que:

- Ambas as técnicas PCR-DGGE e FISH indicaram que a diversidade de arqueias é restrita, constituída por 4 ou 5 populações. Morfologias típicas foram encontradas, semelhantes a gêneros de arqueias metanogênicas acetoclásticas: intensos filamentos de *Methanosaeta* e agregados de cocos de *Methanosarcina*. As outras duas morfologias filamentosas observadas podem estar relacionadas a arqueias hidrogenotróficas;
- Pela análise de PCR-DGGE, conclui-se que a diversidade de arqueias é similar ao longo do perfil vertical de cada um dos reatores, ou seja, as mesmas populações estavam presentes em todas as alturas dos reatores. Entre reatores também não houve diferenças na diversidade, o que significa que o peneiramento forçado do esgoto no reator R2 não interferiu aparentemente no desenvolvimento da comunidade de arqueias quando comparado com o reator controle (R1). Isto pode ser confirmado indiretamente pelas análises físico-químicas, que mostraram uma manutenção da conversão biológica (remoção de DQO filtrada) e, portanto, desempenho estável dos reatores, demonstrando que a microbiota metanogênica foi capaz suportar as condições operacionais impostas;
- Ainda pela análise de PCR-DGGE, verificou-se que a diversidade de arqueias não sofreu alterações bruscas ao longo das fases operacionais (1 a 4), o que significa que as mesmas populações estavam presentes em todo o período de monitoramento dos reatores. Entretanto, há indícios de que algumas populações podem ter predominado durante a fase 3, quando ocorreu o aumento da carga biológica, e também durante a fase 4.
- Quanto à análise de FISH, realizadas durante a fase 5, observou-se diferenças na quantidade de microrganismos detectados entre os perfis de cada reator. Nos perfis mais baixos dos reatores (H1 e H4), onde se encontra o leito de lodo mais denso, foi encontrado um número muito maior de microrganismos. A concentração de arqueias foi estimada em torno de $2,81 \times 10^8$ morfotipos/ mL de lodo para o perfil H1 e $2,71 \times 10^8$ morfotipos/ mL para perfil H4, quase o dobro de arqueias encontradas nos outros perfis.
- A comunidade microbiana metanogênica foi dominada, durante a fase 5, por arqueias filamentosas semelhantes aos do gênero *Methanosaeta* (63 a 87%), em ambos reatores, com concentrações que variavam de $1,0 \times 10^8$ a $2,3 \times 10^8$ morfotipos/ mL de lodo.

Provavelmente, a banda mais intensa detectada nas fases anteriores, por meio de PCR-DGGE, está relacionada ao gênero, corroborando com muitos estudos descritos na literatura..

- Ainda pela análise de FISH, nos testes de AME com lodo dos reatores, o cultivo com acetato foi o que apresentou maior desenvolvimento de arqueias do gênero *Methanosaeta* (em torno de 85%: $8,8 \times 10^6$ morfotipos/ mL de lodo) e maior acúmulo de metano (122 mL), como esperado. O cultivo com glicose apresentou uma produção bem menor de metano (33 mL) e baixo desenvolvimento de arqueias ($1,10 \times 10^7$ morfotipos/ mL), principalmente as acetoclásticas (cerca de 17%: $1,9 \times 10^6$ morfotipos/ mL), provavelmente devido ao baixo pH (5,13) resultante da fase acidogênica. No cultivo com formiato, esperava-se o predomínio de arqueias hidrogenotróficas; ao contrário, houve predominância de filamentos de *Methanosaeta* ($4,96 \times 10^6$ morfotipos/ mL), sugerindo associação sintrófica com bactérias homoacetogênicas, que são consumidoras de formiato e produtoras de acetato.

7 RECOMENDAÇÕES

As recomendações apresentadas descritas abaixo se referem a aspectos metodológicos.

- Em todos os testes moleculares, é recomendável a utilização de amostras de referência de arqueias mais comumente encontradas em reatores, tais como *Methanosaeta concilii*, *Methanobacterium formicium* (ordem Methanobacteriales), *Methanosarcina* sp. e *Methanospirillum* sp (ordem Methanomicrobiales) como controles-positivos. Na impossibilidade de aquisição de todas as amostras, obter, pelo menos, uma de arqueia acetoclástica relacionada ao gênero *Methanosaeta* e outra de arqueia hidrogenotrófica, relacionada ao gênero *Methanobacterium*. Estas amostras poderão dar um suporte mais confiável, principalmente nas análises de DGGE e FISH, uma vez que estes microrganismos têm sido os tipos de arqueias mais freqüentemente encontrados em sistemas de tratamento anaeróbio;
- Quanto aos aspectos metodológicos, apresentados no item 4, sugere-se que novos testes sejam feitos com outro par de *primers* que produza fragmentos menores para melhor separação dos mesmos nos géis de DGGE, bem como utilizar outros métodos de coloração dos géis, que são mais sensíveis e são freqüentemente referidos na literatura, tais como nitrato de prata, *Syber Green* ou *Vista Green*. Além disso, inserir uma etapa de clonagem das bandas excisadas dos géis para facilitar tanto a separação dos fragmentos de DNA quanto a posterior análise de seqüenciamento;
- Nas análises de FISH, recomenda-se a utilização de sondas fluorescentes específicas (em nível de ordem, família ou gênero) para grupos de arqueias metanogênicas, permitindo uma identificação mais precisa;
- Em virtude da morfologia extremamente variada das arqueias, é necessária uma padronização de contagem de células, principalmente dos filamentos de *Methanosaeta* por serem os predominantes. Pré-tratamento do lodo (sonicação, por exemplo) antes ou depois da etapa de preservação das amostras para FISH para desintegração dos grânulos. Maiores diluições também são necessárias para facilitar a contagem de microrganismos. Alguns estudos com lodo anaeróbio de reatores UASB (SANZ *et al.*, 2005; DÍAZ *et al.*, 2006) recomendam a contagem de apenas 10 campos microscópicos que contenham 500 a 1000 células microbianas totais coradas com

DAPI e maiores diluições (50 vezes) das amostras de lodo já preservadas e fixadas para contagem no DAPI;

- Meios digitais de captação de imagens para a técnica de FISH são necessários, pois são rápidos, evitando a perda excessiva de fluorescência pelos microrganismos hibridizados, e possibilitam o armazenamento dos dados para posterior contagem, o que oferece uma quantificação mais precisa dos microrganismos;
- Finalmente, quando possível, submeter as amostras a ambas técnicas moleculares, uma vez que seus resultados fornecem informações complementares, facilitando a interpretação de resultados físico-químicos e, conseqüentemente a compreensão do funcionamento dos reatores.

REFERÊNCIAS

- AKARSUBASI, A. T.; INCE, O.; KIRDAR, B. OZ, N. A.; ORHON, D.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M.; INCE, B. K. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. *Water Research*, v. 39, p. 1576-1584, 2005.
- AKARSUBASI, A. T.; INCE, O.; OZ, N. A.; KIRDAR, B.; INCE, B. K. Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 28-35, 2006.
- AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, v. 172, n.2, p.762-770, 1990.
- AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification an in situ detection of individual cells without cultivation. *Microbial Reviews*, v. 59, n.1, p.143-169, 1995.
- ANDERSON, K., SALLIS, P., UYANIK, S. Anaerobic treatment processes. In: MARA, D.; HORAN, N. (Ed.) *The handbook of water and wastewater microbiology*. Academic Press. p. 391-396, 2003.
- AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*. 10:152-161, 2005.
- ARCHER, D.B.; KIRSOP, B.H. The microbiology and control of anaerobic digestion. In: WHETLEY, A. (Ed.). *Anaerobic digestion: a waste treatment technology*, pp. 43-91, 1990
- BATSTONE, D. J.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L. The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granule anaerobic biomass. *Water Research*, v. 38, p. 1390-1404, 2004.
- BUZZINI, A. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B., PIRES, E. C. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 168-176, 2006.
- CALLI, B.; MERTOGLU, B.; INANC, B.; YENIGUN, O. Methanogenic diversity in anaerobic bioreactors under extremely high ammonia levels. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 448-455, 2005.
- CALLI, B.; DURMAZ, S.; MERTOGLU, B. Identification of prevalent microbial communities in an municipal solid waste landfill. *Water Science Technology*, v. 53, p., n. 8, 139-147, 2006a.
- CALLI, B.; MERTOGLU, B.; ROEST, K.; INANC, B. Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 641-647, 2006b.
- CAMPOS, J. R. (coordenador) Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Programa de Pesquisa em Saneamento Básico. 435 p. 1999.
- CARPENTIER, W. L.; LI, T.; VIGNERON, V.; MAZÉAS, L.; BOUCHEZ, T. Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 89, p. 423-434, 2006.
- CASAMAYOR, E. O.; SHÄFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C; MUYZER, G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two

- neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 499-508, 2000.
- CASSERLY, C.; ERIJMAN, L. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 52, p. 7-12, 2003.
- CHAN, O. C.; LIU, W. T.; FANG, H. H. P. Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. *Water Science Technology*, v.43, n.1, p. 77-82, 2001.
- CHERNICHARO, C. A. L. *Princípio do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios*, v. 5, 2ª edição, Belo Horizonte: Ed. UFMG, 380 p., 2007.
- CHOUARI, R.; PASLIER, D. L.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WESSENBACH, J.; SGHIR, A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 8, p. 1104-1115, 2005.
- DE PAULA, F. S. *Influência dos aspectos hidráulicos na otimização de parâmetros de projeto de reatores UASB tratando esgotos domésticos*. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- DEARMAN, B.; MARSCHNER, P.; BENTHAN, R. H. Methane production and microbial community structure in single-stage batch and sequential batch systems anaerobically co-digesting food waste and biosolids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69; p. 589-596, 2006.
- DELBÈS, C.; MOLETTA, R.; GODON, J. J. Bacterial and archaeal 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, v.35, p. 19-26, 2001.
- DÍAZ, E. E.; STAMS, A. J. M.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n. 7, p. 4942-4949, 2006.
- FERNÁNDEZ, A.; HUANG, S.; SESTON, S.; XING, J.; HICKEY, R.; CRIDDLE, C.; TIEDJE, J. How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n. 8, p.3697-3704, 1999.
- FERNÁNDEZ,.; HASHSHAM, S. A.; DOLLHOPF, S. L.; RASKIN, L.; GLAGOLEVA, O.; DAZZO, F. B.; HICKEY, R. F.; CRIDDLE, C. S.; TIEDJE, J. M. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n. 9, p.4058-4067, 2000.
- FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; HAANDEL, A. V.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, F. F. Fundamentos do tratamento anaeróbio. In: CAMPOS, J. R. (coordenador). *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Rio de Janeiro: PROSAB, p. 29-52, 1999.
- FORESTI, E.; ZAIAT, M. VALLERO, M. Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5:3-19, 2006.
- GODON, J. J.; ZUMSTEIN, E.; DABERT, P.; HABOUZIT, F.; MOLETTA, R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n. 7, p.2802-2813, 1997.

- HAHN D.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; AKKERMANS, A. D. L.; SCHLEIFER, K. H. Detection of microorganisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.*, v. 138, p. 879-887, 1992.
- HAJARNIS, S.R., RANADE, D. R. Effect of propionate toxicity on some methanogens at different pH values and in combination with butyrate. *Proceeding of 7th International Symposium on Aerobic Digestion*, Cape Town, South Africa, 1994.
- HASHSHAM, S. A.; FERNÁNDEZ, A. S.; DOLLHOPF, S. L.; DAZZO, F. B.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M.; CRIDDLE, C. S. Parallel processing of substrate correlates with greater functional stability in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n. 9, p.4050-4057, 2000.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35, p. 1-21, 1998.
- HORI, T.; HARUTA, S.; UENO, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 2, p.1623-1630, 2006.
- HUANG, L. N.; CHEN, Y. Q.; ZHOU, H.; LUO, S.; LAN, C. Y.; QU, L. H. Characterization of methanogenic Archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. *FEMS Microbiology Ecology*, v.46, p. 171-177, 2003.
- HUBER, H.; HOHN, M. J.; RACHEL, R.; FUCHS, T. A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, v. 417, p. 63-67, 2002.
- JANSE, I.; BOK, J.; ZWART, G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, v. 57, p. 279-281, 2004.
- JETTEN, M. S. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiology Reviews*, 88, p. 181-198, 1992.
- KEYSER, M.; WITTHUHN, R. C.; LAMPRECHT, C.; COETZEE, M. P. A.; BRITZ, T. J. PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 29, p. 77-84, 2006.
- KLEYKEMPER, J.; POMBO, S. A.; SCHROTH, M. H.; SIGLER, W. V.; PESARO, M.; ZEYER, J. Activity and diversity of methanogens in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n. 1, p.149-158, 2005.
- LECLERC, M.; DELBES, C.; MOLETTA, R.; GODON, J. J. Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA *Archaea* during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 34, p. 213-220, 2001.
- LECLERC, M.; DELGÈNES, JP.; GODON, JJ. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology*, v. 6, n.8, p. 809-819, 2004
- LEITÃO, R. C.; HANDEL, A. C.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: a review. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1105-1118, 2006.

- LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 67, p. 3-28, 1995.
- LIU, W. T.; CHAN, O. C.; FANG, H. H. P. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Research*, v. 36, p. 1767-1775, 2002.
- LIU, Y.; TAY, J. H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 533-563, 2004.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock – *Biology of microorganisms*. 10^a edição, 1078 p., 2003.
- MC CARTY, P. L. One hundred years of anaerobic treatment. In: SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION (6-11 september 1981, Travemünde, Germany), Edited by Hughes *et al.* Elsevier Biomedical Press B. V., Amsterdam, The Netherlands, 1982.
- MC HUGH, S.; CARTON, M.; MAHONY, T.; O'FLAHERTY, V. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiology Letters*, v. 219, p. 297-304, 2003.
- MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.
- MUYZER, G.; HOTTENTRAGER, S.; TESKE, A.; WAWER, CATHRIN. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual*, v. 3.44, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1996.
- O'FLAHERTY, V.; COLLINS, G.; MAHONY, T. The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 5, p. 39-55, 2006.
- PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.*, 9:1-55, 1986.
- PASSIG, F. H.; SAKAMOTO, I. K.; VARESHE, M. B. A.; CAMPOS, J. R. Aspectos microbiológicos do reator UASB, utilizado no tratamento de esgoto sanitário. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 2005.
- PICIOREANU, C.; D. J. BATSTONE, VAN LOOSDRRECHT, M. C. M. Multidimensional modelling of anaerobic granules. *Water Science Technology*, v. 52, n. 1-2, p. 501-507, 2005.
- PLUMB, J. J.; BELL, J.; STUCKEY, C. Microbial populations associated with treatment of an industrial dye effluent in an anaerobic baffled reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 7, p. 3226-3235, 2000.
- PURDY, K. J.; EMBLEY, T. M.; TAKII, S.; NEDWELL, D. B. Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin-column method. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 10, p. 3905-3907, 1996.
- RASKIN, L.; POULSEN, L. K.; NOGUERA, D. R.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 1241-1248, 1994.

- RASKIN, L.; ZHENG, D.; GRIFFIN, M. E.; STROOT, P. G.; MISTA, P. Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 68, p. 297-308, 1995.
- RITTMANN, B. E.; McCARTY, P. P. *Environmental biotechnology: principles e applications*. Mc Graw-Hill International Editions, 754 p., 2001.
- ROEST, K.; HELIG, H. G. H. J.; SMIDT, H.; VOS, W. M.; STAMS, A. J. M.; AKKERMANS, A. D. L. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28, p. 175-185, 2005.
- SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2nd edition, New York, United States, 1989.
- SANZ, J.L.; DIAZ E.; AMILS R. Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005.
- SASAKI, K.; HARUTA, S.; UENO, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Archaeal population on supporting material in methanogenic packed-bed reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 102, n. 3, p. 244-246, 2006.
- SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; SYUTSUBO, K.; OHASHI, A.; HARADA, H.; NAKAMURA, K. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, v. 144; p. 2655-2665, 1998.
- SOUTO, T. F. F. *Influência das condições de incubação no teste de atividade metanogênica específica (AME) de lodos anaeróbios*. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Escola de Engenharia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- SPEECE, R. E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*, Academic Press.
- TEIXEIRA, A. R. *Influência da alteração da distribuição do tamanho de partículas no desempenho de reatores UASB tratando esgotos domésticos*. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- TAGAWA, T.; SYUTSUBO, K.; SEKIGUCHI, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. Quantification of methanogen cell density in anaerobic granular sludge consortia by fluorescence in situ hybridization. *Water Science Technology*, v. 42, n. 3-4, p. 77-82, 2000.
- VAN HAANDEL, A. C., LETTINGA, G. *Anaerobic sewage treatment. A practical guide for regions with a hot climate*, John Wiley & Sons, New York, 1994.
- VAN LIER, J.B., RINTALA, J., SANZ MARTIN, J.L., LETTINGA, G. Effect of short-term temperature increase on the performance of a mesophilic UASB reactor. *Water Science and Technology*, v. 22, p. 183–190, 1990.
- VAZOLLER, R. F.; MANFIO, G. P.; CANHOS, V. P. Domínio Archaea: Reinos Crenarcheota, Euryarcheota e Korarcheota. In: CANHOS, V. P.; VAZOLLER, R. F. (Ed.) *Série biodiversidade do estado de São Paulo – microrganismos e vírus*. São Paulo, v. 1, 1999.
- WALKER, M.; RAPLEY, R. (tradução Fernando Salvador Moreneo) Guia de rotas na tecnologia do gene. Editora: Ateneu, São Paulo, 1999.
- WATANABE, T.; ASAKAWA, S.; NAKAMURA, A.; NAGAOKA, K.; KIMURA, M. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters*, v. 232, p. 153-163, 2004.

WHITMAN, W. B.; BOWEN, T. L.; BOONE, D. R. The methanogenic bacteria. In: *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application*. H. G. T. A. Balows, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer. NY, Springer-Verlag, p. 719-767, 1992.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271, 1987.

WU, X. L.; CHIN, K. J.; STUBNER, S.; CONRAD, R. Functional patterns and temperature response of cellulose-fermenting microbial cultures containing different methanogenic communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56; p. 212-219, 2001.

YANG, G., ANDERSON, G.K. Effects of wastewater composition on stability of UASB. *Journal of Environmental Engineering*, v. 119, p. 958-977, 1993.

YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Science and Technology*, v. 52, n.1-2, p. 85-91, 2005.

ZEHNDER, A. J. B.; INGVORSEN, K.; MARTI, T. Microbiology of methane bacteria. In *SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION* (6-11 september 1981, Travemünde, Germany), Edited by Hughes *et al.* Elsevier Biomedical, Press B. V., Amsterdam, The Netherlands, 1982.

ZHANG, T.; KE, S. Z.; LIU, Y.; FANG, H. P. Microbial characteristics of a methanogenic phenol-degrading sludge. *Water Science Technology*, v. 52, n. 1-2, p. 73-78, 2005a.

ZHANG, Y.; AIYUK, S.; XU, H.; CHEN, G. X.; VERSTRAETE, W. Study of microbial community structures in UASB sludge treating municipal wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA. *Science in China Series C – Life Sciences*, v. 48, p. 128-135. Suppl.1, 2005b.

ANEXOS

ANEXO 1: Soluções utilizadas nas análises de biologia molecular

1.1 Preparação das colunas cromatográficas utilizadas no procedimento de extração de DNA (PURDY *et al.*, 1996)

Inserir cada seringa em tubos de 50 ml (tipo *Falcon*) com abertura na tampa. Colocar um microtubo estéril de 1,5 mL no fundo do tubo *Falcon* sempre quando o material a ser eluído da coluna for de interesse.

1.1.1 Colunas de HTP

Solução de Hidroxiapatita

1 parte de HTP (*Bio Agency*)

6 partes de ddH₂O

Misturar bem, esperar decantar o pó e descartar o sobrenadante. Repetir a operação. Acrescentar água o suficiente para cobrir o pó. Esterilizar em autoclave por 30 minutos. Armazenar a 4°C.

Preparo da coluna

Com o auxílio de uma pinça de metal estéril, colocar lã de vidro no fundo de seringas de 1,0 mL. Adicionar, às seringas, cerca de 1,0 mL da solução de HTP e centrifugá-las a 700 rpm por 2 a 4 minutos. Repetir a operação até conseguir, aproximadamente, 700 µL de coluna empacotada.

1.1.2 Colunas de Sephadex G-75

Solução de Sephadex G-75

8 g de Sephadex G-75 (*Sigma*)

250 mL de ddH₂O

Misturar bem e esperar decantar o gel. Retirar o excesso de água e deixar apenas uma pequena camada acima do gel.

Preparo da coluna

Com o auxílio de uma pinça de metal estéril, colocar lã de vidro no fundo de seringas de 2,0 mL. Adicionar às seringas solução de Sephadex G-75 até que o gel ocupe toda a coluna e centrifugá-las a 700 rpm por 2 a 4 minutos. Repetir a operação até conseguir, aproximadamente, 2,0 mL de coluna empacotada. Pré-condicionar as colunas com 400 µL de ddH₂O estéril e centrifugá-las a 2.700 rpm por 8 minutos. Realizar esta operação três vezes.

2.1 Soluções utilizadas no protocolo de extração de DNA (SAMBROOK *et al.*, 1989; PURDY *et al.*, 1996)

2.1.1 Solução-estoque de fosfato de sódio dibásico 0,4 M, pH 8,0

28,39 g de Na_2HPO_4 (*Sigma*)

500 mL de ddH₂O

Misturar e esterilizar a solução em autoclave por 30 minutos e armazenar à temperatura ambiente.

2.1.2 Solução de fosfato de sódio dibásico 120 mM, pH 8,0

150 mL de solução de Na_2HPO_4 0,4 M

500 mL de ddH₂O q.s.p.

Misturar, esterilizar a solução em autoclave por 30 minutos e armazenar à temperatura ambiente.

2.1.3 Solução de fosfato de sódio dibásico 120 mM, pH 8,0 com 1% de PVPP (PURDY *et al.*, 1996)

15 mL de solução de Na_2HPO_4 0,4 M

1 g de PVPP (*Sigma*) lavado em ácido

50 mL de ddH₂O q.s.p.

Misturar, esterilizar a solução em autoclave por 30 minutos e armazenar à temperatura ambiente.

2.1.4 Solução de acetato de sódio 3M

4,92 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ (*Sigma*)

20 mL de ddH₂O

Misturar, esterilizar a solução em autoclave por 30 minutos e armazenar à temperatura ambiente.

2.1.5 Solução de fosfato de sódio dibásico 120 mM, pH 7,2

60 mL de solução de Na_2HPO_4 0,4 M

200 mL de ddH₂O q.s.p.

Ajustar o pH com solução de HCl 0,1N.

Misturar, esterilizar a solução em autoclave por 30 minutos e armazenar à temperatura ambiente.

2.1.6 Solução-estoque de fosfato de potássio dibásico 1M, pH 7,2

45,65 g de K_2HPO_4 triidratado (*Sigma*)

200 mL de ddH₂O

Ajustar o pH com solução de HCl 0,1N.

Misturar, esterilizar a solução em autoclave por 30 minutos e armazenar à temperatura ambiente.

2.1.7 Solução de fosfato de potássio dibásico 300 mM, pH 7,2

15 mL de solução de K_2HPO_4 1 M

50 mL de ddH₂O q.s.p.

Misturar, esterilizar a solução em autoclave por 30 minutos e armazenar à temperatura ambiente.

2.1.8 Solução de SDS 20%, pH 7,2

2g de dodecil sulfato de sódio (*BioAgency*)

10 mL de ddH₂O estéril

Misturar e aquecer a 68°C, se necessário, para dissolver o SDS. Ajustar o pH com gotas de HCl concentrado. Armazenar em temperatura ambiente.

2.1.9 Tampão TE (Tris 10mM e de EDTA 1 mM), pH 8,0

1 mL da solução de Tris 1M

0,2 mL da solução de EDTA 0,5 M

100 mL de ddH₂O estéril q.s.p.

Misturar, esterilizar a solução em autoclave por 30 minutos e armazenar em temperatura ambiente.

2.1.10 Tampão Tris – HCl 1 M, pH 8,0

12,11 g Tris (C₄H₁₁NO₃) (*Bio Agency*)

100 mL ddH₂O estéril q.s.p.

Misturar e ajustar o pH com cerca de 42mL de HCl concentrado.

2.1.11 Solução de EDTA 0,5 M, pH 8,0

18,6 g de EDTA (Na₂EDTA)(*Bio Agency*)

[CH₂N(CH₂.COOH)CH₂.COONa]₂.2H₂O)

100 mL de ddH₂O

Ajustar o pH com várias pérolas de NaOH e, depois, com HCl concentrado. Esterilizar em autoclave por 30 minutos e armazenar em temperatura ambiente.

2.2 **Soluções para eletroforese e preparo de géis de agarose e de DGGE (SAMBROOK *et al.*, 1989; MUYZER *et al.*, 1996)**

2.2.1 Solução de agarose 1,0%

2,0 g de agarose (*Bioline*)

200 mL de ddH₂O estéril

Aquecer e misturar até o líquido ficar totalmente transparente. Armazenar em temperatura ambiente. Obs.: Para se fazer as soluções de agarose 0,8 e 2%, seguem-se os mesmos procedimentos, variando-se apenas a quantidade de agarose.

2.2.2 Solução de brometo de etídio

1 gota de brometo de etídio (*Bio Agency*)

200 mL de ddH₂O

Misturar e utilizar a solução para coloração de géis de agarose e de poliacrilamida. Pode ser reutilizada algumas vezes. O brometo de etídio é altamente tóxico, devendo-se ter o cuidado de se descartar luvas e resíduos de géis corados em lixo separado.

2.2.3 Tampão-estoque TAE (Tris, Ácido acético glacial, EDTA) 50X, pH 7,5

121 g de Tris

28,55 mL de ácido acético glacial (*F. Maia*)

50 mL de EDTA 0,5M

Completar o volume para 300 mL com ddH₂O. Ajustar pH com aproximadamente 100 mL de HCl concentrado e completar o volume da solução para 500 mL. Esterilizar em autoclave por 30 minutos e armazenar à temperatura ambiente.

2.2.4 Tampão TAE 1X

20 mL de tampão TAE 50X

980 mL de ddH₂O estéril

Misturar e armazenar a solução em temperatura ambiente.

2.2.5 Tampão TAE 0,5X

70 mL de tampão TAE 50X

6930 mL de ddH₂O

Misturar e armazenar a solução em temperatura ambiente.

2.2.6 Solução de bis-acrilamida 30%

29,22 g de acrilamida ultratransparente (CH₂CHCONH₂) (*Bio Agency*)

0,78 g de bis (*Bio Agency*)

Dissolver em 100 mL de dd H₂O estéril.

Filtrar em membrana de 0,45 µm.

Armazenar a 4°C.

2.2.7 Solução de persulfato de amônio 10%

0,1 g de persulfato de amônio (*Bio Agency*)

Pesar o persulfato de amônio em um microtubo. Dissolver em 1 mL de ddH₂O estéril e manter a -20°C por até 30 dias.

2.2.8 Solução com desnaturante (100%) – acrilamida 6%

20 mL de solução de acrilamida 30%

42 g de uréia (CH₄N₂O) (*Vetec*)

40 mL de formamida deionizada (*Sigma*)

Dissolver a uréia na acrilamida em placa aquecedora (aproximadamente 40°C) sob agitação constante. Após a dissolução da uréia, adicionar a formamida. Armazenar a 4°C protegido da luz. Esta solução necessita ser ressolubilizada antes do uso, tendo-se o cuidado de não aquecê-la muito.

2.2.9 Solução com desnaturante (100%) – acrilamida 8%

27 mL solução de acrilamida 30%

42 g de uréia

40 mL de formamida deionizada

Seguir as mesmas instruções de preparo e armazenamento da solução anterior.

2.2.10 Solução sem desnaturante (0%) – acrilamida 6%

20 mL de solução de acrilamida 30%

80 mL de ddH₂O estéril

Misturar e armazenar a solução a 4°C protegida da luz.

2.2.11 Solução sem desnaturante (0%) – acrilamida 8%

27 mL de solução de acrilamida 30%

73 mL de ddH₂O estéril

Misturar e armazenar a solução a 4°C protegida da luz.

2.2.12 Solução *stacking gel*

3,0 mL de solução sem desnaturante (0%)

30 µL de tampão TAE 50X

30 µL de solução de persulfato de amônio 10%

3,0 µL de TEMED

Misturar os reagentes e, com a ajuda de uma seringa com agulha, cobrir lentamente a superfície do gel de DGGE já polimerizado.

2.2.13 Montagem de géis de agarose (cuba de eletroforese horizontal *Bio Rad*)

1- Lacrar bem as laterais do suporte de acrílico para o gel com fita crepe.

2- Após fundir a solução de agarose, verter de 25 a 30 mL em um tubo Falcon (no caso de géis para purificação de DNA, após a extração, utilizar 50 mL de solução de agarose). Esperar esfriar até a uma temperatura de cerca de 45°C e verter no suporte de acrílico lacrado.

2- Imediatamente, colocar o pente para a formação das canaletas.

3- Esperar esfriar para a solidificação do gel.

2.2.14 Montagem de géis de DGGE (aparato *DCodeTM System Bio Rad*)

1- Limpar os vidros, removendo-se as manchas com um lenço de papel; se estiverem muito sujos ou engordurados, lavá-los com solução diluída de detergente Extran e enxaguá-los abundantemente com água destilada. Atenção: não usar álcool para limpar.

2- Montar os “sanduíches” apropriadamente, colocando-se os espaçadores entre as duas placas de vidro, travando-as com as presilhas (a placa menor sobre a placa maior, e as setas apontadas para os vidros). Os espaçadores devem ser colocados de maneira que a abertura dos sulcos fique face aos grampos do “sanduíche”, próximos à porção superior das placas.

3- Posicionar as placas na canaleta de alinhamento do suporte (um “sanduíche” por vez); alinhar as placas com o cartão de alinhamento; retirar as placas e verificar se os espaçadores estão alinhados também na parte de baixo.

4- Posicionar os “sanduíches” no suporte sob a base de espuma, travando-os com a presilha externa.

5- Preparar as seringas e o sistema de distribuição das soluções *low* e *high* na bancada. Deixar

- um b quer com água destilada para lavagem das seringas. Verificar se o volume de ajuste do sistema está corretamente selecionado.
- 6- Colocar aproximadamente 6,5 litros de TAE 0,5X no tanque de eletroforese e ligar o sistema para iniciar o aquecimento (60 C).
 - 7- Preparar as soluções *low* e *high* nas seringas específicas sob banho de gelo (consultar a Tabela 1.1 deste Anexo). Adicionar tampão TAE 50X e posteriormente as soluções 0% e 100% de desnaturante, seguidas das soluções de persulfato de amônio 10% e de TEMED. Atenção, todas as soluções, exceto o tampão TAE, devem ser manipuladas na capela. As soluções *low* e *high* devem ser preparadas dentro de 10 a 15 minutos antes de serem distribuídas em suas respectivas seringas.
 - 8- Misturar delicadamente e transferir as soluções para as seringas específicas, uma de cada vez; removendo as bolhas de ar.
 - 9- Verificar se o sistema de distribução está totalmente para tr s. Posicionar as seringas em seus respectivos lugares (sistema *top filling* – solução *low* na frente e *high* atrás) e a porção terminal da mangueira entre as placas de vidro (utilizar uma ponteira para ajudar na distribução e uma fita adesiva para prendê-la ao vidro).
 - 10- Iniciar o processo de distribução, girando o sistema de forma lenta e constante, utilizando-se as duas mãos para que o gradiente seja corretamente formado.
 - 11- Ao final da distribução, retirar as seringas e lav -las imediatamente com água destilada para que a solução não se polimerize dentro das mangueiras.
 - 12- Repita os passos 7-11 para a produção do segundo gel (se for o caso).
 - 13- Aguardar a polimerização da acril mida por aproximadamente 1 hora.
 - 14- Após a solidificação, preparar o *stacking* gel e, com a ajuda de uma seringa com agulha, cobrir lentamente a superfície do gel polimerizado com a solução. Ao final, encaixar o pente de forma inclinada para evitar bolhas, e centraliz -lo no gel. Aguardar a polimerização (aproximadamente 30 minutos).
 - 15- Remover os pentes lentamente e posicionar os dois “sanduíches” no suporte interno (*core*) cuidadosamente, com a placa de vidro menor voltada para o *core*. Adicionar um pouco de tampão TAE 0,5X na cuba superior e verificar se há vazamentos; em caso positivo, remover e colocar novamente os “sanduíches” no suporte interno..
 - 16- Mergulhar o suporte interno no tanque com tampão TAE 0,5X e lavar as canaletas para remover vestígios de poliacril mida. Adicionar tampão até atingir o nível máximo, fechar o sistema e esperar até que a temperatura de 60 C seja atingida.

17- Desligar o sistema e adicionar as amostras de forma rápida e precisa, para que não haja um esfriamento excessivo do tampão e não caia amostra em canaletas vizinhas.

18- Ligar o sistema e aguardar a temperatura atingir 60°C. Conectar a fonte elétrica (80 V) e deixar a eletroforese correr por aproximadamente 15 horas.

19- Desmontar o sistema e retirar o gel cuidadosamente, procedendo-se em seguida à técnica de coloração.

20- Mergulhar as placas e presilhas em solução diluída de Extran, esfregando-se cuidadosamente. Enxaguar bem em água destilada, deixando-se de secar livremente sem contato com pano ou papel.

2.2.14 Tabela de gradiente para o preparo das soluções *low* e *high* (DGGE)

Volume final da solução: 14 mL (espaçadores 0,75mm)

Volume de ajuste da seringa: 12,3 mL

Gradiente desnaturante (%)	Solução 0% (mL)	Solução 100% (mL)
0	14,0	0
5	13,2	0,8
10	12,6	1,4
15	11,8	2,2
20	11,2	2,8
25	10,4	3,6
30	9,8	4,2
35	9,0	5,0
40	8,4	5,6
45	7,6	6,4
50	7,0	7,0
55	6,2	7,8
60	5,6	8,4
65	4,8	9,2
70	4,2	9,8
75	3,4	10,6
80	2,8	11,2
85	2,0	12,0
90	1,4	12,6
95	0,6	13,4
100	0	14,0

2.3 Soluções para análises de FISH (AMANN *et al.*, 1990)

2.3.1 Solução-estoque de NaCl 5M

73,05 g de NaCl

250 mL de ddH₂O

Dissolver o sal na água (processo lento).

Esterilizar em autoclave por 30 minutos.

2.3.2 Solução de NaOH 1N

2 g de NaOH

50 mL de ddH₂O

Misturar e armazenar a solução em temperatura ambiente.

2.3.3 Solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10X (NaCl 1,3 M, Na₂HPO₄ 70 mM, NaH₂PO₄ 30 mM, pH 7,2)

1,66 g de NaH₂PO₄ (*Cinética*)

3,97 g de Na₂HPO₄ (*Sigma*)

104 mL de solução de NaCl 5M

400 mL de ddH₂O q.s.p.

Misturar e armazenar a solução em temperatura ambiente. Esterilizar em autoclave por 30 minutos.

2.3.4 Solução PBS 1X

100 mL de PBS 10X

900 mL de ddH₂O estéril

Misturar e armazenar a solução em temperatura ambiente.

2.3.5 Tampão de fixação (4% de paraformaldeído)

2 g de paraformaldeído (*Vetec*)

150 µL de solução de NaOH 1N

5 mL de PBS 10X

50 mL de ddH₂O estéril q.s.p.

Aquecer 40 mL de ddH₂O até 55 – 65°.

Adicionar a solução de NaOH 1N e o paraformaldeído. Misturar e adicionar o PBS 10X. Ajustar o pH para 7,2 – 7,4 com 1 gota de HCl concentrado. Ajustar o volume final da solução para 50 mL. Estocar a 4°C e utilizar em até 4 dias.

2.3.6 Tampão-estoque de hibridização (NaCl 0,9M, Na₂EDTA 5 mM, Tris-HCl 20mM, pH 7,2)

90 mL de solução de NaCl 5M

5 mL de solução de Na₂EDTA 0,5 M

10 mL de solução de Tris – HCl 1M

500 mL de ddH₂O estéril q.s.p.

Misturar e armazenar a solução em temperatura ambiente.

2.3.7 Tampão-estoque de lavagem (Na₂EDTA 5 mM, Tris – HCl 20mM, pH 7,2)

5 mL de Na₂EDTA 0,5 M

10 mL de solução de Tris – HCl 1M

500 mL de ddH₂O estéril q.s.p.

Misturar e armazenar a solução em temperatura ambiente.

2.3.8 Tampão de hibridização com 20%
de formamida e 0,1% de SDS
(sonda ARC 915)

10 mL de formamida

250 µL de solução de SDS 20%

40 mL de tampão-estoque de hibridização

q.s.p.

Misturar e armazenar a solução em
temperatura ambiente.

2.3.9 Tampão de lavagem com 225 mM
de NaCl e 0,1% de SDS
(sonda ARC 915)

2150 µL de solução de NaCl 5M

250 µL de solução de SDS 20%

50mL de tampão-estoque de lavagem q.s.p.

Misturar e armazenar a solução em
temperatura ambiente.

ANEXO 2: Imagens em preto e branco dos géis de DGGE

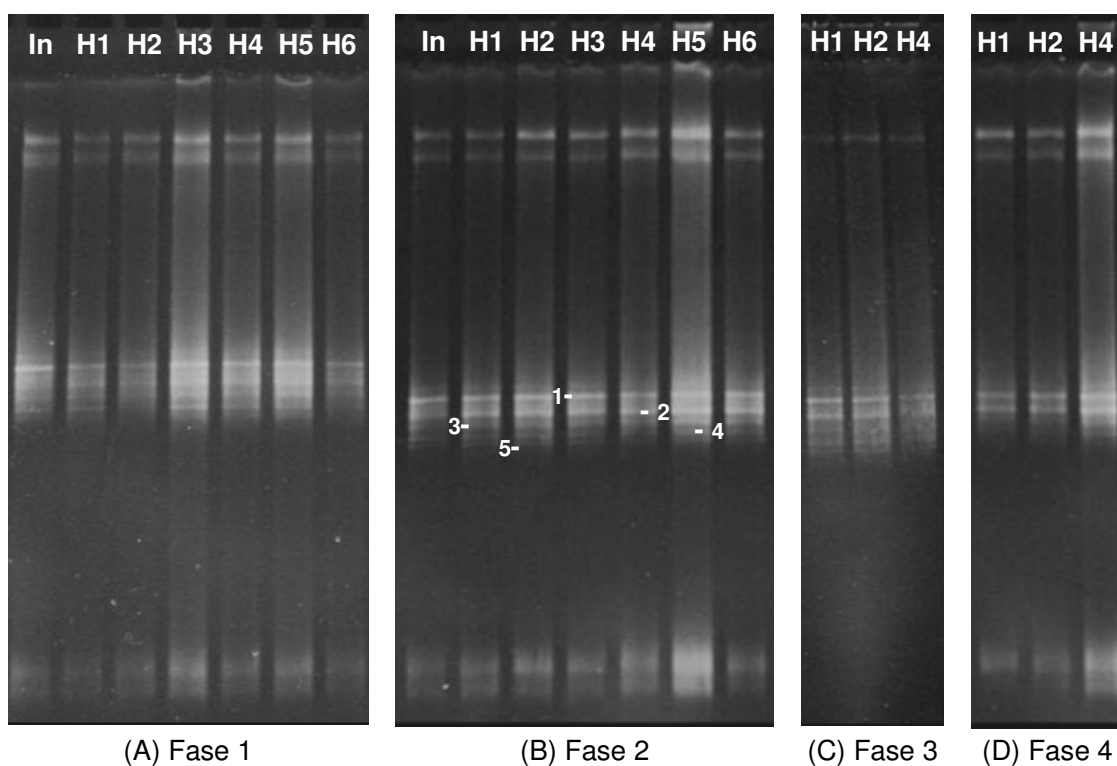


Figura 2.1 – DGGE com as amostras das fases 1 a 4 (gradiente de 45 a 65%)

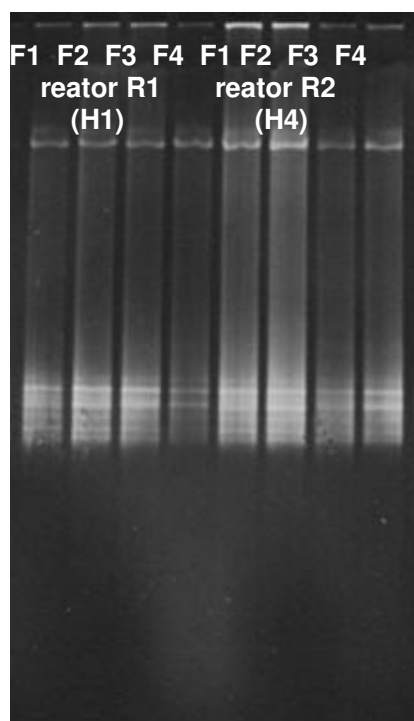


Figura 2.2 – Comparação de perfil de bandas de DGGE entre os reatores (pontos H1 e H4) ao longo das fases

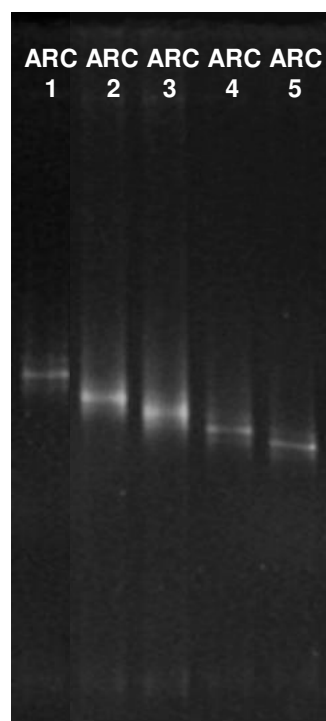


Figura 2.3 – DGGE das bandas ARC 1 a 5

ANEXO 3: Eficiências de remoção de DQO dos reatores R1 e R2
(DE PAULA, 2007; TEIXEIRA, 2007)

Tabela 3.1 – Eficiências de remoção de DQO dos reatores R1 e R2

Fase	Período	Eficiências de remoção de DQO			
		Total		Filtrada	
		R1	R2	R1	R2
1	12-10-04 a 21-12-04	60	61	73	77
2	14-01-05 a 18-03-05	67	63	81	82
3	12-04-05 a 31-05-05	31	36	72	71
4	01-07-05 a 15-09-05	53	51	79	79
5	07-10-05 a 05-01-06	59	58	74	77

ANEXO 4: Testes de AME com diferentes substratos (Souto, 2007)

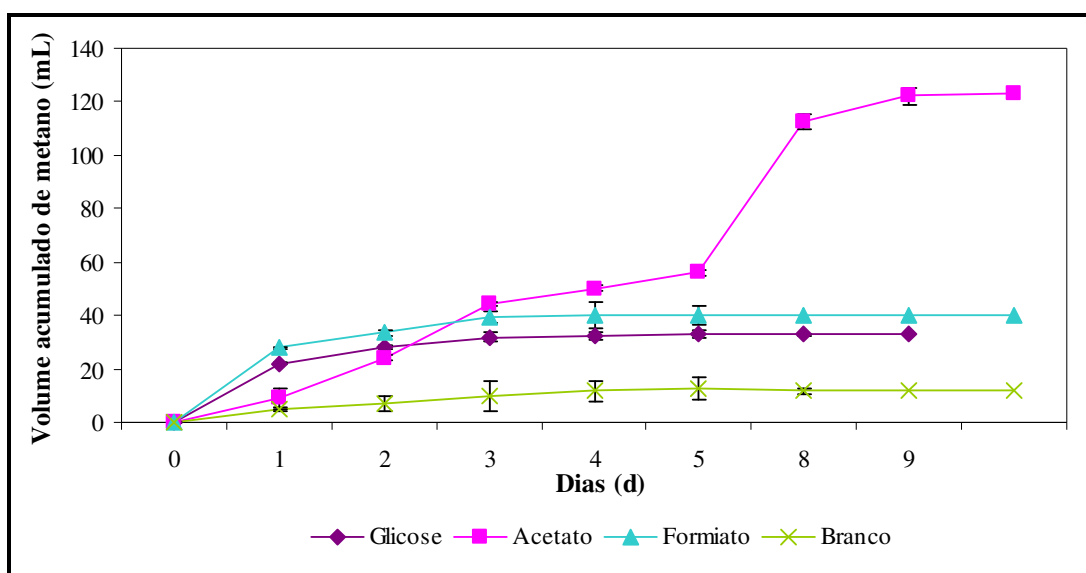


Figura 4.1 – Produção acumulada de metano na etapa que avaliou a influência do tipo de substrato

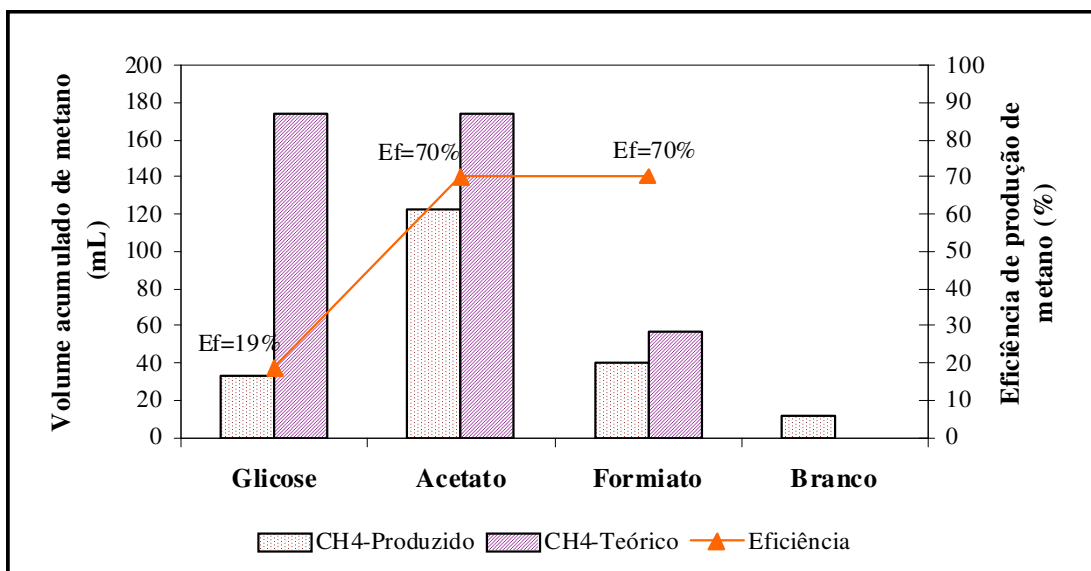


Figura 4.2 – Eficiência na produção de metano na etapa que avaliou a influência do tipo de substrato

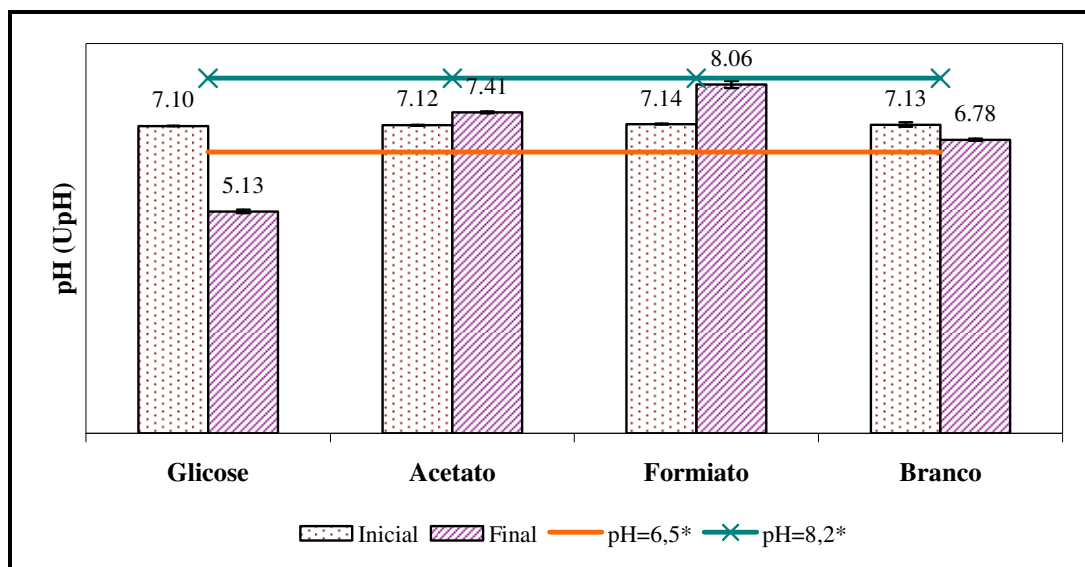


Figura 4.3 – Monitoramento do pH na etapa que avaliou a influência do tipo de substrato* Speece, 1996