

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSO*  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MARIA ISABEL STETS

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MATERIAL SUPORTE E  
CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DE REATORES  
ANAERÓBIOS PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTE DE  
ABATEDOURO

PONTA GROSSA  
2008

Maria Isabel Stets

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MATERIAL SUPORTE E  
CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DE REATORES  
ANAERÓBIOS PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTE DE  
ABATEDOURO

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
para obtenção do grau de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos da Universidade Estadual de Ponta  
Grossa-PR

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Barana  
Co-orientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert  
Galvão

PONTA GROSSA  
2008

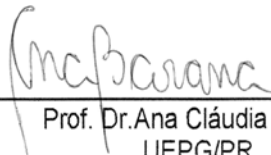
## TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA ISABEL STETS

### “AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MATERIAL SUPORTE E CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DE REATORES ANAERÓBIOS PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO”

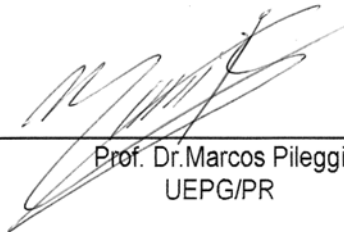
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:

Ponta Grossa, 17 de Março de 2008.



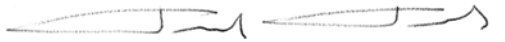
---

Prof. Dr. Ana Cláudia Barana  
UEPG/PR



---

Prof. Dr. Marcos Pileggi  
UEPG/PR



---

Prof. Dr. Fernando Fernandes  
UEL/PR

Ponta Grossa  
2008

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer. Aquele que tem idéias é forte, mas aquele que tem ideais é invencível. Não é o desafio com o qual nos deparamos, que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira correta com que respondemos ao desafio. E, enquanto acreditamos no nosso sonho, nada é por acaso."

Anônimo

*Aos meus pais  
À minha irmã  
Aos meus amigos*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

*Cada novo amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos.*

*Miguel Unamuno*

A Deus, meu Senhor, por todas as bênçãos que me concedeu, que muitas pessoas chamam de sorte ou de coincidência;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

A minha orientadora, Ana Cláudia Barana, por partilhar comigo seus conhecimentos, pela generosidade, confiança, atenção e paciência. Pela liberdade a mim concedida para que pudesse acrescentar análises que não constavam nas etapas do projeto;

A minha co-orientadora, Carolina Weigert Galvão, por ter aceitado o desafio de orientar a realização das análises por biologia molecular. Pela amizade, apoio incondicional, dedicação, paciência e generosidade;

Aos meus pais, Antônio e Emília Stets, pelo exemplo, educação, carinho e incentivo;

À minha irmã, Sandra Stets, pela amizade, paciência em me ouvir, por me acompanhar em muitos finais de semana e noites no laboratório, seu apoio foi fundamental;

Às alunas de iniciação científica: Maria Angélica Vivan (Magé), Vanessa Leifeld, Ana Paula Peron e Carolina Pereira (Carol), pela dedicação na realização deste projeto, pelo companheirismo, amizade e momentos de descontração. A ajuda de vocês foi essencial para a realização deste projeto;

Ao matadouro de Ponta Grossa, pela concessão do substrato utilizado neste projeto e à Cervejaria FEMSA, por ceder gentilmente o inóculo utilizado nos reatores;

Ao doutorando Rafael Mazer Etto, pelas contribuições e sugestões essenciais na realização deste projeto, por compartilhar generosamente seus conhecimentos, pela dedicação prestada, o que o fazia deixar seu próprio projeto de lado para ajudar a solucionar os problemas que surgiam durante o percurso. Pela amizade, confiança e incentivo;

A todos os professores do programa de mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos, por estarem sempre dispostos a colaborar;

Ao professor Marcos Pileggi, por acompanhar e incentivar meu trabalho desde minha graduação, pelas contribuições feitas na qualificação e na defesa;

À professora Adriana Scoton Antonio Chinelatto, do Departamento de Engenharia de Materiais, pela ajuda nas análises dos materiais suporte;

Ao Nilton, pela ajuda com a microscopia ótica;

Ao professor Marcelo De Julio, do Departamento de Engenharia Civil, pelas importantes contribuições feitas na qualificação;

Ao professor Fernando Fernandes, da Universidade Estadual de Londrina, pelas importantes contribuições feitas na defesa;

Ao grupo de pesquisa em fixação de nitrogênio da Universidade Federal do Paraná, pelos reagentes gentilmente cedidos;

A Rui e Nadir Leifeld, pais da Vanessa, por cederem seu carro e nos acompanhar várias vezes nas coletas de substrato no matadouro, agradeço o carinho e a preocupação;

À professora Noemi Nagata, ao Rodrigo Stuart, Rafael Noleto e Leila Denise Falcão pela grande ajuda com o tratamento estatístico dos dados;

Ao professor Ricardo Ayub, por permitir que eu utilizasse os equipamentos, reagentes e vidrarias do laboratório de etileno;

Às técnicas: Daniani, Denise e Rita, dos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos e a Jana, do Laboratório de Microbiologia, pela amizade, por estarem sempre dispostas a ajudar, pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados;

Às amigas de mestrado: Ana Mery de Oliveira, Cleoci Beninca (Kika), Cristiane Schame, Cristiane Trevisan Slivinski, Daniani Marinho Zardo, Débora Borsato, Leila Dierings, Lúcia Helena Garrido Pereira, Marina Tolentino, Mary de Fátima Dias Queji, Rosa Cristina Prestes, Simone Bicudo e Tatiana Roselena de Oliveira, pelo incentivo, momentos de distração, amigos secretos, comemorações, enfim, pelos laços de amizade criados que possibilitarão muitos outros momentos alegres;

Aos amigos do curso de engenharia de alimentos: Alex, Michele, Marina, Lis, Jaque, Manoela, Carol, Karine, Juliana e Daiana pelo carinho e amizade;

Aos catequistas de minha comunidade, por terem dado continuidade ao trabalho, mesmo com a coordenadora ausente e com péssima memória;

Aos meus alunos, funcionários da América Latina Logística (ALL), o exemplo de vida e a determinação de vocês renovam minhas forças a cada aula;

Aos novos engenheiros de alimentos, da turma de 2007, por me receberem muito bem enquanto fiz estágio em docência, uma experiência importantíssima para minha formação, por me fazerem rever meus conceitos;

Aos amigos do Laboratório de Etileno: Bruna, Fernando, Gabrielle, Geisa, Livia, Maiara e Rafaela, por terem me acolhido super bem, pelos momentos de descontração;

Aos grandes amigos da minha turma do curso de biologia (formandos de 2005), que apesar das distâncias estão sempre presentes, apoiando e incentivando nos momentos difíceis e comemorando as vitórias conquistadas. Em especial ao inesquecível grupo das cinco marias: Anna Luiza (Aninha), Fabiana (Fabi), Marciele (Marci), Neriane (Nê) e Tatiane (Tati), as lembranças de tudo que já passamos me deram forças para continuar em muitos momentos difíceis.

*O tempo não pára! Só a saudade é que faz as coisas pararem no tempo...*

*Mário Quintana*

## RESUMO

O efluente gerado em abatedouros possui uma elevada concentração de matéria orgânica e necessita de tratamento antes de ser descartado nos corpos hídricos. Os filtros biológicos anaeróbios são considerados uma boa técnica para tratamento de efluentes industriais, porém, a escolha correta do meio suporte é extremamente importante para garantir o sucesso do reator. Da mesma forma, o estudo da diversidade microbiana pode otimizar o desempenho e a operação desses sistemas. Neste trabalho, foi realizada a avaliação da eficiência do tratamento de efluente de abatedouro, utilizando-se três filtros biológicos anaeróbios de fluxo ascendente, bem como a comparação da diversidade microbiana desses filtros. Os reatores denominados A, B e C foram construídos em cloreto de polivinila e preenchidos com anéis de polipropileno, espuma de poliuretano ou pedaços de tijolo de argila, respectivamente. Esses reatores foram operados à temperatura ambiente e os Tempos de Retenção Hidráulica (TRHs) utilizados foram de 30; 20; 18; 14; 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1,5 e 1 dia. Para monitorar a eficiência do processo, foram analisados no substrato e efluente de cada reator pH, alcalinidade, acidez, Demanda Química de Oxigênio (DQO), teor de sólidos totais e sólidos voláteis, nitrogênio e fósforo. Os valores de pH do efluente dos reatores decresceram com a redução do TRH. A relação acidez volátil/alcalinidade ficou abaixo de 0,13 durante a maior parte do período analisado. No TRH de 1 dia o reator C foi o mais eficiente alcançando 80,76% de remoção de DQO. Observou-se uma elevada taxa de remoção de nitrogênio em todos os reatores provavelmente devido à sua baixa quantidade no substrato. Também ocorreram elevadas remoções de fósforo, mas houve decréscimo dessa remoção com a diminuição do TRH nos reatores A e B, o mesmo não ocorrendo no reator C. Quando se analisaram as amostras retiradas em quatro diferentes alturas dos reatores, observou-se que os três se comportaram de forma similar quanto aos pontos de coleta e não houve diferença entre esses pontos quanto à remoção de DQO, relação acidez volátil/alcalinidade e pH. Para avaliar o efeito dos diferentes meios suporte na comunidade microbiana, o DNA da biomassa dos reatores foi extraído, quantificado e usado como molde numa reação de amplificação do gene 16S rDNA de bactérias e archaeas metanogênicas. Os fragmentos de aproximadamente 1500 pb amplificados foram tratados com as enzimas de restrição *Hinf*I, *Rsa*I e *Hae*III para obtenção dos perfis de ARDRA (Análise da Restrição de rDNA Amplificado) dos reatores. Os índices de riqueza, riqueza modificada, diversidade de Shannon-Weaver e dendograma de similaridade, determinados a partir da ARDRA, agruparam os reatores A e B, ficando o reator C isolado devido à sua dessemelhança. A Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) também agrupou os reatores dessa forma, entretanto, esse agrupamento possui menos que 0,1% de similaridade, sugerindo uma baixa interferência do meio suporte nas comunidades microbianas.

Palavras chaves: Biodigestão anaeróbia, filtro anaeróbio de fluxo ascendente, abatedouro, meio suporte, diversidade microbiana.



## ABSTRACT

The effluent generated in abattoirs has a high concentration of organic matter and need treatment before being discarded in the water bodies. Anaerobic biological filters are considered a good technique for the treatment of industrial effluents; however, choosing the correct support media is extremely important to ensure the success of the reactor. In the same way, the study of microbial diversity can optimize the performance and the operation of these systems. In this work it was evaluated the efficiency of the treatment of the effluent from slaughterhouse, using three upflow anaerobic biological filters, and it was compared the microbial diversity of these filters. The reactor called A, B and C were built in chloride polivinile and filled with rings of polypropylene, polyurethane foam, or pieces of clay brick, respectively. These reactors were operated at room temperature and the used Hydraulic Retention Times of (HRTs) were of 30, 20, 18, 14, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5 and 1 day. To monitor the efficiency of the process, the pH, alkalinity, acidity, Chemistry Oxygen Demand (COD), and total solids content of volatile solids, nitrogen and phosphorus substrate and effluents of each reactor were analyzed. The values of pH decreased with the reduction of HRT and the ratio volatile acidity / alkalinity remained below 0.13 during the majority of the analyzed period. In the one day's HRT, the reactor C was more effective reaching 80.76% of removal. There was a high rate of nitrogen removal probably due to its low concentration in the substrate. High phosphorus removals also occurred: there was a decrease of phosphorus removal when the HRT declines in reactors A and B, the same did not occur in the reactor C. The three reactors behaved similarly regarding to the collecting sites and there was no difference between these sites when COD removal, volatile acidity / alkalinity ratio and pH were analyzed. To evaluate the effect of different media support in the microbial community, the reactors DNA biomass was extracted, quantified and used as template in an amplification reaction of 16S rDNA gene from bacteria and metanogenic. The amplified fragments of approximately 1500 bp were treated with *HinfI*, *RsaI* and *HaeIII* restriction enzymes to obtain the reactors ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) profiles. The indices of richness, richness modified, Shannon-Weaver diversity index and similarity dendogram, determined from ARDRA, grouped the reactors A and B, and left the reactor C isolated due to its dissimilarity. The Hierarchical Cluster Analysis (HCA) also grouped the reactors that way, however, that group has less than 0.1% of similarity, suggesting a low interference in the reactors media support in microbial communities.

Key words: Anaerobic biodigestion, upflow anaerobic filter, slaughterhouse, means support, microbial diversity.

## LISTA DE ABREVIACOES

- AMOVA - Analysis of Molecular Variance (Análise de Varincia Molecular);
- ANAMMOX - Anaerobic Ammonium Oxidation (Oxidao anaeróbia da amônia);
- ANOVA - Analysis of Variance (Análise de Varincia);
- ARDRA - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Análise da Restrição de rDNA Amplificado);
- ASBR - Anaerobic Sequencing Batch Reactor (Reator Anaeróbio Operado em Batelada Seqüencial);
- BSA - Bovine Serum Albumin (Albumina do Soro Bovino);
- CTAB - Brometo de hexadecilcetiltrimetilamnio;
- DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (eletroforese em gel com gradiente denaturante);
- dNTP - deoxynucleotide triphosphate (Desoxirribonucleotídeos trifosfatados);
- D.O. - Densidade ptica;
- DQO - Demanda Química de Oxigênio;
- $D_{sh}$  - Diversidade de Shannon-Weaver;
- EDTA - cido Etilenodiamino Tetra-Acético;
- ExpASy - Expert Protein Analysis System;
- $F_{st}$  - ndice de fixao;
- HCA - Hierarchical Cluster Analysis (Análise do Agrupamento Hierárquico);
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
- JGI - Joint Genome Institute;
- MCR - Metil-coenzima M Redutase;
- NCBI - National Center for Biotechnology Information;
- NTSYS - Numerical Taxonomy System of multivariate Analysis System;

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase);

PVC - Policloreto de Vinila;

rDNA - DNA ribossômico;

RDP - Ribosomal Database Project II;

rRNA - RNA ribossômico;

S - Riqueza;

SDS - Sódio Dodecil Sulfato;

S<sub>mod</sub> - Riqueza modificada;

ST - Sólidos Totais;

SV - Sólidos Voláteis;

TEMED - N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine;

tRFLP - (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Terminais de Restrição;

TRH - Tempo de Retenção Hidráulica;

UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Reator Anaeróbio de Manta de Lodo);

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (Método do pareamento de médias não ponderadas);

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Seqüências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia (adaptado de CHERNICHARO, 1997) .....	24
Figura 2 - Conversão biológica nos sistemas aeróbios e anaeróbios (Adaptado de CHERNICHARO, 1997) .....	26
Figura 3 - Foto do ponto de coleta do efluente utilizado no experimento.....	37
Figura 4 - Foto dos três reatores anaeróbios utilizados no experimento .....	39
Figura 5 - Materiais suporte utilizados neste estudo: a- anéis de mangueira de polipropileno; b- cubos de espuma de poliuretano; c- tijolo de argila .....	39
Figura 6 -Esquema geral do reator utilizado neste experimento e respectivo gasômetro	40
Figura 7 - Lodo do reator metanogênico da cervejaria FEMSA, utilizado como inóculo neste experimento .....	40
Figura 8 – Foto do reator com os pontos de alimentação e retirada de amostra .....	42
Figura 9 - Valores de pH do efluente dos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH.....	55
Figura 10 - Relação Acidez Volátil/Alcalinidade do efluente dos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e dos TRHs utilizados	59
Figura 11 - Remoção de DQO do efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e dos TRHs utilizados .....	60
Figura 12 - Remoção de sólidos totais do efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH.....	66
Figura 13 - Remoção de sólidos voláteis do efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH.....	66
Figura 14 - Remoção de nitrogênio no efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH.....	67
Figura 15 - Remoção de fósforo no efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH.....	69
Figura 16 - Valores de pH do efluente dos reatores A, B e C. a: reator A, contendo anéis de polipropileno como meio suporte; b: reator B, contendo cubos de espuma de poliuretano como meio suporte; c: reator C, contendo pedaços de tijolo de argila como meio suporte, em função dos pontos de coletas de amostras no TRH de 1 dia.....	70
Figura 17 - Relação Acidez Volátil/Alcalinidade do efluente dos reatores A, B e C. a: reator A, contendo anéis de polipropileno como meio suporte; b: reator B, contendo cubos de espuma de poliuretano como meio suporte; c: reator C, contendo pedaços de tijolo de argila como meio suporte, em função dos pontos de coletas de amostras no TRH de 1 dia.	71
Figura 18 - Redução de DQO no efluente tratado pelos reatores A, B e C. a: reator A, contendo anéis de polipropileno como meio suporte; b: reator B, contendo cubos de espuma de poliuretano como meio suporte; c: reator C, contendo pedaços de tijolo de argila como meio suporte, em função dos pontos de coletas de amostras no TRH de 1 dia.....	72

- Figura 19 - Microscopia ótica da espuma de poliuretano em luz transmitida (a) e tijolo de argila em campo escuro (b), com aumento de 50 e 100 vezes, respectivamente ..... 75
- Figura 20 - Produto de PCR de amostra de DNA dos reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente. a: comunidade bacteriana; b: comunidade de archaeas metanogênicas. M: marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*Hind* III; pb: pares de bases ..... 79
- Figura 21 - Perfil de restrição do 16S rDNA da comunidade bacteriana dos reatores A, B e C, com anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como meio suporte, respectivamente, obtidos pela enzimas *Hin*I, *Rsa*I e *Hae*III. M: marcador molecular 100pb (Biolabs Inc) ..... 80
- Figura 22 - Perfil de restrição do 16S rDNA da comunidade de archaeas metanogênicas dos reatores A, B e C, com anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como meio suporte, respectivamente, obtidos pela enzimas *Hin*I, *Rsa*I e *Hae*III. M: marcador molecular 100pb (Biolabs Inc) ..... 80
- Figura 23 – Dendogramas de similaridade construído com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da matriz binária de dados da ARDRA para os reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente. Figura a: comunidade bacteriana; Figura b: comunidade de archaeas metanogênicas ..... 82
- Figura 24 – Dendograma de similaridade construído pelo método HCA (Análise do Grupamento Hierárquico) a partir da matriz de distância euclidiana de dados físico-químicos e o índice de diversidade de shannon-Weaver para os reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente ..... 83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reatores utilizados neste experimento com respectivo tipo de suporte e volume útil .....	38
Tabela 2 - “Primers” utilizados para amplificação do gene 16s rDNA das amostras dos reatores.....	46
Tabela 3 - Composição das soluções e tampões.....	49
Tabela 4 – Composição do gel de poliacrilamida de empilhamento e de separação.....	50
Tabela 5 - Caracterização dos lotes de substrato utilizados neste experimento e do similar encontrado na literatura. ....	53
Tabela 6 - Período de duração dos TRHs e respectivos lotes do substrato utilizados nos reatores.....	54
Tabela 7 – Valores médios de pH do efluente dos reatores A, B e C em função do TRH56	
Tabela 8 - Valores médios de alcalinidade e acidez volátil do efluente dos reatores A, B e C em função dos TRHs utilizados.....	58
Tabela 9 – Teores de DQO de entrada e de saída dos reatores A, B e C em função dos TRHs utilizados.....	63
Tabela 10 - Teores de sólidos totais e sólidos voláteis do substrato e do efluente dos reatores A, B e C em função do TRH aplicado .....	65
Tabela 11 – Remoção média de nitrogênio do efluente dos reatores A, B e C em função do TRH .....	68
Tabela 12 – Remoção média de fósforo do efluente dos reatores A, B e C em função do TRH .....	69
Tabela 13 - Características dos materiais suportes utilizados nos reatores deste estudo	74
Tabela 14 - Características dos materiais suportes utilizados por Silva et al. (2006) ....	75
Tabela 15 – Relação de densidade ótica (DO) das amostras de DNA dos reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente, em A260/230 e A260/280 nm e respectiva concentração de DNA.....	78
Tabela 16 - Índices de diversidade dos reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente .....	81

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 SUBSTRATO.....	19
2.2 A BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	20
2.3 VANTAGENS DO TRATAMENTO ANAERÓBIO.....	24
2.4 FILTROS BIOLÓGICOS ANAERÓBIOS DE FLUXO ASCENDENTE.....	28
2.5 EFEITO DO MEIO SUPORTE.....	29
2.6 BIOGÁS.....	31
2.7 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA.....	33
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 SUBSTRATO.....	37
4.2 REATORES ANAERÓBIOS.....	38
4.3 GASÔMETRO .....	39
4.4 INÓCULO .....	40
4.5 DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO.....	41
4.5.1 Processo de partida .....	41
4.5.2 Período de otimização .....	41
4.5.3 Alimentação e pontos de coleta das amostras .....	41
4.6 REAGENTES.....	42
4.7 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	42
4.7.1 Determinação de pH.....	42
4.7.2 Determinação da alcalinidade e Acidez Volátil .....	42
4.7.3 Determinação de Sólidos totais (ST) e voláteis (SV).....	43
4.7.4 Determinação de Demanda Química de Oxigênio .....	43
4.7.5 Determinação dos teores de Nitrogênio e Fósforo .....	43
4.8 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO SUPORTE.....	43
4.8.1 Densidade aparente.....	43
4.8.2 Porosidade aparente.....	45
4.8.3 Microscopia ótica .....	45
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	45
4.10 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA.....	46
4.10.1 Escolha dos “primers” (oligonucleotídeos iniciadores).....	46
4.10.2 Coleta das amostras .....	46
4.10.3 Extração do DNA .....	47
4.10.4 Quantificação do DNA extraído.....	47
4.10.5 Tratamento do DNA com BSA (Albumina do Soro Bovino) .....	48
4.10.6 Amplificação do DNA.....	48

4.10.7 Eletroforese em gel de agarose .....	49
4.10.8 Purificação do DNA amplificado .....	49
4.10.9 Análise de restrição do fragmento amplificado (ARDRA) .....	50
4.10.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	50
4.10.11 Análise do perfil de restrição .....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO .....	53
5.2 ANÁLISES DO EFLUENTE DE CADA REATOR .....	54
5.2.1 Valores de pH, Acidez Volátil, Alcalinidade e relação Acidez Volátil/Alcalinidade	54
5.2.2 Demanda Química de Oxigênio .....	60
5.2.3 Teores de sólidos totais e voláteis .....	64
5.2.4 Teores de nitrogênio e fósforo .....	66
5.2.5 Análises nas diferentes saídas dos reatores no TRH de 1 dia .....	70
5.3 PRODUÇÃO DE BIOGÁS .....	73
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO MEIO SUPORTE .....	74
5.5 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA .....	76
5.5.1 Escolha dos “primers” .....	76
5.5.2 Quantificação do DNA extraído .....	77
5.5.3 Amplificação do DNA utilizando a técnica de PCR .....	78
5.5.4 Análise de restrição do fragmento amplificado (ARDRA) .....	79
5.5.4.1 Perfil de restrição .....	79
6 CONCLUSÕES .....	84
7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....	85
8 REFERÊNCIAS .....	86
9 ANEXOS .....	99
9.1 REAGENTES .....	100
9.2 METODOLOGIA ANALÍTICA .....	101
9.2.1 Determinação de pH .....	101
9.2.2 Determinação de alcalinidade .....	101
9.2.3 Determinação de Acidez Volátil .....	102
9.2.4 Determinação de Sólidos totais (ST) e voláteis (SV) .....	102
9.2.5 Determinação de Demanda Química de Oxigênio .....	102
9.2.6 Determinação dos teores de Nitrogênio e Fósforo .....	103
9.3 - RELAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ENCONTRADOS EM TRABALHOS COM REATORES ANAERÓBIOS .....	105



## 1 INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos têm importante participação na economia brasileira, caracterizando-se como um setor produtivo relevante e em expansão, tanto na agricultura quanto na pecuária. A indústria da carne, em especial, vem se desenvolvendo em grande escala nos últimos anos, para atender a demanda interna e externa.

As atividades que envolvem o abate de animais e o processamento de carnes geram efluentes que necessitam de tratamento antes de serem descartados nos corpos hídricos. O efluente de abatedouro é altamente poluidor por possuir elevados teores de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, que podem ultrapassar a capacidade de autodepuração de cursos d'água e acelerar o processo de eutrofização de lagos e represas. Desta forma se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias capazes de aprimorar os sistemas de tratamento.

A biodigestão anaeróbia tem se mostrado uma alternativa eficiente para o tratamento de efluentes agroindustriais, por alcançar boas taxas de remoção de matéria orgânica e produção de metano, que pode ser utilizado como um biocombustível na própria indústria e ainda gerar créditos de carbono. Essas altas taxas de remoção, que chegam a 80%, somente são conseguidas se o reator for capaz de reter uma grande quantidade de microrganismos ativos na degradação (lodo). Desta forma, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de reatores capazes de imobilizar esses microrganismos em superfícies inertes (meio suporte), formando um biofilme, tem merecido destaque.

O meio suporte determina a capacidade de retenção da biomassa. A biodigestão anaeróbia depende fundamentalmente dos microrganismos presentes no interior dos reatores, que devem estar adaptados ao efluente em questão e serem resistentes a variações do processo.

A aderência dos microrganismos, que é dependente das características físico-químicas do suporte, é um fator decisivo para o desempenho do sistema.

Ainda são poucos os estudos que aliam o entendimento dos parâmetros operacionais à dinâmica da biomassa presente. Os avanços das técnicas de biologia molecular têm auxiliado a compreensão da função de cada grupo de microrganismo envolvido na biodigestão.

Face ao exposto, o presente trabalho objetiva avaliar a eficiência de três filtros biológicos anaeróbios de fluxo ascendente com diferentes tipos de suporte para tratamento de efluente de abatedouro e a diversidade microbiana entre eles.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SUBSTRATO

De acordo com o Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007), no segundo trimestre de 2007 foram abatidos no Brasil 7,6 milhões de cabeças de bovinos, 6,6 milhões de unidades de suínos e 1,1 bilhões de unidades de frangos, representando um aumento no abate de 1,1%, 7,6% e 21,4%, respectivamente, com relação ao segundo trimestre de 2006. Quanto ao cenário externo observou-se, no 2º trimestre de 2007, a exportação de 349,4 mil toneladas de carne bovina, 752,8 mil toneladas de carne de frango e 149,9 mil toneladas de carne suína, indicativo de aumento de 20,5%, 30,9% e 43,4% respectivamente, com relação ao mesmo período do ano anterior.

O sul do Brasil é caracterizado pela enorme produção de carne suína e derivados, que pode resultar em um elevado impacto ambiental caso os resíduos gerados durante o processo não sejam devidamente tratados e/ou reutilizados. O maior problema deste tipo de efluente é a presença de grande concentração de matéria orgânica, pois os resíduos são parcialmente solubilizados em água levando a um efeito altamente contaminante em rios e lagos, se o mesmo não for previamente estabilizado (RUIZ et al., 1997; TORKIAN et al., 2003).

Os abatedouros industriais são freqüentemente responsáveis pela poluição de ecossistemas aquáticos também devido ao grande volume de resíduos gerado. Segundo Cammarota e Freire (2006), o consumo de água por animal abatido varia de acordo com o animal e o tipo de processo empregado pela indústria, variando de 1,0 a 8,3 m<sup>3</sup>. A maioria desta água, de 0,4 a 3,1 m<sup>3</sup> é descartada como efluente.

As principais fontes de matéria orgânica nas águas residuais de abatedouros são

sangue, gordura, óleos e fezes. O sangue residual, urina e fezes também são fontes importantes de nitrogênio, especialmente nitrogênio orgânico. O fósforo contido nestas águas residuais deriva do sangue, estrume e compostos de limpeza e saneamento (DEL NERY et al., 2006). Os elementos mais importantes envolvidos na degradação do meio ambiente são o fósforo e o nitrogênio, responsáveis pela eutrofização de um corpo aquático (FERREIRA; LUCAS JR e AMARAL, 2003).

O efluente de abatedouro possui características típicas como elevados teores de Demanda Química de Oxigênio (DQO), sólidos voláteis, amônia, fósforo, nitrogênio e alcalinidade (RUIZ et al., 1997; CASSIDY et al., 2005). Métodos físico-químicos e processos biológicos aeróbios podem ser utilizados para o tratamento deste tipo de efluente. Altas concentrações de matéria orgânica biodegradável e concentrações adequadas de nutrientes para crescimento bacteriano tornam esse efluente passível de tratamento biológico (MASSE e MASSE, 2005).

## 2.2 A BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

As águas efluentes de atividades humanas adquirem características próprias de acordo com o uso que sofreram e, quando retornadas ao ambiente, tendem a alterar as propriedades do corpo hídrico receptor podendo resultar em poluição, contaminação por microrganismos patogênicos, eutrofização, entre outras conseqüências indesejáveis (CERQUEIRA, 2004).

Diversas atividades que o homem desenvolve geram efluentes que podem ser utilizados para a produção de energia, recuperação de bioprodutos e da água componente. Diversas técnicas já estão disponíveis para alcançar os objetivos da conservação e da proteção ambiental dos recursos hídricos. No caso do tratamento de efluentes, a combinação de diferentes métodos podem ser utilizados, como por exemplo, métodos físico-químicos como a

filtração, químicos como a coagulação ou biológicos como a digestão aeróbia ou anaeróbia (LEITÃO et al., 2006).

Em vista da rápida escassez de recursos hídricos renováveis em muitas partes do mundo, vem crescendo o interesse na reutilização de efluentes industriais e de sistemas de tratamento de esgoto. Além da possibilidade de reutilização industrial e urbana, esgotos tratados podem ser reutilizados na agricultura, dependendo do tipo de efluente local (TAWFIK et al., 2003).

A biodigestão anaeróbia é um processo natural, ocorre em ambientes livres de oxigênio, onde microrganismos decompõem a matéria orgânica (LIU et al., 2008). É um processo pelo qual a maioria dos resíduos orgânicos, na ausência de oxigênio, é biologicamente convertida a metano e outros produtos. É um processo complexo, que requer condições ambientais específicas e diferentes populações de microrganismos (LASTELLA et al., 2000). Nesse processo existe um delicado equilíbrio entre os processos primários (hidrólise e acidogênese) e a conversão dos produtos ácidos pelos microrganismos acetogênicos e a formação de metano e dióxido de carbono pelos metanogênicos (LEITÃO et al., 2006).

A capacidade de tratamento de um sistema de digestão anaeróbia é determinada pela atividade microbiana da biomassa mantida dentro do sistema, que por sua vez é influenciada pela composição do efluente e configuração do reator (PEREZ et al., 2007).

Por muitos anos os pesquisadores projetaram sistemas baseados principalmente em informações fornecidas por parâmetros físicos e químicos. E foram razoavelmente bem sucedidos utilizando as vantagens de comunidades microbianas com potencial metabólico surpreendente sem conhecimento detalhado sobre os organismos envolvidos. Entretanto, a proliferação de determinados microrganismos pode contribuir para a melhoria de determinados processos. Para se monitorar e controlar tais fenômenos é importante

compreender melhor os agentes biológicos associados a estes sistemas (GILBRIDE, LEE e BEAUDETTE, 2006).

A biodigestão anaeróbia envolve diferentes espécies de microrganismos (CÔTÉ et al., 2006). Sua atividade metabólica bacteriana pode ser dividida em duas fases principais, a fase acidogênica, na qual as bactérias acidogênicas reduzem a matéria orgânica complexa a ácidos orgânicos e, a fase metanogênica, a qual os microrganismos metanogênicos específicos podem converter o acetato a metano e dióxido de carbono (KEYSER et al., 2006).

Segundo Chernicharo (1997), embora o processo de digestão anaeróbia seja, de maneira simplificada, considerado como de duas fases, este pode ser subdividido em quatro fases principais, como a seguir:

-Hidrólise: a primeira fase no processo de degradação anaeróbia. Consiste na hidrólise de materiais particulados complexos em materiais dissolvidos mais simples, os quais podem atravessar as paredes celulares das bactérias fermentativas.

-Acidogênese: os produtos solúveis oriundos da fase de hidrólise são metabolizados no interior das células das bactérias fermentativas, sendo convertidos em diversos compostos mais simples, os quais são então excretados pelas células. Os compostos produzidos incluem ácidos graxos voláteis, álcoois, ácido lático, gás carbônico, hidrogênio, amônia e sulfeto de hidrogênio. Como os ácidos graxos voláteis são o principal produto dos organismos fermentativos, esses organismos são usualmente designados bactérias fermentativas acidogênicas.

-Acetogênese: nesta fase as bactérias acetogênicas são responsáveis pela conversão dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado para as archaeas metanogênicas. Os produtos gerados pelas bactérias acetogênicas são o hidrogênio, o dióxido de carbono e o acetato.

-Metanogênese: é a etapa final do processo global de degradação anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono, efetuada por archaeas metanogênicas. Em função da sua afinidade por substrato e magnitude de produção de metano, são divididas em dois grupos principais, um que forma metano a partir de ácido acético ou metanol e o segundo que produz metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono, como explicado a seguir:

Metanogênicas acetoclásticas: embora apenas poucas espécies de metanogênicas sejam capazes de formar metano a partir do acetato, estes são normalmente os microrganismos predominantes na digestão anaeróbia. São responsáveis por cerca de 60 a 70% de toda a produção de metano, a partir do grupo metil do ácido acético. Pertencem a dois gêneros principais: *Methanosarcina* e *Methanosaeta*.

Metanogênicas hidrogenotróficas: são capazes de produzir metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono. Os gêneros mais frequentemente encontrados em reatores anaeróbios são: *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter*.

Uma representação esquemática dos grupos de microrganismos e fases da digestão anaeróbia é mostrada na Figura 1.

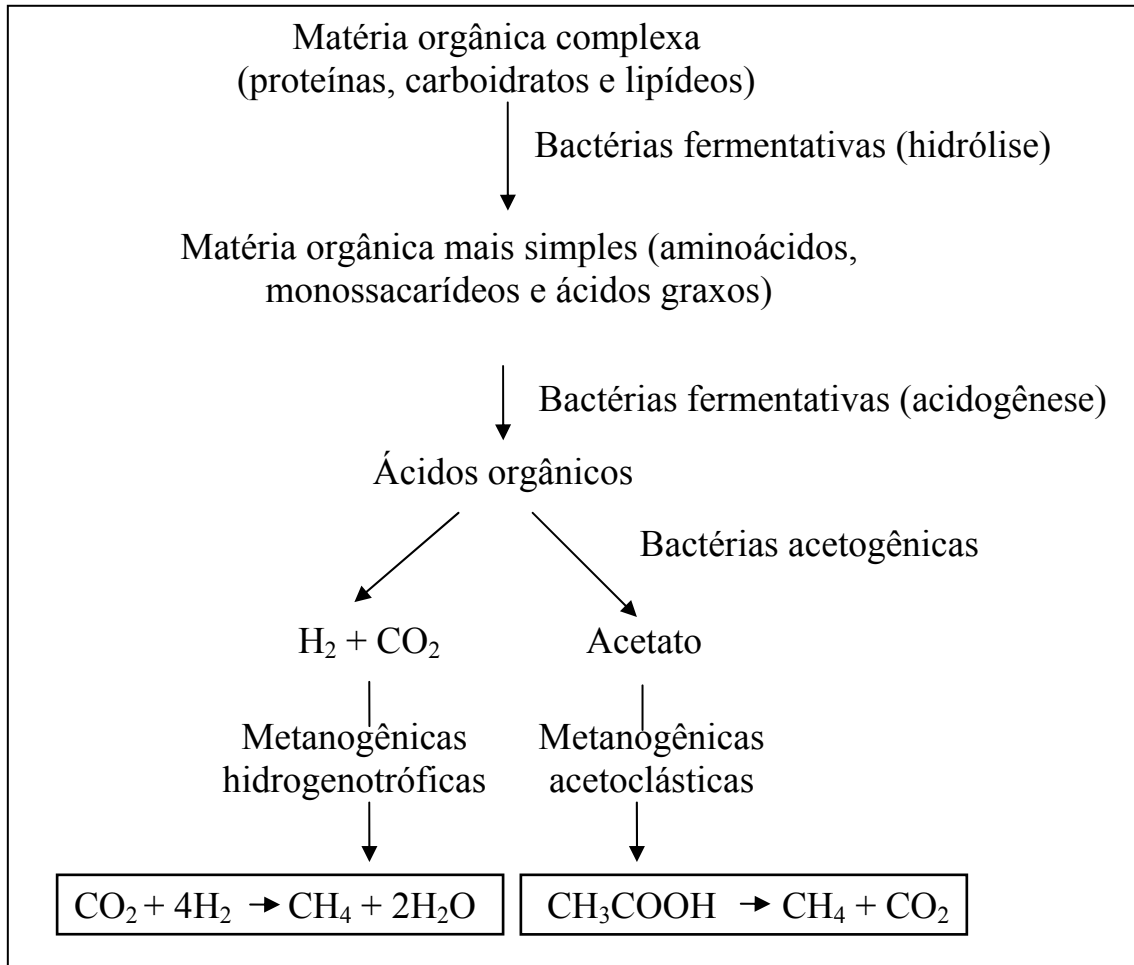


Figura 1 - Seqüências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia (adaptado de CHERNICHARO, 1997)

### 2.3 VANTAGENS DO TRATAMENTO ANAERÓBIO

Comparando-se processos biológicos aeróbios com os anaeróbios para tratamento de efluentes, têm-se como desvantagem do primeiro as elevadas exigências de energia requeridas para a aeração e as grandes quantidades de biomassa (lodo) geradas (TORKIAN et al., 2003; ARNAIZ et al., 2006). Os processos anaeróbios tradicionais, como lagoas de estabilização, são também limitados, devido às baixas taxas da remoção de matéria orgânica, dos longos Tempos de Retenção Hidráulica (TRH), de acumulação excessiva de matéria orgânica residual e de produtos intermediários e de grandes exigências quanto ao volume do reator (TORKIAN et al., 2003).



Em alguns casos, somente a biodigestão anaeróbia não é suficiente para a remoção da grande quantidade de matéria orgânica do efluente e se faz necessário o uso de um sistema de pós-tratamento (DENG; ZHEN e CHEN, 2006). Contudo, os recentes avanços no desenvolvimento de reatores capazes de reter grandes quantidades de biomassa, têm melhorado estas perspectivas.

O tratamento anaeróbio de águas residuárias industriais tem se tornado uma tecnologia viável nos últimos anos devido ao rápido desenvolvimento de reatores de altas taxas (elevada retenção de biomassa no reator) como o filtro anaeróbio e o reator UASB (Reator Anaeróbio de Manta de Lodo) (PEREZ et al., 2007). Nesses reatores, foi possível aumentar o Tempo de Retenção Celular e diminuir o Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) (TORKIAN et al., 2003; PEREZ et al., 2007). Resultando no aumento da eficiência do tratamento destes processos, diminuição do volume dos reatores e melhoria gradual e constante da percepção comum de que os processos anaeróbios são apropriados para o tratamento de vários efluentes industriais (TORKIAN et al., 2003).

Nos processos aeróbios, 50 a 60% da matéria orgânica presente no efluente é convertida em novas células da biomassa (Figura 2), aumentando significativamente os custos com o tratamento do efluente devido à grande produção diária de lodo, que requer um tratamento adicional e eliminação segura. Em contraste, a biodigestão anaeróbia converte de 5 a 15% da matéria orgânica, medida em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO), do efluente em novas células microbianas, o carbono restante é convertido a gases como  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  (biogás) (CHERNICHARO, 1997).

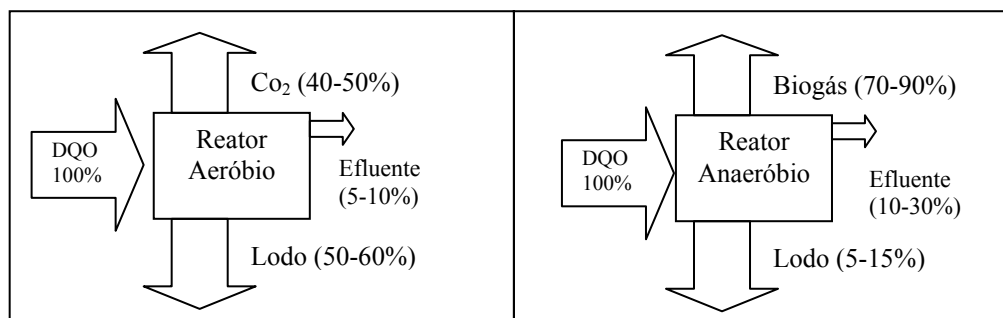


Figura 2 - Conversão biológica nos sistemas aeróbios e anaeróbios (Adaptado de CHERNICHARO, 1997)

Os processos anaeróbios são duplamente economizadores de energia elétrica. Além de não necessitarem de equipamentos de aeração artificial como nos processos aeróbios, o metano produzido durante esse processo pode ser aproveitado na indústria, se estudos de viabilidade técnica e econômica forem bem conduzidos (RUIZ et al., 1997; BORJA et al., 1998; ARNAIZ et al., 2006). O aproveitamento do metano pela indústria, evitando o seu descarte na atmosfera, também pode resultar em créditos de carbono para a empresa, que pode vendê-los.

Os processos anaeróbios também se caracterizam pela baixa redução de minerais (CHERNICHARO, 1997). Porém esta desvantagem pode ser amenizada utilizando o efluente destes reatores como biofertilizante na agricultura, uma vez que ainda contém grandes quantidades de nitrogênio e fósforo (KOETZ et al., 1995; ANGENENT, SUNG e RASKIN, 2002; AMARAL, AMARAL e LUCAS JÚNIOR, 2004).

Muitos estudos têm sido conduzidos visando a remoção da matéria orgânica de efluentes de abatedouro. Massé e Masse (2001), tratando efluente de matadouro de suínos em reator anaeróbio em batelada seqüencial, observaram redução da concentração da matéria orgânica superior a 90%, independente da temperatura utilizada no processo. Foram aplicadas cargas orgânicas de 2,75; 2,94 e 4,93 kg.m<sup>-3</sup>.dia<sup>-1</sup> para temperaturas de 20, 25 e 30°C, respectivamente. Para essas cargas orgânicas, os sistemas foram eficientes e apresentaram estabilidade operacional resultando em alta taxa de conversão de matéria orgânica a metano.

Ruiz et al. (1997) testaram a viabilidade do tratamento de efluente de abatedouro em reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) e em filtro biológico à temperatura de 37°C. A carga orgânica foi aumentada de 0,5 até 6 Kg de DQO/m<sup>3</sup>/dia (TRH de 1,5 dias). Ao final do tratamento, obtiveram de 63 a 84% de remoção de DQO, demonstrando que a digestão anaeróbia é um método eficiente para o tratamento de efluente de abatedouro.

Nos estudos que vêm sendo desenvolvidos por diversos pesquisadores no mundo, observa-se que o efeito da temperatura sobre o desempenho de reatores anaeróbios é muito variável. Manariotis e Grigoropoulos (2006), estudando três filtros anaeróbios de fluxo ascendente para o tratamento de esgoto municipal, observaram que houve um decréscimo da remoção de matéria orgânica e dos sólidos com a diminuição da temperatura de 25,4°C para 15,5°C. Luostarinen et al. (2007) estudaram três reatores anaeróbios tipo UASB para o pré-tratamento de efluente sanitário no norte da Europa, onde a temperatura ambiente fica abaixo de 14°C na maior parte do ano. A temperatura, que variou de 5 a 17°C, não teve efeito significativo sobre o desempenho dos reatores, indicando a viabilidade do tratamento anaeróbio para este tipo de efluente nas baixas temperaturas do clima norte europeu.

Beux, Nunes e Barana (2007) estudando o tratamento de efluente de abatedouro em filtros anaeróbios de duas fases também observaram que a temperatura, que variou de 12 a 26°C, não tinha efeito significativo sobre a biodigestão anaeróbia para este tipo de efluente, e os reatores metanogênicos apresentaram comportamento similar durante o experimento.

## 2.4 FILTROS BIOLÓGICOS ANAERÓBIOS DE FLUXO ASCENDENTE

Nos últimos 20 anos, diversos processos baseados na retenção de biomassa foram desenvolvidos como sistemas altamente eficientes de biodigestão (YANG et al., 2004b). Uma comparação entre reatores de biofilme com outros sistemas de biodigestão sugere que esses

reatores são mais simples e têm melhor produtividade que outros sistemas (QURESHI et al., 2005).

Os filtros biológicos anaeróbios são reatores nos quais a matéria orgânica é estabilizada pela ação de microrganismos que ficam retidos nos interstícios ou aderidos ao material suporte, como biofilme (SHOW e TAY, 1999; PEREIRA-RAMIREZ et al., 2001). Este material constitui o meio através do qual os despejos líquidos escoam em fluxo vertical tanto ascendente quanto descendente, sendo constituídos de um leito de material que acumula em sua superfície os microrganismos responsáveis pelo processo de estabilização da matéria orgânica (PEREIRA-RAMIREZ et al., 2001). Estudos têm demonstrado que esse suporte tem um efeito marcante na taxa de desenvolvimento do biofilme e no crescimento das linhagens de microrganismos que convertem ácido acético a metano (SHOW e TAY, 1999).

Segundo Andrade Neto et al. (2002), os filtros anaeróbios apresentam vantagens em relação aos reatores anaeróbios de manta de lodo, com maior eficiência na remoção da matéria orgânica dissolvida, menor produção de lodo, maior resistência às variações de vazão afluente, menor perda de biomassa, mais opções de forma, sentido de fluxo, materiais de enchimento, construção e operação muito simples.

Os filtros biológicos são capazes de degradar uma variedade de compostos. Estes servem como fonte preliminar de carbono ou de energia para os microrganismos. Os processos chave envolvidos na biofiltração são o transporte convectivo através do leito, dissolução dos compostos no biofilme aderido ao suporte, difusão dos compostos até os microrganismos e biodegradação desses compostos pelos mesmos (SCHWARZ, DEVINNY e TSOTSIS, 2001).

O filtro anaeróbio de fluxo ascendente foi inicialmente descrito em 1969 e é considerado uma boa técnica para tratamento de efluentes industriais (PUÑAL, MÉNDEZ-PAPÍN e LEMA, 1999). É um reator que se baseia num processo de tecnologia relativamente

simples. Em termos biológicos, não requer a formação de um lodo granular como em outros tipos de reatores (AHN e FORSTER, 2002). Esses reatores são projetados para conseguir uma elevada retenção de biomassa para uma operação eficiente e estável. Essa retenção é realizada pela imobilização dos microrganismos no suporte do filtro por meio da produção de biofilme (SHOW e TAY, 1999).

Bodík, Herdová e Drtil (2002) estudando o tratamento de esgoto sintético em filtro anaeróbio de fluxo ascendente à temperatura ambiente, que variou de 9 a 23°C, obtiveram índices de redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 46 a 92%, com os valores variando de acordo com a temperatura e tempo de retenção hidráulica, sendo os maiores valores de redução alcançados em temperaturas mais elevadas.

## 2.5 EFEITO DO MEIO SUPORTE

Existem três tipos de técnicas de imobilização microbiana conhecidas: adesão, fixação química sobre um apoio sólido e encapsulamento em uma matriz de gel. No tratamento de efluentes, em que consideráveis volumes com diferentes concentrações são tratados com desenvolvimento espontâneo de comunidades microbianas, a adesão espontânea parece ser o método mais adequado. É simples, barato e permite imobilização significativa de biomassa (HADJIEV et al., 2007).

Um importante fator para o bom desempenho do filtro anaeróbio é a habilidade que o meio suporte possui de reter altas concentrações de biomassa (SHOW et al., 1999). O processo de colonização no meio suporte ocorre em três fases consecutivas: fase lag (ataque celular primário), produção de biofilme (acumulação de células com produção de uma matriz de biopolímero) e estado contínuo após o estabelecimento e maturação do biofilme (MICHAUD et al., 2005).

O biofilme é definido como uma comunidade de células bacterianas estruturada, rodeada por uma matriz polimérica excretada pelos próprios microrganismos, aderidos a uma superfície inerte. A superfície sobre a qual as células microbianas são imobilizadas tem um importante papel na formação do biofilme. Superfícies rugosas e materiais porosos auxiliam a adesão das células e conseqüente formação de biofilme, além de aumentar a área superficial (QURESHI, 2005).

As estruturas dos poros nos meios suportes em filtros biológicos podem ser muito diferentes, dependendo do material de sustentação usado para o crescimento da biomassa (SCHWARZ, DEVINNY e TSOTSIS, 2001). Os materiais utilizados como meio suporte nos filtros biológicos devem ser baratos, mecanicamente resistentes, biologicamente inertes, ter uma relação área/volume elevada, boa porosidade e baixa massa específica, entre outros fatores (PEREIRA-RAMIREZ et al., 2001).

Filtros biológicos com diferentes tipos de material suporte têm sido utilizados com sucesso no tratamento de efluente de abatedouro, com eficiência na remoção de DQO de 80-90% obtidos com cargas orgânicas superiores a  $22 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$  (MITTAL, 2006).

Borja, Banks e Wang, (1995) estudaram o desempenho de um reator híbrido (manta de lodo combinado com filtro anaeróbio), recheado com anéis de argila como meio suporte, para tratamento de efluente de abatedouro com DQO inicial de  $2.450 \text{ mg.L}^{-1}$ . As maiores taxas de remoção de DQO foram superiores a 96% com carga orgânica de até  $25 \text{ g COD.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ .

## 2.6 BIOGÁS

Microrganismos têm o potencial de conversão de resíduos, incluindo efluentes industriais, em substâncias gasosas que podem ser usadas como fontes de energia e,

especialmente, como combustíveis (NOYOLA, MORGAN-SAGASTUME e LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2006).

O biogás produzido durante a digestão anaeróbia da matéria orgânica é formado por uma mistura de gases composta geralmente de 60 a 65% metano ( $\text{CH}_4$ ) e 35 a 40% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Outros constituintes podem ser encontrados em menor quantidade como sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), traços de oxigênio ( $\text{O}_2$ ), monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ), amônia ( $\text{NH}_3$ ), argônio ( $\text{Ar}_2$ ) e outros compostos orgânicos voláteis (MACIAS-CORRAL et al., 2004; NOYOLA, MORGAN-SAGASTUME e LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2006).

A composição do biogás depende do tipo e da concentração da matéria orgânica a ser digerida, das condições físico-químicas do reator (pH, alcalinidade, temperatura) e da presença de outros ânions como nitrato e fosfatos (NOYOLA MORGAN-SAGASTUME e LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2006).

Em muitos países, as pesquisas sobre a produção de biogás como uma fonte renovável de energia e os microrganismos que o produzem, têm aumentado recentemente devido aos problemas associados com a queima de combustíveis fósseis e poluição do meio ambiente (GÓMEZ et al., 2006; KLOCKE et al., 2007). Esse aumento tem por finalidade a mitigação dos gases do efeito estufa ( $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ ), o fornecimento de meios para a independência de energia e podem ainda oferecer novas possibilidades de emprego (DEMIRBAS e BALAT, 2006).

O biogás gerado na digestão anaeróbia é uma fonte de energia útil que pode ser utilizada para diversas finalidades: pode ser usado diretamente nas caldeiras ou outros equipamentos de queima de combustível, em motores acoplados diretamente a geradores de energia, e, ainda, se houver uma adequação do biogás às especificações do gás natural, pode ser utilizado em motores de veículos ou fornecer uma rede local de gás (NOYOLA,

MORGAN-SAGASTUME e LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2006). O biogás é um combustível limpo, barato, versátil e também renovável.

Massé e Masse (2001) estudaram o tratamento de efluente de abatedouro em quatro reatores anaeróbios operados em bateladas seqüenciais (ASBR) sob o efeito de diferentes temperaturas. Os resultados mostraram que as maiores taxas de produção de metano foram a 30°C, com uma produção média de 0,37 g CH<sub>4</sub>-DQO.g<sup>-1</sup> SV.d<sup>-1</sup> (g/g/d) e a 25°C, com produção de 0,34 g/g/d.

Manariotis e Grigoropoulos (2006), estudando três filtros anaeróbios de fluxo ascendente para o tratamento de esgoto municipal contendo como meio suporte cerâmica, anéis de plástico e pedaços de pedras, observaram que a aparente conversão da matéria orgânica em biogás alcançou uma taxa máxima de 0,17 a 0,18 m<sup>3</sup>.kg<sup>-1</sup> de DQO removida com TRH de 1,25 dias.

## 2.7 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA

A composição bioquímica da maioria dos organismos é muito semelhante, biomoléculas, enzimas, vias metabólicas e assim por diante. Porém as archaeas são diferentes, este grupo diverso de microrganismos possui algumas características únicas que lhes permite tolerar e prosperar em alguns dos mais inóspitos ambientes da Terra. Muitas são altamente adaptadas a ambientes com condições químicas ou físicas extremas (temperatura, pH, salinidade, etc.). O grupo pode ser dividido em hipertermófilos, halófilos e metanogênicos. Isto sugere que as archaeas podem ser descendentes das primeiras formas de vida celular que teriam evoluído em tais condições (BULLOCK, 2000).

Apesar das semelhanças morfológicas, as archaeas são mais estreitamente relacionadas bioquimicamente com os eucariotos do que com as bactérias. Uma das mais significantes



diferenças entre archaeas e outros organismos é a estrutura química dos lipídeos da membrana que é composta por cadeias de isopreno saturadas, de diferentes tamanhos, ligadas ao glicerol por ligações éter (DE ROSA, 1996; BULLOCK, 2000; NISHIMURA e EGUCHI, 2007).

A diversidade microbiana existe, em diferentes níveis, dentro de espécies, comunidades e ecossistemas. Mas, até poucas décadas, a compreensão desta diversidade era limitada devido a pequena quantidade de espécies de microrganismos passíveis de cultivo, representando menos de 1% do total de microrganismos estimados existir no planeta (YANG; YAO e WANG, 2004) O desenvolvimento de métodos moleculares independentes de cultivo tem facilitado a determinação da diversidade microbiana uma vez que fornecem uma perspectiva mais real da complexidade dentro dos sistemas ambientais (YANG; YAO e WANG, 2004; COOK et al., 2004). Especialmente em biorreatores anaeróbios, onde a estabilidade e o desempenho são fortemente dependentes de complexas interações microbianas, o estudo molecular independente de cultivo permite avaliar a estrutura microbiana e as características funcionais do sistema (ROEST et al., 2005; DEMIREL e YENIGÜN, 2006).

Na prática, os biorreatores operam em condições dinâmicas e estão freqüentemente sujeitos a mudança nos parâmetros operacionais. Apesar disso, pouco se sabe sobre a forma como tais distúrbios afetam a dinâmica da comunidade e, conseqüentemente, a sua estabilidade funcional (GENTILE et al., 2006).

Dessa forma, a determinação da diversidade microbiana e da função desses microrganismos envolvidos no processo, permite aos pesquisadores modelar e aperfeiçoar o desempenho e a operação desses sistemas (GILBRIDE, LEE e BEAUDETTE, 2006).

Na maioria dos casos, as técnicas microbiológicas clássicas para o estudo da biodiversidade microbiana são de utilização limitada, devido à especialização de certos requisitos ambientais necessários para o crescimento de grupos de microrganismos como as

archaeas e bactérias acetogênicas. Dessa forma, além de técnicas tradicionais de isolamento, diversas técnicas independentes de cultivo, baseadas na detecção de diferenças do genoma microbiano, têm sido estabelecidas (KLOCKE et al., 2007).

Em particular, métodos moleculares com base em análises da seqüência de nucleotídeos do gene 16S rDNA (DNA ribossômico) têm sido utilizados na determinação da diversidade microbiana. Essa seqüência está universalmente presente em bactérias e archaeas, uma vez que codifica o rRNA (RNA ribossômico) da subunidade menor do ribossomo desses microrganismos. O 16S rDNA contém regiões altamente conservadas intercaladas com regiões variáveis, facilitando assim o desenho de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) e sondas para análises de filogenia. Análises de seqüências de rDNAs revelaram que o 16S pode ser usado como biomarcador evolutivo. Atualmente, uma grande base de dados de seqüências do rDNA 16S está disponível, e está a expandir-se diariamente. Dessa forma, análises de seqüências do gene 16S rDNA têm se tornado um importante instrumento para a identificação de novas linhagens de microrganismos (CALLI et al., 2006).

Para comparar comunidades microbianas em diferentes níveis de especificidade (família, gênero ou espécie), muitas técnicas moleculares baseadas em seqüências de rDNA 16S foram desenvolvidas, como por exemplo, DGGE (eletroforese em gel com gradiente denaturante), tRFLP (polimorfismo do comprimento dos fragmentos terminais de restrição) e ARDRA (análise da restrição de rDNA amplificado) (COOK et al., 2004).

Dentre as metodologias citadas, a ARDRA tem se destacado por fornecer um rápido perfil das comunidades estudadas. Essa técnica molecular requer a amplificação do gene marcador 16S rDNA, a sua posterior digestão utilizando enzimas de restrição específicas e, finalmente, a análise do perfil de migração dos fragmentos digeridos após corrida eletroforética. O perfil de fragmentos obtido permite a caracterização da comunidade

analisada (MALIK et al., 2008; WANG et al., 2008). Os padrões da ARDRA são altamente reprodutíveis e comparáveis entre laboratórios (SATOKARI et al., 2003).

A análise dos dados obtidos pela ARDRA permite medir a similaridade entre os pares de populações ou indivíduos e, ainda, agrupar as populações ou indivíduos baseando-se na similaridade entre eles e na estimativa da diversidade genética das populações (SCHLÜTER e HARRIS, 2006). O número de fragmentos (bandas) no gel indica a riqueza de seqüências de 16S rDNA presentes na comunidade microbiana e a intensidade dessas bandas sinaliza a abundância relativa dessas seqüências na comunidade (YANG, YAO e WANG, 2004; WANG et al., 2008).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem por objetivo geral comparar a eficiência de três filtros biológicos anaeróbios de fluxo ascendente com diferentes tipos de suporte para tratamento de efluente de abatedouro.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Este trabalho tem como objetivos específicos:

- Avaliar e comparar a eficiência dos três filtros biológicos anaeróbios quanto aos seguintes fatores: remoção de Demanda Química de Oxigênio (DQO), remoção de sólidos totais e voláteis, de nitrogênio e fósforo;
- Analisar e comparar a diversidade microbiana entre os filtros biológicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SUBSTRATO

O substrato utilizado foi o efluente gerado no Matadouro Municipal da cidade de Ponta Grossa-PR. O matadouro abate cerca de 500 bovinos e 2000 suínos por mês. O efluente foi coletado após a etapa de tratamento primário, realizada por um tanque de decantação e flotação para a retirada dos sólidos mais grosseiros e da gordura (Figura 3), armazenado em recipientes de polipropileno com 5 litros de capacidade e mantido em freezer. De acordo com a necessidade, os galões eram descongelados e mantidos em geladeira, o volume a ser utilizado era aquecido até temperatura ambiente antes da alimentação dos reatores. A frequência das coletas do efluente no matadouro foi variável durante o experimento, nos TRHs iniciais as coletas foram realizadas com menor frequência, aproximadamente uma vez a cada dois meses, porque o volume de substrato utilizado em cada reator era menor. Nos TRHs finais foram realizadas coletas com uma frequência maior, aproximadamente uma a cada quinze dias.



Figura 3 - Foto do ponto de coleta do efluente utilizado no experimento

## 4.2 REATORES ANAERÓBIOS

No presente experimento foram utilizados três filtros biológicos anaeróbios de fluxo ascendente, com um tipo de suporte diferente em cada reator, conforme apresentado na Tabela 1. Os reatores foram operados à temperatura ambiente, que variou de 14°C a 29°C, e alimentados diariamente.

O volume útil dos reatores corresponde ao volume total do mesmo excluído o volume do material suporte e do inóculo. Antes de serem colocados nos reatores, os materiais suporte ficaram submersos em água durante 24 horas para que os espaços vazios fossem preenchidos e não interferissem na medida do volume útil. O lodo preencheu 1/3 do volume total de cada reator.

Tabela 1 - Reatores utilizados neste experimento com respectivo tipo de suporte e volume útil

<b>Reator</b>	<b>Tipo de suporte</b>	<b>Volume útil</b>
A	anéis de polipropileno	1040 mL
B	espuma de poliuretano sem corantes e substâncias antimicrobianas	910 mL
C	tijolo de argila	910 mL

A mangueira de polipropileno tem sido freqüentemente utilizada nos estudos de tratamento de efluentes do mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR em função da facilidade de obtenção e baixo preço. A espuma de poliuretano tem sido muito investigada como suporte em reatores no tratamento de diversos tipos de efluentes devido à elevada relação volume/área (VARESCHE et al., 1997; JOU e HUANG, 2002; YANG et al., 2004a; LIMA et al., 2005; SARTI et al., 2006; SARTI et al., 2007) e os pedaços de tijolo de argila são resíduos da construção civil sendo, portanto, escolhidos como material suporte neste estudo por se tratarem de uma fonte alternativa barata.

Os reatores foram construídos em tubos de PVC (Policloreto de Vinila) de 10 cm de diâmetro, com cerca de 30 cm de altura (Figura 4) recheados com os materiais suporte

ilustrados na Figura 5.



Figura 4 - Foto dos três reatores anaeróbios utilizados no experimento

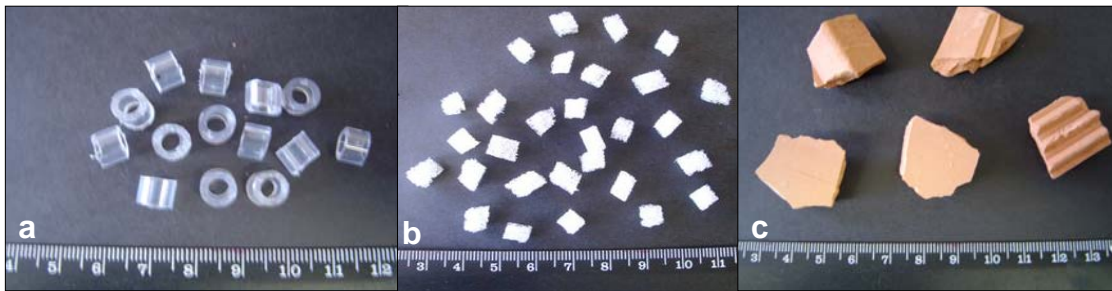


Figura 5 - Materiais suporte utilizados neste estudo: a- anéis de mangueira de polipropileno; b- cubos de espuma de poliuretano; c- tijolo de argila

### 4.3 GASÔMETRO

Para cada reator foi construído um gasômetro para se quantificar a produção do biogás. O gasômetro era composto de um frasco de vidro preenchido com solução salina acidificada (25% de NaCl e 3% de  $H_2SO_4$ ). Cada frasco foi fechado com uma rolha com duas saídas, na qual foram introduzidas duas mangueiras, uma para passagem do biogás e a outra para a solução salina. À medida que ocorria a produção de gás, a solução era deslocada do frasco e coletada em um recipiente plástico para medida do volume. Com a solução salina acidificada determinava-se o volume total de biogás produzido (Figura 6).

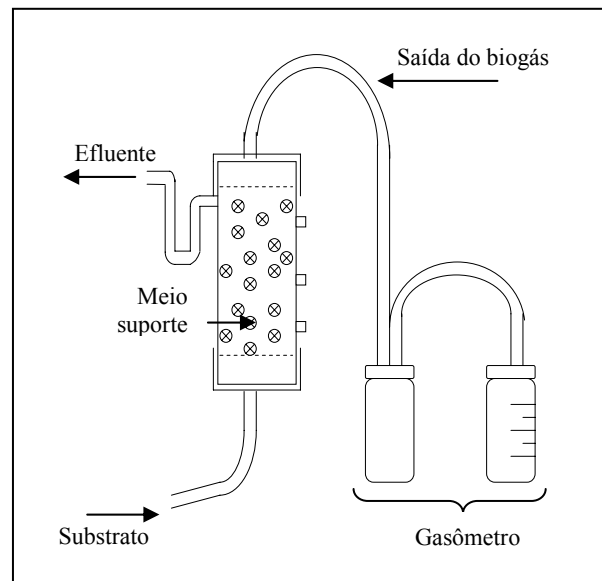


Figura 6 -Esquema geral do reator utilizado neste experimento e respectivo gasômetro

#### 4.4 INÓCULO

Os três reatores foram inoculados com lodo de um reator metanogênico em operação desde o ano de 1997, doado pela Cervejaria FEMSA, unidade de Ponta Grossa-PR (Figura 7).



Figura 7 - Lodo do reator metanogênico da cervejaria FEMSA, utilizado como inóculo neste experimento



## 4.5 DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

### 4.5.1 Processo de partida

Iniciou-se o experimento com Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) de 30 dias para os três reatores. Os reatores foram alimentados com o efluente do abatedouro com DQO de 3466,7 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> até que o efluente completasse todo o volume útil do reator (ao final de trinta dias), nesse período, não houve coleta de amostras, somente a entrada do substrato. Escolheu-se um TRH elevado para o processo de partida para que o lodo pudesse se adaptar às novas condições empregadas.

### 4.5.2 Período de otimização

Após os primeiros trinta dias de operação, verificando-se que o processo encontrava-se em estado estacionário aparente, ou seja, a taxa de remoção de DQO havia se estabilizado, mudou-se o TRH dos filtros anaeróbios de 30 para 20 dias e iniciou-se a coleta de amostras para o monitoramento do funcionamento dos reatores. Durante o experimento, foram utilizados TRHs iguais para os três reatores. Os TRHs utilizados foram de 20; 18; 14; 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1,5 e 1 dia. As mudanças de TRH eram realizadas sempre que a remoção da carga orgânica se apresentava constante.

### 4.5.3 Alimentação e pontos de coleta das amostras

A alimentação era realizada em regime contínuo, uma vez ao dia, de segunda a sexta-feira, os três reatores eram alimentados simultaneamente e com o mesmo lote do substrato. As amostras do efluente dos reatores foram coletadas no ponto 5 (Figura 8) pelo deslocamento produzido pela entrada do substrato no ponto 4.

No TRH de 1 dia os reatores foram alimentados em sistema de batelada, esvaziados

antes da alimentação. O esgotamento do volume dos reatores iniciava-se na saída de número 1, localizada no ponto mais alto do reator, seguida pela de número 2, 3 e 4. Depois de esvaziados procedia-se à alimentação dos mesmos pelo ponto 4 (Figura 8). Para o TRH de 1 dia, também se coletou amostra dos pontos 1, 2, 3 e 4 de cada reator (Figura 8).



Figura 8 – Foto do reator com os pontos de alimentação e retirada de amostra

#### 4.6 REAGENTES

O preparo dos reagentes utilizados para as análises está descrito no Anexo 1.

#### 4.7 METODOLOGIA ANALÍTICA

A metodologia analítica está descrita com mais detalhes no Anexo 2.

##### 4.7.1 Determinação de pH

A determinação de pH foi feita segundo metodologia descrita em APHA (1998), utilizando-se um potenciômetro.

##### 4.7.2 Determinação da alcalinidade e Acidez Volátil

A Alcalinidade e a Acidez Volátil foram determinadas pelo método titulométrico segundo descrito por Silva (1981).

#### 4.7.3 Determinação de Sólidos totais (ST) e voláteis (SV)

O teor de sólidos totais e voláteis foi determinado pelo método gravimétrico segundo descrito em APHA (1998).

#### 4.7.4 Determinação de Demanda Química de Oxigênio

A medida da DQO foi realizada segundo metodologia descrita em APHA (1998), utilizando-se o método colorimétrico de refluxo fechado.

#### 4.7.5 Determinação dos teores de Nitrogênio e Fósforo

##### - Nitrogênio

Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método micro-Kjeldahl, segundo metodologia descrita por APHA (1998). O fósforo foi determinado segundo metodologia descrita por SILVA (1981).

### 4.8 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO SUPORTE

Para caracterização do meio suporte foram feitas determinações de densidade aparente, porosidade aparente e microscopia ótica.

#### 4.8.1 Densidade aparente

A densidade aparente da mangueira de polipropileno foi medida utilizando a Equação

I.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad \text{(Equação I)}$$

Onde,

$\rho$  – Densidade aparente da amostra ( $\text{g.cm}^{-3}$ );

m - massa da amostra (g);

V - volume da amostra (cm<sup>3</sup>).

A medida da massa da amostra foi realizada pesando-se cinco anéis de mangueira de polipropileno e anotando-se a massa. Colocou-se água destilada em uma proveta até a metade de sua capacidade total. Ajustou-se o menisco e anotou-se o volume. Os anéis de mangueira foram introduzidos na proveta, anotou-se o novo volume. Calculou-se a diferença entre o volume inicial e o volume final, esta medida fornece o volume da amostra. As medidas foram feitas em triplicata.

A densidade aparente da espuma foi fornecida pelo fabricante da mesma, a fábrica Sonhos Indústria e Comércio de Colchões Ltda, localizada no município de Curitiba-PR.

O tijolo de argila teve sua densidade aparente determinada segundo metodologia descrita por SANTOS (1989). A medida da densidade baseia-se em três pesagens, realizadas de acordo com a metodologia descrita abaixo:

-A 1ª pesagem foi efetuada após a amostra ter sido seca em estufa a temperatura de 105°C por 24 horas. Este valor foi denominado peso seco.

-A 2ª pesagem foi efetuada após a amostra ter ficado submersa em água destilada por 24 horas a temperatura ambiente. Este valor foi denominado peso úmido.

-A 3ª pesagem foi efetuada com a amostra imersa em água. Este valor foi denominado peso imerso. As pesagens foram realizadas em triplicata.

A densidade aparente do tijolo foi expressa segundo a Equação II.

$$Densidade\ aparente\ (g/cm^3) = \frac{peso\ seco\ (g)}{peso\ úmido\ (g) - peso\ imerso\ (g)} \quad (Equação\ II)$$

#### 4.8.2 Porosidade aparente

Fez-se a determinação da porosidade aparente do tijolo de argila segundo metodologia descrita por Santos (1989).

-A 1ª pesagem foi efetuada após a amostra ter sido seca em estufa a temperatura de 105°C por 24 horas. Este valor foi denominado peso seco.

-A 2ª pesagem foi efetuada após a amostra ter ficado submersa em água destilada por 24 horas a temperatura ambiente. Este valor foi denominado peso úmido.

-A 3ª pesagem foi efetuada com a amostra imersa em água. Este valor foi denominado peso imerso. As pesagens foram realizadas em triplicata.

A porosidade aparente do tijolo foi expressa segundo a Equação III.

$$Porosidade\ aparente\ (\%) = \frac{peso\ úmido\ (g) - peso\ seco\ (g)}{peso\ úmido\ (g) - peso\ imerso\ (g)} \times 100 \quad (Equação\ III)$$

#### 4.8.3 Microscopia ótica

Para as análises de microscopia ótica utilizou-se um microscópio Olympus BX51. A amostra de tijolo de argila foi visualizada em campo escuro com aumento de 100 vezes e a de espuma em luz transmitida com aumento de 50 vezes. A estrutura dos poros da amostra de mangueira de polipropileno não puderam ser visualizados por microscopia ótica pelo fato de serem muito pequenos.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados obtidos pelas análises realizadas no monitoramento dos reatores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5%, utilizando o software Statistica 7.0 (2004) (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

## 4.10 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA

### 4.10.1 Escolha dos “primers” (oligonucleotídeos iniciadores)

As seqüências dos “primers”, obtidas na literatura, foram avaliadas quanto à homologia com as seqüências do gene 16S rDNA de microrganismos comumente encontrados em reatores anaeróbios. Para isso, fez-se um levantamento bibliográfico das linhagens e grupos de microrganismos que podem ser encontrados em diversos tipos de reatores. As seqüências de nucleotídeos do gene 16S rDNA desses microrganismos foram buscadas nos endereços: <http://www.jgi.doe.gov>, do JGI (“Joint Genome Institute”) e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). As seqüências foram alinhadas e confrontadas com os “primers” utilizando o programa ClustalW (“Expert Protein Analysis System”), no endereço <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Os “primers” foram confrontados também com o banco de dados de seqüências do gene 16S rDNA de bactérias do RDP (“Ribosomal Database Project II”), no endereço <http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>. Na Tabela 2 estão listadas as seqüências dos “primers” utilizados neste estudo.

Tabela 2 - “Primers” utilizados para amplificação do gene 16s rDNA das amostras dos reatores

Primer	Seqüência	Domínio	Referência
28F	5'-TGGTTGATCCTGCCAGAGG-3'	Archaea	SHIGEMATSU et al., 2006
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Bacteria	LANE, 1991; SHIGEMATSU et al., 2006
1492R	5' AAGTCGTAACAAGGTAGCCG 3'	Universal	LANE, 1991

### 4.10.2 Coleta das amostras

Para a coleta das amostras, os reatores foram parcialmente esvaziados e então agitados (para homogeneizar a biomassa) após tampar suas saídas. As amostras foram coletadas em frascos estéreis e transportadas sob refrigeração até o laboratório, para a extração imediata do DNA.

#### 4.10.3 Extração do DNA

Para a extração do DNA das amostras, utilizou-se o Kit comercial PSP Spin Stool DNA Kit, Invitex Inc de acordo com as recomendações do fabricante até o passo 3. Após este passo, utilizou-se um tratamento adicional para a extração das impurezas, com a adição de igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), os tubos foram agitados levemente e centrifugados a 17900 g por 5 minutos. Passada essa etapa de lavagem, a fase aquosa foi transferida para tubos novos e o DNA foi precipitado após adição de 0,6 volumes de isopropanol e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente (~25°C). Posteriormente, o DNA precipitado foi centrifugado a 17900 g por 20 minutos e o sobrenadante descartado. Após a adição de 1 mL de etanol 70% ao precipitado, os tubos foram centrifugados a 17900 g por 8 minutos e o sobrenadante descartado. Ao final o precipitado foi seco em estufa a 37°C, ressuspenso em 20 µL de água e congelado a -20°C.

#### 4.10.4 Quantificação do DNA extraído

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro SHIMADZU (Modelo UV-1650PC, Japão) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para tal, as amostras de DNA foram diluídas 5-10 vezes em água MilliQ. A leitura a 260 nm permite o cálculo da concentração de ácidos nucleicos na amostra e a relação entre a Densidade Óptica em 260 nm e a 280 nm ( $D.O._{260}/D.O._{280}$ ) fornece uma estimativa da pureza do DNA. Para estimar a quantidade de DNA, utilizou-se a Equação IV a qual considera que uma unidade de Densidade Óptica (D.O.) equivale a 50 ng de DNA por µL de solução.

$$\text{Concentração do DNA (ng. } \mu\text{L}^{-1}) = D.O._{260} \times 50 \times fd \quad (\text{Equação IV})$$

Onde:

$D.O._{260}$ : Densidade Óptica na amostra medida em 260 nm;

fd: fator de diluição.

#### 4.10.5 Tratamento do DNA com BSA (Albumina do Soro Bovino)

O sistema de reação (20  $\mu\text{L}$ ) utilizado para o tratamento do DNA extraído dos reatores com BSA continha 10  $\mu\text{L}$  de DNA (10  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 6  $\mu\text{L}$  de BSA (Q-Bio-Gene Inc - 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e 4  $\mu\text{L}$  de água MilliQ. Esse sistema foi incubado durante 45 minutos a 37° C.

#### 4.10.6 Amplificação do DNA

Na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pequenas seqüências de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos (“primers”) se anelam nas fitas complementares do DNA e direcionam a síntese de milhões de cópias do fragmento de DNA delimitado pelos “primers”.

Os “primers” utilizados na PCR foram planejados baseando-se na seqüência de nucleotídeos de uma região conservada do marcador molecular 16S rDNA, região essa que é comum a um grande número de espécies de microrganismos procariotos (LANE, 1991; MARCHESI et al., 1998).

O sistema para a PCR utilizado continha 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Invitrogen Inc), 5  $\mu\text{L}$  de tampão da Taq polimerase 10x (Invitrogen Inc), 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (Desoxirribonucleotídeos Tri-Fosfatados – GE Healthcare) 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 10 pmol de cada “primer” (63F e 1492R - Prodimol Inc), 2U Taq DNA polimerase (Invitrogen Inc), sistema de 20  $\mu\text{L}$  do tratamento do DNA com BSA e água MilliQ para completar 50  $\mu\text{L}$ .

O programa utilizado no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) para o conjunto de primers que amplificam o domínio Bacteria consistiu de 1 ciclo de 94°C por 3 minutos seguido de 25 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (55°C) e extensão (72°C). Ao final, foi acrescentada uma etapa à 72°C por 10 minutos para garantir a completa extensão do DNA. Para os primers que amplificam o domínio Archaea foi utilizado o programa descrito por Rösch et al. (2002).



#### 4.10.7 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese juntamente com marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ /Hind III (Invitrogen Inc). As amostras foram misturadas em tampão FSUDS (Tabela 3). As corridas eletroforéticas foram feitas em gel de agarose 1%, a 40 V por 2 h, em tampão TAE 1x (Tabela 3), coradas com brometo de etídeo  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Invitrogen Inc), visualizadas sob luz ultra-violeta e fotografadas em câmera digital (Olympus modelo C-3040ZOOM, Japão).

Na Tabela 3 encontra-se a composição das soluções e tampões utilizados nas eletroforeses deste trabalho.

Tabela 3 - Composição das soluções e tampões

Soluções/tampões	Composição
Acrilamida-Bis (30% T <sup>a</sup> , 2.67% C <sup>b</sup> )	29,2% (p/v) acrilamida e 0,8% (p/v) bisacrilamida
FSUDS 5x	0,25% (p/v) azul de bromofenol; 30% (v/v) glicerol; 65 mmol.L <sup>-1</sup> , Tris-HCl pH 8,0; 1% SDS e 1,8 mmol.L <sup>-1</sup> de EDTA pH 8,0
TAE 1x	0,04 mol.L <sup>-1</sup> Tris base; 1,14 mL ácido acético glacial e 1 mmol.L <sup>-1</sup> EDTA pH 8,0
TE 1x	10 mM Tris-Cl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0

<sup>a</sup> percentagem de acrilamida + bisacrilamida.

<sup>b</sup> percentagem de bisacrilamida.

#### 4.10.8 Purificação do DNA amplificado

Os produtos da PCR (40  $\mu\text{L}$ ) foram precipitados a partir da adição de 150  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (96%) e 10  $\mu\text{L}$  de água MilliQ, homogeneização e incubação do sistema durante uma hora a temperatura ambiente. Após centrifugação a 17900 g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Novamente, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 17900 g e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi seco em estufa a 37°C, ressuspensão em 5  $\mu\text{L}$  de tampão TE 1x e congelado a -20°C.

#### 4.10.9 Análise de restrição do fragmento amplificado (ARDRA)

Os sistemas de restrição (15  $\mu$ L) continham 350 ng de DNA amplificado com os “primers” 27F/1492R e 500ng do DNA amplificado com os “primers” 28F/1492R; 0,5  $\mu$ L da enzima *Hinf*I (Fermentas Life Scienses Inc.), *Rsa*I (Fermentas Life Scienses Inc.) e *Hae*III (Invitrogen Inc); 1,5  $\mu$ L do tampão R 10x, Tango 10x e React 2 10x, respectivamente. Os sistemas foram incubados a 37°C por 5 horas. Posteriormente, as enzimas foram inativadas pela incubação por 20 minutos a 65°C. A restrição foi analisada em gel de poliacrilamida 12%.

#### 4.10.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Na Tabela 4 estão listados os reagentes e respectivas concentrações utilizadas para os géis de poliacrilamida.

Tabela 4 – Composição do gel de poliacrilamida de empilhamento e de separação

Reagentes	Gel de empilhamento 4%	Gel de separação 12%
Água MilliQ	1,15 mL	4,95 mL
TAE 10x	150 $\mu$ L	1 mL
Acrilamida-Bis (30% T <sup>a</sup> , 2.67% C <sup>b</sup> )	195 $\mu$ L	4 mL
Persulfato de amônio 10%	7,5 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	1,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Volume total	2 mL	10 mL

<sup>a</sup> percentagem de acrilamida + bisacrilamida.

<sup>b</sup> percentagem de bisacrilamida.

Os géis foram feitos usando o sistema de minigéis da Hoefer. Após uma pré-corrída em tampão TAE 1x a 100V durante 30 minutos, as amostras foram aplicadas e submetidas à eletroforese em tampão TAE 1x a 100V durante 2 horas. O gel foi corado em brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), visualizado em luz ultravioleta e fotografado em câmara digital (Olympus modelo C-3040ZOOM, Japão).

#### 4.10.11 Análise do perfil de restrição

A imagem do perfil de restrição no gel foi capturada pelo programa LabWorks 4.0 (UVP Inc), o contraste e o “background” da imagem foram ajustados para reduzir os interferentes nas análises das bandas e conseguir uma imagem com alta resolução. Análises no LabWorks permitiram determinar a posição e a intensidade relativas das bandas detectadas no gel.

Os diferentes padrões de restrição gerados por ARDRA para cada conjunto de primers com as enzimas *HinfI*, *RsaI* e *HaeIII* de cada reator foram utilizados para calcular riqueza, riqueza modificada e os índices de diversidade e dendograma de similaridade.

Para o cálculo da riqueza e riqueza modificada, foram utilizadas matrizes binárias que representavam a presença e ausência de bandas no perfil de restrição de cada reator.

Para a determinação do índice de diversidade de Shannon-Weaver, foi utilizada uma metodologia proposta por Yang et al. (2004), representada na Equação V. Na qual o índice de  $D_{sh}$  deve estar entre 0 e  $\ln(S)$ , para ser considerado significativo.

$$D_{sh} = - \sum_{i=1}^S (N_i / N) \times \ln(N_i / N) \quad (\text{Equação V})$$

Onde:

$D_{sh}$ : diversidade de Shannon-Weaver;

$N_i$ : intensidade de cada banda após subtração do “background”;

$N$ : intensidade de todas as bandas da amostra após subtração do “background”;

$\ln$ : logaritmo natural;

$S$ : riqueza.

Os dendogramas de similaridade foram estimados utilizando uma matriz binária de presença e ausência de bandas. Os dados obtidos foram utilizados para a construção de uma

matriz binária que foi analisada com auxílio do programa computacional NTSYSpc (“Numerical Taxonomy System of multivariate Analysis System”) versão 2.1 (Applied Biostatistics Inc).

Os dendogramas foram construídos pelo algoritmo UPGMA (“Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages”), desenvolvido por Sokal e Michener (1958), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1901).

Esse coeficiente permite calcular similaridades com base em variáveis binárias. As homologias entre diferentes padrões de bandeamento foram calculadas pela Equação VI.

$$J = 100 \left[ \frac{c}{(a + b - c)} \right] \quad \text{(Equação VI)}$$

Onde:

a: número de bandas da amostra A;

b: número de bandas da amostra B;

c: número de bandas que estão em comum nas amostras A e B.

A Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) foi realizada utilizando dados físico-químicos do TRH de 1 dia e o índice de diversidade de Shannon-Weaver utilizando o programa computacional Einsight 3.0 (Infometrix Inc).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

Na Tabela 5 está apresentada a composição dos lotes de substrato utilizados durante o experimento e de um similar encontrado na literatura. Observa-se que os valores dos parâmetros analisados são variáveis entre os lotes, devido às variações nas espécies e no número de animais abatidos durante as coletas do substrato. A composição do efluente de abatedouro também pode variar de uma instalação para outra, dependendo do processo industrial e o consumo de água por animal abatido (DEL NERY et al., 2006).

Tabela 5 - Caracterização dos lotes de substrato utilizados neste experimento e do similar encontrado na literatura

Parâmetro	Lote 01	Lote 02	Lote 03	Lote 04	Lote 05	Lote 06	Lote 07	Lote 08	Faixa	BEUX, NUNES e BARANA (2007)
pH	7,02	6,95	7,07	7,51	7,60	7,02	8,81	8,01	6,95-8,81	6,20-8,40
Alcalinidade	450	300	533	213	168	131	430	336	131-533	283-1433
Acidez Volátil	224	102	496	242	161	119	259	259	102-259	114-752
Sólidos Totais	0,30	0,12	0,16	0,17	0,26	0,10	0,28	0,33	0,10-0,33	0,12-0,39
Sólidos Voláteis	0,23	0,09	0,12	0,13	0,20	0,09	0,22	0,24	0,09-0,24	0,04-0,15
DQO	3467	3543	2156	1448	1713	1192	962	995	962-3543	1200-4389
Nitrogênio	21,70	10,20	11,50	11,74	15,67	7,89	3,88	26,02	3,88-26,02	60,30-460,00
Fósforo	34,50	31,90	25,76	33,44	24,58	27,56	22,97	57,04	22,97-57,04	9,00-69,00

Unidades: Alcalinidade ( $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ), Acidez Volátil ( $\text{mgCH}_3\text{COOH}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Sólidos Totais e Sólidos Voláteis (%), DQO ( $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ), Nitrogênio e Fósforo ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Durante a realização do experimento houve variação do TRH (Tempo de Retenção Hidráulica) dos reatores, que foi sendo diminuído gradativamente para que o processo se tornasse mais econômico, pois, quanto menor o TRH, menor o volume do biodigestor. Na Tabela 6 encontram-se os TRHs utilizados nos reatores, bem como sua duração e respectivos

lotes de substratos utilizados em cada um.

Tabela 6 - Período de duração dos TRHs e respectivos lotes do substrato utilizados nos reatores

TRH (dias)	Duração	Lote substrato
30	23/08/06 a 02/10/06	01
20	03/10/06 a 01/11/06	01
18	06/11/06 a 01/12/06	01
14	04/12/06 a 22/12/06	01 e 02
10	30/01/07 a 02/03/07	02
08	05/03/07 a 10/04/07	02 e 03
06	11/04/07 a 08/05/07	03 e 04
05	09/05/07 a 29/05/07	04
04	30/05/07 a 20/06/07	04 e 05
03	21/06/07 a 06/07/07	05 e 06
02	09/07/07 a 23/07/07	06
1,5	24/07/07 a 03/08/07	07
01	06/08/07 a 24/08/07	07 e 08

Os valores de pH do substrato permaneceram muito próximos de 7,0 durante a maior parte do experimento. Contudo, no TRH de 1,5 dias houve um aumento nos valores desse parâmetro. Isto ocorreu devido à utilização de um novo lote, lote 07, como pode ser observado na Tabela 6, que foi utilizado também no TRH de 1 dia.

## 5.2 ANÁLISES DO EFLUENTE DE CADA REATOR

### 5.2.1 Valores de pH, Acidez Volátil, Alcalinidade e relação Acidez Volátil/Alcalinidade

Na Figura 9 encontram-se os valores de pH do efluente dos três reatores em função da temperatura e dos dias de funcionamento dos mesmos. Os valores de pH dos efluentes dos três reatores permaneceram acima de 7,0 na maior parte do período analisado, indicando boa estabilidade do sistema.

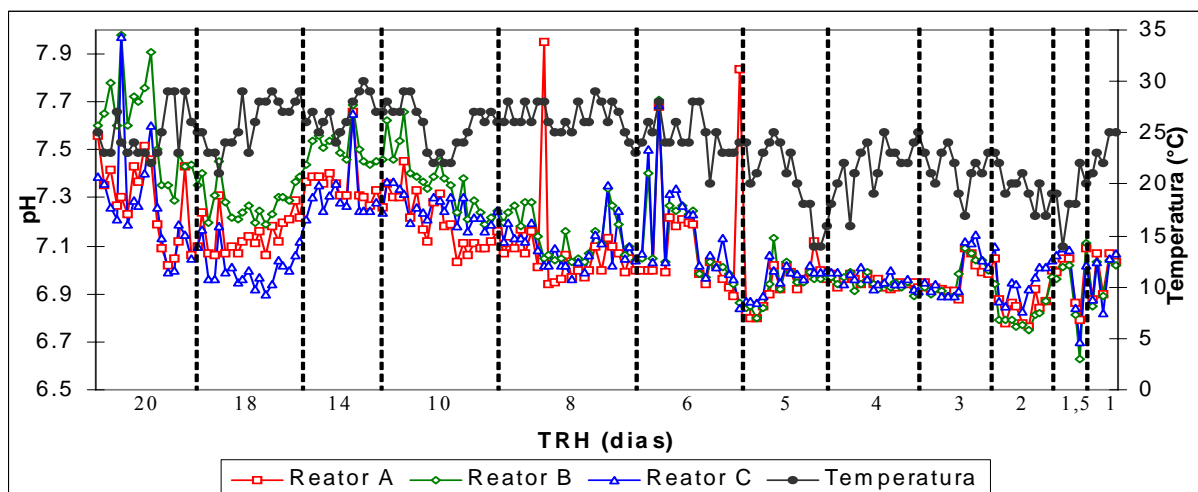


Figura 9 - Valores de pH do efluente dos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH

Observa-se que os valores de pH dos efluentes dos três reatores decresceram com a redução do TRH, sendo que o efluente do reator B, com meio suporte de espuma, apresentou os maiores valores de pH no início do experimento, indicando maior consumo de ácidos orgânicos devido, provavelmente, a uma maior concentração de archaeas metanogênicas, que convertem os ácidos a metano e  $\text{CO}_2$ , pois, comparando-se os três meios suportes, a espuma é a que tem menor densidade e poros de maior tamanho, ou seja, maior área para aderência e desenvolvimento da biomassa. Porém, a partir do TRH de 5 dias, os valores de pH do efluente dos três reatores ficaram muito próximos.

Silva et al. (2006) estudando o efeito do material suporte em filtros anaeróbios na adesão da biomassa, verificaram que a espuma de poliuretano apresentou a concentração específica de biomassa mais elevada durante todo o experimento, quando comparada com carvão vegetal, polietileno de baixa densidade e cerâmica.

Na Tabela 7 encontram-se os valores médios de pH do efluente dos reatores em função do TRH.

Tabela 7 – Valores médios de pH do efluente dos reatores A, B e C em função do TRH

TRH (dias)	n	Reator A	$\sigma$	Reator B	$\sigma$	Reator C	$\sigma$
20	18	7,29 <sup>b</sup>	0,17	7,60 <sup>a</sup>	0,20	7,28 <sup>c</sup>	0,24
18	19	7,15 <sup>a</sup>	0,08	7,29 <sup>b</sup>	0,08	7,01 <sup>c</sup>	0,08
14	14	7,36 <sup>a</sup>	0,10	7,51 <sup>c</sup>	0,07	7,30 <sup>b</sup>	0,11
10	20	7,20 <sup>a</sup>	0,11	7,37 <sup>b</sup>	0,13	7,26 <sup>b</sup>	0,07
08	24	7,08 <sup>a</sup>	0,20	7,14 <sup>b</sup>	0,10	7,09 <sup>c</sup>	0,09
06	18	7,13 <sup>a</sup>	0,26	7,13 <sup>b</sup>	0,21	7,15 <sup>c</sup>	0,21
05	14	6,94 <sup>b</sup>	0,09	6,94 <sup>a</sup>	0,09	6,96 <sup>a</sup>	0,06
04	16	6,95 <sup>b</sup>	0,02	6,95 <sup>a</sup>	0,03	6,96 <sup>a</sup>	0,03
03	12	6,96 <sup>b</sup>	0,07	6,96 <sup>a</sup>	0,08	6,98 <sup>a</sup>	0,10
02	8	6,87 <sup>a</sup>	0,10	6,82 <sup>a</sup>	0,09	6,93 <sup>a</sup>	0,09
1,5	10	6,95 <sup>b</sup>	0,10	6,90 <sup>a</sup>	0,14	6,98 <sup>a</sup>	0,12
01	5	6,99 <sup>b</sup>	0,09	6,97 <sup>a</sup>	0,09	6,97 <sup>a</sup>	0,11

A, B e C: reator A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente.  $\sigma$ : desvio padrão. N: número de amostras analisadas. \*Letras diferentes em uma mesma linha denotam diferença estatística entre eles (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ).

Na Tabela 8 estão os valores de alcalinidade e acidez volátil dos três reatores em função do TRH. Os valores de alcalinidade decresceram com a redução do TRH, no TRH de 1 dia houve um aumento neste valor para os três reatores. Comparando-se os valores apresentados na Tabela 8 com os da Figura 9, observa-se que, apesar de os teores de alcalinidade baixarem com a diminuição do TRH e os teores de acidez volátil sofrerem um pequeno aumento (Tabela 8), os valores de pH dos efluentes dos reatores permaneceram próximos à neutralidade (Figura 9), indicando que a alcalinidade foi suficiente para a manutenção desses valores.

Os teores de alcalinidade e acidez volátil se apresentaram sempre menores para o reator C, recheado com tijolo de argila, em comparação com os demais reatores.

Moreira et al. (2008), estudando a influência da sobrecarga de matéria orgânica em biodigestor anaeróbio tratando efluente sintético, observaram que o mesmo, um reator anaeróbio batelada seqüencial com biofilme, pareceu robusto com carga orgânica de 2000 mg DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, apresentando taxas de remoção de DQO acima de 90%. Com carga de 8000 mg DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a concentração de matéria orgânica e ácidos voláteis no substrato aumentou,



diminuindo a eficiência de remoção de DQO para cerca de 80%.

Goblos et al. (2008), analisando o tratamento de efluente de laticínio em um biodigestor anaeróbio batelada seqüencial, observaram que com o aumento da carga orgânica de 1,6 para 12,8 g DQO. L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> houve um acúmulo de ácidos voláteis no reator, resultando em queda do valor de pH de 8,0 para 5,0 e diminuição da taxa de remoção de DQO de 95 para 68%.

Tabela 8 - Valores médios de alcalinidade e acidez volátil do efluente dos reatores A, B e C em função dos TRHs utilizados

TRH (dias)	n	Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )						Acidez Volátil (mg CH <sub>3</sub> COOH.L <sup>-1</sup> )					
		A	σ	B	σ	C	σ	A	σ	B	σ	C	σ
20	8	798,54 <sup>a</sup>	218,3	715,63 <sup>a</sup>	149,2	774,48 <sup>b</sup>	1063,2	62,96 <sup>a</sup>	23,8	42,06 <sup>a</sup>	13,7	23,81 <sup>b</sup>	19,5
18	6	972,50 <sup>a</sup>	93,4	912,50 <sup>b</sup>	115,9	650,69 <sup>c</sup>	79,5	59,85 <sup>a</sup>	10,0	57,17 <sup>a</sup>	9,1	36,00 <sup>a</sup>	9,9
14	7	964,29 <sup>a</sup>	138,3	934,52 <sup>b</sup>	121,6	705,95 <sup>c</sup>	83,4	56,9 <sup>a</sup>	19,1	48,50 <sup>a</sup>	11,4	31,79 <sup>b</sup>	12,2
10	9	931,83 <sup>a</sup>	92,1	950,85 <sup>b</sup>	127,6	766,99 <sup>c</sup>	76,4	42,95 <sup>a</sup>	9,4	36,82 <sup>a</sup>	8,1	19,77 <sup>a</sup>	8,4
08	12	853,1 <sup>a</sup>	57,1	851,56 <sup>b</sup>	83,3	806,41 <sup>c</sup>	43,5	55,4 <sup>a</sup>	7,4	50,30 <sup>a</sup>	8,8	33,70 <sup>b</sup>	13,4
06	8	633,99 <sup>a</sup>	171,4	576,20 <sup>b</sup>	255,3	656,18 <sup>c</sup>	187,7	58,73 <sup>a</sup>	24,1	48,46 <sup>a</sup>	20,1	39,03 <sup>a</sup>	16,0
05	6	443,68 <sup>a</sup>	71,3	490,38 <sup>a</sup>	77,8	467,03 <sup>b</sup>	75,0	47,58 <sup>a</sup>	13,8	49,44 <sup>a</sup>	4,8	21,74 <sup>b</sup>	7,4
04	7	420,33 <sup>a</sup>	49,9	416,33 <sup>a</sup>	62,5	416,33 <sup>b</sup>	71,8	60,22 <sup>a</sup>	35,2	54,48 <sup>a</sup>	21,6	33,77 <sup>a</sup>	7,2
03	5	410,05 <sup>a</sup>	103,9	435,27 <sup>a</sup>	79,7	407,25 <sup>b</sup>	52,4	88,98 <sup>a</sup>	7,0	80,06 <sup>b</sup>	25,5	67,72 <sup>a</sup>	11,8
02	5	261,54 <sup>a</sup>	26,4	291,43 <sup>a</sup>	116,4	283,96 <sup>a</sup>	50,1	81,82 <sup>a</sup>	55,7	84,70 <sup>b</sup>	74,7	68,14 <sup>b</sup>	53,5
1,5	4	303,57 <sup>a</sup>	46,7	322,25 <sup>a</sup>	117,5	368,96 <sup>b</sup>	31,9	37,74 <sup>a</sup>	16,8	40,16 <sup>a</sup>	18,7	45,97 <sup>a</sup>	8,9
01	5	515,60 <sup>b</sup>	92,1	504,39 <sup>ab</sup>	104,8	530,55 <sup>a</sup>	106,2	60,97 <sup>a</sup>	27,5	63,87 <sup>a</sup>	25,6	39,48 <sup>a</sup>	13,0

A, B e C: reator A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente. σ: desvio padrão. n: número de amostras analisadas. \*Letras diferentes em uma mesma linha denotam diferença estatística entre si (Tukey HSD test, p<0,05).

Nota-se na Figura 10 que a relação acidez volátil/alcalinidade ficou abaixo de 0,13 durante a maior parte do período analisado. A partir do TRH de 6 dias ocorreram variações desta relação chegando a um pico de 0,68 no reator A, 0,55 no reator B e 0,62 no C. Observa-se que no TRH de 2 dias essa relação retorna a valores mais baixos, indicando que o processo se estabilizou novamente.

O acúmulo de ácidos graxos voláteis pode ser uma resposta do reator à sobrecarga, variações súbitas de TRH e taxas orgânicas e a influência da temperatura. Porém, como não houve a ocorrência de nenhum desses fatos durante esse período, pode-se explicar o aumento da relação acidez volátil/alcalinidade devido à presença de algum composto inibidor no efluente do abatedouro, como por exemplo, um sanitizante (PULLAMMANAPPALLIL et al., 2001; LEITÃO et al., 2006).

Apesar do reator C apresentar menores valores de acidez volátil, quando comparado com os outros reatores, verifica-se que a relação acidez volátil/alcalinidade alcançou valores muito próximos a estes, indicando a similaridade entre eles frente a este parâmetro analisado.

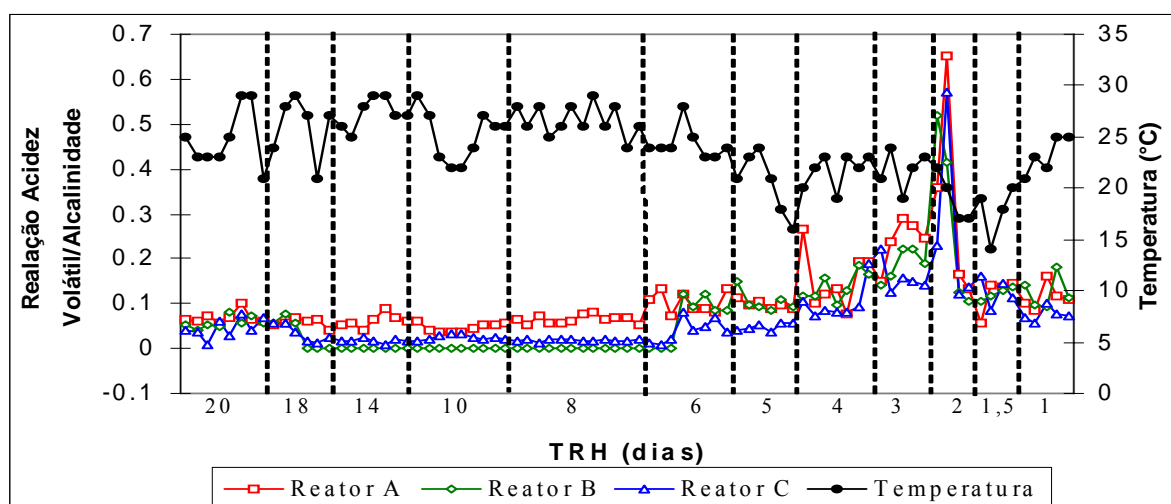


Figura 10 - Relação Acidez Volátil/Alcalinidade do efluente dos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e dos TRHs utilizados

### 5.2.2 Demanda Química de Oxigênio

Na Figura 11 encontram-se as taxas de remoção de DQO dos três reatores em função da temperatura e dos TRHs utilizados e na Tabela 9 encontram-se os valores de DQO de entrada e média da DQO de saída em função do TRH. O reator A, com anéis de polipropileno como meio suporte, apresentou a menor remoção de DQO no TRH de 20 dias em relação aos demais reatores.

Silva et al. (2006) estudando a adesão de bactérias redutoras de sulfato e archaeas metanogênicas em espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno de baixa densidade e cerâmica à base de alumina utilizando reatores anaeróbios, alimentados com substrato sintético, observaram que depois de 7 dias de operação, os reatores com suporte de espuma, carvão e cerâmica apresentaram eficiência de remoção de DQO de mais de 85%. Em contraste, o reator com polietileno como material suporte alcançou esses valores somente após 14 dias de operação.

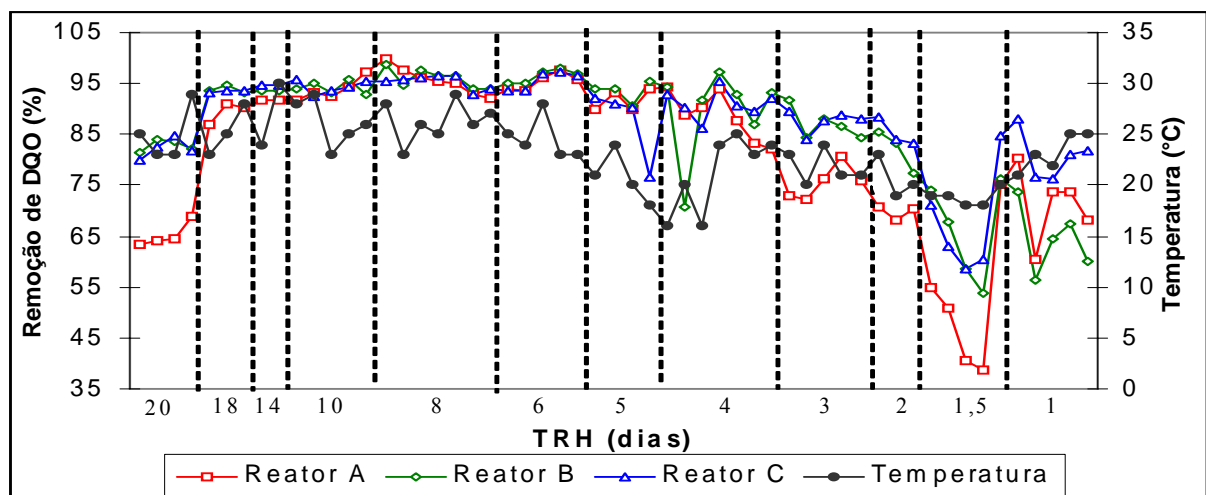


Figura 11 - Remoção de DQO do efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e dos TRHs utilizados

Entre o período com TRH de 18 dias e o de 6 dias os três reatores apresentaram taxas de remoção de DQO muito próximas. Nos TRHs de 5 e 4 dias ocorreram algumas variações na taxa de remoção de DQO para os reatores B e C, contendo cubos de espuma de poliuretano

e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, e a partir do TRH de 3 dias as taxas de remoção começaram a decrescer para os três reatores.

Essa diminuição na taxa de remoção de DQO é devida à mistura do efluente tratado com o não tratado que ocorre durante a alimentação, feita uma única vez ao dia. O aumento da taxa de remoção no TRH de 1 dia nos três reatores é explicado pelo fato de, neste TRH em especial, a alimentação dos reatores ter sido feita de maneira diferente em batelada, primeiro esvaziando-se o reator e, depois, alimentando-o com todo o volume necessário para aquele dia. Ou seja, não havia mistura do efluente tratado com o substrato, fato que provavelmente ocorria nos TRHs de 3; 2 e 1,5 dia.

Analisando-se a Tabela 9 e a Figura 11, nota-se que no TRH de 1 dia, com carga orgânica de  $995 \text{ mg DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , houve diferença estatística significativa entre os três reatores quanto a DQO do efluente dos reatores. O reator C, com pedaços de tijolo de argila como meio suporte foi o que apresentou melhor desempenho na remoção de DQO, com 80,8% de remoção seguido pelo reator A, com anéis de mangueira de polipropileno como meio suporte, com 71,3% de remoção de DQO e pelo reator B, com espuma de poliuretano como meio suporte, com 64,4% de remoção de DQO.

Acharya; Mohana e Madamwar (2007) estudando a digestão anaeróbia de águas residuárias de uma destilaria em filtros biológicos anaeróbios de fluxo ascendente, utilizando diferentes materiais suportes como carvão, fibra de coco e fibras de nylon, observaram que dentre os vários materiais suporte estudados, a fibra de coco poderia tratar efluente de destilaria com carga orgânica de  $23,25 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$  levando à redução de 64% da matéria orgânica sem qualquer tratamento prévio ou neutralização do efluente.

Garcia et al. (2007) estudaram o efeito de quatro materiais suporte no tratamento de efluente doméstico em reatores anaeróbios batelada seqüenciais com biofilme. A DQO do substrato foi de  $301 \text{ mg.L}^{-1}$  para o reator com suporte de espuma de poliuretano,  $347 \text{ mg.L}^{-1}$

para o reator com suporte de carvão vegetal,  $446 \text{ mg.L}^{-1}$  para o recheado com pedra-pomes sintética e  $337 \text{ mg.L}^{-1}$  para o reator com polietileno reciclado de baixa densidade como meio suporte, obtendo taxas de remoção de 60, 40, 48 e 33% respectivamente, em TRH de 8 horas. O reator com espuma de poliuretano como meio suporte foi o mais eficiente para a remoção da matéria orgânica nas condições testadas.

Tabela 9 – Teores de DQO de entrada e de saída dos reatores A, B e C em função dos TRHs utilizados

TRH (dias)	n	Carga orgânica (mg DQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	DQO (entrada) (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	Reator A DQO (saída) (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	σ	Reator B DQO (saída) (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	σ	Reator C DQO (saída) (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	σ
20	4	173	3467	419 <sup>a</sup>	2,4	207 <sup>b</sup>	1,2	213 <sup>a</sup>	2,0
18	3	193	3467	370 <sup>b</sup>	2,2	211 <sup>a</sup>	0,9	224 <sup>a</sup>	0,2
14	2	248	3467	283 <sup>b</sup>	0,1	225 <sup>a</sup>	0,1	184 <sup>a</sup>	1,4
10	5	354	3543	218 <sup>a</sup>	2,3	209 <sup>b</sup>	1,3	201 <sup>a</sup>	1,4
08	7	393	3146	146 <sup>a</sup>	2,7	118 <sup>b</sup>	1,8	140 <sup>a</sup>	1,3
06	5	359	2156	99 <sup>a</sup>	1,7	75 <sup>b</sup>	1,3	94 <sup>a</sup>	1,8
05	4	431	2156	178 <sup>a</sup>	2,1	139 <sup>b</sup>	2,2	269 <sup>b</sup>	7,2
04	7	523	2093	235 <sup>a</sup>	4,8	225 <sup>b</sup>	8,9	191 <sup>b</sup>	2,9
03	5	536	1609	394 <sup>b</sup>	3,3	205 <sup>a</sup>	3,1	199 <sup>a</sup>	2,1
02	3	596	1192	361 <sup>b</sup>	1,3	214 <sup>a</sup>	4,3	175 <sup>ab</sup>	2,8
1,5	5	703	1054	504 <sup>b</sup>	14,6	352 <sup>a</sup>	9,7	342 <sup>b</sup>	10,7
01	5	995	995	285 <sup>a</sup>	7,4	354 <sup>b</sup>	6,7	191 <sup>c</sup>	4,7

Reator A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente; σ: desvio padrão; n: número de amostras analisadas. \*Letras diferentes em uma mesma linha denotam diferença estatística entre si (Tukey HSD test, p<0,05).

### 5.2.3 Teores de sólidos totais e voláteis

A redução de sólidos voláteis é comumente utilizada para se medir o desempenho dos processos de digestão anaeróbia, pois o teor de sólidos voláteis é um indicador da quantidade de matéria orgânica presente em efluentes e lodos (DE LA RUBIA et al., 2006).

Na Tabela 10 encontram-se os teores de sólidos totais e voláteis do substrato e efluente dos três reatores. Nota-se a diminuição da concentração dos sólidos totais e voláteis ao longo do período analisado, com destaque para o reator C, que alcançou os maiores valores de remoção na maior parte do período.

A remoção de sólidos voláteis foi sempre positiva, indicando que a remoção da fração orgânica dos sólidos totais foi efetiva. Estas altas taxas de remoção de sólidos podem estar ocorrendo porque a operação inicial destes reatores pode estar exercendo um efeito “físico” de filtro, isto poderia ser verificado analisando a DQO particulada no substrato e no efluente dos reatores.



Tabela 10 - Teores de sólidos totais e sólidos voláteis do substrato e do efluente dos reatores A, B e C em função do TRH aplicado

TRH (dias)	n	ST (%) (entrada)	Reator A ST (%) (saída)	$\sigma$	Reator B ST (%) (saída)	$\sigma$	Reator C ST (%) (saída)	$\sigma$	SV (%) (entrada)	Reator A SV (%) (saída)	$\sigma$	Reator B SV (%) (saída)	$\sigma$	Reator C SV (%) (saída)	$\sigma$
20	4	0,31	0,11 <sup>b</sup>	7,4	0,08 <sup>ab</sup>	2,3	0,06 <sup>a</sup>	1,4	0,23	0,067 <sup>a</sup>	10,4	0,051 <sup>b</sup>	12,1	0,054 <sup>c</sup>	11,2
18	4	0,31	0,07 <sup>a</sup>	11,7	0,06 <sup>a</sup>	9,9	0,06 <sup>a</sup>	10,2	0,23	0,040 <sup>a</sup>	8,4	0,034 <sup>a</sup>	6,6	0,024 <sup>a</sup>	9,6
14	3	0,31	0,09 <sup>b</sup>	1,7	0,08 <sup>b</sup>	1,3	0,09 <sup>a</sup>	6,2	0,23	0,053 <sup>a</sup>	4,9	0,041 <sup>b</sup>	1,8	0,055 <sup>c</sup>	10,0
10	4	0,12	0,07 <sup>b</sup>	9,0	0,07 <sup>a</sup>	3,2	0,06 <sup>a</sup>	5,4	0,09	0,038 <sup>a</sup>	5,1	0,039 <sup>a</sup>	7,4	0,040 <sup>a</sup>	3,08
08	6	0,13	0,07 <sup>a</sup>	15,7	0,06 <sup>a</sup>	9,9	0,06 <sup>a</sup>	9,9	0,10	0,033 <sup>b</sup>	5,7	0,027 <sup>a</sup>	4,6	0,033 <sup>b</sup>	4,4
06	4	0,16	0,05 <sup>a</sup>	5,0	0,06 <sup>a</sup>	1,6	0,05 <sup>a</sup>	3,3	0,12	0,018 <sup>b</sup>	6,6	0,017 <sup>a</sup>	4,0	0,018 <sup>b</sup>	3,1
05	6	0,17	0,07 <sup>a</sup>	20,3	0,07 <sup>a</sup>	3,2	0,07 <sup>a</sup>	3,6	0,13	0,030 <sup>b</sup>	9,1	0,023 <sup>a</sup>	2,9	0,030 <sup>b</sup>	1,2
04	4	0,17	0,06 <sup>a</sup>	13,6	0,07 <sup>a</sup>	4,5	0,06 <sup>a</sup>	21,1	0,13	0,033 <sup>a</sup>	5,4	0,032 <sup>a</sup>	5,1	0,032 <sup>a</sup>	15,2
03	4	0,24	0,07 <sup>b</sup>	6,5	0,06 <sup>a</sup>	5,9	0,07 <sup>a</sup>	6,6	0,18	0,039 <sup>a</sup>	6,9	0,034 <sup>a</sup>	7,9	0,036 <sup>a</sup>	8,7
02	3	0,15	0,08 <sup>b</sup>	26,3	0,07 <sup>b</sup>	21,4	0,08 <sup>a</sup>	25,5	0,13	0,032 <sup>a</sup>	9,1	0,029 <sup>a</sup>	8,5	0,034 <sup>a</sup>	9,3
1,5	7	0,18	0,07 <sup>b</sup>	18,9	0,07 <sup>a</sup>	15,6	0,07 <sup>a</sup>	23,4	0,15	0,043 <sup>a</sup>	9,9	0,036 <sup>b</sup>	8,5	0,042 <sup>b</sup>	14,6
01	5	0,33	0,11 <sup>b</sup>	2,4	0,11 <sup>b</sup>	2,9	0,09 <sup>a</sup>	1,9	0,24	0,046 <sup>a</sup>	2,8	0,050 <sup>b</sup>	3,4	0,038 <sup>c</sup>	1,5

Reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente;  $\sigma$ : desvio padrão; n: número de amostras analisadas. \*Letras diferentes em uma mesma linha denotam diferença estatística entre si (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ).

Nas Figuras 12 e 13 estão as taxas de remoção dos teores de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV), durante o experimento.

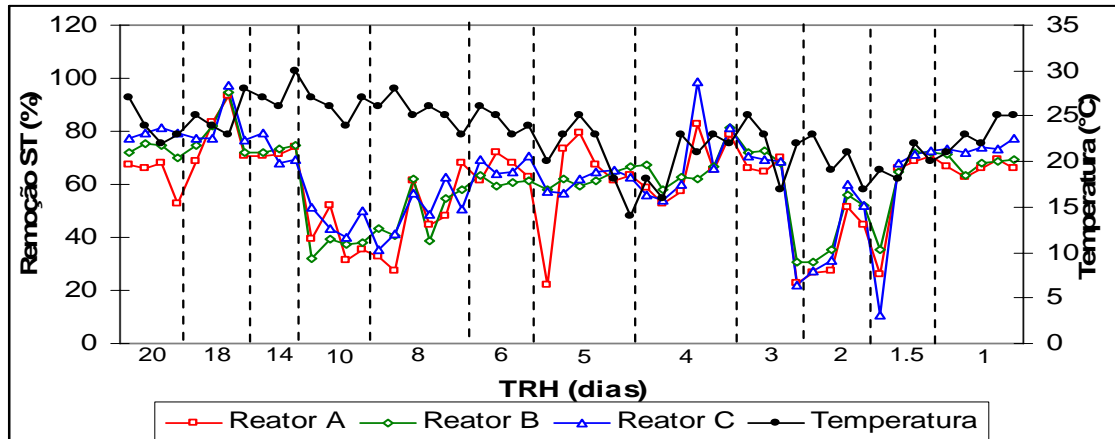


Figura 12 - Remoção de sólidos totais do efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH

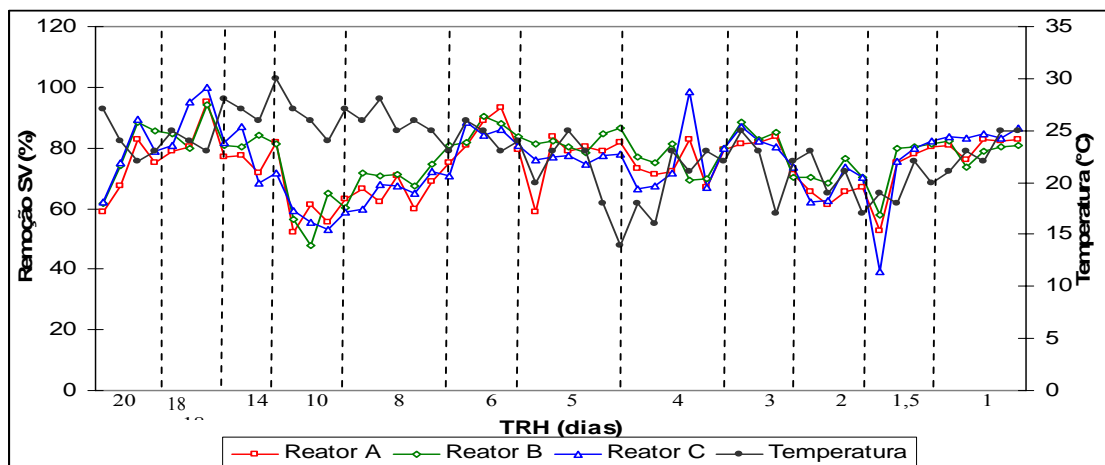


Figura 13 - Remoção de sólidos voláteis do efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH

#### 5.2.4 Teores de nitrogênio e fósforo

Os principais elementos envolvidos na degradação ambiental são o fósforo e o nitrogênio. Quando o fósforo é aplicado em grandes quantidades e várias vezes no solo, ele pode ser transportado da superfície pela enxurrada, levando à eutrofização dos ecossistemas aquáticos. O nitrogênio, além de estar envolvido no processo de eutrofização, quando convertido para nitrato representa um perigo para a saúde pública devido aos problemas associados com a ocorrência de metahemoglobinemia e a potencial formação de nitrosaminas

e nitrosamidas cancerígenas (FERREIRA; LUCAS JR; AMARAL, 2003). A baixa redução de minerais é uma característica da digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 1997), porém, neste estudo observou-se uma redução acentuada de nitrogênio e fósforo.

Observa-se que a remoção de nitrogênio teve um perfil semelhante à remoção de DQO, apresentando elevada taxa de remoção nos TRHs iniciais e diminuindo com a redução do TRH até chegar a níveis baixos de remoção no TRH de 1,5 dia, provavelmente devido à mistura entre o substrato e o efluente durante a alimentação. A taxa de remoção voltou a aumentar no TRH de 1 dia.

As elevadas taxas de remoção de nitrogênio (Figura 14) podem ocorrer devido ao baixo teor deste elemento encontrado no substrato utilizado neste experimento combinado com um elevado TRH, que favorece a assimilação destes compostos em novas células e em biogás.

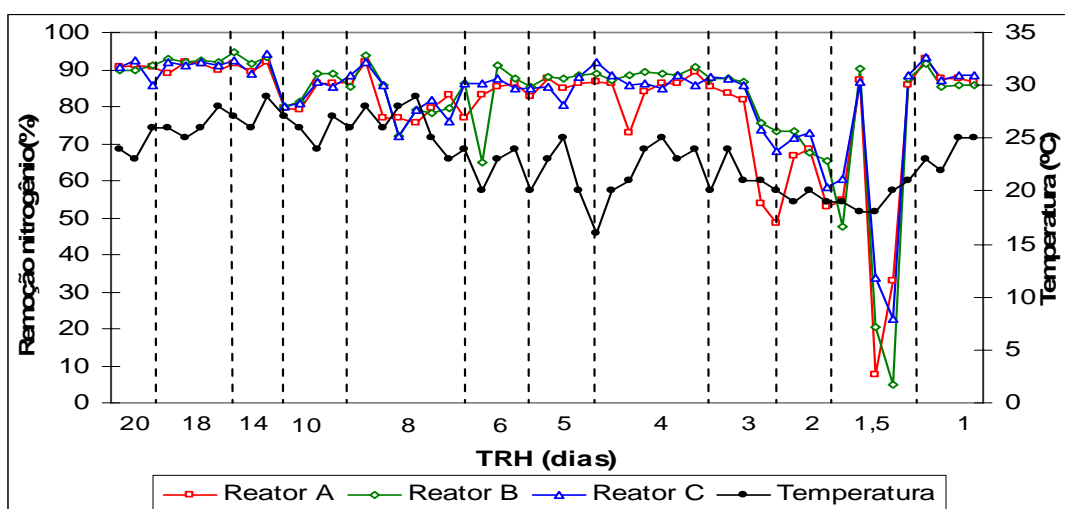


Figura 14 - Remoção de nitrogênio no efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH

A baixa concentração de nitrogênio no substrato pode ser explicada pela reutilização do sangue nas instalações do abatedouro. O sangue tem uma concentração de nitrogênio de aproximadamente  $30 \text{ g.L}^{-1}$  (SOUZA PENA, 2007), outra possibilidade seria a volatilização do nitrogênio amoniacal durante a análise. Outra alternativa, seria a presença de linhagens capazes de oxidar amônia anaerobiamente a  $\text{N}_2$ . Análises filogenéticas de seqüências 16S do

rDNA mostram que estas bactérias estão relacionadas aos membros da ordem Planctomycetales que executam o processo ANAMMOX (oxidação anaeróbia da amônia) (KUYPERS et al., 2003; THAMDRUP e DALSGAARD, 2002; TAL, WATTS e SCHREIRER, 2006). Uma forma de verificar a ocorrência deste processo seria a determinação de nitritos e nitratos no efluente dos reatores.

Na Tabela 11 estão as taxas de remoção média de nitrogênio em cada reator em função do TRH, observa-se que, com 95% de confiança, não houve diferença significativa ( $p = 0,0645$ ) entre os três reatores quanto à remoção de nitrogênio em cada TRH.

Tabela 11 – Remoção média de nitrogênio do efluente dos reatores A, B e C em função do TRH

TRH (dias)	n	Reator A (%)	$\sigma$	Reator B (%)	$\sigma$	Reator C (%)	$\sigma$
20	3	90,98 <sup>a</sup>	0,22	90,39 <sup>a</sup>	0,72	89,56 <sup>a</sup>	3,32
18	4	90,54 <sup>a</sup>	1,34	92,40 <sup>a</sup>	0,47	91,60 <sup>a</sup>	0,45
14	3	91,02 <sup>a</sup>	1,47	93,19 <sup>a</sup>	1,64	91,90 <sup>a</sup>	2,56
10	4	82,73 <sup>a</sup>	3,93	84,73 <sup>a</sup>	4,73	83,20 <sup>a</sup>	3,29
08	7	81,52 <sup>a</sup>	6,08	81,97 <sup>a</sup>	7,05	82,16 <sup>a</sup>	7,13
06	4	82,81 <sup>a</sup>	4,17	82,52 <sup>a</sup>	11,94	86,31 <sup>a</sup>	1,14
05	4	85,25 <sup>a</sup>	2,03	87,37 <sup>a</sup>	1,34	84,71 <sup>a</sup>	3,18
04	7	84,58 <sup>a</sup>	5,32	88,81 <sup>a</sup>	1,01	87,35 <sup>a</sup>	2,38
03	4	76,08 <sup>a</sup>	15,06	84,35 <sup>a</sup>	6,01	83,81 <sup>a</sup>	6,69
02	3	61,28 <sup>a</sup>	11,08	71,49 <sup>a</sup>	3,38	70,82 <sup>a</sup>	2,49
1,5	5	50,65 <sup>a</sup>	32,73	55,91 <sup>a</sup>	29,39	59,73 <sup>a</sup>	21,72
01	5	88,09 <sup>a</sup>	2,70	87,24 <sup>a</sup>	2,57	89,16 <sup>a</sup>	2,50

Reator A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente;  $\sigma$ : desvio padrão; n: número de amostras analisadas. \*Letras diferentes em uma mesma linha denotam diferença estatística entre si (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ).

Observa-se decréscimo da remoção de fósforo com a diminuição do TRH nos reatores A e B, o mesmo não ocorrendo no reator C, que manteve as elevadas taxas de remoção durante todo o experimento. Verifica-se na Figura 15 que houve remoção e, em alguns casos, aumento do teor de fósforo. Caixeta; Cammarota; Xavier (2003) também observaram um aumento no teor de fósforo tratando resíduo de abatedouro em reator anaeróbio do tipo UASB, atribuindo este resultado a mudanças operacionais na indústria.

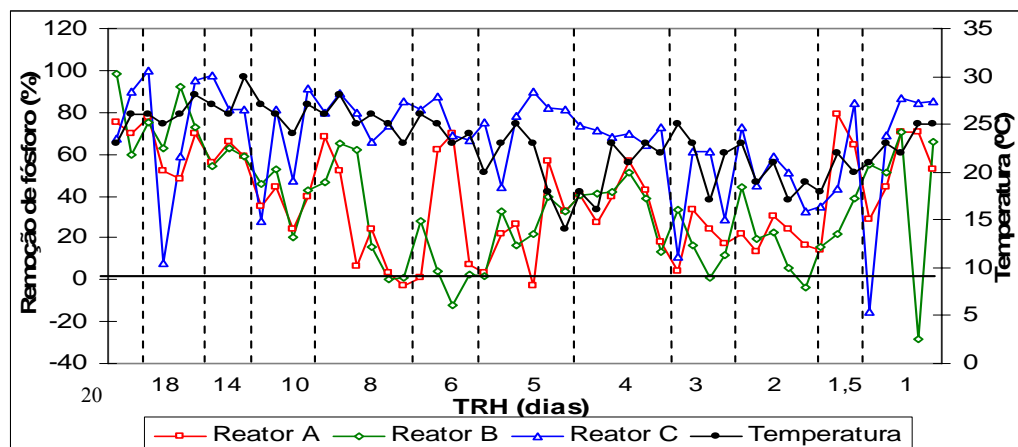


Figura 15 - Remoção de fósforo no efluente tratado pelos reatores A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente, em função da temperatura e do TRH

Na Tabela 12 estão as taxas de remoção média de fósforo em cada reator em função do TRH. Pode-se observar que os reatores A e C não diferiram estatisticamente entre si e nos TRHs de 6; 3 e 2 dias não houve diferença estatística quanto à remoção de fósforo para os três reatores.

Tabela 12 – Remoção média de fósforo do efluente dos reatores A, B e C em função do TRH

TRH (dias)	n	Reator A (%)	$\sigma$	Reator B (%)	$\sigma$	Reator C (%)	$\sigma$
20	2	72,31 <sup>a</sup>	3,92	79,00 <sup>b</sup>	27,52	78,54 <sup>a</sup>	16,21
18	4	61,94 <sup>a</sup>	14,09	75,60 <sup>b</sup>	12,19	65,52 <sup>a</sup>	42,64
14	4	60,17 <sup>a</sup>	4,94	58,80 <sup>b</sup>	4,27	86,80 <sup>a</sup>	9,36
10	4	35,79 <sup>a</sup>	8,70	40,35 <sup>b</sup>	14,19	61,92 <sup>a</sup>	29,43
08	6	25,23 <sup>a</sup>	28,88	31,97 <sup>b</sup>	29,76	79,03 <sup>a</sup>	8,36
06	4	34,79 <sup>a</sup>	35,74	5,45 <sup>a</sup>	16,67	76,11 <sup>a</sup>	10,16
05	6	22,84 <sup>a</sup>	21,37	24,09 <sup>b</sup>	13,74	74,94 <sup>a</sup>	15,82
04	6	37,29 <sup>a</sup>	13,43	37,82 <sup>b</sup>	12,93	69,97 <sup>a</sup>	3,38
03	4	19,75 <sup>a</sup>	12,26	15,64 <sup>a</sup>	13,37	40,65 <sup>a</sup>	24,90
02	5	21,25 <sup>a</sup>	6,63	17,50 <sup>a</sup>	18,37	52,15 <sup>a</sup>	15,16
1,5	3	52,64 <sup>a</sup>	34,06	25,45 <sup>b</sup>	11,82	54,39 <sup>a</sup>	26,06
01	5	53,34 <sup>a</sup>	17,93	42,90 <sup>b</sup>	40,73	62,01 <sup>a</sup>	43,77

Reator A, B e C, contendo anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como material suporte, respectivamente;  $\sigma$ : desvio padrão; n: número de amostras analisadas. \*Letras diferentes em uma mesma linha denotam diferença estatística entre si (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ).

### 5.2.5 Análises nas diferentes saídas dos reatores no TRH de 1 dia

Durante o TRH de 1 dia, coletou-se amostras do efluente nos pontos 1, 2, 3 e 4 de cada reator (Figura 8), para analisar a relação Acidez volátil/Alcalinidade, pH e redução de DQO

em diferentes alturas dos reatores. Nas Figuras 16 e 17 estão os resultados da relação Acidez volátil/Alcalinidade e pH. Pode-se observar que não houve uma estratificação no interior dos reatores. Os quatro pontos analisados mostraram valores próximos para a relação Acidez volátil/Alcalinidade e para o pH.

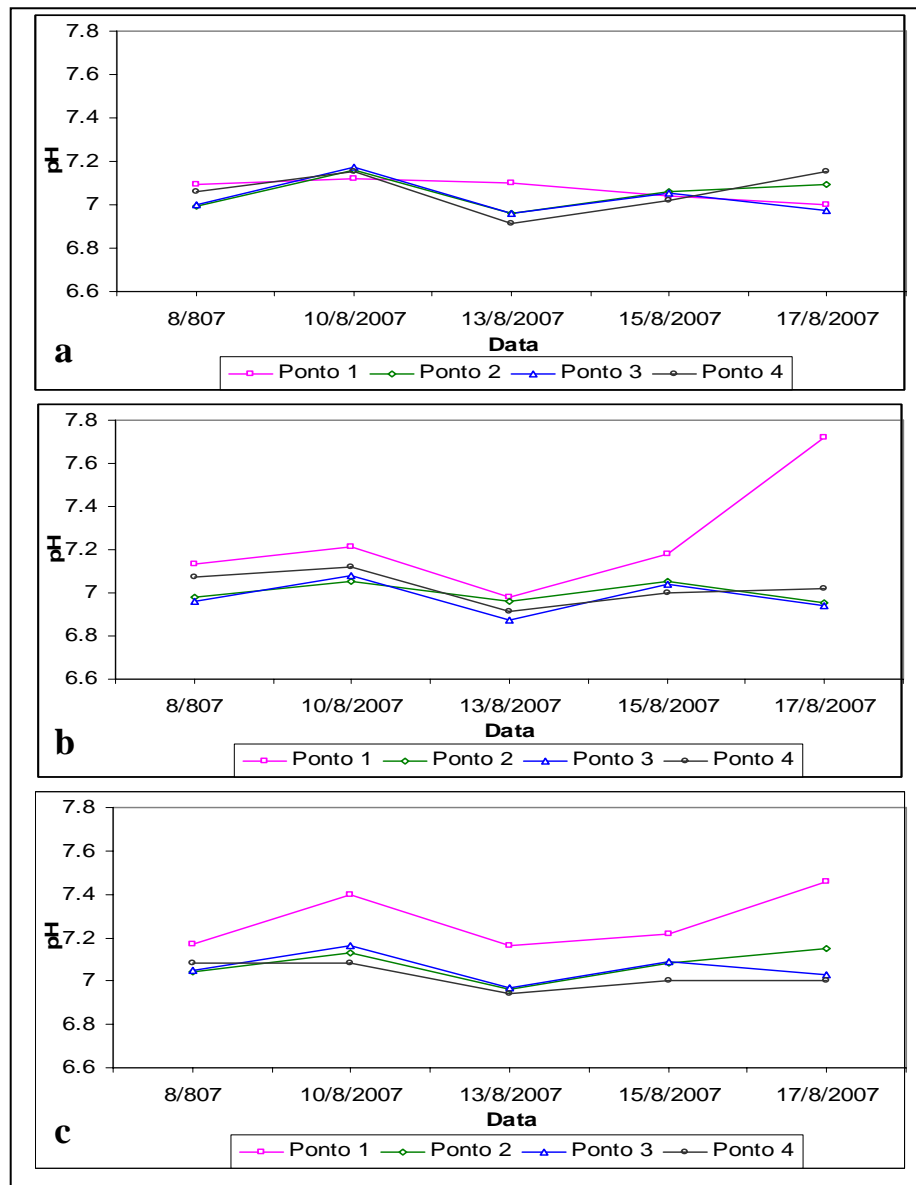


Figura 16 - Valores de pH do efluente dos reatores A, B e C. a: reator A, contendo anéis de polipropileno como meio suporte; b: reator B, contendo cubos de espuma de poliuretano como meio suporte; c: reator C, contendo pedaços de tijolo de argila como meio suporte, em função dos pontos de coletas de amostras no TRH de 1 dia.

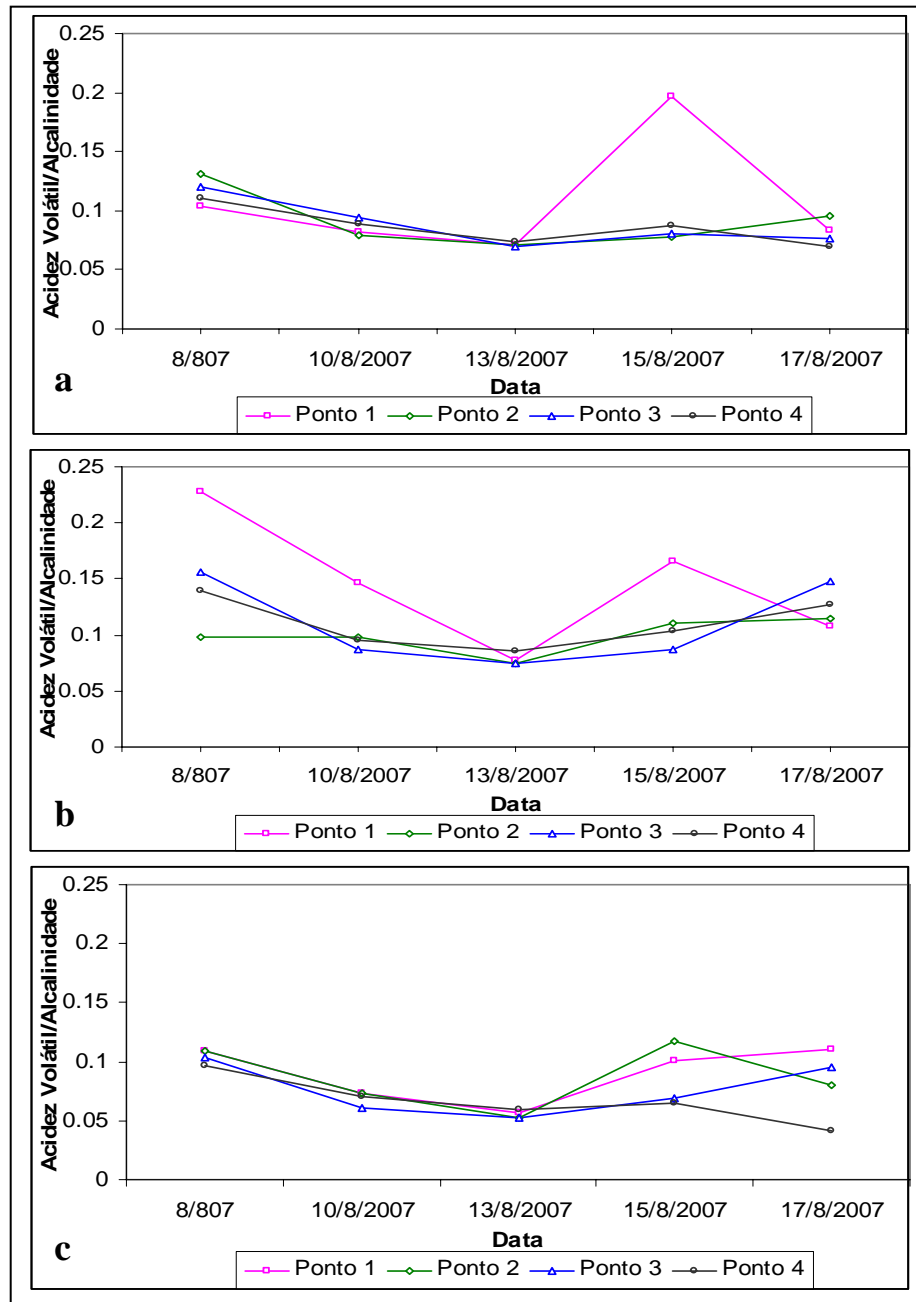


Figura 17 - Relação Acidez Volátil/Alcalinidade do efluente dos reatores A, B e C. a: reator A, contendo anéis de polipropileno como meio suporte; b: reator B, contendo cubos de espuma de poliuretano como meio suporte; c: reator C, contendo pedaços de tijolo de argila como meio suporte, em função dos pontos de coletas de amostras no TRH de 1 dia.

Na Figura 18, estão os resultados de remoção da DQO no TRH de 1 dia nos quatro pontos analisados, pode-se observar que não houve diferença entre os pontos de coleta para cada reator. O reator C, com suporte de tijolo de argila, foi o mais eficiente em termos de remoção de DQO nos três primeiros dias de análise, porém no último dia esses valores decresceram. O reator A com suporte de anéis de polipropileno manteve remoção constante

de DQO e o reator B, com suporte de espuma de poliuretano manteve uma característica de baixa redução de DQO no ponto 1 comparado com os outros pontos do mesmo reator.

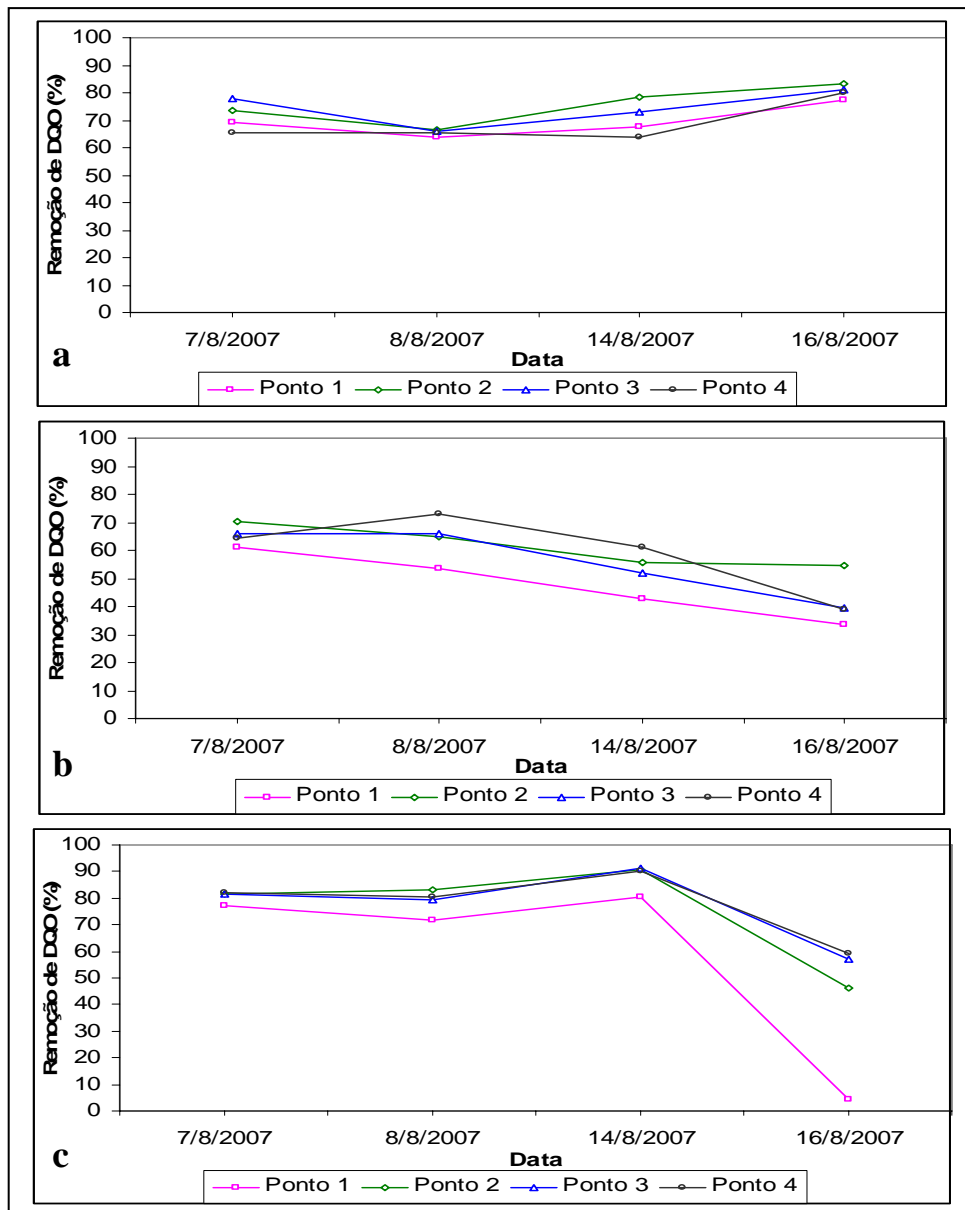


Figura 18 - Redução de DQO no efluente tratado pelos reatores A, B e C. a: reator A, contendo anéis de polipropileno como meio suporte; b: reator B, contendo cubos de espuma de poliuretano como meio suporte; c: reator C, contendo pedaços de tijolo de argila como meio suporte, em função dos pontos de coletas de amostras no TRH de 1 dia.

O sistema de alimentação em batelada, feita no TRH de 1 dia contribuiu para a não estratificação de linhagens de microrganismos no sentido longitudinal do reator.

Estes perfis observados ocorrem provavelmente, devido à concentração de biomassa ativa já na parte inferior dos reatores. Como a biomassa fica retida no suporte neste tipo de reator, formaram-se consórcios microbianos contendo microrganismos hidrolíticos,



acidogênicos, acetogênicos e metanogênicos na entrada do substrato. Os compostos orgânicos foram então degradados reduzindo a DQO e, conseqüentemente, os valores de pH se mantiveram estáveis, pois não havia acúmulo de ácidos orgânicos que eram prontamente degradados a  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  pelas archaeas metanogênicas.

Calli et al. (2006) estudaram a remoção de DQO e o pH em diferentes alturas no 830º dia de funcionamento de três reatores anaeróbios, um reator tipo UASB, um reator híbrido (filtro e manta de lodo) e um filtro de fluxo ascendente, todos com 100 cm de altura, tratando lixiviado de um aterro. Observaram que o pH aumentou de 4,5 para cerca de 7 nos primeiros 20 cm entre a entrada e o primeiro ponto de amostragem no filtro anaeróbio e no reator híbrido, enquanto que no tipo UASB não foi observado este comportamento até 50 centímetros. Este padrão foi semelhante para os perfis de remoção de DQO. Os autores atribuíram este comportamento devido à quantidade de biomassa acumulada nos reatores, enquanto a biomassa fica acumulada na parte inferior do reator híbrido e do filtro, esta foi distribuída de forma mais homogênea do reator tipo UASB na forma de flocos suspensos.

Omil et al. (2003) também verificaram pouca diferença entre três pontos de saída de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente em escala industrial tratando efluente da indústria de laticínios.

### 5.3 PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Durante todo o experimento observou-se produção de biogás. Porém, devido a problemas de vazamento dos gases não foi possível se obter uma correlação entre o volume de biogás gerado e redução de DQO.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO MEIO SUPORTE

Os meios suportes utilizados neste experimento foram caracterizados quanto à densidade aparente, porosidade aparente e estrutura dos poros ao microscópio óptico. Na Tabela 13 pode-se observar que o tijolo de argila e a mangueira de polipropileno possuem densidade aparente semelhantes e a espuma de poliuretano é menos densa se comparada aos outros dois materiais. A densidade da espuma de poliuretano foi fornecida pelo fabricante. O meio suporte mais utilizado em filtros anaeróbios é a brita, que possui densidade aparente de  $2,73 \text{ g.cm}^{-3}$  (COIMBRA; LIBARDI e MORELLI, 2006), os meios suportes utilizados neste estudo, possuem densidade aparente menor quando comparada com a brita. Isto facilitaria a construção dos filtros, visto que seria necessária uma estrutura menos robusta por possuírem menor massa em relação ao seu volume.

Tabela 13 - Características dos materiais suportes utilizados nos reatores deste estudo

	<b>Mangueira de Polietileno</b>	<b>Espuma de Poliuretano</b>	<b>Tijolo de argila</b>
Dimensões	0,8 cm de diâmetro, 0,5 cm de comprimento e espessura de 0,1 cm	cubos de 0,5 cm de aresta	Pedaços selecionados em peneira com abertura de $\frac{3}{4}$ "
Densidade aparente ( $\text{g.cm}^{-3}$ )	1,64	0,0014	1,66
Porosidade (%)	na	na	37,93

Na Tabela 14 encontram-se as características dos materiais suporte utilizados por Silva et al. (2006) no estudo da adesão de bactérias redutoras de sulfato e archaeas metanogênicas utilizando reatores anaeróbios alimentados com substrato sintético, neste estudo também foi utilizado carvão vegetal como meio suporte em um dos reatores (dados não constam na Tabela 14). Observa-se que a espuma de poliuretano possui a maior porosidade comparada com a cerâmica e maior densidade quando comparada com a espuma utilizada neste estudo. A cerâmica é menos densa e possui uma porosidade maior quando comparada com o tijolo de argila.

Tabela 14 - Características dos materiais suportes utilizados por Silva et al. (2006)

	<b>Polietileno de baixa densidade</b>	<b>Espuma de poliuretano</b>	<b>Cerâmica de alumina</b>
Formato	cilíndrico	cúbico	cúbico
Densidade aparente (g.cm <sup>-3</sup> )	0,40	0,023	0,46
Porosidade (%)	na	92	75

Na Figura 19 estão as fotos obtidas por microscopia óptica da espuma de poliuretano e do tijolo, nelas se observa perfeitamente que a espuma de poliuretano (Figura 19a) possui poros com tamanhos maiores que os do tijolo, na maior parte, maiores que 300  $\mu\text{m}$  e não uniformes. Na Figura 19b também se observa a heterogeneidade dos materiais que constituem o tijolo de argila. Não foi possível observar a porosidade dos anéis de polipropileno por microscopia porque seus poros possuem dimensões muito pequenas. Neste tipo de material os microrganismos se desenvolvem no interstício do anel e não em sua superfície.

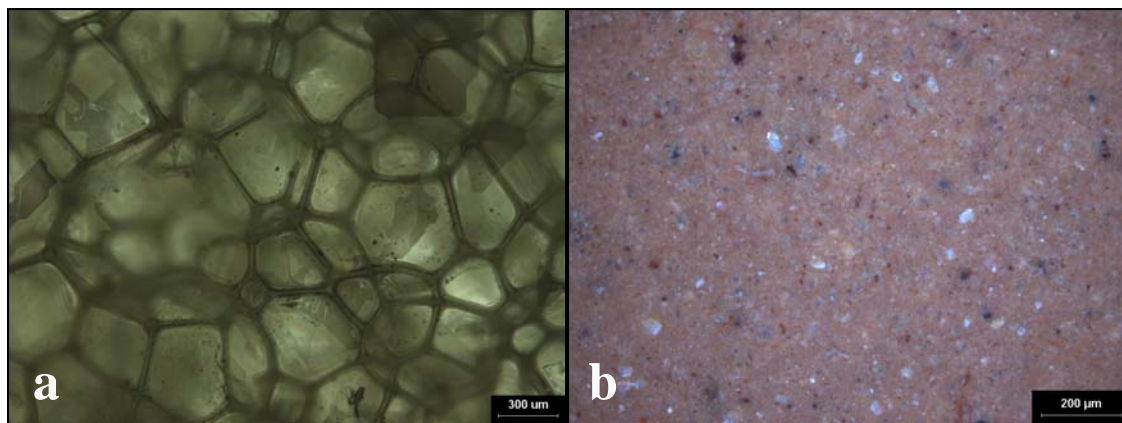


Figura 19 - Microscopia óptica da espuma de poliuretano em luz transmitida (a) e tijolo de argila em campo escuro (b), com aumento de 50 e 100 vezes, respectivamente

Silva et al. (2006) estudando a adesão de bactérias redutoras de sulfato e archaeas metanogênicas em espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno de baixa densidade e cerâmica à base de alumina utilizando reatores anaeróbios diferenciais alimentados com substrato sintético, observaram que a espuma de poliuretano apresentou a maior concentração de biomassa aderida durante todo o período analisado, seguido pelo carvão vegetal, cerâmica e o polietileno. A taxa de remoção de sulfato para a espuma e o carvão foi de 39% e 45%, respectivamente e a média da eficiência da remoção de DQO foi de 86% e 90%,

respectivamente. Os outros dois suportes, polietileno e cerâmica, alcançaram taxas de remoção de DQO de 84% e 86%, respectivamente. No entanto, não foi observado redução de sulfato com estes suportes.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA

### 5.5.1 Escolha dos “primers”

Os primers utilizados neste estudo, foram desenhados para amplificar o gene 16S rDNA de amostras do lodo dos reatores. No Anexo 1 se encontra a relação de linhagens e grupos de microrganismos que já foram encontrados em reatores anaeróbios, com suas respectivas referências. A composição da microbiota varia de acordo com o substrato a ser tratado e com o tipo do reator anaeróbio usado no tratamento. Dependendo da técnica utilizada para o levantamento da biodiversidade do reator, os autores classificaram os microrganismos encontrados em níveis de filo, família, gênero ou até mesmo, espécie.

Confrontando o “primer” 28F com as seqüências do gene 16S rDNA das archaeas metanogênicas encontradas em reatores anaeróbios (Anexo 2), verificou-se que esse “primer” alinha com as seqüências destes microrganismos. Portanto, poderia ser utilizado para o levantamento da diversidade de archaeas metanogênicas nos reatores. O “primer” 27F tem sido utilizado para o levantamento de bactérias presentes em reatores anaeróbios (CHAUHAN e OGRAM, 2005; TANG et al., 2005; SHIGEMATSU et al., 2006; CONNAUGHTON, COLLINS e O’FLAHERTY, 2006; ENRIGHT, COLLINS e O’FLAHERTY, 2007; KAPLEY, DE BAERE e PUROHIT, 2007) e ao ser confrontado com seqüências do 16S rDNA bacterianas do RDP (Ribosomal Database Project II), alinhou com 74.598 das 513.272 seqüências disponíveis neste site.

O “primer” 1492R foi escolhido pela sua utilização em estudos de levantamento da diversidade microbiana (CHAUHAN e OGRAM, 2005; KAPLEY DE BAERE e PUROHIT,

2007; SIRIPONG e RITTMANN, 2007) e por alinhar-se com seqüências do 16S rDNA tanto de bactérias quanto de archaeas. Esse “primer” também foi confrontado com seqüências 16S bacterianas do RDP (Ribosomal Database Project II), alinhando com 34.705 das 513.272 seqüências disponíveis neste site.

Segundo a literatura, para a caracterização de archaeas, além da utilização de “primers” que anelam em regiões específicas do gene 16S rDNA, também são empregados “primers” que amplificam genes exclusivos desse grupo de microrganismos, como o gene *mcrA* que codifica a subunidade  $\alpha$  da Metil-coenzima M Redutase (MCR). A MCR entra na etapa final da síntese do metano ( $\text{CH}_4$ ), catalisando a redução de um grupo metil anexado a coenzima M com a formação de metano (JUOTTONEN, GALAND e YRJÄLÄ, 2006). Os “primers” utilizados para amplificar esse grupo de genes são comumente degenerados (“primers” que apresentam em determinadas posições de sua extensão dois, três ou até qualquer um dos quatro nucleotídeos), característica que os torna monetariamente mais custosos.

### 5.5.2 Quantificação do DNA extraído

Para amostras puras de DNA, a relação de densidade óptica (DO) das leituras em 260 e 280 nm deve estar entre 1,7 e 2,0 e em 260 e 230 nm acima de 2,0 (SHAN et al., 2008). Esta é uma boa indicação de que o DNA da amostra é livre de ácido ribonucléico (RNA), proteínas e ácidos húmicos (JI et al., 2007). O DNA extraído apresentou baixas quantidades de impurezas por proteínas e RNA porém está contaminado por ácidos húmicos (Tabela 15), diante disso, se fez necessário um pré-tratamento com BSA (Albumina do Soro Bovino) antes da amplificação

Tabela 15 – Relação de densidade ótica (DO) das amostras de DNA dos reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente, em A260/230 e A260/280 nm e respectiva concentração de DNA

Reator	A260/230 nm	A260/280 nm	Concentração (ng DNA.µL <sup>-1</sup> )
A	1,9	1,9	315,1
B	1,9	1,9	396,9
C	1,7	1,8	294,2

### 5.5.3 Amplificação do DNA utilizando a técnica de PCR

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a base de muitas metodologias da biologia molecular para estudos em ecologia microbiana, mas esta técnica é particularmente sensível a contaminações, como aquelas causadas por substâncias húmicas, proteínas e polissacarídeos. Dessa forma, a extração e a purificação do DNA de diferentes amostras ambientais, que será amplificado na PCR, são dois fatores cruciais para garantir o sucesso das técnicas moleculares baseadas em PCR (SHAN et al., 2008). Para garantir a pureza da amostra de DNA, podem ser adicionadas etapas no processo de sua purificação, metodologia essa que aumenta o tempo e o custo da preparação da amostra, bem como pode induzir a perda do DNA alvo. Abordagens mais satisfatórias para diminuir a interferência dos compostos inibidores foram descritas por Kreader (1996), dentre elas a incubação do DNA com albumina do soro bovino (BSA). A melhor concentração de BSA estabelecida para a diminuição da inibição de ácidos húmicos foi de 200 a 400 ng.mL<sup>-1</sup> do sistema da PCR (KREADER, 1996).

Diante da baixa ou nula eficiência de amplificação, o DNA extraído dos reatores foi tratado com BSA. O aumento da intensidade das bandas do amplificado (dados não mostrados) e a amplificação de amostras não amplificáveis antes do tratamento indicaram a eficiência do mesmo na redução da quantidade de impurezas no DNA.

Para o aperfeiçoamento do protocolo da PCR vários testes foram realizados, incluindo curvas de concentração de MgCl<sub>2</sub>, e modificações na concentração das amostras, Taq polimerase e programas no termociclador (dados não mostrados).

Como pode ser observado na Figura 20 a amplificação do DNA dos reatores A, B e C respectivamente com os “primers” 27F/1492R (Figura 20a) e 28F/1492R (Figura 20b), gera fragmentos de aproximadamente 1500 pares de bases. Em todos os casos. Não se observa a formação de bandas inespecíficas demonstrando que as condições utilizadas na PCR são adequadas.

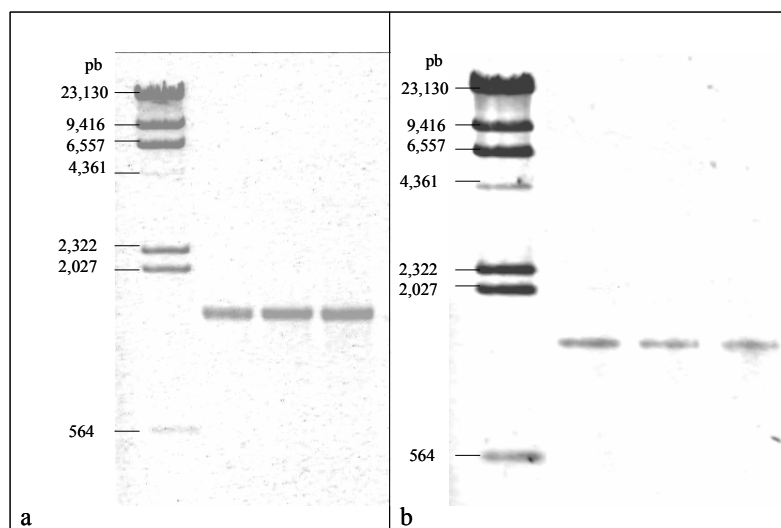


Figura 20 - Produto de PCR de amostra de DNA dos reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente. a: comunidade bacteriana; b: comunidade de archaeas metanogênicas. M: marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*Hind* III; pb: pares de bases

#### 5.5.4 Análise de restrição do fragmento amplificado (ARDRA)

##### 5.5.4.1 Perfil de restrição

Os produtos de PCR dos reatores foram analisados por ARDRA. Nas Figuras 21 e 22 se encontram os perfis de restrição do 16S rDNA de bactérias e archaeas metanogênicas dos reatores A, B e C tratados com as enzimas *Hinf*I, *Rsa*I e *Hae*III. Observam-se algumas bandas específicas em cada reator. Nesta análise cada banda não é considerada como um único microrganismo, mas sim como um grupo de fragmentos de mesmo tamanho proveniente de vários microrganismos presentes na amostra, portanto, as análises realizadas são referentes ao polimorfismo genético das amostras.

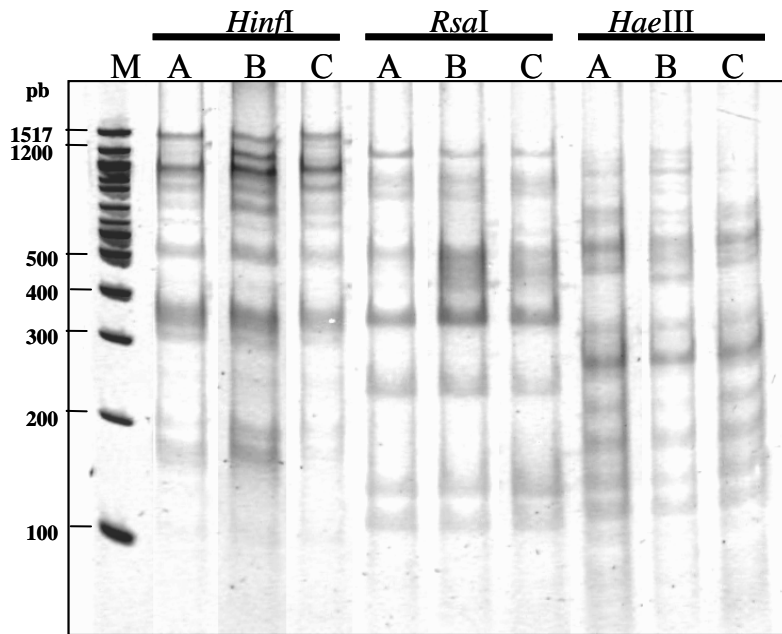


Figura 21 - Perfil de restrição do 16S rDNA da comunidade bacteriana dos reatores A, B e C, com anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como meio suporte, respectivamente, obtidos pela enzimas *HinfI*, *RsaI* e *HaeIII*. M: marcador molecular 100pb (Biolabs Inc)

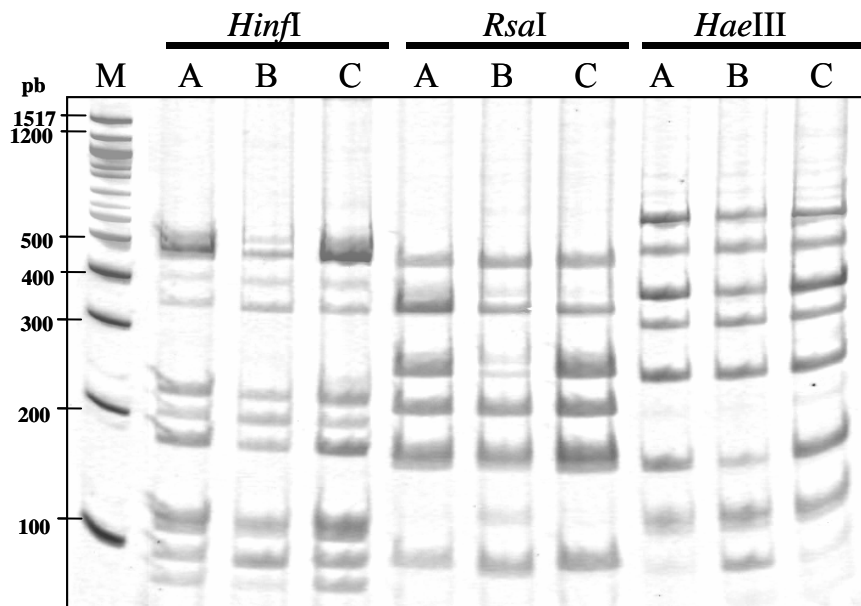


Figura 22 - Perfil de restrição do 16S rDNA da comunidade de arqueas metanogênicas dos reatores A, B e C, com anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila como meio suporte, respectivamente, obtidos pela enzimas *HinfI*, *RsaI* e *HaeIII*. M: marcador molecular 100pb (Biolabs Inc)

O número total de fragmentos produzidos em uma comunidade microbiana é considerado como representativo de sua riqueza (S); nesse cálculo, cada fragmento gerado contribui igualmente para a diversidade da amostra.



No entanto, por considerar que o tamanho dos fragmentos produzidos podem indicar uma contribuição heterogênea para a riqueza, utilizou-se também o cálculo da riqueza modificada ( $S_{mod}$ ) (YANG, YAO e WANG, 2004). Essa análise é realizada a partir da comparação dos perfis dos fragmentos de restrição obtidos nos três reatores. É portanto uma análise de riqueza comparativa, que parte do princípio de que um mesmo fragmento presente nos três perfis dos reatores não contribui para a distinção dos mesmos, diferentemente dos fragmentos presentes em apenas um ou em dois perfis de restrição. Desta forma, para fragmentos encontrados em todos os perfis foi atribuído valor 0, para fragmentos encontrados em dois perfis, valor 0,5 e para os encontrados em somente um perfil, o valor 1.

Os índices de riqueza e riqueza modificada refletem de certa forma a diversidade da comunidade, mas não indicam a abundância relativa dessas seqüências de DNA na amostra. Uma comparação entre os índices de diversidade dos três reatores é apresentada na Tabela 16.

Tabela 16 - Índices de diversidade dos reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente

Item	Bactérias			Archaeas metanogênicas		
	A	B	C	A	B	C
Riqueza (S)	30	33	32	22	27	22
Riqueza modificada ( $S_{mod}$ )	9,0	10,5	11,5	5,5	8,5	6,0
Diversidade de Shannon-Weaver ( $D_{sh}$ )	3,01	2,95	3,00	2,90	3,09	2,90

A estimativa da diversidade genética presente na comunidade microbiana de cada reator foi calculada com base no índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $D_{sh}$ ), que integra riqueza de espécies e abundância. O reator A obteve os menores índices de riqueza (S) e riqueza modificada ( $S_{mod}$ ) tanto de bactérias quanto de archaeas, os reatores B e C obtiveram valores muito próximos para estes índices para as bactérias. O reator B apresentou os maiores valores de riqueza, riqueza modificada e diversidade de Shannon-Weaver de archaeas metanogênicas.

Dentre as várias medidas de similaridade, o coeficiente de Jaccard tem sido amplamente usado em análises de diversidade microbiana (LYAUTEY et al., 2005; VLIET, BLOEM e GOEDE, 2006; ZHANG et al., 2007; O'CALLAGHAN et al., 2008; WANG et al., 2008; ZHAO et al., 2008).

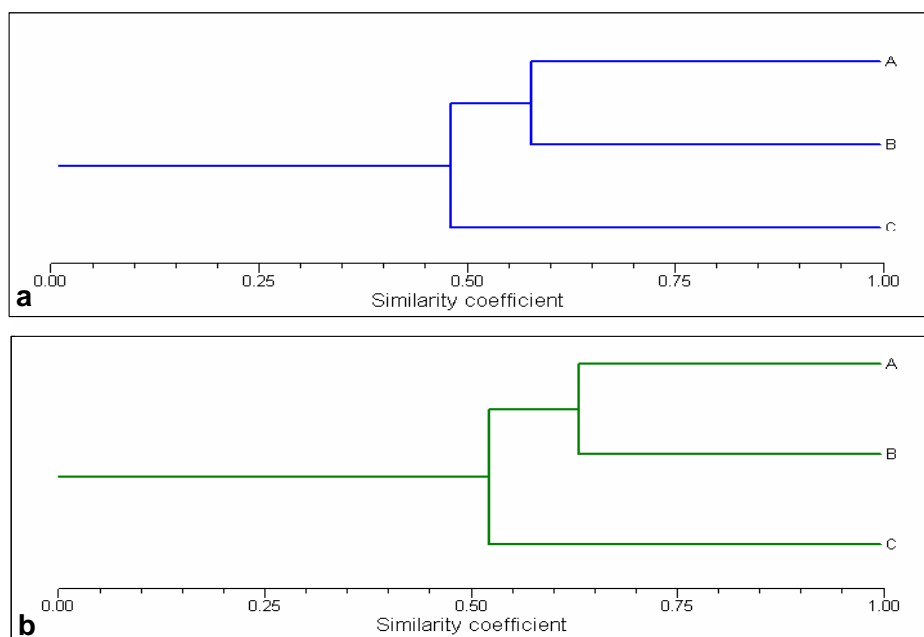


Figura 23 – Dendrogramas de similaridade construído com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da matriz binária de dados da ARDRA para os reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente. Figura a: comunidade bacteriana; Figura b: comunidade de archaeas metanogênicas

Na Figura 23 está representado os dendrogramas de similaridade dos reatores obtidos com o coeficiente de Jaccard. Pode-se observar a formação de dois grupos, os reatores A e B, recheados com mangueira de polipropileno e tijolo de argila, respectivamente, agrupados por apresentarem maior similaridade e o reator A, recheado com espuma de poliuretano apresentando maior dessemelhança.

Na Figura 24 está representado o dendrograma de similaridade dos reatores obtido com o HCA á partir dos dados físico-químicos do TRH de 1 dia e o índice de diversidade de Shannon-Weaver. Pode-se observar a formação de dois grupos, os reatores A e B, recheados com mangueira de polipropileno e espuma de poliuretano, respectivamente foram agrupados como mais semelhantes e o reator C, recheado com tijolo de argila apresentando maior

dessemelhança, assim como foi representado no dendograma de similaridade obtido pelo coeficiente de Jaccard. Porém, nesta análise, o coeficiente de similaridade ficou menor que 0,1 demonstrando que o grupo formado pelos reatores A e B não difere do reator C. Esta análise é baseada na matriz da distância euclidiana que é a menor distância existente entre os três reatores, diferentemente do dendograma de similaridade obtido pelo coeficiente de Jaccard que é construído pela matriz binária de presença e ausência de bandas. O HCA é uma análise multivariada, isto é, utiliza simultaneamente todas as variáveis na interpretação dos resultados, diminuindo o risco de erros e resultando em análises mais confiáveis.

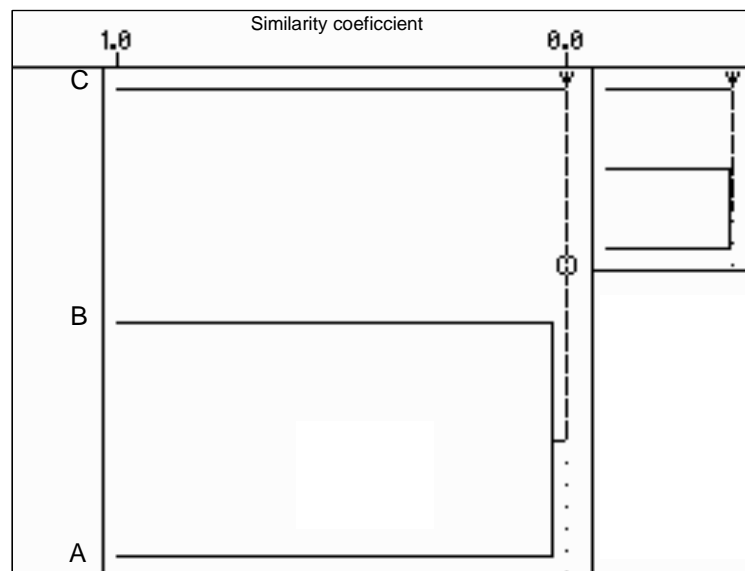


Figura 24 – Dendograma de similaridade construído pelo método HCA (Análise do Grupamento Hierárquico) a partir da matriz de distância euclidiana de dados físico-químicos e o índice de diversidade de shannon-Weaver para os reatores A, B e C, com recheio de anéis de polipropileno, cubos de espuma de poliuretano e pedaços de tijolo de argila, respectivamente

## 6 CONCLUSÕES

Analisando-se os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Com baixas cargas orgânicas, de 193 a 523 mg DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, os três biodigestores apresentaram a mesma eficiência na remoção de DQO;
- Com carga orgânica de 995 mg DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> o reator mais eficiente foi o que apresentava recheio de pedaços de tijolo de argila;
- Com TRH de 1,5 dias, o sistema de alimentação contínua feita uma única vez ao dia, mostrou-se ineficiente, uma vez que há mistura do substrato com o efluente tratado;
- Com a alimentação dos reatores feita uma única vez ao dia, o sistema em batelada e TRH de 1 dia, mostrou-se mais eficiente que o sistema de alimentação contínuo e TRH de 1,5 dias;
- A temperatura não afetou a estabilidade do sistema, dentro das condições estudadas;
- Os índices de riqueza e diversidade e o dendograma de similaridade agruparam os reatores A e B, com recheio de mangueira de polipropileno e espuma de poliuretano respectivamente, como similares e o reator C, com recheio de tijolo de argila, como o mais dessemelhante entre os três. Porém a análise de HCA não indicou a existência de uma alta variação entre eles.

## **7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

- Realizar as análises de teor de nitrogênio com a amostra líquida, sem a secagem inicial da amostra;
- Analisar nitrogênio amoniacal, nitratos e nitritos para compreender melhor a dinâmica do nitrogênio;
- Para avaliar melhor a composição do substrato e a dinâmica do sistema de decomposição da matéria orgânica, seriam necessários ainda, análise do teor de sulfetos, de óleos e graxas;
- Analisar a DQO solúvel e DQO particulada para verificar se os reatores não estão exercendo um efeito físico de “filtro”;

## 8 REFERÊNCIAS

ACHARYA, B. K., MOHANA, S., MADAMWAR, D. Anaerobic treatment of distillery spent wash – A study on upflow anaerobic fixed film bioreactor. **Bioresource Technology** (IN PRESS), 2007.

AHN, J. H., FORSTER, C. F. A comparison of mesophilic and thermophilic anaerobic upflow filters treating paper pulp liquors. **Process Biochemistry** v. 38, p. 257-262, 2002.

AKARASUBASI, A. T., INCE, O., KIRDAR, B., OZ, N. A., ORHON, D., CURTIS, T. P., HEAD, I. M., INCE, B. K. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. **Water Research** v. 39, p. 1576–1584, 2005.

AKARASUBASI, A. T., INCE, O., OZ, N. A., KIRDAR, B., INCE, B. K. Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. **Process Biochemistry** v. 41, p. 28–35, 2006.

AMARAL, C. M. C., AMARAL, L. A., LUCAS JÚNIOR, J. Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1897-1902, 2004.

ANDRADE NETO, C. O. de, HAANDEL, A. Van, MELO, H. N. S., O Uso do Filtro Anaeróbio para Pós-Tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios no Brasil. Anais do X Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Braga: APESB/APRH/ABES, 2002.

ANGENENT, L. T., SUNG, S. RASKIN, L. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. **Water Research** v. 36, p. 4648–4654, 2002.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: APHA/AWWA, 1998.

ARNAIZ, C., GUTIERREZ, J. C., LEBRATO, J. Support material selection for anaerobic fluidized bed reactors by  $\square$ ethod $\square$ iais $\square$ s analysis. **Biochemical Engineering Journal** v. 27, p. 240-245, 2006.

BATSTONE, D. J., KELLER, J., BLACKALL, L. L. The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. **Water Research** v. 38, p. 1390–1404, 2004.

BEUX, S., NUNES, E., BARANA, A. C. Slaughterhouse effluent treatment evaluation in two-phase anaerobic reactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (IN PRESS), 2007.

BODÍK, I., HERDOVÁ, B., DRTIL, M. The use of upflow anaerobic filter and AnSBR for wastewater treatment at ambient temperature. **Water Research** v. 36, p. 1084–1088, 2002.

BORJA, R., BANKS, C. J., WANG, Z. Performance of a hybrid anaerobic reactor, combining a sludge blanket and a filter, treating slaughterhouse wastewater. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 43, p. 351-357, 1995.

BORJA, R., BANKS, C. J., WANG, Z., MANCHA, A. Anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater using a combination Sludge Blanket and Filter arrangement in a single reactor. **Bioresource Technology** v. 65, p. 125-133, 1998.

BULLOCK, C. The Archaea - a biochemical perspective. **Biochemistry and Molecular Biology Education** v. 28, p. 186-191, 2000.

BUZZINI, A. P., SAKAMOTO, I. K., VARESCHE, M. B., PIRES, E. C. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. **Process Biochemistry** v. 41, p. 168–176, 2006.

CAIXETA, C. E. T., CAMMAROTA, M. C., XAVIER, A. M. F. Slaughterhouse wastewater bioreactor. **Advances in Environmental Research** v. 7, p. 463–469, 2003.

CALLI, B., MERTOGLU, B., ROEST, K., INANC, B. Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. **Bioresource Technology** v. 97, p. 641–647, 2006.

CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology** v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CASSERLY, C. ERIJMAN, L. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 52, p. 7–12, 2003.

CASSIDY, D. P., BELIA, E. Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. **Water Research** v. 39, p. 4817-4823, 2005.

CERQUEIRA, R. S. **Pós-tratamento de efluente de lagoa anaeróbia por escoamento superficial no solo**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

CHAUHAN, A. OGRAM, A. Evaluation of support matrices for immobilization of anaerobic consortia for efficient carbon cycling in waste regeneration. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 327, p. 884–893, 2005.

CHERNICHARO, C. A. de L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: Segrac, v. 5, 245 p., 1997.

COIMBRA, M. A., LIBARDI, W., MORELLI, M. R. Estudo da influência de cimentos na fluência em concretos para a construção civil. **Cerâmica** v. 52, p. 98-104, 2006.

CONNAUGHTON, S., COLLINS, G., O'FLAHERTY, V. Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18°C. **Water Research**. V. 40, p. 1009 – 1017, 2006.

COOK, K. L., LAYTON, A. C., DIONISI, H. M., FLEMING, J. T., SAYLER, G. S. Evaluation of a plasmid-based 16S–23S rDNA intergenic spacer region array for analysis of microbial diversity in industrial wastewater. **Journal of Microbiological Methods** v. 57, p. 79– 93, 2004.

CÔTÉ, C., MASSÉ, D. I., QUESSY, S. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. **Bioresource Technology** v. 97, p. 686-691, 2006.

DE LA RUBIA, M. A., PEREZ, M., ROMERO, L. I., SALES, D. Effect of solids retention time (SRT) on pilot scale anaerobic thermophilic sludge digestion. **Process Biochemistry** v. 41, p. 79–86, 2006.

DE ROSA, M. Archaeal lipids: structural features and supramolecular organization. **Thin Solid Films** n. 284, v. 285, p. 13-17, 1996.



DEL NERY, V., NARDI, I. R. DE, DAMIANOVIC, M. H. R. Z., POZZI, E. AMORIM, A. K. B., ZAIAT, M. Long-term operating performance of a poultry slaughterhouse wastewater treatment plant. **Resources, Conservation and Recycling** (IN PRESS), 2006.

DEMIRBAS, M. F., BALAT, M. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: A global perspective. **Energy Conversion and Management** v. 47, p. 2371-2381, 2006.

DEMIREL, B., YENIGÜN, O. Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. **Bioresource Technology** v. 97, p. 1201–1208, 2006.

DENG, L. W., ZHENG, P., CHEN, Z. A. Anaerobic digestion and post-treatment of swine wastewater using IC–SBR process with bypass of raw wastewater. **Process Biochemistry** v. 41, p. 965-969, 2006.

ENRIGHT, A., COLLINS, G., O'FLAHERTY, V. Temporal microbial diversity changes in solvent-degrading anaerobic granular sludge from low-temperature (15 °C) wastewater treatment bioreactors. **Systematic and Applied Microbiology** (IN PRESS), 2007.

ExPASy Proteomics Server - Expert Protein Analysis System. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>>. Acesso em: outubro de 2007.

FERREIRA, F. L. A., LUCAS JR, J., AMARAL, L. A. Partial characterization of the polluting load of swine wastewater treated with an integrated biodigestion system. **Bioresource Technology** v. 90, p. 101-108, 2003.

FUJII, T., SUGINO, H., ROUSE, J. D., FURUKAWA, K. Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-Oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 94, p. 412-418, 2002.

GARCIA, M. L., LAPA, K. R., FORESTI, E. ZAIAT, M. Effects of bed materials on the performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage. **Journal of Environmental Management** (IN PRESS), 2007.

GENTILE, M., YAN, T., TIQUIA, S. M., FIELDS, M.W., NYMAN, J., ZHOU, J., CRIDDLE, C. S. Stability in a denitrifying fluidized bed reactor. **Microbial Ecology** v. 52, p. 311–321, 2006.

GILBRIDE, K. A.; LEE, D. Y.; BEAUDETTE, L.A. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. **Journal of Microbiological Methods** v. 66, p. 1–20, 2006.

GOBLOS, S. Z., PORTORO, P., BORDÁS, D. KALMAN, M., KISS, I. Comparison of the effectivities of two-phase and single-phase anaerobic sequencing batch reactors during dairy wastewater treatment. **Renewable Energy** n. 33, p. 960-965, 2008.

GÓMEZ, X., MORÁN A., CUETOS, M. J., SÁNCHEZ, M. E. The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. **Journal of Power Sources** v. 157, p. 727-732, 2006.

HADJIEV, D., DIMITROV, D., MARTINOV, M., SIRE, O. Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. **Enzyme and Microbial Technology** v. 40, p. 840–848, 2007.

IBGE - FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Trimestral de Abate de Animais - Resultados Mensais – Setembro de 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=325>>. Acesso em: 02 de outubro de 2007.

IVNITSKY, H., KATZ, I., MINZ, D., VOLVOVI, G., SHIMONI, E., KESSELMAN, E., SEMIAT, R., DOSORETZ, C. G. Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment, **Water Research** (IN PRESS), 2007.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin del la Société Vaudoise des Sciences Naturelles** v. 37, p. 547-579, 1901.

JGI - Joint Genome Institute. Disponível em: <<http://www.jgi.doe.gov>>. Acesso em: outubro de 2007.

JI, H. M., SAMPER, V., CHEN, Y., HUI, W C., LYE , H. J., MUSTAFA, F. B., LEE, A. C., CONG, L., HENG, C. K., LIM, T. M. DNA purification silicon chip. **Sensors and Actuators A** v. 139, p. 139–144, 2007.

JOU, C. G., HUANG, G. A pilot study for oil refinery wastewater treatment using a fixed film treatment: evaluation of a new three-phase separation system in a UASB reactor. **Bioresource Technology** v. 81, p. 61-69, 2002.

JUOTTONEN, H., GALAND, P. E., YRJÄLÄ, K. Detection of methanogenic *Archaea* in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. **Research in Microbiology** v. 157, p. 914–921, 2006.

KAPLEY, A., DE BAERE, T., PUROHIT, H. J. Eubacterial diversity of activated biomass from a common effluent treatment plant. **Research in Microbiology** (IN PRESS), 2007.

KEYSER, M., WITTHUHN, R. C., LAMPRECHT, C., COETZEE, M. P. A., BRITZ, T. J. PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. **Systematic and Applied Microbiology** v. 29, p. 77-84, 2006.

KLOCKE, M., MÄHNERT, P., MUNDT, K., SOUIDI, K., LINKE, B. Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. **Systematic and Applied Microbiology** v. 30, p. 139–151, 2007.

KOETZ, P. R., FARIA, O. L. V., NUNES, W. A. Tratamento de efluentes homogêneos de curtume por digestão anaeróbia em reatores de fluxo ascendente. **Revista Brasileira de Agrobiologia** v.1, n.1, 1995.

KREADER, C. A. Relief of amplification inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. **Applied and Environmental Microbiology** v. 62, n. 3, p. 1102–1106, 1996.

KUYPERS, M. M., SLIEKERS, A. O., LAVIK, G., SCHMID, M., JORGENSEN, B. B., KUENEN, J. G., SINNINGHE DAMSTE, J. S., STROUS, M., JETTEN, M.S. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. **Nature** v. 422, n. 10, p.608-611, 2003.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW, M. (Eds.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**: New York (Wiley), p. 115–148, 1991.

LASTELLA G., TESTA C., CORNACCHIA G., NOTORNICOLA M., VOLTASIO F. e SHARMA K. V. Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: biogas production and its purification. **Energy Conversion and Management** v. 43, p. 63-75, 2000.

LECLERC, M., DELGÈNES, J., GODON, J. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. **Environmental Microbiology** v. 6, p. 809–819, 2004.

LEITÃO, R. C., VAN HAANDEL, A. C., ZEEMAN, G., LETTINGA, G. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. **Bioresource Technology** v. 97, p. 1105–1118, 2006.

LIMA, C. A. A., RIBEIRO, R., FORESTI, E., ZAIAT, M. Morphological study of biomass during the start-up period of a fixed-bed anaerobic reactor treating domestic sewage. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 48, n. 5, p. 841-849, 2005.

LIU, C., YUAN, X., ZENG, G., LI, W., LI, J. Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Bioresource Technology** v. 99, p. 882–888, 2008.

LIU, W. CHAN, O. FANG, H. H. P. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. **Water Research** v. 36, p. 1767–1775, 2002.

LIU, Y., ZHANG, T., FANG, H. H. P. Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge. **Bioresource Technology** v. 96, p.1205–1214, 2005.

LUOSTARINEN, S., SANDERS, W., KUJAWA-ROELEVELD, K., ZEEMAN, G. Effect of temperature on anaerobic treatment of black water in UASB-septic tank systems. **Bioresource Technology** v. 98, p. 980–986, 2007.

LYAUTEY, E., LACOSTE, B., TEN-HAGE, L., ROLS, J. L., GARABETIAN, F. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16 S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. **Water Research** v. 39, p. 380–388, 2005.

MACIAS-CORRAL, M., SAMANI, Z., HANSON, A., DELAVEGA, R., HALLA, K. Producing compost and biogas from cattle manure. **Bio Cycle** v. 45, n. 3, p. 55-56, 2004.

MALIK, S., BEER, M., MEGHARAJ, M., NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International** v. 34, p. 265–276, 2008.

MANARIOTIS, L. D., GRIGOROPOULOS, S. G. Municipal wastewater treatment using upflow anaerobic filters. **Water Environment Research** v. 78, n.3, p. 233-242, 2006.

MARCHESI, J. R., SATO, T., WEIGHTMAN, A. J., MARTIN, T. A., FRY, J. C., HIOM, S. J., WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that

amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology** v. 64, n. 2, p. 795–799, 1998.

MASSÉ, D. I., MASSE, L. The effect of temperature on slaughterhouse wastewater treatment in anaerobic sequencing batch reactors (ASBR). **Bioresource Technology** v. 76, p. 91-8, 2001.

MASSE, L., MASSÉ, D. I. Effect of soluble organic, particulate organic, and hydraulic shock loads on anaerobic sequencing batch reactors treating slaughterhouse wastewater at 20°C. **Process Biochemistry** v. 40, p.1225–1232, 2005.

MICHAUD, S., BERNET, N., BUFFIÈRE, P. DELGENÈS, J. P. Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilms. **Process Biochemistry** v. 40, p. 2751-2755, 2005.

MITTAL, G. S. Treatment of wastewater from abattoirs before land application - a review. **Bioresource Technology** v. 97, p. 1119–1135, 2006.

MIURA, Y., HIRAIWA, M. N., ITO, T., ITONAGA, T., WATANABE, Y., OKABE, S. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance. **Water Research** v. 41, p. 627 – 637, 2007.

MOREIRA, M. B., RATUSZNEI, S. M., RODRIGUES, J. A. D., ZAIAT, M., FORESTI, E. Influence of organic shock loads in an ASBBR treating synthetic wastewater with different concentration levels. **Bioresource Technology** v. 99, p. 3256-3266, 2008.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: outubro de 2007.

NISHIMURA, Y. E EGUCHI, T. Stereochemistry of reduction in digeranylgeranyl glycerophospholipid reductase involved in the biosynthesis of archaeal membrane lipids from *Thermoplasma acidophilum*. **Bioorganic Chemistry** v. 35, p. 276–283, 2007.

NOYOLA, A., MORGAN-SAGASTUME, J. M., LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. E. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy/resource recovery. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology** v. 5, p. 93-114, 2006.

O'CALLAGHAN, M., GERARD, E. M., BELL, N. L., WAIPARA, N. W., AALDERS, L. T., BAIRD, D. B., CONNER, A. J. Microbial and nematode communities associated with potatoes genetically modified to express the antimicrobial peptide magainin and unmodified potato cultivars. **Soil Biology & Biochemistry** (IN PRESS), 2008.

OMIL, F., GARRIDO, J. M., ARROJO, B., MÉNDEZ, R. Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale. **Water Research** v. 37, p. 4099–4108, 2003.

PEREIRA-RAMIREZ, O., ANTUNES, R. M., QUADRO, M. S., KOETZ, P. R. Pós-tratamento de efluentes de reator UASB com filtros anaeróbios. **Revista Brasileira de Agrobiologia** v.7, n. 3, p.209-212, 2001.

PEREZ, M., RODRIGUEZ-CANO, R., ROMERO, L. I., SALES, D. Performance of anaerobic thermophilic fluidized bed in the treatment of cutting-oil wastewater. **Bioresource Technology** v. 98, p. 3456–3463, 2007.

PULLAMMANAPPALLIL, P. C., CHYNOWETH, D. P., LYBERATOS, G. SVORONOS, S. A. Stable performance of anaerobic digestion in the presence of high concentration of propionic acid. **Bioresource Technology** v. 78, p. 165-169, 2001.

PUÑAL, A., MÉNDEZ-PAMPÍN, R. J., LEMA, J. M. Characterization and comparison of biomasses from single- and multi-fed upflow anaerobic filters. **Bioresource Technology** v. 68, p. 293-300, 1999.

QURESHI, N., ANNOUS, B. A., EZEJI, T. C., KARCHER, P., MADDOX, I. S. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. **Microbial Cell Factories** v. 4, n. 24, 2005.

RDP - Ribosomal Database Project II. Disponível em: <<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>>. Acesso em: dezembro de 2007.

ROEST, K. HEILIG, H. G. H. J. SMIDT, H. DE VOS, W. M. STAMS, A. J. M. AKKERMANS, A. D. L. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. **Systematic and Applied Microbiology** v. 28, p. 175–185, 2005.

RÖSCH, C., MERGEL, A., BOTHE, H., Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, p. 3818-3829, 2002.

RUIZ, I., VEIGA, M. C., DE SANTIAGO, P., BLÁSQUEZ, R. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. **Bioresource Technology** v. 60, p. 251-258, 1997.

SANTOS, P. de S. **Ciência e tecnologia de argilas**. 2º Ed. V. 1 Editora Edgard Blucher LTDA. São Paulo, 1989.

SARTI, A., GARCIA, M. L., ZAIAT, M., FORESTI, E. Domestic sewage treatment in a pilot-scale anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR) Resources, **Conservation and Recycling** v. 51, p. 237–247, 2007.

SARTI, A., SAKAMOTO, I. K., VARESCHE, M. B. A., ZAIAT, M., FORESTI, E. Tratamento de esgoto sanitário utilizando reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais (escala piloto) **Engenharia Sanitária e Ambiental** v.11, n. 1, p. 73-82, 2006.

SATOKARI, R. M., VAUGHAN, E. E., SMIDT, H., SAARELA, M., MÄTTÖ, J., DE VOS W. M. Molecular approaches for the detection and identification of Bifidobacteria and Lactobacilli in the human gastrointestinal tract. **Systematic Applied Microbiology** v. 26, p. 572–584, 2003.

SCHLÜTER, P. M., HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes** v. 6, p. 569–572, 2006.

SCHWARZ, B. C. E., DEVINNY, J. S., TSOTSIS, T. T. A biofilter network model - importance of the pore structure and other large-scale heterogeneities. **Chemical Engineering Science** v. 56, p. 475-483, 2001.

SHAN, G., JIN, W., LAM, E. K. H., XING, X. Purification of total DNA extracted from activated sludge. **Journal of Environmental Sciences** v. 20, p. 80–87, 2008.

SHIGEMATSU, T., TANG, Y., MIZUNO, Y., KAWAGUCHI, H., MORIMURA, S., KIDA, K. Microbial diversity of mesophilic methanogenic consortium that can degrade long-chain fatty acids in chemostat cultivation. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 102, n. 6, p. 535–544, 2006.

SHOW, K. Y., TAY, J. H. Influence of support media on biomass growth and retention in anaerobic filters. **Water Research** v. 33, n. 6, p. 1471-1481, 1999.

SILVA, A. J., HIRASAWA, J. S., VARESCHE, M. B., FORESTI, E., ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe** v. 12, p. 93–98, 2006.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV - Imprensa Universitária, 1981.

SIRIPONG, S., RITTMANN, B. E. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. **Water Research** v. 41, p. 1110 – 1120, 2007.

SOKAL, R. R., MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Sci. Bull.* V. 38, p. 1409-1438, 1958.

SOUZA PENA, A. **Resposta técnica: Tratamento de efluentes de abatedouro e beneficiamento de sangue bovino**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, 2007. Disponível em < <http://www.sbrt.ibict.br>>. Acesso em: janeiro de 2008.

TAL, Y., WATTS, J. E. M., SCHREIER, H. J. Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. **Applied and environmental microbiology** v. 72, n. 4, p. 2896-2904, 2006.

-TANG, Y., SHIGEMATSU, T., MORIMURA, S., KIDA, K. Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 99, n. 2, p.150–164, 2005.

TAWFIK, A., ZEEMAN, G., KLAPWIJK, A., SANDERS, W., EL-GOHARY, F., LETTINGA, G. Treatment of domestic sewage in a combined UASB/RBC system. Process optimization for irrigation purposes. **Water Science and Technology** v. 48, n.1, p.131-138, 2003.

THAMDRUP, B., DALSGAARD, T. Production of N<sub>2</sub> through Anaerobic Ammonium Oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. **Applied and environmental microbiology** v. 68, n. 3, p. 1312-1318, 2002.

TORKIAN, A., EQBALI, A., HASHEMIAN, S.J. The effect of organic loading rate on the performance of UASB reactor treating slaughterhouse effluent. *Resources, Conservation and Recycling* v. 40, p.1–11, 2003.



VARESCHE, M. B., ZAIAT, M., VIEIRA, L. G. T., VAZOLLER, R. F., FORESTI, E. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 48, p. 534-538, 1997.

VLIET, P. C. J. van, BLOEM, J., GOEDE, R. G. M. de Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition of Effective Micro-organisms® (EM) to slurry manure. **Applied Soil Ecology** v. 32, p. 188–198, 2006.

WANG, M. C., LIU, Y. H., WANG, Q., GONG, M., HUA, X. M., PANG, Y. J., HU, S., YANG, Y. H. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry** v. 40, p. 778–788, 2008.

YANG, Q., JIA, Z., LIU, R., CHEN, J. Molecular diversity and ANAMMOX activity of novel planctomycete-like bacteria in the wastewater treatment system of a full-scale alcohol manufacturing plant. **Process Biochemistry** v. 42, p. 180–187, 2007.

YANG, Y. H., YAO, J., WANG, M. C. RAPD Marker and substrate utilization pattern applied to study microbial community diversity in the soil affected by agricultural chemicals. **Journal of Environmental Science and Health B** v. B39, n. 1, p. 125–138, 2004.

YANG, Y., TADA, C., TSUKAHARA, K., SAWAYAMA, S. Methanogenic community and performance of fixed- and fluidized-bed reactors with reticular polyurethane foam with different pore sizes. **Materials Science and Engineering** v. 24, p. 803-813, 2004a.

YANG, Y., TSUKAHARA, K., SHIGEKI, S., MAEKAWA, T. Anaerobic digestion by a fixed and fluidized hybrid reactor packed with carbon felt. **Materials Science and Engineering** v. 24, p. 893-899, 2004b.

YANG, Y., TSUKAHARA, K., SAWAYAMA, S. Performance and methanogenic community of rotating disk reactor packed with polyurethane during thermophilic anaerobic digestion. **Materials Science and Engineering** v. 27, p. 767–772, 2007.

ZHANG, C. B., HUANG, L. N., SHU, W. S., QIU, J. W., ZHANG, J. T., LAN, C. Y. Structural and functional diversity of a culturable bacterial community during the early stages of revegetation near a Pb/Zn smelter in Guangdong, PR China. **Ecological Engineering** v. 30, p. 16–26, 2007.

ZHAO, X., YANG, L., YU, Z., PENG, N., XIAO, L., YIN, D., QIN, B. Characterization of depth-related microbial communities in lake sediment by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of amplified 16S rRNA fragments. **Journal of Environmental Sciences** v. 20, p. 224–230, 2008.

**9 ANEXOS**

## 9.1 REAGENTES.

### 9.1.1 Reagentes utilizados para análise de DQO

#### - Solução digestora para análise de DQO

A solução foi preparada segundo APHA (1998). Dissolveram-se 10,216 g de Dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) previamente seco e 33 g de Sulfato de mercúrio ( $HgSO_4$ ) em uma solução de 167 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) em 500 mL de água destilada. Diluiu-se a 1000 mL.

#### - Solução catalítica para análise de DQO

A solução foi preparada segundo APHA (1998). Dissolveram-se 9,9 g de sulfato de prata ( $AgSO_4$ ) em 1000 mL de ácido sulfúrico concentrado.

#### - Solução padrão de DQO

A solução foi preparada segundo APHA (1998). Dissolveram-se 0,8502 g de biftalato de potássio em água destilada completando o volume a 1000 mL. A partir desta solução foram preparadas três diluições de 800, 500 e 200  $mg.L^{-1}$  para traçar a equação da reta.

### 9.1.2 Reagentes utilizados para determinação de nitrogênio

#### - Mistura catalítica

A mistura catalítica foi preparada segundo APHA (1998). Misturaram-se três partes de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) para uma de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ).

#### - Indicador misto para análise de nitrogênio

Adicionaram-se, por litro de ácido bórico 2% ( $H_3BO_3$ ), 5 mL de solução de vermelho de metila 0,1% em etanol e 25 mL de verde de bromocresol 0,1% em etanol e então completou-se o volume.

### 9.1.3 Reagentes utilizados para determinação de fósforo

#### - Solução de molibdato para análise de fósforo

A solução foi preparada segundo Silva (1981). Pesou-se 1 g de carbonato de bismuto, diluiu-se em 200 mL de água destilada e adicionou-se 138 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em outro béquer, adicionaram-se 20g de molibdato de amônio e 150 mL de água destilada. Em seguida, as duas soluções foram transferidas para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume.

## 9.2 METODOLOGIA ANALÍTICA

### 9.2.1 Determinação de pH

A determinação de pH foi feita segundo metodologia descrita em APHA (1998), utilizando-se um potenciômetro.

### 9.2.2 Determinação de alcalinidade

A alcalinidade foi determinada segundo metodologia descrita por Silva (1977), onde se utilizou cerca de 20 a 50 mL de amostra filtrada em papel filtro qualitativo. O filtrado foi titulado sob agitação contínua com ácido sulfúrico 0,1N até pH 4,0. Para o cálculo da alcalinidade, utilizou-se a Equação VII:

$$\text{Alcalinidade (mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\text{Vol. (H}_2\text{SO}_4) \times N (\text{H}_2\text{SO}_4) \times 50000}{\text{Volume da amostra (mL)}} \quad (\text{Equação VII})$$

Onde:

Vol.: volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado (mL);

N: normalidade do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

50000: equivalente molar do CaCO<sub>3</sub>.

### 9.2.3 Determinação de Acidez Volátil

Para determinação de Acidez Volátil a mesma amostra submetida à análise de alcalinidade foi utilizada. À mesma foi adicionado  $H_2SO_4$  0,1 N até pH 3,5 e em seguida a amostra foi submetida à fervura por 3 minutos. Depois de resfriada, foi titulada com NaOH 0,01N de pH 4,0 até 7,0. Para o cálculo da acidez volátil, utilizou-se a Equação VIII:

$$Acidez\ Volátil\ (CH_3COOH.L^{-1}) = \frac{Vol.\ (NaOH) \times N\ (NaOH) \times 60000}{Volume\ da\ amostra\ (mL)} \quad (Equação\ VIII)$$

Onde:

Vol.: volume de NaOH utilizado (mL);

N: normalidade do NaOH;

60000: equivalente molar do  $CH_3COOH$ .

### 9.2.4 Determinação de Sólidos totais (ST) e voláteis (SV)<sup>9</sup>.

O teor de sólidos totais e voláteis foi determinado pelo método gravimétrico segundo descrito em APHA (1998). As amostras foram colocadas em cápsula de porcelana e secas em estufa a 105°C até peso constante, obtendo-se o teor de sólidos totais. A mesma cápsula era utilizada na determinação de sólidos voláteis, por incineração em forno mufla a 550°C por cerca de seis horas, seguido por resfriamento em dessecador e pesagem.

### 9.2.5 Determinação de Demanda Química de Oxigênio

A medida da DQO foi realizada segundo metodologia descrita em APHA (1998), utilizando-se o método colorimétrico de refluxo fechado.

Procedimento:

Em tubo de digestão, foram adicionados 3 mL da amostra homogeneizada e 2 mL da solução digestora e agitou-se bem para misturar. Em seguida, foram adicionados lentamente 4 mL da solução catalítica pelas paredes do tubo, fechando-o imediatamente e agitando sob

água corrente, devido ao aquecimento com a mistura das fases. O mesmo procedimento foi realizado colocando-se 3 mL de água destilada no lugar da amostra, sendo este tubo denominado branco. Os tubos foram colocados no bloco digestor a 150°C por duas horas. Para cada amostra foram feitas triplicatas. Depois das duas horas, os tubos foram retirados do bloco, esperou-se esfriar até temperatura ambiente e foram feitas leituras em espectrofotômetro a 600 nm, usando o branco para acertar o zero da escala.

Preparou-se uma solução padrão de biftalato de potássio equivalente a 1000 mg.L<sup>-1</sup> de DQO e diluiu-se para concentrações de 800, 500 e 200 mg.L<sup>-1</sup>, para traçar a equação da reta  $y = a.x + b$ , na qual a e b são obtidos da equação e x é o valor da absorbância. Calculou-se a DQO segundo a Equação IX:

$$DQO \left( mg O_2.L^{-1} \right) = [a \times x + b] \times \text{diluição da amostra} \quad (\text{Equação IX})$$

## 9.2.6 Determinação dos teores de Nitrogênio e Fósforo

### - Nitrogênio

Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método micro-Kjeldahl, segundo metodologia descrita por APHA (1998).

#### Procedimento:

Pesaram-se 10 mL de cada amostra em tubos de digestão e colocou-se em estufa até secagem completa. Logo após, adicionaram-se a cada tubo 1,5 g de catalisador e 6 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram levados ao bloco digestor com temperatura inicial de 50°C, aumentando-se a temperatura em 50°C a cada 30 minutos até atingir 350°C. Quando o conteúdo dos tubos ficou transparente, de cor verde-azulado, as amostras permaneceram por mais duas horas. Depois, nos tubos frios, adicionou-se um pouco de água destilada, lavando as paredes do tubo. A seguir, as amostras foram tratadas em destilador de

nitrogênio, neutralizadas com NaOH 50 % até o aparecimento de cor escura (óxido de cobre formado). O destilado foi recolhido em erlenmeyer com 10 mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2% com indicador misto até um volume de 150 mL. O destilado foi titulado com HCl 0,01N até que o indicador virou da cor azul para vinho. Realizou-se então o cálculo para o teor de nitrogênio segundo a Equação X:

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{\text{Vol. (HCl)} \times N(\text{HCl}) \times fc \times 0,014 \times 100}{\text{peso da amostra (g)}} \quad (\text{Equação X})$$

Onde:

Vol.: volume de HCl utilizado (mL);

N: normalidade do HCl;

fc: fator de correção do HCl;

- Fósforo

O fósforo foi determinado segundo metodologia descrita por SILVA (1981).

Procedimento:

Adicionaram-se 20 mL da amostra em cápsulas de porcelana que foram levadas à estufa para secagem da amostra. Depois de secas, as amostras foram levadas a mufla por 6 horas a 550°C. Retirou-se as cápsulas da mufla e, após esfriarem, foram adicionados 5 mL de HCl 1:1 e levadas ao aquecimento em chapa até secagem total do ácido. Depois, foram adicionados mais 5 mL do HCl e levadas novamente ao aquecimento até que o volume do ácido foi reduzido à cerca de 1 mL, quando retirou-se da chapa para esfriar. Em seguida, as cápsulas foram lavadas com água e filtradas em balão de 100 mL, preenchendo-se o volume. Desse balão, foram transferidos 5 mL para um balão de 50 mL e adicionaram-se mais 5 mL de solução de molibdato e 2 mL de ácido ascórbico 2%, completando-se o volume com água destilada. Passados cinco minutos, foram efetuadas as leituras em 725 nm. Um branco foi preparado, usando água destilada mais os reagentes para acertar o zero da escala, preparou-se



também, uma solução padrão de fósforo com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  equivalente a  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de fósforo. O cálculo do teor de fósforo foi determinado pela Equação XI:

$$\text{Fósforo (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{abs. amostra}}{\text{abs. padrão}} \times \text{diluição da amostra} \quad (\text{Equação XI})$$

Onde:

abs. amostra: absorvância da amostra;

abs. padrão: absorvância do padrão de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de fósforo.

### 9.3 - RELAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ENCONTRADOS EM TRABALHOS COM REATORES ANAERÓBIOS.

Relação dos microrganismos encontrados em trabalhos com reatores anaeróbios

<b>Microrganismo</b>	<b>Referência</b>
<i>Acetobacter cerevisiae</i>	TANG et al., 2005
<i>Acetovibrio cellulolyticus</i>	KLOCKE et al., 2007
<i>Achromobacter insolitus</i>	TANG et al., 2005
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	TANG et al., 2005
<i>Acidovorax</i> sp	KAPLEY et al., 2007; IVNITSKY et al., 2007
<i>Acidovorax anthurii</i>	TANG et al., 2005
<i>Acinetobacter junii</i>	LIU, ZHANG e FANG, 2005
Actinobacteria	KLOCKE et al., 2007; MIURA et al., 2007; ENRIGHT et al., 2007; ROEST et al., 2005
<i>Aeromonas</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Aeromonas salmonicida</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Agrobacterium</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TANG et al., 2005
<i>Alcaligenes</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Alcaligenes defragrans</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Alistipes putredinis</i>	TANG et al., 2005
<i>Alphaproteobacteria</i>	MIURA et al., 2007
<i>Aminobacterium colombiense</i>	TANG et al., 2005
<i>Aminobacterium mobile</i>	TANG et al., 2005
<i>Aminomonas paucivorans</i>	TANG et al., 2005
<i>Anaerocellum thermophilum</i>	TANG et al., 2005
<i>Aquaspirillum metamorphum</i>	FUJII et al., 2002
<i>Aquifex pyrophilus</i>	TANG et al., 2005
<i>Arcobacter butzlerii</i>	TANG et al., 2005
<i>Arcobacter cibarius</i>	TANG et al., 2005
<i>Arcobacter skirrowi</i>	TANG et al., 2005
<i>Arthrobacter globiformis</i>	CHAUHAN et al., 2005; TANG et al., 2005
<i>Atopobium parvulum</i>	KLOCKE et al., 2007
<i>Azoarcus</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Bacillus</i> sp	IVNITSKY et al., 2007; KAPLEY et al., 2007
<i>Bacteriodes fragilis</i>	TANG et al., 2005
<i>Bacteroides acidifaciens</i>	TANG et al., 2005
<i>Bacteroides eggerthii</i>	TANG et al., 2005
Bacteroidetes	IVNITSKY et al., 2007; KLOCKE et al., 2007; MIURA et al., 2007; ENRIGHT et al., 2007; SHIGEMATSU et al., 2006
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	TANG et al., 2005

<i>Betaproteobacteria</i>	MIURA et al., 2007
<i>Bilophila wadsworthia</i>	TANG et al., 2005
<i>Bordetella</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Brachyspira aalborgi</i>	TANG et al., 2005
<i>Brevibacillus</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Brevundimonas diminuta</i>	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Brevundimonas</i> sp	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Brucella</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Burkholderia</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Cellulomonas gelida</i>	ROEST et al., 2005
<i>Chlamydophila psittaci</i>	TANG et al., 2005
<i>Chloroflexi</i> sp	MIURA et al., 2007; ROEST et al., 2005
<i>Citrobacter</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Clostridium acetireducens</i>	TANG et al., 2005
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Clostridium butyricum</i>	TANG et al., 2005
<i>Clostridium indolis</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Clostridium quinii</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Clostridium sardiniensis</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Clostridium</i> sp	TANG et al., 2005; LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Clostridium stercorarium</i>	TANG et al., 2005
<i>Clostridium thermocellum</i>	TANG et al., 2005
<i>Clostridium thermocopriae</i>	TANG et al., 2005
<i>Clostridium ultunense</i>	TANG et al., 2005
<i>Clostridium uzonii</i>	TANG et al., 2005
<i>Cnadidatus Brocadia anammoxidans</i>	FUJII et al., 2002
Comamonadaceae	KAPLEY et al., 2007
<i>Comamonas aquatica</i>	TANG et al., 2005
<i>Comamonas koreensis</i>	TANG et al., 2005
<i>Comamonas</i> sp	LIU, ZHANG e FANG, 2005; KAPLEY et al., 2007
<i>Comamonas testosteroni</i>	TANG et al., 2005
Crenarchaeota	ROEST et al., 2005
<i>Crenarchaeota-like</i>	ENRIGHT et al., 2007
<i>Cryomorphaceae bacterium</i>	TANG et al., 2005
<i>Cystobacter</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Cytophaga</i> sp	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Dechloromonas</i> sp	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Delftia</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Deltaproteobacteria</i>	MIURA et al., 2007
<i>Desulfitobacterium</i> sp	ROEST et al., 2005
<i>Desulfobacterium macestii</i>	TANG et al., 2005
<i>Desulfobalobium retbaense</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	TANG et al., 2005
<i>Desulfotomaculum</i> sp	TANG et al., 2005
<i>Desulfovibrio alcoholovorans</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Desulfovibrio aminophilus</i>	TANG et al., 2005
<i>Desulfovibrio bastini</i>	TANG et al., 2005
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	TANG et al., 2005
<i>Desulfovibrio</i> sp	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Desulfuromonas thiophila</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Diaphorobacter</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Dyella</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Enterobacter</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Erysipelothrix</i> sp	KAPLEY et al., 2007

<i>Escherichia</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Euryarchaeota</i>	SHIGEMATSU et al., 2006
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	TANG et al., 2005
Firmicutes	KLOCKE et al., 2007; MIURA et al., 2007; ENRIGHT et al., 2007; SHIGEMATSU et al., 2006; ROEST et al., 2005
<i>Flavobacterium</i> sp	KAPLEY et al., 2007; ROEST et al., 2005; IVNITSKY et al., 2007; LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	TANG et al., 2005
<i>Flexibacter</i> sp	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Flexistipes sinusarabici</i>	TANG et al., 2005
Gammaproteobacteria	MIURA et al., 2007
<i>Gemmata</i> sp	YANG, Q. et al., 2007
<i>Geobacter metallireducens</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Gluconacetobacter</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Halobacterium halobium</i>	CHAUHAN et al., 2005
<i>Hydrogenophaga</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> ,	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Hyphomicrobium</i> sp	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Isosphaera</i> sp	YANG, Q. et al., 2007
<i>Klebsiella</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Legionella-like</i>	IVNITSKY et al., 2007
<i>Mesorhizobium</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Mesorhizobium</i> sp	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Methanobacterium bryantii</i>	AKARSUBASI et al., 2006; TANG et al., 2005
<i>Methanobacterium formicicum</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; YANG, Y. et al., 2007; AKARSUBASI et al., 2006; ROEST et al., 2005; KEYSER et al., 2006; KLOCKE et al., 2007; AKARSUBASI et al., 2005
<i>Methanobacterium palustre</i>	YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanobacterium</i> sp	YANG, Y. et al., 2007; ROEST et al., 2005; CASSERLY e ERIJMAN, 2003; LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Methanobacterium subterraneum</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; YANG et al., 2007a
<i>Methanobrevibacter</i> sp	CONNAUGHTON et al., 2006; YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanobrevibacter wolinii</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004
<i>Methanocalculus taiwanenese</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004
<i>Methanococcoides burtonii</i>	YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanococcus</i> sp	CASSERLY e ERIJMAN, 2003
<i>Methanococcus voltae</i>	CONNAUGHTON et al., 2006; YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanocorpusculum bavarium</i>	CONNAUGHTON et al., 2006
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	CONNAUGHTON et al., 2006
<i>Methanocorpusculum parvum</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; CONNAUGHTON et al., 2006
<i>Methanocorpusculum sinens</i>	CONNAUGHTON et al., 2006
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	TANG et al., 2005
<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	TANG et al., 2005
<i>Methanoculleus marisnigri</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; TANG et al., 2005
<i>Methanoculleus palmaeoli</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004
<i>Methanoculleus thermophilicus</i>	CONNAUGHTON et al., 2006; TANG et al., 2005
<i>Methanofollis tationis</i>	YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanogenium</i> sp	CASSERLY e ERIJMAN, 2003
<i>Methanolobus tindarius</i>	YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanomethylivorans hollandica</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanomicrobiales-like</i>	ENRIGHT et al., 2007
<i>Methanomicrobium mobile</i>	YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanomicrobium</i> sp	ENRIGHT et al., 2007; ROEST et al., 2005; LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Methanosaeta concilii</i>	KEYSER et al., 2006; LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004;




	CONNAUGHTON et al., 2006; KLOCKE et al., 2007; YANG, Y. et al., 2007; TANG et al., 2005; AKARSUBASI et al., 2005; ROEST et al., 2005; CHAUHAN et al., 2005
<i>Methanosaeta soehngenii</i>	AKARSUBASI et al., 2006
<i>Methanosaeta</i> sp	BATSTONE, KELLER e BLACKALL, 2004; LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; YANG, Y. et al., 2007; BUZZINI et al., 2006; ENRIGHT et al., 2007; SHIGEMATSU et al., 2006; CASSERLY e ERIJMAN, 2003; LIU, CHAN e FANG, 2005; CHAUHAN et al., 2005
<i>Methanosaeta thermoacetophila</i>	YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanosaeta thermophila</i>	KEYSER et al., 2006; TANG et al., 2005
<i>Methanosaeta-like</i>	ENRIGHT et al., 2007
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	KLOCKE et al., 2007; YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanosarcina barkeri</i>	KEYSER et al., 2006; KLOCKE et al., 2007; YANG, Y. et al., 2007
<i>Methanosarcina friskus</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004
<i>Methanosarcina mazeii</i>	KEYSER et al., 2006; KLOCKE et al., 2007; YANG, Y. et al., 2007; CHAUHAN et al., 2005
<i>Methanosarcina siciliae</i>	YANG et al., 2007a
<i>Methanosarcina</i> sp	BATSTONE, KELLER e BLACKALL, 2004; YANG, Y. et al., 2007; BUZZINI et al., 2006; ENRIGHT et al., 2007; CASSERLY e ERIJMAN, 2003
<i>Methanosarcina thermophila</i>	YANG et al., 2007a
<i>Methanosarcina vacuolata</i>	CONNAUGHTON et al., 2006
<i>Methanospirillum hungaeti</i>	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; YANG, Y. et al., 2007; TANG et al., 2005; CHAUHAN et al., 2005
<i>Methanospirillum</i> sp	LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; CONNAUGHTON et al., 2006; TANG et al., 2005; SHIGEMATSU et al., 2006; CHAUHAN et al., 2005
<i>Methanothrix soehngenii</i>	CHAUHAN et al., 2005
<i>Methylobacter whittenburyi</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Methylophilaceae</i>	KAPLEY et al., 2007
<i>Microbacterium</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Micrococcus</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Myxococcus</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Nitrobacter</i> sp	KELLY et al., 2005
<i>Nitrosomonas communis</i>	SIRIPONG e RITTMANN, 2007
<i>Nitrosomonas europaea/eutropha</i>	SIRIPONG e RITTMANN, 2007
<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	SIRIPONG e RITTMANN, 2007
<i>Nitrosomonas</i> sp	KELLY et al., 2005
<i>Nitrospira lineages</i>	SIRIPONG e RITTMANN, 2007
<i>Nitrospira marina</i>	TANG et al., 2005
<i>Nitrospira</i> sp	MIURA et al., 2007; KELLY et al., 2005; ENRIGHT et al., 2007
<i>Ochrobactrum</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Owenweeksia hongkongensis</i>	TANG et al., 2005
<i>Pantoea</i>	KAPLEY et al., 2007
<i>Paracoccus</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Paracoccus marcusii.</i>	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	KLOCKE et al., 2007
<i>Pelobacter carbinolicus</i>	KLOCKE et al., 2007
<i>Pelobacter venetianus</i>	KLOCKE et al., 2007
<i>Peptrostreptococcus genosp.</i>	TANG et al., 2005
<i>Peptrostreptococcus micros</i>	TANG et al., 2005
<i>Pirellula</i> sp	YANG, Q. et al., 2007
<i>Planctomyces</i>	KAPLEY et al., 2007; ROEST et al., 2005; YANG, Q. et al., 2007
<i>Porphiromonas</i> sp	TANG et al., 2005
<i>Propionibacterium lymphophilum</i>	ROEST et al., 2005
<i>Prostheobacter vanneervanii</i>	LIU, ZHANG e FANG, 2005

Proteobacteria	KLOCKE et al., 2007; ENRIGHT et al., 2007; SHIGEMATSU et al., 2006; ROEST et al., 2005
<i>Proteobacteria-like</i>	ENRIGHT et al., 2007
<i>Proteophilum aceticum</i>	KLOCKE et al., 2007
<i>Pseudomonas</i> sp	IVNITSKY et al., 2007; KAPLEY et al., 2007
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	KAPLEY et al., 2007
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	TANG et al., 2005
<i>Ralstonia</i> sp	IVNITSKY et al., 2007
<i>Rhodobacter</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Rhodocyclus purpureus</i>	TANG et al., 2005
<i>Rikella microfusus</i>	TANG et al., 2005
<i>Rikenella microfusus</i>	TANG et al., 2005; KLOCKE et al., 2007
<i>Roseomonas</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	FUJII et al., 2002
<i>Ruminococcus bromii</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Sedimentibacter saelensis</i>	TANG et al., 2005
<i>Sinorhizobium</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Sphingobacterium faecium</i>	TANG et al., 2005
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	TANG et al., 2005
<i>Sphingobacterium thalpophilum</i>	TANG et al., 2005
<i>Sphingomonas</i> sp	IVNITSKY et al., 2007; KAPLEY et al., 2007
<i>Sphingopyxis</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Spirochaeta africana</i>	TANG et al., 2005
<i>Spirochaeta africana</i>	TANG et al., 2005
<i>Spirochaeta aurantia</i>	TANG et al., 2005
<i>Spirochaetes</i> sp	KLOCKE et al., 2007; SHIGEMATSU et al., 2006
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	TANG et al., 2005
<i>Sporobacter termitidis</i>	KLOCKE et al., 2007
<i>Staphylococcus</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Stenotrophomonas africana</i>	TANG et al., 2005
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	YANG et al., 2007a
<i>Sulfolobus</i> sp	CONNAUGHTON et al., 2006
<i>Sulfurospirillum barnesii</i>	TANG et al., 2005
<i>Synergistes jonesii</i>	TANG et al., 2005
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	CHAUHAN et al., 2005
<i>Syntrophobacter pfennigii</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Syntrophobacter pfennigii</i>	CHAUHAN et al., 2005
<i>Syntrophobacter</i> sp	CHAUHAN et al., 2005
<i>Syntrophomonas flectens</i>	CHAUHAN et al., 2005
<i>Syntrophomonas</i> sp	CHAUHAN et al., 2005
<i>Syntrophomonas wolfei</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Syntrophus buswellii</i>	LIU, CHAN e FANG, 2005
<i>Thauera</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Thermoanaerobacter cellulolyticus</i>	TANG et al., 2005
<i>Thermotogales</i> sp	ENRIGHT et al., 2007
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	FUJII et al., 2002
<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	TANG et al., 2005
<i>Wolinella succinogenes</i>	TANG et al., 2005
<i>Xanthobacter</i> sp	KAPLEY et al., 2007
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	LIU, ZHANG e FANG, 2005
<i>Zoogloea ramigera</i>	FUJII et al., 2002

## ANEXO 4 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rDNA DE ARCHAEAS METANOGENICAS.

"Primer" 28F TGGTTGATCCTGCCAGAGG	
Methanosarcina barkeri	ATTC TGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGTGTTGCGCTAAGCCATGCGAGTCA 60
Methanosarcina mazei	ATTCTGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGTGTTGCGTCTAAGCCATGCGAGTTA 60
Methanosarcina acetivorans	-TTCTGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGTGTTGCGCTAAGCCATGCGAGTCA 59
Methanococoides burtonii	ACTCTGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGTGTTGCGACTAAGCCATGCGAGTCA 60
Methanosaeta thermophila	--ACTGGTTGATCCTGCCAGAGGTTACTGCTATCGGGGTCCGACTAAGCCATGCGAGTTG 58
Methanocorpusculum labreanum	--TCTGGTTGATCCTGCCAGAGGCCATTGCTATCAGGGTTTGACTAAGCCATGCGAGTCG 58
Methanoculleus marisnigri	--TCTGGTTGATCCTGCCAGAGGTCAGTCTGCTATCGGGGTTCGATTAAGCCATGCGAGTCG 58
Methanospirillum hungatei	ATTC TGGTTGATCCTGCCAGAGGCCACTGCTATCGGGGTTTGACTAAGCCATGCGAGTCG 60
Methanobrevibacter smithii	-TTCTGTTGATCCTGCCAGAGTCTACTGCTATTGGGATTCGATTAAGCCATGCAAGTCG 59
"Primer" 1492R AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT	
Methanosarcina barkeri	AGGGGGGTTA-----
Methanosarcina mazei	AGGGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1478
Methanosarcina acetivorans	AGGGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1474
Methanococoides burtonii	AGGGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1476
Methanosaeta thermophila	AGGGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1473
Methanocorpusculum labreanum	AGGAGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1465
Methanoculleus marisnigri	AGGGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1465
Methanospirillum hungatei	AGGGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAATCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1466
Methanobrevibacter smithii	AGGAGGGCGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1475

Anexo 4 - Alinhamento da sequência do gene 16S rDNA de archaeas metanogênicas.

Legenda:  28F(5'TGGTTGATCCTGCCAGAGG 3');  
 1492R 5'ACGGCTACCTTGTACGACTT 3');  
 Mismatch