

ÉRIKA LAMARO SARTI

Influência do Oxigênio no Crescimento de Arquéias
Metanogênicas e Bactérias Redutoras de Sulfato em
Reatores Anaeróbios em Batelada

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche

São Carlos

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

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

S249i Sartí, Érika Lamaro
Influência do oxigênio no crescimento de arqueias
metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato em
reatores anaeróbios em batelada / Érika Lamaro Sartí ;
orientador Maria Bernadete A. Varesche. -- São Carlos,
2007.

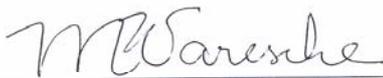
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e
Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola
de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Bactérias redutoras de sulfato. 2. Arqueias
metanogênicas. 3. Oxigênio. 4. Reatores em batelada.
5. FISH. I. Título.

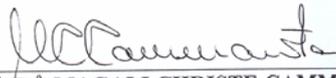
FOLHA DE JULGAMENTO

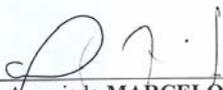
Candidata: Licenciada **ERIKA LAMARO SARTI**

Dissertação defendida e julgada em 10/05/2007 perante a Comissão Julgadora:


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


Dr.^ª **IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE**
(Pós-Doutoranda/FAPEP) *Aprovada*


Prof.^ª Dr.^ª **MAGALI CHRISTE CAMMAROTA**
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ) *Aprovada*


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


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

Aos meus pais, Antonio
Carlos e Maria José, e ao
Thel.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Bernadete, pela amizade, orientação e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat pela disponibilidade de esclarecer dúvidas e pelas sugestões e críticas no exame de qualificação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante o período de vigência do Mestrado.

Às secretárias do Departamento de Hidráulica e Saneamento Sá e Pavi pela ajuda com assuntos burocráticos, e também à Rose.

À profa. Beth Moraes, Janja e Eloísa, pela constante ajuda nas análises cromatográficas e microscopia.

À FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro através do Projeto Temático “Desenvolvimento de Sistemas Combinados de Tratamento de Águas Residuárias Visando a Remoção de Poluentes e a Recuperação de energia e de Produtos dos Ciclos de Carbono, Nitrogênio e Enxofre”.

A todo pessoal do LPB: Carol, Tiago, Sandra, Daniele, Júlia, Luís Ricardo, Gunther, Kátia, Iolanda, Lorena, Noemi, Alexandre, Renata, Leonardo, Arnaldo, Márcia, Margarita e todo pessoal da iniciação científica, pela amizade, ajuda e bons momentos vividos no laboratório.

À Júlia pela ajuda com o FISH.

Às amigas de casa, Thaís, Sulita e Silvia pela companhia, conversas e bons momentos.

Aos amigos do mestrado pela amizade e momentos de descontração.

À minha família, pelo constante apoio.

RESUMO

SARTI, E. L. **Influência do oxigênio no crescimento de arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato em reatores anaeróbios em batelada**. 2007. 114p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato na presença de oxigênio, em reatores anaeróbios em batelada, sob condições sulfetogênicas e mesofílicas. Os reatores foram inoculados com lodo anaeróbio proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de avicultura. Triplicatas de reatores foram alimentadas com meio basal ZINDER, acrescido de acetato de sódio, etanol ou lactato de sódio e sulfato de sódio, de modo a se obter relações DQO/sulfato iniciais de 1,1-1,5. O *headspace* dos reatores foi preenchido com N₂ (100%) acrescido de oxigênio puro comercial (3-3,5 mg/L de oxigênio dissolvido). Os reatores anaeróbios controle foram alimentados com os mesmos substratos orgânicos, entretanto, seu *headspace* foi preenchido com N₂/CO₂ (70/30%). Nos reatores com acetato de sódio, etanol e lactato de sódio as velocidades de produção de metano foram de 0,30 mmol/L.h, 0,41 mmol/L.h e 0,16 mmol/L.h, respectivamente, para os reatores controle. Em relação aos reatores com oxigênio os valores foram de 0,27 mmol/L.h, 0,40 mmol/L.h e 0,08 mmol/L.h, respectivamente. Na presença de acetato, etanol e lactato a redução de sulfato foi de 57% e 97%; 59,6% e 76,6%; 77,5% e 41,9%, respectivamente, nos reatores controle e com oxigênio. Nos reatores com acetato e etanol houve predomínio de organismos do Domínio *Archaea* nos reatores controle (59,2% e 58,8%) e com oxigênio (60,7% e 54,5%), respectivamente. No reator controle contendo lactato, também ocorreu o predomínio de arqueias metanogênicas (56,2%), enquanto na presença de oxigênio houve predomínio de organismos do Domínio *Bacteria* (63,9%). As proporções de BRS nos reatores controle e com oxigênio contendo acetato, etanol e lactato foram de 22% e 17,3%; 28% e 16,9%; 19,5% e 21,9%, respectivamente. O oxigênio não inibiu a metanogênese e nem a redução de sulfato nos reatores contendo acetato e etanol.

Palavras-chave: bactérias redutoras de sulfato, arqueias metanogênicas, oxigênio, reatores em batelada, FISH.

ABSTRACT

SARTI, E. L. **Oxygen influence on methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria's growth in anaerobic batch reactors.** 2007. 114p. Msc Dissertation. - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

This work aimed to evaluate the behavior of methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria in the presence of oxygen, using anaerobic batch reactors under sulfidogenic and mesophilic conditions. The reactors were inoculated with anaerobic sludge from UASB reactor treating poultry wastes. Three copies of the reactors were fed with ZINDER medium, increased with sodium acetate, ethanol or sodium lactate and sodium sulfate, in order to get COD/sulfate ratio of 1,1-1,5. The headspace of the reactors was filled with N₂ (100%) and increased with oxygen (OD concentration of 3 – 3.5 mg/L). The anaerobic control reactors were fed with the same organics substrates, however, the headspace was filled with N₂/CO₂ (70/30%). The rates of methane production were 0.30 mmol/L.h, 0.41mmol/L.h and 0.16 mmol/L.h, in acetate, ethanol and lactate controls reactors, respectively. In oxygen reactors, the rates of methane production were 0.27 mmol/L.h, 0.40mmol/L.h and 0.08 mmol/L.h in acetate, ethanol and lactate reactors, respectively. The rates of sulfate reduction in acetate, ethanol and lactate reactors were 57% and 97%; 59.6% and 76.6%; 77.5% and 41.9%, respectively, in control reactors and oxygen reactors. In acetate and ethanol reactors, were verified predominance of *Archaea* Domain in control reactors (59.2% and 58.8%) and oxygen reactors (60.7% and 54.5%), respectively. In lactate control reactor also was verified predominance of *Archaea* Domain (56.2%), whereas in lactate oxygen reactors there was predominance of cells belonging to *Bacteria* Domain (63.9%). BRS ratio in acetate, ethanol and lactate control reactors and oxygen reactors corresponded to 22% and 17.3%; 28% and 16.9%; 19.5% and 21.9%, respectively. The addition of oxygen didn't inhibit the methanogenesis and sulfate reduction in acetate reactors and in ethanol reactors.

Keywords: sulfate reducing bacteria, methanogenic archaeas, oxygen, batch reactors and FISH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Fluxograma das atividades experimentais.....	28
Figura 4.2. Reatores em batelada.....	29
Figura 4.3. Lâmina de vidro revestida de teflon utilizada no FISH.....	39
Figura 5.1. Variação temporal da concentração de ácido acético nos reatores em batelada	43
Figura 5.2. Variação temporal da concentração de metano nos reatores contendo acetato, com oxigênio e controle.....	45
Figura 5.3. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto nos reatores contendo acetato e oxigênio.....	48
Figura 5.4. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto nos reatores controle contendo acetato.....	48
Figura 5.5. Morfologias observadas no inóculo sob microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência: (a) morfologia semelhante a <i>Methanosarcina</i> sp., (b) fluorescência de <i>Methanosarcina</i> sp., (c) filamentos e (d) bacilos com extremidades arredondadas.....	50
Figura 5.6. Composição da comunidade microbiana do inóculo. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios <i>Bacteria</i> (EUB338) e <i>Archaea</i> (ARC915) e BRS da subdivisão delta de <i>Proteobacteria</i> (SRB385) e soma dos dois Domínios (EUB338 + ARC915). As barras indicam o erro padrão.....	52
Figura 5.7. Morfologias hibridadas com a sonda EUB338: (a) células coradas com DAPI, (b) bacilo (seta branca) e cocos em forma de sarcina.....	53
Figura 5.8. Morfologias observadas em microscopia óptica de contraste de fase nos reatores controle contendo acetato (a-c) e com adição de oxigênio (d-f): (a) morfologias semelhantes a <i>Methanosarcina</i> sp., (b) cocos, (c) morfologias semelhantes a <i>Methanosaeta</i> sp., (d) filamentos segmentados, (e) cocobacilos, (f) bacilo curvo.....	56
Figura 5.9. Comunidade microbiana nos reatores controle e com oxigênio contendo acetato. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios <i>Bacteria</i> (EUB338) e <i>Archaea</i> (ARC915) e grupo das BRS da subdivisão delta de <i>Proteobacteria</i> (SRB385) e soma dos dois Domínios (EUB338 + ARC915). As barras indicam o erro padrão.....	57
Figura 5.10. Variação temporal da concentração de etanol nos reatores em batelada.....	61

Figura 5.11. Variação temporal da concentração máxima de metano nos reatores contendo etanol com oxigênio e controle.....	62
Figura 5.12. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto no biogás dos reatores contendo etanol e oxigênio.....	65
Figura 5.13. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto no biogás dos reatores controle contendo etanol.....	65
Figura 5.14. Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase nos reatores alimentados com etanol controle (a-b) e com oxigênio (c-d): (a) cocos e filamentos segmentados, (b) bacilo com extremidade arredondada e bacilo curvo, (c) <i>Methanosaeta</i> sp., (d) bacilos curvos.....	67
Figura 5.15. Comunidade microbiana nos reatores controle e com oxigênio contendo etanol. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios <i>Bacteria</i> (EUB338), <i>Archaea</i> (ARC915), BRS da subdivisão delta de <i>Proteobacteria</i> (SRB385) e soma dos dois Domínios (EUB338 + ARC915). As barras indicam o erro padrão.....	69
Figura 5.16. Variação temporal do ácido lático nos reatores em batelada.....	72
Figura 5.17. Variação temporal da concentração de metano nos reatores contendo lactato com oxigênio e controle.....	74
5.18. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto nos reatores contendo lactato e oxigênio.....	77
Figura 5.19. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto nos reatores controle contendo lactato.....	77
Figura 5.20. Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase nos reatores alimentados com lactato controle (a-b) e com oxigênio (c-d): (a) bacilos curvos semelhantes a <i>Desulfovibrio</i> sp., (b) bacilo curvo (seta preta), cocobacilos (seta vermelha) e filamento semelhante a <i>Methanosaeta</i> sp. (seta amarela), (c) cocos (seta preta) e bacilos com extremidades arredondadas (seta vermelha), (d) cocobacilos em pares (seta preta), bacilos com extremidades arredondadas (seta vermelha) e cocobacilos (seta amarela).....	80
Figura 5.21. Comunidade microbiana nos reatores controle e com oxigênio alimentados com lactato. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios <i>Bacteria</i> (EUB338), <i>Archaea</i> (ARC915), BRS da subdivisão delta de <i>Proteobacteria</i> (SRB385) e	

soma dos dois Domínios (EUB338 + ARC915). As barras indicam o erro padrão.....	81
Figura 5.22. Morfologias hibridadas com a sonda EUB338 nos reatores contendo lactato com oxigênio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Composição do meio basal Zinder.....	30
Tabela 4.2. Composição da solução traço de metais.....	31
Tabela 4.3. Composição da solução de vitaminas.....	31
Tabela 4.4. Composição dos reatores em batelada.....	33
Tabela 4.5. Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação fluorescente <i>in situ</i>	37
Tabela 4.6. Concentrações-estoque de cada sonda.....	38
Tabela 4.7. Protocolos de hibridação.....	41
Tabela 5.1. Relação DQO/sulfato, DQO inicial, potencial de oxi-redução, eficiência de remoção de DQO e sólidos totais voláteis dos reatores em batelada com acetato.....	43
Tabela 5.2. Velocidade máxima de produção de metano e concentração máxima de metano nos reatores alimentados com acetato de sódio.....	44
Tabela 5.3. Consumo de sulfato, início do tempo de detecção de sulfeto no biogás e concentração máxima de sulfeto nos reatores contendo acetato.....	47
Tabela 5.4. Caracterização morfológica do inóculo.....	51
Tabela 5.5. Porcentagens de microrganismos obtidos no inóculo por meio do FISH.....	52
Tabela 5.6. Morfologias das células predominantes no inóculo detectadas pelo FISH.....	52
Tabela 5.7. Caracterização morfológica dos reatores contendo acetato.....	54
Tabela 5.8. Porcentagens de microrganismos obtidos com o FISH nos reatores controle e com oxigênio contendo acetato.....	58
Tabela 5.9. Morfologias das células predominantes nos reatores contendo acetato, detectadas pelo FISH.....	58
Tabela 5.10. Relação DQO/sulfato, DQO inicial, potencial de oxi-redução, eficiência de remoção de DQO e sólidos totais voláteis dos reatores em batelada contendo etanol.....	60
Tabela 5.11. Velocidade máxima de produção de metano e concentração máxima de metano nos reatores contendo etanol.....	63
Tabela 5.12. Consumo de sulfato, início do tempo de detecção de sulfeto no biogás e concentração máxima de sulfeto nos reatores contendo etanol.....	64

Tabela 5.13. Morfologias observadas nos reatores contendo etanol.....	68
Tabela 5.14. Porcentagens de microrganismos obtidos com o FISH nos reatores controle e com oxigênio contendo etanol.....	69
Tabela 5.15. Morfologias das células predominantes nos reatores contendo etanol detectado por FISH.....	70
Tabela 5.16. Relação DQO/sulfato, DQO inicial, potencial de oxi-redução, eficiência de remoção de DQO e sólidos totais voláteis dos reatores em batelada contendo lactato de sódio.....	71
Tabela 5.17. Velocidade máxima de produção de metano e concentração máxima de metano nos reatores contendo lactato de sódio.....	73
Tabela 5.18. Consumo de sulfato, início do tempo de detecção de sulfeto no biogás e concentração máxima de sulfeto nos reatores contendo lactato de sódio.....	76
Tabela 5.19. Caracterização morfológica dos reatores contendo lactato.....	79
Tabela 5.20. Porcentagens de microrganismos obtidos com o FISH nos reatores controle e com oxigênio contendo lactato.	81
Tabela 5.21. Morfologias das células predominantes nos reatores contendo lactato detectadas pelo FISH.....	82
Tabela 5.22. Comparação dos resultados de produção de metano e consumo de sulfato dos reatores contendo acetato, etanol e lactato.....	84
Tabela 5.23. Comparação dos resultados obtidos com FISH, nos reatores contendo acetato, etanol e lactato.....	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. Influência do oxigênio no crescimento das bactérias redutoras de sulfato.....	16
3.2. Respostas comportamentais à exposição ao oxigênio.....	16
3.3. Influência do oxigênio no crescimento das arqueias metanogênicas.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Fluxograma experimental.....	27
4.2. Inóculo.....	28
4.3. Reatores em batelada.....	28
4.4. Meio basal Zinder.....	29
4.5. Solução de substratos orgânicos.....	32
4.5.1. Solução de acetato de sódio.....	32
4.5.2. Solução de lactato de sódio.....	32
4.5.3 Solução de etanol.....	32
4.6. Solução de sulfato de sódio.....	32
4.7. Inoculação dos reatores em batelada.....	32
4.8. Análises físico-químicas.....	33
4.8.1. Determinação de sulfato.....	33

4.8.2. Determinação do potencial de oxi-redução e oxigênio dissolvido.....	34
4.9. Análises cromatográficas.....	34
4.9.1. Determinação de metano e sulfeto.....	35
4.9.2. Determinação de ácidos orgânicos e álcool.....	35
4.10. Microscopia óptica.....	36
4.11. Hibridação fluorescente <i>in situ</i>	37
4.11.1. Preparação e fixação das amostras.....	38
4.11.2. Tratamento das lâminas de vidro.....	39
4.11.3. Hibridação.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Reatores em batelada contendo acetato de sódio.....	42
5.1.2. Caracterização microbiana.....	49
5.2. Reatores em batelada contendo etanol.....	59
5.2.1. Caracterização microbiana.....	66
5.3. Reatores em batelada contendo lactato de sódio.....	70
5.3.1. Caracterização microbiana.....	78
5.4. Comparação do desempenho dos reatores anaeróbios em batelada.....	84
6. CONCLUSÕES.....	87
7. RECOMENDAÇÕES.....	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICES.....	95
ANEXOS.....	113

1. INTRODUÇÃO

Apesar do desenvolvimento tecnológico dos processos anaeróbios de tratamento de efluentes, persiste ainda uma questão, relacionada ao desempenho dos reatores em função dos possíveis efeitos da entrada de oxigênio dissolvido. Acreditava-se que a possível presença de oxigênio dissolvido nos reatores anaeróbios causaria problemas nos sistemas, entretanto, muitos efluentes podem conter oxigênio dissolvido. Reatores como UASB (Reator Anaeróbio de Manta de Lodo) operam com altas cargas hidráulicas, desse modo, níveis elevados de oxigênio podem entrar no sistema (KATO et al., 1997).

Os compostos que são gerados na redução química e metabólica do oxigênio são altamente tóxicos e reativos (JENNEY Jr. et al., 1999). Segundo Madigan et al. (1997), as formas tóxicas do oxigênio incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íon hidroxila (OH^-).

Jenney Jr. et al. (1999) salientam que os compostos gerados na redução do oxigênio, também são tóxicos para os organismos aeróbios, entretanto estes possuem as enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase, que participam de mecanismos de proteção contra os efeitos tóxicos. Os mesmos autores sugerem, ainda, que os organismos anaeróbios geralmente não possuem essas enzimas, mas possuem uma outra enzima responsável pelo mecanismo de defesa; ou seja, a superóxido redutase.

De acordo com Madigan et al. (1997) e Jenney Jr. et al. (1999), foi observado em *Pyrococcus furiosus* a presença de uma enzima denominada de superóxido redutase, responsável pela remoção do ânion superóxido, por meio da sua redução a peróxido de hidrogênio, sem haver produção de oxigênio. O peróxido de hidrogênio seria clivado por enzimas peroxidase, que geram água como produto final (MADIGAN et al., 1997).

Todavia, os microrganismos variam quanto suas necessidades ou tolerância ao oxigênio. São divididos em vários grupos, dependendo dos efeitos do oxigênio. Os organismos aeróbios são capazes de crescer na concentração de saturação de oxigênio e muitas espécies toleram valores ainda mais elevados. Por outro lado, as arqueias metanogênicas são anaeróbias estritas e não crescem na presença de oxigênio.

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) representam outro grupo de microrganismos presentes nos processos biológicos de tratamento de efluentes. Por muitos anos, foi considerado um grupo de microrganismos anaeróbios e especializado, que utilizava quantidade limitada de

substratos, os quais eram oxidados, incompletamente. Entretanto, tal visão mudou drasticamente com as pesquisas realizadas por Widdel, a partir de 1981 e 1982. Esse autor descobriu representante que utilizava ampla variedade de substratos orgânicos os quais eram oxidados completamente. Nos dias de hoje, os estudos salientam que as BRS também reduzem diferentes fontes de enxofre, tais como sulfato, sulfito, tiosulfato e enxofre elementar, além de nitrato e nitrito (CYPIONKA, 2000). Além dessas possibilidades, alguns representantes do grupo BRS, como, por exemplo, *Desulfovibrio* que possui capacidade de reduzir oxigênio utilizando os mesmos substratos orgânicos usados na redução de sulfato, tais como hidrogênio, lactato, acetato, álcoois, entre outros. Além disso, conseguem oxidar compostos reduzidos de enxofre, como sulfeto, na respiração aeróbia. Os doadores de elétrons utilizados pelas BRS são, principalmente, compostos de baixa massa molecular e, muitos destes são produtos do processo de fermentação bacteriana da degradação de carboidratos, proteínas e outros compostos. Entretanto, os doadores de elétrons mais importantes são o hidrogênio, acetato, lactato e propionato (HOLMER e STORKHOLM, 2001).

Na presença de oxigênio, as BRS e arqueias metanogênicas, não apresentam crescimento celular, isto é, aumento de biomassa; entretanto, também não morrem pelo simples contato com oxigênio. A metanogênese e redução de sulfato podem ser inibidas na presença do oxigênio, todavia, quando este é esgotado do meio, a produção de metano e redução de sulfato voltam a ocorrer.

Portanto, este trabalho visou avaliar a dinâmica de produção de metano e redução de sulfato, além da proporção dos diferentes microrganismos (bactérias, arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato) em reatores de batelada contendo substratos orgânicos (acetato, etanol e sulfato) na presença e ausência de oxigênio. Desse modo, pretendeu-se contribuir com informações fisiológicas e bioquímicas desses microrganismos visando oferecer subsídios para entendimento do processo e aplicação da tecnologia anaeróbia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral dessa pesquisa foi analisar a influência do oxigênio na dinâmica de produção de metano, redução de sulfato e consumo de matéria orgânica em reatores contendo acetato de sódio, etanol e lactato de sódio, separadamente, na presença de sulfato, sob condições mesofílicas.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Verificar o consumo dos substratos orgânicos nos reatores anaeróbios em batelada controle e com adição de oxigênio;
- Avaliar a produção de metano e a redução de sulfato nos reatores em batelada;
- Caracterizar morfológicamente os microrganismos crescidos nos reatores em batelada, por meio de microscopia óptica de contraste de fase;
- Quantificar as populações microbianas nos reatores em batelada por meio da técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Influência do oxigênio no crescimento das bactérias redutoras de sulfato

Dilling e Cypionka (1990) estudaram a utilização de oxigênio por *Desulfovibrio desulfuricans*. Os organismos foram incubados em frascos contendo hidrogênio ou lactato como doadores de elétrons, ausência de sulfato e sulfeto, e apenas 50 μM de tiosulfato como fonte de enxofre. O *headspace* foi preenchido com 80% (v/v) de hidrogênio e 20% de CO_2 . Em intervalos, foi adicionado o total de 25 mL (1 mmol) de oxigênio no *headspace* nos frascos sob agitação. Os autores verificaram que 5 ou 10 mL de oxigênio foram consumidos em um ou dois dias, sem aumento da biomassa. Todavia, os autores não estavam certos se o oxigênio havia sido consumido na redução do tiosulfato a sulfeto, uma vez que o tiosulfato estava presente no meio em pequena concentração (50 μM).

Dannenberg et al. (1992) compararam a capacidade de respiração aeróbia com utilização de vários substratos orgânicos no crescimento de BRS provenientes de água doce e ambiente marinho. Foram utilizados como doadores de elétrons hidrogênio adicionado como gás no *headspace* (H_2/CO_2 80/20, v/v), lactato de sódio, piruvato, formiato, etanol, acetato, propionato e butirato. Sulfato de sódio (20 mM), nitrato (10 mM) e oxigênio foram utilizados como aceptores de elétrons. O oxigênio foi adicionado por meio da adição de tampão fosfato de potássio saturado de oxigênio contendo 1,17 mM de oxigênio.

Todas as 14 linhagens de BRS estudadas por Dannenberg et al. (1992) foram capazes de reduzir o oxigênio com pelo menos um substrato, sendo os mesmos normalmente utilizados na redução do sulfato. Assim, hidrogênio, formiato, lactato, piruvato, etanol, acetato, propionato, butirato como também sulfeto, tiosulfato e sulfeto foram os doadores de elétrons para a redução do oxigênio. Os organismos estudados também foram capazes de oxidar sulfeto, sulfeto e tiosulfato a sulfato, tendo comoceptor de elétrons o oxigênio. Os autores observaram também que a capacidade de redução do oxigênio foi mais freqüente nas BRS de água doce do que nas espécies marinhas, o que, segundo ainda os mesmos autores, pode ser uma adaptação à limitação de sulfato que ocorre em ambientes de água doce, mas não nos marinhos.

Marschall et al. (1993) demonstraram a influência do oxigênio na redução de compostos inorgânicos de enxofre em culturas puras de dez linhagens de BRS, e também a influência no

crescimento celular, viabilidade e mobilidade das células em culturas homogeneamente aeradas e com gradientes de oxigênio-sulfeto (estratificação de oxigênio e sulfeto).

Nos ensaios com culturas homogeneamente aeradas, os organismos foram cultivados em frascos de 500 mL, com meio contendo acetato (2 mM) e tiosulfato. O *headspace* foi preenchido com mistura de H₂/CO₂ (80/20, v/v) e adição de oxigênio com utilização de seringa. Os frascos permaneceram sob agitação e temperatura de 29°C. Os ensaios com gradiente de oxigênio-sulfeto foram realizados em tubos de vidro preenchidos até a metade com meio mineral sem adição de sulfato, contendo agar (0,36%, m/v), lactato (20 mM), resazurina (1 mg/L) e Na₂S (250 µM), inoculados com aproximadamente 10⁷ células/mL. A fase gasosa consistiu de 20% de dióxido de carbono e quantidades variadas de nitrogênio e oxigênio.

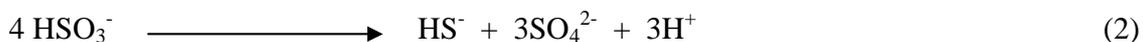
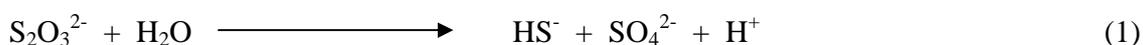
Nas culturas homogeneamente aeradas, a redução do sulfato, sulfito e tiosulfato foram sensíveis ao oxigênio em concentrações acima de 15 µM. Nessas condições não foi observada a formação de sulfeto. Nas culturas com a formação de gradiente de oxigênio-sulfeto, todas as espécies de BRS cresceram em pequenas colônias, formando faixas claras próximas à interface entre a região aerada e anaeróbia. Quanto ao aumento de biomassa, nas culturas homogeneamente aeradas somente três linhagens estudadas (*Desulfovibrio desulfuricans* Essex, *D. desulfuricans* CSN e *Desulfobacterium autotrophicum*) apresentaram pequeno crescimento celular. No ensaio com gradiente de oxigênio-sulfeto todas as linhagens estudadas apresentaram crescimento celular, isto é, aumento de biomassa.

Krekeler e Cypionka (1995) estudaram o crescimento de *Desulfovibrio desulfuricans* CSN utilizando sulfato, tiosulfato, sulfito, nitrito, nitrato e oxigênio como aceptores de elétrons. Os organismos foram cultivados em quimiostato contendo H₂/CO₂ (80/20, v/v), acetato (2 mM), sulfato (20 mM) e temperatura de 30°C.

Desulfovibrio desulfuricans catalisou a redução de seis diferentes aceptores de elétrons com hidrogênio como doador de elétrons. As maiores velocidades de redução foram observadas com o oxigênio como acceptor (1050 nmol elétrons transferidos/min.mg proteína), seguido por nitrato (680 nmol elétrons transferidos/min.mg proteína) e nitrito (410 nmol elétrons transferidos/min.mg proteína). Por outro lado, os diferentes compostos de enxofre (sulfato, sulfito e tiosulfato) apresentaram as menores velocidades, respectivamente de 140, 180 e 40 nmol elétrons transferidos/min.mg proteína. Os mesmos autores também observaram que na ausência de hidrogênio, sulfito e tiosulfato foram desproporcionados a sulfeto e sulfato. Além disso, o

sulfeto foi oxidado tendo nitrato e nitrito como doadores de elétrons, sulfato e amônia como produtos finais.

Segundo Madigan et al. (1997) a desproporção corresponde a clivagem de um composto em dois novos, onde um deles é mais oxidado que o substrato original, e o outro, mais reduzido. As reações (1) e (2) mostram a desproporção do tiosulfato e sulfito, respectivamente, gerando sulfato e sulfeto como produtos. Essas reações foram extraídas de Dilling e Cypionka (1990).



Em estudo realizado com biomassa microbiana do Lago Solar (Sinai), Krekeler et al. (1997) isolaram nova espécie de BRS, *Desulfovibrio oxyclinae* que na presença de oxigênio (adição de 30 μM) apresentou respiração aeróbia, com velocidade de 260 nmol $\text{O}_2/\text{minuto.mg}$ proteína. Tal velocidade foi a maior encontrada para respiração aeróbia de BRS marinhas. Além disso, *D. oxyclinae* oxidou hidrogênio, lactato, sulfeto e sulfito na presença de oxigênio. Sob condições anaeróbias apresentou crescimento celular com sulfato, sulfito e tiosulfato como aceptores de elétrons utilizando hidrogênio, lactato, piruvato, etanol, propanol e butanol como doadores de elétrons. Na ausência de doadores de elétrons o organismo isolado apresentou crescimento celular por meio da desproporção do sulfito ou tiosulfato a sulfato e sulfeto e fermentação do piruvato. O DNA da amostra foi extraído e o gene do RNAr 16S foi amplificado por PCR (Reação de Polimerase em cadeia), em seguida o produto da PCR foi seqüenciado. Com base na árvore filogenética resultante, a linhagem estudada pertenceu a *Desulfovibrio* sp., sendo considerada uma nova espécie, denominada *Desulfovibrio oxyclinae*.

Sass et al. (1997) isolaram 28 linhagens de BRS de sedimento do Lago Stechlin, localizado próximo a Berlim. Dessas, 14 foram isoladas de sedimento coletado a 50 cm de profundidade e 15 linhagens de sedimento coletado a 32 m. Para avaliação do consumo dos substratos orgânicos, os organismos foram incubados em tubos fechados contendo meio de cultura e doadores de elétrons em concentrações entre 5 mM e 20 mM, e 10 mM de aceptores de elétrons. Foram utilizados como doadores de elétrons hidrogênio, formiato, lactato, etanol,

fumarato, malato, metanol, acetato e propionato, e como aceptores de elétrons sulfato, tiosulfato e nitrato. A respiração aeróbia e redução de sulfato foram analisadas por meio de microeletrodos e o crescimento celular por meio da turbidez (absorbância).

Os autores observaram que das 13 linhagens isoladas do sedimento coletado a 50 cm de profundidade, 12 possuíam características típicas de *Desulfovibrio* sp., ou seja, presença de desulfovirdina, células móveis e capacidade de utilizar hidrogênio e lactato. Em amostras coletadas a 32 m de profundidade, foram observados organismos semelhantes a *Desulfovibrio* sp., além de *Desulfotomaculum orientis*, que foi identificado pela sua capacidade de oxidar metanol e formar endósporos. A maior parte das linhagens isoladas do sedimento coletado a 50 cm de profundidade (12 linhagens) foi capaz de realizar redução do oxigênio, utilizando principalmente hidrogênio, formiato e lactato. O mesmo foi observado com as linhagens isoladas do sedimento a 32 m de profundidade; ou seja, das 15 linhagens, 12 também reduziram oxigênio utilizando hidrogênio, lactato e formiato. Ainda na presença de oxigênio, 12 das 28 linhagens estudadas realizaram a oxidação de sulfeto, sulfito e tiosulfato a sulfato, utilizando oxigênio como aceptor de elétrons. A Redução de sulfato não foi observada na presença de oxigênio.

Sigalevich e Cohen (2000) realizaram estudo para observar o crescimento de *Desulfovibrio oxyclinae* em co-cultura com *Marinobacter* sp. Tal experimento foi realizado em fermentador de 0,45 litro, com lactato (19 mM), sulfato (8 mM), pH $7,4 \pm 0,2$ e temperatura de 35°C. Os experimentos foram realizados em três diferentes condições de crescimento: (1) em condições anaeróbias na presença de sulfato (8 mM), (2) em condições microaeróbias (5% de oxigênio) na presença de sulfato (8 mM) e (3) em condições microaeróbias (5% de oxigênio), sem adição de sulfato. A quantificação de *D. oxyclinae* na co-cultura foi realizado por meio do FISH. Na condição 1, todo sulfato adicionado foi consumido; os substratos orgânicos lactato, acetato e citrato não foram totalmente consumidos; e ocorreu predominância de *D. oxyclinae*, correspondendo a 86% do total de células na co-cultura. Na condição 2, somente 55% do sulfato foi consumido; acetato também não foi totalmente consumido; em contrapartida, oxigênio, lactato e citrato foram totalmente consumidos; e a proporção de *D. oxyclinae* na co-cultura foi de 69,5%. Na condição 3, o oxigênio do meio também foi todo consumido; além dele, lactato, citrato e acetato também foram consumidos. Nessa última condição, a proporção de *D. oxyclinae* na co-cultura foi de $34,4 \pm 1,9\%$ e a velocidade de crescimento de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Os autores mencionaram que devido ao fato de *D. oxyclinae* ser incapaz de oxidar acetato e citrato, provavelmente, o

consumo desses substratos foi realizado por *Marinobacter* sp. Além disso, provavelmente o crescimento celular de *D. oxyclinae* ocorreu devido à energia obtida da respiração aeróbia devido ao fato do oxigênio ser o único aceptor de elétrons disponível na condição 3, isto é, na ausência de sulfato.

Fareleira et al. (2003) estudaram a influência do oxigênio no crescimento de *Desulfovibrio gigas*, com objetivo de conhecer suas estratégias de sobrevivência sob tais condições. Os organismos foram cultivados em frascos de dois litros, contendo meio com lactato (5 mM) e sulfato, mantidos a 35°C sob atmosfera contínua de gás argônio (cultura controle) e atmosfera de ar e gás argônio. O consumo de lactato foi totalmente inibido com adição de oxigênio. Quando a atmosfera era constituída de argônio o consumo foi de 7,4 nmol/min.mg massa seca, com a adição do oxigênio esse valor decaiu para zero.

No mesmo trabalho, Fareleira et al. (2003) submeteram organismos na fase exponencial, cultivados em meio contendo lactato, sulfato e concentrações de oxigênio iguais a 5, 10, 20, 40 e 120 μM durante oito horas. Ensaio controle foram realizados com culturas mantidas sob atmosfera de gás argônio. Com a adição do oxigênio o crescimento cessou, isto é, a concentração de proteína tornou-se constante. Entretanto, a partir do momento em que a atmosfera tornou-se anaeróbia, as células voltaram a se multiplicar, com velocidade de crescimento igual a $0,14 \text{ h}^{-1}$, valor que correspondeu a 70% do valor médio encontrado nas culturas controles, que não foram expostas ao oxigênio ($0,2 \text{ h}^{-1}$).

Kjeldsen et al. (2004) estudaram a tolerância das BRS ao oxigênio em sistemas de lodos ativados através da velocidade de redução de sulfato e quantificação dos organismos (NMP). Dois ensaios foram realizados, sendo o primeiro sob condições aeradas, por curto período de tempo, enquanto o segundo por longo período. No primeiro experimento, amostras coletadas do tanque de lodos ativados durante a fase anóxica, foram colocadas em frascos aerados com ar estéril ($0,2 \mu\text{M}$) com 100% de saturação de oxigênio durante 40 minutos. No segundo ensaio, os frascos foram mantidos sob aeração por período de 121 h e amostras foram retiradas no tempo zero e em 3, 9, 33, 73 e 121 h para as análises.

No primeiro experimento, a redução de sulfato iniciou-se imediatamente após a incubação dos frascos, tanto no ensaio com oxigênio quanto no controle, sem oxigênio. As velocidades de redução do sulfato observadas também foram semelhantes nos frascos aerados e no controle, com valores iguais a 2,2 e 2,1 $\mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{h}$, respectivamente. No segundo experimento, a velocidade de

redução de sulfato diminuiu com o aumento do tempo de exposição ao oxigênio; ou seja, 0,24 $\mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{h}$ em 3 h até 0,04 $\mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{h}$ em 121 h. Entretanto, a quantidade de BRS durante todo o período de aeração (121 h) se manteve constante, em torno de 10^6 células/mL, o que indicou que a diminuição da velocidade de redução de sulfato ocorreu devido a inativação metabólica temporária de grande parte da população de BRS presente na amostra (KJELDSEN, et al. 2004). Para os autores essa inativação metabólica ocorre em resposta ao *stress* causado por algum fator, no caso a presença de oxigênio.

Os autores (Op. cit.) constataram ainda, que a população de BRS no sistema de lodos ativados foi de 10^6 - 10^7 células/mL, enquanto que, o total de células encontradas ultrapassou o valor de 10^9 células/mL. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, provavelmente, as BRS estavam adaptadas ao oxigênio devido a capacidade de recuperação da redução de sulfato após a exposição a curtos períodos de tempo.

3.2. Respostas comportamentais à exposição ao oxigênio

As BRS também exibem respostas comportamentais em relação à presença de oxigênio (Cypionka, 2000). Segundo o mesmo autor, três diferentes respostas podem ser observadas: agregação celular, migração para ambientes sem oxigênio e formação de faixas na interface aeróbia-anaeróbia de lagos, rios e mar (CYPIONKA, 2000).

Johnson et al. (1997) realizaram estudo para verificar aerotaxia em *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, sob concentrações crescentes de oxigênio (0,02 a 0,12%). Para tal experimento, os autores utilizaram tubos fechados para cultura contendo 15 mL de meio e mistura gasosa de oxigênio, combinada com $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{N}_2$, nas proporções 10/10/80%. Essa mistura gasosa foi adicionada constantemente nos tubos de cultura durante todo o ensaio. Os autores observaram que com porcentagens reduzidas de oxigênio (0,02 a 0,04%), *D. vulgaris* moveram-se em direção ao local onde havia oxigênio e realizaram respiração aeróbia. Os mesmos autores acreditam que essa aerotaxia apresentada por *D. vulgaris* foi primordialmente um mecanismo de defesa contra a intrusão de oxigênio no meio anaeróbio.

Krekeler et al. (1998) isolaram de biomassa cianobacteriana do Lago Solar (Sinai) 4 linhagens de BRS pertencentes a *Desulfovibrio*, identificadas como D22, N13, N33 e N24. A biomassa foi dividida em duas partes, de acordo com a profundidade, a primeira de 0 - 3 mm e outra de 3 - 6 mm. A camada superior (0 - 3 mm) permaneceu oxigenada durante o dia e

anaeróbia à noite. Todavia, a camada inferior (3 – 6 mm) permaneceu anaeróbia durante dia e noite. As linhagens foram cultivadas em meio contendo lactato (10 mM), 1 mM de FeSO_4 e 1 mM de tioglicolato. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos de NMP, os quais foram incubados a 30°C por três meses. A difusão de oxigênio para dentro dos tubos foi permitida pela utilização de tampas de borracha permeáveis.

A quantidade de BRS na camada superior foi 100 vezes menor durante o dia (10^4 células/mL) que à noite (10^6 células/mL), enquanto que, na camada inferior, esse valor foi maior durante o dia (10^6 células/mL) e menor à noite (10^5 células/mL). Segundo os autores, tal fato indicou que as BRS da camada superior migraram para a camada inferior durante o dia por causa do gradiente de oxigênio, ou os organismos formaram agregados celulares na camada superior, ocasionando menor concentração de organismos nesta camada.

Krekeler et al. (1998) observaram também formação de faixas de organismos (pertencentes a linhagem N13) ao redor das bolhas de oxigênio, localizadas na interface aeróbia-anaeróbia. Com o passar do tempo de incubação, os autores observaram que as bolhas tornaram-se menores, indicando consumo do oxigênio.

Teske (1998) investigou a presença de BRS em biomassa cianobacteriana e suas relações com o oxigênio presente no ambiente. Amostras da biomassa foram coletadas do Lago Solar (Sinai, Egito), à profundidade de 0,6 a 0,7 m. Estas foram utilizadas para ensaios de NMP para quantificação das BRS e para medição das velocidades de redução de sulfato. A biomassa foi dividida em camadas de 0-2, 2-4, 4-7, 7-10 e 10-13 mm, para melhor distinção da profundidade da mesma.

Com base no método do NMP, o autor encontrou população ativa de BRS durante o dia na zona oxigenada (0-2 mm) estimada em $4,5 \times 10^6$ células/mL e elevadas velocidades de redução de sulfato (2,207 nmol de SO_4^{2-} /mL.dia). Portanto, o oxigênio não inibiu significativamente a redução de sulfato, uma vez que o valor encontrado correspondeu a 70% da maior velocidade de redução de sulfato encontrada na biomassa cianobacteriana (TESKE, 1998).

Segundo o autor (Op. cit.), essa elevada atividade da população de BRS na zona oxigenada sugeriu que essas bactérias desenvolveram estratégias adaptativas para crescerem na presença de oxigênio, o que incluiu a respiração com oxigênio, mobilidade e formação de agregados e co-culturas.

Eschemann et al. (1999) analisaram a aerotaxia de *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfovibrio oxyclinae*, em relação à presença de oxigênio. Os organismos foram cultivados em meio contendo lactato (20 mM) e sulfato (20 mM), a 30°C. Resazurina (1 µM) foi adicionada como indicador do potencial redox e solução redutora de ditionito de sódio. A aerotaxia foi observada em tubos capilares, os quais foram preenchidos com o meio, células suspensas e 5 µL de oxigênio introduzido com auxílio de seringa Hamilton. Os autores observaram a formação de faixas de BRS (agregados celulares) ao redor das bolhas de oxigênio. As células presentes no interior da faixa tornaram-se rosa devido ao potencial redox oxidado, enquanto que as células presentes na parte externa permaneceram transparentes, devido ao potencial redox reduzido. O oxigênio das bolhas foi totalmente consumido durante a noite, restando apenas pequena bolha, provavelmente de nitrogênio. A formação das faixas dependeu da presença de um doador de elétrons e do oxigênio, ou seja, em ensaios realizados sem a adição de lactato não houve a formação das faixas ao redor das bolhas de oxigênio.

Ainda no mesmo estudo, em experimento controle, sem adição de oxigênio, somente sob atmosfera de nitrogênio, não houve a formação das faixas. Em relação à mobilidade, Eschemann et al. (1999) verificaram que *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfovibrio oxyclinae* quando expostas ao oxigênio, não se locomoveram em direção à zona anaeróbia, como era esperado para organismo anaeróbio estrito. Ao invés disso, acumularam-se na zona oxigenada, na qual a concentração de oxigênio era de 20% (50 µM) do ar saturado. Segundo os autores, esse comportamento foi relacionado com a estratégia para remover o oxigênio do meio e restabelecer a condição anaeróbia.

3.3. Influência do oxigênio no crescimento das arqueias metanogênicas

Lens et al. (1994) avaliaram a produção de metano em reator aeróbio (biofiltros, lodos ativados e de discos rotativos) e anaeróbio (reator de fluxo ascendente e manta de lodo - UASB). Um dos reatores de lodos ativados era aerado com oxigênio puro (40 mg/L de OD) e outro com ar. Os ensaios foram realizados em tubos de 20 mL, preenchidos com meio basal, acetato de sódio (200 mg/L) e *headspace* preenchido com H₂/CO₂ (80/20%) para favorecer o crescimento de arqueias metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas.

Segundo Lens et al. (1994), foi verificada produção de metano, após duas semanas de incubação, nos frascos inoculados com biomassa dos lodos ativados, biofiltro e discos rotativos.

Entretanto, a velocidade de produção de metano nesses frascos correspondeu a menos de 1% da velocidade observada no UASB ($40666 \pm 2082 \mu\text{L CH}_4/\text{g SV.d}$). Somente nos frascos inoculados com biomassa retirada do reator de lodos ativados com oxigênio puro não foi verificada produção de metano, mesmo após dois meses de operação. Os autores atribuíram a existência de arqueias metanogênicas em reatores aeróbios à existência de micronichos anaeróbios, tais como biofilmes e flocos, uma vez que oxigênio consegue penetrar até $100 \mu\text{m}$ no biofilme, além da versatilidade fisiológica desses organismos.

Zitomer (1997) estudou a conversão de substrato orgânico por culturas mistas de bactérias aeróbias e arqueias metanogênicas, na presença de oxigênio. Os ensaios em batelada foram realizados em frascos de 160 mL, contendo meio basal, propionato e etanol como substratos orgânicos. Lodo anaeróbio proveniente de estação de tratamento de esgoto sanitário foi utilizado como inóculo, sendo adicionado 50 mL em cada frasco. Resazurina foi utilizada como indicador do potencial redox. O *headspace* foi preenchido com gás metano. Para cada substrato utilizado, um reator foi mantido anaeróbio, como controle; outro recebeu 10 mL de ar por dia (com auxílio de seringa) e outro recebeu 30 mL de ar por dia. Os reatores foram incubados a 35°C , sob agitação, no escuro.

Zitomer (1997) observou que os organismos mantiveram-se em suspensão, e não formando flocos ou aglomerados que poderiam formar micronichos anaeróbios para as arqueias metanogênicas. Os autores também observaram que nos primeiros trinta minutos após adição do oxigênio, o potencial redox dos frascos estava oxidado (resazurina com coloração rosa), indicando presença do oxigênio. Entretanto, após esse período, o potencial redox tornou-se reduzido (resazurina tornou-se transparente), restando de 0,6 a 1% de oxigênio no *headspace*. O autor atribuiu o consumo do oxigênio à presença de bactérias aeróbias que oxidam metano (metanotróficas). Com relação à remoção de DQO, o autor observou que cerca de 45 a 95% foi removida por metanogênese. Assim, o autor concluiu que as arqueias metanogênicas não morrem na presença de oxigênio, todavia seu crescimento pode ser inibido. Após o consumo do oxigênio por organismos aeróbios, as arqueias metanogênicas passam a reduzir o substrato orgânico produzindo metano.

Zitomer e Shrout (1998) estudaram a metanogênese e a redução do oxigênio em culturas mistas. O inóculo utilizado foi oriundo de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgoto sanitário. Os autores usaram frascos de soro de 160 mL, nos quais foram adicionados 50 mL de

inóculo, 10 mL de meio contendo sacarose (5-80 g/L), amônia, fósforo, nutrientes e resazurina. Gás metano foi adicionado nos frascos e fechados em seguida. A cada dois dias 10 mL de cultura eram retiradas e mesmo volume de meio novo adicionado. Duas condições de adição de oxigênio nos frascos foram testadas. Na primeira condição, o oxigênio foi adicionado no momento da adição do meio nos reatores, definido como ensaio com culturas aeróbias/anaeróbias. Na segunda condição, o oxigênio foi adicionado no dia seguinte da adição do meio, portanto, foi denominado ensaio com culturas anaeróbias/aeróbias. O oxigênio foi adicionado por meio de seringa, em volumes iguais a 4, 12 e 48 mL, a cada dois dias. Um reator controle foi mantido sob condições anaeróbias. Todos os reatores foram mantidos a 35°C, sob agitação, no escuro.

Zitomer e Shroul (1998) observaram que nos reatores controle e naqueles com 4 e 12 mL de oxigênio, a resazurina ficou transparente (potencial redox reduzido) e, portanto, não indicou a sua presença no meio. Apenas durante os primeiros trinta minutos após a adição do oxigênio, a resazurina apresentou coloração rosa (potencial redox oxidado), indicando presença do mesmo. Em contrapartida, nos reatores onde foram adicionados 48 mL de oxigênio, a solução permaneceu rosa (potencial redox oxidado). A atividade metanogênica específica foi calculada, e os maiores valores foram encontrados nos frascos com 48 mL de oxigênio (1,2 mL biogás/g SSV. d), enquanto nos reatores com 4 mL de oxigênio, foi observado atividade de 0,8 mL biogás/g SSV. d. Embora nos reatores com 48 mL de oxigênio terem sido observados os maiores valores de atividade metanogênica específica, a quantidade produzida de metano foi menor (15 mL), comparando-se com os reatores com 4 mL de oxigênio, nos quais foram produzidos 20 mL de metano. Os autores atribuem a menor quantidade de metano nos frascos com maior quantidade de oxigênio à oxidação do metano por bactérias metanotróficas, que são organismos aeróbios.

Zitomer e Shroul (1998), ainda no mesmo estudo, não observaram a presença de grânulos, flocos ou qualquer tipo de aglomerado celular que poderiam formar micronichos anaeróbios para as metanogênicas. Eles acreditam que na presença do oxigênio ocorreu oxidação aeróbia de intermediários como ácido propiônico, ácido acético e hidrogênio. Assim, a menor concentração desses intermediários no sistema pode explicar a maior atividade dos organismos metanogênicos nos reatores com oxigênio.

Estrada-Vázquez et al. (2003) avaliaram a influência da concentração de substrato orgânico (sacarose) na resistência ao oxigênio de biomassa metanogênica suspensa. O lodo utilizado foi retirado de reatores contínuos, em escala de bancada, alimentados com água

residuária sintética contendo 25 g/L de DQO. Os reatores foram alimentados com várias concentrações de sacarose (0, 1, 2 e 4 g/L de DQO), sob proporções crescentes de oxigênio no *headspace* (0; 2,5; 5; 10; 20; 50 e 70% v/v). Foram utilizados frascos de soro de 160 mL, como reatores, com 60 mL de volume reacional e 100 mL de *headspace*. Os reatores foram incubados a 35°C, sob agitação de 80 rpm, durante três dias. Após esse período, o meio foi trocado por outro contendo acetato de sódio 30 mmol/L e o *headspace* preenchido com N₂/CO₂ (4/1), para determinação da atividade metanogênica específica. Os autores calcularam a taxa de recuperação do lodo (R) após a incubação com oxigênio, pela divisão entre a atividade metanogênica específica da cultura após exposição ao oxigênio, pela atividade metanogênica específica do controle, em porcentagem.

Os autores (Op. Cit.) verificaram que o aumento da concentração de sacarose aumentou significativamente a resistência do lodo ao oxigênio. A taxa de recuperação (R) atingiu 95% para concentrações de 1 e 2 g/L de sacarose. Estrada-Vázquez et al. (2003) observaram também que a exposição ao oxigênio em culturas sem adição de sacarose afetou drasticamente a produção de metano. Nos reatores controle a concentração máxima de metano chegou a 0,08 mmol/reator, enquanto que nos frascos com oxigênio foi observado 0,01 mmol/reator. Nos ensaios com adição de 2 e 4 g/L de sacarose, o efeito do oxigênio na produção de metano foi menor. Em proporções menores de oxigênio (0; 2,5 e 5%), as concentrações observadas de metano foram semelhantes a dos reatores controle. Os autores concluíram que organismos facultativos presentes nos sistemas utilizaram o substrato orgânico na respiração aeróbia, retirando oxigênio do meio, evitando assim, a inibição das arqueias metanogênicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fluxograma experimental

Na realização dos experimentos foi utilizado como inóculo lodo granular proveniente de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves. Foram utilizados reatores em batelada, contendo meio basal ZINDER, acrescido de solução de metais traço, vitaminas, substratos orgânicos (acetato de sódio, etanol e lactato de sódio) e solução de sulfato de sódio, como fonte de enxofre. As concentrações dos substratos orgânicos e do sulfato de sódio foram calculadas para se obter a relação DQO/sulfato de aproximadamente 1,1-1,5. Tal relação foi escolhida para favorecer a sulfetogênese.

Os reatores foram alimentados com acetato de sódio (757,7 mg/L)/sulfato de sódio (960 mg/L), etanol (540,6 mg/L)/sulfato de sódio (967 mg/L) e lactato de sódio (922,5 mg/L)/sulfato de sódio (860 mg/L). Nesses reatores foi borbulhado oxigênio puro comercial no meio líquido para se obter concentração de oxigênio dissolvido de aproximadamente 3,0 - 3,5 mg/L, o que corresponde a aproximadamente metade da concentração de saturação do oxigênio na água a 25°C, cujo valor é de aproximadamente 8 mg/L. Os reatores controle anaeróbios também foram alimentados com acetato de sódio (874,5 mg/L)/sulfato de sódio (950 mg/L), etanol (454,9 mg/L)/sulfato de sódio (907 mg/L) e lactato de sódio (1010,3 mg/L)/sulfato de sódio (920 mg/L) e submetidos a atmosfera gasosa de N₂/CO₂ (70/30%). Todos os reatores permaneceram sob agitação de 150 rpm e temperatura de 25°C.

Os reatores em batelada, controle e com oxigênio, foram operados durante 960 h, 816 h e 768 h, com os substratos orgânicos acetato de sódio, etanol e lactato de sódio, respectivamente.

Para o acompanhamento das atividades microbianas foram realizadas análises físico-químicas (sulfato, potencial redox, OD e DQO), análises cromatográficas (metano, sulfeto e ácidos orgânicos) e exames microscópicos de contraste de fase, fluorescência e FISH. A Figura 4.1 mostra o fluxograma das atividades experimentais.

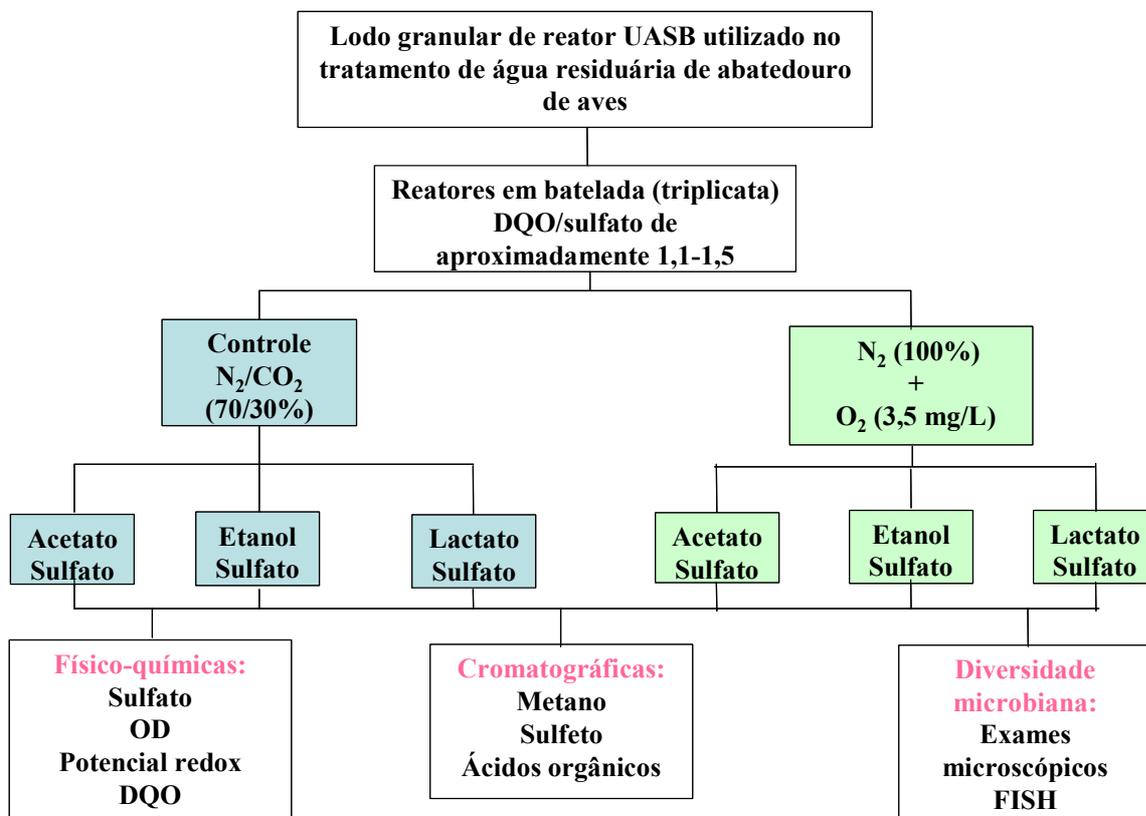


Figura 4.1 Fluxograma das atividades experimentais.

4.2. Inóculo

O inóculo utilizado foi proveniente de reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dacar S/A, Tietê, SP). O lodo foi mantido sob refrigeração a 4°C até sua utilização. Antes de ser adicionado ao reator, o inóculo foi lavado em água destilada, homogeneizado em liquidificador e realizado a análise de sólidos totais voláteis (STV), de acordo com APHA (1998). Foram utilizados 7% (v/v) de inóculo em cada reator.

4.3. Reatores em batelada

Os reatores anaeróbicos para os ensaios em batelada com células planctônicas foram preparados, em triplicata, em frascos Duran de 2 L, fechados com tampas de borracha de butila e rosca plástica (Figura 4.2). Os mesmos foram mantidos sob agitação de 150 rpm (DOMINGUES, 2001) e temperatura controlada de 25°C. A triplicata consistiu da utilização de três reatores em cada condição estudada.

Utilizou-se o meio basal Zinder acrescido de solução traço de metais (ZINDER et al. 1984) e de vitaminas (WIDDEL e PFENNING, 1984), alimentados com acetato de sódio, etanol, lactato de sódio e sulfato de sódio sob atmosfera de oxigênio puro comercial, adicionado com auxílio de pedra microporosa. Os reatores controle também foram alimentados com os mesmos substratos orgânicos e fonte de enxofre, entretanto, submetidos a atmosfera de N_2/CO_2 (70/30%). O volume total da solução foi de 1200 mL e do *headspace* de 800 mL.



Figura 4.2 Reator em batelada

4.4. Meio Basal Zinder

Foi utilizado no cultivo dos microrganismos o meio basal Zinder (ZINDER et al. 1984). O meio de cultivo foi preparado pela dissolução dos seus componentes em água ultrapurificada, na ordem apresentada na Tabela 4.1. Após o preparo, o meio permaneceu sob atmosfera de nitrogênio (100%) durante 20 minutos e distribuído em frascos Duran de 2 L. Em seguida, os frascos foram fechados com tampa de butila e roscas plásticas, esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm, durante 20 minutos, e estocados à temperatura ambiente na ausência de luz.

A solução traço de metais foi preparada pela dissolução inicial de Tritriplex em água ultrapurificada e seu pH ajustado para 7,0 com solução de KOH 10 M. Em seguida, os demais componentes foram acrescentados na solução na ordem apresentada na Tabela 4.2. Após o

preparo, a solução foi distribuída em frascos de antibiótico, esterilizada em autoclave a 121°C e 1 atm, durante 20 minutos, e mantida sob refrigeração (4°C) no escuro.

Tabela 4.1. Composição do meio basal Zinder.

Componentes	Quantidades – Q.S.P. 1000 mL de Água Ultrapurificada
NH ₄ Cl	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,4g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05g
Solução Traço de Metais	10,0 mL

Fonte: ZINDER et al. (1984).

Acrescentou-se também ao meio de cultivo solução de bicarbonato de sódio (10%) e solução de vitaminas. Foi utilizado 12 mL de solução de bicarbonato e 12 mL de solução de vitaminas, para 1072 mL, 1087 mL e 1085 mL de volume reacional, nos reatores contendo acetato, etanol e lactato, respectivamente.

A solução de bicarbonato de sódio (10%) foi preparada pela dissolução do respectivo sal em água ultrapurificada, previamente fervida e resfriada a 50°C, mantida por 20 minutos sob fluxo de nitrogênio (100%), esterilizada por filtração rápida pelo sistema Millipore, com filtro de membrana de 0,22 µm de porosidade, sob condições de assepsia. Todo material utilizado foi previamente autoclavado a 121°C e 1 atm, durante 20 minutos. Em seguida, a solução foi distribuída em frascos de antibiótico, fechados com batoques de borracha de butila, lacrados com selos de alumínio e mantidos em temperatura ambiente na ausência de luz.

A solução de vitaminas foi preparada pela dissolução dos componentes em água ultrapurificada na ordem apresentada na Tabela 4.3. A solução foi distribuída em frascos apropriados sob atmosfera de N₂ (100%). A solução foi esterilizada nas mesmas condições da solução de bicarbonato de sódio (10%) e mantida no escuro sob refrigeração (4°C).

Tabela 4.2. Composição da solução traço de metais.

Componentes	Quantidades – Q.S.P. 1000 mL de Água Ultrapurificada
Tritriplex III	4,5 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,556 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,086 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,21 g
H ₃ BO ₃	0,19 g
NiCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g

Fonte: ZINDER et al. (1984).

Tabela 4.3. Composição da solução de vitaminas.

Componentes	Quantidades – Q.S.P. 1000 mL de Água Ultrapurificada
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina . HCl.2H ₂ O	0,005 g
Piroxidina HCl	0,01 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantotenato de cálcio	0,0001 g
Vitamina B ₁₂	0,0001 g
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,005
Ácido lipóico	0,005 g

Fonte: WIDDEL e PFENNING (1984).

4.5. Solução de substratos orgânicos

Foram utilizados substratos orgânicos como acetato de sódio, lactato de sódio e etanol, separadamente, nos reatores em batelada, com sulfato de sódio.

4.5.1. Solução de acetato de sódio

A solução de acetato de sódio (60 g/L) foi preparada pela dissolução do respectivo sal em água ultrapurificada, distribuída em frascos de antibiótico sob fluxo de nitrogênio (100%), fechados com batoques de borracha de butila, lacrados com selos de alumínio. Os frascos foram esterilizados a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Os frascos foram armazenados à temperatura ambiente, na ausência de luz.

4.5.2. Solução de lactato de sódio

A solução de lactato de sódio (180 g/L) foi preparada através da reação de neutralização de ácido láctico 4 M e hidróxido de sódio 4 M. O pH da solução final foi ajustado para 9,8 utilizando-se a solução de hidróxido de sódio 4 M. A solução foi mantida e distribuída em frascos de antibiótico sob fluxo de nitrogênio (100%), esterilizada a 121°C e 1 atm, por 20 minutos, e armazenada à temperatura ambiente, na ausência de luz.

4.5.3. Solução de etanol

A solução de etanol foi preparada pela adição de 9,10 mL de etanol em 50 mL de água ultrapurificada estéril. Essa solução foi preparada no momento da utilização nos reatores em batelada. Utilizou-se etanol Merk com 99,9% de pureza.

4.6. Solução de sulfato de sódio

O sulfato de sódio foi adicionado diretamente nos reatores em batelada na quantidade de 1,35g, valor calculado para se obter a concentração de aproximadamente 960 mg/L de sulfato nos reatores.

4.7. Inoculação dos reatores em batelada

Os reatores em batelada foram preenchidos com meio Zinder, solução de bicarbonato de sódio, solução de vitaminas e os substratos orgânicos (acetato de sódio, etanol e lactato de sódio),

separadamente. A Tabela 4.4 mostra as quantidades das soluções adicionadas nos reatores. Os reatores controle tiveram *headspace* preenchido com mistura de N₂/CO₂ (70/30%) e os reatores com oxigênio tiveram seu *headspace* primeiramente fluxionado com N₂ (100%), em seguida, oxigênio puro comercial foi borbulhado no meio líquido, utilizando-se pedra microporosa Alltech Hastaloy, de 2 µm de porosidade, até obter-se a concentração de oxigênio dissolvido de 3-3,5 mg/L.

Tabela 4.4. Composição dos reatores em batelada.

Soluções	Reatores		
	Acetato de Sódio	Etanol	Lactato de sódio
Meio Zinder (mL)	1072	1087	1085
Solução de			
Bicarbonato de	12	12	12
Sódio (10%) (mL)			
Solução de			
Vitaminas (mL)	12	12	12
Sulfato de Sódio (g)	1,35	1,35	1,35
Substrato Orgânico			
(mL)	20	5	6,6
Inóculo (mL)	84	84	84

4.8. Análises físico-químicas

Foi realizado o acompanhamento temporal das concentrações de sulfato e demanda química de oxigênio (DQO) inicial e final, em amostras filtradas em membrana de fibra de vidro de 1,2 µm. As análises de OD e potencial de oxi-redução foram realizadas no início e final dos experimentos, de acordo com os métodos descritos em APHA (1998).

4.8.1. Determinação de sulfato

O acompanhamento temporal da utilização do sulfato foi realizado por método espectrofotométrico, utilizando-se o *Kit SULFAVER® 4* (SULFATE REAGENT-HACH),

através do qual o íon sulfato foi precipitado em meio ácido com cloreto de bário realizando-se a leitura de absorbância em 450 nm (APHA, 1998).

Amostras foram coletadas dos reatores em batelada com seringa esterilizada, sob condições de assepsia, centrifugadas a 10000 rpm e filtradas em membrana de fibra de vidro de 1,2 µm de porosidade. Alíquotas de 2,5 mL das amostras foram diluídas em 50 mL de água destilada para a leitura da absorbância. Para a leitura do branco foram utilizadas as mesmas amostras diluídas, mas sem a precipitação com o cloreto de bário.

As velocidades de consumo de sulfato foram calculadas por meio do ajuste da equação exponencial de primeira ordem das concentrações analisadas, seguido da derivação da curva originada, utilizando o *software* Origin 6.0.

4.8.2. Determinação do potencial de oxi-redução e oxigênio dissolvido

O potencial de oxi-redução foi analisado no início e final dos ensaios nos reatores em batelada utilizando-se potenciômetro (Modelo UB-10, Denver Instruments) e eletrodo combinado de platina - referência Ag/AgCl (Modelo DMR-CP1, Digimed). O valor do potencial redox foi transformado em relação ao padrão de hidrogênio (Eh) de acordo com APHA (1998), utilizando a Equação (3):

$$Eh(\text{ sistema}) = E(\text{ observado}) + Eh(\text{ ZoBell}) - Eh(\text{ ZoBell observado}) \quad (3)$$

sendo,

$$Eh(\text{ ZoBell}) = 428 \text{ mV} \text{ e } Eh(\text{ ZoBell observado}) = 224 \text{ mV a } 25^{\circ}\text{C}$$

O oxigênio dissolvido (OD) também foi analisado no início e fim dos ensaios utilizando-se eletrodo Orion modelo 810.

4.9. Análises cromatográficas

Análises cromatográficas foram realizadas para monitoramento do gás metano e sulfeto produzidos, e acompanhamento temporal do consumo dos ácidos orgânicos voláteis (ácido acético e ácido láctico) e etanol.

4.9.1. Determinação de metano e sulfeto

O monitoramento do gás metano e sulfeto foram realizados por cromatografia gasosa. As amostras foram analisadas em cromatógrafo Gow-Mac, equipado com detector de condutividade térmica e colunas PORAPAK-Q (de análise) e PORAPAK-T (de referência), ambas com 2 m de comprimento, ¼” de diâmetro interno e 80-100 mesh, operados a 50°C. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste.

Alíquotas de 1 mL da atmosfera dos frascos foram retiradas como amostra, com o auxílio de uma seringa *gas tight*, com trava para gases. Os frascos não foram despressurizados, e os resultados estão expressos em mmol/L de gás acumulado no *headspace*. A velocidade máxima de produção de metano foi calculada por meio do ajuste de Boltzmann (sigmoidal) das concentrações de metano obtidas, e derivação da curva originada, utilizando-se o *software* Origin 6.0.

4.9.2. Determinação dos ácidos orgânicos e álcool

As análises do ácido acético foram realizadas em cromatógrafo a gás HP6890, equipado com coluna HP INNOWAX (Cross Linked Polyethylene) com 300 x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura do filme. O injetor operou a 250°C, com taxa de *split* de 1:20 e o detector de ionização de chama (FID) a 300°C. Foram utilizados os gases hidrogênio (gás de arraste) com fluxo de 30 mL/min, nitrogênio (gás auxiliar) com fluxo de 33 mL/min e ar sintético com fluxo de 300 mL/min. Solução de ácido crotônico, em concentração de 700 mg/L foi utilizado como padrão interno (MORAES et al., 2000).

Amostras de 2 mL foram coletadas, sob condições de assepsia, centrifugadas a 10000 rpm, acondicionadas em tubos de ensaio com tampa rosqueável de teflon e mantidos no freezer até o momento da análise. As amostras foram preparadas seguindo a metodologia de extração de Moraes et al. (2000), descrita a seguir.

- Adicionar a 2 mL de amostra 1,0 g de NaCl (P.A.); 100 µL de solução de ácido sulfúrico 1 M; 100 µL de solução de ácido crotônico e 0,60 mL de éter etílico purificado (gelado);
 - Agitar a amostra no agitador de tubos (vórtex) por 1 minuto;
 - Centrifugar a amostra por 1 minuto;
 - Armazenar a amostra no freezer até o momento da análise cromatográfica;
 - Injetar 1 µL da fase orgânica.

As concentrações (mg/L) de ácido acético foram calculadas em relação aos padrões, de acordo com os fatores de resposta (área pico do ácido/área pico do padrão interno) dos picos obtidos nos cromatogramas, com limite de detecção de ácido acético de 5,13 mg/L.

As análises do ácido láctico foram realizadas por cromatografia líquida (HPLC), em cromatógrafo SHIMADZU, equipado com controlador SCL 10 A, três bombas LC 10 AD, forno CTO 10 A e detector DIODE ARRAY DETECTOR em comprimento de onda de 210 nm. Como fase estacionária, foi utilizada coluna Aminex HPX-87H BIO-RAD de exclusão iônica, 300 x 7,8 mm, em forno de 45°C. O efluente usado na fase móvel foi solução de H₂SO₄ 5 mM, com fluxo de 0,500 mL/min. O volume de injeção foi de 100 µL. As amostras foram coletadas e armazenadas da mesma maneira descrita no item 4.9.2, e sua preparação também foi realizada seguindo a metodologia de extração de Moraes et al. (2000). Nessa metodologia as amostras foram filtradas em filtro Millipore de 0,22 µm antes de serem injetadas. Empregou-se curva de calibração do ácido láctico com menor concentração igual a 18,75 mg/L.

O etanol foi determinado em cromatógrafo a gás HP 6890, coluna HP INNOWAX – 30 mm x 0,25 mm x 0,25 µm, forno a 70°C e detector de ionização de chama (FID) a 300°C. As amostras foram coletadas e armazenadas nas mesmas condições descritas no item 4.9.2. Depois de descongeladas, foram colocadas em frascos de volumes idênticos, fechados com batoques de borracha de butila, lacrados e mantidos em banho de água em ebulição por 10 minutos. Retiraram-se 400 µL do *headspace* para ser injetado no cromatógrafo. Isobutanol foi utilizado como padrão interno. Empregou-se curva de calibração com menor concentração igual a 30,9 mg/L.

4.10. Microscopia óptica

Exames microscópicos das amostras foram realizados empregando-se microscopia de contraste de fase e fluorescência em aparelho Leica DMLB, com sistema de câmera colorida digital Optronics. O *software* utilizado para aquisição das imagens foi o *Image Pro-Plus* versão 3.0.1. Por meio desse equipamento foi possível captar as imagens na tela de computador de 17 polegadas, e registrar as morfologias microbianas.

Para a realização dos exames microscópicos, as amostras foram retiradas com agulha hipodérmica esterilizada. Para a observação das amostras, ágar 2% foi aquecido em forno microondas por aproximadamente 1 minuto e distribuído sobre a lâmina de vidro. Após sua

solidificação, alíquota de amostra foi colocada sobre a lâmina e recoberta por lamínula. Foram analisados de 20 a 30 campos microscópicos no mapeamento das morfologias observadas nas amostras dos reatores.

4.11. Hibridação fluorescente *in situ*

A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada para contagem e caracterização das bactérias do grupo BRS e arqueias metanogênicas presentes nos reatores em batelada. Foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos específicas ao RNAr 16S dos Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915) e para o grupo geral das BRS pertencentes à subdivisão *Proteobacteria* (SRB385). Todas as sondas foram marcadas com corante fluorescente rodamina na extremidade 5', conforme descritas na Tabela 4.5.

Foi utilizada também a sonda NON 338 como controle negativo para quantificar as porcentagens de hibridações não específicas.

As concentrações finais das sondas utilizadas estão apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.5. Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação fluorescente *in situ*.

Sonda	Especificidade	Seqüência (5'→ 3')*	Sítio do RNAr 16S*	Referência
NON338	Controle negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	338-355	Manz et al., 1992
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338-355	Amann et al., 1990
SBR385	Grupo geral de BRS Gram negativas da subdivisão delta de Protobacteria	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	385-402	Amann et al., 1990
ARC915	Domínio <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCCAATTC CT	915-934	Stahl e Amann, 1991

* Posição do RNAr 16S de acordo com a numeração de *Escherichia coli*

Tabela 4.6. Concentrações-estoque de cada sonda.

Sonda	Concentração Final Usada na Hibridação (ng/μL)
NON338	44,0
EUB338	41,8
SBR385	35,4
ARC915	39,5

Concentração obtida conforme descrito por Araújo (2001).

O FISH consistiu das seguintes etapas: desprendimento, lavagem e fixação das células planctônicas, preparação das lâminas de vidro, hibridação, microscopia de epifluorescência e contagem dos microrganismos. As etapas estão descritas a seguir.

4.11.1. Preparação e fixação das amostras

Para o desprendimento das amostras foram retirados dos reatores em batelada 4 mL de amostra, com seringa estéril, transferida para frascos de antibiótico estéril contendo 2 g de pérolas de vidro. Os frascos foram submetidos a atmosfera de N₂ (100%) durante 5 minutos. Depois de lacrados, os frascos foram agitados manualmente em ângulo de 45° durante 20 minutos, e submetidos à homogeneização adicional por 5 minutos em agitador magnético. Em seguida, as amostras foram transferidas para frascos de 1 mL (em triplicata) para o procedimento de lavagem e fixação.

A lavagem das células foi realizada utilizando-se tampão fosfato salino (PBS 1X: 130 mM NaCl + 7 mM Na₂HPO₄ + 3 mM NaH₂PO₄ em pH 7,2), por duas vezes, seguida de centrifugação por 1 minuto, com velocidade de 9000 rpm a 15°C. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS (1X) e 600 μ L de tampão de fixação com paraformaldeído 4% em PBS, e mantidas a 4°C por 12-16 horas. Terminado o período de fixação, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS (1X), centrifugadas nas mesmas condições anteriores e ressuspensas em PBS (1X)/etanol (1:1, v/v). As amostras foram armazenadas a 20°C até sua utilização.

O tampão de fixação foi preparado pela dissolução de 2 g de paraformaldeído em 45 mL de água ultrapurificada, previamente aquecida a 60°C. Foram adicionados, em seguida, 150 µL de NaOH 1N e 5 mL de PBS (1X). O pH da solução foi ajustado para 7,2 – 7,4, utilizando-se HCl (p.a.). O volume final foi completado até 50 mL com água ultrapurificada. A solução pode ser estocada em geladeira por no máximo 48 horas.

4.11.2. Tratamento das lâminas de vidro

Para a realização do FISH foram utilizadas lâminas de vidro revestidas com teflon (Cell-Line/Erie Scientific Co), com 12 pocinhos de 8 mm cada (Figura 4.3).

Antes da sua utilização, as lâminas foram submersas em solução de hidróxido de potássio 10% em etanol durante 1 hora, lavadas em água corrente e destilada e mergulhadas em etanol para secagem. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de gelatina 0,2% e $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e secas à temperatura ambiente, na posição vertical, para se tornarem hidrófobas. Após o tratamento, as lâminas permaneceram estocadas sob refrigeração a 4 °C até sua utilização.

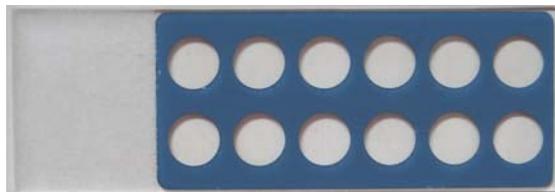


Figura 4.3. Lâmina de vidro revestida de teflon utilizada no FISH.

4.11.3. Hibridação

Para a realização da hibridação foi utilizado protocolo descrito por Araújo (2001). Alíquotas de 1 µL de cada amostra foram espalhadas sobre os pocinhos das lâminas de vidro e levada para secar em forno de hibridação a 45°C durante 20 minutos, para promover a fixação das células na lâmina. Após esse período, as amostras foram desidratadas em séries gradativas de etanol 50%, 80% e 100%, por 3 minutos em cada e secas em temperatura ambiente.

Após a desidratação em cada pocinho foram colocados 9 µL de tampão de hibridação, previamente aquecido à temperatura de hibridação. Cerca de 1 µL de sonda foi adicionada, para concentração final de 25-50 ng/µL. As composições dos tampões de hibridação e lavagem, e respectivas temperaturas de hibridação para cada sonda utilizada, seguem protocolo descrito na Tabela 4.7.

A hibridação foi realizada no interior de frascos de polipropileno de 50 mL com tampa de rosca, contendo em seu interior papel filtro umedecido com tampão de hibridação pré-aquecido. Esses tubos foram revestidos externamente com papel alumínio e funcionaram como câmara úmida, para manter a concentração do tampão de hibridação inalterada e evitar a secagem das células. Os tubos foram levados ao forno de hibridação com tempos e temperatura adequados para cada sonda (Tabela 4.7).

Após a hibridação, as lâminas foram submersas em tubos de polipropileno (50mL) contendo o respectivo tampão de lavagem, por tempo e temperatura específicos para cada sonda (Tabela 4.7), em banho-maria. Em seguida, as lâminas foram levemente borrifadas com água ultrapurificada para a remoção de sais e sondas não-hibridadas e secas à temperatura ambiente. Depois de secas, foi adicionado em cada pocinho 10-20 μ L de DAPI 10 μ g/mL (4', 6-diamidino-2-fenil indol, Sigma), por 10 minutos em temperatura ambiente e ausência de luz. Após esse período, as lâminas foram lavadas com água ultrapurificada para retirar o excesso de DAPI e colocadas para secar também em temperatura ambiente e ausência de luz.

Depois de secas, as lâminas foram cobertas com 1 a 2 μ L de glicerol/PBS (80/20, v/v), cobertas com lamínulas e observadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60-FLA. Esse tratamento foi utilizado para evitar o branqueamento das células devido à exposição prolongada à luz durante o exame microscópico. Foram utilizados filtros específicos, com excitação na região UV do espectro (para observação das células coradas com DAPI) e com excitação na região verde (para células coradas com rodamina). As imagens foram fotografadas com sistema de câmera acoplada para captura de imagem, em tempos de exposição de 0,08 s para contraste de fase e 0,5 s e 4,0 s para fluorescência.

Para a quantificação dos organismos, três imagens do mesmo campo microscópico foram fotografadas e arquivadas no computador: em contraste de fase, uma correspondente à excitação do DAPI (referente ao total de células) e outra correspondente à excitação da rodamina (referente às células hibridadas). As três imagens foram colocadas lado a lado para realização da contagem, e assim diferenciar células hibridadas de partículas abióticas, que às vezes apresentavam fluorescência com a sonda.

Para avaliação dos grupos microbianos presentes nas amostras, foi realizada a contagem do número total de células coradas com DAPI e contagem do número de células hibridadas com a sonda específica. Foram contadas de 800 a 1000 células de 30 a 40 campos aleatórios. A

porcentagem de células hibridadas com sondas específicas, em cada campo microscópico, foi calculada em relação ao total de células coradas com DAPI.

Tabela 4.7. Protocolos de hibridação.

Sondas	Temperatura e Tempo de Hibridação	Tampão de Hibridação	Temperatura e Tempo de Lavagem	Tampão de Lavagem	Referência
EUB338	46°C	0,9M NaCl,	48°C	20mM	ABE, 1998
NON338	1h30min	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	15 minutos	TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225mM NaCl	
SRB385	45°C 2h	0,9M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 30% formamida	48°C 20 minutos	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 80mM NaCl	HAHN et al., 1992
ARC915	45°C 2h	0,9M NaCl, 20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C 20 minutos	20mM TrisHCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225mM NaCl	HAHN et al., 1992

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios foram realizados em triplicata, entretanto, os resultados apresentados correspondem às médias aritméticas dos valores obtidos nos reatores com respostas mais semelhantes de cada condição, com respectivos desvios padrão.

5.1. Reatores em batelada contendo acetato de sódio

Nos reatores em batelada alimentados com acetato de sódio e adição de oxigênio foi verificada DQO inicial de 1463 ± 11 mg/L, potencial de oxi-redução de 382 ± 23 mV, $3,5$ mg/L de OD, sólidos totais voláteis de 5135 mg/L e relação DQO/sulfato de $1,5$ (Tabela 5.1). O ensaio, após 960 horas de operação, apresentou DQO de 207 ± 27 mg/L, resultando eficiência de $85,8\%$. Após esse período, o potencial de oxi-redução foi de -205 ± 3 mV, OD igual a zero e sólidos totais voláteis de 3220 ± 283 mg/L. Ocorreu diminuição da quantidade de sólidos, o que indicou que houve redução da biomassa causada por morte celular, provavelmente, devido as novas condições nutricionais mais restritivas. O ácido acético adicionado ($757,7 \pm 85$ mg/L) foi totalmente consumido (Figura 5.1) em 120 horas de ensaio. Após esse período os valores encontrados estiveram abaixo do limite de detecção do método cromatográfico; ou seja, foram inferiores a $5,13$ mg/L.

Nos reatores controle contendo acetato de sódio, a DQO inicial foi de 1291 ± 14 mg/L, potencial de oxi-redução de 98 ± 2 mV, sólidos totais voláteis de 5135 mg/L e relação DQO/sulfato de $1,5$ (Tabela 5.1). Este ensaio também teve duração de 960 horas, DQO final igual a 159 ± 1 mg/L, o que gerou eficiência de remoção de $87,7\%$, e potencial de oxi-redução de -169 ± 2 mV.

Os sólidos totais voláteis também apresentaram diminuição da concentração, com valor de 3613 ± 140 mg/L. Como pode ser observado, a diferença entre os sólidos inicial e final dos ensaios controle foi pouco menor que nos ensaios com adição de oxigênio. No ensaio controle o ácido acético adicionado ($874,5 \pm 5$ mg/L) também foi totalmente consumido em 120 horas (Figura 5.1). Após esse período os valores encontrados estiveram abaixo do limite de detecção do método cromatográfico; ou seja, inferiores a $5,13$ mg/L.

Nos reatores com oxigênio o potencial de oxi-redução no início foi mais positivo, comparando-se com os reatores controle, possivelmente devido a presença do oxigênio que deixou o meio oxidado. O valor do potencial redox nos reatores anaeróbios controle também

apresentou valores positivos (potencial oxidado), devido à ausência de solução redutora e presença de sulfato de sódio, que é substância oxidada. No final dos ensaios, os reatores com oxigênio apresentaram potencial redox reduzido, devido a redução do oxigênio e formação de sulfeto. Nos reatores controle ao final do ensaio, o potencial redox encontrava-se reduzido, entretanto, menos reduzido que nos reatores com oxigênio.

Análises cromatográficas detectaram presença de ácidos propiônico, isobutírico, butírico e isovalérico em concentrações que variaram de 1,2 a 17,6 mg/L para os reatores controle e com oxigênio.

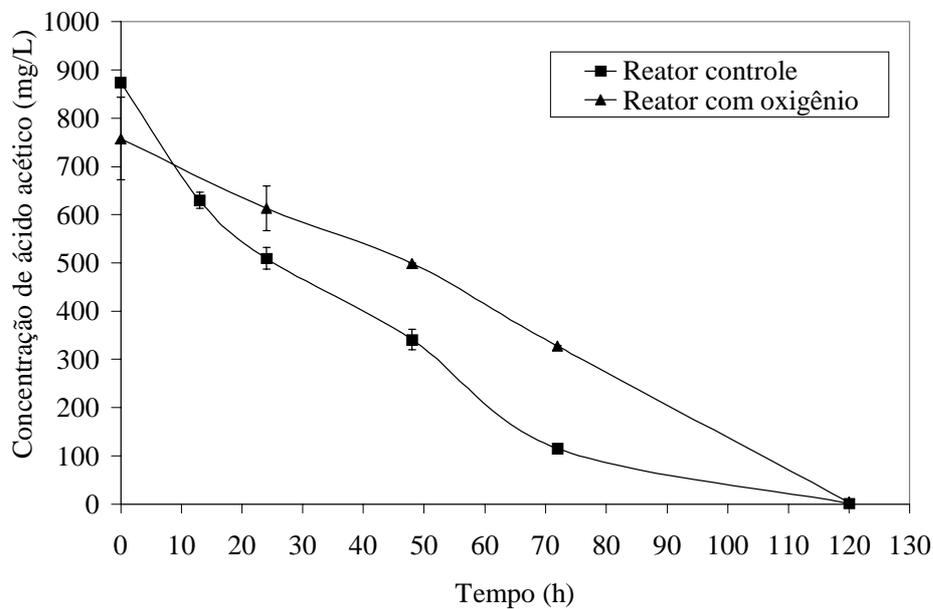


Figura 5.1. Variação temporal da concentração de ácido acético nos reatores em batelada.

Tabela 5.1. Relação DQO/sulfato, DQO inicial, potencial de oxi-redução, eficiência de remoção de DQO e sólidos totais voláteis dos reatores em batelada com acetato.

Ensaio	Relação DQO/Sulfato	DQO inicial (mg/L)	Potencial de Oxi-Redução (mV)		Eficiência Remoção DQO (%)	Sólidos Totais Voláteis (mg/L)	
			Inicial	Final		Inicial	Final
Acetato/Controle	1,5	1291	98	-169	87,7	5135	3613

Nos reatores alimentados com acetato e adição de oxigênio a produção de metano atingiu a velocidade máxima de 0,27 mmol/L.h em 55 horas, velocidade média de $0,037 \pm 0,07$ mmol/L.h e concentração máxima de metano de 19 mmol/L (Tabela 5.2, Figura 5.2) em 132 horas de operação, estabilizando-se em seguida, no mesmo tempo de operação.

Nos reatores controle a velocidade máxima de produção de metano foi de 0,30 mmol/L.h em 50 horas, velocidade média de $0,054 \pm 0,07$ mmol/L.h e concentração máxima observada de 19 mmol/L (Tabela 5.2, Figura 5.2) em 137 horas de operação, estabilizando-se em seguida. As curvas de produção de metano tiveram valores de coeficiente de correlação (R^2) iguais a 0,99 para ambos reatores, com oxigênio e controle.

Tabela 5.2. Velocidade máxima de produção de metano e concentração máxima de metano nos reatores alimentados com acetato de sódio.

Ensaio	Velocidade Máxima de Produção de Metano (mmol/L.h)	Concentração Máxima de Metano (mmol/L)	Período da Produção Máxima de Metano (h)
Acetato/Oxigênio	0,27	19	132
Acetato/Controle	0,30	19	137

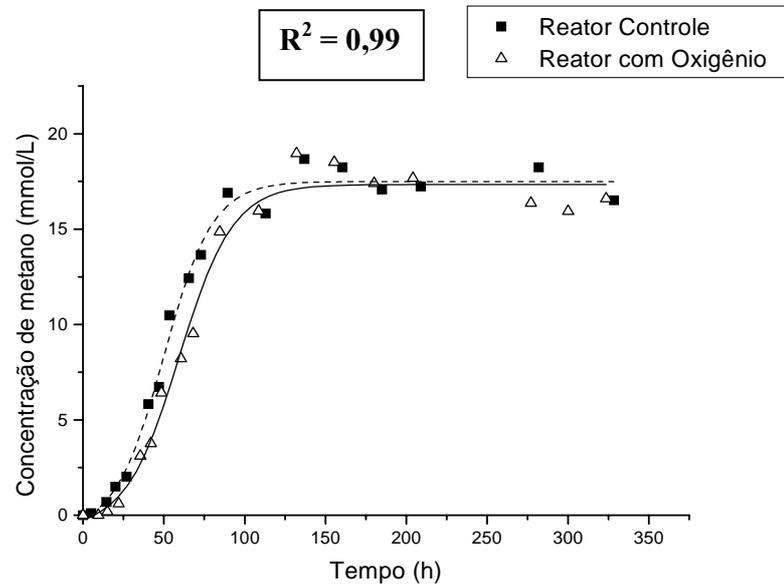


Figura 5.2. Variação temporal da concentração de metano nos reatores contendo acetato, com oxigênio e controle.

Pode-se observar que nos reatores com oxigênio a velocidade de produção de metano foi semelhante à velocidade observada nos reatores controle, além disso, a concentração de metano observada foi a mesma para os dois reatores (19 mmol/L). Portanto, a presença de oxigênio nos reatores contendo acetato de sódio não afetou a metanogênese.

Zitomer e Shrout (1998) estudaram a atividade metanogênica em reatores em batelada contendo sacarose, onde foram adicionadas quantidades de 4, 12 e 48 mL de oxigênio, a cada dois dias. Os autores também observaram valores de metano produzidos semelhantes (aproximadamente 20 mL) nos reatores anaeróbios controle e em reatores que receberam 48 mL de oxigênio. Os autores atribuem tal desempenho à oxidação aeróbia de compostos intermediários (ácido propiônico, ácido acético e hidrogênio) por bactérias facultativas, que retiraram oxigênio do meio, favorecendo, assim, a metanogênese. Além disso, segundo os mesmos autores, as metanogênicas sobreviveriam devido à formação de micronichos anaeróbios.

Neste presente trabalho, o hidrogênio e outros compostos intermediários, provavelmente, foram utilizados por bactérias facultativas ou BRS, para reduzir o oxigênio do meio, e desse modo restabelecer condições anaeróbias para a metanogênese.

O consumo de sulfato nos reatores contendo acetato e adição de oxigênio foi de 97%, para

concentração inicial de 960 ± 57 mg/L, restando ao final do ensaio 30 ± 14 mg/L de sulfato (Figura 5.3). A velocidade máxima de consumo do sulfato foi de 1,97 mg/L.h, observada em $t=0$ (apêndice A) e velocidade média de $0,89 \pm 0,5$ mg/L.h. O sulfeto analisado no biogás, somente, começou a ser detectado com 541 horas de operação. Após 707 horas foi observada concentração máxima de 1 mmol/L. Considerando a quantidade de sulfato adicionado, estequiometricamente sua redução produziria 9,7 mmol/L de sulfeto total (biogás e dissolvido), sendo 3,1 mmol/L referente ao sulfeto dissolvido, calculado teoricamente. Entretanto, o sulfeto total (biogás e dissolvido) observado nos ensaios foi 4,1 mmol/L, ou seja, valor inferior ao teórico.

Nos reatores controle contendo acetato, a concentração inicial de sulfato foi de 950 ± 14 mg/L e final de 410 ± 42 mg/L resultando consumo de 57% (Figura 5.4). A velocidade máxima de consumo de sulfato foi de 1,01 mg/L.h, observada também em $t=0$ (apêndice B) e velocidade média de $0,52 \pm 0,2$ mg/L.h. O sulfeto do biogás começou a ser detectado em 113 horas de operação. Após 664 horas foi observada concentração máxima de 1,5 mmol/L. A concentração teórica de sulfeto dissolvido foi calculada, obtendo-se o valor de 4,1 mmol/L. Estequiometricamente, a redução do sulfato adicionado produziria 5,6 mmol/L de sulfeto total (dissolvido e biogás), valor igual ao total de sulfeto observado nos ensaios (somando valores do sulfeto no biogás com o sulfeto dissolvido calculado).

A Tabela 5.3 mostra os valores de consumo de sulfato, tempo de início da detecção do sulfeto no biogás e concentrações máximas de sulfeto no biogás observadas nos reatores com oxigênio e controle, contendo acetato de sódio. A velocidade de consumo de sulfato nos reatores contendo oxigênio foi o dobro da verificada para os reatores controle, assim, a redução de sulfato pode ter sido favorecida na presença de oxigênio (Tabela 5.3). Canfield e Des Marais (1991) observaram maiores velocidades de redução de sulfato na superfície oxigenada ($1,8 \mu\text{M}/\text{min}$ a 2 mm de profundidade) em comparação com regiões mais profundas anaeróbias ($0,8 \mu\text{M}/\text{min}$ a 8 mm de profundidade) de biomassa contendo cianofíceas e bactérias de ambiente marinho. O mesmo comportamento pode ter ocorrido neste estudo; ou seja, maior velocidade de redução de sulfato nos reatores com oxigênio.

Tabela 5.3. Consumo de sulfato, início do tempo de detecção de sulfeto no biogás e concentração máxima de sulfeto nos reatores contendo acetato de sódio.

Ensaio	Consumo de Sulfato (%)	Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	Velocidade Máxima Consumo sulfato (mg/L.h)	Início da Detecção do Sulfeto (h)	Concentração Máxima Sulfeto no Biogás (mmol/L)
Acetato/Oxigênio	97	960	1,97	541	1
Acetato/Controle	57	950	1,01	113	1,5

Conforme pode ser observado na Figura 5.3 e Tabela 5.3, o sulfeto começou a ser detectado no biogás dos reatores com oxigênio, somente após 500 horas de ensaio. Isso pode ter ocorrido porque na presença de oxigênio as BRS podem primeiro ter realizado a redução dele, e somente quando o oxigênio foi esgotado do meio, iniciaram a redução de sulfato. Krekeler et al. (1998) observaram que ao adicionar oxigênio em células de BRS em suspensão, utilizando hidrogênio como doador de elétrons e sulfato ou tiosulfato como aceptores, a produção de sulfeto cessou e o oxigênio foi consumido.

Além disso, na presença de oxigênio, o sulfeto pode ser utilizado como doador de elétrons para a redução do oxigênio, e assim, o maior tempo para a detecção do sulfeto no biogás pode ter ocorrido porque o sulfeto teria sido oxidado na redução do oxigênio até este ser esgotado do meio. Comparando o período em que o sulfato começou a ser consumido e o período em que o sulfeto começou a ser detectado no biogás dos reatores com oxigênio (Figura 5.3), observa-se que quando o sulfeto começou a ser detectado o sulfato já havia começado a ser reduzido, o que mostra que o sulfeto produzido no começo dos ensaios, pode ter sido oxidado, na redução do oxigênio.

Para Dilling e Cypionka (1990) os compostos reduzidos de enxofre podem ser utilizados como substratos para a respiração aeróbia. Os autores observaram que *Desulfovibrio desulfuricans* oxidou completamente tiosulfato e sulfito com a adição de 2% e 0,5% de oxigênio no meio, respectivamente. Dannenberg et al. (1992) observaram a capacidade de oxidar sulfeto com oxigênio como acceptor de elétrons em cinco espécies de *Desulfovibrio*, em *Desulfobulbus*

propionicus e *Desulfococcus multivorans*.

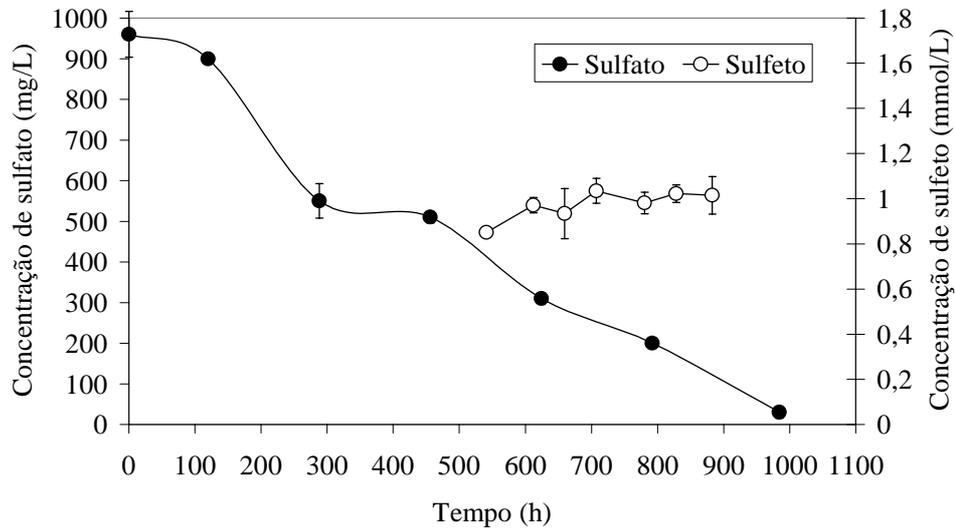


Figura 5.3. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto nos reatores contendo acetato e oxigênio.

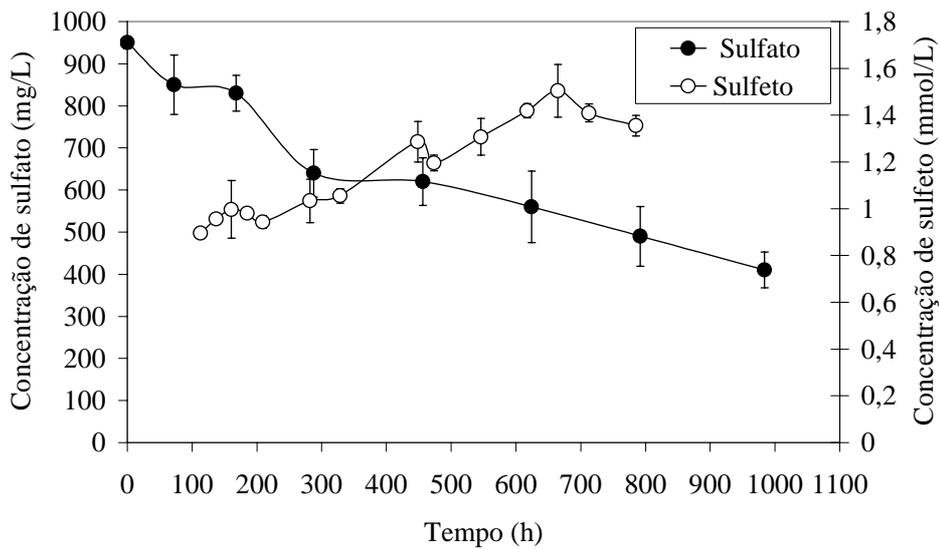


Figura 5.4. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto no biogás dos reatores controle contendo acetato.

A Figura 5.1 mostra que o consumo total do ácido acético ocorreu em 120 horas, tanto nos reatores com oxigênio, quanto nos reatores controle. Nesse período os valores foram abaixo do limite de detecção do método cromatográfico; ou seja, de 5,13 mg/L. Entretanto, a redução de sulfato durante esse período estava no início e continuou até o término do ensaio. Apesar do esgotamento da fonte orgânica adicionada, a redução de sulfato não cessou. Tal fato pode ser explicado pela presença de outras fontes orgânicas ou hidrogênio que foram utilizadas pelas BRS. Conforme citado anteriormente, houve diminuição da concentração de sólidos totais voláteis ao final do ensaio, o que mostra que ocorreu morte celular. Desse modo os organismos presentes podem ter utilizado os ácidos orgânicos e hidrogênio provenientes da degradação celular, para realizarem a redução do sulfato.

5.1.1. Caracterização microbiana

Por meio da observação sob microscopia óptica do lodo granulado utilizado como inóculo foi possível identificar as seguintes morfologias celulares: filamentos, cocos, bacilos com extremidades arredondadas, bacilos delgados, filamentos semelhantes a *Methanosaeta* sp. e morfologias semelhantes a *Methanosarcina* sp. (Tabela 5.4). Hirasawa (2003) usou o mesmo lodo granular proveniente de tratamento de água residuária de abatedouro de aves para avaliar a comunidade microbiana de reatores anaeróbios diferenciais e em batelada, sob condições sulfetogênicas e mesofílicas, e observou as mesmas morfologias. Entretanto, o autor encontrou bacilos fluorescentes e cistos de sarcinas, o que não foi verificado neste trabalho. A Figura 5.5 mostra algumas dessas morfologias observadas.

As porcentagens médias de microrganismos no inóculo detectadas pelas sondas EUB338, ARC915 e SRB385 foram, respectivamente, 49,8% (erro padrão – EP: 3,3%), 56,7% (EP: 3,2%) e 27,9% (EP: 1,1%) (Figura 5.5). Esses valores estão descritos na Tabela 5.5 e Figura 5.6. Esses resultados são compatíveis com os encontrados por Hirasawa (2003), que observou valores de 44,8% (EP: 2,7%) e 59,5% (EP: 1,8%) para as sondas EUB338 e ARC915, respectivamente. O autor não quantificou a porcentagem de BRS devido a problemas de homogeneização das amostras. Assim, com base nas porcentagens o lodo era predominantemente metanogênico. A Tabela 5.6 e Figura 5.7 mostram as morfologias hibridadas com as sondas EUB338, ARC915 e SRB385.

As morfologias das células hibridadas com a sonda NON 338 foram anotadas para que fossem desconsideradas na contagem.

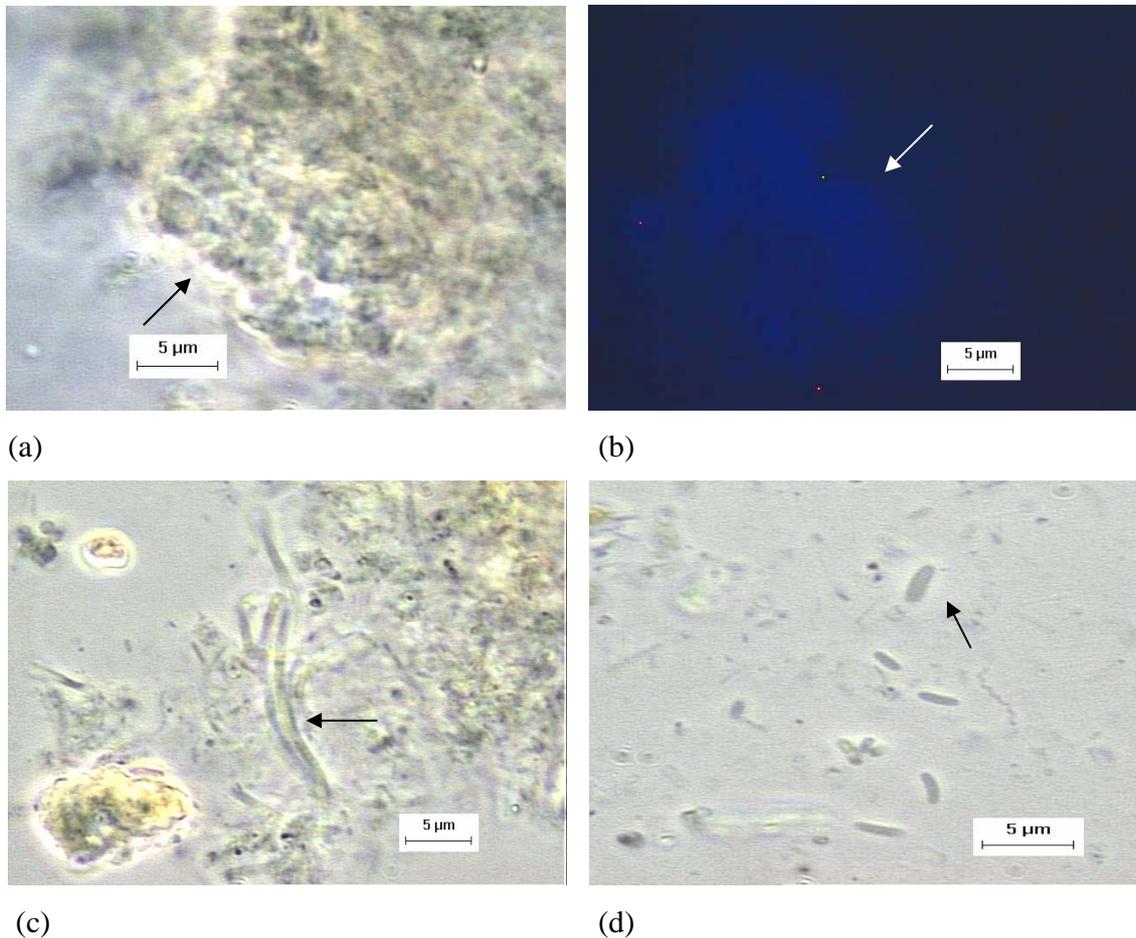


Figura 5.5. Morfologias observadas no inóculo sob microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência: (a) morfologia semelhante a *Methanosarcina* sp., (b) fluorescência de *Methanosarcina* sp., (c) filamentos e (d) bacilos com extremidades arredondadas.

Segundo Raskin et al. (1994), a soma das porcentagens das células pertencentes aos Domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*, hibridadas com as sondas ARC915, EUB338 e EUK516, respectivamente, deve ser igual a 100%. Entretanto, neste trabalho foram utilizadas apenas sondas ARC915 e EUB338, pelo fato de organismos eucariontes geralmente não estarem presentes nos sistemas de tratamento anaeróbio. Assim, a somatória das células hibridadas com as duas sondas deveria ser 100%. No inóculo a somatória foi igual a 106,5%, essa superestimativa

da população total pode estar provavelmente relacionada com a intensidade do sinal fluorescente, preparação das amostras, desprendimentos dos arranjos celulares. Variações semelhantes também foram observadas por Domingues (2001) na avaliação da sulfetogênese e metanogênese utilizando substrato orgânico acetato, lactato e propionato, em reatores anaeróbios em batelada, sob condições termofílicas. Hirasawa (2003) também observou acréscimo na somatória das porcentagens do Domínio *Bacteria* e *Archaea* no estudo da comunidade microbiana em reatores sulfetogênicos com diferentes materiais suportes: espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno e cerâmica porosa.

Tabela 5.4. Caracterização morfológica do inóculo.

Morfologia	Inóculo
Arquéias metanogênicas	
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++
Cistos de sarcinas	-
Bactérias	
Bacilos com extremidades arredondadas	+++
Bacilos delgados	+
Cocobacilos	+
Cocos	+
Espiroqueta	+
Filamentos	++
Filamentos segmentados	-

(++++) predominantes, (+++) frequentes, (++) pouco frequentes, (+) raros, (-) não foram observados.

Tabela 5.5. Porcentagens de microrganismos obtidos no inóculo por meio do FISH.

Material	EUB338		ARC915		SRB385	
	(%)	Erro padrão	(%)	Erro padrão	(%)	Erro padrão
Inóculo	49,8	3,3	56,7	3,2	27,9	1,1

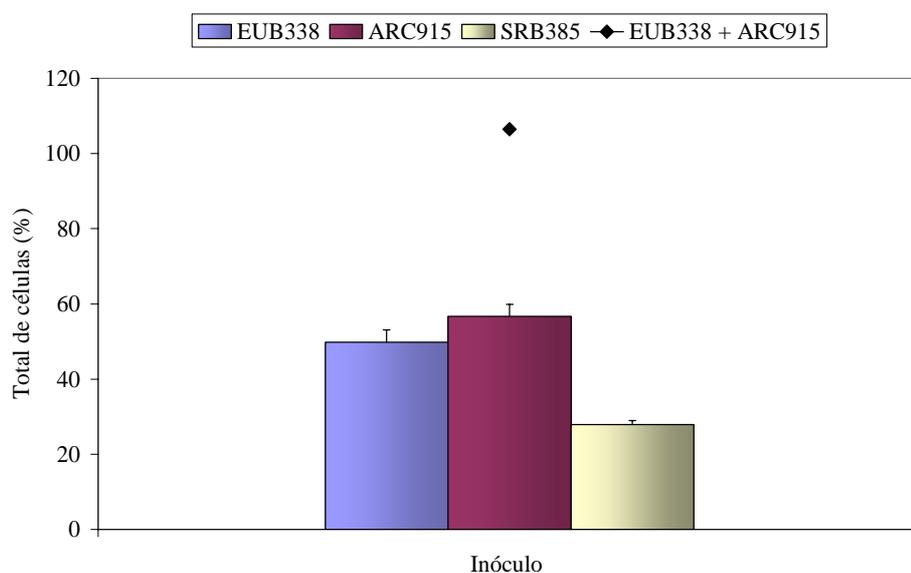


Figura 5.6. Composição da comunidade microbiana do inóculo. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915) e BRS da subdivisão delta de *Proteobacteria* (SRB385) e soma dos dois Domínios (EUB338 + ARC915). As barras indicam o erro padrão.

Tabela 5.6. Morfologias das células predominantes no inóculo detectadas pelo FISH.

Sonda	Morfologia das Células Híbridadas
EUB338	Cocos, bacilos, cocobacilos
ARC915	Filamentos, sarcinas e bacilos
SRB385	Cocos, bacilos, cocobacilos

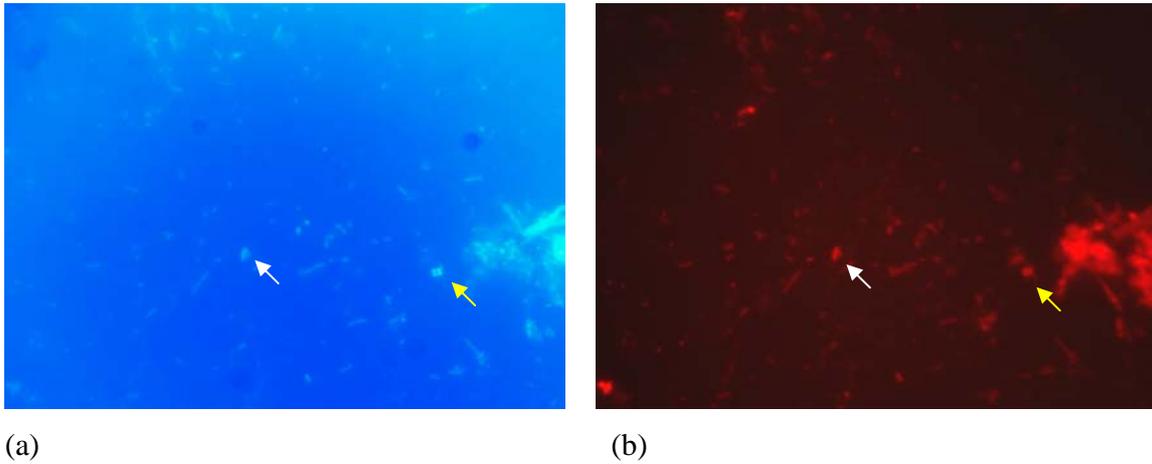


Figura 5.7. Morfologias hibridadas com a sonda EUB338: (a) células coradas com DAPI, (b) bacilo (seta branca) e cocos em forma de sarcina (seta amarela).

Nos reatores controle contendo acetato foram observadas as seguintes morfologias celulares: filamentos, cocos, bacilos com extremidades arredondadas, cocobacilos, bacilos delgados, morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. Nos reatores com oxigênio foram observadas as mesmas morfologias celulares. Em ambos reatores houve predominância de *Methanosaeta* sp. (Figura 5.8, Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Caracterização morfológica dos reatores contendo acetato.

Morfologias	Reatores controle	Reatores com oxigênio
Arquéias metanogênicas		
<i>Methanosarcina</i> sp.	++++	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++	++++
Cistos de sarcinas	-	+
Bactérias		
Bacilos com extremidades arredondadas	+++	+++
Bacilos delgados	+++	+++
Bacilos curvos	+	+
Cocobacilos	+++	++++
Cocos	++++	++
Espiroqueta	-	-
Filamentos	-	-
Filamentos segmentados	++++	+++

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados.

Domingues (2001) avaliou a diversidade morfológica de reatores em batelada contendo acetato e sulfato sob condições termofílicas. O autor observou predomínio de sarcinas, bacilos fluorescentes, e bactérias com extremidades afiladas semelhantes a *Desulfotomaculum* sp. Outras morfologias também foram observadas; tais como bacilos com extremidades arredondadas, bacilos curvos, esporos de sarcinas e raros bacilos curvos. No presente trabalho, nos reatores com acetato não foi observada a presença de bacilos fluorescentes. Além disso, não foram observadas morfologias semelhantes a *Desulfotomaculum* sp. Tal fato justifica-se porque, embora sob condição anaeróbia com acetato como substrato orgânico, os inóculos e temperatura de incubação foram diferentes.

Amostras retiradas dos reatores em batelada, controle e com oxigênio, após 6 dias de operação e ao final do ensaio também foram hibridadas. Os resultados foram comparados entre si

e com o inóculo. O período de 6 dias foi escolhido para comparação, devido à provável mudança na diversidade microbiana após esse período sob condições distintas.

Nos reatores controle com 6 dias de operação foram observadas as porcentagens de 40,5% (EP: 1,9%) para a sonda EUB338, 49,6% (EP: 1,8%) para ARC915 e 30,7% (EP: 1,2%) para SRB385. Nos reatores com oxigênio os valores observados foram de 40,4% (EP: 2,1%), 59% (EP: 2,1%) e 24,9% (EP: 0,8%), respectivamente (Figura 5.9).

Ao final dos ensaios foi observado nos reatores controle 37,6% (EP: 2,2%), 59,2% (EP: 2,6%) e 22% (EP: 1%) para as sondas EUB338, ARC915 e SRB385, respectivamente. Nos reatores com oxigênio foram observados 31,1% (EP: 1,7%), 60,7% (EP: 2,4%) e 17,3% (EP: 1,1%) respectivamente (Figura 5.9). As porcentagens de hibridação dos reatores alimentados com acetato estão descritas na Tabela 5.8. A Tabela 5.9 mostra as morfologias hibridadas pelas sondas EUB338, ARC915 e SRB385 nos reatores contendo acetato.

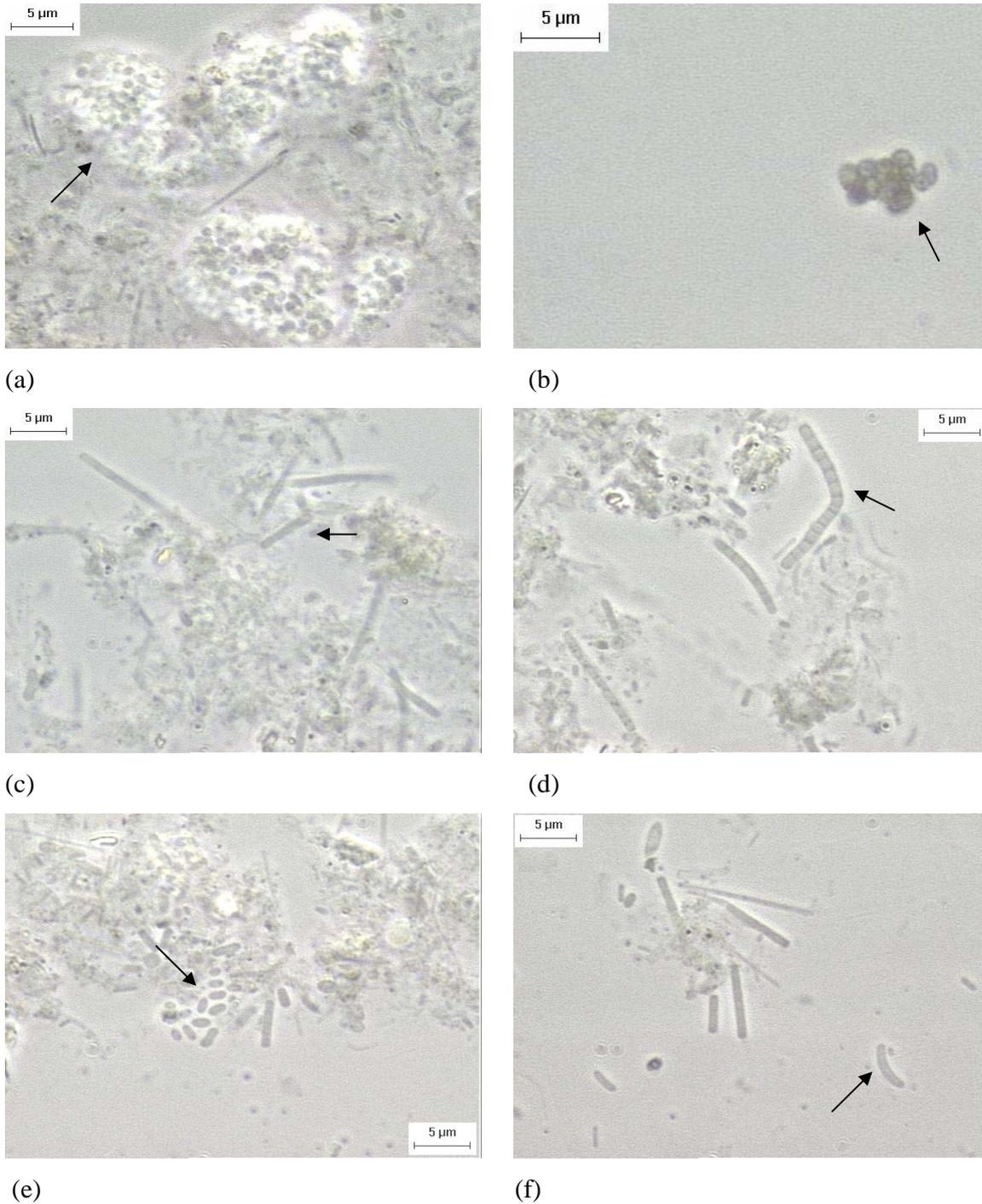


Figura 5.8. Morfologias observadas em microscopia óptica de contraste de fase nos reatores controle contendo acetato (a-c) e com adição de oxigênio (d-f): (a) morfologias semelhantes a *Methanosarcina* sp., (b) cocos, (c) morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp., (d) filamentos segmentados, (e) cocobacilos, (f) bacilo curvo.

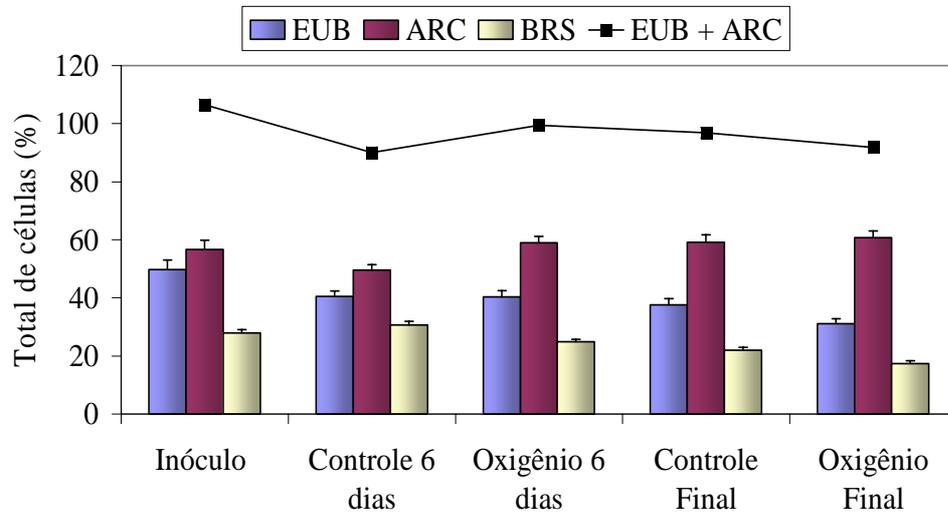


Figura 5.9. Comunidade microbiana nos reatores controle e com oxigênio contendo acetato. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338) e *Archaea* (ARC915) e grupo das BRS da subdivisão delta de *Proteobacteria* (SRB385) e soma dos dois Domínios (EUB338 + ARC915). As barras indicam o erro padrão.

Conforme pode ser observado na Figura 5.9, nos reatores contendo acetato houve predomínio de arqueias metanogênicas, tanto nos reatores controle quanto nos reatores com oxigênio. Esse resultado está em acordo com a produção de metano observada nos reatores (19 mmol/L). Nesses reatores a metanogênese não foi afetada pela presença do oxigênio.

A proporção de organismos do grupo das BRS diminuiu ao longo do ensaio nos reatores controle e com oxigênio, conforme pode ser observado na Figura 5.9. Apesar do elevado consumo de sulfato observado nos reatores com oxigênio (97%), nesses reatores foi observada a menor proporção de BRS ao final do ensaio (17,3%). Em contrapartida, nos reatores controle a proporção de BRS foi ligeiramente maior (22%), embora a redução de sulfato menor (57%). Tais resultados indicaram que na presença de acetato o crescimento das arqueias metanogênicas foi mais favorecido do que das BRS. O crescimento de BRS foi favorecido em condições anaeróbias, principalmente para aquelas que utilizam completamente o acetato. Outro aspecto importante refere-se à redução de sulfato, a qual foi maior nos reatores com oxigênio. Provavelmente, bactérias facultativas, não pertencentes ao grupo das BRS, usaram o substrato orgânico para reduzir sulfato. Todavia, estas não foram detectadas pela sonda SRB385 e também não apresentaram acréscimo nas porcentagens de EUB338, uma vez que as amostragens foram obtidas após 6 dias de operação. Provavelmente, em função da utilização de oxigênio, o aumento

da biomassa seria observado no final de 2 dias de operação. Sendo assim, a biomassa coletada aos 6 dias, não apresentou RNAr em plena atividade e, conseqüentemente não foi possível a sua detecção. Mas, a sua presença foi constatada pela redução do sulfato.

Tabela 5.8. Porcentagens de microrganismos obtidos com o FISH nos reatores controle e com oxigênio contendo acetato.

Amostra	EUB338		ARC915		SRB385	
	(%)	Erro padrão	(%)	Erro padrão	(%)	Erro padrão
Controle/6 dias	40,5	1,9	49,6	1,8	30,7	1,2
Controle/Final	37,6	2,2	59,2	2,6	22	1
Oxigênio/6 dias	40,4	2,1	59	2,1	24,9	0,8
Oxigênio/Final	31,1	1,7	60,7	2,4	17,3	1,1

Tabela 5.9. Morfologias das células predominantes nos reatores contendo acetato, detectadas pelo FISH.

Sonda	Morfologia das Células Híbridadas			
	Controle/6 dias	Controle/Final	Oxigênio/6 dias	Oxigênio/Final
EUB338	Cocos, cocobacilos, bacilos	Cocos, cocobacilos, bacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos, filamentos, bacilos curvos	Cocos, bacilos, bacilos curvos
ARC915	Filamentos, sarcinas, bacilos	Filamentos, sarcinas, bacilos	Filamentos, bacilos, sarcinas, cocos	Filamentos, bacilos, sarcinas
SRB385	Bacilos, cocos, cocobacilos	Cocos, cocobacilos	Cocos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos

A somatória das células híbridadas com EUB338 + ARC915 foram, respectivamente, 90,1% e 99,4%, para os reatores controle e com adição de oxigênio, após 6 dias de operação;

96,8% e 91,8%, para os reatores controle e com oxigênio, respectivamente, ao final do ensaio. Neste caso houve subestimativa da população total pelos mesmos motivos citados anteriormente.

Domingues (2001) realizou experimentos com reatores anaeróbios em batelada contendo acetato e sulfato, sob condições termofílicas. O autor também observou predomínio de arqueias metanogênicas (51,5% – 67,6%); ou seja, valores semelhantes aos observados nos reatores controle (anaeróbios) deste trabalho.

Omil et al. (1997) estudaram reator UASB em escala de bancada contendo acetato de sódio/sulfato de sódio e observou, por meio do FISH, que houve predomínio de *Methanosaeta* sp. após exposição ao ar durante 24 horas. Organismos do Domínio *Archaea* consistiram de 40 a 95% do total de células no sistema. Apesar disso, os autores verificaram que a maior parte do acetato (cerca de 70%) foi consumido pelas BRS, e não pelas arqueias metanogênicas.

De acordo com Yoda (1987), as BRS possuem maior afinidade ao acetato comparado com as arqueias metanogênicas, por possuírem menor valor de k_s . As BRS possuem k_s igual a 102 mg acetato/L, enquanto as arqueias metanogênicas têm k_s igual a 116 mg acetato/L. Segundo Lens et al. (1998), as BRS tendem a ter maiores velocidades de crescimento utilizando acetato, em comparação com as arqueias metanogênicas. Entretanto, a competição entre as BRS e arqueias metanogênicas depende de vários fatores, tais como, concentração de acetato, concentração de sulfato, pH, temperatura, entre outros (LENS et al., 1998). Especificamente, no presente trabalho, o inóculo foi predominantemente metanogênico confirmado por porcentagens de FISH e microscopia de fluorescência. Portanto, embora as BRS utilizem mais rapidamente o acetato, nas condições experimentais deste trabalho foi observado comportamento contrário. Provavelmente, as BRS que utilizam acetato estavam em menor número no inóculo (27,9%, EP: 1,1%) e foram desfavorecidas na presença do oxigênio (30,7% a 22%) e também em condições anaeróbias (24,9% a 17,3%), respectivamente no início (6 dias) e final (960 dias) dos experimentos.

5.2. Reatores em batelada contendo etanol

Nos reatores em batelada contendo etanol e adição de oxigênio a DQO inicial foi de 1128 \pm 11 mg/L, potencial de oxi-redução de 370 \pm 1 mV, 4,4 mg/L de OD, sólidos totais voláteis de 4507 mg/L e relação DQO/sulfato de 1,2 (Tabela 5.10).

Ao final do ensaio, com 816 horas, a DQO foi igual a 158 \pm 21 mg/L, o que resultou em eficiência de 86% de remoção, potencial de oxi-redução de -186 \pm 2 mV e 0,41 mg/L de OD. A

concentração de sólidos final também foi inferior a inicial, com valor de 2770 ± 127 mg/L. Foi observado consumo de 95,7% do etanol após 72 horas de operação, para concentração inicial de $540,6 \pm 0,5$ mg/L, resultando no final do ensaio $23 \pm 0,1$ mg/L (Figura 5.10).

Os reatores controle alimentados com etanol apresentaram DQO inicial de 1016 ± 13 mg/L, potencial de oxi-redução inicial -29 ± 3 mV, sólidos totais voláteis de 5135 mg/L e relação DQO/sulfato de 1,1 (Tabela 5.10). Estes ensaios também tiveram duração de 816 horas, DQO final de 129 ± 5 mg/L, resultando em eficiência de remoção de 87,3%, potencial de oxi-redução de -168 ± 7 mV e sólidos totais voláteis final igual a 3453 ± 254 mg/L. Neste ensaio houve consumo de 90,3% do etanol após 72 horas, para concentração inicial de $454,9 \pm 1$ mg/L e final de $19,9 \pm 0,3$ mg/L (Figura 5.10).

Tabela 5.10. Relação DQO/sulfato, DQO inicial, potencial de oxi-redução, eficiência de remoção de DQO e sólidos totais voláteis dos reatores em batelada contendo etanol.

Ensaio	Relação DQO/Sulfato	DQO inicial (mg/L)	Potencial de Oxi-Redução (mV)		Eficiência Remoção DQO (%)	Sólidos Totais Voláteis (mg/L)	
			Inicial	Final		Inicial	Final
			Etanol/Oxigênio	1,2		1128	370
Etanol/Controle	1,1	1016	-29	-168	87,3	4507	3453

Nos reatores com etanol e oxigênio o potencial de oxi-redução foi positivo (oxidado), quando comparados com os reatores controle (reduzido). No final dos ensaios, os reatores com oxigênio apresentaram potencial redox reduzido, devido a redução do oxigênio e formação de sulfeto. Nos reatores controle também ao final do ensaio, o potencial redox encontrava-se reduzido, entretanto, menos reduzido que nos reatores com oxigênio, semelhante ao que ocorreu nos reatores com acetato.

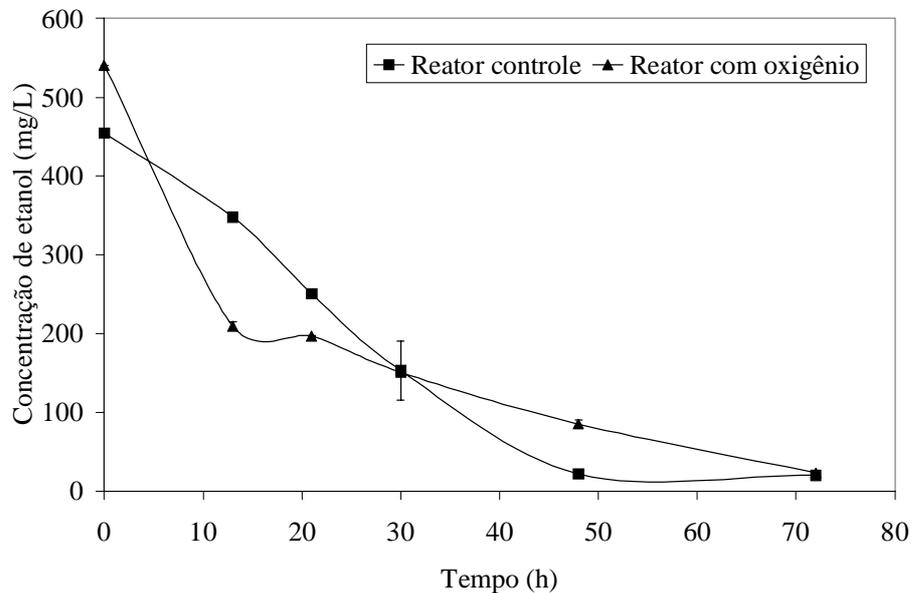


Figura 5.10. Variação temporal da concentração de etanol nos reatores em batelada.

Nos reatores alimentados com etanol e adição de oxigênio a velocidade máxima de produção de metano foi de 0,40 mmol/L.h em 25 horas, velocidade média de $0,024 \pm 0,07$ mol/L.h e concentração máxima observada de 13 mmol/L (Tabela 5.11 e Figura 5.11) após 63,5 horas de operação, estabilizando-se também no mesmo tempo.

Nos reatores controle contendo etanol a velocidade máxima de produção de metano foi de 0,41 mmol/L.h em 24 horas, velocidade média de $0,038 \pm 0,09$ mmol/L.h e concentração máxima de 14 mmol/L (Tabela 5.11 e Figura 5.11) em 63,5 horas, estabilizando-se em seguida. As curvas de produção de metano tiveram valores de coeficiente de correlação (R^2) iguais a 0,99 para ambos reatores, com oxigênio e controle.

Nesses ensaios, as velocidades máximas de produção de metano foram maiores que as observadas nos reatores com acetato de sódio, embora as velocidades médias tenham sido inferiores. Entretanto, o etanol não é um substrato orgânico prontamente utilizado pelas arqueias metanogênicas. De acordo com Madigan et al. (1997), o etanol é fermentado em hidrogênio e acetato. Esta reação possui variação de energia livre positiva, portanto, desfavorável. O hidrogênio liberado da fermentação do etanol pode ter sido consumido pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e BRS, diminuindo, assim, a pressão parcial do hidrogênio e

permitindo que a reação ocorresse no sentido de formação de acetato (MADIGAN et al., 1997).

Jones et al. (1984) estudaram a metanogênese a partir da sacarose utilizando consórcio microbiano composto por *Escherichia coli*, *Acetobacterium woodii*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanobacterium formicicum*. Os autores observaram que *E. coli* fermentou a sacarose produzindo acetato, lactato, etanol, formiato, CO₂ e H₂. Segundo os mesmos autores, *D. vulgaris* (BRS) foi responsável pela oxidação do etanol a acetato, devido ao fato de que em culturas na ausência dessa bactéria, etanol foi detectado como produto ao final dos ensaios. O mesmo pode ter acontecido neste estudo, BRS ou bactérias acetogênicas oxidaram o etanol a acetato que foi utilizado pelas metanogênicas. Desse modo, tanto a metanogênese, quanto a redução de sulfato foram favorecidas.

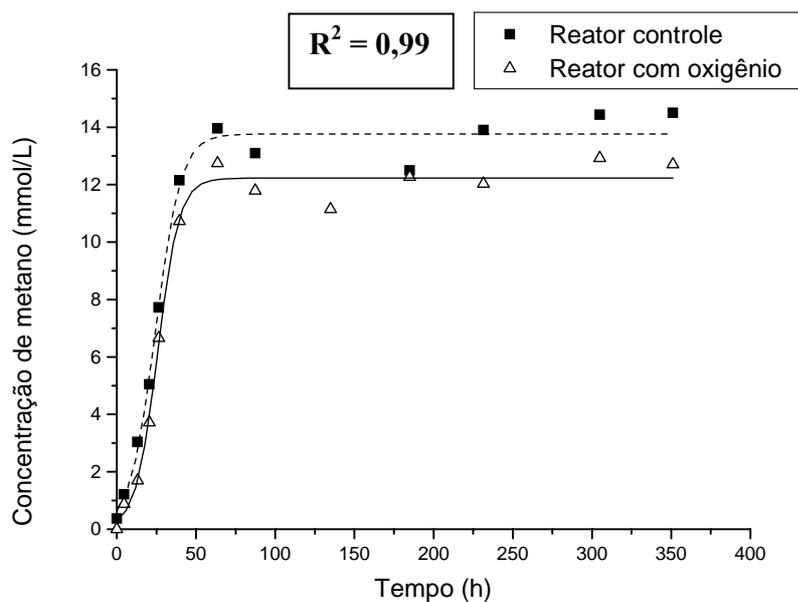


Figura 5.11. Variação temporal da concentração máxima de metano nos reatores contendo etanol com oxigênio e controle.

A concentração máxima de metano nos reatores com etanol e oxigênio e a velocidade máxima de produção do mesmo foram muito semelhantes aos valores observados nos reatores controle. Assim, pode-se supor que a concentração adicionada de oxigênio nos reatores contendo

etanol não inviabilizou a metanogênese.

Tabela 5.11. Velocidade máxima de produção de metano e concentração máxima de metano nos reatores contendo etanol.

Ensaio	Velocidade Máxima de Produção de Metano (mmol/L.h)	Concentração Máxima de Metano (mmol/L)	Período da Produção Máxima de Metano (h)
Etanol/Oxigênio	0,40	13	63,5
Etanol/Controle	0,41	14	63,5

Nos reatores contendo etanol e oxigênio, a concentração inicial de sulfato foi $966,7 \pm 23$ mg/L e final de $226,7 \pm 50$ mg/L, resultando consumo de 76,6% (Figura 5.12). A velocidade máxima de consumo de sulfato foi de 2,6 mg/L.h, observada no tempo inicial (tempo zero) (apêndice C) e velocidade média de $0,98 \pm 0,7$ mg/L.h. O sulfeto no biogás começou a ser detectado após 39,5 horas de operação, atingindo valor máximo de 1,41 mmol/L em 495 horas. A concentração teórica de sulfeto dissolvido foi calculada, observando-se o valor de 4,3 mmol/L. Estequiometricamente, o sulfato adicionado produziria 7,7 mmol/L de sulfeto total (dissolvido e biogás), entretanto, nos reatores foi observado 5,71 mmol/L de sulfeto total, somando-se o valor do sulfeto no biogás com o sulfeto dissolvido calculado. Todavia, este valor foi inferior ao valor calculado estequiometricamente. Desse modo, nesses reatores com oxigênio, conforme observado também nos reatores com acetato, o sulfeto gerado pode ter sido oxidado na redução do oxigênio nas primeiras horas do ensaio.

Nos reatores controle contendo etanol, a concentração inicial de sulfato foi $906,7 \pm 12$ mg/L e final de $366,7 \pm 23$ mg/L, resultando consumo do sulfato de 59,6% (Figura 5.13). A velocidade máxima de consumo de sulfato foi de 2,1 mg/L.h, também observada no início do ensaio ($t=0$) (apêndice D) e velocidade média de $0,74 \pm 0,5$ mg/L.h. O sulfeto presente no biogás começou a ser detectado após 20,5 horas de operação e observou-se concentração máxima de 1,46 mmol/L em 305 horas. A concentração teórica de sulfeto dissolvido também foi calculada, obtendo-se o valor de 4,3 mmol/L. Estequiometricamente, o sulfato adicionado produziria 5,6 mmol/L de sulfeto total (biogás e dissolvido). De acordo com os valores observados no biogás e a

concentração teórica calculada de sulfeto dissolvido, nesses reatores obteve-se 5,8 mmol/L de sulfeto total, valor muito semelhante ao teórico. Portanto, diferente do observado nos reatores com oxigênio, nesse caso pode-se supor que o sulfeto produzido não foi oxidado, uma vez que nesses reatores não havia oxigênio para ser reduzido.

A Tabela 5.12 mostra os valores de consumo de sulfato, tempo de início da detecção do sulfeto no biogás e concentrações máximas de sulfeto observadas nos reatores com oxigênio e controle contendo etanol. Conforme observado na mesma Tabela, nos reatores com etanol e oxigênio foi observada velocidade maior de consumo de sulfato, em comparação com os reatores controle.

Tabela 5.12. Consumo de sulfato, início do tempo de detecção de sulfeto no biogás e concentração máxima de sulfeto nos reatores contendo etanol.

Ensaio	Consumo de Sulfato (%)	Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	Velocidade Máxima Consumo Sulfato (mg/L.h)	Início da Detecção do Sulfeto (h)	Concentração Máxima de Sulfeto no Biogás (mmol/L)
Etanol/Oxigênio	76,6	966,7	2,6	39,5	1,41
Etanol/Controle	59,6	906,7	2,1	20,5	1,46

Conforme observado na Figura 5.10, o consumo total de etanol ocorreu em 72 horas, tanto nos reatores controle, quanto nos reatores com oxigênio. Da mesma maneira como observado nos reatores com acetato, mesmo após o consumo do substrato orgânico, a redução do sulfato não cessou. Nesse caso também foi observada redução na concentração de sólidos totais voláteis no final do ensaio, indicando morte celular. Assim, as BRS podem ter utilizado outros doadores de elétrons na redução do sulfato, como os ácidos orgânicos e hidrogênio. Entretanto, as maiores velocidades de consumo de sulfato foram observadas nas primeiras horas de operação dos reatores, provavelmente devidas ainda à presença de etanol, e quando este foi esgotado, foram utilizados os ácidos liberados pela morte celular.

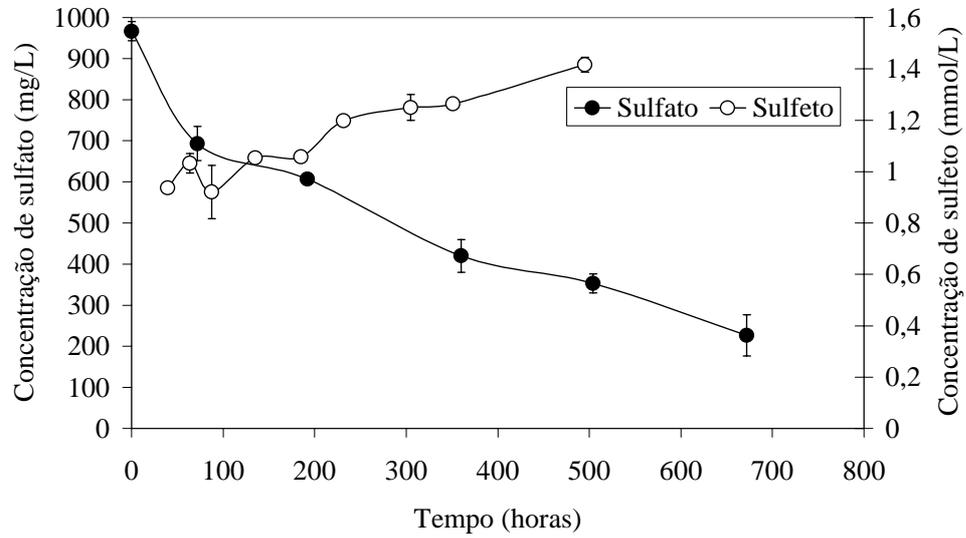


Figura 5.12. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto no biogás dos reatores contendo etanol e oxigênio.

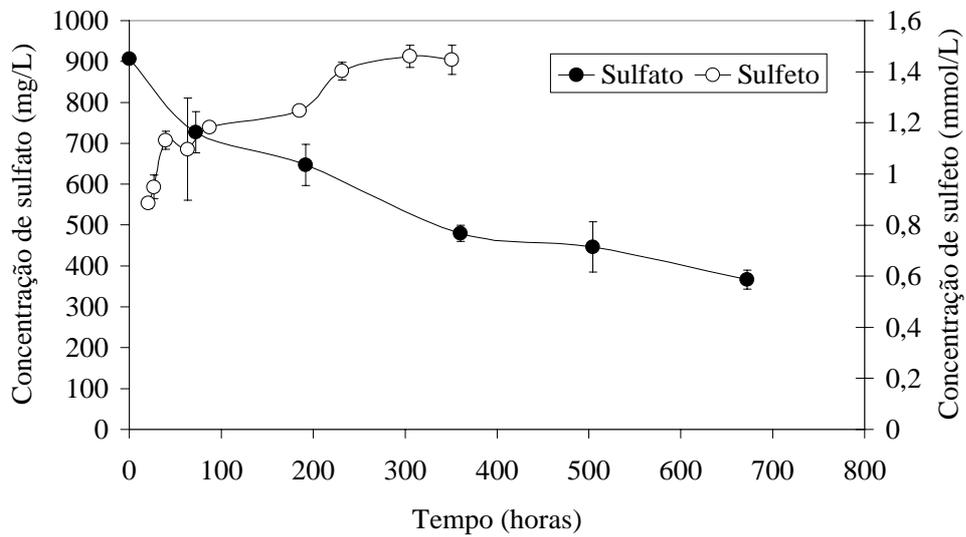


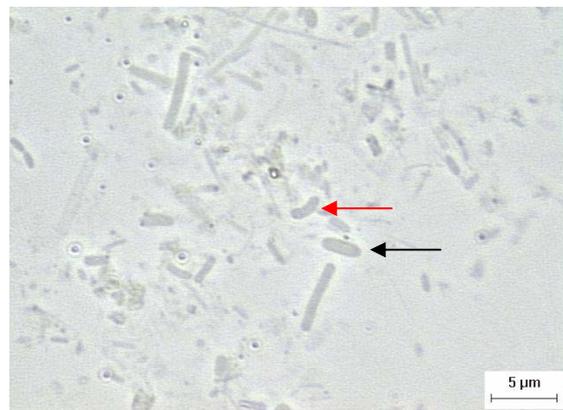
Figura 5.13. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto no biogás dos reatores controle contendo etanol.

5.2.1 Caracterização microbiana

As análises de microscopia mostraram as seguintes morfologias nos reatores controle com etanol: filamentos segmentados, cocos, cocobacilos, bacilos com extremidade arredondada, bacilos curvos, filamentos, morfologias semelhantes a *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. Nos reatores com oxigênio foram observadas as mesmas morfologias, entretanto bacilos curvos foram mais freqüentes. A predominância de *Methanosaeta* sp. foi observada em ambos os reatores. As arqueias pertencentes ao gênero *Methanosarcina* sp. são organismos diversos metabolicamente e podem utilizar outros substratos além do acetato (GARCIA et al., 2000). Todavia, possuem menor afinidade a esse substrato orgânico ($k_s = 4,02$ mM) (DÍAZ et al., 2003). Por outro lado, arqueias semelhantes a *Methanosaeta* sp. utilizam apenas acetato como substrato para a metanogênese, e possuem maior afinidade a este substrato ($k_s = 0,44$ mM) (DÍAZ et al., 2003). Entretanto, nesses reatores com etanol foi observado predomínio de arqueias semelhantes a *Methanosaeta* sp. Provavelmente, BRS ou bactérias acetogênicas oxidaram etanol em acetato, e este foi utilizado por *Methanosaeta* sp. A Tabela 5.13 mostra as freqüências desses organismos observadas nos reatores, e a Figura 5.14 mostras algumas dessas morfologias observadas.



(a)



(b)

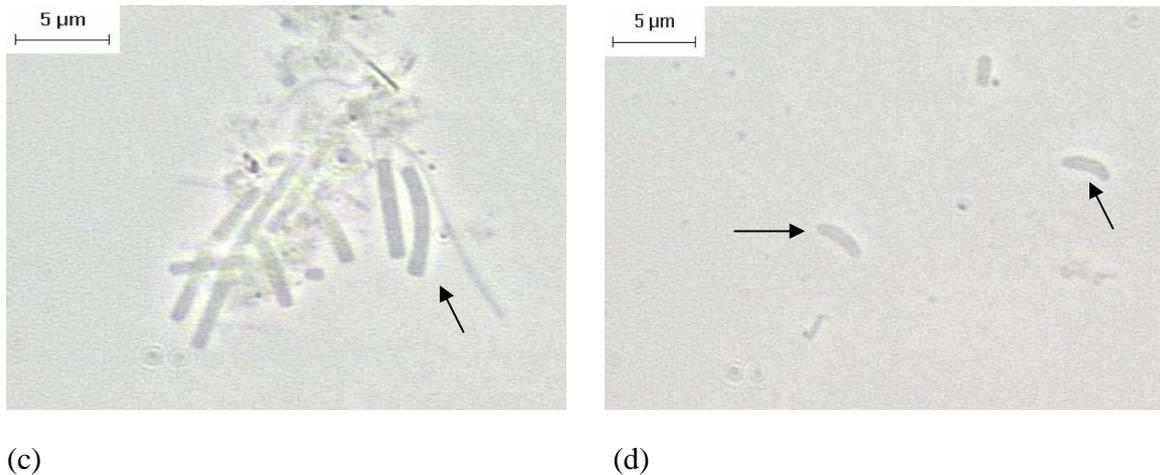


Figura 5.14. Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase nos reatores alimentados com etanol controle (a-b) e com oxigênio (c-d): (a) cocos e filamentos segmentados, (b) bacilo com extremidade arredondada e bacilo curvo, (c) *Methanosaeta* sp., (d) bacilos curvos.

Amostras dos reatores controle e com oxigênio foram retiradas também após 6 dias de operação e ao final do ensaio para hibridação.

Nos reatores controle após 6 dias de operação foram observadas 41,2% (EP: 2,3%), 58,6% (EP: 1,7%) e 23,9% (EP: 0,8%) para as sondas EUB338, ARC915 e SRB385, respectivamente (Figura 5.15). Nos reatores com oxigênio foram verificados 39,7% (EP: 1,8%), 66,3% (EP: 2,5%) e 30,3% (EP: 1,2%), respectivamente (Figura 5.15).

Ao final dos ensaios, nos reatores controle foi observado 35,3% (EP: 2,5%), 58,8% (EP: 2,3%) e 28% (EP: 1,1%), respectivamente, para as sondas EUB338, ARC915 e SRB385 (Figura 5.15). Enquanto nos reatores com oxigênio foram verificados 40,1% (EP: 1,6%), 54,5% (EP: 1,8%) e 16,9% (EP: 0,7%), respectivamente (Figura 5.15). A Tabela 5.14 descreve as porcentagens da contagem das células hibridadas, e a Tabela 5.15 mostra as morfologias das células.

A somatória total das populações hibridadas com as sondas EUB338 mais ARC915 foram, respectivamente, 99,8% e 106%, para amostras dos reatores controle e com oxigênio, com 6 dias de operação; 94,1% e 94,6%, para reatores controle e com oxigênio, ao final dos ensaios.

Tabela 5.13. Morfologias observadas nos reatores contendo etanol.

Morfologias	Reatores controle	Reatores com oxigênio
Arquéias metanogênicas		
<i>Methanosarcina</i> sp.	+++	+++
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++	++++
Cistos de sarcinas	-	-
Bactérias		
Bacilos com extremidades arredondadas	++	++
Bacilos delgados	++++	+++
Bacilos curvos	++	++
Cocobacilos	+++	++++
Cocos	++++	++
Espiroqueta	-	-
Filamentos	+	++
Filamentos segmentados	+++	+++

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não observados.

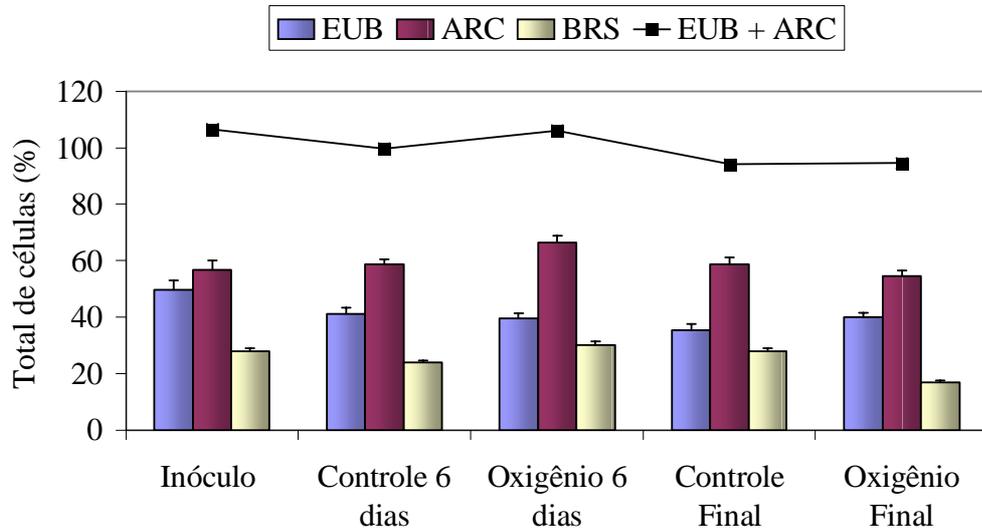


Figura 5.15. Comunidade microbiana nos reatores controle e com oxigênio contendo etanol. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338), *Archaea* (ARC915), BRS da subdivisão delta de *Proteobacteria* (SRB385) e soma dos dois Domínios (EUB338 + ARC915). As barras indicam o erro padrão.

Tabela 5.14. Porcentagens de microrganismos obtidos com o FISH nos reatores controle e com oxigênio contendo etanol.

Amostra	EUB338		ARC915		SRB385	
	(%)	Erro padrão	(%)	Erro padrão	(%)	Erro padrão
Controle/6 dias	41,2	2,3	58,6	1,7	23,9	0,8
Controle/Final	35,3	2,5	58,8	2,3	28	1,1
Oxigênio/6 dias	39,7	1,8	66,3	2,5	30,3	1,2
Oxigênio/Final	40,1	1,6	54,5	1,8	16,9	0,7

Nos reatores controle com 6 dias, a proporção de arqueias (58,6%) foi semelhante a verificada no inóculo (56,7%), e manteve-se com valor semelhante no final do ensaio (58,8%). A população de bactéria diminuiu ao longo do ensaio, comparando-se os valores do inóculo (49,8%), após 6 dias (41,2%) e no final do ensaio (35,3%). A proporção de BRS manteve-se aproximadamente constante.

Nos reatores com oxigênio com 6 dias de operação, a proporção de arqueias (66,3%) aumentou em relação ao inóculo (56,7%), entretanto, diminuiu no final do experimento (54,5%). A população de bactérias diminuiu após 6 dias (39,7%) em relação ao inóculo (49,8%), e manteve proporção semelhante ao final do ensaio (40,1%). A população de BRS após 6 dias de operação (30,3%) apresentou proporção ligeiramente superior ao inóculo (27,9%), e diminuiu no final (16,9%). Nesses ensaios, também, a proporção de BRS foi menor nos reatores com oxigênio, embora o consumo de sulfato tenha sido maior (76,6%), comparando-se com os reatores controle. Conforme aconteceu nos reatores com acetato e oxigênio, nesses reatores com etanol e oxigênio, o sulfato também pode ter sido reduzido por outras bactérias não pertencentes ao grupo das BRS. Desse modo explica-se o alto consumo de sulfato e baixa porcentagem de BRS detectada pelo FISH.

Tabela 5.15. Morfologias das células predominantes nos reatores contendo etanol detectados pelo FISH.

Sondas	Morfologia das Células Híbridadas			
	Controle/6 dias	Controle/Final	Oxigênio/6 dias	Oxigênio/Final
EUB338	Cocos, bacilos, filamentos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos, filamentos
ARC915	Filamentos, bacilos, sarcinas	Filamentos, Cocos, bacilos, sarcinas	Filamentos, cocos, bacilos, sarcinas	Filamentos, cocos, bacilos, sarcinas
SRB385	Cocos, bacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos

5.3. Reatores em batelada contendo lactato de sódio

Nos reatores em batelada contendo lactato de sódio e adição de oxigênio a DQO inicial foi de 1326 ± 5 mg/L, potencial de oxi-redução de 327 ± 6 mV, 3,7 mg/L de OD, sólidos totais voláteis de 4507 mg/L e relação DQO/sulfato de 1,5 (Tabela 5.16).

Os reatores foram operados durante 768 horas, ao final do ensaio a DQO foi igual a 165 ± 4 mg/L, o que resultou eficiência de 87,5%, potencial de oxi-redução de -191 ± 1 mV, OD igual a

zero e sólidos totais voláteis de 3830 ± 127 mg/L. Semelhante ao observado nos outros ensaios com acetato de sódio e etanol, as concentrações de sólidos totais voláteis no final do experimento também foram inferiores em relação aos valores iniciais. O lactato adicionado ($922,5 \pm 27$ mg/L) foi totalmente consumido após 55 horas, isto é, concentração abaixo do limite da curva de calibração (Figura 5.16).

Nos reatores controle com lactato, a DQO inicial foi 1343 ± 36 mg/L, potencial de oxidação de 14 ± 5 mV, sólidos totais voláteis 4507 mg/L e relação DQO/sulfato de 1,4 (Tabela 5.16). Estes reatores também foram operados durante 768 horas, apresentaram DQO final de 147 ± 3 mg/L, resultando eficiência de 89%, potencial de oxidação igual a -181 ± 3 mV e sólidos totais voláteis final de 3750 ± 99 mg/L. O lactato adicionado ($1010,3 \pm 14$ mg/L) foi totalmente consumido em 72 horas, ou seja, concentração inferior ao limite de detecção da curva de calibração (Figura 5.16).

Tabela 5.16. Relação DQO/sulfato, DQO inicial, potencial de oxidação, eficiência de remoção de DQO e sólidos totais voláteis dos reatores em batelada contendo lactato de sódio.

Ensaio	Relação DQO/Sulfato	DQO inicial (mg/L)	Potencial de Oxi-Redução (mV)		Eficiência Remoção DQO (%)	Sólidos Totais Voláteis (mg/L)	
			Inicial	Final		Inicial	Final
Lactato/Oxigênio	1,5	1326	327	-191	87,5	4507	3830
Lactato/Controle	1,4	1343	14	-181	89	4507	3750

Nesses reatores com lactato e oxigênio, conforme observado também com acetato e etanol, o potencial de oxidação foi mais positivo, comparando-se com os reatores controle, possivelmente devido à presença do oxigênio que deixou o meio oxidado. Os reatores controle também, no início do ensaio, apresentaram potencial redox positivo (oxidado), possivelmente devido à ausência de solução redutora e presença de sulfato que possui potencial redox oxidado. No final dos ensaios, os reatores com oxigênio apresentaram potencial redox reduzido, devido a redução do oxigênio e formação de sulfeto. Nos reatores controle também ao final do ensaio, o potencial redox encontrava-se reduzido, entretanto, menos reduzido que nos reatores com oxigênio.

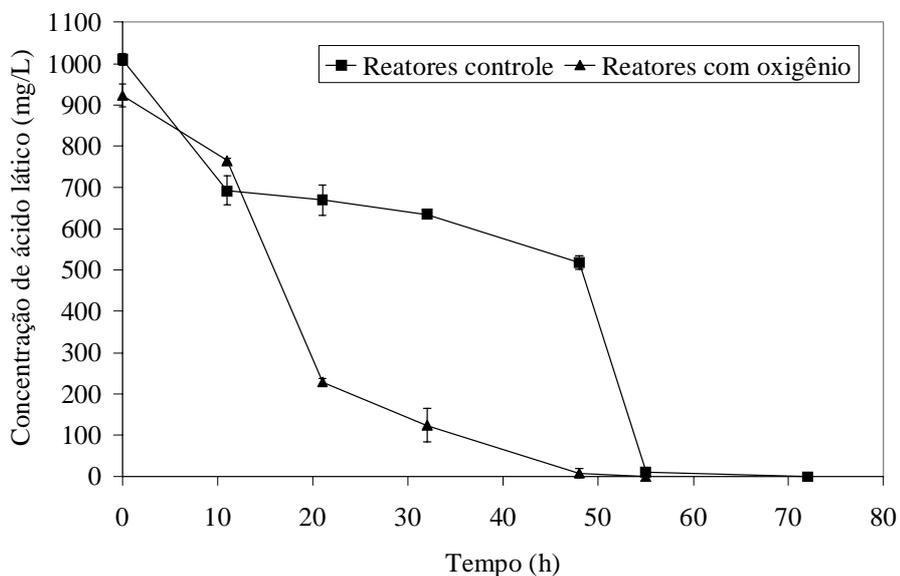


Figura 5.16. Variação temporal do ácido láctico nos reatores em batelada.

Como pode ser observado pela Figura 5.16, nos reatores com oxigênio o consumo de ácido láctico ocorreu em menor tempo que nos reatores controle. Análises cromatográficas detectaram a presença dos ácidos acético, propiônico, fórmico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico, em concentrações que variaram de 1,5 até 150 mg/L, em ambos reatores. As concentrações de ácido acético chegaram a 150 mg/L nos reatores controle, enquanto que nos reatores com oxigênio os valores foram menores de 50 mg/L.

Com relação à produção de metano, nos ensaios com lactato e adição de oxigênio, a velocidade máxima de produção de metano foi de 0,08 mmol//L.h em 50 horas e velocidade média de $0,013 \pm 0,02$ mmol/L, atingindo concentração máxima de 3 mmol/L de metano (Tabela 5.17 Figura 5.17) em 139 horas, estabilizando-se também no mesmo período.

Tabela 5.17. Velocidade máxima de produção de metano e concentração máxima de metano nos reatores contendo lactato de sódio.

Ensaio	Velocidade Máxima de Produção de Metano (mmol/L.h)	Concentração Máxima de Metano (mmol/L)	Período da Produção Máxima de Metano (h)
Lactato/Oxigênio	0,08	3	139
Lactato/Controle	0,16	13	139

Nos reatores controle, a velocidade máxima de produção de metano foi de 0,16 mmol/L.h em 56 horas e velocidade média de $0,034 \pm 0,05$ mmol/L, atingindo concentração máxima de 13 mmol/L de metano (Tabela 5.17 e Figura 5.17) em 139 horas, estabilizando-se em seguida. Nestes reatores, as curvas de produção de metano apresentaram coeficiente de correlação (R^2) iguais a 0,97 e 0,99 para os reatores com oxigênio e controle, respectivamente.

Nos reatores com lactato de sódio e oxigênio ocorreu inibição da produção de metano, fato observado pela menor concentração de metano verificada (3 mmol/L), além da baixa velocidade de produção de metano (0,08 mmol/L.h), comparando-se com as velocidades observadas nos reatores alimentados com os outros substratos (acetato e etanol) na presença de oxigênio.

Os reatores controle também apresentaram velocidades de produção de metano menores em relação aos reatores controle contendo acetato e etanol, o que pode ser explicado pelo fato de o lactato não ser substrato orgânico utilizado pelas metanogênicas. Contudo, ele pode ser metabolizado por bactérias fermentativas e BRS oxidadoras incompletas, a acetato e hidrogênio, os quais são utilizados na metanogênese.

Vazzoler et al. (1996) propuseram uma rota biológica de degradação de compostos orgânicos para explicar a interação metabólica entre as culturas presentes em lodo granulado, submetido a elevadas concentrações de sulfato de sódio. Os autores propuseram que o lactato de sódio seria oxidado parcialmente a acetato pelas BRS, estando assim totalmente disponibilizado para as arqueias metanogênicas, uma vez que nem todas as espécies de BRS oxidam acetato.

Jones et al. (1984) estudaram a metanogênese a partir de sacarose como substrato orgânico, utilizando consórcio microbiano composto por *Escherichia coli*, *Acetobacterium woodii*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanobacterium formicicum*. Os autores observaram que a fermentação da sacarose foi realizada por *E. coli*, produzindo acetato, lactato, etanol, formiato, CO₂ e H₂. Segundo os autores, o lactato produzido teria sido oxidado por *A. woodii*. Na ausência desse organismo, a velocidade máxima de produção de metano foi 30% inferior comparado com experimentos quando esse microrganismo estava presente no consórcio microbiano.

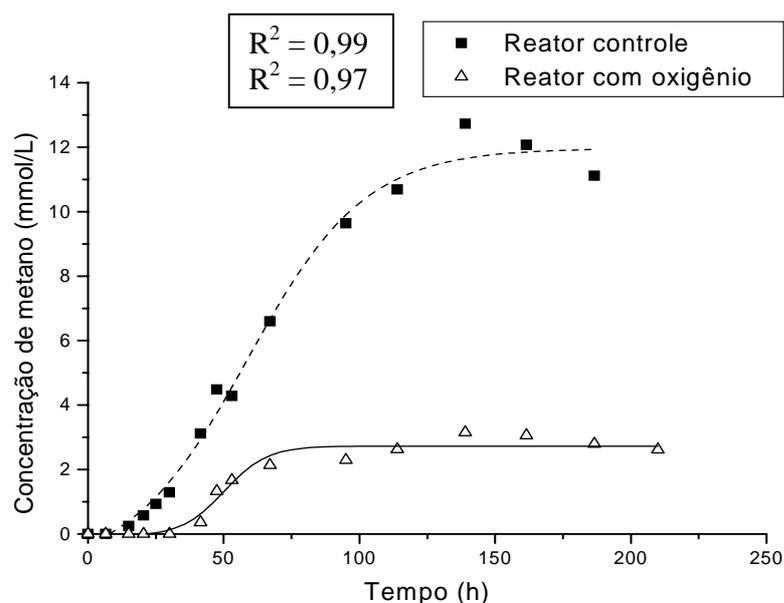


Figura 5.17. Variação temporal da concentração de metano nos reatores contendo lactato com oxigênio e controle.

A concentração inicial de sulfato nos reatores alimentados com lactato e adição de oxigênio foi de 860 ± 28 mg/L e a final de 500 ± 104 mg/L, o que correspondeu ao consumo de 41,9% (Figura 5.18). A velocidade máxima de consumo do sulfato foi de 1,07 mg/L.h, observada no início do ensaio ($t = 0$) (apêndice E) e velocidade média de $0,48 \pm 0,3$ mg/L.h. O sulfato presente no biogás começou a ser detectado após 161,5 horas de ensaio, atingindo valor máximo

de 1,41 mmol/L em 715 horas. A concentração teórica de sulfeto dissolvido foi calculada, obtendo-se o valor de 4,3 mmol/L. Estequiometricamente, o sulfato adicionado produziria 3,7 mmol/L de sulfeto total (biogás e dissolvido), entretanto, nesses reatores o valor de sulfeto total (biogás e dissolvido) observado foi de 5,1 mmol/L, valor superior ao valor teórico estequiométrico. Nesse caso, o valor de sulfeto total foi maior ao observado nos ensaios, em relação ao teórico, o que pode ser devido a aproximações realizadas nos cálculos para quantificação do sulfeto dissolvido, uma vez que este não foi medido nos ensaios, mas foi calculado teoricamente.

Nos reatores controle a concentração inicial de sulfato foi 920 ± 85 mg/L e final de $206,7 \pm 23$ mg/L, resultando consumo de 77,5% (Figura 5.19). A velocidade máxima de consumo de sulfato foi de 7,9 mg/L.h observada também no início do ensaio ($t = 0$) (apêndice F) e velocidade média de $1,14 \pm 1,9$ mg/L.h. O sulfeto no biogás começou a ser detectado após 30 horas, e atingiu concentração máxima de 1,84 mmol/L em 503,5 horas. A concentração teórica de sulfeto dissolvido foi calculada obtendo-se o valor de 4,5 mg/L. Estequiometricamente, o sulfato adicionado produziria 3,7 mmol/L de sulfeto total (biogás e dissolvido). Entretanto, o sulfeto total observado (biogás e dissolvido) nesses reatores foi de 6,3 mmol/L, valor também superior ao teórico estequiométrico. Essa incompatibilidade entre o valor de sulfeto total observado e teórico pode ter ocorrido pelos mesmos motivos citados acima.

A Tabela 5.18 mostra os valores de consumo de sulfato, tempo de início da detecção do sulfeto no biogás e concentrações máximas de sulfeto observadas nos reatores com oxigênio e controle, alimentados com lactato de sódio. Conforme observado na mesma Tabela, nos reatores controle foi verificado maior velocidade de consumo do sulfato, em relação a todas as condições testadas. Desse modo, pode-se supor que dos três substratos orgânicos utilizados, o lactato foi o mais utilizado pelas BRS, confirmando a preferência nutricional para esse substrato (Widdel, 1988).

Tabela 5.18. Consumo de sulfato, início do tempo de detecção de sulfeto no biogás e concentração máxima de sulfeto nos reatores contendo lactato de sódio.

Ensaio	Consumo de Sulfato (%)	Concentração Inicial de Sulfato (mg/L)	Velocidade Máxima Consumo Sulfato (mg/L.h)	Início da Detecção do Sulfeto (h)	Concentração Máxima de Sulfeto no Biogás (mmol/L)
Lactato/Oxigênio	41,9	860	1,07	161,5	1,41
Lactato/Controle	77,5	920	7,9	30	1,84

De acordo com a Figura 5.19, nos reatores controle, as maiores velocidades de consumo de sulfato ocorreram nas primeiras 100 horas, o que pode ter ocorrido devido a disponibilidade de lactato; entre 100 e 300 horas não foi observado consumo de sulfato, e após esse período, até o término dos ensaios, o consumo de sulfato foi lento. Ácidos orgânicos e hidrogênio podem ter sido liberados pela morte celular, e estes substratos utilizados para redução do sulfato após consumo do lactato.

Nos reatores com oxigênio, o consumo do sulfato foi praticamente lento durante todo o período do ensaio. Nesse caso, morte celular também poder ter fornecido ácidos orgânicos e hidrogênio para redução de sulfato. Além disso, acetato e hidrogênio liberados da oxidação do lactato a acetato, por BRS oxidadoras incompletas ou bactérias facultativas, foram utilizados pelas BRS para redução do sulfato.

Fareleira et al. (2003) observaram inibição do consumo de lactato por *Desulfovibrio gigas*, em reatores em batelada, na presença de oxigênio. Neste estudo, o consumo do lactato pelas BRS também pode ter sido inibido pela presença do oxigênio. Desse modo, o substrato foi utilizado por outras bactérias presentes nos reatores.

Nos reatores com oxigênio, foi observado também, que o sulfeto demorou 162 h para começar a ser detectado no biogás, sendo que tal comportamento não foi observado nos reatores controle. Conforme ocorreu nos reatores com acetato e oxigênio, o sulfeto produzido pode ter sido oxidado na redução do oxigênio, tendo como produto sulfato.

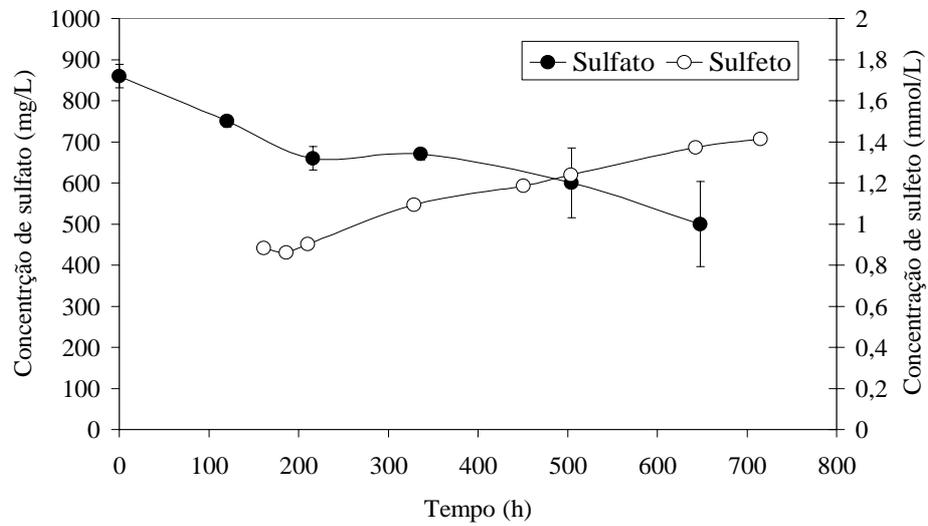


Figura 5.18. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto nos reatores contendo lactato e oxigênio.

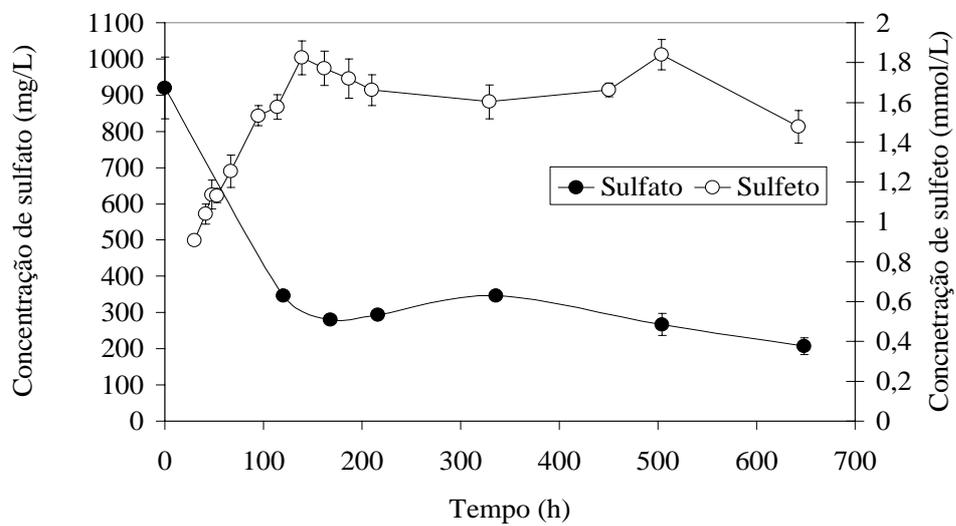


Figura 5.19. Variação temporal da concentração de sulfato e sulfeto nos reatores controle contendo lactato.

5.3.1. Caracterização microbiana

As análises de microscopia mostraram as seguintes morfologias nos reatores controle com lactato: filamentos, filamentos segmentados, bacilos delgados, cocos, bacilos com extremidades arredondados, bacilos delgados, formas semelhantes a *Methanosarcina* sp. e predominância de bacilos curvos, cocobacilos e morfologia semelhante a *Methanosaeta* sp. Nos reatores com oxigênio foram observadas as mesmas formas celulares, com a diferença da presença de cocobacilos em pares, o que não foi observado nos outros reatores. Houve predomínio desses cocobacilos em pares, bacilos com extremidades arredondadas, filamentos segmentados e dois tipos de bacilos curvos. A Tabela 5.19 e Figura 5.20 mostram as morfologias observadas.

Domingues (2001) estudou reatores contendo lactato e sulfato sob condições termofílicas. O autor observou predominância de bacilos com extremidades afiladas semelhantes a *Desulfotomaculum* sp., presença de bacilos retos fluorescentes, bacilos com extremidades arredondadas, endósporos e raros bacilos curvos. Neste trabalho, novamente, não foi observado presença de bacilos retos fluorescentes e nem formas semelhantes a *Desulfotomaculum* sp., como explicado anteriormente.

Nos reatores controle após 6 dias de operação foram observadas 32,7% (EP: 2%), 62,5% (EP: 1,8%) e 16,2% (EP: 1,1%) para as sondas EUB338, ARC915 e SRB385, respectivamente (Figura 5.20). Nos reatores com oxigênio foram verificados 67,6% (EP: 1,6%), 24,8% (EP: 2,3%) e 17,1% (EP: 0,8%), respectivamente (Figura 5.21).

Ao final dos ensaios, nos reatores controle foi observado 35,2% (EP: 1,9%), 56,2% (EP: 1,8%) e 19,5% (EP: 0,8%), respectivamente para as sondas EUB338, ARC915 e SRB385. Nos reatores com oxigênio os valores obtidos foram os seguintes: 63,9% (EP: 2,3%), 35,2% (EP: 1,6%) e 21,9% (EP: 0,9%), (Figura 5.21). A Tabela 5.20 descreve as porcentagens das células hibridadas com as sondas. A Tabela 5.21 e Figura 5.22 mostram as morfologias predominantes detectadas pelo FISH.

A somatória total das populações hibridadas com as sondas EUB338 mais ARC915 foram, respectivamente, 95,2% e 92,4%, para amostras dos reatores controle e com oxigênio, com 6 dias de operação; 91,4% e 99,1%, para reatores controle e com oxigênio, ao final dos ensaios.

Tabela 5.19. Caracterização morfológica dos reatores contendo lactato.

Morfologias	Reatores controle	Reatores com oxigênio
Arquéias metanogênicas		
<i>Methanosarcina</i> sp.	++	+
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++	++++
Cistos de sarcinas	-	+
Bactérias		
Bacilos com extremidades arredondadas	+++	++++
Bacilos delgados	+++	+++
Bacilos curvos	++++	++++
Cocobacilos	++++	+++
Cocobacilos em pares	-	++++
Cocos	+	+++
Espiroqueta	-	-
Filamentos	+	++
Filamentos segmentados	+++	++++

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não observados.

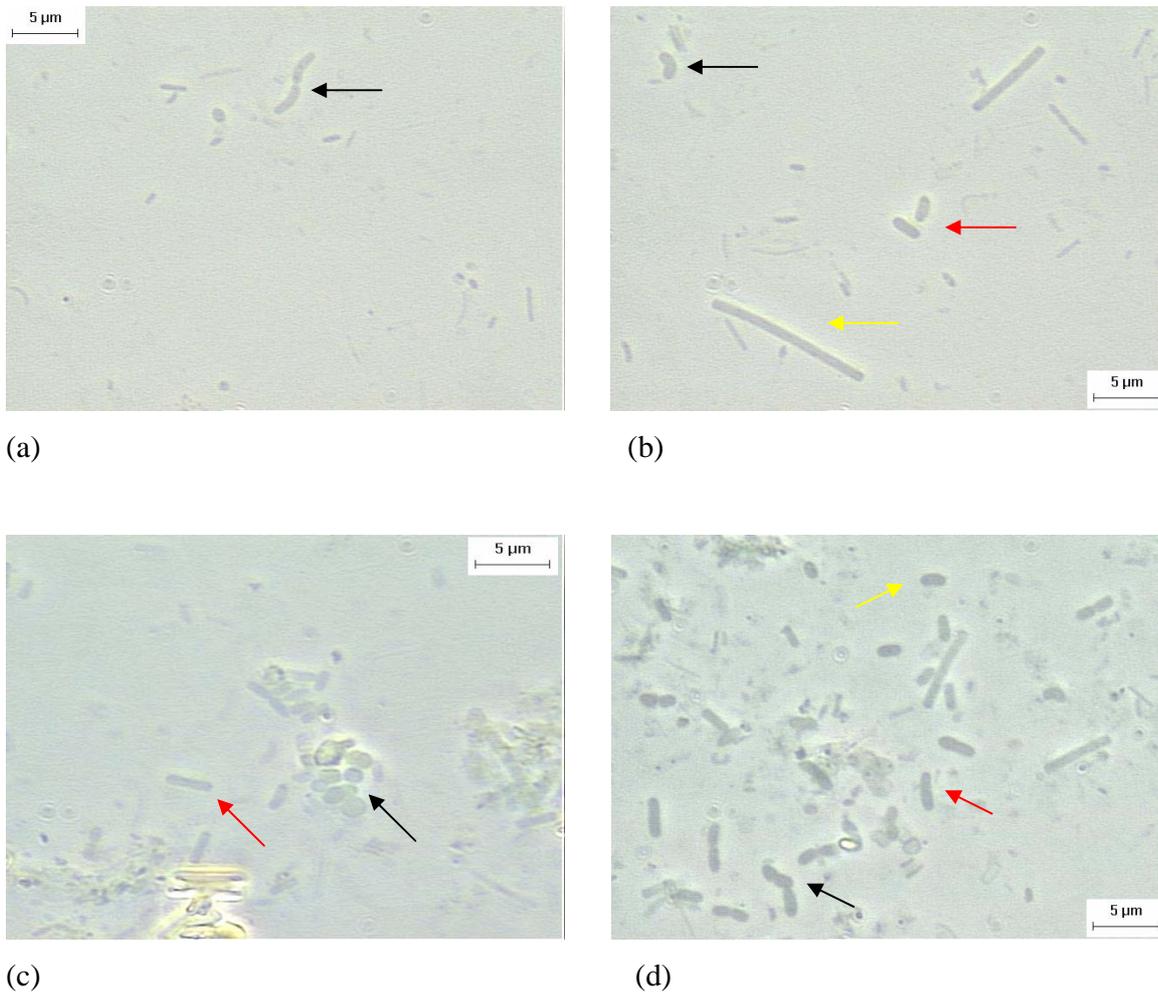


Figura 5.20. Morfologias observadas sob microscopia óptica de contraste de fase nos reatores alimentados com lactato controle (a-b) e com oxigênio (c-d): (a) bacilos curvos semelhantes a *Desulfovibrio* sp., (b) bacilo curvo (seta preta), cocobacilos (seta vermelha) e filamento semelhante a *Methanosaeta* sp. (seta amarela), (c) cocos (seta preta) e bacilos com extremidades arredondadas (seta vermelha), (d) cocobacilos em pares (seta preta), bacilos com extremidades arredondadas (seta vermelha) e cocobacilos (seta amarela).

Tabela 5.20. Porcentagens de microrganismos obtidos com o FISH nos reatores controle e com oxigênio contendo lactato.

Amostras	EUB338		ARC915		SRB385	
	(%)	Erro padrão	(%)	Erro padrão	(%)	Erro padrão
Controle/6 dias	32,7	2	62,5	1,8	16,2	1,1
Controle/Final	35,2	1,9	56,2	1,8	19,5	0,8
Oxigênio/6 dias	67,6	1,6	24,8	2,3	17,1	0,8
Oxigênio/Final	63,9	2,3	35,2	1,6	21,9	0,9

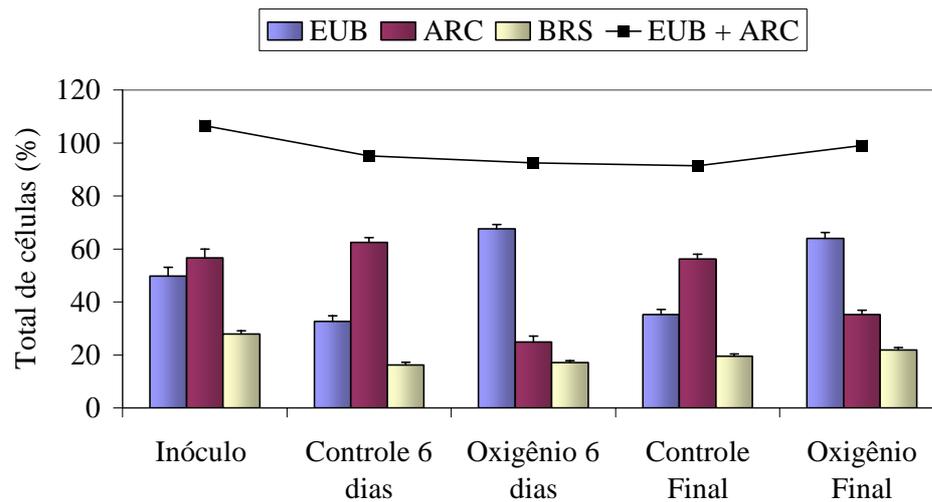


Figura 5.21. Comunidade microbiana nos reatores controle e com oxigênio alimentados com lactato. Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Bacteria* (EUB338), *Archaea* (ARC915), BRS da subdivisão delta de *Proteobacteria* (SRB385) e soma dos dois Domínios (EUB338 + ARC915). As barras indicam o erro padrão.

Tabela 5.21. Morfologias das células predominantes nos reatores contendo lactato detectadas pelo FISH.

Sondas	Morfologia das Células Híbridadas			
	Controle/6 dias	Controle/Final	Oxigênio/6 dias	Oxigênio/Final
EUB338	Cocos, bacilos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos, filamentos	Cocos, bacilos, cocobacilos, filamentos	Cocos, bacilos, cocobacilos
ARC915	Filamentos, cocos, bacilos, sarcinas	Filamentos, cocos, bacilos, sarcinas	Filamentos, bacilos	Filamentos, cocos
SRB385	Cocos, bacilos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos	Cocos, bacilos, cocobacilos

Nos reatores controle contendo lactato, também se observou predomínio de organismos metanogênicos (52,6%), ao final do ensaio. A população de BRS diminuiu em relação ao inóculo, apesar do consumo de 77,5% de sulfato. A população de *Bacteria* diminuiu consideravelmente em relação ao inóculo. Domingues (2001), diferente do que foi observado neste trabalho, verificou predomínio de organismos do Domínio *Bacteria* (80%) e elevada proporção de BRS (56,3% - 67,4%) em reatores em batelada alimentados com lactato e sulfato, sob condições termofílicas, entretanto o lodo utilizado como inóculo era diferente do utilizado neste trabalho. Os organismos metanogênicos não utilizam lactato na metanogênese, entretanto, organismos acetogênicos e também BRS oxidadoras incompletas, podem ter oxidado lactato a acetato, e este foi utilizado pelas metanogênicas, conforme citado anteriormente.

Nos reatores com adição de oxigênio ocorreu o inverso, a população de bactérias prevaleceu (63,9%, no final do ensaio). Apesar da predominância de bactérias, as BRS corresponderam a apenas 21,9% do total de organismos do Domínio *Bacteria*.

Nestes reatores com oxigênio populações de bactérias não pertencentes ao grupo das BRS, provavelmente facultativas, competiram pelo lactato com as BRS, e prevaleceram nessa condição nutricional. Isto pode ser comprovado pelo baixo consumo de sulfato nesses reatores e pela elevada proporção de células pertencentes ao Domínio *Bacteria* detectadas pelo FISH, em comparação com a proporção de BRS.

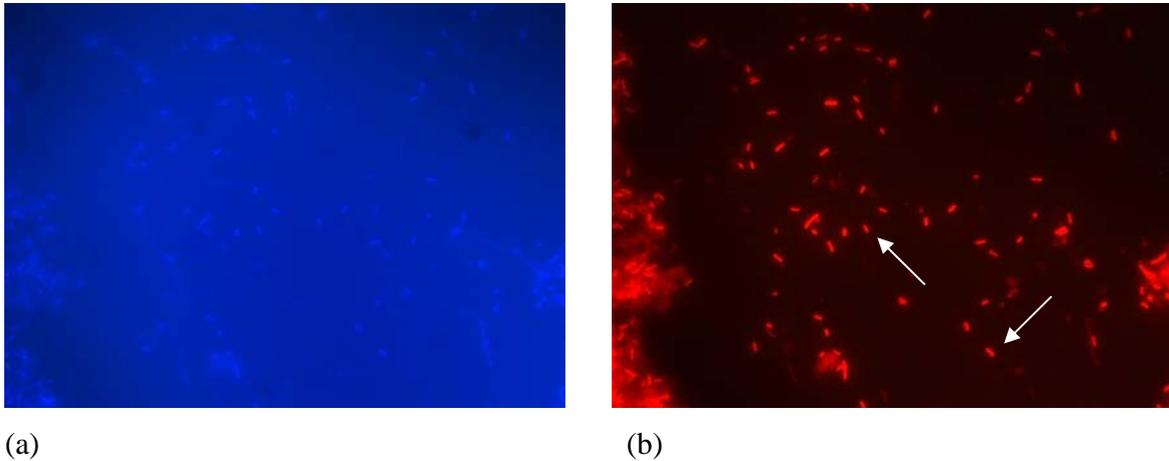


Figura 5.22. Morfologias hibridadas com a sonda EUB338 nos reatores contendo lactato com oxigênio: (a) coloração com DAPI, (b) bacilos.

5.4. Comparação do desempenho dos reatores anaeróbios em batelada

A Tabela 5.22 mostra os resultados das análises de produção de metano e consumo de sulfato nos reatores controle e com oxigênio contendo acetato, etanol e lactato.

Tabela 5.22. Comparação dos resultados de produção de metano e consumo de sulfato dos reatores contendo acetato, etanol e lactato.

Ensaio	Velocidade Máxima Produção Metano (mmol/L.h)	Concentração Máxima Metano (mmol/L)	Período Consumo Total Substrato (h)	Consumo de Sulfato (%)	Velocidade Máxima Consumo Sulfato (mg/L.h)
Acetato/Controle	0,30	19	120	57	1,01
Acetato/Oxigênio	0,27	19	72	97	1,97
Etanol/Controle	0,41	14	72	59,6	2,1
Etanol/Oxigênio	0,40	13	72	76,6	2,6
Lactato/Controle	0,16	13	72	77,5	7,9
Lactato/Oxigênio	0,08	3	55	41,9	1,07

Com base na Tabela 5.22 a quantidade de oxigênio escolhida neste trabalho (3 – 3,5 mg/L) não afetou a metanogênese nos reatores contendo acetato e etanol, comparando-se as concentrações máximas de metano e velocidades máximas de produção deste, com os valores observados nos reatores controles anaeróbios. Nos reatores com lactato a presença do oxigênio afetou significativamente a metanogênese, conforme pode-se observar pelos valores das concentrações máximas de metano obtidas e velocidades máximas de produção dos reatores com oxigênio.

As maiores velocidades de produção de metano foram observadas nos reatores contendo etanol. Jones et al. (1984) avaliaram a metanogênese em culturas mista de organismos contendo *Desulfovibrio vulgaris*, *Acetobacterium woodi* e *Methanosarcina barkeri*. Os autores observaram que o etanol foi oxidado a acetato por *D. vulgaris*, o qual foi utilizado na metanogênese. O mesmo comportamento pode ter acontecido neste trabalho, nos reatores contendo etanol. Desse modo, não houve competição pelo acetato pelas BRS e arqueias metanogênicas, resultando as maiores velocidades de produção de metano. Por outro lado, o lactato foi o substrato utilizado que menos favoreceu a metanogênese, de acordo com as velocidades de produção de metano observadas com este substrato.

A redução de sulfato ocorreu nos reatores contendo acetato e etanol na presença de oxigênio, em valores superiores aos observados nos reatores controle. A presença do oxigênio pode ter favorecido algumas populações de bactérias tolerantes ao oxigênio e que também utilizam sulfato. Em contrapartida, nos reatores com lactato e oxigênio a redução de sulfato ocorreu em menor proporção. Provavelmente, no inóculo estiveram presentes em sua maioria BRS anaeróbias estritas. Desse modo, o crescimento dessas células foi desfavorecido na presença de oxigênio, embora tendo lactato como substrato preferencial para o crescimento dessas células.

As maiores velocidades de consumo de sulfato, em todos os reatores, ocorreu nas primeiras horas de ensaio. Possivelmente, no início dos ensaios, a redução do sulfato ocorreu por meio da utilização dos substratos orgânicos adicionados (acetato, etanol e lactato), com o esgotamento destes, o restante do sulfato foi reduzido utilizando-se ácidos orgânicos e hidrogênio provenientes da morte celular, e como consequência, menores velocidades de consumo do sulfato.

Tabela 5.23. Comparação dos resultados obtidos com FISH, nos reatores contendo acetato, etanol e lactato.

Amostras	ARC915 (%)		EUB338 (%)		SRB385 (%)	
	6 dias	Final	6 dias	Final	6 dias	Final
Acetato/controle	49,6	59,2	40,5	37,6	30,7	22
Acetato/oxigênio	59	60,7	40,4	31,1	24,9	17,3
Etanol/controle	58,6	58,8	41,2	35,3	23,9	28
Etanol/oxigênio	66,3	54,5	39,7	40,1	30,3	16,9
Lactato/controle	62,5	56,2	32,7	35,2	16,2	19,5
Lactato/oxigênio	24,8	35,2	67,6	63,9	17,1	21,9

De acordo com a Tabela 5.23, organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* foram predominantes em todas as condições estudadas, inclusive nos reatores em que foi adicionado oxigênio. A exceção ocorreu nos reatores contendo lactato e oxigênio, nos quais houve predomínio dos organismos do Domínio *Bacteria*. Omil et al. (1997) observaram proporção de 40 a 95% de organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* em reator UASB em escala de bancada, após exposição do lodo ao ar durante 24 h. Da mesma forma como ocorreu neste trabalho, as metanogênicas foram predominantes, mesmo na presença do oxigênio. Além disso, os autores, ainda no mesmo estudo, verificaram que dentre os organismos metanogênicos, *Methanosaeta* sp. foi predominante após exposição ao ar. O que também foi observado neste estudo, ou seja, predomínio de *Methanosaeta* sp. nos reatores contendo acetato, etanol e lactato com adição de oxigênio.

As BRS estiveram presentes em todas as condições estudadas, inclusive nos reatores com adição de oxigênio. Entretanto, é possível observar que nesses reatores ocorreu diminuição da porcentagem de BRS ao final do ensaio, com exceção dos reatores contendo lactato, nos quais os valores ao final dos ensaios foram pouco maiores que os observados com 6 dias de operação. De fato, as BRS estão presentes em ambientes expostos ao oxigênio, como biomassa cianobacteriana

e sedimentos. Sass et al. (1997) observaram população ativa de BRS em sedimento lacustre exposto ao oxigênio, sendo que a maior parte dos organismos isolados pertencia a *Desulfovibrio* sp.

6. CONCLUSÕES

- A quantidade adicionada de oxigênio (3 – 3,5 mg/L de OD) nos reatores contendo acetato de sódio e etanol não inibiu a metanogênese, de acordo com os valores das velocidades de produção e concentrações de metano observadas. Entretanto, nos reatores contendo lactato e oxigênio, a metanogênese foi severamente inibida, também com base nos valores observados nos reatores controle alimentados com o mesmo substrato.
- A presença do oxigênio nos reatores contendo acetato e etanol não prejudicou a redução de sulfato. Nesses reatores, inclusive, observou-se maior consumo de sulfato, comparando-se com os reatores controle. Ao contrário, nos reatores contendo lactato e oxigênio ocorreu pouco consumo de sulfato.
- Dos três substratos orgânicos utilizados, o lactato de sódio foi o menos favorável para a metanogênese, de acordo com as menores concentrações e velocidades de produção de metano em relação ao acetato e etanol.
- Com base no FISH, organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* foram predominantes nos reatores contendo acetato e etanol, nas condições controle e com oxigênio; e lactato na condição controle. Nos reatores contendo lactato e oxigênio houve predomínio de células pertencentes ao Domínio *Bacteria*. As BRS estiveram presentes em todas condições estudadas, inclusive na presença de oxigênio.
- Conforme os dados deste trabalho, pode-se concluir que as arqueias metanogênicas e as bactérias redutoras de sulfato podem tolerar a presença de oxigênio no meio, inclusive manter suas atividades metabólicas de produção de metano e redução de sulfato, respectivamente.

7. RECOMENDAÇÕES

- Avaliar, por meio de PCR/DGGE e sequenciamento os microrganismos presentes em reatores submetidos à presença do oxigênio, com ênfase nas populações de BRS e arqueias metanogênicas.
- Utilizar concentrações menores de oxigênio dissolvido, que a usada neste trabalho, em reatores anaeróbios em batelada, com o intuito de avaliar quais grupos de microrganismos prevaleceriam.
- Realizar ensaios sob condições desnitrificantes e sulfetogênicas simultaneamente, com a finalidade de avaliar a utilização do nitrato pelas BRS e evitar a liberação de sulfeto, que é corrosivo e tóxico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, D. S. **Desnitrificação e caracterização filogenética de bactérias de vida livre aderidas às partículas no hipolímnio do Lago Kizaki, Japão.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

AMANN, R. L. et al. Combination of 16S rRNA-target oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1919-1925, 1990.

APHA, AWWA, WPCF. **Standard methods for examination of water and wastewater.** American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation, Washington, 1998.

ARAÚJO, J. C. **Biofilmes anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

CANFIELD, D.E; DES MARAIS, D.J. Aerobic sulfate reduction in microbial mats. **Science**, v. 251, p. 1471-1473, 1991.

CYPIONKA, H. Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 54, p. 827-848, 2000.

DANNENBERG, S. KRODER, M.; DILLING, W.; CYPIONKA, H. Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 158, P. 93-99, 1992.

DÍAZ, E.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 57-64, 2003.

DILLING, W.; CYPIONKA, H. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 71, p. 123-128, 1990.

DOMINGUES, M.R. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e de leito fixo, sob condições termofílicas**. 165 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

ESCHEMANN, A.; KÜHL, M.; CYPIONKA, H. Aerotaxis in *Desulfovibrio*. **Environmental Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 489-494, 1999.

ESTRADA-VÁZQUEZ, C.; MACARIE, H.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; ESPARZA-GARCÍA, F.; POGGI-VARALDO, H. M. The effect of the supplementation with a primary carbon source on the resistance to oxygen exposure of methanogenic sludge. **Water Science & Technology**, v. 48, n. 6, p. 119-124, 2003.

FARELEIRA, P.; SANTOS, B.S.; ANTÔNIO, C.; MORADAS-FERREIRA, P.; LeGALL, J.; XAVIER, A.V.; SANTOS, H. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas*. **Microbiology**, v. 149, p. 1513-1522, 2003.

GARCIA, J., PATEL, B.K.C., OLLIVIER, B. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. **Anaerobe**, v. 6, p. 205-226, 2000.

HAHN, D.; LUDWIG, W.; AKKERMANS, A. D. L.; SCHLEIFER, K. H. Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA target, fluorescent labeled oligonucleotides. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 879-887, 1992.

HIRASAWA, J.S. **Avaliação da comunidade microbiana anaeróbia em reator sulfetogênico utilizando a hibridação in situ com sondas fluorescentes (FISH)**. 82 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

HOLMER, M.; STORKHOLM, P. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. **Freshwater Biology Special Review**, v. 46, p. 431-451, 2001.

JENNEY JUNIOR., F.E.; VERHAGEN, M.F.J.M.; CUI, X.; ADAMS, M.W.W. Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. **Science**, v. 286, p. 306-309, 1999.

JOHNSON, M. S.; ZHULIN, I.B.; GAPUZAN, M.E.R.; TAYLOR, B.L. Oxygen-dependent growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5598-5601, 1997.

JONES, W. J.; GUYOT, J.; WOLFE, R. S. Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 1-6, 1984.

KATO, M. T.; FIELD, J. A.; LETTINGA, G. Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 4, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66321997000400015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 fev 2007. Pré-publicação. doi: 10.1590/S0104-66321997000400015

KJELDSSEN, K. U.; JOULIAN, C.; INGVORSEN, K. Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 2038-2043, 2004.

KREKELER, D.; CYPIONKA, H. The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 17, p. 271-278, 1995.

KREKELER, D.; SIGALEVICH, P.; TESKE, A.; CYPIONKA, H.; COHEN, Y. A sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar Lake (Sinai), *Desulfovibrio oxycliniae* sp. nov. **Archives of Microbiology**, v. 167, p. 369-375, 1997.

KREKELER, D; TESKE, A.; CYPIONKA, H. Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p. 89-96, 1998.

LENS, P. N.; DE POORTER, M. P.; CRONENBERG, C. C.; VERSTRAETE, W. H. Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems. **Water Research**, v. 29, p. 871-880, 1994.

LENS, P.N.L.; VISSER, A.; JANSSEN, A.J.H.; HULSHOFF POL, L.,W.; LETTINGA, G. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41-88, 1998.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PRKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Tradução de Cynthia Maria Kyaw. New Jersey: Prentice Hall, 1997.

MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Environmental Microbiology**, v. 15, p. 593-600, 1992.

MARSCHALL, C; FRENZEL, P; CYPIONKA, H. Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 159, p. 168-173, 1993.

MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. **Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos**. In: VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia. Recife: editora Universitária – UFPE, 2000. p. 235-238.

OMIL, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; LENS, P.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Effect of the inoculation with *Desulforhabdus amnigenus* and pH or O₂ shocks on the competition between sulphate reducing and methanogenic bacteria in an acetate fed UASB reactor. **Bioresource Technology**, p. 113-122, 1997.

RASKIN, L.; STROMLEY, J. M.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. A. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1232-1240, 1994.

SASS, H.; CYPIONKA, H.; BABENZIEN, H. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 245-255, 1997.

SIGALEVICH, P; COHEN, Y. Oxygen-dependent growth of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* in coculture with *Marinobacter* sp. strain MB in an aerated sulfate-depleted chemostat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 5019-5023, 2000.

STAHL, D. A.; AMANN, R. I. **Development and application of nucleic acid techniques in bacterial systematics**. London: John Wiley & Sons Ltd., p. 207-248, 1991.

TESKE, A. Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2943-2951, 1998.

VAZZOLER, R. F.; MONTENEGRO, M. A. P.; CALLADO, N.H.; FORESTI, E. **Uma proposta para o metabolismo do sulfato em um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com glicose, acetato e metanol**. In: 11º Simpósio Nacional de Fermentações, São Carlos, 1996.

WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: ZEHNDER, A. J. B. **Biology of anaerobic microorganisms**. John Wiley & Sons Inc., 1988. p. 469-586.

WIDDEL, F.; PFENNING, N. Dissimilatory sulfate or sulfur reducing bacteria. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer. V. 2, 1984.

YODA, M.; KITAGAWA, M.; MYAJI, Y. Long term competition between sulfate reducing and methane producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. **Water Research**, v. 21, p. 1547-1556, 1987.

ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester. *Methanotrix* sp. as an important aceticlastic methanogen. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, p. 796-807, 1984.

ZITOMER, D. H. Stoichiometry of combined aerobic and methanogenic COD transformation. **Water Research**, v. 32, p. 669-676, 1997.

ZITOMER, D. H.; SHROUT, J. D. Feasibility and benefits of methanogenesis under oxygen-limited conditions. **Waste Management**, v. 18, p. 107-116, 1998.

APÊNDICE A – Velocidades de consumo de sulfato nos reatores contendo acetato de sódio.

Reatores com Oxigênio

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	-1,97	517,02	-0,73
16,68	-1,94	533,69	-0,71
33,36	-1,88	550,37	-0,68
50,03	-1,82	567,05	-0,66
66,71	-1,76	583,73	-0,64
83,39	-1,70	600,41	-0,62
100,07	-1,65	617,08	-0,60
116,75	-1,60	633,76	-0,58
133,42	-1,55	650,44	-0,56
150,10	-1,50	667,12	-0,54
166,78	-1,45	683,80	-0,53
183,46	-1,40	700,47	-0,51
200,14	-1,36	717,15	-0,49
216,81	-1,31	733,83	-0,48
233,49	-1,27	750,51	-0,46
250,17	-1,23	767,19	-0,45
266,85	-1,19	783,86	-0,43
283,53	-1,15	800,54	-0,42
300,20	-1,12	817,22	-0,41
316,88	-1,08	833,90	-0,39
333,56	-1,05	850,58	-0,38
350,24	-1,01	867,25	-0,37
366,92	-0,98	883,93	-0,36
383,59	-0,95	900,61	-0,35
400,27	-0,92	917,29	-0,33
416,95	-0,89	933,97	-0,32
433,63	-0,86	950,64	-0,31
450,31	-0,83	967,32	-0,30
466,98	-0,81	984,00	-0,30
483,66	-0,78		
500,34	-0,75		

Reatores controle

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	-1,01	517,02	-0,45
16,68	-1,00	533,69	-0,44
33,36	-0,97	550,37	-0,43
50,03	-0,95	567,05	-0,42
66,71	-0,92	583,73	-0,40
83,39	-0,90	600,41	-0,39
100,07	-0,87	617,08	-0,38
116,75	-0,85	633,76	-0,37
133,42	-0,83	650,44	-0,36
150,10	-0,81	667,12	-0,35
166,78	-0,79	683,80	-0,34
183,46	-0,77	700,47	-0,34
200,14	-0,75	717,15	-0,33
216,81	-0,73	733,83	-0,32
233,49	-0,71	750,51	-0,31
250,17	-0,69	767,19	-0,30
266,85	-0,67	783,86	-0,29
283,53	-0,65	800,54	-0,29
300,20	-0,64	817,22	-0,28
316,88	-0,62	833,90	-0,27
333,56	-0,60	850,58	-0,26
350,24	-0,59	867,25	-0,26
366,92	-0,57	883,93	-0,25
383,59	-0,56	900,61	-0,24
400,27	-0,54	917,29	-0,24
416,95	-0,53	933,97	-0,23
433,63	-0,51	950,64	-0,23
450,31	-0,50	967,32	-0,22
466,98	-0,49	984,00	-0,22
483,66	-0,47		
500,34	-0,46		

APÊNDICE B – Velocidades de consumo de sulfato nos reatores contendo etanol.

Reatores com oxigênio

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	-2,65	353,08	-0,70
11,39	-2,59	364,47	-0,67
22,78	-2,48	375,86	-0,64
34,17	-2,37	387,25	-0,62
45,56	-2,27	398,64	-0,59
56,95	-2,18	410,03	-0,56
68,34	-2,08	421,42	-0,54
79,73	-1,99	432,81	-0,52
91,12	-1,91	444,20	-0,50
102,51	-1,83	455,59	-0,47
113,90	-1,75	466,98	-0,45
125,29	-1,68	478,37	-0,44
136,68	-1,60	489,76	-0,42
148,07	-1,54	501,15	-0,40
159,46	-1,47	512,54	-0,38
170,85	-1,41	523,93	-0,37
182,24	-1,35	535,32	-0,35
193,63	-1,29	546,71	-0,34
205,02	-1,24	558,10	-0,32
216,41	-1,18	569,49	-0,31
227,80	-1,13	580,88	-0,29
239,19	-1,08	592,27	-0,28
250,58	-1,04	603,66	-0,27
261,97	-0,99	615,05	-0,26
273,36	-0,95	626,44	-0,25
284,75	-0,91	637,83	-0,24
296,14	-0,87	649,22	-0,23
307,53	-0,84	660,61	-0,22
318,92	-0,80	672,00	-0,21
330,31	-0,77		
341,69	-0,73		

Reatores controle

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	-2,10	353,08	-0,51
11,39	-2,05	364,47	-0,49
22,78	-1,96	375,86	-0,47
34,17	-1,87	387,25	-0,45
45,56	-1,79	398,64	-0,43
56,95	-1,71	410,03	-0,41
68,34	-1,63	421,42	-0,39
79,73	-1,56	432,81	-0,37
91,12	-1,49	444,20	-0,35
102,51	-1,42	455,59	-0,34
113,90	-1,35	466,98	-0,32
125,29	-1,29	478,37	-0,31
136,68	-1,23	489,76	-0,29
148,07	-1,18	501,15	-0,28
159,46	-1,12	512,54	-0,27
170,85	-1,07	523,93	-0,26
182,24	-1,03	535,32	-0,24
193,63	-0,98	546,71	-0,23
205,02	-0,93	558,10	-0,22
216,41	-0,89	569,49	-0,21
227,80	-0,85	580,88	-0,20
239,19	-0,81	592,27	-0,19
250,58	-0,78	603,66	-0,18
261,97	-0,74	615,05	-0,18
273,36	-0,71	626,44	-0,17
284,75	-0,68	637,83	-0,16
296,14	-0,65	649,22	-0,15
307,53	-0,62	660,61	-0,15
318,92	-0,59	672,00	-0,14
330,31	-0,56		
341,69	-0,54		

APÊNDICE C – Velocidades de consumo de sulfato nos reatores contendo lactato de sódio.

Reatores com oxigênio

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	-1,08	340,47	-0,39
10,98	-1,06	351,46	-0,38
21,97	-1,02	362,44	-0,36
32,95	-0,99	373,42	-0,35
43,93	-0,96	384,41	-0,34
54,92	-0,93	395,39	-0,33
65,90	-0,90	406,37	-0,32
76,88	-0,87	417,36	-0,31
87,86	-0,84	428,34	-0,30
98,85	-0,81	439,32	-0,29
109,83	-0,78	450,31	-0,28
120,81	-0,76	461,29	-0,27
131,80	-0,73	472,27	-0,26
142,78	-0,71	483,25	-0,25
153,76	-0,69	494,24	-0,24
164,75	-0,66	505,22	-0,24
175,73	-0,64	516,20	-0,23
186,71	-0,62	527,19	-0,22
197,69	-0,60	538,17	-0,21
208,68	-0,58	549,15	-0,21
219,66	-0,56	560,14	-0,20
230,64	-0,54	571,12	-0,19
241,63	-0,52	582,10	-0,19
252,61	-0,51	593,08	-0,18
263,59	-0,49	604,07	-0,17
274,58	-0,47	615,05	-0,17
285,56	-0,46	626,03	-0,16
296,54	-0,44	637,02	-0,16
307,53	-0,43	648,00	-0,15
318,51	-0,42		
329,49	-0,40		

Reatores controle

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	-7,87	340,47	-0,15
10,98	-7,39	351,46	-0,13
21,97	-6,49	362,44	-0,11
32,95	-5,70	373,42	-0,10
43,93	-5,00	384,41	-0,09
54,92	-4,39	395,39	-0,08
65,90	-3,85	406,37	-0,07
76,88	-3,38	417,36	-0,06
87,86	-2,97	428,34	-0,05
98,85	-2,61	439,32	-0,05
109,83	-2,29	450,31	-0,04
120,81	-2,01	461,29	-0,04
131,80	-1,76	472,27	-0,03
142,78	-1,55	483,25	-0,03
153,76	-1,36	494,24	-0,02
164,75	-1,19	505,22	-0,02
175,73	-1,05	516,20	-0,02
186,71	-0,92	527,19	-0,02
197,69	-0,81	538,17	-0,01
208,68	-0,71	549,15	-0,01
219,66	-0,62	560,14	-0,01
230,64	-0,55	571,12	-0,01
241,63	-0,48	582,10	-0,01
252,61	-0,42	593,08	-0,01
263,59	-0,37	604,07	-0,01
274,58	-0,32	615,05	-0,01
285,56	-0,28	626,03	-0,01
296,54	-0,25	637,02	0,00
307,53	-0,22	648,00	0,00
318,51	-0,19		
329,49	-0,17		

APÊNDICE D – Velocidades de produção de metano reatores contendo acetato de sódio.

Reatores com oxigênio

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	0,0343	246,16	0,0000
7,94	0,0440	254,10	0,0000
15,88	0,0680	262,04	0,0000
23,82	0,1017	269,98	0,0000
31,76	0,1454	277,92	0,0000
39,70	0,1946	285,86	0,0000
47,64	0,2394	293,81	0,0000
55,58	0,2661	301,75	0,0000
63,53	0,2645	309,69	0,0000
71,47	0,2354	317,63	0,0000
79,41	0,1895	325,57	0,0000
87,35	0,1405	333,51	0,0000
95,29	0,0978	341,45	0,0000
103,23	0,0651	349,39	0,0000
111,17	0,0420	357,33	0,0000
119,11	0,0266	365,27	0,0000
127,05	0,0166	373,21	0,0000
134,99	0,0103	381,15	0,0000
142,93	0,0064	389,09	0,0000
150,87	0,0039	397,03	0,0000
158,81	0,0024	404,97	0,0000
166,75	0,0015	412,92	0,0000
174,69	0,0009	420,86	0,0000
182,64	0,0006	428,80	0,0000
190,58	0,0003	436,74	0,0000
198,52	0,0002	444,68	0,0000
206,46	0,0001	452,62	0,0000
214,40	0,0001	460,56	0,0000
222,34	0,0000	468,50	0,0000
230,28	0,0000		
238,22	0,0000		

Reatores controle

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	0,0492	172,60	0,0004
5,57	0,0588	178,17	0,0003
11,14	0,0811	183,74	0,0002
16,70	0,1097	189,31	0,0001
22,27	0,1448	194,87	0,0001
27,84	0,1850	200,44	0,0001
33,41	0,2266	206,01	0,0000
38,97	0,2640	211,58	0,0000
44,54	0,2902	217,14	0,0000
50,11	0,2995	222,71	0,0000
55,68	0,2895	228,28	0,0000
61,25	0,2627	233,85	0,0000
66,81	0,2251	239,42	0,0000
72,38	0,1834	244,98	0,0000
77,95	0,1434	250,55	0,0000
83,52	0,1085	256,12	0,0000
89,08	0,0801	261,69	0,0000
94,65	0,0581	267,25	0,0000
100,22	0,0415	272,82	0,0000
105,79	0,0294	278,39	0,0000
111,36	0,0207	283,96	0,0000
116,92	0,0145	289,53	0,0000
122,49	0,0101	295,09	0,0000
128,06	0,0070	300,66	0,0000
133,63	0,0049	306,23	0,0000
139,19	0,0034	311,80	0,0000
144,76	0,0023	317,36	0,0000
150,33	0,0016	322,93	0,0000
155,90	0,0011	328,50	0,0000
161,47	0,0008		
167,03	0,0005		

APÊNDICE E – Velocidades de produção de metano nos reatores contendo etanol.

Reatores com oxigênio

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	0,0722	260,08	0,0000
8,39	0,1375	268,47	0,0000
16,78	0,2982	276,86	0,0000
25,17	0,4009	285,25	0,0000
33,56	0,3154	293,64	0,0000
41,95	0,1520	302,03	0,0000
50,34	0,0533	310,42	0,0000
58,73	0,0163	318,81	0,0000
67,12	0,0048	327,20	0,0000
75,51	0,0014	335,59	0,0000
83,90	0,0004	343,98	0,0000
92,29	0,0001	352,37	0,0000
100,68	0,0000	360,76	0,0000
109,07	0,0000	369,15	0,0000
117,46	0,0000	377,54	0,0000
125,85	0,0000	385,93	0,0000
134,24	0,0000	394,32	0,0000
142,63	0,0000	402,71	0,0000
151,02	0,0000	411,10	0,0000
159,41	0,0000	419,49	0,0000
167,80	0,0000	427,88	0,0000
176,19	0,0000	436,27	0,0000
184,58	0,0000	444,66	0,0000
192,97	0,0000	453,05	0,0000
201,36	0,0000	461,44	0,0000
209,75	0,0000	469,83	0,0000
218,14	0,0000	478,22	0,0000
226,53	0,0000	486,61	0,0000
234,92	0,0000	495,00	0,0000
243,31	0,0000		
251,69	0,0000		

Reatores controle

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	0,1052	184,42	0,0000
5,95	0,1485	190,37	0,0000
11,90	0,2499	196,32	0,0000
17,85	0,3570	202,27	0,0000
23,80	0,4111	208,22	0,0000
29,75	0,3728	214,17	0,0000
35,69	0,2706	220,12	0,0000
41,64	0,1650	226,07	0,0000
47,59	0,0897	232,02	0,0000
53,54	0,0456	237,97	0,0000
59,49	0,0224	243,92	0,0000
65,44	0,0108	249,86	0,0000
71,39	0,0052	255,81	0,0000
77,34	0,0025	261,76	0,0000
83,29	0,0012	267,71	0,0000
89,24	0,0006	273,66	0,0000
95,19	0,0003	279,61	0,0000
101,14	0,0001	285,56	0,0000
107,08	0,0001	291,51	0,0000
113,03	0,0000	297,46	0,0000
118,98	0,0000	303,41	0,0000
124,93	0,0000	309,36	0,0000
130,88	0,0000	315,31	0,0000
136,83	0,0000	321,25	0,0000
142,78	0,0000	327,20	0,0000
148,73	0,0000	333,15	0,0000
154,68	0,0000	339,10	0,0000
160,63	0,0000	345,05	0,0000
166,58	0,0000	351,00	0,0000
172,53	0,0000		
178,47	0,0000		

APÊNDICE F – Velocidades de produção de metano nos reatores contendo lactato de sódio.**Reatores com oxigênio**

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	0,0009	110,34	0,0002
3,56	0,0012	113,90	0,0002
7,12	0,0018	117,46	0,0001
10,68	0,0027	121,02	0,0001
14,24	0,0042	124,58	0,0000
17,80	0,0064	128,14	0,0000
21,36	0,0096	131,69	0,0000
24,92	0,0143	135,25	0,0000
28,47	0,0210	138,81	0,0000
32,03	0,0301	142,37	0,0000
35,59	0,0417	145,93	0,0000
39,15	0,0551	149,49	0,0000
42,71	0,0685	153,05	0,0000
46,27	0,0792	156,61	0,0000
49,83	0,0841	160,17	0,0000
53,39	0,0818	163,73	0,0000
56,95	0,0729	167,29	0,0000
60,51	0,0600	170,85	0,0000
64,07	0,0463	174,41	0,0000
67,63	0,0340	177,97	0,0000
71,19	0,0240	181,53	0,0000
74,75	0,0165	185,08	0,0000
78,31	0,0111	188,64	0,0000
81,86	0,0074	192,20	0,0000
85,42	0,0049	195,76	0,0000
88,98	0,0032	199,32	0,0000
92,54	0,0021	202,88	0,0000
96,10	0,0014	206,44	0,0000
99,66	0,0009	210,00	0,0000
103,22	0,0006		
106,78	0,0004		

Reatores controle

Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)	Tempo (h)	Velocidades (mg/L.h)
0,00	0,0297	172,86	0,0010
5,58	0,0345	178,44	0,0007
11,15	0,0452	184,02	0,0005
16,73	0,0585	189,59	0,0004
22,31	0,0744	195,17	0,0003
27,88	0,0924	200,75	0,0002
33,46	0,1117	206,32	0,0002
39,03	0,1307	211,90	0,0001
44,61	0,1471	217,47	0,0001
50,19	0,1587	223,05	0,0001
55,76	0,1634	228,63	0,0000
61,34	0,1604	234,20	0,0000
66,92	0,1504	239,78	0,0000
72,49	0,1349	245,36	0,0000
78,07	0,1163	250,93	0,0000
83,64	0,0969	256,51	0,0000
89,22	0,0785	262,08	0,0000
94,80	0,0620	267,66	0,0000
100,37	0,0481	273,24	0,0000
105,95	0,0368	278,81	0,0000
111,53	0,0279	284,39	0,0000
117,10	0,0209	289,97	0,0000
122,68	0,0156	295,54	0,0000
128,25	0,0115	301,12	0,0000
133,83	0,0085	306,69	0,0000
139,41	0,0063	312,27	0,0000
144,98	0,0046	317,85	0,0000
150,56	0,0034	323,42	0,0000
156,14	0,0025	329,00	0,0000
161,71	0,0018		
167,29	0,0013		

APÊNDICE G – Concentrações de metano produzidas nos reatores contendo acetato se sódio (triplicata).

Tempo acumulado (h)	Concentração de metano (mmol/L)			Tempo acumulado (h)	Concentração de metano (mmol/L)		
	Reatores Acetato/controle				Reatores Acetato/oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	-0,2643	-0,2590	-0,2494	0,00	-0,4079	-0,3631	-0,3616
5,00	0,0687	0,1082	0,1300	9,50	-0,1305	-0,0613	-0,1035
14,50	0,5901	0,6808	0,8201	15,00	0,1976	0,2149	0,1631
20,00	1,0912	1,2864	2,1228	22,00	0,7032	0,5845	0,5281
27,00	1,5483	1,5373	2,9647	35,50	3,5398	2,8795	2,9069
40,50	5,0844	4,6477	7,7476	42,00	4,2696	3,5228	3,5127
47,00	5,9338	5,5483	8,6888	48,50	7,2168	5,9659	6,0736
53,50	9,4488	8,7891	13,1671	60,50	9,1848	7,7061	7,7541
65,50	11,8084	10,5852	14,8890	68,00	10,5352	8,9629	9,0553
73,00	13,1704	12,5245	15,2551	84,50	16,1691	13,9924	14,4001
89,50	17,1076	16,6388	16,9727	108,50	15,9058	15,9228	16,0073
113,00	16,0055	15,5270	15,9047	132,00	18,9053	18,7461	19,2268
137,00	18,6052	18,7337	18,6762	155,50	18,7603	18,2126	18,5665
160,50	18,0608	17,9810	18,7013	180,00	17,2922	17,5035	17,3886
185,00	17,3154	16,7908	17,1334	204,00	17,6006	17,7799	17,6018
209,00	17,2501	17,1310	17,3459	277,00	16,6485	16,0968	16,0937
282,00	18,3788	18,0909	19,2857	300,00	15,7291	16,0060	16,7972
328,50	16,5579	16,4598	15,5927	323,50	16,3640	16,6243	15,5406
448,50	19,2280	19,2792	17,0907	468,50	15,1983	15,5178	18,0130
473,50	15,7879	15,5974	17,0492	541,00	18,0590	18,3670	17,9867
546,00	17,8754	17,6333	18,4880	612,00	17,5955	18,1647	19,2036
617,00	17,9278	17,7224	15,6135	659,50	18,8181	19,1776	16,5243
664,50	19,1809	19,2914	12,4094	707,50	16,1878	16,3707	13,2946
712,50	16,6425	16,4076		780,00	12,8598	12,5606	14,3886
785,00	13,8869	13,8068		828,00	14,1961	13,9673	15,9323

APÊNDICE H – Concentrações de metano produzidas nos reatores contendo etanol (triplicata).

Tempo acumulado (h)	Concentração de metano (mmol/L)			Tempo acumulado (h)	Concentração de metano (mmol/L)		
	Reatores Etanol/controle				Reatores Etanol/oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	0,4215	0,3864	0,3074	0,00	-0,2984	0,0897	-0,1503
4,50	1,3651	1,1647	1,1246	4,50	-0,0961	0,8769	0,0166
13,00	3,3341	2,7520	3,0289	13,00	0,3000	2,6576	0,7332
20,50	5,3889	4,7032	5,0513	20,50	0,9912	5,2956	2,1356
26,50	8,1129	7,7095	7,3459	26,50	2,3038	8,8134	4,4959
39,50	12,7531	11,4770	12,2279	39,50	5,3274	11,3413	10,1073
63,50	13,2954	13,9327	14,6458	63,50	13,0081	13,0388	12,4463
87,50	13,6950	12,5018	7,1067	87,50	7,7367	11,5777	11,9989
185,00	13,5046	12,0634	11,0849	135,00	14,0933	11,1455	12,2644
231,50	14,0918	12,8840	14,2402	185,00	9,9060	11,6788	12,3839
305,00	14,8276	13,3779	14,3455	231,50	16,4401	12,5372	13,3133
351,00	14,2470	14,1540	15,1264	305,00	17,9069	12,3686	13,0388
				351,00	17,4148	11,4985	12,2517

APÊNDICE I – Concentração de metano produzida nos reatores contendo lactato de sódio (triplicata).

Tempo acumulado (h)	Concentração de metano (mmol/L)			Tempo acumulado (h)	Concentração de metano (mmol/L)		
	Reatores Lactato/controle				Reatores Lactato/oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	-0,3423	-0,3024	-0,2975	0,00	-0,4052	-0,4067	-0,3960
6,50	-0,2280	-0,1645	-0,1543	6,50	-0,4339	-0,4207	-0,4068
15,00	0,0495	0,2533	0,4388	15,00	-0,3918	-0,3872	-0,3936
20,50	0,3530	0,5864	0,7797	20,50	-0,3949	-0,3936	-0,4018
25,00	0,6843	0,9155	1,1932	30,00	-0,2738	-0,2948	-0,3454
30,00	1,0164	0,9952	1,8728	41,50	0,8426	0,5460	0,1632
41,50	2,3795	3,0707	3,9123	47,50	1,5689	1,6319	1,0111
47,50	3,6863	4,3924	5,3774	53,00	1,2558	1,8547	1,4824
53,00	3,5241	4,2197	5,1033	67,00	1,4443	2,1331	2,1397
67,00	5,8430	6,7880	7,1572	95,00	1,6027	2,3096	2,2781
95,00	9,4731	9,2639	10,1862	114,00	1,8606	2,6308	2,6264
114,00	10,7935	10,3536	10,9213	139,00	2,2773	3,1810	3,1146
139,00	12,7190	12,4594	13,0246	161,50	2,1893	3,0770	3,0451
161,50	12,2308	11,5234	12,4659	186,50	2,0137	2,8002	2,7894
186,50	11,1951	10,7094	11,4533	210,00	1,8862	2,6587	2,5704
210,00	9,8415	10,2048	10,6758	329,00	2,9732	3,6032	3,8597
329,00	8,1133	9,8907	10,0889	450,50	2,9196	3,6247	3,6389
450,50	10,1094	9,2316	9,2167	503,50	2,8512	3,7400	3,5786
503,50	10,8399	10,6927	11,0575	642,50	3,0591	3,9763	4,2990
642,50	7,5459	6,9174	8,0119	715,00	3,1809	3,8716	3,9617

APÊNDICE J – Consumo de sulfato nos reatores contendo acetato de sódio (triplicata).

Tempo acumulado (h)	Consumo de sulfato (mg/L)			Tempo acumulado (h)	Consumo de sulfato (mg/L)		
	Reatores controle				Reatores com oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	960	940	720	0,00	1000	920	840
72,00	900	660	800	120,00	900	900	760
168,00	800	640	860	288,00	580	520	640
288,00	600	700	680	456,00	520	500	560
456,00	660	560	580	624,00	300	320	280
624,00	620	480	500	792,00	200	200	180
792,00	540	460	440	984,00	20	40	80
984,00	440	480	380				

APÊNDICE K – Consumo de sulfato nos reatores contendo etanol (triplicata).

Tempo acumulado (h)	Consumo de sulfato (mg/L)			Tempo acumulado (h)	Consumo de sulfato (mg/L)		
	Reatores controle				Reatores com oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	900	900	920	0,00	980	940	980
72,00	780	720	680	72,00	740	660	680
192,00	700	640	600	192,00	620	600	600
360,00	460	480	500	360,00	460	420	380
504,00	380	460	500	504,00	380	340	340
672,00	340	380	380	672,00	280	220	180

APÊNDICE L – Consumo de sulfato nos reatores contendo lactato de sódio (triplicata).

Tempo acumulado (h)	Consumo de sulfato (mg/L)			Tempo acumulado (h)	Consumo de sulfato (mg/L)		
	Reatores controle				Reatores com oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	760	980	860	0,00	880	840	740
120,00	340	360	340	120,00	740	760	1020
168,00	280			216,00	680	640	
216,00	280	300	300	336,00	660	680	760
336,00	340	360	340	504,00	380	660	540
504,00	300	260	240	648,00	560	560	380
648,00	180	220	220				

APÊNDICE M – Consumo ácido acéticos nos reatores em triplicara.

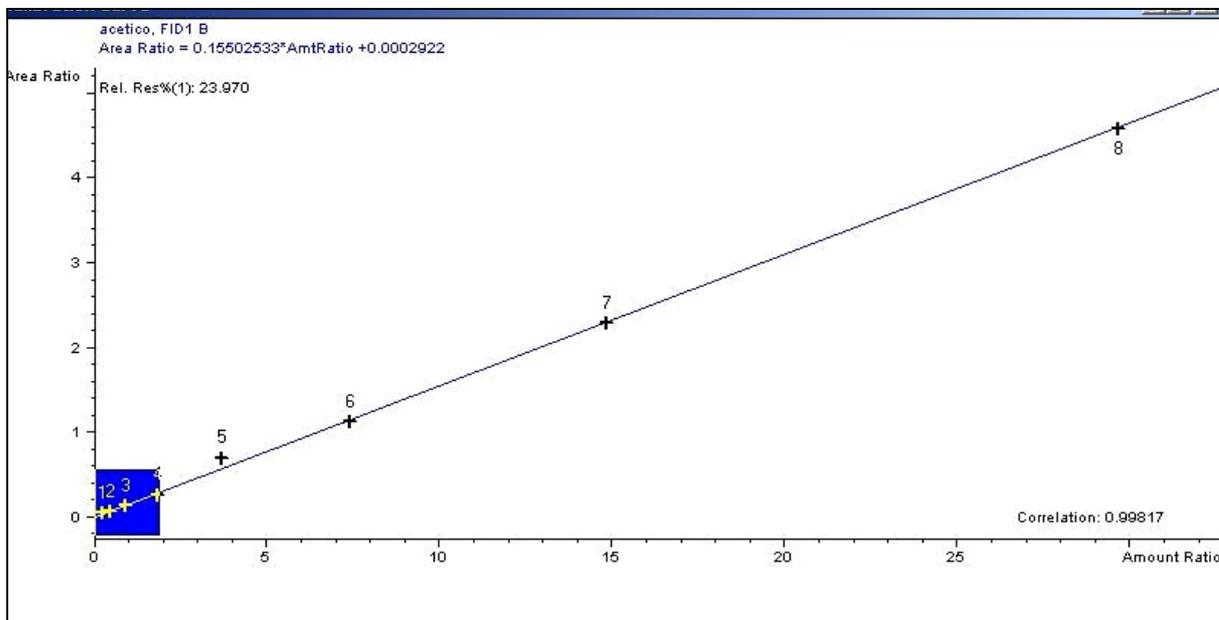
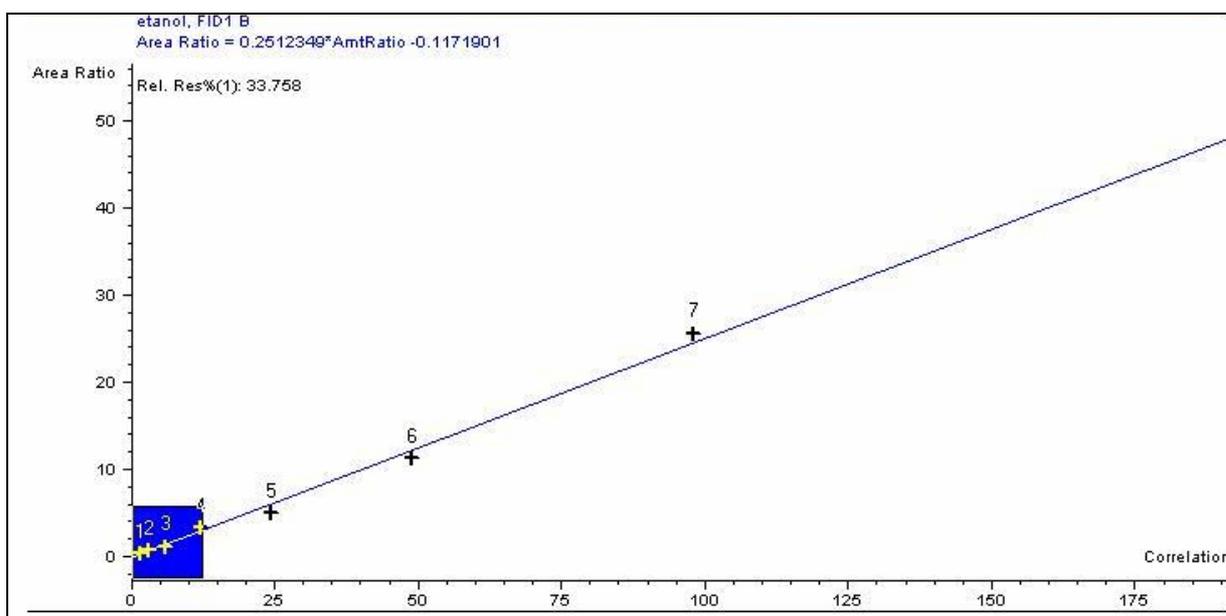
Tempo acumulado (h)	Consumo de ácido acético (mg/L)			Tempo acumulado (h)	Consumo de ácido acético (mg/L)		
	Reatores controle				Reatores com oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	874,5	691,98	706,48	0,00	643,5	763,78	
13,00	641,68	617,66	575,18	24,00	645,78	494,76	580,64
24,00	493,58	525,04	417,3	48,00	497,94	499,7	584,26
48,00	355,63	325,83	270,87	72,00	309,17	328,02	326,36
72,00	110,02	120,64	3,1	120,00	8,34	4,34	3,94
120,00	0	2,84	0				

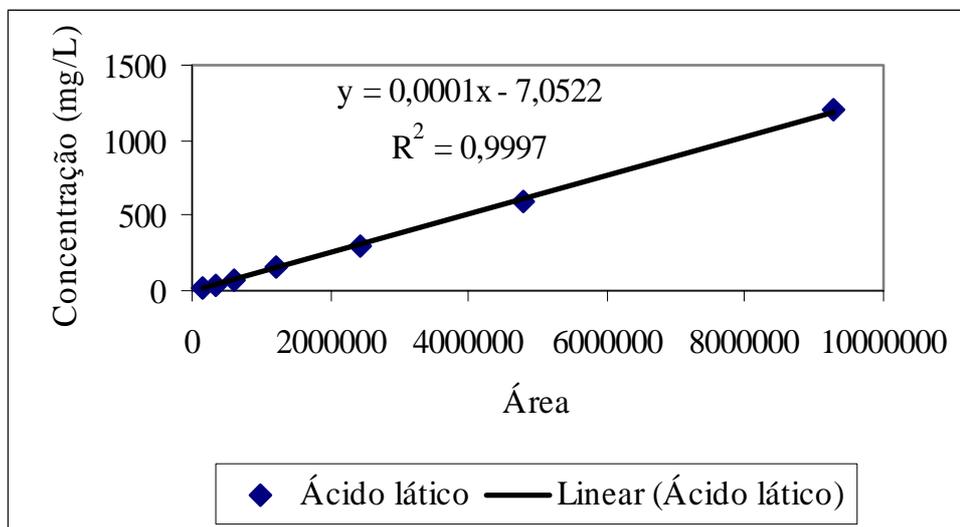
APÊNDICE N – Consumo do etanol nos reatores em triplicata.

Tempo acumulado (h)	Consumo de etanol (mg/L)			Tempo acumulado (h)	Consumo de etanol (mg/L)		
	Reatores controle				Reatores com oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	348,76	287,3	454,9	0,00	245,76	230,48	216,78
13,00	290,02	229,06	349,9	13,00	206,15	173,71	213,47
21,00	247,32	253,9	213,65	21,00	196,7	149,06	197,25
30,00	126,37	179,7		30,00	150,64	78,67	
48,00	19,96	24,7	20,38	48,00	81,5	88,87	23,03
72,00	20	19,6	20,08	72,00	22,94	23,05	

APÊNDICE O – Consumo de ácido láctico nos reatores em triplicata

Tempo acumulado (h)	Consumo de ácido láctico (mg/L)			Tempo acumulado (h)	Consumo de ácido láctico (mg/L)		
	Reatores controle				Reatores com oxigênio		
	Reator 1	Reator 2	Reator 3		Reator 1	Reator 2	Reator 3
0,00	934,5	1000,5	1020,1	0,00	941,6	903,4	864,4
11,00	945,4	667,1	717,6	11,00	769,1	761,3	710,3
21,00	696,3	543,5	643,8	21,00	112,8	235,70	222,8
32,00	638,4	753,3	632	32,00	44,6	96,2	153,1
48,00	530,4	506,7		48,00	0	21,9	4,3
55,00	7,1	0	15,3	55,00	0	0	0
72,00	0	0	0				

ANEXO A – Curva de calibração do ácido acético.**ANEXO B – Curva de calibração do etanol.**

ANEXO C – Curva de calibração do ácido láctico.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)