

nº 575- REPI DISCA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

**“DEGRADAÇÃO MICROBIANA ANAERÓBIA DE PROTEÍNAS  
(GELATINA) PELA ATIVIDADE DE UM LODO GRANULADO ORIUNDO  
DE UM REATOR ANAERÓBIO DE FLUXO ASCENDENTE E MANTA DE  
LODO ALIMENTADO COM ESGOTO SINTÉTICO ”**

MARIA APARECIDA SCHIAVUZZO

DEDALUS - Acervo - EESC



31100008010

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

ORIENTADOR: Prof. Dr . Eugenio Foresti



SÃO CARLOS  
1997

Class.	T 656 - 665C
Curr.	5250
Tombo	T 0062/98

311 0000 8010

S/S 944420

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

S329d

Schiavuzzo, Maria Aparecida

Degradação microbiana anaeróbia de proteínas (gelatina) pela atividade de um lodo granulado oriundo de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo alimentado com esgoto sintético / Maria Aparecida Schiavuzzo. -- São Carlos, 1997.

Tese (Doutorado). -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1997.

Área: Hidráulica e Saneamento.

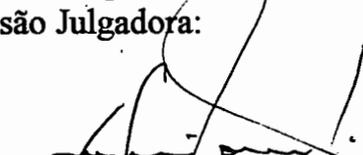
Orientadora: Prof. Dr. Eugenio Foresti.

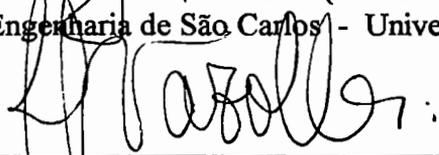
1. Proteína - degradação. 2. Cinética.  
I. Título.

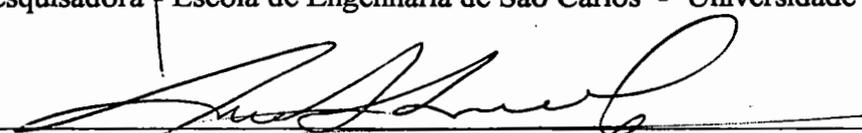
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

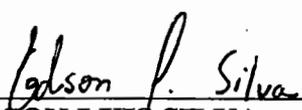
Candidata: Bacharela MARIA APARECIDA SCHIAVUZZO

Tese defendida e aprovada em 10-12-1997  
pela Comissão Julgadora:

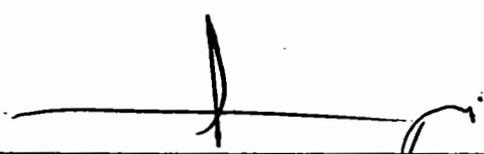
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Titular **EUGENIO FORESTI (Orientador)**  
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)

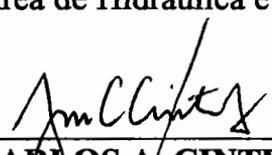
  
\_\_\_\_\_  
Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER**  
(Pesquisadora - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Titular **ARISTIDES ALMEIDA ROCHA**  
(Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Doutor **EDSON LUIS SILVA**  
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Doutor **CARLOS EDUARDO BLUNDI**  
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Titular **FAZAL HUSSAIN CHAUDHRY**  
Coordenador da Área de Hidráulica e Saneamento

  
\_\_\_\_\_  
**JOSE CARLOS A. CINTRA**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

À

*José Aureliano Basso Bernardi*

*...a quem sem saber me levou ao mundo dos anaeróbios*

*dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Eugenio Foresti pela orientação e apoio durante o curso.

À Profa. Dra. Rosana F. Vazoller meu agradecimento especial pela orientação e sugestões durante o trabalho.

Aos professores do Departamento de Hidráulica e Saneamento pelos conhecimentos transmitidos em especial ao Professor Dr. Fazal Hussain Chaudry pelo apoio e motivação.

Aos técnicos do Laboratório de Saneamento da EESC, Julio Cesar, José Miguel, Maria Aparecida e Paulo.

À equipe do Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto especialmente ao Dr. Joel Lewis Greene por permitir a realização das análises em seu laboratório, pela amizade e sugestões; à Dra. Clarisse Izumi pelas análises de proteína; ao Sr. João Gilberto Padovan pelas análises com aminoácidos; às secretárias Silvia e Maria Helena e às pesquisadoras Regina, Helen e Marilisa.

À Dra. Jocelen Machado e à técnica Célia do Departamento de Nutrição Humana e Alimentos da ESALQ-USP pelas análises de nitrogênio.

À Prof. Dra. Elizabeth Moraes pelas análises de ácidos graxos e pela amizade.

Aos colegas Marcelo Zaiat e Deize Diaz Lopes pela colaboração nos ensaios de cinética e pela amizade.

À Dra. Eloisa Pozzi Gianotti pela amizade e colaboração durante as análises no Laboratório de Processos Anaeróbios.

À Mirleia, Maria Cristina e Mirla com quem tive o prazer da convivência.

À Neide Gava pelo especial apoio e Ninosca Alcócer, uma grande amiga.

À minha família pela paciência e apoio durante a realização deste trabalho em especial à Isabel Cristina, José Edvaldo e Casimiro.

Aos colegas e amigos e a todos que participaram direta ou indiretamente neste trabalho.

À CNPq pelo suporte financeiro durante o curso de doutorado.

# SUMÁRIO

	pg
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2- OBJETIVOS.....	02
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3.1. Aspectos biológicos da degradação anaeróbia microbiana.....	05
3.2. Degradação microbiana anaeróbia de proteínas.....	11
3.2.1. Definições genéricas sobre proteínas.....	11
3.2.2. Degradação microbiana anaeróbia de proteínas e bactérias proteolíticas.....	16
3.2.3. Enzimas proteolíticas.....	22
3.2.4. Estudos da degradação anaeróbia microbiana de proteínas em biodigestores.....	26
3.2.5. Degradação anaeróbia de aminoácidos.....	33
3.2.5.1. Degradação de aminoácidos aromáticos.....	44
3.2.5.2. Energética da degradação de aminoácidos.....	44
3.3. Métodos para determinação de proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, amônia e fosfato .....	56
3.3.1. Métodos para determinação de proteínas.....	56
3.3.2. Métodos para determinação de aminoácidos.....	59
3.3.3. Métodos para determinação de amônia e fosfato.....	59

3.3.3.1. Métodos para determinação de amônia.....	61
3.3.3.2. Métodos para determinação de fosfato.....	62
3.3.4. Métodos para determinação de ácidos graxos voláteis.....	63
4. Estudos cinéticos do tratamento anaeróbio.....	65
5. Materiais e métodos.....	72
5.1. Materiais.....	72
5.1.1. Equipamentos.....	72
5.1.2. Vidraria e outros materiais.....	73
5.2. Procedimentos experimentais.....	73
5.2.1. Ensaio 1.....	74
5.2.1.1. Testes para produção de gás metano.....	74
5.2.1.1.1. Primeiro teste para peptona.....	74
5.2.1.1.2. Enriquecimento das culturas em meio com peptona.....	76
5.2.1.1.3. Primeiro teste com gelatina.....	77
5.2.1.2. Testes para degradação de proteína e produção de metano.....	78
5.2.1.2.1. Segundo teste para peptona.....	79
5.2.1.2.2. Segundo teste para gelatina.....	80
5.2.1.2.3. Determinação de proteínas pelo método do biureto.....	80
5.2.1.2.4. Determinação de proteínas pelo método de Lowry.....	81
5.2.1.2.5. Terceiro teste para gelatina.....	82
5.2.1.2.6. Quarto teste para gelatina.....	82
5.2.2. Ensaio 2.....	84
5.2.1.2. Aminoacidograma da gelatina.....	84
5.2.1.3. Aminoacidograma das amostras.....	86
5.2.1.4. Determinação de proteínas pela análise de aminoácidos.....	87

64

5.2.1.5. Determinação de proteínas pelo método de Lowry.....	87
5.2.1.6. Determinação de proteínas pelo método do Micro-Kjeldahl.....	88
5.2.3. Ensaio 3.....	89
5.2.3.1. Determinação de proteína nas amostras.....	90
5.2.3.2. Determinação de ácidos graxos voláteis.....	90
5.2.3.3. Determinação de amônia.....	91
5.2.3.4. Determinação de fosfato.....	92
5.3. Microscopia das amostras .....	93
5.3.1. Método do “roll-tube para bactérias proteolíticas.....	94
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
6.1. Resultados do ensaio 1.....	97
6.1.1. Resultados do primeiro teste com peptona.....	97
6.1.1.1. Resultados da primeira alimentação dos frascos com peptona.....	98
6.1.1.2. Resultados da segunda alimentação dos frascos com peptona.....	99
6.1.2. Resultados do primeiro teste com gelatina.....	101
6.1.2.1. Resultados do teste para degradação de proteína e produção de gás.....	102
6.1.2.1.1. Resultados para degradação de proteína e produção de metano para peptona.....	102
6.1.2.1.2. Resultados para degradação de proteína e produção de metano para gelatina.....	104
6.1.2.2. Resultados do terceiro teste para gelatina.....	107
6.1.2.3. Resultados do quarto teste para gelatina.....	109
6.2. Resultados do ensaio 2.....	111
6.2.1. Determinação de proteína nas amostras (Lowry).....	112
6.2.2. Aminoacidograma da gelatina.....	113

6.2.3. Aminoacidoograma das amostras.....	115
6.2.4. Determinação da proteína pelo método do micro-Kjeldahl.....	128
6.3. Resultados do ensaio 3.....	130
6.3.1. Resultados para degradação de proteína.....	130
6.3.2. Resultados da análise de ácidos graxos.....	132
6.3.3. Resultados da determinação de amônia.....	136
6.3.4. Resultados da determinação de fosfato.....	139
6.4. Microscopia do lodo anaeróbio.....	140
7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	145
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
9. ANEXOS.....	161

## LISTA DE FIGURAS

	..pág
FIGURA 1. Os três estágios da fermentação de metano.....	8
FIGURA 2. Esquema da degradação geral de polímeros orgânicos e alguns grupos bacterianos envolvidos.....	10
FIGURA 3. Os 20 aminoácidos padrão das proteínas em suas formas totalmente ionizadas .....	14
FIGURA 4. Esquema da utilização de proteínas por bactérias do rúmen mostrando: (a) solubilização; (b) proteólise; (c) atividade de peptidase extracelular; (f) atividade de protease intracelular; (g) fermentação de aminoácidos (h) síntese de proteína microbiana e (i) difusão passiva de amônia e ácidos voláteis para o interior da célula.....	17
FIGURA 5. Esquema ilustrando a reação de Stickland em extratos com células livres.....	34
FIGURA 6. Metabolismo de Arginina em Clostrídio.....	38
FIGURA 7. Esquema da degradação da Glicina.....	40
FIGURA 8. Via hipotética para fermentação de glutamato por <i>Selenomonas acidaminophila</i> cepa Dk gluI6.....	41
FIGURA 9. Reação de Stickland entre alanina e ácido ceto-pirúvico.....	43
FIGURA 10 Vias envolvidas na fermentação do glutamato por <i>Acidaminobacter hydrogenoformans</i> .....	52

	..pág
FIGURA 11 Esquema resumindo os testes realizados no ensaio 1.....	83
FIGURA 12 Produção de metano nos frascos com e sem peptona.....	98
FIGURA 13 Produção de metano após a primeira realimentação.....	99
FIGURA 14 Produção de metano após a segunda realimentação.....	100
FIGURA 15. Produção de metano em frascos com gelatina (teste 1).....	111
FIGURA 16a e 16 b Produção de metano e degradação de proteínas (teste 2 -peptona).....	103
FIGURA 17a e 17b .Produção de metano e degradação de proteína (teste 2- gelatina).....	105
FIGURA 18. Degradação de gelatina pelo método do micro-biureto.....	107
FIGURA 19. Produção de metano e degradação de proteína para o teste 3 para gelatina.....	108
FIGURA 20 . Produção de metano e degradação de proteína para o 4° teste para gelatina.....	109
FIGURA 21. Concentração de proteína nas amostras determinadas pelo método de Lowry.....	113
FIGURA 22. Decréscimo no teor de aminoácidos durante o período de incubação de amostras sem hidrólise (zero à 36 h).....	117

FIGURA 23. Decréscimo no teor de aminoácidos em três diferentes períodos.....	118
FIGURA 24. Porcentagem de aminoácidos totais e proteína em relação ao tempo zero.....	124
FIGURA 25. Porcentagem de aminoácidos totais e proteína em relação ao tempo zero.(micro Kjeldahl).....	129
FIGURA 26. Degradação da proteína em 2,5 g/L de gelatina.....	130
FIGURA 27. Degradação da proteína em 5 g/L de gelatina.....	130
FIGURA 28. Degradação da proteína em 10 g/L de gelatina .....	131
FIGURA 29. Degradação da proteína em 15 g/L de gelatina.....	131
FIGURA 30. Ácidos graxos detectados nos frascos contendo 2,5g/L de gelatina..	134
FIGURA 31. Ácidos graxos detectados nos frascos contendo 5 g/L de gelatina.....	134
FIGURA 32. Ácidos graxos detectados nos frascos contendo 10 g/L de gelatina.....	135
FIGURA 33. Ácidos graxos detectados nos frascos contendo 15 g/L de gelatina.....	135
FIGURA 34. Teor de amônia nos frascos contendo diferentes concentrações de gelatina. ....	137

FIGURA 35. Presença de fosfato nas amostras com diferentes concentrações de gelatina.....	140
FIGURA 36. Fotografia de amostras do lodo contendo gelatina em meio de cultura. ....	141
FIGURA 37. Fotografias de colônias de bactérias proteolíticas, com morfologia ramificada crescidas em “roll-tube”.....	141
FIGURA 38. Fotografias em microscópio eletrônico de varredura de meio de bactérias em cultura contendo gelatina. ....	143
FIGURA 39. Fotografias em microscópio eletrônico de varredura mostrando detalhes de bactérias presentes no meio de cultura contendo gelatina.....	144

## LISTA DE TABELAS

	..pág
TABELA 1 Bactérias proteolíticas e o local em que foram isoladas.....	21
TABELA 2 Especificidade de algumas endopeptidases.....	23
TABELA 3 Classificação de proteases de acordo com seus inibidores.....	24
TABELA 4 Produtos da oxidação de aminoácidos das espécies de clostrídios.....	45
TABELA 5 Bactérias anaeróbias degradadoras de aminoácidos e seus principais produtos de fermentação.....	37
TABELA 6 Mudanças de energia livre( $\Delta G^{\circ}$ )para os diferentes mecanismos de degradação de aminoácidos estudados.....	49
TABELA 7 Energética da produção de $H_2$ a partir de aminoácidos.....	51
TABELA 8 Modelos cinéticos usados no tratamento anaeróbio.....	67
TABELA 9 Cálculo dos potenciais metanogênicos para a 1ª alimentação e produção de metano.....	99
TABELA 10 Cálculo dos potenciais metanogênicos para a 2ª alimentação e produção de metano.....	100
TABELA 11 Cálculo dos potenciais metanogênicos para a 1º teste com gelatina.	102

TABELA 12 Cálculo dos potenciais metanogênicos no segundo teste com peptona.....	103
TABELA 13 Cálculo das velocidades de degradação de proteína no segundo teste com peptona.....	104
TABELA 14 Cálculo das velocidades de degradação de proteína no segundo teste com gelatina.....	105
TABELA 15 - Cálculo dos potenciais metanogênicos no segundo teste com gelatina.....	106
TABELA 16- Potenciais metanogênicos e produção de metano para o 3º teste com gelatina.....	108
TABELA 17. Cálculo das velocidades de degradação de proteína no terceiro teste com gelatina.....	109
TABELA 18 Cálculo das velocidades de degradação de proteína no quarto teste com gelatina.....	110
TABELA 19 Cálculo dos potenciais metanogênicos para o 4º teste com gelatina.....	110
TABELA 20 Composição de aminoácidos da gelatina e comparação com dados da literatura .....	114
TABELA 21. Aminoacidograma da gelatina.....	115
TABELA 22 .Aminoacidograma das amostras de proteína sem hidrólise.....	116

TABELA 23. Teor de aminoácidos livres nas amostras sem hidrólise.....	116
TABELA 24 Aminograma das amostras hidrolisadas.....	119
TABELA 25 Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T0.....	121
TABELA 26 Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T6.....	122
TABELA 27 Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T12.....	123
TABELA 28 Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T18.....	124
TABELA 29 Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T24.....	125
TABELA 30 Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T36.....	126
TABELA 31 Porcentagem de aminoácidos livres nos diferentes períodos de incubação.....	127
TABELA 32 Porcentagem de proteína livre nos diferentes períodos de incubação.....	127
TABELA 33 Valores das velocidades de degradação de gelatina em quatro diferentes concentrações.....	132
TABELA 34 Concentração de ácidos graxos para as diferentes concentrações de gelatina	133
TABELA 35 Concentrações de amônia nas amostras com diferentes concentrações de gelatina.....	138

## LISTA DE SÍMBOLOS

Aa	Aminoácidos
AABgg	Padrão interno do Centro de Química de Proteínas para cromatografia
Ác. Asp.	Ácido aspártico
Ác. Glut.	Ácido glutâmico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ADP	Adenosina di-fosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
BES	Ácido bromoetanosulfônico
BFA	Bactérias metanogênicas acetotróficas
BAPH	Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio
BHP	Bactérias produtoras de hidrogênio
BMH	Bactérias metanogênicas hidrogenotróficas
BRN	Bactérias redutoras de nitrato
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
BSA	Soro albumina bovina
Cis	Cisteína
CoA	Coenzima A
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CH <sub>4</sub>	Metano
DO	Densidade óptica

DPN	Nucleotídeo Difosfato
DPNH <sub>2</sub>	Nucleotídeo Difosfato reduzido
DQO	Demanda química de oxigênio
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino-tetracético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FID	Detector de ionização de chama
GL	Gas liquid chromatography
Gly	Glicina
GSC	Gas solid chromatography
HMDS	Hexametildisilano
His	Histidina
HPLC	High performance liquid Chromatography
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis/Lys	Lisina
MB	Bactérias metanogênicas
Met	Metionina
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	Nicotinamida adenina difosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoeletrico

Phe	Fenilalanina
Pi	Fosfato inorgânico
Pro	Prolina
THFA	Ácido tetra hidrofólico
TLC	Tin layer Chromatography
Tyr	Tirosina
Trp	Triptofano
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket
Val	Valina
$\Delta G^\circ$	Variação de energia livre padrão

## RESUMO

Pesquisou-se o comportamento de um lodo anaeróbio granulado proveniente de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo quando inoculado em meio contendo sais minerais e proteína (peptona e gelatina).

Nos experimentos realizados observou-se que a degradação de proteínas foi lenta nos meios em que as populações bacterianas não estavam adaptadas aos substratos proteicos estudados. Após vários sub-cultivos, a degradação foi mais rápida. A produção de metano foi avaliada e a cinética da degradação de proteínas e produção de metano foi estudada.

Caracterizou-se a gelatina usada nos experimentos em termos de seus aminoácidos constituintes. Os aminoácidos resultantes da degradação da gelatina foram analisados através de cromatografia em intervalos de 6 horas em testes realizados num período de zero à 36 horas.

Ácidos graxos foram detectados 18 horas após a incubação em meios com quatro diferentes concentrações de gelatina (2,5, 5,0, 10 e 15 g/L). O ácido acético foi o que apareceu em maior quantidade, seguido dos ácidos propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico. Para 2,5 g/L de gelatina foram produzidos 1.278 mg/L de ácido acético após 192 horas de incubação e para as concentrações de 10 e 15 g/L de gelatina, essa quantidade dobrou. Estudos cinéticos mostraram que a concentração inicial não interfere na velocidade de degradação. A velocidade de degradação de proteína foi menor para o teste com 10g/L de gelatina.

As determinações de amônia mostraram que sua presença foi maior nos frascos contendo 5 g/L de gelatina e o teor maior detectado foi 3,4 g/L. Para as concentrações de 2,2, 10 e 15 g/L de gelatina o teor de amônia diminuiu após 192 horas. Para 15 g/L de gelatina os valores oscilaram e ocorreu um pequeno aumento no final do experimento. As análises de fosfato mostraram que não houve alterações nas suas concentrações para todos os testes realizados

Palavras-chave: proteína - degradação: cinética

## ABSTRACT

A research was conducted with an granulated anaerobic sludge from a UASB reactor which was inoculated in a medium with mineral salts and protein (peptone and gelatin).

The experiments showed that the degradation of gelatin and peptone were slow in media where the bacterial populations was not adapted to the protein substrate studied. When the sludge was subcultivated several times, the protein degradation was faster. The methane production was evaluated and the kinetic of protein degradation was studied.

The gelatin protein was characterized by their amino acids constituents. The amino acid produced by the protein degradation were evaluating by chromatographic analysis after 36 h of incubation.

Fatty acids were detected 18 hours after incubation on four gelatin concentrations (2.5, 5.0, 10 and 15 g/L and acetic acid was the principal product, followed by butyric, isobutyric, valeric and isovaleric acids. In a medium with 2.5 g/L of gelatin, 12278 mg/L of acetic acid were produced after 192 h of incubation and to the media with 10 and 15 g/L of gelatin, this value was duplicated. Kinetic studies showed that the initial concentration of protein does not interfere with the degradation rates. A small decrease of degradation was observed at 10 g/L of gelatin

Phosphate and ammonium were determined on media with four different concentrations of gelatin. The more high concentrations of ammonia was present on a 5g/L of gelatin medium. For 2.5, 5.0 and 10 g/L of gelatin, the ammonium concentration decreased after 192 h of incubation. There was a little increase of ammonium on this time with 15g/L of gelatin. The phosphate analysis showed not be important to the tests.

Keywords: Protein - degradation; cinética

## 1. INTRODUÇÃO

A falta de saneamento básico no Brasil, tem sido apontada como uma das principais causas de transmissão de doenças infecciosas. Esse fato, associado à nutrição inadequada e ao baixo poder aquisitivo da população, levou a índices alarmantes de mortalidade infantil, tanto nas pequenas cidades como nas grandes. A busca de alternativas para o tratamento de despejos induziu a procura de sistemas de tratamento adequados à realidade nacional, sob custos razoáveis.

O tratamento de resíduos e águas residuárias através de processos anaeróbios tem-se tornado um método comum para a estabilização da matéria orgânica, principalmente a partir da década de 70, em que diversos tipos de biorreatores anaeróbios tem sido desenvolvidos.

O Brasil, em meados de 1994, apresentava um número de 115 reatores anaeróbios, ocupando o 1º lugar na América Latina, onde um total de 306 reatores estavam operando. Desses, 43% correspondiam a reatores que tratavam efluentes industriais, e o restante, usados para o tratamento de esgotos sanitários (BORZACCONI et al,1995).

A digestão anaeróbia tem sido aplicada para resíduos de diversos setores agro-industriais, incluindo indústrias de açúcar, amido, enlatados, laticínios, cervejarias, abatedouros e esgotos domésticos. Os resíduos complexos que consistem de biopolímeros como lipídeos, carboidratos e proteínas, são transformados ultimamente para substâncias na maioria voláteis.

O lodo biológico metanogênico, que atua na digestão anaeróbia em reatores como o de fluxo ascendente, filtro anaeróbio e de leito fluidificado, consiste de material densamente agregado contendo bactérias de diferentes tipos fisiológicos. Os compostos orgânicos são degradados por associações de bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas. Primeiramente, os materiais poliméricos são hidrolisados por enzimas extracelulares a

produtos solúveis de pequeno tamanho, o suficiente para permitir seu transporte através da membrana celular. Esses compostos solúveis, relativamente simples, são fermentados ou anaerobiamente oxidados para ácidos graxos de cadeia curta, álcoois, dióxido de carbono, hidrogênio gasoso e amônia. Os ácidos graxos (outros além do acetato), são convertidos para acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Posteriormente, ocorre a metanogênese à partir da redução do CO<sub>2</sub> por hidrogênio ou a partir da oxidação do acetato.

A natureza e a composição química dos materiais usados na digestão anaeróbia comandam os processos operativos de degradação e os grupos microbianos envolvidos na conversão anaeróbia desses substratos.

Segundo METCALF & EDDY (1979), cerca de 75% dos sólidos suspensos e 40% dos sólidos filtráveis presentes nas águas residuárias são de natureza orgânica, sendo que proteínas constituem de 40 a 60%, carboidratos, 25 a 50%, e óleos e graxas, 10%.

Águas residuárias domésticas podem conter vários tipos de proteínas e como exemplo, podem ser citadas as albuminas, as globulinas, as enzimas. As águas residuárias industriais, dependendo das atividades, podem conter outras proteínas, tais como, caseínas e lactoalbuminas, em despejos de laticínios; colágeno, elastina, soroalbumina, em despejos de abatedouros; proteínas enzimáticas, em despejos de indústrias têxteis e de papel. As proteínas são compostos orgânicos muito importantes presentes em águas residuárias, correspondendo a uma fração muito grande da matéria nitrogenada. Quando presentes em grandes quantidades, podem sofrer decomposição e gerar odores desagradáveis (BLUNDI, 1988).

Pesquisas realizadas com a degradação anaeróbia de águas residuárias contendo altos níveis de proteínas têm relatado efeitos adversos no desempenho dos reatores. Não está claro, contudo, se as proteínas em si ou seus produtos são os responsáveis pela resposta ineficiente do processo de tratamento. Alguns dos problemas incluem ocorrência de flotação do lodo granulado e formação de espuma resultando na perda do lodo.

Outro problema relacionado à degradação anaeróbia de proteínas diz respeito aos elevados níveis de amônia liberados no processo. Alguns autores acreditam que a amônia inibe o desenvolvimento e/ou crescimento do lodo anaeróbio, mas há discrepâncias quanto ao real valor em que a amônia é tóxica para o processo.

A degradação anaeróbia de proteínas é um processo complexo envolvendo tipos diferentes de microrganismos. Em geral, as proteínas são hidrolizadas a peptídeos e aminoácidos, os quais são posteriormente fermentados para ácidos graxos voláteis, hidrogênio e dióxido de carbono, antes de serem convertidos a metano.

Algumas áreas de estudo sobre a degradação anaeróbia de proteínas que necessitam de mais pesquisas foram identificadas por PAVLOSTATHIS e GIRALDO-GOMEZ (1991) e incluem: (1) transferência de elétrons entre as espécies bacterianas; (2) conhecimento da concentração de organismos viáveis para acurada expressão da cinética do tratamento; (3) transferência de massa em sistemas anaeróbios.

Pesquisas realizadas com degradação anaeróbia de proteínas no Brasil são escassas. Este trabalho junto com vários outros realizados no Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento, faz parte de um projeto temático da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) cujo tema é: "Desenvolvimento de sistemas anaeróbios para tratamento de águas residuárias: concepção, operação, hidrodinâmica, microbiologia e materiais de construção alternativos". Neste trabalho estão abordados alguns aspectos da degradação anaeróbia de proteína (gelatina) em meio de cultura simulando o esgoto sintético em escala de laboratório e sob condições controladas procurando contribuir para um maior conhecimento das complexas reações bioquímicas e microbiológicas que ocorrem dentro de um sistema anaeróbio de tratamento de esgotos sanitários.

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos do presente trabalho são:

- a) Estudar o comportamento de um lodo anaeróbio granulado, em termos de velocidade de degradação e produção de metano, quando proteína é utilizada como substrato;
- b) Avaliar os aminoácidos e seus produtos de fermentação, resultantes da degradação anaeróbia da gelatina;
- c) Comparar as taxas de degradação e a influência dos seus produtos no lodo submetido a diferentes concentrações de gelatina.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA MICROBIANA

O objetivo fundamental do tratamento anaeróbio dos diferentes resíduos é diminuir o poder poluente dos resíduos em condições de ausência de oxigênio. O ideal seria transformar os poluentes em produtos voláteis sem prejudicar a atmosfera, mas com essas características não existe nenhum tratamento químico ou biológico que o faça (SOUBES, 1994).

Por muito tempo sistemas aeróbios foram empregados para o tratamento de águas residuárias, e sistemas de tratamentos anaeróbios, para o tratamento de resíduos com alto teor de sólidos (biomassa, lodos)

A digestão anaeróbia é um processo de engenharia biológica onde uma mistura complexa de substâncias é convertida numa variedade de compostos mais simples por microrganismos que se estabelecem e se mantêm na ausência de oxigênio. A fisiologia e a bioquímica desses microrganismos é que dão aos sistemas de digestão suas características especiais (HUGHES, 1980).

A existência desses organismos anaeróbios, de acordo com HUGHES (1980), data de  $3,5 \times 10^9$  anos e a microbiologia do processo anaeróbio tem, ambos, técnica e determinação da bioquímica envolvidas dependentes dos avanços feitos na investigação da microbiologia do rúmen que se desenvolveu a partir de 1940 (HOBSON et al., 1981). Além das bactérias que são as maiores responsáveis pela degradação dos compostos orgânicos podem estar incluídos também, no processo protozoários e fungos (NOVAES, 1986). HUNGATE (1982), descreveu que protozoários flagelados, normalmente associados ao trato digestivo de cupins, e alguns fungos no rúmen, produzem enzimas que são ativas na quebra de materiais lignocelulósicos e TOERIEN & HATTING (1969), também observaram a

presença de fungos, protozoários e leveduras em biodigestores de lodo de esgoto, afirmando contudo, que esses organismos não têm importância na degradação de compostos no sistema.

O sistema biológico anaeróbio vem sendo estudado a quase um século, desde que OMELIANSKI apud NOVAES (1986), descreveu a degradação da celulose com formação de metano como uma ação específica de bactérias. Várias técnicas e métodos têm sido desenvolvidos e adaptados por pesquisadores, tais como HUNGATE (1969), BRYANT (1972), MILLER & WOLLIN (1974), EDWARDS & McBRIDE (1975) para permitir o isolamento e estudo das bactérias anaeróbias. A grande dificuldade com a manipulação das culturas em laboratório era justamente devido ao metabolismo obrigatoriamente anaeróbio desses organismos (NOVAES, 1986).

Hoje, a digestão anaeróbia é reconhecida como consequência de uma série de interações metabólicas entre diversos grupos de populações microbianas tais como bactérias hidrolíticas e /ou acidogênicas, bactérias acetogênicas, e bactérias metanogênicas, em que as metanogênicas têm um papel vital como reguladoras do processo total. As bactérias metanogênicas são extremamente sensíveis a mudanças ambientais e têm como característica inerente uma taxa de crescimento lenta, e são frequentemente excedidas em número por bactérias hidrolíticas e acidogênicas, tornando o processo instável (NAGAI & NISHIO apud CHEREMISINOFF, 1989).

Esses fatos indicaram que a compreensão dos aspectos fundamentais dos microrganismos relacionados, é essencial para estabelecer e controlar uma fermentação estável, e para explicar a maioria das potencialidades concernentes a ele.

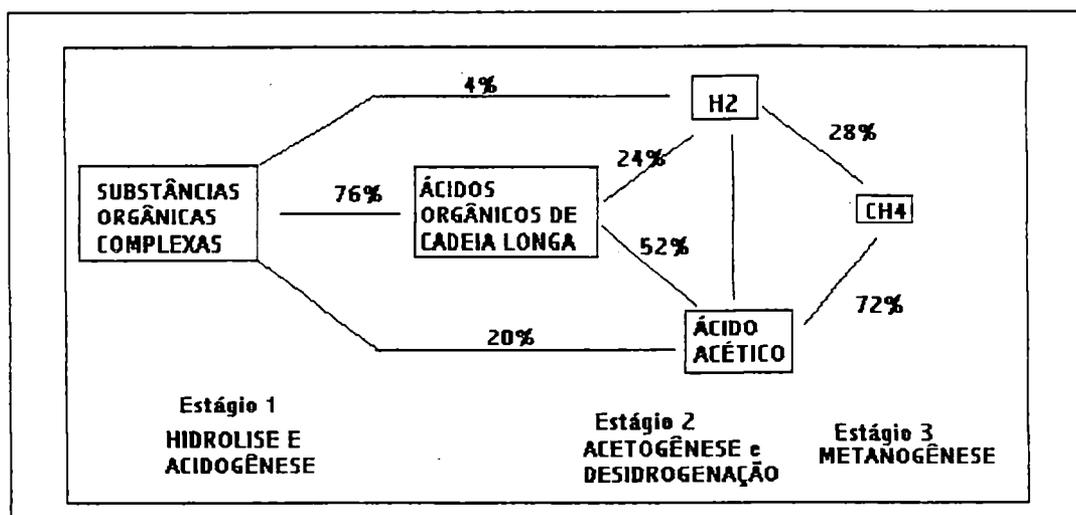
As atividades metabólicas coordenadas e combinadas entre populações microbianas anaeróbias são capazes de degradar compostos orgânicos a metano e dióxido de carbono. Os substratos intermediários necessários para certos microrganismos são fornecidos a partir de produtos finais produzidos por outros e, assim um consórcio microbiano estável deve existir num sistema de biodegradação anaeróbia .

Na década de 50, as fermentações a metano foram discutidas com base nos estágios de degradação de compostos orgânicos, isto é, estágios de formação de ácidos e de formação de metano, em que o estágio formador de ácido envolvia as bactérias acidogênicas que hidrolisam polímeros e convertem os compostos para ácidos orgânicos, álcoois, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>;

enquanto as bactérias metanogênicas catabolizavam esses compostos aos produtos finais  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ . Contudo, bactérias metanogênicas não são capazes de catabolizar outros álcoois além do metanol ou outros ácidos orgânicos além do acetato e formiato, o que significa que no mínimo três grupos de bactérias existem coordenadamente para decompor a matéria orgânica para metano e  $\text{CO}_2$ . O primeiro grupo hidrolisa materiais poliméricos a monômeros tais como glicose e aminoácidos e então estes são convertidos a ácidos graxos voláteis junto com  $\text{H}_2$  e ácido acético. No segundo estágio, bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio convertem os produtos, por exemplo, ácido propiônico a  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e acetato, e então, finalmente, o terceiro grupo, as bactérias metanogênicas, capazes de utilizar esses compostos converte-os a  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ . Os três principais estágios da degradação estão mostrados na Figura 1

De acordo com HARPER & POLAND apud FORESTI (1994), existem nove etapas reconhecidas no processo de digestão anaeróbia, cada qual mediada por um grupo específico de microrganismos, a saber: a) Hidrólise de polímeros orgânicos complexos a monômeros tais como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos; b) Conversão de monômeros orgânicos a hidrogênio, bicarbonato, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e outros produtos orgânicos, tais como etanol e ácido láctico; c) Oxidação de compostos orgânicos reduzidos a hidrogênio, bicarbonato e ácido acético pelas bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio (BAPH). d) respiração homoacetogênica do bicarbonato pelas bactérias homoacetogênicas; e) oxidação de compostos reduzidos a acetato pelas bactérias redutoras de nitrato (BRN) e pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS); f) oxidação de acetato a bicarbonato pelas BRN e BRS; g) oxidação de hidrogênio pelas BRN e BRS.; h) fermentação metanogênica acetoclástica; i) respiração metanogênica do hidrogênio.

Cada uma dessas etapas deve ser mantida em equilíbrio dinâmico a fim de que a metanogênese ocorra a taxa máxima. Tanto na natureza como nos biodigestores industriais, os substratos que devem ser degradados, são complexos e são compostos por diferentes polímeros. Os microrganismos devem metabolizá -los tanto para seu uso como fonte de energia como para biossíntese de seus componentes celulares. A velocidade de crescimento dos microrganismos depende não só da concentração dos substratos e produtos do meio em que crescem como da sua afinidade pelos substratos.



**Figura 1** - Os três estágios da fermentação de metano. As porcentagens representam o fluxo de elétrons dos compostos orgânicos a metano. Fonte :CHERMISINOFF apud Mc CARTY (1982)

Quando num sistema há muitos tipos diferentes de microrganismos, e competem pelo mesmo substrato, geralmente crescem a velocidades diferentes, e num sistema contínuo, por exemplo, alguns microrganismos podem desaparecer do meio por lavagem. Assim, é fundamental que num biodigestor que tenha um sistema biológico complexo, desenvolva-se uma população bacteriana estável de crescimento mais lento (SOUBES, 1994). A Figura 2 apresenta um esquema da degradação de polímeros orgânicos com seus produtos e bactérias envolvidas segundo STRONACH et al. (1986).

A divisão do processo de digestão anaeróbia em etapas é muito conveniente, porém, a realidade biológica é muito mais complexa. Os microrganismos produzem interações muito estreitas entre si. Por exemplo, o hidrogênio tem um papel fundamental no processo. Ele deve ser continuamente removido do meio para assegurar que a produção de ácido acético não seja interrompida ou diminua drasticamente. Isso é conseguido pela presença de metanogênicas no meio. Quando baixas pressões parciais de hidrogênio prevalecem, a formação de compostos orgânicos como acetato,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  é termodinamicamente favorecida, e se a pressão parcial de hidrogênio é mantida alta, ocorre a produção de propionato, lactato, etanol e alguns outros ácidos orgânicos (ZEHNDER apud NOVAES, 1986).

As entradas e saídas de hidrogênio nas diversas etapas da digestão anaeróbia, são reguladas por concentrações muito baixas de  $\text{H}_2$  no meio, capazes de reverter o sentido das

reações, promovendo a formação desse composto quando sua concentração se eleva. Ao retirarem o  $H_2$  do meio imediatamente após sua formação, as BMH (bactérias metanogênicas hidrogenotróficas) controlam o metabolismo das BFAs (bactérias acetotróficas) dirigindo-o à formação de ácido acético (FORESTI, 1994).

Com relação ao hidrogênio pode-se dividir a população de um biodigestor como tendo dois grupos bacterianos (SOUBES, 1994):

*-Produtoras de hidrogênio:* Bactérias hidrolíticas e fermentativas; bactérias acetogênicas redutoras de prótons (sintróficas) e bactérias redutoras de sulfato (sintróficas facultativas).

*-Consumidoras de hidrogênio:* Bactérias homoacetogênicas, bactérias metanogênicas e bactérias desnitrificantes.

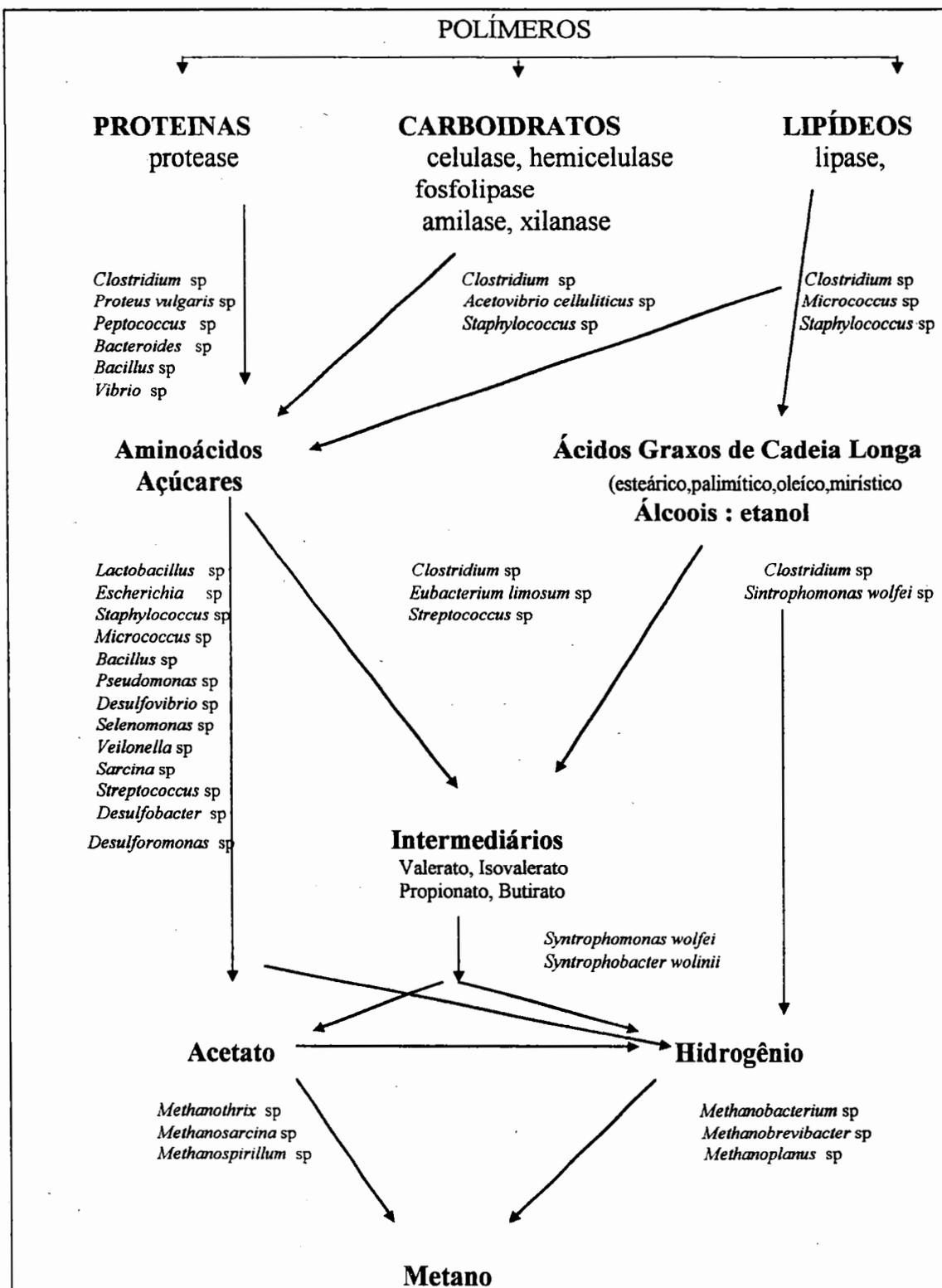


FIGURA 2. Esquema da degradação geral de polímeros orgânicos e alguns grupos bacterianos envolvidos. Fonte: STRONACH et al.,(1986).

Nos processos de fermentação a estratégia celular para conservar a energia da reação é a fosforilação a nível de substrato, enquanto na respiração a maior parte da energia é gerada pela fosforilação oxidativa, isto é, pela passagem dos elétrons através de uma cadeia respiratória. Em todas as células, o ATP é o composto que é mais empregado como fonte de energia, e é sintetizado concomitantemente aos processos de oxidação e redução, na fosforilação oxidativa, ou por hidrólise dos intermediários ricos em energia, tais como, 1,3-difosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e acetilfosfato nos processos de fermentação. O cofator NAD (nicotinamina dinucleotídeo) é de livre circulação celular, e se reduz ou se oxida funcionando como transferidor de equivalentes de redução intracelular. Nos processos de fermentação, a oxidação dos substratos é incompleta, e portanto, a energia é menor (SOUBES, 1994).

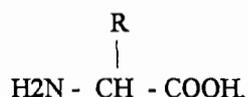
Para que o catabolismo se processe continuamente, para as quantidades de NAD presentes, o NADH (produzido pela fosforilação, a nível do substrato a partir de gliceraldeído 3-fosfato e na descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico a acetil-CoA) deve ser regenerado. Essa função é levada a efeito pela redução de prótons para formar hidrogênio gasoso, que é removido pelas bactérias hidrogenotróficas (BMH, BRS, BRN), em processo conhecido como “transferência de hidrogênio inter-espécies”. O acúmulo de hidrogênio, em quantidade acima da capacidade assimilativa coletiva desses organismos, torna necessária a presença de um método alternativo de disposição de elétrons que possibilite a regeneração do NADH. Essa necessidade é preenchida pela fermentação de piruvato a propionato, lactato e etanol ou pela fermentação de acetil-CoA a ácido butírico. Uma vez que as metanogênicas não podem utilizar tais produtos finais diretamente, seu acúmulo no meio prossegue, podendo baixar o pH da fermentação e levar o biodigestor ao colapso (HARPER & POHLAND apud FORESTI, 1994).

## **3.2. DEGRADAÇÃO MICROBIANA ANAERÓBIA DE PROTEÍNAS.**

### **3.2.1. DEFINIÇÕES GENÉRICAS SOBRE PROTEÍNAS**

As proteínas são substâncias nitrogenadas poliméricas encontradas em todas as células animais e vegetais. São formadas pela combinação de vinte aminoácidos diferentes e cujo número e sequência na molécula polimérica confere propriedades específicas a cada proteína (LEHNINGER, 1995).

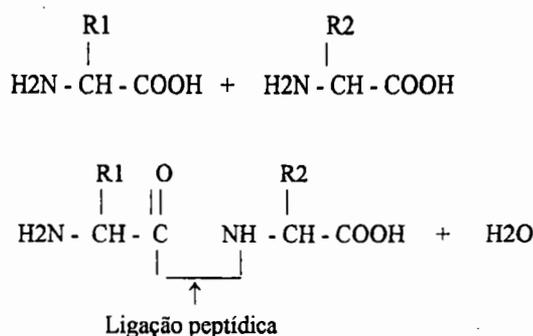
Dos 20 aminoácidos normalmente encontrados, 19 apresentam a seguinte estrutura geral:



que diferem entre si pela estrutura química da cadeia lateral (R). O 20º aminoácido (prolina) é similar mas sua cadeia lateral é ligada a um átomo de nitrogênio formando um iminoácido (CREIGHTON, 1993). Exceto para glicina, em que a cadeia lateral é apenas um átomo de hidrogênio, o átomo de carbono central é assimétrico e sempre na forma de um isômero L.

Microorganismos apresentam 21 aminoácidos (MADIGAN et al., 1997). Trata-se da selenocisteína- HSe-CH<sub>2</sub> – um aminoácido polar não ionizável do grupo da cisteína.

Os aminoácidos estão ligados entre si através de uma ligação denominada peptídica:



A **cadeia polipeptídica** é uma repetição das unidades básicas, os aminoácidos. Quando a cadeia lateral está incluída, a unidade é descrita como um **resíduo** de aminoácido. Uma cadeia curta de resíduos com uma sequência definida é denominada de **peptídeo**.

Proteínas com números de 15 a 10.000 aminoácidos são conhecidas. Podem variar na composição, sequência e número de aminoácidos, e dessa forma, é possível uma enorme variedade de tipos de proteínas.

A cadeia polipeptídica não é muito reativa quimicamente. Os grupos normalmente ionizados são os grupos amino terminal e grupos carboxilas que normalmente têm valores de pKa médios de 7,3 e 3,9, respectivamente.

O caráter específico de cada proteína é determinado pela disposição espacial das diferentes cadeias laterais dos aminoácidos. Essas cadeias incluem, entre outros, grupos catiônicos e aniônicos, hidroxilas aromáticas, amidas, tiois, heterociclos e cadeias fortemente hidrofóbicas (alifáticas e aromáticas) que contribuem tanto para as interações específicas das proteínas como para sua estabilidade estrutural. Esses grupos reativos podem servir também como pontes de ligação para grupos diferentes dos aminoácidos como açúcares,  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{R-C=O}$ , etc.

Os aminoácidos podem ser agrupados em cinco classes diferentes e dentro de uma classe existe uma graduação de tamanho, polaridade e forma dos grupos R. As estruturas desses aminoácidos estão ilustrados na Figura 3.

Proteínas que apresentam apenas aminoácidos em suas moléculas (tais como as enzimas ribonuclease e quimi tripsina) são consideradas **proteínas simples**. Aquelas que apresentam outros componentes além dos aminoácidos são chamadas **proteínas conjugadas**. Assim temos **lipoproteínas, glicoproteínas e metaloproteínas** (LEHNINGER et al., 1995).

As proteínas também podem ser classificadas de acordo com suas funções biológicas. Assim temos:

**Enzimas** - são proteínas catalizadoras.

**Proteínas transportadoras** - (hemoglobina)

**Proteínas nutrientes e de armazenamento** - (caseína e proteínas de sementes).

**Proteínas contrácteis ou de motilidade** - (actina de músculos e denaina de cílios, respectivamente)

**Proteínas estruturais** - (o colágeno de cartilagens e tendões)

**Proteínas de defesa** - (imunoglobulinas)

**Proteínas reguladoras** - (hormônios e ligadas à divisão celular)

**Outras proteínas** (de difícil classificação)

Conceitualmente, a estrutura das proteínas pode ser considerada em quatro níveis:

1- **Estrutura primária**: é a sequência de aminoácidos da sua cadeia polipeptídica,

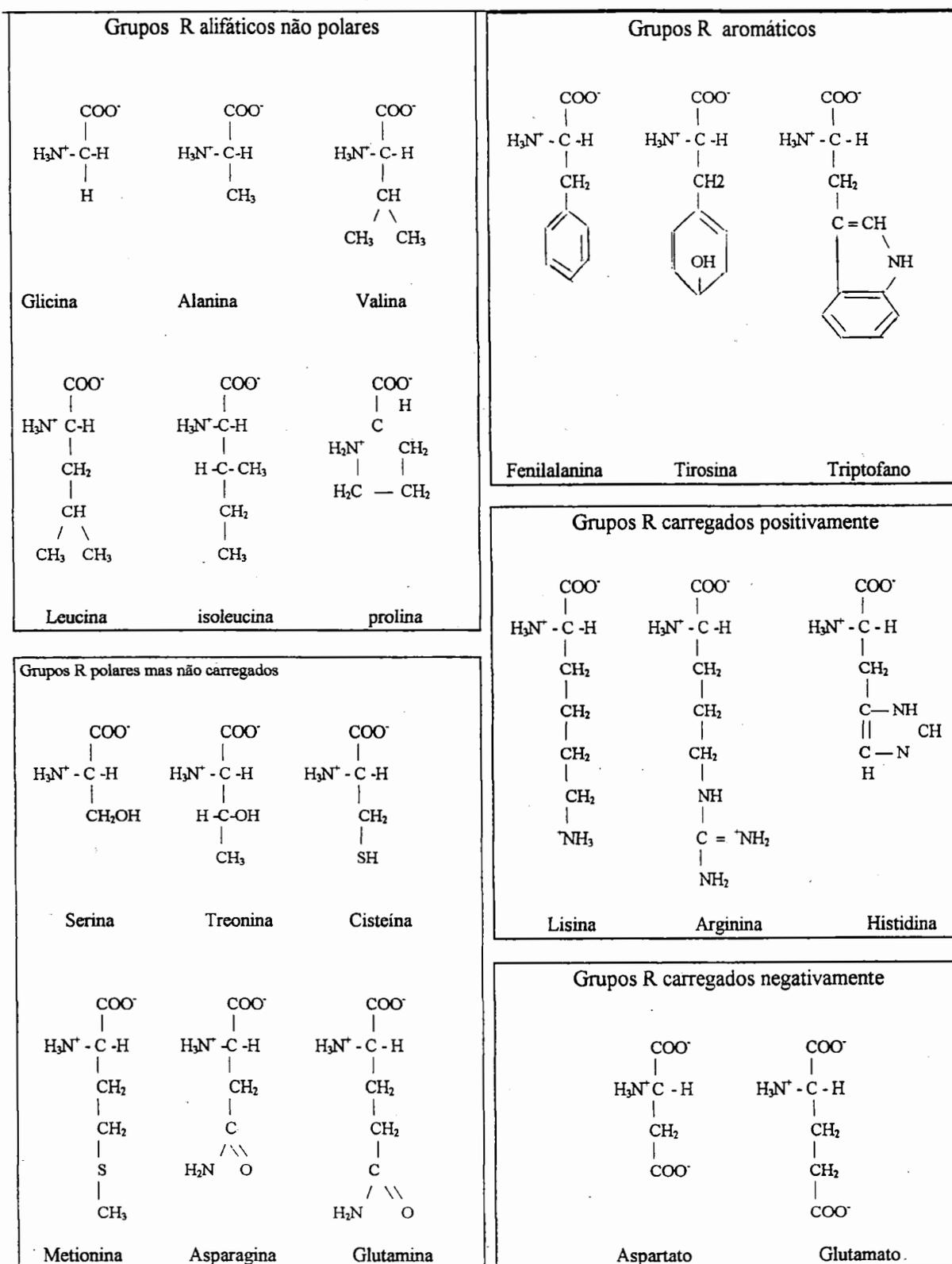


FIGURA 3. Os 20 aminoácidos padrão das proteínas em suas formas totalmente ionizadas (pH 7,0) (LEHNINGER et al., 1995)

2- *Estrutura secundária*: refere-se ao arranjo espacial dos átomos do “esqueleto” polipeptídico sem levar em conta a sua conformação das cadeias laterais.

3- *Estrutura terciária*: é a estrutura tridimensional completa, isto é, o relacionamento espacial entre todos os aminoácidos em um polipeptídeo.

4- *Estrutura quaternária*: é o arranjo espacial das subunidades (cadeias polipeptídicas) que se associam através de interações covalentes e, em alguns casos, pontes dissulfeto.

Dois níveis estruturais e intermediários tem sido definidos além desses níveis de organização:

**Estrutura supersecundária**- termo usado para descrever arranjos particulares estáveis que ocorrem em muitas proteínas diferentes, e em alguns casos, várias vezes numa mesma proteína.

**Domínio**- é uma região compacta que inclui de 40 a 400 aminoácidos que constitui uma unidade estrutural distinta no interior de uma cadeia polipeptídica maior, termodinamicamente estável.

### 3. 2. 2 DEGRADAÇÃO MICROBIANA ANAERÓBIA DE PROTEÍNAS E BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS.

As informações atuais sobre a degradação microbiana anaeróbia, incluem resultados obtidos sobre o rúmen, resultados sobre culturas bacterianas enriquecidas e fermentação do lodo de esgoto em biodigestores. Assim, neste item, estão incluídos trabalhos realizados buscando reunir a maior quantidade de informação possível com relação à degradação de proteínas e as bactérias que participam desse processo.

\* Parece que há pouca dúvida que a degradação em biodigestores anaeróbios, segue um padrão similar àquele do rúmen, em que proteínas são hidrolisadas a peptídeos e aminoácidos, que são subsequentemente desaminados, produzindo amônia, dióxido de carbono e ácidos graxos voláteis. Peptídeos, aminoácidos e amônia podem ser reaproveitados para a síntese de proteínas bacterianas de acordo com ALLISON e BLACKBURN apud MACKIE e BRYANT, (1990). Um esquema da utilização de proteínas no rúmen envolvendo a solubilização, hidrólise extracelular, transporte, desaminação e a formação de produtos finais está apresentado na Figura 4 (WOLIN, 1988).

✂ No rúmen, a amônia é o produto que aparece em maior quantidade após a digestão de proteínas provenientes do alimento e do nitrogênio não protéico (uréia). Cerca de 60 a 92% do nitrogênio proveniente da dieta alimentar é convertido em amônia no rúmen. A amônia é fator de crescimento para algumas espécies bacterianas, enquanto outras utilizam principalmente os aminoácidos. A maior diferença entre o rúmen e os biodigestores parece ser os tipos de bactérias envolvidas na degradação da matéria orgânica. No rúmen, proteínas são degradadas por espécies fermentadoras de carboidratos, e a fermentação de peptídeos ou aminoácidos não fornece energia suficiente para o crescimento, enquanto em biodigestores, bactérias especializadas tais como clostrídios proteolíticos, são importantes nos processos produtores de energia (Mc INERNEY, 1988).

BRYANT apud FULGHUM & MOORE (1963), relatou a proteólise da gelatina realizada pela ação de microrganismos isolados do rúmen. BRYANT & BURKEY (1958) demonstraram que aproximadamente 1/5 das cepas bacterianas isoladas do rúmen podiam liquefazer a gelatina.

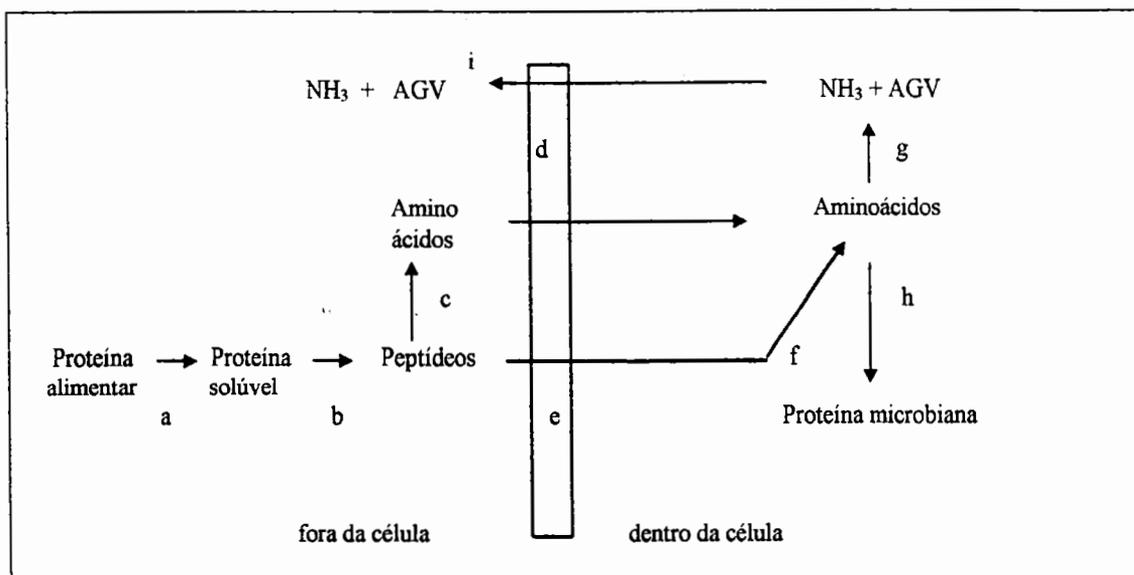


FIGURA 4. Esquema da utilização de proteínas por bactérias do rúmen mostrando: (a) solubilização; (b) proteólise; (c) atividade de peptidase extracelular; (f) atividade de protease intracelular; (g) fermentação de aminoácidos; (h) síntese de proteína microbiana e (i) difusão passiva de amônia e ácidos voláteis para o exterior da célula. (Fonte: WOLIN, 1988)

BRYANT & DOETSCH (1954) relataram grupos isolados de bactérias que degradavam caseína mas não gelatina. Essas bactérias eram do gênero *Selenomonas ruminantium*. Neste mesmo ano, outros autores que estudaram a proteólise da gelatina foram MANN, MASSON & OXFORD (FULGHUM & MOORE, 1963).

Meios para o isolamento de bactérias do rúmen foram descritos por APPLEBY, KING & SMITH e HAMELIN & HUNGATE (FULGHUM & MOORE, 1963). FULGHUM (1958) descreveu o desenvolvimento de dois meios anaeróbios diferentes para isolar e enumerar bactérias proteolíticas do rúmen, a partir de meios já existentes. BRYANT et al. (1958) verificaram que *Bacteroides ruminicola* catabolizava caseína hidrolizada e cisteína. Os autores constataram que todos os organismos isolados representavam espécies ou gêneros já conhecidos como membros de outros grupos fisiológicos: *Butyrivibrio* sp, *Succinovibrio* sp, *Bacteroides* sp, *Selenomonas ruminantium* var. lactilytica, *Borrelia* sp.

BLACKBURN & HOBSON (1960), verificaram que todas as frações do conteúdo do rúmen apresentavam atividade proteolítica (por protozoários e bactérias de vários tamanhos) e iniciaram o isolamento de bactérias proteolíticas do rúmen ovino, mas não tiveram sucesso. BLADEN et al. (1960) estudaram 271 cepas bacterianas e verificaram que

34 cepas de *Bacteroides ruminicola*, mais seis relacionadas, eram as maiores produtoras de amônia do rúmen. Outras espécies menos ativas foram *S. ruminantium*, *Peptoestreptococcus elsdenii* e algumas cepas de *Butyrivibrio*.

\* WRIGHT & HUNGATE (1967) verificaram que as proteínas que entraram no rúmen foram digeridas e fermentadas com a liberação de nitrogênio na forma de amônia. A fermentação foi rápida e completa e aminoácidos não se acumularam no meio em concentrações significativas. Nesses estudos, a amônia foi a maior forma disponível de nitrogênio solúvel para a biossíntese bacteriana. PITMAN et al. apud WOLIN (1988) verificaram que a espécie *Bacteroides ruminicola* usou peptídeos e amônia, mas não aminoácidos como fonte de nitrogênio no rúmen .

\* Em 1981, HASLEWOOD & EDWARDS apud WALLACE & BRAMMAL (1985) estudaram uma bactéria do rúmen que utilizava proteínas solúveis como única fonte de nitrogênio para seu crescimento (*Bacteroides ruminicola* cepa R 8/4). Usaram para esse estudo vários inibidores de protease. RUSSELL et al. apud WALLACE & BRAMMAL (1985) verificaram que *Streptococcus bovis* promoveu rápida proteólise em culturas mistas do rúmen contendo caseína sugerindo que esse organismo era um proteolítico importante.

WALLACE & BRAMMAL (1985) investigaram a importância de diferentes espécies proteolíticas no rúmen de ovelhas. Verificaram que *Bacteroides ruminicola* e *Streptococcus bovis* foram as espécies mais importantes.

\* Bactérias anaeróbias proteolíticas foram isoladas dos mais diversos ambientes e principalmente do rúmen de herbívoros. Algumas delas foram capazes de utilizar carboidratos, indicando assim sua versatilidade em hidrolisar diferentes compostos (SIEBERT & TOERIEN, 1969).

\* A maioria das bactérias do rúmen são Gram-negativas, e a membrana mais externa é uma barreira seletiva para muitas substâncias. Transportadores de peptídeos na membrana citoplasmática tanto de bactérias Gram-negativas como Gram-positivas parecem suportar a passagem de aminoácidos com até 5 resíduos (HIGGINS & GIBSON apud RUSSELL et al., 1991).

As principais espécies proteolíticas no rúmen incluem: *Bacteroides* sp ; *Bacteroides ruminicola*; *Butyrivibrio* sp; *Streptococcus bovis*. Também foram isolados *Selenomonas* sp, *Eubacterium* sp, *Succinovibrio* sp, *Lachnospira* sp, *Clostridium* sp e *Bacillus* sp (Mc INERNEY, 1988).

Uma revisão sobre a fermentação de proteínas no rúmen foi realizada por RUSSELL et al. (1991), e os autores constataram alguns pontos de controvérsia entre as pesquisas já realizadas. Inferiram, contudo, que o acúmulo de peptídeos *in vivo* e, a observação de que muitas bactérias do rúmen podiam utilizar apenas uma fração de peptídeos indicou que a atividade de peptidase extracelular e o transporte de peptídeos eram etapas potencialmente limitantes na degradação total de proteínas do alimento. Não sabiam se as espécies individuais tinham a mesma especificidade de utilização de peptídeos e assim mais pesquisa seria necessária. Devido os altos preços de uma dieta alimentar rica em proteínas, nutricionistas pensaram vias de diminuir a degradação de proteínas no rúmen e usar suplementos com proteína insolúvel, porém sabiam que a deficiência de nitrogênio proveniente de aminoácidos podia diminuir a produção microbiana, a digestão de celulose e absorção de alimentos. Assim se fazia necessário otimizar a utilização de proteínas.

Estudos realizados com biodigestores de lodo mostraram que eles também contém grande número de bactérias proteolíticas. A maioria dos isolados pertencem ao gênero *Clostridium* sp, somada a presença de espécies como *Peptococcus anaerobicus* dos gêneros *Bifidobacterium* sp, *Staphylococcus* sp e alguns bacilos Gram-negativos não formadores de esporos. O mesmo foi verificado em sedimentos de lagos eutróficos em que 66% das bactérias pertenciam às espécies *Clostridium bifermentans* e *C. sporogenes* (Mc INERNEY, 1988).

SIEBERT & TOERIEN (1969) investigaram a ocorrência e a identidade de bactérias proteolíticas em biodigestores de lodo de esgoto bruto. O número de bactérias proteolíticas foi de  $65 \times 10^6$  /mL. Dessas, 65% eram bastonetes formadores de esporos e incluíram sete espécies de clostrídios, 21% apresentaram formas cocóides e consistiram principalmente de *Peptococcus anaerobius*. Este último grupo, e mais um isolado pertencente ao grupo *Bacteroides*, segundo os autores, pode ter pouca significância na degradação de proteína em biodigestores de lodo de esgoto. Similarmente, o isolamento de duas culturas de bastonetes retos não formadores de esporos de *Eubacterium spp* sugeriu que elas não apresentaram um papel importante na degradação de proteínas nesses digestores.

Espécies de *Clostridium* sp e *Eubacterium* sp são proteolíticas ativas em biodigestores de soro de leite contendo ácidos graxos de cadeia longa (WILDENAUER & WINTER apud Mc INERNEY, 1988).

↙ A espécie *Clostridium proteolyticum* foi isolada, por JAIN & ZEIKUS (1985) de lodo de esgoto. Essa espécie hidrolisou várias proteínas e fermentou aminoácidos, principalmente a acetato e CO<sub>2</sub> com pequenas quantidades de hidrogênio, isovalerato e isobutirato. Além disso, esse organismo consumiu H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> na fase estacionária de crescimento, o que sugeriu que ele era um acetogênico (Mc INERNEY, 1988).

OLLIVIER et al. apud Mc INERNEY (1988), isolaram um bacilo Gram-negativo não formador de esporos, a partir de resíduos de curtume e estrume de gado. Esse bacilo denominado *Thermobacteroides proteolyticus* utilizava vários substratos protéicos e não utilizava açúcar.

Diversos clostrídios proteolíticos são frequentemente encontrados em ferimentos e outros danos traumáticos, e compõem fatores etiológicos importantes no desenvolvimento de gangrenas ou tétano (SMITH apud Mc INERNEY, 1988). Do grupo de *Bacteroides* sp, que apresentam colônias com pigmentação preta, a única que mostrou atividade colagenolítica foi a *Bacteroides gengivalis* (McFARLANE et al., 1986). Esses organismos causaram infecções diversas em animais usados em experimentos e a sua alta atividade proteolítica pode ser a causa da sua virulência.

↙ Clostrídios proteolíticos, tais como *C. perfringens*, *C. bifermentans*, *C. histolyticum* e *C. sporogenes*, são importantes na degradação de carnes e alimentos enlatados (BANWART, HURST & COLLINS-THOMPSON, apud Mc INERNEY, 1988). Nesse grupo também se inclui o *Clostridium botulinum*, que é ativamente proteolítico. A Tabela 1 mostra uma relação de bactérias proteolíticas e o local em que foram isolados.

★ TABELA 1-Bactérias proteolíticas e o local em que foram isoladas

MICROORGANISMOS	ORIGEM
<i>Bacterodes sp</i>	Intestino humano, lodo de esgoto, Rúmen bovino e caprino
<i>Bacteroides amylophilus</i>	Rúmen bovino
<i>B. ruminicola</i>	Rúmen bovino
<i>Bifidobacterium sp</i>	Lodo de esgoto
<i>Borrelia sp</i>	Rúmen bovino
<i>Butyrivibrio sp</i>	Rúmen bovino
<i>B. alactacidigens</i>	Rúmen bovino
<i>B. fibrisolvens</i>	Rúmen bovino
<i>Clostridium sp</i>	Lodo de esgoto, Rúmen bovino
<i>C. bifermentans</i>	Sedimento de lagos, lodo de esgoto
<i>C. Litoseburens</i>	Lodo de esgoto
<i>C. manganotti</i>	Lodo de esgoto
<i>C. perene</i>	Lodo de esgoto
<i>C. perfringens</i>	Lodo de esgoto
<i>C. proteolyticum</i>	Lodo de esgoto
<i>C. sporogenes</i>	Sedimento de lago
<i>C. collagenovorans</i>	Lodo de esgoto*
<i>Eubacterium sp</i>	Lodo de esgoto, rumem bovino
<i>E. ruminantium</i>	Rúmen bovino
<i>E. acidaminophilum</i>	Lodo de esgoto*
<i>Fusabacterium sp</i>	Rúmen bovino
<i>Lachnospira multiparis</i>	Rúmen bovino
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Rúmen bovino
<i>Peptococcus anaerobicus</i>	Lodo de esgoto
<i>Propionibacterium sp</i>	Intestino humano
<i>Selenomonas sp</i>	Rúmen bovino
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Rúmen bovino
<i>Selenomonas acidaminovorans</i>	Lodo de refinaria
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lodo de esgoto
<i>Streptococcus bovis</i>	Rúmen bovino
<i>Succinovibrio sp</i>	Rúmen bovino
<i>Thermobacteroides proteolyticus</i>	Estrume bovino, residuo de curtume

Fonte: modificado de VILLAS BÔAS (1991)

### 3. 2. 3. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Na digestão anaeróbia as proteínas biodegradáveis são hidrolisadas por dois grupos de enzimas chamadas proteases e peptidases e o esquema geral para quebra enzimática de proteínas é:

proteínas → polipeptídeo → peptídeos → aminoácidos

Essas duas categorias de enzimas são parcialmente ligadas à parede celular, e ocorrem parcialmente livres no fluido do reator (GLEN apud SAYED, 1987).

De acordo com GAUDY & GAUDY apud VILLAS BôAS (1990), as proteases bacterianas parecem ser menos específicas que as enzimas de mamíferos. Elas não rompem as ligações em lugares específicos, e a hidrólise de ligações peptídicas de muitas proteínas, provavelmente ocorre ao acaso.

Segundo DOELLE (1981), a degradação anaeróbia de proteínas envolve enzimas proteolíticas divididas em duas classes: endo e exopeptidases, dependendo do seu ataque na cadeia polipeptídica. As exopeptidases se subdividem em dois tipos: a) aminopeptidases, que requerem um grupo aminoterminal livre e são dependentes de íons metálicos para sua atividade e, b) carboxipeptidases, que hidrolisam peptídeos com um grupo carboxila terminal livre. Ambos os tipos de enzimas são capazes de romper a cadeia liberando di ou tripeptídeos, que por ação de di e tri peptidases formam aminoácidos livres que são então capazes de se difundir para dentro das células. A Tabela 2 mostra a especificidade de algumas endopeptidases (DOELLE, 1981).

A função de muitas proteases bacterianas extracelulares segundo LAW (1980) pode ser simplesmente fornecer nutrientes às bactérias, atuando como enzimas de “arraste” fornecendo fontes de carbono e nitrogênio facilmente transportáveis. Porém, essas enzimas também podem ajudar na penetração de barreiras por bactérias invasoras ou potencialmente invasoras como clostrídios ou pseudomonados respectivamente. Proteases do gênero *Bacillus* sp estão também relacionadas à esporulação.

TABELA 2 .Especificidade de algumas endopeptidases.

Enzima	Fonte	Especificidade	Comentários
Tripsina	pâncreas bovino	Rn-1=resíduos positivamente carregados: Arg,Lis; Rn = Pro	Altamente específica
Quimiotripsina	pâncreas bovino	Rn-1= resíduos hidrofóbicos: Fen.,Trip.,Tir: Rn =Pro	Cliva mais lentamente Rn-1= Asp, His, Met, Leu
Elastase	pâncreas bovino	Rn-1=pequenos resíduos neutros:Ala,Gli,Ser, Val Rn=Pro	
Termolisina	<i>Bacillus Thermoproteolyticus</i>	Rn=Ile,met,Fen,Tri,Tir,Val; Rn- =Pro	Ocasionalmente cliva Rn= Ala, Asp,His,Treo.
Pepsina	Mucosa gástrica bovina	Rn= Leu, Fen,Tri, Tir; m-1 = Pro	Outros também não específicos; pH ótimo = 2,0
Endopeptidase V8	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rn-1 = Glu	

$$\begin{array}{ccccccc}
 & & \text{Rn-1} & & \text{O} & & \text{Rn} & & \text{O} \\
 & & | & & || & & | & & || \\
 \text{NH} & - & \text{CH} & - & \text{C} & - & \text{NH} & - & \text{CH} & - & \text{C} \\
 & & & & \uparrow & & \uparrow & & & & \\
 & & & & \text{Ligação peptídica} & & \text{séssil} & & & & 
 \end{array}$$

Fonte: modificado de DOELLE (1981).

As proteases geralmente são classificadas por identificação do grupo catalítico essencial através do uso de inibidores. Essa forma tem sido usada para identificar os tipos de proteases presentes no fluido do rúmen. A maioria das atividades de proteases encontradas na fração microbiana do fluido do rúmen é removida por meios físicos delicados indicando que essas atividades estão associadas com o material de revestimento ou capsular. Essas proteases tem uma ampla especificidade pelo substrato incluindo atividade de endo e exoproteases (Mc INERNEY, 1988).

As proteases podem ser também classificadas de acordo com a variação do pH em que elas são ativas (ácidas, neutras ou alcalinas), de acordo com sua capacidade de hidrolisar proteínas específicas (queratinase, elastase, colagenase, etc) e com a sua similaridade com proteases bem caracterizadas tais como pepsina, tripsina, quimiotripsina ou catepsinas de

mamíferos. A Tabela 3 apresenta a classificação de proteases, considerando a sua sensibilidade a vários inibidores (NORTH, 1982).

Alguns inibidores comumente usados, entretanto, não são específicos a um tipo de protease. Por exemplo, os derivados de clorometil cetona, TCLK (N- $\alpha$ -tosil-L-lisina-clorometil cetona) e TPCK (L-tosil amido-2-fenilmetil clorometil cetona) e os inibidores leupeptina e antipaina, todos inibem algumas proteases de serina bem como muitas proteases de cisteína (NORTH, 1982).

TABELA 3. Classificação de proteases de acordo com seus inibidores.

Tipo	Inibidores específicos	Outros inibidores	Ativadores
Proteases aspárticas	Pepstatina SPI( acetil pepstatina) Diazoacetil norleucina, metil ester-N-Diazoacetil; N-2,4 dinitrofenil diamina; Epoxi (p-nitrofenoxi) propano		
Metaloproteases	Agentes quelantes-EDTA- etileno glicol-bis (aminoetil éter-N,N-tetra-cético ácido); O fenantropina; $\beta$ -hidroxi quinolina-dipiril fosforamidona.		
Serina proteases	PHSF (fenil metil sulfonil fluoreto) DIFP (diisopropil-fluorofosfato)	TLCK <sup>1</sup> ;TPCK <sup>2</sup> Antipaina, Leupeptina, animostatina	
Cisteina proteases	Iodoacetamida, iodoacetatos Metais pesados; N-etil maleimida	TLCK, TPCK Antipaina, Leupeptina, quimiostatina;p- cloromercúrio benzoato	Agentes reduzores Cisteína, DTT <sup>3</sup> ,EDT A <sup>4</sup>

1-TCLK = N- tosil-L- lisina- clorometil cetona

2-TPCK = L-tosil amido -2, fenilmetil clorometil cetona

Fonte: NORTH, (1982)

3- DTT = Ditioneitol

4- EDTA = ácido etileno diamino-tetracético

Existe alguma falta de clareza entre essa classificação e aquela baseada no pH. As proteases aspárticas (carboxila) são todas ativas em pH ácidos e muitas proteases ácidas, por falta de dados que confirmem, são consideradas do tipo aspártico enquanto outras tem sido

notificadas como proteases de cisteína (tiol), as quais são normalmente mais ativas em pHs levemente ácidos. Metaloproteinases são ativas em pH próximo à neutralidade, e proteases de serina são normalmente ativas em pH alcalino. Contudo, os termos proteases alcalinas e proteases neutras tem sido frequentemente usados como sinônimos para esses dois tipos de enzimas.

No curso de sua existência, as bactérias produtoras de proteases encontram proteínas de estruturas diversas como soro-albuminas, proteínas de plantas, proteínas de tecidos conectivos animais (como colágeno e queratina), proteínas de parte dos corpos de animais mortos e plantas que fazem parte do seu meio ambiente. Essa multiplicidade de fontes nutrientes é disputada pela enorme diversidade de proteases bacterianas (LAW, 1980).

Nem sempre está claro se as enzimas proteolíticas extracelulares derivadas das diversas espécies bacterianas são realmente extracelulares, ou são liberadas através de lise celular ou pelo movimento bacteriano (POLLOCK, 1962). Entretanto, muitas proteases são isoladas do sobrenadante em soluções de culturas bacterianas. GLEN (1976) sugeriu que apenas bactérias Gram-positivas produzem enzimas realmente extracelulares (LAW, 1980). Para PRIEST (1983), porém, enzimas digestivas dentro dos vacúolos, ou enzimas liberadas para o meio por uma bactéria, são todas extracelulares, uma vez que tenham atravessado a membrana citoplasmática.

POOLMAN et al. (1995) identificaram várias peptidases de *Lactococcus lactis*, uma bactéria que degrada caseína do leite. Os estudos bioquímicos e genéticos indicaram que as enzimas estão localizadas intracelularmente, e não possuem nenhum papel na degradação extracelular de peptídeos derivados da caseína. Na via proteolítica desse microrganismo, a caseína é hidrolisada extracelularmente a oligopeptídeos por um sistema de proteinase (PrTP). Uma grande fração dos peptídeos formados é absorvida pelas células via um sistema oligopeptídico (Opp), e os outros se acumulam no meio. Esses últimos são absorvidos por um sistema de transporte de di- e tri-peptídeos denominado DtpT. De acordo com VESSER et al. apud POOLMAN et al. (1995), duas classes específicas de proteases foram bem definidas (PI e PIII) e degradam tipos diferentes de caseína do leite (a caseína apresenta quatro tipos diferentes de proteínas).

### 3. 2. 4. ESTUDOS DA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA MICROBIANA DE PROTEÍNAS EM BIODIGESTORES.

Estudos sobre a degradação de proteínas em biodigestores foram realizados com diferentes tipos de reatores, vários tipos de proteína e focalizando aspectos distintos da degradação.

Nesta revisão estão apresentados alguns dos trabalhos que foram realizados com biodigestores envolvendo a tecnologia e aspectos bioquímicos da degradação anaeróbia de substratos protéicos.

De acordo com TOERIEN et al.(1967), quando a degradação anaeróbia que ocorre no rúmem e a que ocorre nos biodigestores são comparadas, verifica-se que há uma estreita semelhança entre os dois processos. Estes sistemas recebem um alimento complexo, que é degradado num ambiente rico em bactérias, sob condições de baixo potencial de oxidação-redução. Em ambos os sistemas a matéria orgânica introduzida é transformada em ácidos graxos. Na digestão anaeróbia em digestores, todos os ácidos graxos são convertidos a metano e dióxido de carbono, enquanto nos ruminantes, os ácidos graxos são absorvidos pela corrente sanguínea e uma pequena quantidade de metano é produzida a partir de dióxido de carbono e hidrogênio.

Para MCKINNEY (1962), a maioria dos pesquisadores das décadas de 50 e 60 concentrou seus estudos nas populações bacterianas aeróbias e anaeróbias facultativas nos digestores, e poucos trabalhos foram realizados com bactérias anaeróbias estritas porque consideravam que as bactérias anaeróbias facultativas predominavam sobre as estritas na fase acidogênica. TOERIEN et al. (1967) verificaram que as bactérias anaeróbias estritas formadoras de ácido são encontradas em todos os biodigestores, em todos os estágios, normalmente em número 100 a 200 vezes maior que aeróbias e facultativas presentes. Elas são importantes para retirar o oxigênio do meio, permitindo o crescimento das metanogênicas.

A digestão anaeróbia tem sido utilizada como um processo de tratamento de resíduos e para produção do metano. Porém, com a crise de energia na década de 70, maior ênfase foi dada à produção de metano. Estudos realizados por HILLS e ROBERTS (1980) e ROBBINS

et al (1983) usando estrume de gado, visaram otimizar a produção de metano, focando a eficiência nas taxas de retorno da matéria orgânica e a estabilidade do processo. A otimização foi conseguida adicionando-se material celulósico aos resíduos (ROBBINS et al., 1989).

HASHIMOTO (1983) estudou os efeitos da temperatura, tempo de residência hidráulica e composição da mistura estrume-fibras na produção de metano e seus dados indicaram que a produção de metano declinava proporcionalmente com o conteúdo de fibras. Seus resultados contrastaram com os de HILLS & ROBERTS (1980) e os de ROBBINS et al. (1983a), mostrando que a natureza dos substratos era mais importante que uma simples relação carbono-nitrogênio. Essa relação C:N refere-se à íons  $\text{NH}_4^+$  provenientes da degradação da proteína

Estudos realizados por ROBBINS et al. (1989) visaram a eficiência da produção de metano e conversão de sólidos na digestão de resíduos com alto teor de nitrogênio tais como resíduos de abatedouros. Esses estudos envolviam digestão anaeróbia de misturas de proteína e estrume, quando BSA (soro albumina bovina) foi usada como modelo de material nitrogenado. Seus estudos conseguiram mostrar a instabilidade do processo e eficiência de conversão da matéria orgânica. Ao tentar analisar a causa do mau desempenho do reator, os autores confrontaram-se com as possibilidades de inibição de bactérias por  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NH}_3$ , inibição por ácidos graxos voláteis ou, ainda, a digestão da proteína BSA, levar a problemas metabólicos. Os autores não conseguiram encontrar uma relação causa-efeito

Os efeitos do íon  $\text{NH}_4^+$  ou amônia na produção de metano a partir de populações mistas em biodigestores foram apontados em vários estudos realizados por Mc CARTY, MELBINGER & DANELLON, CONVERSE et al., KROEKER et al. e VAN VELSEN apud ROBBINS et al. (1989). O nível tóxico do  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NH}_3$  foi o ponto de discrepância entre alguns autores. VAN VELSEN et al. e KROEKER et al. apud ROBBINS et al. (1989), demonstraram que a metanogênese foi inibida por altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , mas ela continuou com concentrações de  $\text{NH}_4^+$  muito maiores que os níveis previamente considerados tóxicos. VAN VELSEN (1979) apud ROBBINS et al. (1989) mostrou claramente que a adaptação das bactérias a altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  era possível, mas não indicou qual atividade da digestão (fermentativa, acetogênica ou metanogênica) foi mais inibida.

HOBSON & SHAW (1976) verificaram que o íon  $\text{NH}_4^+$  inibiu a produção de metano em culturas de *Methanobacterium formicicum*, uma metanogênica utilizadora de hidrogênio. Entretanto, uma comunidade mista de biodigestor é um sistema mais complexo em que as populações são metabolicamente interdependentes.

ROBBINS et al. (1989) estudaram o efeito de nitrogênio amoniacal total na digestão de estrume de gado contendo proteína e na utilização de glicose, propionato e acetato. Os processos de fermentação da glicose, oxidação de propionato e quebra de acetato, representaram processos metabólicos de organismos fermentadores, acetogênicos e metanogênicos, respectivamente. Os resultados desse estudo indicaram que a inibição foi mais pronunciada com a atividade metanogênica que com os outros dois processos. Contudo, esses resultados são específicos de um resíduo contendo material protéico, e não podem ser generalizados para todo tipo de mistura estrume-proteína.

BREURE et al. (1985), verificaram que não ocorreu granulação durante a digestão de uma água residuária contendo gelatina, sob condições de acidificação em reator do tipo UASB e que um lodo bem peletizado foi negativamente afetado por altas concentrações de proteína com perigo de flotação da biomassa. Verificaram também que concentrações de amônia de 1 a 2 g/L, frequentemente excedidas durante a digestão anaeróbia de efluentes com altas cargas orgânicas de nitrogênio, levaram a um marcante retardo no desenvolvimento do lodo granular, com aumento na decomposição da estrutura dos grânulos.

SCHULZE et al. (1988) verificaram que quando concentrações de 5 g/L de gelatina foram fermentados produzindo 1 g/L de amônia, não influenciaram no desempenho do reator nem no desenvolvimento do lodo granular. Porém, com 15 g/l de gelatina e 2,7 g/L de amônia, provocou uma leve mudança nas características do lodo, ou seja os flocos não apresentavam estrutura arredondada, diminuíram em diâmetro e eram aparentemente limosos, mantendo porém, boas propriedades de sedimentação. A produção de gás só foi observada após quatro semanas e quando o pH passou de 7,8 a 7,4.

Mc CARTY & Mc KINNEY (1961) observaram que a formação de metano foi quase completamente inibida por 150 mg/L de nitrogênio amoniacal livre. Os microrganismos, provavelmente, não estavam suficientemente adaptados a altas concentrações de amônia.

✎ A revisão de literatura mostra que há muita discrepância entre os níveis em que a amônia é tóxica. Alguns autores relataram que 80 mg/L de amônia começou a inibir a metanogênese, enquanto outros, que a toxicidade pelo nitrogênio amoniacal total começa de 1700 a 1800 mg/L. PARKIN & MILLER (1982) relataram que é possível adaptação de bactérias entre 8000 a 9000 mg/L sem decréscimo na produção de metano. Assim, mais pesquisas seriam necessárias em relação à toxicidade da amônia às bactérias metanogênicas.

✎ GUJER & ZEHNDER (1983) mostraram que num sistema UASB um substrato protéico segue o mesmo padrão de carboidratos. Na quebra acidogênica, aminoácidos são transformados para ácidos graxos de cadeia curta, amônia e hidrogênio, e os pré-requisitos para peletização são os mesmos: alta pressão parcial de hidrogênio, fornecimento adequado das espécies amoniacais (livre e salina) e pH próximo à neutralidade. A acetogênese e metanogênese permanecem as mesmas, independente do substrato, mas a acidogênese pode diferir muito entre os substratos e estruturas orgânicas dentro de um tipo. Os autores usaram dois sistemas de reatores tipo UASB em escala de laboratório com alta e baixa pressão parcial de hidrogênio e outro sistema em série e usaram caseína como substrato, nas proporções 50 a 100% de proteína.

MACKIE & BRYANT (1990) estudaram a taxa de absorção ou de incorporação de nitrogênio usando  $^{15}\text{NH}_3$  em biodigestores mesofílico e termofílico tratando resíduos de gado e alimentados semi-continuamente. Verificaram que a concentração de amônia foi maior no digestor mesofílico que no termofílico, à mesma taxa de carga orgânica. Essa diferença não foi significativa com as taxas de carga mais baixas, mas com taxas mais altas foi bem maior no digestor mesofílico. O nitrogênio amoniacal é importante para síntese bacteriana em digestores anaeróbios, embora, não exista nenhuma informação específica a respeito do metabolismo do nitrogênio em bactérias isoladas de biodigestores. A infusão de  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  teve um efeito desprezível no estoque de  $\text{N-NH}_4^+$  devido à grande quantidade deste nos biodigestores, especialmente com as maiores taxas de carga. Assumiu-se que o estoque extracelular de  $\text{N-NH}_4^+$  estava em equilíbrio com o intracelular, assim a taxa com que era removido era a mesma com que era incorporado no material celular. A desvantagem dessa técnica de usar  $\text{NH}_4^+$  marcado, como sal é que ela ignora a incorporação direta de nitrogênio dos aminoácidos e peptídico dentro da proteína bacteriana, e assim a síntese de proteína bacteriana é subestimada. Também não há informações sobre lise bacteriana e degradação, principalmente de células viáveis em digestores. As taxas de produção celular foram maiores

no digestor termofílico que no mesofílico, com altas taxas de carga orgânica. Nas taxas mais baixas não houve diferença.

THASVEERI et al. (1994) estudaram o efeito de substratos ricos em proteína na produção do lodo granular usando reatores do tipo UASB com sistema de recirculação externa. Quando o nitrogênio amoniacal substituiu o nitrogênio protéico, os dados sugeriram que proteínas foram responsáveis pela baixa produção de grânulos. De todos os parâmetros examinados, os autores acreditam que alguns metabólitos da degradação de proteínas diminuem a tensão superficial, o que pode ter sido a causa da baixa produção de grânulos. A recirculação externa do lodo aumentou a biomassa, provavelmente devido à vantagem das bactérias anaeróbias facultativas.

Por outro lado, FANG et al. (1994) verificaram o desempenho e características de grânulos de um reator UASB tratando águas residuárias contendo proteína hidrolisada (peptona) e verificaram que 16% da proteína permaneceu intacta, 10% foi convertida em biomassa com uma remoção de DQO de 74%. Não houveram problemas de formação de espuma nem flotação no reator.

KESTERS et al. (1994) estudaram um sistema alternativo para reciclar produtos residuários através de quatro compartimentos (Melissa- Microbial Ecological Life Supporting System Alternative). O primeiro compartimento assegurava a liquefação de resíduos por bactérias proteolíticas termofílicas a fim de fornecer nutrientes como amônia e ácidos graxos voláteis às que colonizavam o segundo compartimento. Mais de 3 g/L de gelatina desapareceram do meio em 3 dias. Concentrações maiores aumentaram o crescimento celular, mas não proporcionalmente. O máximo foi observado com 50 g/L de gelatina. As maiores concentrações de amônia e ácidos graxos continuaram aumentando, mesmo após a degradação da gelatina ter sido interrompida. Foram obtidos ácido acético, isobutírico e isovalérico, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. A maior porcentagem (30%) de conversão de nitrogênio orgânico para amoniacal foi observada com 2,7 g/L de gelatina. *Thermobacteroides proteolyticus* foi o microrganismo testado para o primeiro compartimento.

PERLE et al. (1995) investigaram a degradação de caseína, ácidos graxos do leite e seus compostos de degradação em águas residuárias de indústria de laticínios. A caseína só foi eficientemente degradada por culturas que foram pré-adaptadas. Aminoácidos típicos da

hidrólise de caseína foram também degradados sem necessidade de adaptação, mas ácidos graxos do leite foram a maior causa da inibição de metanogênese e redução no nível de ATP.

<sup>4</sup> BREURE et al.(1985) estudaram a degradação de gelatina dissolvida em meio com sais minerais e submetida a uma população mista de bactérias num reator de fluxo ascendente (escala de laboratório), e verificaram que ela pode ser convertida a altas taxas e numa quantidade substancial a ácidos graxos voláteis. Os produtos foram principalmente acetato, propionato e valerato e em menor quantidade foram produzidos isobutirato, butirato e isovalerato. Os gases CO<sub>2</sub> e metano foram produzidos em pequenas quantidades. BREURE et al. (1985) também investigaram a hidrólise e fermentação acidogênica de misturas de gelatina e glicose em meio definido com sais minerais e sob condições controladas. Os autores mostraram que a gelatina foi degradada em quantidades limitadas em culturas de bactérias adaptadas à glicose. Na ausência de glicose a gelatina não foi degradada. Por outro lado, pequenas quantidades de glicose foram instantaneamente degradadas por populações mistas de bactérias na presença de gelatina. Sob essas circunstâncias, a degradação de gelatina foi levemente retardada pela adição de glicose.

<sup>4</sup> BREURE et al. (1986) investigaram a influência de ácidos graxos voláteis e carboidratos na hidrólise e fermentação acidogênica da gelatina. O grau de hidrólise da proteína diminuiu com o aumento nas taxas de diluição. Quando uma grande quantidade de carboidrato foi adicionada como um segundo substrato ela foi contra selecionada pelas bactérias. A fermentação da gelatina resultou em acetato, propionato e butirato. Isto indicou que embora as culturas mistas estivessem adaptadas a gelatina, elas também são capazes de fermentar glicose e lactose realizando uma fermentação do tipo acetato/butirato, frequentemente observada em fermentações acidogênicas de carboidratos. Quando ácidos graxos foram adicionados ao meio (uma mistura de acetato, butirato e propionato), pouca influência tiveram sobre a hidrólise de proteína. O retardo na degradação de proteína devido à presença de carboidrato levou-os a concluir que açúcares eram os substratos preferidos por aqueles organismos. Como a degradação de proteína não é inibida por altas concentrações de ácidos graxos, um sistema de reatores em escala industrial, poderia ser projetado para o tratamento de águas residuárias contendo carboidratos e proteínas. Nesse sistema, os carboidratos seriam primeiramente fermentados a ácidos graxos voláteis com pH baixo (entre 5,0 e 6,0) e depois as proteínas seriam fermentadas a ácidos graxos em pH próximo à neutralidade, e os ácidos graxos, finalmente, fermentados a metano e dióxido de carbono.

JAIN & ZEYKUS (1989) estudaram a degradação de gelatina por uma cultura mista de *C. collagenovorans* e *M. barkeri*, esta última adaptada a acetato. Após 16 horas de alimentação cerca de 85% da gelatina foi hidrolisada produzindo acetato e metano. O crescimento da população e a produção de metano aumentaram em relação ao consumo e adição de gelatina. Os autores ressaltaram, contudo, que num estudo anterior sobre a metanogênese termofílica de gelatina, com uma cultura mista de *T. proteolyticus*, *Methanobacterium* sp e *Methanosarcina* sp MP, mesmo após um longo período de fermentação (20 dias), nem todo acetato foi convertido a metano. Proteínas são compostas de muitos aminoácidos diferentes e, também, *C. collagenovorans* é uma espécie que tem como principal produto acetato e hidrogênio como substância traço, que são intermediários usados por outras espécies não obrigatoriamente sintróficas. Esta espécie realmente degrada proteínas de origem animal porque contém atividade de colagenase e protease. Nesse estudo, a degradação de acetato, mas não de gelatina, foi significativamente limitante ao processo total.

STAMS (1994) estudou as interações metabólicas entre bactérias anaeróbias em ambientes metanogênicos dirigindo-se mais atentamente para interações entre bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas causadas pela transferência de hidrogênio e formiato e discute a termodinâmica dessas interações. Relações sintróficas que dependem da transferência interespecies de H<sub>2</sub> e formiato foram descritas para a degradação de ácidos graxos, aminoácidos e compostos aromáticos.

POOLMAN et al. (1995) estudando a degradação de caseína por *Lactococcus lactis* verificaram que ela foi hidrolisada a oligopeptídeos. Uma grande fração dos peptídeos foi absorvida pelas células e outros se acumularam no meio. Alguns di e tripeptídeos foram absorvidos em menor extensão por um sistema especial. Embora várias peptidases tenham sido identificadas, estudos bioquímicos e genéticos mostraram que as enzimas são localizadas intracelularmente e não tem nenhum papel na degradação extracelular de peptídeos derivados da caseína. Apenas poucos aminoácidos foram encontrados no meio extracelular.

A degradação de aminoácidos sob condições metanogênicas tem sido estudada por alguns pesquisadores como GUANSHENG et al. (1992) e ÖRLYGSSON et al. (1995). Estes trabalhos estão incluídos no próximo item da revisão de literatura que trata especificamente da degradação anaeróbia de aminoácidos.

### 3. 2. 5. DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE AMINOÁCIDOS

A degradação de aminoácidos, oriundos da hidrólise de proteínas é um processo complexo realizado por um grande número de microrganismos anaeróbios e facultativos. As reações de degradação liberam amônia e são referidas como desaminações que envolvem oxidações, reduções ou podem ocorrer sem qualquer transferência de elétrons (BARKER (1981); Mc INERNEY (1988); ANDRESEN et al., 1989 apud ÖRLYGSSON et al., (1995). Essas desaminações diferem de acordo com a constituição enzimática do microrganismo e das condições do meio (DOELLE, 1981).

As reações de oxidação que ocorrem pela atividade das bactérias anaeróbias são frequentemente similares, se não idênticas, àquelas encontradas em bactérias aeróbias, e incluem desaminação oxidativa, transaminação e  $\alpha$ -ceto-oxidações. Contudo, reações envolvendo oxigênio molecular ou outros oxidantes fortes não são encontradas em bactérias anaeróbias. As reações de redução são muito mais distintas. Aminoácidos,  $\alpha$  e  $\beta$ -ceto-ácidos, ácidos  $\alpha$  e  $\beta$ -insaturados ou seus derivados de coenzima A (CoA) e prótons são os maiores aceptores de elétrons. Os maiores produtos finais dessas reações incluem o ácido graxo correspondente (ácidos graxos de cadeia curta, succinato e  $\delta$ -aminovalerato) e hidrogênio. Em contraste, os outros dois mecanismos resultam num oxi-ácido intermediário que é normalmente atacado por descarboxilases, resultando num ácido graxo de um carbono,  $\text{CO}_2$  e equivalentes redutores (ORLYGSSON et al., 1995).

Durante a degradação de aminoácidos, prótons são frequentemente usados como "canais" de elétrons. De acordo com SETO apud ORLYGSSON et al. (1995), em algumas espécies de clostrídios, os elétrons liberados a partir dessas oxidações são canalizados diretamente a um segundo aminoácido, que por sua vez é desaminado por redução. Esse tipo de reação que ocorre entre dois aminoácidos em que um serve como doador e outro comoceptor de hidrogênio é conhecida como reação de Stickland (NISMAN, 1954). Para ORLYGSSON et al. (1995), muitos trabalhos tem citado essa reação em seus estudos com culturas puras, mas pouco se sabe sobre sua importância na degradação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios naturais ou artificiais. A Figura 5 apresenta um esquema da reação de Stickland de acordo com NISMAN (1954).

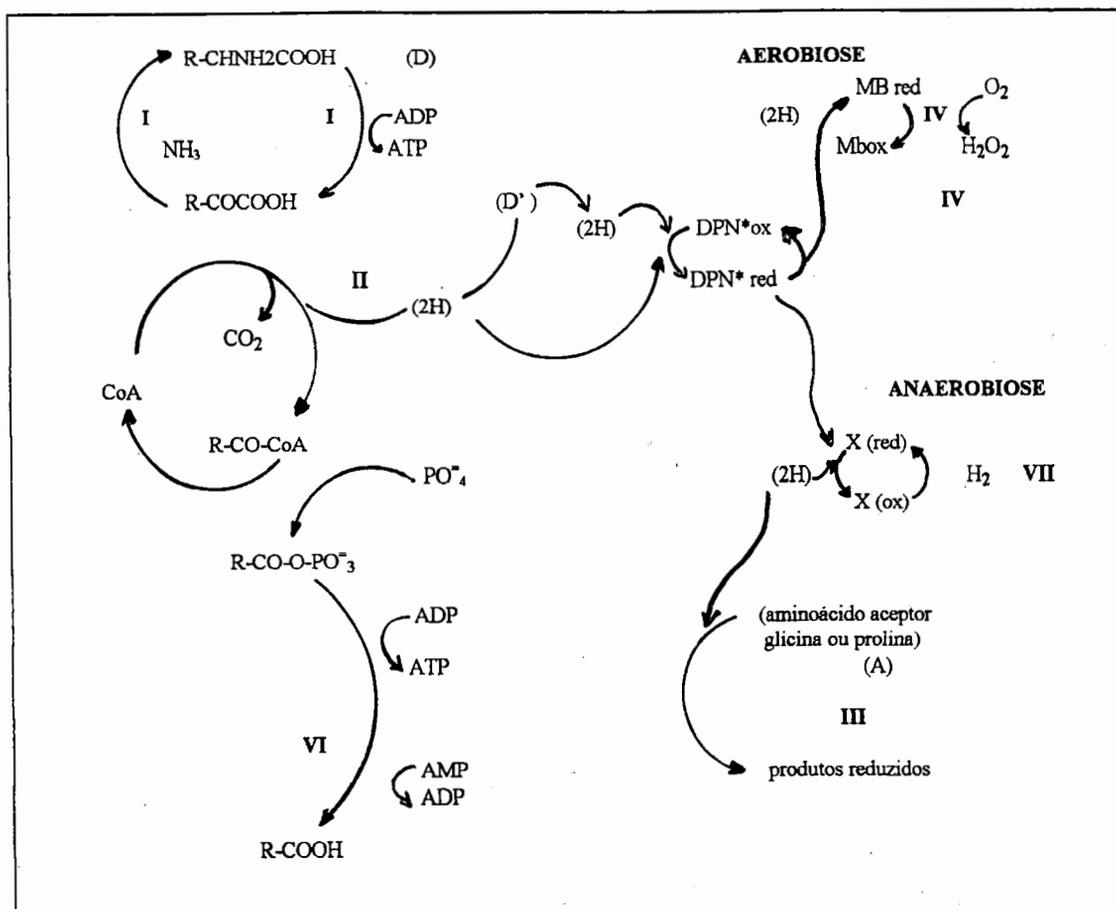


FIGURA 5- Esquema ilustrando a reação de Stickland em extratos com células livres.  
Fonte: NISMAN (1954)

Reação	Enzimas	Cofatores
I	L-aminocetoácido desidrogenase	DPN*, PO <sub>4</sub>
II	α-cetoácido desidrogenase	DPN*, DPT, CoA, ácido α-lipóico, PO <sub>4</sub>
III	Redutase de aminocido	DPN
IV	Diaforase?	FAD
V	Transacetilase	PO <sub>4</sub>
VI	Sistema receptor de fosfato	CoA?
VII	Hydrogenase	?

- (a) O aminoácido doador (D) é oxidativamente desaminado a α-cetoácido (D'), amônia e DPNH<sub>2</sub> por uma reação catalisada pelo sistema de enzima I.
- (b) D' é descarboxilado para CO<sub>2</sub>, Acetil-CoA e DPNH<sub>2</sub> pela ação do sistema de enzima II.
- (c) DPNH<sub>2</sub>, formado durante as reações catalisadas pelo sistema I e II é transferido para o sistema receptor III onde o aceptor A é reduzido de acordo com a reação  $2H + X \rightleftharpoons XH_2$  ou  $DPNH_2 + X \rightleftharpoons DPN + XH_2$ .
- (d) DPNH<sub>2</sub> é aerobiamente reoxidado por MB que se torna MBH<sub>2</sub> que por sua vez é reoxidado por oxigênio molecular a MB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- (e) A reação irreversível I onde DPN é reduzido para DPNH<sub>2</sub> pode ser acoplada a uma esterificação de fosfato inorgânico (ADP → ATP).
- (f) O acetil ativo é removido da Acetil-CoA por transacetilase e transformado para um acil-fosfato.
- (g) Acil-fosfato é decomposto por um sistema receptor (AMP → ADP) ou (ADP → ATP) para um ácido graxo e uma ligação rica em energia (VI).
- (h) O sistema de enzima VII é uma hidrogenase que ativa hidrogênio molecular.
- (i) O sistema carregador intermediário IV que atua entre DPN red e MB é supostamente uma diaforase (enzima FAD).

\* atualmente designada NAD (nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato)

As principais bactérias fermentadoras de aminoácidos pertencem ao grupo dos clostrídios e, de acordo com MEAD (1971) se subdividem em quatro subgrupos segundo o padrão dos aminoácidos usados ou formados.

O grupo I consiste de espécies que realizam as reações de Stickland entre pares de aminoácidos. Essas bactérias reduzem prolina ou arginina a  $\delta$ -aminovalerato pela oxidação da serina, fenilalanina e outros aminoácidos. Os grupos II, III e IV não produzem  $\delta$ -aminovalerato,  $\gamma$ -aminobutirato ou  $\alpha$ -aminobutirato a partir de hidrolisados de caseína. Todas as bactérias do grupo III são fermentadoras do glutamato e também serina e histidina. O grupo IV contém apenas uma espécie que realmente usa serina e treonina. A Tabela 4 apresenta esses grupos e suas características (Mc INERNEY, 1988).

TABELA 4. Produtos da oxidação de aminoácidos pelas espécies de clostrídios.

Grupos /Espécies	Características
<b>I-Clostridium bifermentans</b> <i>C.sorolelii</i> <i>C.botulinum (A,B,C)</i> <i>C.caloritolerans</i> <i>C.sporogenes</i> <i>C.cochlearum (1 cepa)</i> <i>C.difficile</i> <i>C.putrificum</i> <i>C.sticklandii</i> <i>C.ghoni</i> <i>C.mangenotti</i> <i>C.scatalogenes*</i> <i>C.lituseburensis*</i>	Organismos que fazem a reação Stickland; reduzem prolina e produzem $\delta$ -aminovalerato; oxidam serina, fenilalanina e outros aminoácidos; produzem o $\alpha$ -aminobutirato a partir de treonina ou metionina e $\gamma$ -aminobutirato a partir de glutamato.
<b>II</b> <i>C. botulinum</i> tipos C,G <i>C histolyticum</i> <i>C. cochlearum (1 cepa)</i> <i>C.subterminale</i>	Não produzem $\delta$ -aminovalerato. Todas as espécies usam arginina e/ou glicina
<b>III</b> - <i>C cochlearum (1 cepa)</i> <i>C.tetani</i> <i>C.tetanomorphum</i> <i>C. microsporum</i> <i>C.lentoputrescens</i> <i>C.limosum</i> <i>C.malenomenatum</i> <i>C. aminobutylicum</i>	Não produzem $\delta$ -aminovalerato. Utilizam glutamato, serina e histidina
<b>IV</b> - <i>C. putrefasciens</i>	Não produzem $\delta$ -aminovalerato; utilizam serina e treonina

\* Formam  $\alpha$  e  $\gamma$ -aminobutirato.

Fonte : McINERNEY (1988).

Outros pesquisadores como ELSDEN & HILTON (1976/78), estenderam os estudos de MEAD (1971) para incluir espécies adicionais bem como os produtos finais produzidos por essas bactérias. Seus trabalhos, em geral, confirmaram os de MEAD e mostraram a importância desses tipos de análises na taxonomia dos clostrídios (Mc INERNEY, 1988).

¶ Para algumas bactérias do rúmem, a amônia é a principal fonte de nitrogênio. Essas espécies incluem *Bacteroides ruminicola*, *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii* e algumas espécies de *Butyrivibrio* sp (HUNGATE, 1982). As principais bactérias degradadoras de aminoácidos bem como seus produtos de fermentação estão ilustrados na Tabela 5.

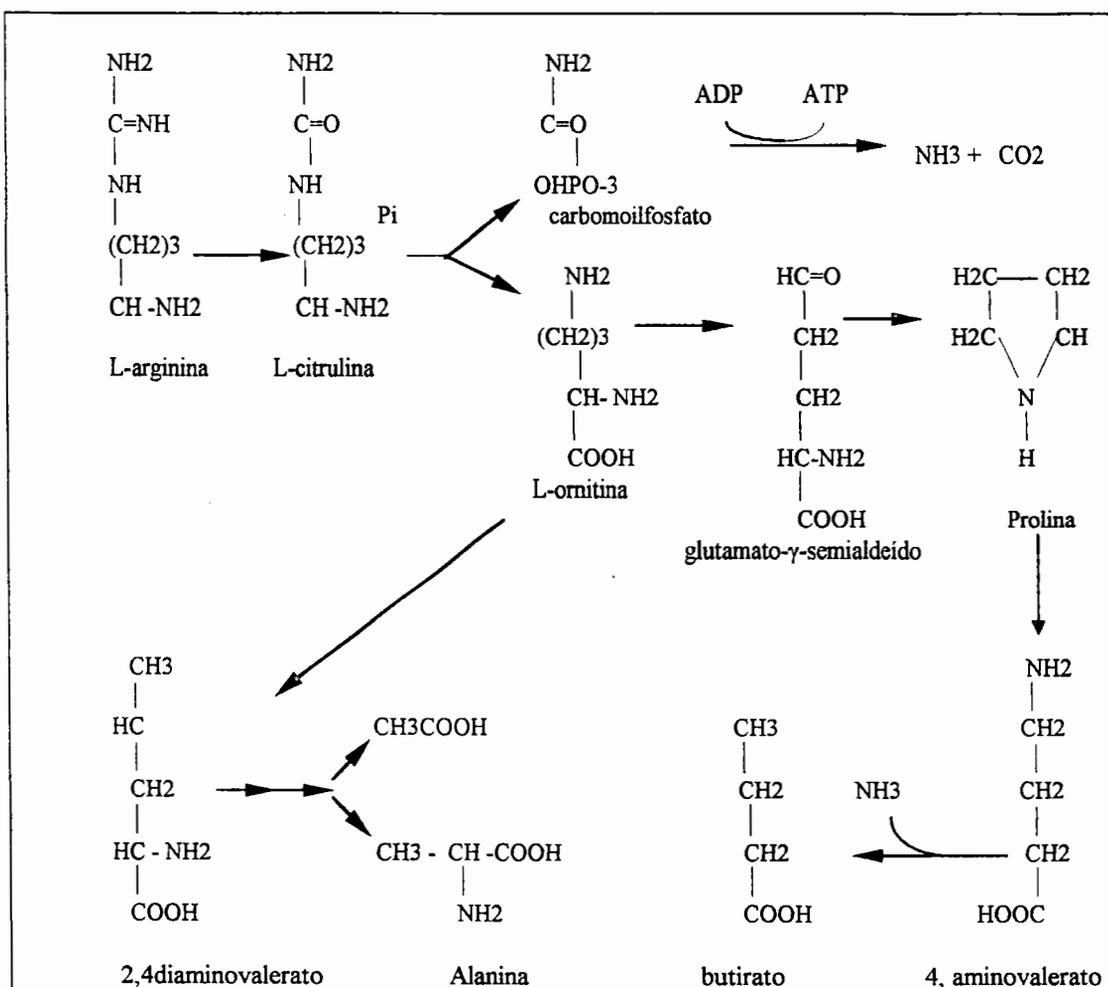
TABELA 5. Bactérias anaeróbias degradadoras de aminoácidos e seus principais produtos de fermentação.

Microorganismo	Aminoácido	Produtos
<i>C. histolyticum</i> <i>C. sporoferoides</i> <i>C. sticklandii</i> <i>C. subterminale</i> <i>C. difficile</i> <i>C. scatologenes</i>	Treonina Leucina Isoleucina Valina	Acético, propiônico, n-butírico, isobutírico, 3 e 2-metilbutírico, ácidos iso-capróico, n- valérico
<i>C. sporogenes</i>	Leucina , glicina	Acético, iso-butírico, iso valérico
<i>C. sticklandii</i>	Prolina, lisina Arginina, ornitin	Ornitina, acético, $\gamma$ -aminovalérico
<i>C. pasteurianum</i> , <i>C. propionicum</i> <i>C. histolyticum</i>	Treonina.	Butírico, propiônico, acético, aminobutírico
<i>C. histolyticum</i> <i>C. purinolyticum</i> <i>C. sticklandii</i> <i>C. sporogenes</i> <i>Peptococcus glycinophylus</i> ; <i>P. magnus</i>	Glicina	Acético
<i>Streptococcus faecalis</i> <i>S. lactis</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Mycoplasma arthridis</i>	Arginina	ornitina
<i>C. pasteurianum</i> <i>C. propionicum</i> <i>C. histolyticum</i>	Treonina	Acético, butírico, propiônico, aminobutírico
<i>C. propionicum</i>	Alanina	Acético, propiônico
<i>C. tetanomorphum</i> <i>Peptococcus aerógenes</i> <i>Fusobacterium sp</i> <i>Acidaminobacter hydrogenoformans</i> * <i>Selenomonas acidaminovorans</i> *	Glutamato	Propiônico, acético, butírico
<i>C. sticklandii</i> <i>C. subterminale</i>	Lisina	Acético, butírico
<i>Campylobacter sp</i> <i>Bacteroides melaninogenicus</i> <i>Selenomonas acidaminophyla</i>	Aspartato	Acético, succínico, propiônico
<i>Fusobacterium sp</i> <i>Clostridium sp</i>	Histidina	Acético, formaldeído, glutâmico
<i>C. acidurici</i>	Serina	Pirúvico, amônia.
<i>C. sporogenes</i>	Leucina	Succínico, acético, isobutírico.
<i>Spirochaeta isovalérica</i> <i>Bacteroides ruminicola</i>	Isoleucina	Ác. 2-metilbutírico
<i>C. sticklandii</i>	Ornitina	Acético, alanina, $\gamma$ -aminovalérico.
<i>C. bifermens</i> <i>C. sticklandii</i> <i>C. difficile</i> <i>C. tetani</i>	Fenilalanina Tirosina Triptofano	Fenilacético, fenilbutírico, fenil-lático. Hidroxifenil (acético, butírico, propionico) fenol Indol. ác. Indol-acético. indol-propiónico

Fontes: Mc INERNEY(1988), NAGAI e NISHIO (1989), \*STAMS et al. (1994)

Como exemplo de catabolismo envolvendo um único aminoácido temos a utilização de **arginina** por algumas espécies de clostrídios, algumas bactérias produtoras de ácido láctico, micoplasmas e muitas espécies de bacilos (VAN DEMARK e BATZING, 1986).

Nessa fermentação, arginina é convertida em citrulina, que na presença de fosfato inorgânico é "quebrada" para formar ornitina e um composto rico em energia: o carbamilo-fosfato. A degradação desse último resulta em  $\text{CO}_2$  e  $\text{NH}_3$  e na presença de ADP, forma-se ATP (Figura 6). A ornitina pode ser metabolizada por *C. sticklandii*. Essa via não é bem compreendida mas resulta nos produtos finais acetato, propionato, valerato e butirato.



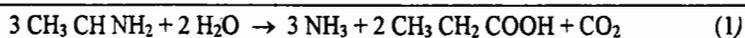
**FIGURA 6-** Metabolismo da arginina em clostrídios proteolíticos (DOELLE, 1981).

O metabolismo da **lisina** também leva a acetato e butirato como produtos finais maiores. A característica dessa via é a mudança do aminogruppo na molécula antes que a desaminação ocorra. Essas desaminações são catalisadas por desidrogenases dependentes de

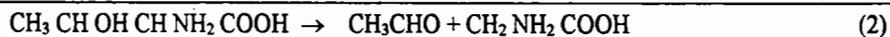
NAD. As vias a partir de ceto-aminoácidos não são completamente compreendidas, mas assume-se que os aminoácidos sofram uma clivagem tiolítica para formar acetato e o éster CoA é metabolizado gerando ácido butírico como produto final.

De acordo com Mc INERNEY (1988), a **lisina** pode ser fermentada por *C. subterminale* e *C. sticklandii* produzindo butirato, acetato e amônia e, experimentos usando marcadores indicaram que esse aminoácido pode ser degradado por três diferentes vias: uma onde o butirato é derivado dos carbonos 3 para o 6 da lisina; outra onde é derivado a partir do carbono 1 para 4 da lisina e, a terceira envolve formação de butirato a partir de 2 acetatos ou unidades acetyl. Evidências sugeriram que em extratos, a lisina é degradada quase exclusivamente pela primeira via.

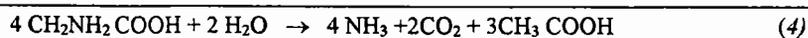
A **alanina** é fermentada a propionato, acetato e CO<sub>2</sub>, via acrilato em *C. propionicum* (KUCHTA & ABELES, SCWEISER & BUCHEL, apud Mc INERNEY, 1988)



A análise dos produtos de **treonina** por vários clostrídios mostraram padrões distintos (ELSDEN & HILTON, 1978). Muitas espécies produziram muito mais propionato e pouco n-butilato quando o meio de cultura foi suplementado com treonina. Algumas espécies produziram apenas acetato e um número de clostrídios produziu quantidades consideráveis de 2-aminobutilato a partir de treonina. BARKER (1961) postulou que a formação de acetato apenas pode envolver a clivagem direta da treonina à acetaldeído e glicina, seguida pela oxidação de acetaldeído para acetato e a conversão de glicina a acetato.



A fermentação de **glicina** produziu acetato, dióxido de carbono e amônia por *Peptococcus glycinophilus*.



Cepas de *Peptococcus*, *Micrococcus anaerobius*, *M. magnus* (*P. variabilis*), *C. histolyticum* e *C. purinolyticum* fermentaram glicina como na reação acima (DOUGLAS, DÜRRE & ANDREESSEN, GUILLAME apud Mc INERNEY (1988). Experimentos usando marcadores mostraram que a maior parte do  $^{14}\text{C}$  era encontrado no  $\text{CO}_2$  e em menor quantidade no acetato produzido. Outros experimentos usando traçadores de acordo com DÜRRE et al. (1983), levaram ao esquema da Figura 7.

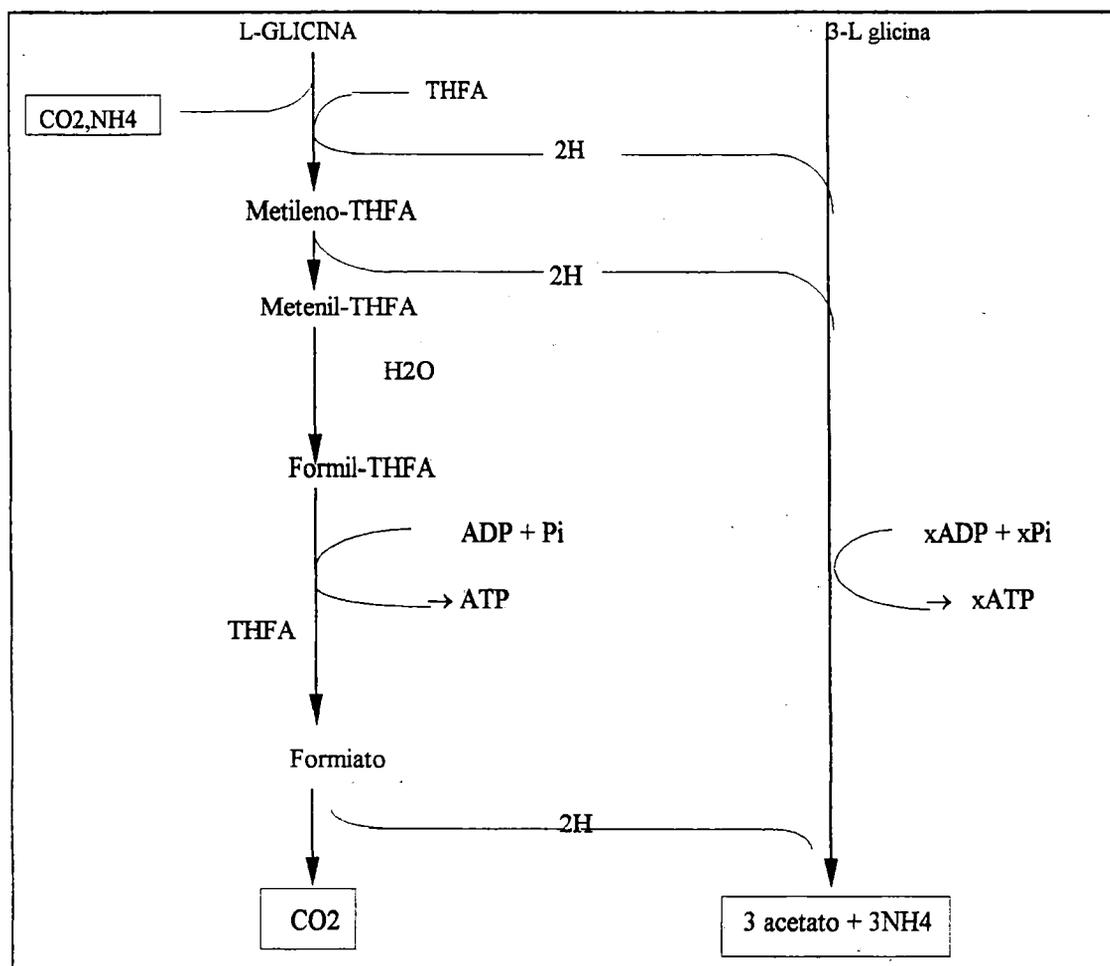


FIGURA 7- Esquema da degradação da glicina (DÜRRE et al., 1983).

A fermentação do glutamato tem sido descrita para um número de diferentes tipos de bactérias anaeróbias Gram -positivas e Gram-negativas (BARKER, Mc INERNEY apud GUANSCHENG et al., 1992). Os produtos de fermentação são específicos para cada cepa. Em adição, vias diferentes podem produzir os mesmos produtos. Cepas de *Clostridium* sp, *Fusobacterium* sp e *Peptococcus* sp fermentam glutamato para acetato, butirato,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (BARKER, 1981). Nesses organismos, as vias seguidas são as via metilaspártato e a via hidroxiglutarato. Algumas espécies homoacetogênicas fermentam glutamato para acetato

como único produto. *Selenomonas acidaminophila* degrada glutamato para acetato e propionato sendo que este último é formado via redução de oxalacetato a malato e fumarato a succinato. Já, a espécie *A. hydrogenoformans* fermenta glutamato a acetato, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e formiato (STAMS & HANSEN apud GUANSHENG et al.(1992). Quando esse organismo é cultivado com anaeróbios que consomem hidrogênio, o propionato também é formado, e neste caso por oxidação via  $\alpha$ -cetogluturato para succinil CoA. Esse fato também foi observado por GUANGSHENG et al. (1992) em culturas de *Selenomonas acidaminovorans*, sp. Nov. Uma via hipotética para a fermentação do glutamato esquematizada por CHEREMISINOFF (1989) está mostrada na Figura 8.

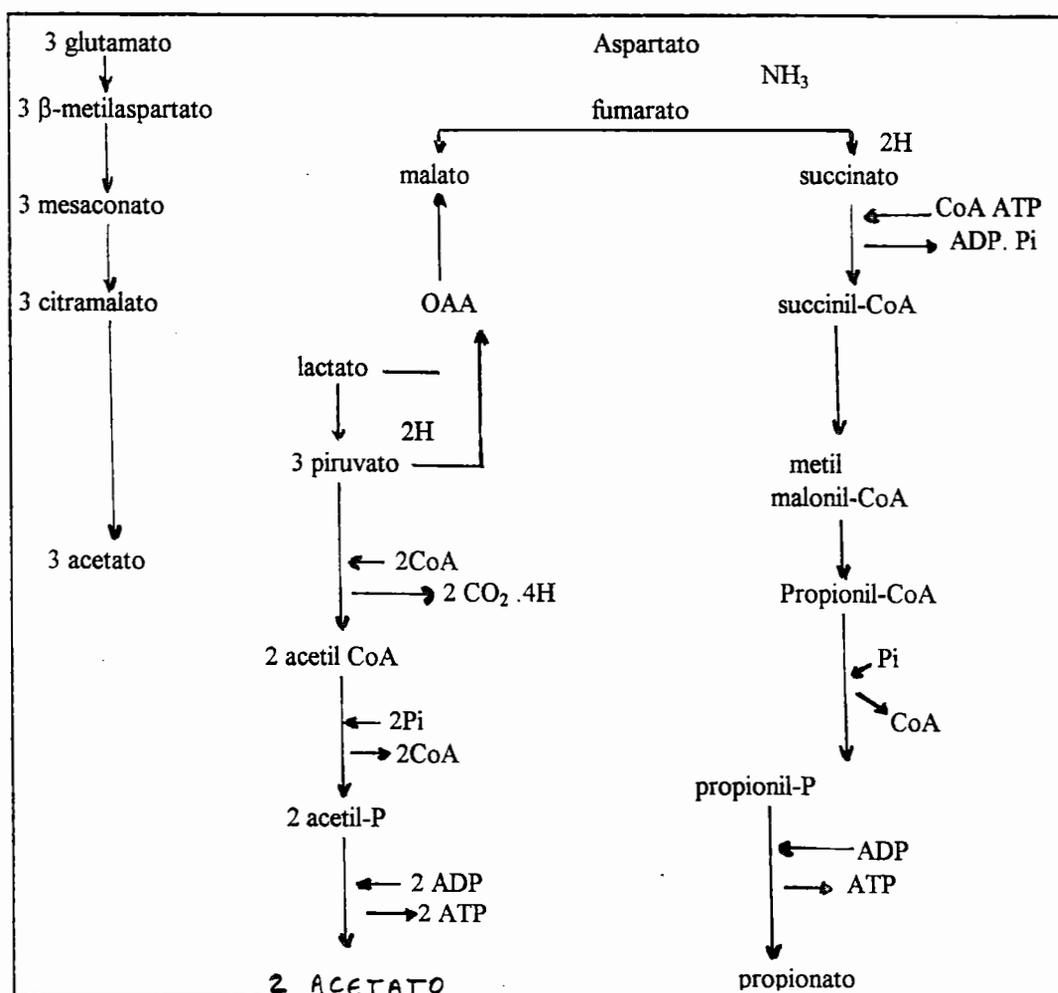
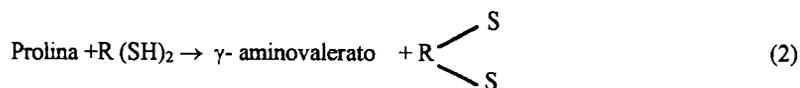
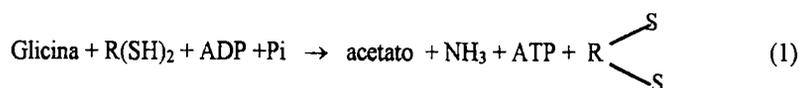


FIGURA 8 -Via hipotética para fermentação de glutamato por *Selenomonas acidaminophila* cepa Dk gluI6. Fonte: CHEREMISINOFF (1989).

Os aminoácidos podem também ser metabolizados aos pares (DOELLE, 1981; VAN DEMARK & BATZING, 1986, Mc INERNEY, 1988). Muitos clostrídios crescendo em hidrolisados de proteínas ou misturas de aminoácidos podem obter muita da sua energia através de reações acopladas de oxidação-redução entre aminoácidos disponíveis. Nessas reações um membro do par é oxidado enquanto outro é reduzido (ver esquema na Figura 9 de acordo com DOELLE, 1981). Alguns aminoácidos que servem como doadores de elétrons incluem alanina, leucina, isoleucina, valina e histidina. Aceptores incluem glicina, prolina, hidroxiprolina, ornitina, arginina e triptofano. Nem todos esses aminoácidos são usados pelas mesmas espécies e as taxa de utilização dos diferentes aminoácidos diferem para uma espécie particular (Mc INERNEY, 1988).

Evidências sugerem que a reação entre pares de aminoácidos compreende um número de etapas: a primeira envolve uma coenzima- NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) como acceptor primário de hidrogênio e um sistema desidrogenase de aminoácidos; a segunda etapa envolve a reoxidação de NADH<sub>2</sub> (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) por um acceptor de elétrons junto com um sistema redutase de aminoácido. O ATP (adenosina trifosfato) é produzido durante a formação do ácido carboxílico.

A redução de glicina e prolina tem sido estudadas com alguns detalhes



A redução de 1 mol de glicina (mas não prolina) está estequiometricamente acoplada à síntese de 1 mol de ATP (STADTMAN apud Mc INERNEY, 1988). Tanto NADH<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) como um dimercaptano pode servir como doador de elétrons na oxidação de aminoácidos como alanina, leucina, isoleucina e valina via um  $\alpha$ -cetoácido, bem como na redução da prolina.

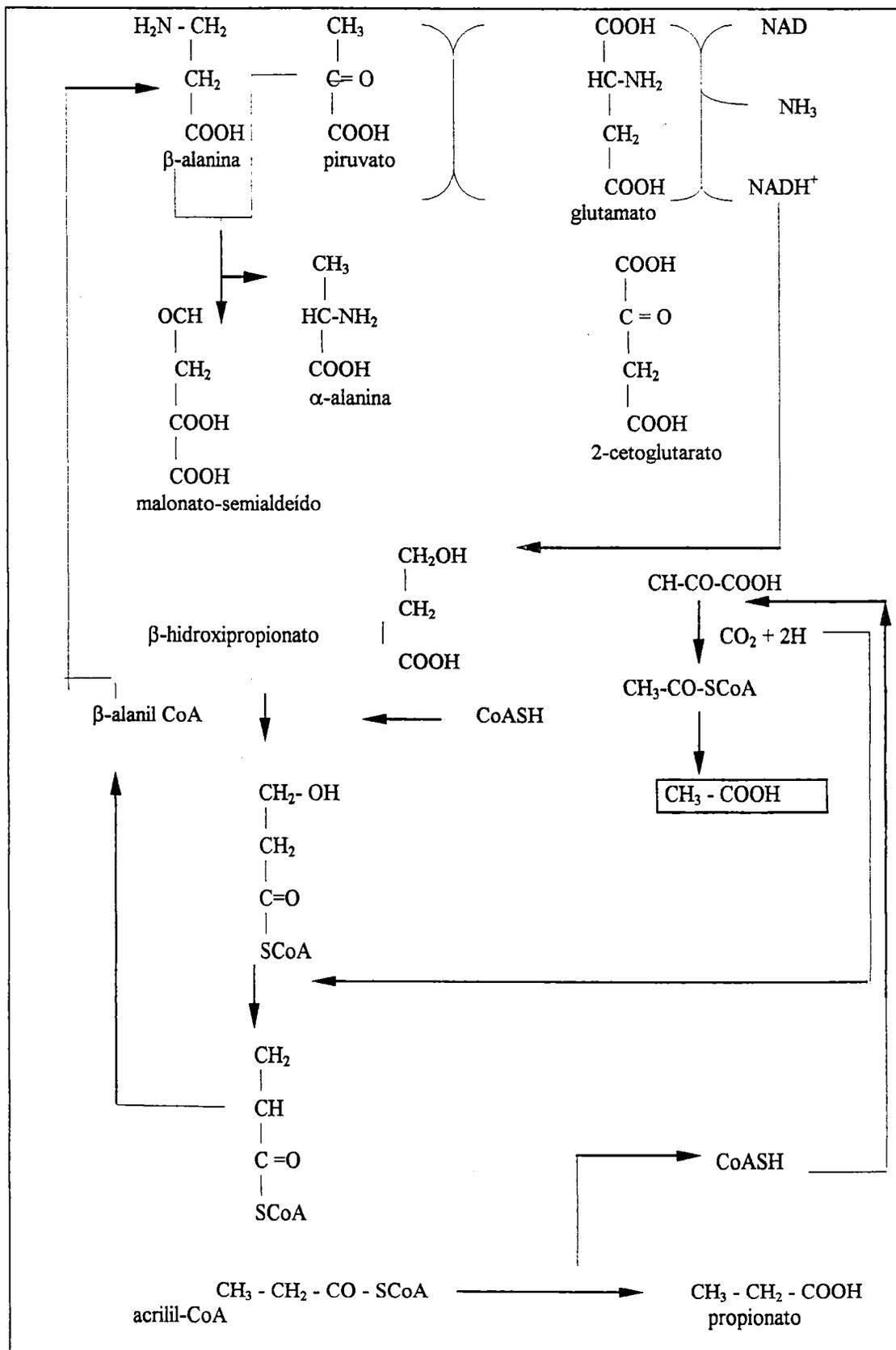


FIGURA 9. Reação de Stickland entre alanina e ácido ceto-pirúvico (DOELLE, 1981)

### ✂ 3. 2. 5. 1-. DEGRADAÇÃO DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS

Os produtos aromáticos resultantes da ação de 23 espécies de clostrídios incluem: fenilacetato, fenilpropionato a partir de fenilalanina, hidroxifenolacetato, hidroxifenilpropionato. Também incluem fenol e cresol a partir de tirosina e indol, e indolacetato e indolpropionato a partir do triptofano.

A redução desses aminoácidos a seus ácidos aromáticos presumivelmente envolve a formação de  $\alpha$ -cetoácidos por transaminação e, também uma descarboxilação oxidativa do  $\alpha$ -cetoácido, ou uma descarboxilação seguida pela oxidação do aldeído resultante (BUHLER et al., O'NEIL & De MOSS apud Mc INERNEY, 1988).

A redução de fenilalanina, tirosina e triptofano por clostrídios provavelmente ocorre via  $\alpha$ -ceto,  $\alpha$ -hidroxi e ácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados (BAKER, BUHLER e JEAN & De MOSS apud Mc INERNEY, 1988). As transaminases e desidrogenases de  $\alpha$ -hidroxiácidos tem sido purificadas ou parcialmente purificadas, mas a conversão de ácidos hidroxi-aromáticos para  $\alpha,\beta$ -insaturados, tem sido demonstrada apenas em extratos crus ou suspensões de células.

O anel aromático não é alterado por bactérias fermentadoras tais como clostrídios. Outras bactérias tais como *Syntrophus buswelli* (MOUTFORT & BRYANT apud Mc INERNEY, 1988), *Pelobacter acidigalii* (SHINK & PFENNING apud Mc INERNEY, 1988) e certas bactérias redutoras do sulfato (PFENNING & WIDDEL apud Mc INERNEY, 1988) são responsáveis pela clivagem do anel.

### ✂ 3. 2. 5. 2. ENERGÉTICA DA DEGRADAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Reações do tipo oxidação-redução podem ocorrer espontaneamente, mas a baixas taxas. Nos sistemas biológicos enzimas realizam essas reações e requerem a ação concomitante de coenzimas que são transportadores de elétrons, átomos de hidrogênio ou grupos químicos que se ligam transitoriamente às enzimas durante as reações. Exemplos de

coenzimas são o NAD(P) (nicotina adenina dinucleotídeo-fosfato); FAD (flavina adenina dinucleotídeo), ferredoxina e ATP (adenosina trifosfato). Muitas reações de oxidação-redução envolvem as coenzimas NAD e NADP que se tornam alternativamente oxidadas ou reduzidas pela aceitação ou doação de elétrons e dois prótons.

O ATP é formado a partir do ADP e energia que é derivada de reações redox funcionando assim como um transportador de fosfato e também de energia.

Reações de desaminação são sempre endergônicas sob condições padrão. Assim, elas não podem ocorrer a menos que equivalentes redutores produzidos sejam removidos do meio. Embora a maioria dos trabalhos sobre degradação anaeróbia de aminoácidos se refiram à termodinâmica da reação total (aminoácidos para ácidos graxos), pouca atenção tem sido dada às diferentes reações intermediárias envolvidas.

Em bactérias, o poder redutor é sempre o  $\text{NADH}_2$ . A mudança na energia livre durante a oxidação torna-se negativa quando a pressão parcial de hidrogênio cai abaixo de  $10^{-3}$  atm. Assim, à baixa pressão parcial de hidrogênio, o metabolismo seguirá para a formação de  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e acetato. Ao contrário, valores altos de hidrogênio promoverão a formação de  $\text{NADH}_2$  que será usado na produção de compostos mais reduzidos tais como, propionato, valerato, lactato e caproato (GOTTSCHALK apud MARTY, 1986).

Bactérias fermentativas e acetogênicas têm a capacidade de dispor de equivalentes redutores pela redução de prótons ou bicarbonato. Diferentes tipos de mediadores de elétrons podem estar envolvidos na quebra de substratos. NAD(P) é o aceptor de elétrons mais comum na degradação de açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos. Ferredoxina (Fd) está envolvida em algumas descarboxilações oxidativas, por exemplo, oxidação de piruvato a  $\alpha$ -cetoglutarato para acetil CoA e succinil CoA. FAD está envolvida em algumas reações especiais de desidrogenação de acetogênicas que oxidam ácidos graxos (STAMS 1994).

À baixa pressão parcial de hidrogênio ( $10^{-4}$  atm) a oxidação do NADH acoplada à formação de hidrogênio é energeticamente possível. Entretanto, a oxidação do  $\text{FADH}_2$  para redução de prótons requer pressões mais baixas, o que pode ser conseguido através da atividade de bactérias metanogênicas ou outras utilizadoras de hidrogênio Além disso, bactérias acetogênicas que formam  $\text{FADH}_2$  em processos catabólicos tem que investir energia para realizar essa oxidação.

Degradações obrigatoriamente sintróficas tem sido descritas para um grande número de compostos. Estes incluem álcoois (etanol, metanol), ácidos graxos (acetato, propionato, butirato), ácidos graxos de cadeia ramificada tais como isobutirato e isovalerato; glutamato, aspartato, alanina valina, histidina, leucina, isoleucina), outros compostos orgânicos (malato, lactato, gliocolato) e compostos aromáticos (benzoatos, hidroquinonas, fenol). No mínimo uma etapa da oxidação na conversão desses compostos é energeticamente difícil e tem que ser auxiliada por outras bactérias (STAMS, 1994)

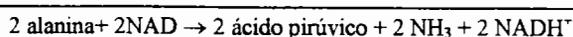
Na última década tornou-se claro que em ambientes metanogênicos, aminoácidos podem ser degradados por associações sintróficas de bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas. A etapa inicial da degradação de alanina, valina, leucina e isoleucina é uma desaminação ao  $\alpha$ -cetoácido correspondente, dependente de NAD(P). O  $\Delta G^{\circ}$  dessa reação quando acoplada com a formação de hidrogênio é cerca de +60 kJ/mol. Metanogênicas ajudam a realizar essa reação. O  $\alpha$ -cetoácido é convertido depois a um ácido graxo por uma oxidação provavelmente dependente de ferredoxina, uma reação que é energeticamente muito mais favorável ( $\Delta G^{\circ} = -50$  kJ/ mol) (STAMS, 1994).

Para MOOSBRUGGER et al. (1990) as vias acetogênica e metanogênica permanecem as mesmas, independentemente do substrato, mas a via acidogênica pode diferir bastante entre os tipos de substrato e estruturas orgânicas dentro de um tipo. Os autores estudaram as reações de acidogênese da caseína que consiste de 20 aminoácidos com estruturas químicas bem diferentes. Apesar dessas diferenças estruturais para a maioria dos aminoácidos, a fase acidogênica ocorre em dois estágios:

1-) Um estágio de desaminação com liberação de amônia e vários produtos orgânicos dependendo do aminoácido desaminado.

2-) Um estágio de oxidação onde os produtos de (1) são oxidados a ácidos graxos de cadeia curta, principalmente butírico, propiônico e acético.

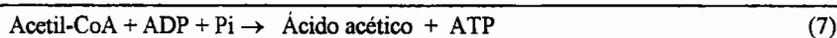
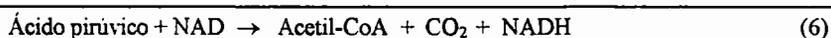
Qualquer que seja o tipo de desaminação, todas essas reações liberam amônia e dependem da pressão parcial de hidrogênio. Por exemplo para a alanina tem-se:



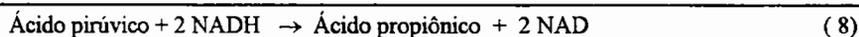
(5)

Essa reação ocorre a baixa pressão parcial de hidrogênio e termina aí, a menos que o NADH seja oxidado. Os produtos orgânicos e o NADH gerados nesse estágio podem ser oxidados por diferentes vias dependendo da natureza dos produtos orgânicos e da pressão de hidrogênio. Quando a  $p_{H_2}$  é menor que  $10^{-6}$  atm, a oxidação do NADH para NAD e  $H_2$  é termodinamicamente favorecida:

$NADH \rightarrow NAD(ox) + H_2$ , e o ácido pirúvico é oxidado:



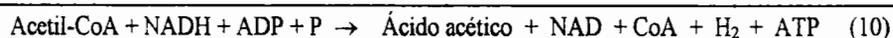
Quando a  $p_{H_2}$  se torna maior que  $10^{-6}$  atm, a oxidação de 2 moles de NADH gerado na equação 1 ocorre pela redução de 1 mol de ácido pirúvico à propiônico:



e outro:

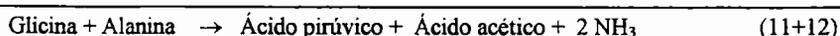
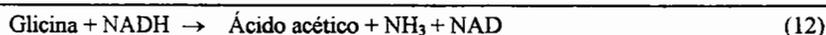
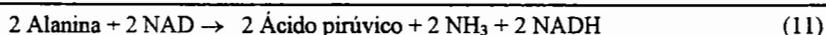


Na equação (5) a energia é requerida para oxidar NADH para NAD e  $H_2$ , o que é conseguido por acoplar numa reação energeticamente favorável (eq.2) para dar:



O resultado líquido é que piruvato é oxidado à propiônico, acético e  $H_2$ .

Na desaminação conjunta um aminoácido sob desaminação oxidativa pode ser acoplado com outro sob desaminação redutiva originando a reação de Stickland. O NADH gerado na primeira é usado para a segunda:



Essa última reação é independente da pressão parcial de hidrogênio. A Tabela 6 mostra a variação de energia livre ( $\Delta G^\circ$ ) para os diferentes mecanismos de degradação de aminoácidos estudados de acordo com ÖRLYGSON et al. (1995). Também mostra os valores da variação de energia livre quando os equivalentes redutores são canalizados para glicina (reação de Stickland) ou para metanogênicas hidrogenotróficas.

TABELA 6 .Mudanças na energia livre ( $\Delta G^{\circ}$ ) para os diferentes mecanismos de degradação de aminoácidos estudados.

Aminoácidos → produtos	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol)				
	Processo de desaminação <sup>a</sup>	Aminoácido para ácido graxo	Aminoácido para oxo-ácido <sup>b</sup>	Reação de Stickland <sup>c</sup>	Metanogênese <sup>d</sup>
Leucina + 3H <sub>2</sub> O → Isovalerato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	Ox	+4.2	+51.5	-151.4	-63.6
Valina + 3H <sub>2</sub> O → Isoutirato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	Ox	+ 9.7	+57.0	-145.9	-58.1
Alanina + 3H <sub>2</sub> O → Acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	Ox	+ 7.4	+54.7	-148.2	-60.4
Serina + 2H <sub>2</sub> O → Acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub>	W	-90.3	-43.1	-168.1	-124.2
Treonina + 2H <sub>2</sub> O → Propionato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub>	W	-78.2	-30.9	-156.0	-112.1
3 Treonina + 3 H <sub>2</sub> O → butirato <sup>-</sup> + 2Propionato <sup>-</sup> + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> + 3NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ox, R	-310.9	NC	NC	NC
Treonina + H <sub>2</sub> O → 2 acetato <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ox, R	-106.4	NC	NC	NC
Cisteína + 3H <sub>2</sub> O → acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> S	W	-57.9	-10.67	-135.7	-91.8
Metionina + 3 H <sub>2</sub> O → Propionato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub> SH	Ox, R, W	+137.4	+184.7	+61.8	+105.7
2 Glicina + 4 H <sub>2</sub> O → acetato <sup>-</sup> + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 2NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	Ox	-51.5	NC	NC	NC
Glicina + H <sub>2</sub> → acetato <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	R	-77.8	NC	NC	NC
4Glicina + 4H <sub>2</sub> O → 3 acetato <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 4NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ox,R	-207.5	NC	NC	NC

Fonte :ORLYGSSON et al. (1995) modificado

<sup>a</sup> Ox = desaminação oxidativa, R = desaminação reductiva, W = desaminação sem transferência de elétrons.

<sup>b</sup> Leucina para 2-oxoisocaproato, valina para 2-oxoisovalerato, alanina, serina e cisteína para piruvato e treonina para 2-oxobutirato.

<sup>c</sup> Calculado com glicina como um acceptor de elétrons

<sup>d</sup> Calculado com uma cultura mista de uma metanogênica utilizadora de hidrogênio ( 4 H<sub>2</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup> → CH<sub>4</sub> + 4H<sub>2</sub>O;  $\Delta G^{\circ}$  = -135. 6)

Segundo NAGASSE & MATSUO (1982), a degradação de alanina, valina e leucina é inibida por clorofórmio, um inibidor de metanogênese. Seus dados sugeriram que o  $H_2$  é produzido durante a degradação desses compostos. A adição de  $H_2$  na presença de bactérias redutoras do íon sulfato em lodo de esgoto, estimulou a degradação de alanina, serina, valina e leucina de acordo com NANNINGA & GOTSCHALL apud McINERNEY (1988). Segundo aqueles autores, pouca degradação de valina e leucina ocorreu nessas amostras a não ser quando a pressão parcial de hidrogênio era baixa.

A desaminação /descarboxilação oxidativa com produção de  $H_2$  de aminoácidos reduzidos, tais como alanina e leucina é energeticamente desfavorável em condições padrão e só ocorre quando a pressão parcial de  $H_2$  é mantida a um nível mais baixo pelas espécies que utilizam  $H_2$ . Nas condições padrão a produção de  $H_2$  é favorecida para aminoácidos mais oxidados, tais como glutamato.

De acordo com STAMS (1994), o glutamato é fermentado por *Acidaminobacter hydrogenoformans* para 2 acetato, 1  $CO_2$ ,  $NH_3$  e  $1H_2$ , ou para 1 propionato,  $2CO_2$ ,  $NH_3$  e  $2H_2$  como pode ser visto na Tabela 7.

Em cultura pura, a bactéria *A. hydrogenoformans* é também capaz de formar formiato. Contudo, na presença de *Methanobrevibacter arboriphilus*, uma utilizadora de hidrogênio, formiato não é formado. A taxa na qual acetato e propionato são formados depende da pressão parcial de hidrogênio. A formação de propionato é favorecida à baixas pressões parciais de hidrogênio. A barreira energética no metabolismo é a desaminação redutiva do glutamato a  $\alpha$ -cetoglutarato, amônia e hidrogênio ( $\Delta G^{\circ} = +59,9$  kJ/mol). A conversão de  $\alpha$ -cetoglutarato à propionato,  $2CO_2$  e  $H_2$ , procede via succinil-CoA, metilmalonil-CoA e propionil-CoA e é exergônica ( $\Delta G^{\circ} = -65,7$  kJ/mol). Quando a barreira energética é removida por cultivar o microrganismo em  $\alpha$ -cetoglutarato, propionato também é formado em cultura pura (STAMS, 1994).

*Clostridium sp* em meio de cultivo contendo glutamato, produz acetato via  $\beta$ -metilaspártato, porém, na presença de *M. arboriphilus*, ou em apenas  $\alpha$ -cetoglutarato, parece ocorrer a formação de acetato via um ciclo reverso do ácido cítrico (STAMS, 1994). Essas vias estão mostradas na Figura 10 (STAMS, 1994).

TABELA 7. Energética da produção de H<sub>2</sub> a partir de aminoácidos

Aminoácidos e seus produtos	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol)
a) Glutamato- + 3H <sub>2</sub> O → 2 acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub>	- 33.9
b) Glutamato + 4H <sub>2</sub> O → propionato + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2H <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	- 5.8
c) Glutamato- + H <sub>2</sub> O → α -cetoglutarato <sup>2-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub>	+ 59.9
d) Glutamato + 7 H <sub>2</sub> O → acetato <sup>-</sup> + 3 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sup>+</sup> + 5 H <sub>2</sub>	+70.3
e) Alanina + 3H <sub>2</sub> O → acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	+ 7.5
f) Leucina + 3H <sub>2</sub> O → isovalerato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	+ 4.2
g) Aspartato + 4H <sub>2</sub> O → acetato <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	- 14.0

Fonte: STAMS (1994) modificado de Mc INERNEY (1988)

O papel da transferência de hidrogênio e formiato na degradação sintrófica ainda é matéria controversa. Algumas bactérias acetogênicas podem crescer sintroficamente com metanogênicas que usam apenas hidrogênio, mas algumas outras acetogênicas requerem a presença de metanogênicas que usam ambos: hidrogênio e formiato. A inibição por formiato não significa necessariamente que a transferência de formiato é o mecanismo pelo qual elétrons são movimentados de acetogênicas para metanogênicas. As enzimas envolvidas nas reações de oxidação-redução e a localização dos componentes de transferência de elétrons tem de ser estudados com mais detalhes (STAMS, 1994).

ÖRLYGSSON et al. (1995) estudaram a degradação de diversos aminoácidos em condições termofílicas (55° C) numa cultura proteolítica em batelada e alimentada semi-continuamente na presença e ausência de metanogênese. Usaram BES (ácido bromoetanossulfônico) como inibidor da metanogênese e com aceptores de elétrons conhecidos da reação de Stickland (prolina, triptofano, betaina e sarcosina)

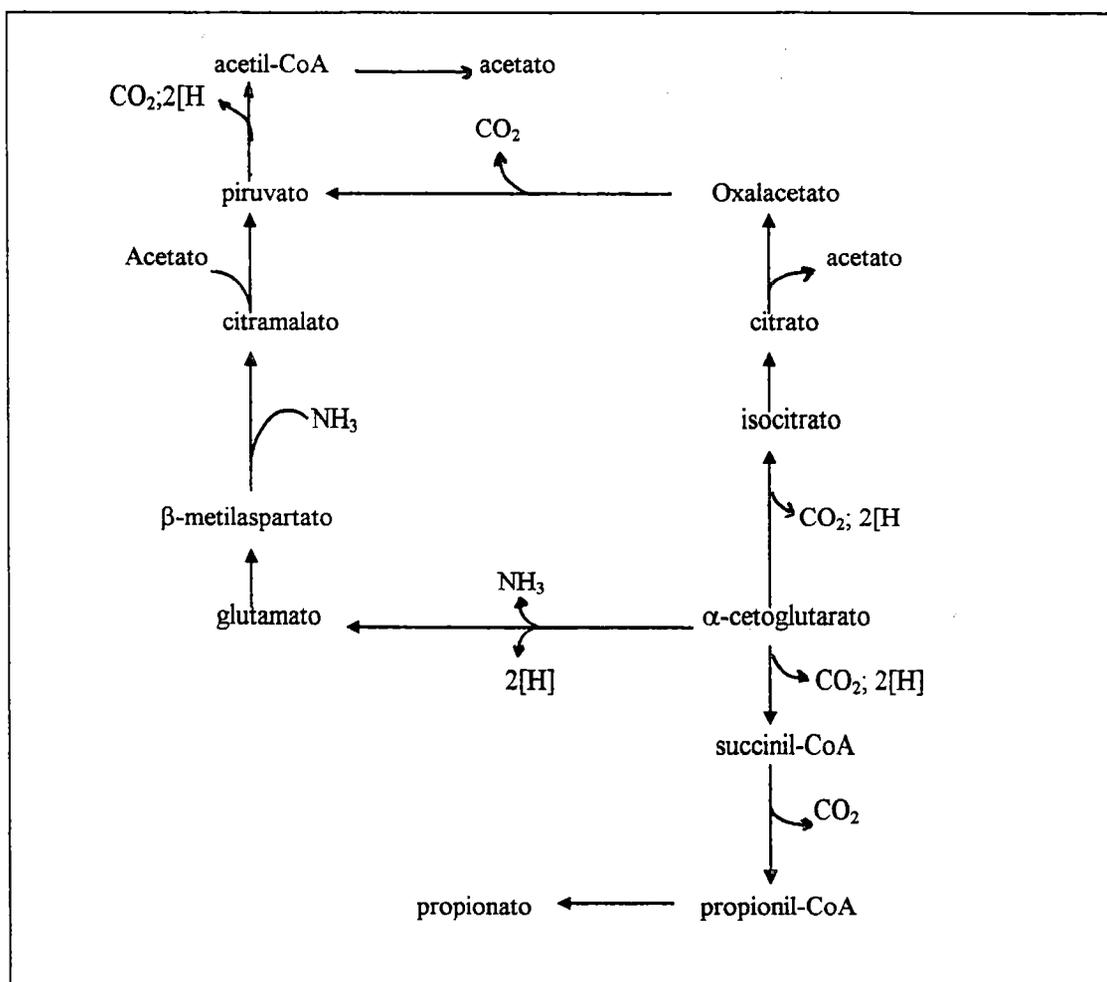


FIGURA 10- Vias envolvidas na fermentação do glutamato por *Acidaminobacter hydrogenoformans*. Fonte: STAMS (1994).

ÖRLYGSSON et al. (1995) observaram que sob condições metanogênicas **leucina** e **valina** foram quase completamente degradadas a isovalerato e isobutirato, respectivamente. Quando a metanogênese foi inibida com BES (ácido bromoetanosulfônico), 14 a 16% da leucina e 11% da valina foram degradados inicialmente (3 a 5 dias) e acumulou-se hidrogênio na fase gasosa. Após esse período a degradação cessou. A **alanina** foi degradada mais lentamente que quaisquer dos aminoácidos investigados. Sob condições metanogênicas, 55% deste aminoácido foi degradado, resultando na formação de acetato, hidrogênio e presumivelmente CO<sub>2</sub> e amônia. Já, na presença de BES a degradação da alanina parou quando sua concentração atingiu cerca de 2 mM. Uma pequena quantidade de butirato foi produzida nas culturas com esses três aminoácidos. Para os autores a degradação de leucina, valina e alanina ocorreu por uma desaminação oxidativa seguida por uma descarboxilação oxidativa resultando num oxi-ácido. Essas duas etapas dão origem a dois equivalentes

redutores e daí ácidos graxos, hidrogênio, CO<sub>2</sub> e metano. Prótons foram, provavelmente, os aceptores de elétrons mais importantes.

A **glicina** sob condições metanogênicas foi completamente degradada para acetato, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. A taxa de degradação foi similar a dos aminoácidos ramificados. Em condições de ausência de metanogênese, 5% da glicina foi degradada e hidrogênio acumulou-se na fase gasosa.

Os aminoácidos **serina** e **treonina** foram desaminados sem oxidações ou reduções. Ocorrem desidratações seguidas por hidratações originando os oxiácidos piruvato e 2-oxibutirato que são descarboxilados para acetato e propionato, respectivamente. Os produtos finais da degradação desses aminoácidos indicaram pelo menos em parte que esses aminoácidos foram degradados por esse mecanismo. Esse tipo de desaminação é termodinamicamente favorável e resulta em hidrogênio e metano. Os principais produtos da serina foram acetato, CO<sub>2</sub> e hidrogênio (metano) e pequenas quantidades de propionato e butirato. A degradação da treonina originou quantidades iguais de acetato e propionato sob metanogênese. Sob condições de inibição da metanogênese formou-se mais propionato e menos acetato. Também pequenas quantidades de valerato foram produzidas com a degradação de treonina, e glicina foi produzida como composto intermediário.

A **cisteína** foi completamente degradada para acetato e CO<sub>2</sub> e presumivelmente sulfeto de hidrogênio sob ambas as condições (com metanogênese e sem metanogênese). A **metionina** foi degradada em menores taxas resultando em propionato, metanetiol e CO<sub>2</sub> e pequenas quantidades de butirato. Os produtos de degradação da cisteína sugeriram que ela segue um padrão similar ao da serina, isto é, não envolve oxidações ou reduções na etapa de desaminação nem liberação de energia. Sulfeto de hidrogênio é removido na primeira etapa, e a subsequente adição de água produz NH<sub>3</sub> e piruvato. Este último é degradado para acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>.

A **metionina** pode ser degradada por bactérias anaeróbias no mínimo por quatro vias diferentes incluindo desaminações oxidativas e redutivas. O propionato pode ser o principal produto dessas vias e, de fato, foi produzido em quantidades proporcionalmente maiores que metanetiol o que indicou que a degradação foi muito complexa. Como as taxas de degradação foram algo maiores que as de leucina, valina e alanina, mas menores que as de

serina, treonina e cisteína, a degradação provavelmente resultou da combinação de mecanismos de desaminação oxidativas e redutivas.

Na conversão total de leucina, valina e alanina a ácidos graxos, apenas a descarboxilação de oxiácidos intermediários libera ATP (THAUER et al., BADER et al. apud ÖRLYGSSON et al. (1995). Isso foi confirmado no trabalho de ÖRLYGSSON et al.(1995). A produção de biomassa durante a degradação de serina, treonina, cisteína e metionina foram apenas algo menores sob condições não metanogênicas. O que foi uma surpresa para os autores uma vez que a produção de compostos reduzidos, isto é, decréscimo na produção de acetato deveria resultar em menor produção de ATP em anaeróbios de acordo com THAUER et al. apud ÖRLYGSSON et al.(1995).

O uso de aceptores de elétrons no meio (prolina, triptofano, betaína e sarcosina) não alterou as taxas de degradação de qualquer aminoácido nem alterou os padrões de degradação. Assim, as reações de Stickland não ocorreram sob as condições de cultura usadas. Ao invés disso, glicina foi oxidativamente desaminada, resultando na produção de hidrogênio. Segundo os autores, a importância da reação de Stickland na degradação de aminoácidos tem sido questionada e claramente justifica mais investigações (ÖRLYGSSON et al., 1995).

Outros aspectos da degradação de aminoácidos que têm sido estudados incluem o fluxo de hidrogênio e formiato entre bactérias acetogênicas e metanogênicas e a temperatura.

Para STAMS (1994), o fluxo desses compostos depende diretamente da área superficial da bactéria produtora, da constante de difusão, da diferença de concentração entre o organismo produtor e o consumidor e da distância entre ambos

A temperatura é outro fator importante. Cálculos dos valores de variação de energia livre a diferentes temperaturas mostraram que a formação de hidrogênio torna-se energeticamente mais favorável a temperaturas mais elevadas, enquanto reações que consomem hidrogênio tornam-se menos favoráveis (STAMS, 1994). Termodinamicamente, menores pressões parciais de hidrogênio podem ser atingidas pelas bactérias metanogênicas a menores temperaturas. O oposto é verdadeiro para maiores concentrações de hidrogênio que podem ser formados pelas acetogênicas. Um efeito similar mas pouco menos significativo

pode ser calculado para formiato por bactérias metanogênicas e formação de formiato por acetogênicas.

Um aumento na temperatura afeta o fluxo de hidrogênio e formiato de duas formas:

- a) Os coeficientes de difusão desses compostos tornam-se maiores e,
- b) O gradiente de concentração entre as metanogênicas e acetogênicas torna-se mais acentuado.

Como em culturas sintróficas as concentrações de hidrogênio e formiato são extremamente baixas, torna-se difícil deduzir qual dos dois é mais importante. O hidrogênio é muito pouco solúvel em água. A uma pressão parcial de hidrogênio de  $10^5$  Pa a concentração é apenas cerca de 1 mM. Além disso, a diferença de concentração entre acetogênicas e metanogênicas pode ser 1000 (mil) vezes maior na presença de formiato, do que na de hidrogênio, enquanto as constantes de difusão desses dois compostos em água difere apenas 30 vezes. Dessa forma, o fluxo de formiato pode ser muito maior (BOONE et al. apud STAMS, 1994). SCHINCK apud STAMS (1994), lançou a hipótese que durante a degradação sintrófica esses dois compostos têm que atravessar duas membranas lipofílicas, e que hidrogênio, mas não formiato, pode facilmente se difundir através dessas membranas.

Para STAMS (1994), em lodo granular metanogênico, a transferência de hidrogênio entre espécies pode ser mais importante devido as curtas distâncias interbacterianas que facilitam a difusão do hidrogênio através das membranas lipofílicas, compensando o fraco gradiente desse elemento entre bactérias acetogênicas e metanogênicas. Assumindo-se que bactérias tem um diâmetro de  $2 \mu\text{m}$ , calcula-se que em culturas contendo  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  e  $10^{11}$  células /mL, as distâncias médias entre as bactérias são cerca de 25, 10, 4 e  $0,5 \mu\text{m}$ , respectivamente. Assim em culturas sintróficas, as taxas de crescimento específico aumentam com o encurtamento das distâncias entre as bactérias. Esse efeito explicaria, por exemplo, as aparentemente longas fases lag de crescimento, frequentemente observadas durante o subcultivo de culturas sintróficas (STAMS, 1994).

### 3. 3. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS, ÁCIDOS GRAXOS, AMÔNIA E FOSFATO.

#### 3. 3. 1.-MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.

As proteínas podem ser determinadas através de métodos colorimétricos que se baseiam na formação de compostos coloridos devido a reações de certos grupos ou radicais presentes nas moléculas com reagentes químicos específicos. Dentre eles o método de Lowry (Folin-Ciocalteu), Biureto, Micro-Biureto, Azul de Comassie e ácido Bicinconínico.

O método do micro-biureto foi descrito por ITZHAK e GILL (1964); o método do ácido bicinconínico foi descrito por SMITH et al. (1985) e os demais por GERHARDT et al.(1981).

Esses métodos apresentam vantagens e desvantagens em termos de sensibilidade e de interferências. Com o método de Lowry, a reação da proteína com o íon cobre em solução alcalina e a redução do ácido fosfomolibdato-fosfotungstíco no reagente de Folin por aminoácidos aromáticos desenvolve uma coloração azul (reação do biureto). Esse método tem a desvantagem de apresentar um desenvolvimento de cor lento e muitos compostos interferem. Por exemplo, sais de amônio como  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  reduzem a cor em 15%. Também altas concentrações de sais de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{-2}$ , alguns açúcares, glicina e compostos com grupos sulfidríla, EDTA, Tris, interferem com a cor. A glicina a 0,5% causa uma diminuição 50% da cor desenvolvida pela proteína. De acordo com LAYNE apud BLUNDI (1988), esse método não sofre interferências de cor em relação às seguintes substâncias que possam estar presentes em amostras: uréia a 0,5%, guanidina a 0,5%, tungstato de sódio a 0,5%, sulfato de sódio a 1%, ácido perclórico a 0,5% (neutralizado), tricloroacético a 0,5 % (neutralizado), álcool etílico, éter a 5%, acetona a 0,5%, sulfato de zinco a 0,1% e hidróxido de bário a 0,5%. De acordo com o autor as duas maiores desvantagens do método consistem no fato de que a cor varia em função do tipo da proteína presente e não apresenta uma relação estritamente proporcional com a concentração da mesma. Contudo, o método apresenta uma sensibilidade cem vezes maior que a do método do Biureto.

O método do Biureto é baseado no desenvolvimento de cor azul por complexos formados entre peptídeos e íons cobre em soluções alcalinas. É uma reação muito menos

sensível que no procedimento de Lowry, mas apresenta a vantagem de consumir menos tempo e pode ser usada na presença de sais de amônio e outros materiais que interferem naquele método. Esse método de acordo com RUSSEL et al. (1981), além de uma relativa insensibilidade, precipita sais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  do meio.

O método do Micro-Biureto pode ser aplicado a qualquer tipo de proteína e não apresenta interferências mesmo em soluções contendo DNA em concentrações igual a 0,7% mg/L na mistura final. Concentrações de vários compostos presentes tais como cloreto de sódio 0,1N, formiato de sódio 0,75 N, ácido perclórico 0,67N, hidrogenofosfato disódico 0,01 M, não causam interferências. Por outro lado, sulfato de amônio a 20 e 40% diminuem a densidade ótica da amostra, cerca de 10 e 20% respectivamente. A uréia a 2,4 M pode causar um pequeno aumento na densidade ótica, o qual pode ser corrigido subtraindo-se o seu valor correspondente, obtido de amostras contendo somente esse composto. A sensibilidade desse método é seis vezes maior do que a do método do Biureto normal, e cerca de 1/6 da do método de Lowry (BLUNDI, 1988)

Com o método do Azul de Comassie, esse composto é usado como corante. Proteínas quando se ligam a corantes causam uma mudança no espectro de absorção do mesmo. Este corante existe em duas formas; uma forma aniônica vermelha que é convertida para azul quando o corante se liga aos grupos amina das proteínas. Esse método descrito por SEDLACK & GROSSBERG (1977) é rápido e de fácil execução. A sensibilidade do corante é comparável ao procedimento de Lowry. Esse processo é aplicável a amostras com proteínas solúveis. Detergentes interferem com o desenvolvimento da cor. Um dos problemas encontrados foi a adsorção dos corantes às cubetas de quartzo usadas na leitura (BRADFORD, 1976).

As proteínas também podem ser determinadas com ultra violeta, em que elas apresentam uma absorção máxima a 280 nm devido à presença de aminoácidos aromáticos: tirosina e triptofano. Esses dois aminoácidos estão presentes em aproximadamente todas as proteínas, e suas proporções relativas a outros aminoácidos normalmente variam numa faixa muito estreita. A absorção no ultra violeta é um meio adequado para se estimar proteínas em soluções que não contenham mais que 20% em peso de outros compostos que absorvam nessa faixa, tais como ácidos nucleicos ou fenóis e a solução não deve apresentar turbidez.

O método de Kjeldahl é um método de doseamento do nitrogênio e é considerado um método de referência para proteínas. É um método complexo e consome tempo. A amostra é aquecida em presença de ácido sulfúrico, de um sal oxidante (como o sulfato de cobre), e de outro sal (como o sulfato de potássio) para elevar o ponto de ebulição. O nitrogênio da amostra é convertido no íon amônio. Esse amônio é convertido em  $\text{NH}_3$  volátil com uma solução de NaOH. A mistura é destilada e recebida numa solução padrão de ácido que fixa o amoníaco destilado. A solução ácido-amoníaco parcialmente neutralizada é retrotitulada até a sua acidez original com um ácido padrão usando um indicador. A quantidade de amoníaco dá a quantidade de nitrogênio na amostra original. Esse método fornece o valor do conteúdo total de nitrogênio da amostra. As técnicas de digestão usadas para cada tipo de amostra incluem aquelas para água do mar, água de lagos e águas residuárias. Técnicas para amostras sólidas incluem aquelas para solo, sedimentos, materiais de plantas, materiais animais, e microbianos. As técnicas para os diferentes tipos de amostras estão disponíveis na literatura. Para se calcular o nitrogênio das proteínas, deve-se determinar o nitrogênio não protéico (NNP) e subtraí-lo do total. O conteúdo médio de nitrogênio das proteínas é 16 e multiplica-se o valor nitrogênio protéico por 100/16 ou 6,25 para se obter a concentração total de proteínas na amostra.

O método do ácido bicinconínico (SMITH et al. 1985), utiliza este sal de sódio solúvel em água que é um reagente altamente específico para  $\text{Cu}^{1+}$ . Esse sal forma um complexo de cor púrpura intensa com proteínas e íons cobre em solução alcalina. Essa técnica oferece maior tolerância à substâncias interferentes que o método de Lowry, tais como, com detergentes aniônicos e sais simples usados como tamponantes, e é tão sensível quanto aquele. O desenvolvimento de cor na reação atinge um máximo em pH 11,25. Também diferentes proteínas testadas com esse método mostram absorvâncias similares às do método de Lowry, mas maior sensibilidade em relação à gelatina.

A revisão de literatura para determinação da degradação de proteínas em biodigestores tem mostrado que vários métodos têm sido usados, tais como, o do Biureto e de Lowry com suas alternativas, o método do azul de Comassie e o método de Kjeldahl.

### 3.3.2. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

As análises de aminoácidos são feitas em geral, após hidrólise ácida. As reações químicas dos aminoácidos são numerosas devido aos diferentes grupos reativos existentes na mesma molécula. Os aminoácidos podem ser determinados através de métodos colorimétricos, microbiológicos, enzimáticos e cromatográficos. Métodos microbiológicos e enzimáticos não serão considerados nesta revisão.

Dentre os *métodos colorimétricos* estão o método do TBNS (Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico) citado por FIELDS (1972). É um método complexo e pode sofrer interferências.

*Reação com ninidrina* (YEMM & COCKING, 1954). Os aminoácidos reagem com o hidrato de tricetoidrindeno (ninidrina) produzindo  $\text{CO}_2$ , amoníaco, e um aldeído contendo um carbono a menos que o aminoácido. Essa reação produz uma cor azul ou roxa, útil para a determinação colorimétrica quantitativa de aminoácidos. Contudo, essa reação colorimétrica não é específica para aminoácidos, já que a cor com ninidrina é produzida pelo  $\text{NH}_3$  e por muitos compostos aminados, incluindo peptídeos e proteínas, em condições nas quais  $\text{CO}_2$  não é liberado na reação. A prolina e a hidroxiprolina apresentam produtos amarelos com a ninidrina.

Reações específicas. Algumas das reações coloridas apresentadas por aminoácidos particulares também são apresentadas pela maioria das proteínas, e assim ajudam na sua identificação:

*Reação de Millon-* Quando compostos fenólicos são aquecidos com  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  em meio contendo uma pequena quantidade de  $\text{HNO}_2$ , obtêm-se uma cor vermelha. As proteínas que contêm tirosina dão essa reação.

*Reação de Sakaguchi-* As guanidinas em solução alcalina produzem uma cor vermelha com o reagente que contém  $\alpha$ -naftol e hipoclorito de sódio. A reação é produzida por arginina e por proteínas que contêm esse aminoácido.

*Teste do nitroprussiato-* a cisteína e as proteínas que contêm grupos sulfidrila livres dão uma cor vermelha com o nitroprussiato de sódio em solução amoniacal diluída.

*Reação de aldeído*- Os derivados do indol apresentam produtos fortemente coloridos com uma série de aldeídos aromáticos. Com o p-dimetilaminobenzaldeído em  $H_2SO_4$ , obtém-se uma cor vermelho roxo com triptofano (reação de Ehrlich). O teste pode ser usado para determinação quantitativa de triptofano nas proteínas.

*Reação de Folin*- Os aminoácidos em solução alcalina dão uma cor vermelha forte com o 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio. Esse método é usado para determinação quantitativa de aminoácidos.

*Reação de Pauly* -para histidina e tirosina. Esses dois aminoácidos acoplam-se com o ácido sulfanílico diazotizado em solução alcalina, produzindo uma cor vermelha.

Métodos cromatográficos- são usados para separar e detectar misturas de aminoácidos. Essa técnica depende do uso de adsorventes que têm afinidades específicas para as substâncias adsorvidas.

A cromatografia de partição em papel tem sido usada para detectar aminoácidos e muitos métodos vêm sendo usados para determinação quantitativa.

A cromatografia de troca iônica é amplamente usada para a separação de aminoácidos. Emprega resinas sintéticas, sendo algumas aniônicas e outras catiônicas. Uma resina de poliestireno sulfonado carrega muitos grupos  $SO_3H$ . Quando uma coluna contendo esta resina é tratada com tampão pH 3,0, contendo íons sódio, a resina converte-se à forma  $SO_2Na$ . Aminoácidos catiônicos introduzidos no topo desta coluna deslocarão sódio e serão retardados ou fortemente adsorvidos, dependendo do grau de retardamento ou adsorção da basicidade de cada aminoácido. Assim, aminoácidos como o aspártico e glutâmico emergem antes da maioria dos aminoácidos neutros, e muito antes que os aminoácidos básicos. Até aminoácidos neutros podem ser separados, pois apesar de terem valores de pK similares, as cadeias laterais têm diferentes afinidades não polares pela resina. Ninidrina é adicionada ao efluente da coluna para que a cor seja registrada numa fotocélula. Os picos de saída de cada aminoácido são registrados num cromatograma e a integração das áreas debaixo de cada pico permitem a avaliação quantitativa dos aminoácidos. A identificação de cada aminoácido é fácil, já que em condições controladas a posição de saída para cada aminoácido é constante.

### **3. 3. 3.- MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMÔNIA E FOSFATO.**

O nitrogênio, juntamente com o fósforo, são elementos indispensáveis ao crescimento de microrganismos e plantas, sendo por isso, denominados de nutrientes essenciais.

#### **3. 3. 3. 1.- MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AMÔNIA**

No esgoto, o nitrogênio presente em amostras recém coletadas, é constituído de matéria protéica e uréia, as quais são decompostas em amônia através da ação bacteriana.

Vários métodos tem sido usados para determinação da amônia e estão disponíveis na literatura incluindo o "Standard Methods". Modificações de métodos convencionais como os do hipoclorito e o método de Nessler descritos por GERHARDT (1981), tem sido utilizados por diferentes pesquisadores.

Os dois maiores fatores que influenciam na seleção do método são a concentração e a presença de interferentes. Em geral a determinação direta de baixas concentrações de amônia, estão confinados às águas potáveis, águas claras de superfícies ou subsolo e efluentes de águas residuárias de boa qualidade. Por outro lado, onde substâncias interferentes estão presentes, destilação das amostras pode ser necessária.

A amônia pode ser determinada aumentando-se o pH do meio e submetendo-se a amostra à destilação. Os vapores que absorvem a amônia gasosa são condensados e a amônia é dosada colorimetricamente.

O nitrogênio orgânico é determinado pelo método de Kjeldahl. A amostra é primeiramente aquecida à ebulição, para expelir a amônia presente, e, em seguida é submetida a um processo de digestão. Durante esse processo de digestão o nitrogênio é convertido em amônia. O nitrogênio total é determinado de forma semelhante, porém a amônia não é expelida na primeira etapa anterior à digestão. Assim, o nitrogênio total corresponde ao nitrogênio orgânico e a amônia presentes.

Uma determinação fácil de  $\text{NH}_4^+$  está baseada na reação de amônia, hipoclorito e fenol formando indofenol azul. A reação é catalizada por manganês. A cor é medida em colorímetro ou espectrofotômetro a 630 nm. As maiores desvantagens desse método são o uso de fenol e a instabilidade dos reagentes. Podem interferir substâncias particuladas, substâncias coloridas, excesso de álcali ou ácidos, compostos nitrogenados de baixo peso molecular. Assim, essa técnica pode requerer destilação prévia das amostras (GERHARDT et al., 1981).

Outra determinação fácil é pelo método de Nessler, em que a amônia reage com mercúrio e iodeto em uma solução alcalina para produzir uma coloração complexa que é medida em colorímetro ou espectrofotômetro. A maior desvantagem do método é a utilização de compostos de mercúrio. Essa técnica pode sofrer interferência de compostos particulados, substâncias coloridas, íons de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{S}^-$ ,  $\text{Mn}^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  e compostos orgânicos de baixo peso molecular, por isso, é uma técnica recomendada para amostras de água pura (GERHARDT et al., 1981).

### 3.3.3.2. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO FOSFATO.

A presença de fósforo em águas residuárias domésticas pode ter origem animal ou vegetal, ou ainda ser devido a adição de produtos de uso doméstico que contenham esse elemento. Em águas residuárias industriais, o fósforo pode ser proveniente da adição de compostos desse elemento empregado pelas indústrias nos processos de fabricação de certos produtos (SEDLAK, 1991)

O fósforo pode apresentar-se sob a forma de ortofosfatos, polifosfatos e fosfato orgânico. Ele ocorre em solução, em material particulado ou nos corpos de organismos. Pequenas quantidades de fosfatos são adicionados em algumas águas durante o processo de tratamento. Grandes quantidades de fosfato podem ser adicionados com produtos comerciais usados na limpeza e nas águas de caldeiras. Ortofosfatos são adicionados como fertilizantes. Fosfatos orgânicos são formados primeiramente por processos biológicos e também contribuem para os resíduos de esgotos como resíduos corporais ou alimentares.

As análises de fosfato englobam dois processos gerais: a) conversão da forma do fósforo de interesse para ortofosfato dissolvido e, b) determinação colorimétrica do ortofosfato dissolvido. A separação do fósforo nas várias formas é definido analiticamente e as várias metodologias podem ser encontrados no STANDARD METHODS.

O método descrito por MENZEL & VACARO (1964) apud KOROLEFF (1976) usado para determinação de fósforo em águas de rios, lagos, etc, baseia-se no fato que em meio ácido fosfatos reagem com molibdato de amônio e antimônio-tartarato de potássio formando um complexo que é reduzido por ácido ascórbico resultando numa coloração azul.

De acordo com o STANDARD METHODS (1995), arseniatos podem interferir na determinação de fosfato com concentrações tão baixas como 0,1 mg As/L (reage com molibdato formando coloração azul ). Cromo hexavalente e  $\text{NO}_2^-$  podem resultar num decréscimo de 3% a menos no resultados quando em concentrações de 1 mg/L e 10 a 15% a menos quando presentes em concentrações de 10 mg/L. Sulfeto ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e silicatos não interferem nas concentrações de 1 e 10 mg/L.

### 3. 3. 4. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS.

A identificação e determinação de produtos da fermentação formados em meios de cultura contendo microrganismos fornece meios para se estudar o metabolismo microbiano. Os métodos usados para essas determinações incluem: cromatografia de camada fina (TLC-thin layer), cromatografia gás-sólido (GSC), cromatografia gás-líquido (GLC), e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os métodos do HPLC e GLC são as mais populares e mais precisas que os outros métodos disponíveis (PAAVILAINEN & KORPELA, 1993).

Ácidos graxos voláteis incluem componentes tais como acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato e isovalerato. São componentes de baixo peso molecular e são descritos como voláteis uma vez que podem ser destilados sob condições ácidas (COLLINS & BRAGA, 1988).

Gases e substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando a cromatografia gasosa. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária através de um sistema de injeção. O uso de temperaturas convenientes no local da injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização destas substâncias, que de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, serão retidos por tempos determinados e chegarão à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna, torna possível a detecção e quantificação destas substâncias (COLLINS & BRAGA, 1988).

#### 4. ESTUDOS CINÉTICOS DO TRATAMENTO ANAERÓBIO

Com o desenvolvimento de biodigestores com aquecimento e mistura, a digestão anaeróbia tem-se tornado o método mais comum de estabilização do lodo. A digestão anaeróbia tem sido aplicada a resíduos agrícolas como por exemplo, resíduos de plantas, de animais e águas residuárias consideradas águas concentradas, i.é.com alto teor de sólidos orgânicos biodegradáveis. O reconhecimento das vantagens do processo anaeróbio levou ao desenvolvimento de novas configurações de biodigestores capazes de tratar resíduos coloidais e solúveis com média e baixa carga orgânica (JEWELL, 1987 apud PAVLOSTHATIS & GIRALDO-GOMEZ, 1991).

O processo cinético tem um papel central no desenvolvimento e operação de sistemas de tratamento anaeróbios. baseados na bioquímica e microbiologia dos processos anaeróbios, a cinética fornece uma base racional para análises, controle e projetos dos processos. Em adição, a descrição quantitativa das taxas de utilização de resíduos, o processo cinético também trata dos fatores operacionais e ambientais que afetam essas taxas. Um conhecimento profundo da cinética permite a otimização da eficiência do processo, uma operação mais estável bem como melhor controle dos processos.

A degradação anaeróbia de materiais orgânicos particulados complexos tem sido descrita como um processo multietapas de reações em série e paralelas.

O processo de tratamento biológico tem sido descrito com sucesso pela teoria do cultivo contínuo de microrganismos e processos cinéticos tem sido utilizados para a descrição matemática de processos aeróbios e anaeróbios.

A cinética do crescimento biológico está baseada em duas relações fundamentais: a taxa de crescimento e a utilização do substrato. O efeito da concentração do substrato como limitante do crescimento (isto é, o nutriente essencial) na taxa de crescimento microbiano, tem sido descrito por vários modelos matemáticos: MONOD (1949); MOSER (1958); CONTOIS (1959); GRAU et al.(1975).

A respiração endógena, comumente definida como auto destruição da biomassa, manutenção celular, predação, morte e lise celular, levam ao decréscimo da massa celular.

Esses processos são importantes para os sistemas de tratamento especialmente o anaeróbio, uma vez que eles normalmente operam à baixas taxas específicas de crescimento. Para analisar o efeito desses processos na taxa de crescimento líquida, uma queda na taxa de microrganismos é normalmente usada para a modificação da taxa de crescimento (LAWRENCE & McCARTY, 1970; LAWRENCE, 1971).

O uso de relações cinéticas fundamentais e a aplicação de balanço de massa para a biomassa e o substrato taxa-limitante, levou ao desenvolvimento de equações para as várias configurações de reatores. Considerando-se um biodigestor de mistura completa pode-se utilizar as reações para ilustrar as diferentes condições quando a concentração de microrganismos no influente é desprezada. De acordo com o modelo de utilização do substrato de LAWRENCE & McCARTY (1970), a concentração de microrganismos no efluente no "estado estacionário" é dada por:

$$X = \frac{\theta_c}{\theta} \frac{Y(S_0 - S)}{1 + b \theta_c} \quad (1)$$

Onde,  $X$  = Concentração de microrganismos (M.L.<sup>-3</sup>)

$\theta$  = Tempo de retenção hidráulica (T)

$\theta_c$  = Tempo de retenção de sólidos (ou tempo de retenção celular médio) (T)

$y$  = coeficiente de crescimento (M.M.<sup>-1</sup>)

$S_0$  e  $S$  = concentração do substrato taxa-limitante no influente e efluente (M.L.<sup>-3</sup>).

$b$  = taxa de decaimento específica de microrganismos (T<sup>-1</sup>)

A **Tabela 8** mostra vários modelos usados nos estudos da digestão anaeróbia. De acordo com os modelos de CONTOIS (1959), CHEN & HASHIMOTO (1978) e GRAU et al. (1975), a concentração do substrato efluente ( $S$ ) é uma função da concentração do substrato influente ( $S_0$ ). É um melhoramento do modelo de MONOD em que  $S$  é independente de  $S_0$ . Em essência, os dois primeiros modelos mostram explicitamente que a carga orgânica afeta a eficiência do biodigestor.

TABELA 8. Modelos cinéticos usados no tratamento anaeróbio (\*)

<i>Primeira ordem</i>		
$\mu = \frac{\kappa S \dots - b}{S_0 - S}$	$\frac{-dS}{dt} = \kappa S$	$S = \frac{\dots S_0 \dots}{1 + \kappa \theta_c}$
<i>GRAU et al.</i>		
$\mu = \frac{\mu S \dots - b}{S_0}$	$\frac{-dS}{dt} = \mu X S$	$S = \frac{S_0 (1+b) \theta_c}{\mu \theta_c}$
<i>MONOD</i>		
$\mu = \frac{\mu S \dots - b}{\kappa_s + S}$	$\frac{-dS}{dt} = \frac{\mu X S}{Y(BX + S)}$	$S = \frac{K_s (1+b \theta_c)}{\theta_c (\mu - b) - 1}$
<i>CONTOIS</i>		
$\mu = \frac{\mu m S \dots - b}{BX + S}$	$\frac{-dS}{dt} = \frac{\mu m X S}{Y(BX + S)}$	$S = \frac{B Y S_0 (1+b \theta_c)}{B Y (1+b \theta_c) + \theta_c (\mu - b) - 1}$
<i>CHEN &amp; HASHIMOTO</i>		
$\mu = \frac{\mu S}{K S_0 = (1-K) S} - b$	$\frac{-dS}{dt} = \frac{\mu X S}{KX + YS}$	$S = \frac{K S_0 (1+b \theta_c)}{(K-1) (1+b \theta_c) + \mu \theta_c}$

(\*)  $S$  é a concentração do substrato no efluente para um reator de mistura completa no estado de equilíbrio;  $K$  é a taxa máxima específica de utilização do substrato;  $\kappa_s$  é a constante de meia saturação.

Fonte : PAVLOSTATHIS & GIRALDO-GOMEZ (1991) modificado.

Muitas das tentativas de descrever a cinética dos processos de tratamento anaeróbio tem considerado a assim chamada etapa taxa-limitante. Em geral, quando um processo é composto por uma sequência de reações, uma etapa normalmente é mais lenta que as outras.

A etapa mais lenta tem sido considerada como taxa controladora, taxa limitante ou etapa taxa-determinante (HILL, 1977).

LAWRENCE (1971), propôs que a etapa taxa-limitante pode ser definida como “aquela etapa que irá causar falhas no processo por ocorrer sob condições de stress cinético”. Para uma cultura contínua, o stress cinético refere-se à imposição de um valor de tempo de retenção de sólidos sendo continuamente reduzido até um valor tão baixo que limite o processo e resulte na lavagem dos microrganismos com diminuição na produção de metano, decréscimo da destruição de substrato e aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia curta e longa.

Alguns autores como O'ROURKE (1968) apesar de considerar as etapas como hidrólise, fermentação, acidogênese e metanogênese, basearam suas fórmulas de cinética na conversão de ácidos graxos de cadeia curta e longa à metano. Outros autores tais como GHOSH (1981), EASTMAN & FERGUNSON (1981), GOSSETT & BELSER (1982), PAVLOSTATHIS & GOSSETT (1986) e PAVLOSTATHIS & GOSSETT (1988) apud PAVLOSTATHIS E GIRALDO-GOMEZ (1991) apontaram a etapa de hidrólise como a mais importante. Está cada vez mais explícito que o tipo de resíduo que está sendo digerido (por exemplo, material solúvel, particulado, ou sua composição química) é que diz quais etapas precisam ser consideradas, o que explica porque diferentes pesquisadores trabalhando diferentes tipos de resíduos tem formulado modelos diversos. Na digestão anaeróbia, a etapa taxa-limitante está relacionada à natureza do substrato, configuração do processo, temperatura e taxa de carga (SPEECE, 1983)

Embora informações cinéticas de cada componente químico de um resíduo seja desejável, dados da literatura são escassos e em muitos casos tratam com a matéria orgânica complexa sem referência à composição química do material. Além disso, diferenças nas condições dos vários estudos (por exemplo, estudos em batelada ou contínuos) tornam as comparações difíceis.

O exemplo mais comum de modelo aplicado para a taxa de hidrólise é uma reação de primeira ordem com relação à concentração da matéria orgânica particulada degradável:

$$\frac{DF}{dt} = -k_h F \quad (2)$$

onde:  $F$  = concentração da matéria orgânica degradável ( $\text{ML}^{-3}$ ); e  
 $\kappa h$  = coeficiente da taxa de hidrólise ( $\text{T}^{-1}$ ).

Para um reator em batelada, a integração da equação (2) leva a:

$$F = F_0 e^{-\kappa h t} \quad (3)$$

Em que,  $F_0$  = concentração inicial da matéria orgânica ( $\text{ML}^{-3}$ ). Para um reator de mistura completa no “estado estacionário” a seguinte equação é obtida:

$$F = \frac{F_0}{1 + \kappa h \theta} \quad (4)$$

A hidrólise de proteínas sob condições anaeróbias é mais lenta que a de carboidratos. Assumindo uma cinética de primeira ordem para a degradação de material proteínico, taxas aparentes constantes para vários substratos proteínicos foram calculadas por PAVLOSTATHIS & GIRALDO-GOMEZ e foram muito variáveis: 0,35 e 0,60  $\text{d}^{-1}$  para caseína e gelatina respectivamente e 0,04  $\text{d}^{-1}$  para zeína.

EASTMAN & FERGUNSON (1981) estudaram a solubilização do lodo primário e derivaram um modelo cinético para a fase ácida e concluíram que a hidrólise do material particulado é a etapa taxa-limitante. O carbono orgânico solúvel produzido durante a fase ácida consistiu primeiramente de ácidos voláteis (85-95%) da DQO solúvel. A fração lipídica não foi degradada durante este estudo (tempo de retenção igual ou menor a tres dias). Perdas de DQO para a fase de gás constituíram menos de 10% da DQO produzida com controle no tempo de retenção de sólidos. O metano produzido com baixos tempos de retenção de sólidos foi atribuído à redução de  $\text{CO}_2$  pelas bactérias utilizadoras de hidrogênio. A DQO do material particulado degradável foi modelada assumindo-se uma cinética de primeira ordem. A 35°C a taxa constante de hidrólise foi encontrada como 0,125  $\text{h}^{-1}$  (= 3,0  $\text{d}^{-1}$ ). Valores aumentados de pH melhoraram a solubilização do substrato particulado e as taxa constantes de hidrólise para o material nitrogenado foram: 0,28, 0,39 e 0,69 quando o pH foi alterado de 5.14, 5.85 e 6.67 respectivamente.

GUJER & ZEHNDER (1983) compilaram dados da literatura e calcularam as taxas constantes aparentes de hidrólise para biopolímeros complexos sob condições anaeróbias: lipídeos: 0,08-1,7 d<sup>-1</sup>; proteínas 0,02-0,03 d<sup>-1</sup>, celulose 0,04-0,13 d<sup>-1</sup>, e hemicelulose 0,54 d<sup>-1</sup>.

Resultados da degradação anaeróbia de aminoácidos produzido pela hidrólise de proteína de resíduos complexos indicaram muito pouca matéria orgânica nitrogenada solúvel remanescente. Por exemplo, o material nitrogenado solúvel residual num digestor de mistura completa alimentado com lodo de esgoto primário e operado com um tempo de retenção de 3 dias foi 4% da DQO total degradável utilizada para EASTMAN & FERGUNSON (1981). Similarmente, a DQO solúvel do efluente de um digestor contendo lodo biológico operado a 6,5 d foi menor que 2% (PAVLOSTATHIS & GOSSETT, 1988). Esses dados indicaram que a fermentação de aminoácidos produzidos durante a hidrólise de proteínas sob condições anaeróbias é rápida e a etapa taxa-limitante é a hidrólise. Contudo, a composição química, origem e vários tratamentos físico-químicos do resíduo tem um efeito pronunciado sob a taxa e extensão de fermentação dos aminoácidos. Estudos com culturas anaeróbias puras crescendo sob hidrólise ácida ou hidrólise enzimática de caseína resultaram em diferentes taxas e diferentes padrões de fermentação.

Um grande número de pesquisas incluindo principalmente substratos complexos não definidos tem produzido parâmetros cinéticos que não se referem as reações individuais mas assumiram a metanogênese como um processo de uma única etapa. A degradação anaeróbia de material particulado requer hidrólise (ou liquefação) para torná-los disponíveis às bactérias. Em muitos casos, o modelo de MONOD (ou variações dele) são inadequados para descrever as reações heterogêneas que ocorrem durante a hidrólise de substratos particulados complexos. Baseados na literatura, com os cálculos realizados por PAVLOSTATHIS & GIRALDO -GOMEZ (1991), a etapa de hidrólise foi considerada como etapa limitante na conversão total dos substratos a metano. Mesmo em casos onde a acidogênese e metanogênese são consideradas etapas limitantes, a hidrólise pode afetar o processo cinético total, um ponto que é frequentemente sobrepassado. Em outras palavras, etapas precedentes à etapa mais lenta, podem influenciar na taxa total. Para LAWRENCE, a taxa de hidrólise para um determinado tempo de retenção, determina o potencial máximo de concentração de substrato possível para bactérias metanogênicas, que por sua vez determina sua taxa máxima de crescimento específico.

Com exceção da etapa de hidrólise, todos os outros subprocessos do tratamento anaeróbio tem sido modelados com sucesso à cinética de MONOD. Uma variação substancial nos valores obtidos não permite a derivação de um valor médio representativo para cada subprocesso. Comparações entre os estudos são quase impossíveis devido a variabilidade no modo de operação (i.é., culturas em batelada ou contínuas) bem como condições ambientais e operacionais (ex. pH, carga orgânica, etc). Em adição, a maioria dos estudos mais antigos sofreram sem dúvida perdas em relação à instrumentação de análises. Este é particularmente o caso do gás hidrogênio. Instrumentos sofisticados permitem a detecção de concentrações muito baixas de intermediários encontrados no tratamento anaeróbio e são requeridos para se estimar constantes biocinéticas mais acuradas (PAVLOSTATHIS & GIRALDO-GOMEZ (1991).

Outros aspectos da cinética do tratamento anaeróbio tais como taxas intrínsecas, considerando o material solúvel e particulado e efeitos da transferência de massa foram revisados por PAVLOSTATHIS e GIRALDO-GOMEZ em 1991 e não serão considerados nesta revisão.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5. 1. Materiais

#### 5. 1. 1. Equipamentos

Autoclave vertical -Phoenix

Cromatógrafos a gás

Analizador de aminoácidos

Forno removedor de oxigênio- CG-01 (Instrumentos Científicos)

Sistema distribuidor e misturador de gases

Microscópios.

Cilindros gasosos ( N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, GLP)

Estufa de cultura -(modelo 002CB da Fanem)

Medidor de pH-(DMPH2-Digimed)

Agitador de tubos (PA 162-Pachane)

Chapa aquecedora com agitador magnético (Corning)

Centrífuga -(modelo 204- NR - Fanem)

Espectrofotômetros

Manômetro

Filtros Millipore

Balanças analítica e semi-analítica

Destilador e deionizador de água

Bomba de vácuo

Drogas químicas (descritas em procedimentos)

Sistema de distribuição simultânea de gases.

### 5.1.2. Vidraria e outros materiais

Balões “pirex” de fundo chato e redondo (10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1.000 e 5.000 mL)

Tubos de ensaio de diversos tamanhos.

Frascos de vidro de 250 ml com rosca de alumínio

Frascos de borosilicato (Duhran) de 500 mL com roscas específicas.

Seringas para coletar amostras de gás (Gastight 1001) - Hamilton Co. Reno nev

Vidraria de uso comum em laboratórios de microbiologia: pipetas volumétricas, graduadas e micropipetas; erlenmeyers, béquers, bastões de vidro, kitassatos, funis, placas de Petri, vidro relógio, frascos de vidro, tubos de ensaio de diversos tamanhos, tubos para centrífuga, lâminas e lamínulas.

Outros materiais:

Seringas e agulhas descartáveis, alicate, lacrador de tubos, mangueiras de silicone, alça de platina, lacres de alumínio, rolhas e tampas de butil, vedantes, etiquetas.

## 5. 2. Procedimentos experimentais

Os experimentos realizados neste trabalho consistem de três ensaios básicos: no primeiro ensaio vários testes foram realizados com o objetivo de estudar a produção de gás metano e a degradação de proteína inoculada em meio de cultura mineral e com lodo anaeróbio granulado. Nesses testes dois tipos de proteína foram utilizados: peptona de carne e gelatina. Para se estudar a degradação de proteínas, dois métodos foram utilizados: micro-biureto e Lowry.

No segundo ensaio, o objetivo foi caracterizar a proteína utilizada nos experimentos em termos de seus aminoácidos constituintes e também averiguar a quantidade de cada aminoácido presente no meio de cultura em que proteína estava sendo degradada em diferentes períodos de tempo. Neste ensaio também se caracterizou o lodo original em termos de proteínas e aminoácidos. No terceiro ensaio, quatro diferentes concentrações de gelatina foram adicionadas em meio de cultura mineral e inoculadas com lodo anaeróbio granulado. A

degradação da proteína foi acompanhada através da determinação das concentrações pelo método de Lowry. O fosfato e amônia também foram quantificados nesses inoculados durante o período de incubação. Neste ensaio o principal objetivo foi determinar a produção de ácidos graxos a partir dos produtos de degradação da proteína através de cromatografia.

Os lodos anaeróbios estudados neste trabalho foram provenientes de dois biodigestores operados por TORRES (1992), num biodigestor do tipo UASB em escala de laboratório para digerir esgoto sanitário sintético, e posteriormente usado por VICTORIA (1993) com a mesma finalidade.

Esse lodo foi mantido em geladeira durante o período de experimentos realizados neste trabalho. O lodo foi alimentado periodicamente com meio mineral mínimo (Zinder) e soluções de micronutriente e vitaminas e incubado em estufa a 37°C a fim de manter a atividade bacteriana do mesmo. Quando essas alimentações eram realizadas, o lodo permanecia por 2 a 3 dias na estufa à 37°C, e em seguida era novamente colocado em geladeira.

Cada ensaio com seus respectivos testes e métodos de análise empregados estão descritos a seguir:

## **5.2.1. ENSAIO 1**

### **5.2.1.1. Testes para produção de gás metano.**

#### **5.2.1.1.1. Primeiro teste com PEPTONA.**

O objetivo deste teste foi verificar a atividade de um lodo anaeróbio granulado quando inoculado em meio de cultura contendo sais minerais e proteína, simulando o esgoto sanitário. A atividade foi averiguada em termos de produção de gás metano.

Para esse teste quatro frascos de vidro de soro com capacidade para 300 mL foram preparados com meio de cultura basal (ZINDER & KOCH, 1984) e inoculados com lodo anaeróbio granulado (volume total de 250 mL). O método utilizado para manipulação de microrganismos anaeróbios foi o de MILLER & WOLLIN (1974).

O meio de cultura utilizado (ZINDER & KOCH, 1984), continha os seguintes componentes:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,5 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,4 g/L),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g/L), Solução de Resazurina (1 mL/L), Solução Traço de Metais (10,0 mL/L), água destilada q.s.p. 1000 mL. A solução traço de metais era composta de (em g/L): Ácido nítrico acético (4,5),  $\text{FeSO}_5 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,566),  $\text{MnSO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,086),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,17),  $\text{ZnSO}_5 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,21);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,19),  $\text{NiCl}_2$  (0,02), Molibdato de sódio (0,01), água destilada q.s.p. 1000 mL.

Cada frasco foi incubado com os seguintes componentes:

**Frasco 1:** Lodo granulado (100 mL);

Meio mineral basal (Zinder)(150 mL)

Bicarbonato de sódio 10% (1,5 mL).

**Frasco 2:** Lodo granulado (100 mL)

Meio mineral mínimo (150 mL) e

Bicarbonato de sódio 10% (2,5 mL).

**Frasco 3:** Lodo granulado (100 mL)

Meio mineral mínimo (150 mL)

Bicarbonato de sódio 10% (1,5 mL)

Peptona de carne a 5 g/L

**Frasco 4:** Lodo granulado (100 mL)

Meio mínimo (150 mL)

Bicarbonato de sódio 10% (1,5 mL)

Extrato de levedura 2% (2,51 mL)

Peptona de carne a 5 g/L

O meio de cultura foi preparado em balão volumétrico de 2000 mL, colocado em frascos de soro de 300 mL de capacidade e cada frasco foi submetido à atmosfera de

nitrogênio durante 20 minutos. A seguir os frascos foram fechados com rolha de borracha de butila e arame. Foram então autoclavados a 120°C e 1 atmosfera durante 15 minutos. Após o resfriamento, o lodo granulado foi introduzido em cada frasco através de seringas e agulhas estéreis. A proteína foi adicionada como pó antes da autoclavagem. O bicarbonato de sódio e o extrato de levedura foram adicionados posteriormente (a partir de soluções estoque estéreis) através de seringas estéreis. Após a inoculação, trocou-se a atmosfera dos frascos por N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (70/30%) e incubou-se os frascos em estufa à 37 °C.

A composição de gases foi monitorada diariamente, iniciando-se 24 h após a inoculação. Os gases foram medidos em cromatógrafo gasoso do tipo GC modelo 69-152 série 150 da Gow-Mac Instruments Co., com coluna de Poropack -T (80-100 mesh) com 2 m e ¼ de comprimento de diâmetro. O gás de arraste foi o hidrogênio superseco. As temperaturas da coluna, do detector de condução térmica e vaporizador eram 70°C e a corrente 150 mA. O volume de gás metano produzido foi calculado através de uma curva padrão. Os frascos foram mantidos em estufa até que a produção de gás metano se tornasse constante ou apresentasse uma queda.

A curva analítica para cálculos da produção de metano está mostrada no Anexo A. Essa curva padrão para metano foi construída a partir de valores de áreas obtidos com as médias de três injeções e corrigindo-se os valores de metano com as condições ambientes de temperatura e pressão.

#### **5. 2. 1. 1. 2. Enriquecimento das culturas em meio com Peptona**

Após o primeiro teste, preparou-se a seguinte mistura: 50 mL de lodo granulado (LG) e 25 mL de meio mineral sintético (MS), como descrito à frente. Essa mistura (LG+MS) foi mantida à 37°C, durante 24 horas em frascos de soro de 250 ml.

O enriquecimento das culturas foi feito da seguinte forma a partir dos lodos dos frascos do primeiro teste:

Para o **frasco 1**: O frasco foi aberto sob atmosfera de nitrogênio. Com uma pipeta estéril retirou-se 75 mL de meio e acrescentou-se o mesmo volume da seguinte mistura: 45 mL de meio mineral basal mais 30 mL de (LG+MS). O frasco foi fechado, trocou-se a

atmosfera para  $N_2/CO_2$ , acrescentou-se 1,5 mL de bicarbonato de sódio (10%) em quantidade relativa ao volume de meio adicionado e incubou-se novamente à 37°C.

Para o **frasco 2**: O frasco foi deixado na horizontal sobre a bancada até o material sólido sedimentar. Com seringa foram retirados 75 mL da parte líquida e adicionou-se o mesmo volume de mistura como citado para o frasco 1. A atmosfera foi trocada e o frasco incubado.

Para o **frasco 3**. Foram retirados 75 mL de líquido e adicionada uma mistura contendo 45 mL de meio mínimo mais 30 mL da mistura LG+MS. Acrescentou-se ainda 0,375 g de peptona de carne. Trocou-se a atmosfera e acrescentou-se bicarbonato de sódio (10%). Incubou-se a 37°C.

Para o **frasco 4**: Foram trocados 75 mL como para o frasco 4 e adicionados 0,75 mL de extrato de levedura mais 0,381 g de proteína. Trocou-se a atmosfera, adicionou-se 0,45 mL bicarbonato de sódio (10%).

O meio sintético era composto de (em g/L): Extrato de carne (0,93), Sacarose (0,16), Óleo de soja (0,053), Amido (maizena) (0,20) mais os compostos inorgânicos (em g/L):  $K_2HPO_4$  (0,0224),  $KH_2PO_4$  (0,00624),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,00704),  $CaCl_2$  (0,00448),  $Na_2S$  (0,00533),  $FeSO_4$  (0,09333),  $CaCO_3$  (0,12),  $NaHCO_3$  (0,84). Este meio era utilizado por CUBA (1993) para alimentar um biodigestor anaeróbio.

Esse procedimento para o enriquecimento das culturas foi realizado duas vezes, respectivamente após o término de cada teste. A curva utilizada para cálculo da produção de metano foi a mesma para todos os testes e está mostrada no Anexo A.

Após esses testes outros frascos foram inoculados, mas com gelatina no lugar da peptona.

### **5. 2. 1. 1. 3. Primeiro teste com GELATINA**

Para se avaliar a produção de gás metano e se estudar a degradação da gelatina três frascos foram preparados da seguinte forma: meio mineral mínimo (ZINDER & KOCH,

1984), lodo anaeróbio granulado sob refrigeração e gelatina. Para cada frasco (300 mL) a composição estudada é a que segue:

**Frasco 1\*:** Lodo anaeróbio (50 mL)  
Meio mineral (75 mL)  
Bicarbonato de sódio 10% (0,75 mL).

**Frasco 2\*:** Lodo anaeróbio (50 mL)  
Meio mineral mínimo (75 mL)  
Gelatina (5 g/L).

**Frasco 3\*:** Lodo anaeróbio (50 mL)  
Meio mineral mínimo (75 mL)  
Extrato de levedura 2% (0,75 mL)  
Gelatina (5g/L).

O frasco 1 neste caso foi usado como controle. A quantidade de metano produzido foi determinada nesse teste com gelatina utilizando-se a curva padrão apresentada no Anexo A.

#### **5. 2. 1. 2. Testes para degradação de proteínas e produção de gás.**

Estes testes tiveram como finalidade sub-cultivar as bactérias provenientes dos testes anteriores e analisar a produção de metano e a degradação de proteínas. Nestes testes, utilizaram-se duas proteínas diferentes, gelatina e peptona. O meio foi o mineral basal (ZINDER & KOCH, 1984) de Vitaminas, Proteína, Bicarbonato de sódio a 10 em frascos de 250 mL. O inóculo foi lodo proveniente dos testes anteriores respectivamente frascos 3 e 4 do primeiro teste com peptona-(item 5.2.1.1.1.) e frascos 2 e 3 do primeiro teste com gelatina- (item 5.2.1.1.3). As condições de incubação estão descritas nos itens específicos, a seguir.

A solução de vitaminas continha (em g/L): Biotina (0,002); Ácido fólico (0,002), Tiamina-HCl (0,005); Riboflavina (0,005), Pantotenato de cálcio (0,005), Piridoxina-HCl (0,01), Vitamina B12 (0,0001), Ácido lipóico (0,005).

### 5. 2. 1. 2. 1. Segundo teste com PEPTONA

Para o 2º teste com peptona preparou-se uma solução da proteína que foi filtrada em Millipore (0,22µm). Retirou-se uma quantidade equivalente de líquido dos frascos para a adição de peptona. O inóculo neste caso foi proveniente dos frascos 3 e 4, após a segunda realimentação dos frascos do primeiro teste com peptona. O número dos frascos foi mantido para este experimento.

Assim cada frasco continha:

Meio mineral (ZINDER & KOCH, 1984) (250 mL)

Solução de vitaminas (2,5 mL)

Bicarbonato de sódio 10% (2,5 mL)

Peptona de carne (5g/L)

Solução redutora ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  5%) (1,25 mL)

Lodo granulado (proveniente do teste realizado para a 2ª alimentação com peptona) (5 mL).

Os inóculos foram retirados dos frascos doadores através de seringas e agulhas estéreis e após agitação. Esse procedimento foi realizado no momento da reinoculação.

A diferença entre o frasco 3 e 4, é que no frasco 4, no teste anterior (teste 1 para peptona), havia sido adicionado extrato de levedura 2% (0,75 mL).

Os frascos foram incubados a 37°C após a troca de atmosfera e adição da solução redutora como nos primeiros testes.

A quantidade de gás metano produzida foi monitorada e também foram retiradas amostras diárias de meio para determinação de proteínas. As amostras foram retiradas com seringas estéreis, centrifugadas a 7000 rpm durante 10 minutos e os sobrenadantes mantidos em congelador em frasquinhos de vidro fechados com rolhas e lacres de alumínio.

Dois métodos foram utilizados para determinar a concentração de proteínas nas amostras: O método do micro-biureto e o método de Lowry. O primeiro método foi escolhido inicialmente, pois requer apenas pequenas quantidades de amostra, o que evitaria

um desfalque no conteúdo de líquido dos frascos. A curva padrão utilizada para produção de metano está mostrada no Anexo A e a curva padrão para proteína está mostrada no Anexo D.

#### **5. 2. 1. 2. 2-. Segundo teste com GELATINA**

Dois frascos foram preparados com a seguinte composição:

Meio mineral (ZINDER & KOCH, 1984) (250 mL)

Solução de vitaminas (2,5 mL)

Bicarbonato de sódio 10% (2,5 mL)

Gelatina ( 5 g/L)

Solução redutora (  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  5%)(1,25 mL)

Lodo granulado (proveniente dos frascos 2 e 3 do primeiro teste com gelatina (5 mL).

As condições de incubação foram semelhantes ao teste com peptona.

A gelatina foi adicionada em pó, sob fluxo de nitrogênio.

Para o segundo teste com gelatina as curvas padrão da proteína estão mostradas no Anexo E. Para cálculo da produção de metano foi utilizada a curva padrão mostrada no Anexo A.

Os métodos analíticos utilizados para o acompanhamento dos testes estão descritos a seguir.

#### **5.2.1.2.3. Determinação de proteínas pelo método do micro-biureto (MANZOLLI, 1987).**

O método consiste na adição de sulfato de sódio e sulfato de cobre à solução contendo proteínas. O excesso de sulfato de cobre é removido por centrifugação.

Mede-se a absorbância do sobrenadante a 310nm em espectrofotômetro contra um branco com água destilada no lugar da amostra.

### Reagentes

- 1-Solução de hidróxido de sódio 20%
- 2-Solução de sulfato de cobre pentahidratado 25%
- 3-Polímero (NACOLYT) não iônico

### Procedimento

- 1- Colocou-se 4 mL da amostra de solução diluída e adicionou-se 30 $\mu$ l de NaOH 20% e 60 $\mu$ l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Agitou-se.
- 2- Adicionou-se 0,03 mL de polímero mais 0,062 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Agitou-se.
- 3- Centrifugou-se 10 minutos a 7000 rpm.
- 4- Leu-se as absorvâncias em 310 nm

### 5. 2. 1. 2. 4. Determinação de proteínas (no 2º teste) pelo método de Lowry.

### Reagentes

- 1- Solução A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2%) em uma solução 0,1N de NaOH.
- 2- Solução B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,5%)
- 3- Solução C: Tartarato de sódio e potássio (1%)
- 4- Solução D: misturar as soluções B e C em partes iguais e completar com 5 partes de solução A
- 5- Solução E: Reagente de Folin-Ciocalteu.

### Procedimento de análise

- 1- Adicionou-se em tubos de ensaio (duplicata) 0,5 mL de amostra e 5 mL de solução D. Agitou-se e deixou-se no escuro 20 minutos.
- 2- Adicionou-se em cada tubo 0,5 mL de reagente de Folin diluído 1:1 com água destilada. Agitou-se e deixou-se 30 minutos no escuro.

3- As absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro em 750 nm.

O branco foi preparado da mesma forma substituindo-se a amostra por NaOH.

#### **5. 2. 1. 2. 5 .Terceiro teste com GELATINA**

Para o terceiro teste com gelatina os mesmos componentes do meio e as mesmas quantidades do segundo teste foram utilizados com exceção dos inóculos que foram provenientes dos frascos 2 e 3 do segundo teste com gelatina ( ítem 5.2.1.2.5). As condições de incubação foram as mesmas dos testes anteriores. As determinações de proteína neste experimento foram inicialmente realizadas com intervalos menores de tempo, e após 42 h de 24 em 24 horas. A curva padrão para gelatina está apresentada no Anexo F.

#### **5. 2. 1. 2.6. Quarto teste com GELATINA.**

Neste ensaio foi preparado apenas um frasco para testar a degradação de proteína e a produção de metano com inóculo proveniente do frasco 3 do terceiro teste para gelatina.O frasco foi incubado nas mesmas condições dos testes anteriores O método de Lowry foi utilizado para determinação das concentrações de proteína. A curva padrão para proteína está mostrada no Anexo G.

Um esquema ilustrando os testes realizados no primeiro ensaio estão mostrados na **Figura 11** a seguir.

FIGURA 11- Esquema ilustrando o ensaio 1

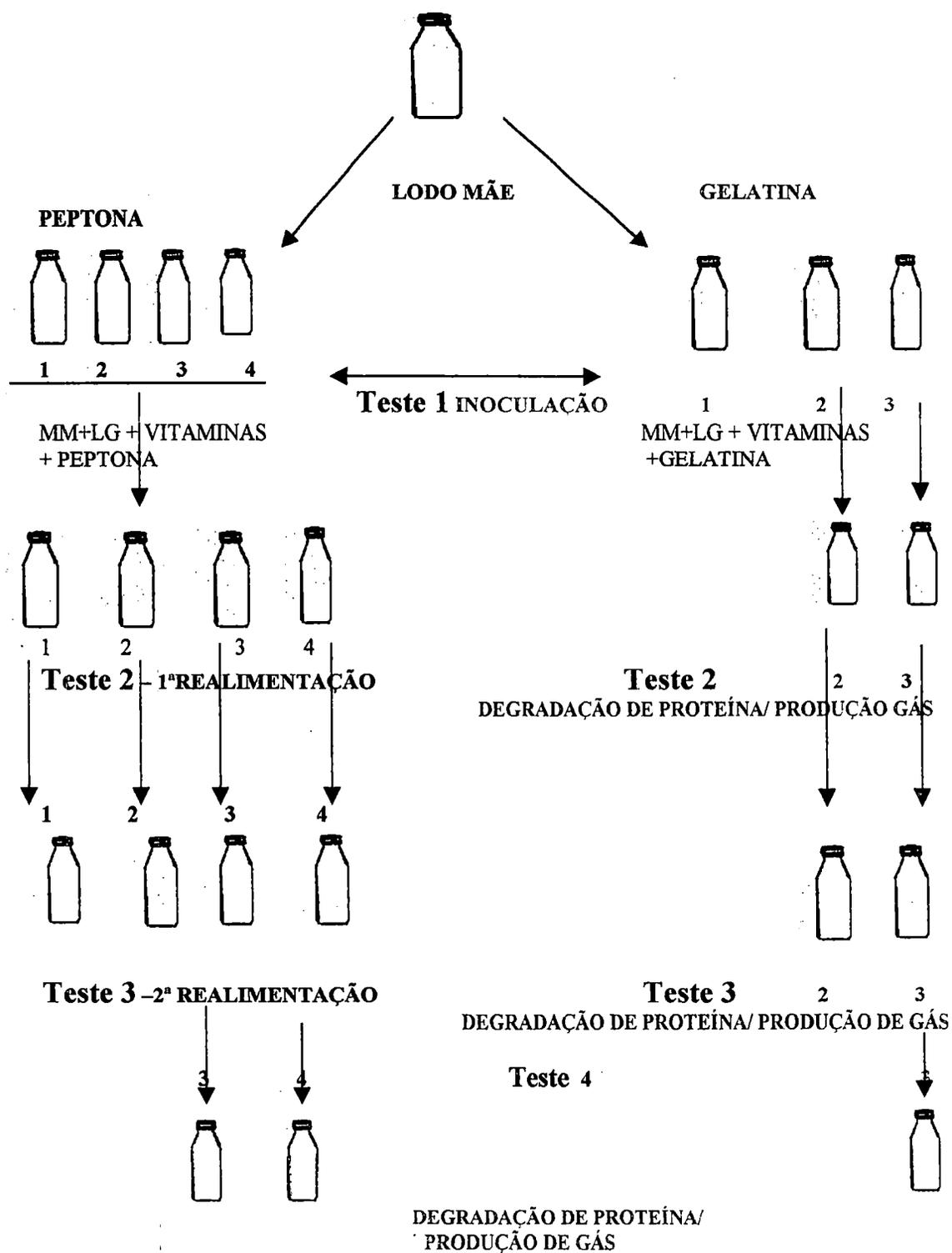


FIGURA 11- Esquema resumindo os testes realizados no ensaio 1. Os números indicam o nº de cada frasco. As setas indicam o caminho do inóculo.

## 5. 2 .2. ENSAIO 2

Neste experimento lodo anaeróbio granulado proveniente do frasco 3 do 4º teste com gelatina (ensaio 1), foi inoculado em frascos de 300 mL de capacidade, utilizando-se 1% de gelatina em relação ao volume total inoculado. O volume total de meio líquido foi 250 mL consistindo de 2,5 g/L de gelatina; 2,5 mL de lodo granulado; 2,5 mL de extrato de levedura 2%, 2,5 mL de bicarbonato de sódio 10% e solução redutora de sulfeto de sódio 5% (1,25 mL). Para adição das alíquotas retiraram-se-se volumes equivalentes do meio de cultura basal.

As análises descritas para esse experimento foram realizadas no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - São Paulo, sob a coordenação do prof. Dr. Lewis J. Greene. Essas análises foram realizadas para se obter o maior número possível de informações a respeito da degradação da gelatina na fase inicial de hidrólise, descritas a seguir.

### 5. 2. 2. 1-Aminograma da gelatina

Essa análise foi realizada com objetivo de se caracterizar a gelatina usada no experimento em termos de sua constituição de aminoácidos e também com fins de comparação com os dados fornecidos pelo MERK INDEX (1989).

Inicialmente alíquotas de soluções de gelatina foram transferidas para tubos de borosilicato (Pirex) que foram previamente pirolisados a 400°C por 8h. Foram adicionados 0,50 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 6N, bidestilado a 104°C. As amostras foram colocadas em atmosfera de nitrogênio e posteriormente foi feito vácuo nos tubos. Este ciclo alternado de nitrogênio e vácuo foi repetido mais quatro vezes sendo que a pressão medida para o último ciclo foi cerca de 10 a 20 mmHg. Os tubos de borosilicato foram então selados a vácuo e colocados, em chapa de aquecimento Pierce. A hidrólise ácida foi realizada a 110°C (MOORE et al. 1958).

Após hidrólise ácida em solução, a amostra foi seca em dessecador e ressuspensa em solução tamponante de citrato de sódio 0,17M (MERCK), pH 2,2, contendo polietilenoglicol 400 (Becto) a 15% (v/v), fenol a 0,0002% (m/v) e tioglicol a 0,4% (v/v). Foram aplicadas alíquotas com volume máximo de 0,900 mL nas colunas de troca catiônica do analisador (coluna curta para aminoácidos básicos e longa para aminoácidos ácidos e neutros) e a mistura de aminoácidos foi resolvida por diferenças de força iônica e de pH (curta em 5,28; longa em 3,25 cm inicialmente e 4,25 posteriormente) (SPACKMAN et al., 1958). Após a separação cromatográfica, os aminoácidos eluídos da coluna reagiram com ninidrina a aproximadamente 100°C (banho de água em ebulição) por 15 minutos e os produtos da reação foram detectados colorimetricamente em dois comprimentos de onda: 440 nm para prolina somente (cubeta de 12mm de caminho óptico) e 570 nm para todos os demais aminoácidos (em duas cubetas, de caminhos ópticos igual a 6 e 12mm). O sistema foi padronizado com aplicação de uma alíquota de solução padrão. A identificação dos aminoácidos foi feita pelo tempo de retenção dos picos comparando-se a posição de eluição dos picos com o padrão e a quantificação dos mesmos foi feita calculando-se a área dos picos. O sistema foi padronizado com aplicação de uma alíquota de solução padrão Pierce H contendo 5,00 µmol de cada aminoácido, através da qual é determinada uma constante em relação à concentração/altura do pico. Esta medida foi realizada manualmente (ALONZO & HIRS, 1968) e os dados de linha de base e altura máxima foram processados por um programa desenvolvido para o CQP-FMRP-USP. O aparelho foi padronizado para operar em uma faixa linear de 1 a 10 ou 15µmol, dependendo do resíduo considerado, e para cálculos realizados com base na altura total dos picos.

A resina utilizada é um polímero de poliestireno com divinilbenzeno, formando ligações cruzadas (copolímero contendo 92 partes de estireno e 8 partes de divinilbenzeno). Os anéis benzênicos são sulfonados ( $\text{SO}_3^-$ ) e estes são os grupos trocadores de cátions.

A separação se dá devido à carga negativa existente nas resina responsável pela troca iônica e também devido à interações entre os aminoácidos e a matriz hidrofóbica da resina. Portanto, os aminoácidos são liberados de acordo com sua carga efetiva e sua hidrofobicidade. Quanto mais carregado negativamente e menos hidrofóbico for o aminoácido, menor o tempo de retenção na coluna. Esta interação hidrofóbica permite a separação de aminoácidos com pIs próximos (como por exemplo, Serina e Treonina, Glicina e Alanina, Isoleucina e Leucina, Tirosina e Fenilalanina) que seria dificultada se a mesma ocorresse exclusivamente por troca iônica.

O tampão utilizado (citrato de sódio) com pH e força iônica variados para se conseguir uma separação eficiente de todos os aminoácidos. O pH influencia na separação através dos pKas dos aminoácidos e a concentração de sódio influencia na eluição dos aminoácidos básicos sem que se eleve muito o pH, pois há uma competição entre sódio e aminoácidos pelos sítios carregados da resina, através da qual os aminoácidos são forçados a sair.

A temperatura é outro fator que influencia na separação. A temperatura inicial da coluna é de 50°C e posteriormente 70°C. A eluição com tampão pH 3,25, eleva-se para 4,25 e depois para 5,28 até o final.

Para análise da gelatina duas amostras (uma de 3 e outra de 4,77 mg) de proteína foram usadas e os volumes aplicados foram:

-0,040 mL para coluna longa (coluna para aminoácidos básicos: Trp, Lis, His, NH<sub>3</sub>, AABgg, Arg);

-0,030 mL para coluna curta (coluna para aminoácidos ácidos e neutros)

A alanina foi detectada em comprimento de onda de 570 nm e cubeta com 6 mm de caminho óptico. As demais leituras foram feitas em cubeta de 12 mm. Prolina foi detectada em comprimento de onda de 440 nm e cubeta de 12 mm.

O analisador de aminoácidos é o equipamento Nicolas V, montado no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto com sensibilidade maior que 0,0001 µmol.

### **5. 2. 2. 2-. Aminograma das amostras .**

Para se determinar as quantidades dos aminoácidos presentes nas amostras de meios inoculados com lodo anaeróbio e proteína foram realizados aminogramas das amostras em diferentes tempos de amostragem: zero, 6, 12, 18, 24 e 36 horas após inoculação. Esses tempos foram escolhidos em função dos resultados obtidos nos testes finais do primeiro ensaio. Aminogramas do lodo puro e do lodo inoculado em meio de cultura foram realizados com e sem hidrólise.

### 5. 2. 2. 3.-Determinação da proteína através da análise de aminoácidos

O cálculo da área sob os picos fornece a quantidade de aminoácidos ( $\mu$ moles) existente no volume de amostra aplicada. Conhecendo-se a concentração da solução de amostra aplicada e relação entre volume total depois de hidrolisado e volume aplicado, podemos calcular a quantidade de  $\mu$ moles totais de cada aminoácido na quantidade (mg) de amostra hidrolisada. Este valor pode ser transformado em miligramas de aminoácidos por miligrama de amostra através de multiplicação da quantidade de cada aminoácido em  $\mu$ moles de peso molecular pelo peso molecular anidro do mesmo aminoácido. Com o valor da soma da quantidade de todos de todos os aminoácidos em miligramas de aminoácido por miligrama de amostra, pode-se calcular a porcentagem de proteína (teor protéico) da amostra.

Outra forma de cálculo útil que pode ser feita a partir da análise de aminoácidos é expressar os dados obtidos na forma de  $\mu$ moles de aminoácidos/100  $\mu$ moles de aminoácidos recuperados. Este cálculo pode ser feito para cada aminoácido através da multiplicação da quantidade de  $\mu$ moles do aminoácido determinada na análise de aminoácidos por um fator obtido pela razão  $100/\Sigma$  da quantidade de aminoácidos totais (em  $\mu$ moles) recuperados na análise.

### 5. 2. 2. 4. Determinação de proteínas pelo método de Lowry

A determinação de proteínas foi feita nas seguintes amostras:

- Lodo anaeróbio original.
- Lodo inoculado após 24 h em meio mineral mais gelatina
- Meio inoculado à um mês
- Meio de cultura puro (isto é, sem lodo e sem proteína)
- Amostras retiradas de 6 em 6 horas.

O método usado para determinação de proteínas foi o de LOWRY (1951) com pequena modificação e está descrito a seguir. As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm e os sobrenadantes foram utilizados para a determinação da proteína.

### Reagentes

- a- Bicarbonato alcalino: 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  mais 0,5 g de tartarato de sódio ou potássio em 100 mL de NaOH 0,1N.
- b- Sulfato de cobre: 1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  é dissolvido em 100 mL de água destilada.
- c- Reagente de Folin diluído 1:1, no momento de uso com água destilada.

### Procedimento (modificado)

- 1- Colocou-se as amostras em duplicata (0,1mL) em tubos
- 2- Adicionou-se 4,5 mL de A. Esperou-se quatro minutos.
- 3- Adicionou-se 0,5 mL de B. Esperou-se 30 minutos.
- 4- Adicionou-se 0,5 mL de Folin diluído 1:1. Agitou-se vigorosamente. Esperou-se 20 minutos.
- 5- Leu-se em 660 nm contra um branco com NaOH no lugar da amostra. As amostras foram lidas num espectrofotômetro o tipo DMS 80 da VARIAN.

#### 5. 2. 2. 5. Determinação de proteína pelo método micro -Kjeldhal.

A determinação do nitrogênio total nas amostras foi realizada com finalidade de se comparar os resultados da determinação de proteínas nas amostras.

O nitrogênio total foi determinado pelo método micro-Kjeldahl, no Laboratório de Nutrição Humana e Alimentos na ESALQ- Piracicaba - São Paulo, sob os cuidados da Prof. Dra Jocele M. Salgado. Esse método foi utilizado pois emprega quantidades pequenas de amostra

Nesse método, as amostras (0,5 mL) foram digeridas, destiladas e tituladas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 N de acordo com a AOAC (1975). O teor protéico foi determinado multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator 6,25.

### 5. 2. 3.-ENSAIO 3

Como dados da literatura diferem muito com relação aos efeitos de diferentes concentrações de gelatina nas águas residuárias quando tratadas com biodigestores, foi realizado um ensaio com quatro diferentes concentrações da proteína. Esses ensaios visaram ainda acompanhar a destino de alguns produtos da degradação da gelatina.

Para este experimento frascos de soro (Duhran) de 500 mL de capacidade foram inoculados em réplicas de cinco. O experimento foi feito em quatro etapas, sendo que em cada uma se usou uma concentração diferente de proteína (2.5, 5.0, 10.0 e 15.0 g/L de gelatina). O lodo anaeróbio inoculado consistiu de 10% do volume final de meio. Esse lodo foi mantido sob refrigeração alternando com períodos de realimentação com meio mineral Zinder & Koch (1984), vitaminas e pequenas doses de solução de gelatina a 3g/L. O lodo era incubado a 37 °C por 2 a 3 dias e em seguida retornava à geladeira. Esse lodo recebeu pequenas quantidades de solução de proteína (1–2 g/L) esporadicamente durante os períodos em que foi realimentado.

Os frascos foram lacrados com rolhas de borracha de butila e rosca de alumínio. As rolhas foram perfuradas num diâmetro que permitisse a adaptação de uma pipeta de 1 mL invertida. Uma das extremidades da pipeta ficou em contato com a parte líquida e na extremidade externa adaptou-se uma mangueira de silicone com diâmetro equivalente ao da pipeta. As mangueiras foram dobradas nas extremidades livres através de cliques para mangueiras evitando-se contato com o ar do ambiente.

Os meios de cultura foram preparados em balão volumétrico de 5 litros. A gelatina foi pesada em suas respectivas quantidades e previamente colocadas nos frascos que em seguida receberam o meio de cultura mineral. Os frascos foram fechados e autoclavados. Os inóculos foram adicionados após o resfriamento com agulhas e seringas descartáveis. O inóculo foi retirado do estoque original mantido em geladeira. Para isso, os inóculos foram deixados em temperatura ambiente por algumas horas e mantidos em estufa por 24 horas antes da inoculação. Os frascos tiveram suas atmosferas trocadas e foram incubados a 37°C.

As amostras para análises foram coletadas a cada 6 horas, inclusive no tempo zero, através de seringas estéreis introduzidas nas mangueiras no momento de coleta.

### **5. 2. 3. 1-Determinação de proteínas nas amostras.**

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Lowry, da mesma forma como para os testes do ensaio 1. Curvas padrão foram construídas para as concentrações de 2,5; 5; e 15 g/L. Para a concentração de 10 g/L de gelatina utilizou-se a curva de 15 g/L.as curvas estão no Anexo J.

### **5. 2. 3. 2. Determinação de ácidos graxos voláteis**

Os ácidos voláteis foram determinados em amostras com os seguintes tempos de inoculação: 18, 30, 48 e 192 horas. Esses tempos foram escolhidos após a aplicação de algumas amostras e verificando-se o aparecimento de uma quantidade detectável de ácido acético. As amostras foram filtradas em seringas com adaptador para filtros millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ . As amostras (1,5 mL) mais 0,5 mL de padrão (n-heptanol) foram diluídas em balão volumétrico de 10 mL com água Milli-Q. Quando necessário foram feitas diluições na quantidade de amostra para os maiores tempos de incubação do experimento.

Os ácidos foram determinados em cromatógrafo gasoso da Antek - modelo 3000, com detector de ionização de chama (FID).

As condições do aparelho foram as seguintes:

Temperatura do injetor: 220°C

Temperatura do detector: 250°C

Gradiente de temperatura na linha de base: 100 - 140 - 170°C

Rampa inicial: 8°C (entre 100 e 140°C)

Rampa final: 30°C (entre 140 e 170°C)

Gás de arraste : nitrogênio ultra puro

Outros gases: N<sub>2</sub> e Ar sintético.

Coluna : Nukol (15m)

Padrão interno: n-heptanol (solução 1 g/L).

A quantificação dos ácidos detectados foi realizada de acordo com uma curva padrão elaborada para cada ácido. As quantidades de ácido em cada amostra foram determinadas

dividindo-se a área obtida para cada amostra pela área do padrão e aplicando-se esses valores nas curvas padrão.

Os ácidos analisados foram: acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico. Para cada ácido foi realizada uma curva padrão as quais estão mostradas no Anexo N.

As amostras foram preparadas em balão de 10 mL, consistindo de 1,5 mL de amostra filtrada, 0,5 mL de padrão (n-heptanol) e completando-se o volume para 10 mL com água deionizada. As amostras foram filtradas com filtros millipore malha 0,22 $\mu$ m em seringas apropriadas. Para cada amostra 1 $\mu$ L de solução foi injetado no cromatógrafo. Quando necessário as amostras foram diluídas como foi o caso de amostras com 10 e 15 g/L de gelatina que tiveram que ser diluídas 5 e 5,33 vezes respectivamente no período de 192 horas

### 5. 2. 3. 3- Determinação de amônia.

A determinação do nitrogênio amoniacal foi a descrita por KOROLEFF (1976)

#### **Reagentes**

##### Solução padrão:

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (10mM)

##### Reagente A

Dissolver 3,5 g de fenol e 0,040 g de nitroferricianeto de sódio (Na<sub>2</sub> Fe(CN)<sub>6</sub> NO<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O em 100 mL de água deionizada.

##### Reagente B

Dissolver 20 g de citrato de sódio e 2 g de hidróxido de sódio em 200 mL de água destilada.

##### Reagente C

Dissolver 28 g de citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2 H<sub>2</sub>O) em 75 mL de água deionizada. Adicionar 5,60 mL de hipoclorito de sódio e completar o volume para 100 mL

### **Procedimento de análise**

Colocou-se 5 mL de amostra em cada tubo e adicionou-se 0,2 mL de reagente A e 0,2 mL de reagente B. Agitou-se e deixou-se no escuro em temperatura ambiente.

Depois de um período de três a quatro horas leu-se as absorvâncias em 630 nm. Para o branco a amostra foi substituída por água deionizada.

### **5. 2. 3. 4-. Determinação do fosfato**

O método usado para a determinação do fósforo total foi o de MENZEL e VACARO (1964) apud KOROLEFF (1976), usado para determinação de fósforo total dissolvido para águas de rios, lagos, etc.

#### **Reagentes:**

##### Solução padrão:

Dissolver 0,175 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro em 500 mL de água deionizada.

##### Reagente A:

Dissolver 6 g de molibdato de amônio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 500 mL de água deionizada.

##### Reagente B:

Adicionar 140 mL de ácido sulfúrico concentrado em 900 mL de água deionizada.

##### Reagente C:

Dissolver 25 g de ácido ascórbico em 500 mL de água deionizada

##### Reagente D:

Dissolver 0,34 g de antimônio tartarato de potássio em 250 mL de água destilada.

##### Reagente E (preparado no momento de uso):

250 mL de solução D

50 mL de solução C

50 mL de solução A

125 mL de solução B

### **Procedimento de análise**

1-Colocou-se em tubos (duplicata) 3,0 mL de amostra.

2-Adicionou-se 0,3 mL de solução de persulfato de potássio saturada ( $K_2 S_2 O_8$ ), preparada na hora. Os tubos foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 120°C durante uma hora.

3-Adicionou-se 0,3 mL de reagente E e fez-se leitura em 882 nm.

### **5. 3. Microscopia das amostras.**

Amostras do experimento foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz comum e em microscópio de varredura.

Para microscopia comum as amostras foram examinadas a fresco, isto é, alíquotas de amostra foram colocadas em lâminas e cobertas com lamínulas e submetidas a um microscópio ótico binocular modelo Olympus BH2 adaptado com câmara fotográfica.

Para a microscopia de varredura as amostras foram preparadas antes de impregnar-se ouro nas mesmas. A técnica usada foi a do Hexametildisilazane (HMDS) descrita por NATION (1983) e adaptada por ARAUJO (1995):

#### **Reagentes:**

GTA (glutaraldeído) 25%

Tampão fosfato (0,1 M; pH 7,3)

Álcool etílico P.A.

HMDS (hexametildisilazane)

### **Procedimento**

- 1- Cobriu-se uma pequena quantidade de amostra com uma solução de 3 mL de GTA 25% e 22 mL de tampão fosfato num período de 12 horas à 4°C.
- 2- Lavou-se a amostra com tampão fosfato (0,1 M) por 10 minutos, três vezes)
- 3- Desidratou-se as amostras com as seguintes sequências de álcoois:

Álcool 50% 10 min.

Álcool 70% 10 min

Álcool 80% 10 min

Álcool 90% 10 min

Álcool 95% 10 min

Álcool 100% 10 min (3 vezes)

- 4- Verteu-se a amostra em um vidro relógio e adicionou-se algumas gotas de HMDS e deixou-se secar.
- 5- As amostras foram coladas em suporte apropriado usando base de unha.
- 6- Deixou-se secar em estufa à temperatura alta e inferior a 60°C.
- 7- Impregnou-se ouro na amostra. Esta etapa foi realizada no Departamento de Física da EESC-SP na seção de Microscopia Eletrônica. Cobriu-se as amostras com ouro 99,99% num metalizador (SDC-050 Balzers). As amostras foram então examinadas num microscópio eletrônico de varredura Zeiss DMS-960 em 11 à 20Kev e fotografadas com um video processador de cópias (Mitsubishi) com chapa fotográfica CK100-S.

#### **5. 3. 1. Método do “roll-tube” para bactérias proteolíticas**

As bactérias inoculadas neste experimento foram obtidas a partir de diluições de meios de cultura incubados em estufa com auxílio de uma seringa.

O "roll-tubes" consistiam de tubos Belco dotados de tampa com rosca.

O procedimento foi o seguinte:

- 1- Pesou-se 0,008 g de agar mais 0,003 g de gelatina e colocou-se direto nos tubos.
- 2- Adicionou-se 3 mL de meio basal (Zinder & Koch, 1984).
- 3- Trocou-se a atmosfera para  $N_2$ , fechou-se os tubos e autoclavou-se.
- 4- Os tubos foram mantidos em banho maria à 50°C e trocou-se a atmosfera para  $N_2+CO_2$ .
- 5- Adicionou-se  $NaHCO_3$  10% (0,1 ml), mais 0,1 mL de solução de vitaminas e 0,1 ml de solução redutora.
- 6- Adicionou-se 0,1 ml de inóculo (retirado do sobrenadante das culturas).
- 7- Rolou-se os tubos em uma bandeja contendo água gelada .
- 8- Incubou-se os tubos em estufa à 37°C de cabeça para baixo.

Observou-se o crescimento das colônias e quando constavam de mais de 1mm (aproximadamente 5 dias), amostras foram retiradas com auxílio de alça de platina sob atmosfera de nitrogênio. Amostras foram colocadas em lâminas e observadas e fotografadas ao microscópio comum.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de iniciar a discussão dos resultados algumas considerações serão feitas:

O lodo anaeróbio utilizado neste trabalho foi proveniente de um reator anaeróbio tratando esgoto sanitário sintético em escala de laboratório e cuja fração protéica era preparada com peptona de carne. A proteína inicialmente utilizada nesta pesquisa como substrato para as bactérias foi a peptona de carne. Posteriormente utilizou-se gelatina como material protéico. A gelatina é uma proteína que representa melhor esse substrato em águas residuárias onde está presente em grandes quantidades, principalmente em água residuárias de abatedouros (SAYED, 1987).

Buscou-se na literatura o método mais adequado a ser utilizado para se determinar as concentrações de proteína durante o período do experimento devido a problemas de substâncias interferentes. Os mais diversos métodos foram empregados por pesquisadores para esse fim, como exemplo o método de Lowry com algumas modificações, o método do Azul de Comassie, o método do Biureto com modificações. O método de Lowry é o método mais comum e mais sensível utilizado nas determinações de proteínas. No entanto, este método de acordo com SMITH et al.(1985), dá uma resposta diminuída nas leituras das absorvâncias da proteína gelatina. O método do Ácido Bicinonínico é mais sensível que o de Lowry para esta proteína, mas este produto teria que ser importado e o custo seria elevado. O método do micro-biureto foi adaptado para determinação de proteínas em águas residuárias no laboratório de Saneamento da EESC- São Carlos e este método e o de Lowry foram utilizados inicialmente nessa pesquisa. Era necessário encontrar um método que fosse sensível e que empregasse pequenas quantidades de amostras. Um método onde destilação das amostras fosse necessária, seria inviável, pois além do tempo necessário para todas as análises, a quantidade de amostra requeridas seriam muito grandes.

Neste trabalho procurou-se estudar o comportamento de um lodo granulado anaeróbio quando inoculado com altas concentrações de proteínas. Para isso, foram realizados alguns experimentos em que o lodo foi inoculado em meio de cultura contendo uma solução de sais minerais e vitaminas e adicionando-se proteína. Os resultados foram avaliados em termos de produção de gás e de degradação de proteínas. Inicialmente dois testes para produção de metano foram realizados em meios contendo peptona de carne e gelatina. Esses meios foram enriquecidos e a produção de metano foi analisada. Outros experimentos visaram estudar a degradação da proteína pelo lodo anaeróbio inoculado em termos de velocidade de degradação, estudar a degradação de proteínas em termos de seus aminoácidos e os produtos da fermentação dos aminoácidos- os ácidos graxos. Também procurou-se avaliar a degradação da proteína quando diferentes concentrações de gelatina foram adicionadas ao meio de cultura Optou-se pelos cálculos de velocidade utilizando a determinação da velocidade de degradação da proteína, levando-se em conta os conceitos de MONOD, e considerando-se condições contínuas de operação.

## **6. 1. Resultados do ensaio 1**

### **6. 1. 1. Resultados do primeiro teste com peptona.**

Nesse teste quatro frascos foram inoculados e dois deles (frascos 3 e 4) contendo proteína (peptona). As quantidades de metano produzidas foram calculadas de acordo com uma curva padrão que está mostrada no Anexo A. Neste primeiro teste o que variou entre os dois primeiros frascos foi apenas o volume de bicarbonato de sódio adicionado. Essa variação foi muito pequena e assim esses dois frascos podem ser considerados como controles. O frasco 4 além da peptona continha extrato de levedura. A Figura 12 mostra a produção de gás metano no primeiro período de incubação desses frascos (14 dias). Os valores estão apresentados no Anexo B.

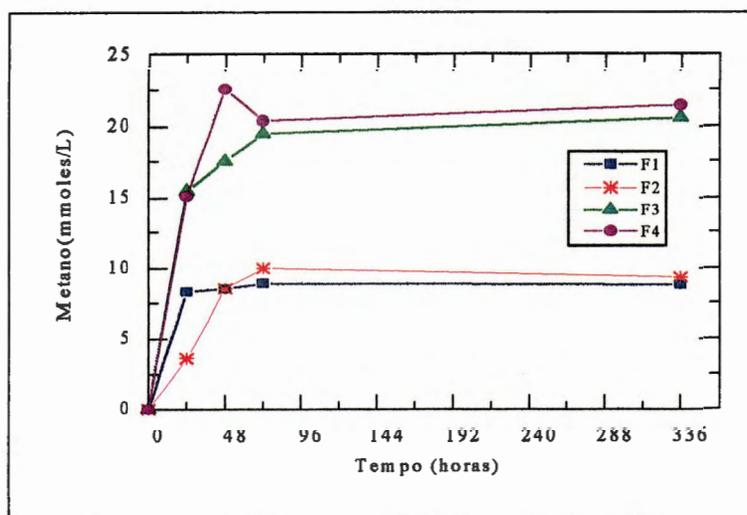


FIGURA 12. Produção de metano no período de incubação para frascos sem peptona (frascos 1 e 2) e com peptona (frascos 3 e 4). No frasco 4 acrescentou-se 2,5 mL de uma solução de extrato de levedura 2%.

Deve-se ressaltar que neste primeiro teste foram tomados poucos pontos de amostragens. Como pode ser observado os frascos contendo proteína apresentaram no final do experimento uma maior quantidade de gás metano. Como poucos pontos foram tomados neste teste não foi calculado o potencial metanogênico do inóculo

#### 6. 1. 1. 1. Resultados da primeira alimentação dos frascos com peptona.

Na primeira alimentação (Figura 13), observa-se que a produção de metano aumentou, principalmente nos frascos contendo proteína e foi bem maior que para os controles (frascos 1 e 2). A quantidade de metano produzido nos frascos 1 e 2 é pequena e é resultado da atividade das bactérias mantidas no lodo sem nenhum substrato adicionado. Já para os frascos em que proteína foi adicionada as taxas de formação de gás não puderam ser calculadas da mesma devido o pequeno número de pontos analisados. Os cálculos do potencial metanogênico para os frascos 1 e 2 foram feitos com o mínimo de quatro pontos.

Observa-se que nos frascos 3 e 4 no período da primeira alimentação, a quantidade de metano em mmoles/L permaneceu a mesma para os dois frascos (em torno de 20 mmoles/L).

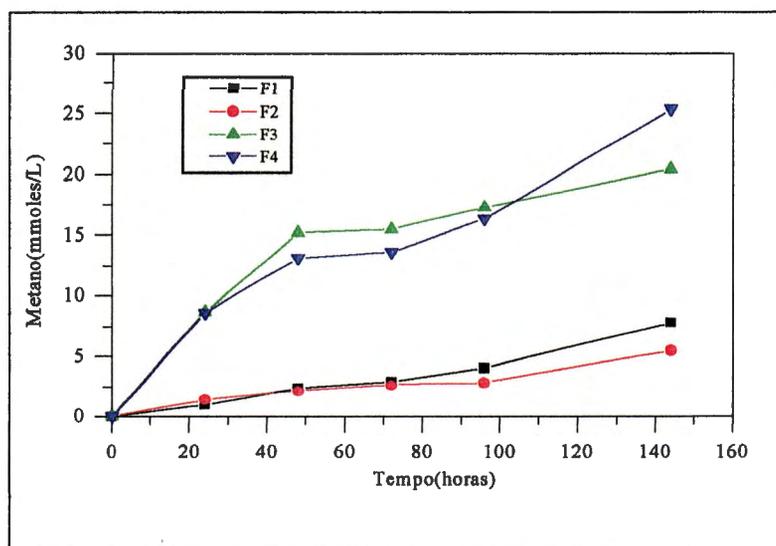


FIGURA 13. Produção de metano nos frascos após a primeira realimentação. Frascos 1 e 2 sem peptona. Frascos 3 e 4 com peptona. Frasco 4 com extrato de levedura

No Anexo B estão mostradas os pontos utilizados para os cálculos de velocidade de produção de metano.

TABELA 9. Cálculo dos potenciais metanogênicos para a 1ª realimentação e produção de metano (frascos 1 e 2 usados como controle, frascos 3 e 4 contendo proteína).

Frasco	Potencial metanogênico (mmoles/L.h <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
F1	0,01394t + 0,08521	0,99
F2	0,01141t + 0,02455	0,99
F3	nc	-
F4	nc	-

#### 6. 1. 1. 2. Resultados da segunda alimentação dos frascos com peptona.

Para a segunda realimentação (Figura 14) observa-se que o padrão de produção de gás metano foi o mesmo que na primeira alimentação, isto é, os frascos 3 e 4 (que receberam proteína) apresentaram maior produção de gás. As taxas de produção de metano e a concentração final estão mostrados no Anexo B.

Nesta segunda realimentação as quantidades de metano, permaneceram em torno de 20 mmols/L mesmo após 17 dias. Neste período, as velocidades de formação de metano foram bastante reduzidas para os frascos 3 e 4 quando comparadas ao período da primeira realimentação. A maior concentração de metano foi observada nos frascos 3 e 4 contendo a proteína.

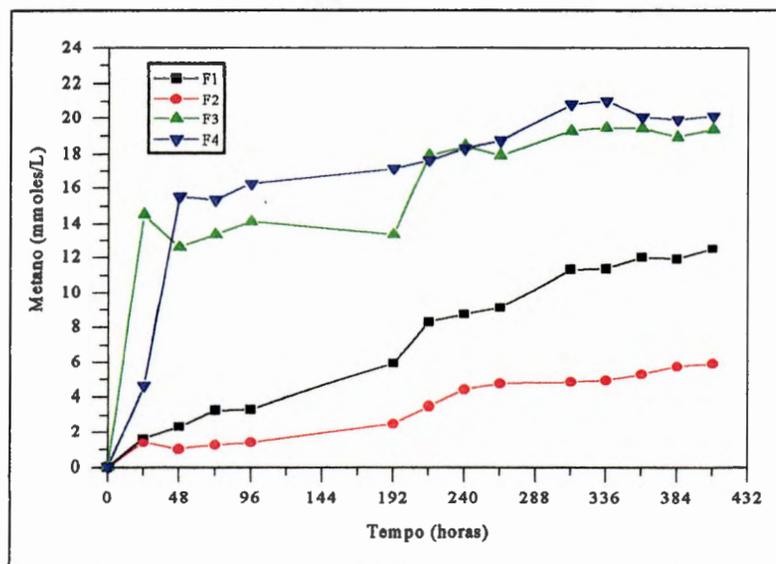


FIGURA 14. Produção de metano nos frascos após a segunda realimentação. Frascos 1 e 2 sem peptona. Frascos 3 e 4 com peptona.

Os cálculos dos potenciais metanogênicos para a segunda alimentação dos frascos com e sem peptona estão mostrados na Tabela 10. Para o frasco 4 não foi calculado o potencial metanogênico devido a falta de um número mínimo de pontos. O que se observa nas figuras apresentadas no Anexo B

TABELA 10- Cálculo dos potenciais metanogênicos para a 2ª realimentação e produção de metano (frascos 1 e 2 usados como controle, frascos 3 e 4 contendo proteína).

Frasco	Potencial metanogênico (mmols/L.h <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
F1	0,01645t+0,03592	0,99
F2	0,00717t -0,35757	0,99
F3	0,00199+2,44875	0,99
F4	nc	-

### 6. 1. 2. Resultados do primeiro teste com Gelatina

A produção de gás para este teste também foi determinada em função da curva padrão do Anexo A. Para este teste foram inoculados três frascos contendo gelatina e incubados nas mesmas condições do primeiro teste para peptona de carne. Os resultados dos cálculos da velocidade para produção de gás estão mostrados na Figura 15. A produção de metano aumentou bastante após três dias de incubação e foi maior nos frascos contendo proteína (frascos 2 e 3).

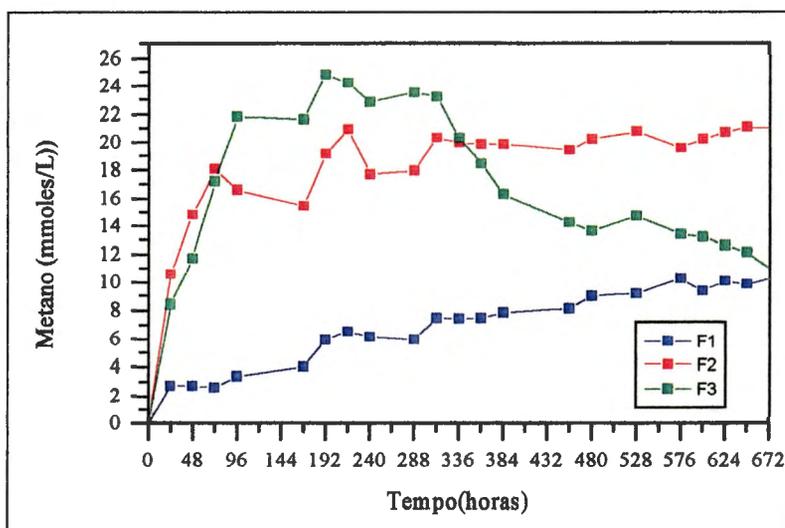


FIGURA 15. Produção de metano em frascos incubados com gelatina. Frasco 1 sem proteína e frascos 2 e 3 com gelatina (5g/L)

Após 14 dias de incubação, ocorreu um decréscimo na produção do gás para o frasco 3, o que deve ter sido causado devido a perdas de gás nos locais de perfuração das rolhas de butila para coleta de amostras. As curvas ajustadas para a produção de metano no primeiro teste com gelatina e os valores estão mostrados no Anexo C.

Os cálculos do potencial metanogênico para o primeiro teste com gelatina estão mostrados na Tabela 11 a seguir. Pelos cálculos verifica-se que a velocidade de produção de metano aumentou nos frascos contendo gelatina quando comparados ao frasco controle e esta atividade foi praticamente igual para os frascos 2 e 3. O frasco 1 mantinha apenas a atividade do lodo, e nos frascos onde proteína foi adicionada deve ter ocorrido uma multiplicação

acelerada de células que degradou o substrato rapidamente e portanto, mais metano foi produzido durante o período.

**TABELA 11.** Cálculo dos potenciais metanogênicos para os inóculos adicionados em

meio com gelatina. (frasco 1 sem proteína, frascos 2 e 3 com gelatina).

Frasco	Potencial metanogênico (mmoles/L.h <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
F1	0,00307t + 0,89338	0,99
F2	0,0124t + 0,03664	0,99
F3	0,0138t + 1,786	0,99

#### 6. 1. 2. 1. Resultados do teste para a degradação de proteína e produção de gás.

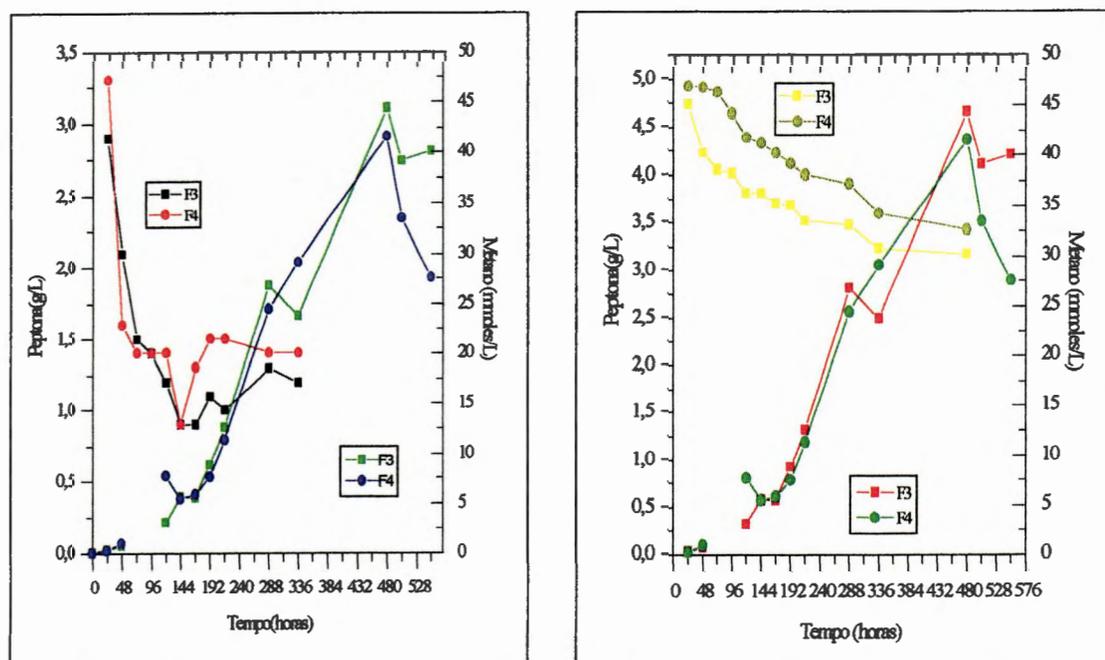
Este teste foi realizado visando estudar a produção de metano em função da degradação de proteína. Dois frascos para cada tipo de proteína (peptona e gelatina) foram inoculados com meio de cultura contendo lodo granulado, proteína (5g/L). Estes frascos foram inoculados nas mesmas condições iniciais anteriormente descritas para os frascos 3 e 4 com peptona e frascos 2 e 3 com gelatina com exceção da quantidade de inóculo que foi reduzida a 50 mL.

Esses testes foram separados em dois conjuntos de resultados, respectivamente, para os valores dos produtos de degradação de peptona e gelatina.

##### 6.1.2.1.1. Resultados da degradação de proteína e produção de metano para Peptona

Os resultados das medidas das concentrações de peptona e metano estão apresentados nas Figuras 16a e 16b. A Figura 16a mostra a produção de metano (mmoles/L) e a degradação de proteína (g/L) nos frascos 3 e 4 que receberam inóculos dos frascos 3 e 4 do teste realizado com a segunda alimentação com peptona. Para se determinar a concentração da proteína nos diferentes tempos de amostragem utilizou o método do microbiureto. Os cálculos da concentração de metano foram realizados da curva analítica mostrada

no Anexo A. Na Figura 16b estão mostrados os resultados de metano nos mesmos frascos e onde se utilizou o método de Lowry para se determinar a proteína. Os valores das determinações de proteína e metano estão no Anexo D



FIGURAS 16a e 16b. Produção de metano e degradação de peptona (Biureto e Lowry respectivamente).

A Figura 16b e os valores do Anexo D mostram que a degradação de proteína foi lenta nos dois frascos inoculados, mas comparando-se as velocidades no teste da segunda alimentação (Tabela 9), a velocidade de produção de metano aumentou para o frasco 3. Isso pode indicar um início de adaptação das culturas ao substrato protéico. Após 14 dias de incubação 63,4% e 68,4% da proteína respectivamente para os frascos 3 e 4 permaneceram no meio. Os valores obtidos aplicando-se o modelo de cinético confirmam esses resultados e estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 12. Cálculo dos potenciais metanogênicos para a o 2º teste com peptona

Frasco	Potencial metanogênico	$r^2$
F3	$0,01747t - 1,22138$	0,99
F4	$0,01399t - 0,69779$	0,99

A produção de metano foi linear para as condições do teste no período de 144 a 480 horas e depois apresentou um decréscimo. Os cálculos das velocidades de degradação da proteína estão mostrados na Tabela 13

**TABELA 13 .** Cálculo das velocidades de degradação de proteína no segundo teste com peptona utilizando-se os resultados obtidos com o método de Lowry.

Frasco	Valores de r para degradação de proteína	r <sup>2</sup>
F3	-0,000902t+ 1,4716	0,99
F4	-0,001t + 1,60867	0,99

Quando se utilizou o método de Lowry verificou-se que a proteína permaneceu mais tempo no meio e mesmo após aproximadamente 20 dias, ou seja ela foi lentamente degradada tanto para o frasco 3 como para o frasco 4. A quantidade de peptona detectada após esse período equivale à quantidade encontrada após 24 horas com o método do micro-biureto.

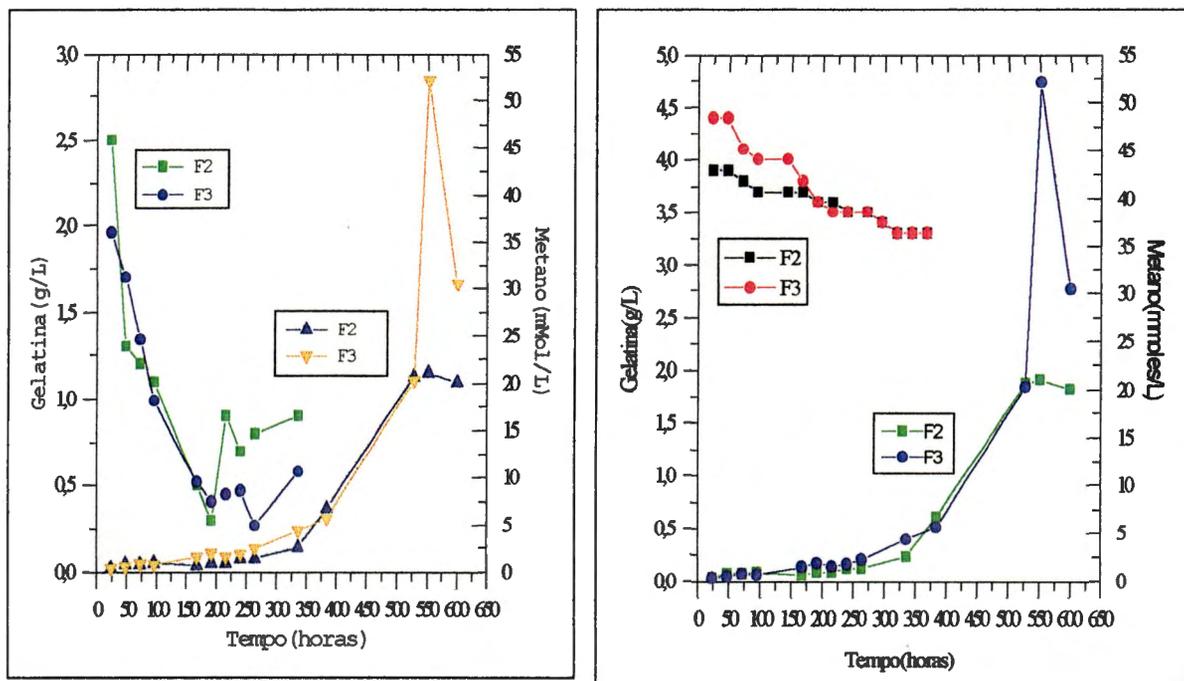
Os valores de produção de metano e degradação de proteína estão mostradas no Anexo D.

Com o método do micro-biureto observou-se que após 24 horas, a quantidade de peptona detectada estava bem abaixo da quantidade adicionada (64%) e também após 6 dias (144 horas) houve um aumento crescente no teor de proteína no meio o que poderia ser provavelmente justificado pelo aumento de proteína lançado no meio por bactérias que estariam se multiplicando. Contudo se isso fosse real, o mesmo deveria ser observado com o método de Lowry, o que não ocorreu.

#### **6.1.2.1.2. Resultados da degradação de proteína e produção de metano para o 2º teste com gelatina.**

Neste teste os métodos do Biureto e Lowry foram utilizados para se determinar a concentração de proteína os frascos 2 e 3 contendo gelatina e os resultados estão mostrados

nas Figuras 17a e 17b. Na Figura 17a está mostrada a concentração da gelatina detectada pelo método do micro-biureto, no período de 24 a 336 horas. Na Figura 17b está mostrada a degradação da gelatina no mesmo período através do método de Lowry. Em ambas as figuras também está mostrada a produção de metano nos frascos 2 e 3 no período de 24 a 600 horas.



**FIGURAS 17a e 17b** - Produção de metano e degradação de gelatina (métodos do Biureto e Lowry, respectivamente) nos frascos 2 e 3 com inóculo proveniente do 1º teste com gelatina. As legendas indicam os números dos frascos.

As determinações de gelatina bem como os dados de produção de metano estão mostrados no Anexo E. As velocidades de degradação da proteína estão apresentadas na Tabela 14.

**TABELA 14-** Cálculo das velocidades de degradação de gelatina para o 2º teste baseadas nas concentrações obtidas com o método de Lowry.

Frasco	Valores de r para degradação de proteína	r <sup>2</sup>
F2	-0,0005278t + 1,37931	0,99
F3	-0,00084809t + 1,47104	0,99

Com o método de Lowry, após 24 horas (1ª medida da concentração), 78% da gelatina adicionada no meio foi detectada. Essas porcentagens consideram que a quantidade de proteína inoculada inicialmente no meio de cultura equivale a porcentagem total, isto é 5 g/L representam 100%. Após 15 dias (360 h) ainda restaram 66% da proteína no meio para o frasco 2. Para o frasco 3, cerca de 88% de gelatina foi detectada após 24 h e 66% ainda restavam no meio após 360. As taxas de degradação obtidas mostram que a gelatina foi lentamente degradada nos dois frascos e com a mesma velocidade no período que durou o experimento. Como se observa para ambos os frascos a degradação de proteína foi muito lenta com uma remoção de apenas 34%.

A produção de metano também foi pequena neste período, sendo que apenas 2,54 mmoles/L de gás foram detectados no final de 336 h. A produção de gás aumentou a um valor máximo de 21,06 mmoles/L (frasco 2) e 33,0 mmoles/L (frasco 3) após 552 horas (23 dias). Os cálculos dos potenciais metanogênicos estão mostrados na Tabela 15.

**TABELA 15.** Cálculo dos potenciais metanogênicos no 2º teste com gelatina.

Frasco	Valores de r	r <sup>2</sup>
F2	0,00973t - 2,0376	0,99
F3	0,00841t - 1,0608	0,99

A diferença entre o experimento com peptona e aquele com gelatina é que a produção de metano nos frascos com peptona atingiram o valor máximo após 480 h e em seguida decresceram, enquanto que naqueles com gelatina valores similares foram conseguidos somente após 552 horas, o que significa que a peptona degradou mais rapidamente.

Quando se analisou um maior número de amostras com o método do biureto confirmou-se que esse método era realmente inadequado para avaliar a concentração de proteína nesse tipo de amostra pois os valores encontrados para os últimos tempos de amostragem foram superiores aos encontrados no início do experimento como mostra a Figura 18. Os valores estão no Anexo F

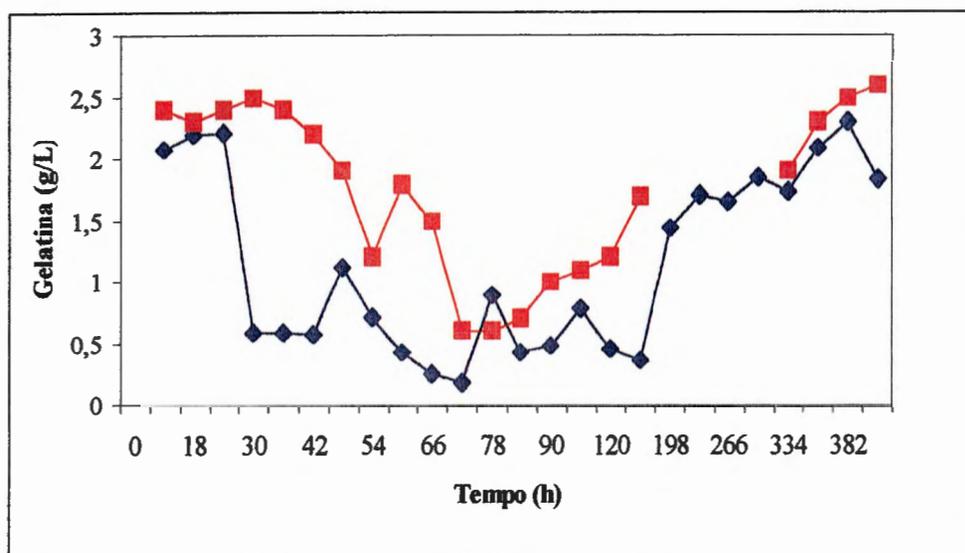


FIGURA 18. Degradação de gelatina pelo método do micro-biureto no 2º teste para gelatina (Para o frasco 3 faltaram algumas amostras)

Com esse padrão incomum de resposta o método do micro-biureto não foi mais utilizado e o de Lowry foi adotado para todos os demais experimentos. A partir desse teste a gelatina foi a proteína usada para todos os demais experimentos.

#### 6.1.2.2. Resultados do terceiro teste para gelatina

Para esse teste, os inóculos (5 mL) foram obtidos a partir do frasco 3 do 2º teste com a gelatina. Os resultados estão mostrados na Figura 19. Nesse teste o frasco 3 foi o que produziu maior quantidade de gás metano e onde a gelatina desapareceu mais rapidamente do meio.

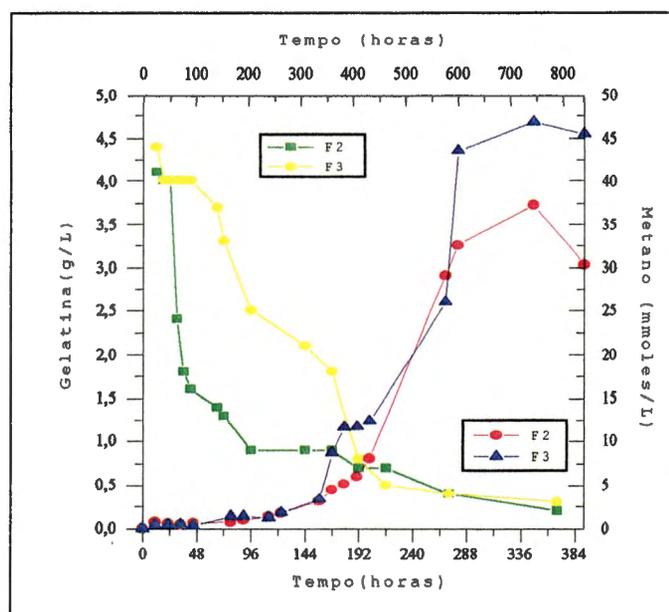


FIGURA 19. Produção de metano e degradação de gelatina detectada pelo método de Lowry. A escala inferior e da esquerda da figura referem-se à degradação de gelatina (frasco 2 em verde e frasco 3 em amarelo). As escalas superior e à direita no gráfico referem-se ao tempo de experimento e aos dados obtidos para metano respectivamente.

Os cálculos para velocidade de degradação da gelatina mostraram valores de  $r$  maiores dos obtidos no teste anterior com gelatina. A degradação da proteína foi muito mais lenta para o frasco 3, mas após 368 horas praticamente toda gelatina foi removida do meio, porém a produção de metano para esse período foi muito baixa (4,84 e 11,6 mmol/L em média para os frascos 2 e 3 respectivamente). O experimento, no entanto teve duração de 35 dias (840 horas). A maior concentração de metano só foi obtida depois 31 dias (744 horas) e após esse período declinou. A Tabela 16 mostra os valores de  $r$  para o modelo de hidrólise da proteína bem como os valores de porcentagens de metano obtidos.

TABELA 16 . Potenciais metanogênicos e produção de metano para o terceiro teste com gelatina.

Frasco	Potenciais metanogênicos	$r^2$
F2	$0,00848t - 1,61087$	0,99
F3	$0,00861t - 1,24659$	0,99

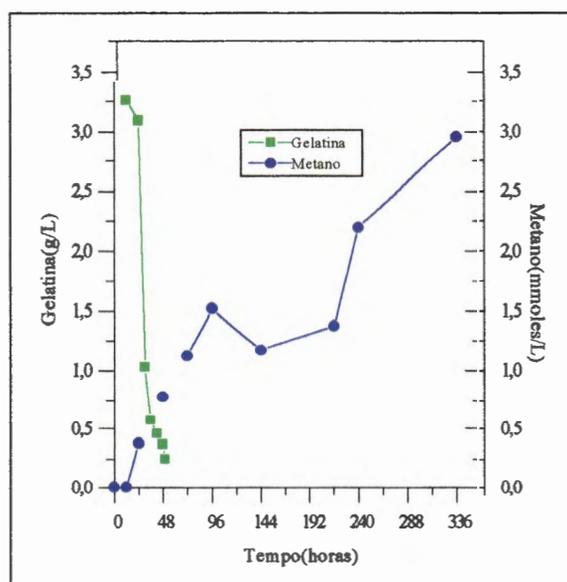
A meia vida para essas taxas de hidrólise foram calculadas em 69,3 h para o frasco 2 e 115,5 horas para o frasco 3 a partir dos valores mostrados na Tabela 17. Esses valores foram calculados para o período de 24 a 274 horas. A partir daí a degradação foi igual para os dois frascos. A produção de metano iniciou-se efetivamente após 144 h quando as concentrações de proteína se encontravam próximas de zero como se pode observar na Figura 19 e nas tabelas do Anexo G.

**TABELA 17.** Cálculo da velocidade de degradação da proteína para o terceiro teste com gelatina

Frasco	Degradação da proteína	$r^2$
F2	$-0,00645t + 0,8138$	0,99
F3	$-0,01027t - 1,84378$	0,99

### 6. 1. 2. 3. Resultados do quarto teste para gelatina

Neste experimento o inóculo foi obtido a partir do frasco 3 do 3º teste com gelatina. A velocidade com que a proteína foi degradada é maior que para o teste anterior como se pode observar na Figura 20 e na Tabela 17. Os valores estão mostrados no Anexo H.



**FIGURA 20.** Degradação de gelatina (5g/L) e produção de metano. (Inóculo proveniente do frasco 3 do teste anterior).

O modelo cinético de primeira ordem nesse caso se ajusta perfeitamente ao processo de degradação (Tabela 18). O valor de  $r$  neste caso foi  $0,073 \text{ mmols/L/d}^{-1}$  com uma meia vida de 9,5 horas, com  $r^2 = 0,99$ . A produção de metano (Tabela 19) seguiu o mesmo padrão que para os outros dois testes quando  $1(\mu\text{m}) \text{ mmol/L}$  de metano foi detectado nas amostras após 72 horas quando a concentração da proteína se encontrava próxima de zero.

TABELA 18. Cálculo da velocidade de degradação de proteína para o quarto teste com gelatina.

Frasco	Degradação da proteína	$r^2$
F3	$-0,07379t - 2,40228$	0,99

TABELA 19. Cálculo dos potenciais metanogênicos para o quarto teste com gelatina

Frasco	Potenciais metanogênicos	$r^2$
F3	$0,01884t - 1,3012$	0,99

Os resultados dos testes 3 e 4 para gelatina mostram que a velocidade de degradação aumentou consideravelmente de um teste para outro, indicando que ocorreu adaptação das bactérias à presença da proteína, mas a produção de metano só teve início após quase toda a proteína ser degradada.

Nas Figuras 19 e 20 pode-se observar uma queda mais rápida nos níveis de proteína no meio que nos testes anteriores. Isso pode indicar uma maior adaptação das bactérias à presença da gelatina. A produção de metano aumentou sensivelmente após 240 horas como se observa na Figura 19. As quantidades de metano produzidas estão mostrados no Anexo H, bem como os cálculos das velocidades de degradação da proteína.

Como este último teste teve uma duração menor de tempo (336 horas) um aumento na produção de metano a partir de 336 horas não pode ser evidenciado, porém quando se observa os valores nesse último tempo verifica-se que a tendência para produção de metano é

aumentar como ocorreu no caso anterior. Neste último teste as concentrações de gelatina foram medidas em intervalos de tempo menores. A produção de metano e a concentração de gelatina estão no Anexo H.

As pesquisas de SCHULZE et al.(1988), mostraram que a degradação de 5 g/L de gelatina em reator UASB contendo meio mineral basal, foi de 91% após 32 dias com 58% de metano foi detectado no biogás. Quando aumentou a concentração para 15 g/L, 90% da gelatina foi hidrolisada em 28 dias e a eficiência do reator não melhorou. não houve aumento na produção de gás. O conteúdo de metano foi de 50% no biogás

Deve-se observar que para os testes 3 e 4 com gelatina foi utilizada uma quantidade bem menor de inóculo, isto é, um número menor de bactérias foram inoculadas aos novos meios.

De acordo com BREURE et al.(1984), bactérias metanogênicas que fermentam acetato crescem muito lentamente. A atividade máxima específica de bactérias acidogênicas na degradação da gelatina é relativamente alta e muito maior que para as metanogênicas e resultados similares foram verificados com a degradação de carboidratos. A produção de organismos acidogênicos é muito maior (8-15%) quando comparada com a de metanogênicas (1-2%). Isso significa que a conversão de 1 g de um biopolímero, por exemplo, gelatina leva à formação de 0,08-0,15 g de organismos acidogênicos e apenas 0,01-0,02 g de metanogênicos..

## **6.2.- RESULTADOS DO ENSAIO 2**

Os testes descritos nessa etapa do trabalho foram realizados visando estudar a degradação de proteína em termos de seus aminoácidos constituintes e a quantificação dos mesmos durante o período de incubação.

Trabalhos citados na literatura com relação a degradação de gelatina, como os realizados por BREURE et al (1984, 1985, 1986) e SCHULZE et al. (1988), NAGASSE & MATSUO (1982) apresentam resultados concernentes à taxas de hidrólise, influência do pH na degradação da proteína, produção de ácidos graxos, influência de outros compostos tais

como glicose, porém não existem dados a respeito da fase hidrolítica de proteínas com relação a quais e em que quantidade aminoácidos resultantes da hidrólise estão presentes no meio. BREURE et al. (1985), em seus estudos com fermentação de gelatina, realizaram esse tipo de análise mas não publicaram dados a respeito. Apenas citaram as análises como provas para confirmar a extensão da hidrólise da proteína (isto é, se a gelatina foi degradada completamente ou não).

Neste trabalho identificou-se quais os aminoácidos constituíam a proteína e em que quantidades e também quantificou-se os aminoácidos liberados após diferentes períodos de tempo nos meios. Amostras foram retiradas a cada 6 horas para análise. Os tempos de amostragem foram escolhidos em função do último teste realizado com degradação de gelatina no ensaio 1.

#### **6.2.1. Determinação de proteína nas amostras(Lowry)**

As concentrações de proteínas foram determinadas a partir de uma curva padrão com cinco diferentes concentrações de gelatina. Essas concentrações foram escolhidas após alguns testes de absorvância, e a partir do fator (concentração/absorvância) encontrado na curva, foram determinados os equivalentes para gelatina das amostras. Também foram calculados os equivalentes para amostras de lodo puro, lodo mais meio de cultura os cálculos estão mostrados no Anexo I

As concentrações de proteína foram calculadas para os tempos zero, 6, 12, 18, 24 e 36 horas após a inoculação, e estão mostradas no anexo. Pode-se verificar que a concentração de proteína diminuiu consideravelmente nas amostras no período de 24 a 36 horas quando a proteína basicamente desapareceu do meio. A concentração de proteína determinada no lodo 'mãe' foi similar àquela das amostras após 36 horas de inoculação. Essa proteína do lodo, provavelmente deve ter sido liberada no meio pelas bactérias presentes. A determinação de proteína no meio contendo apenas sais teve como finalidade evitar dúvidas quanto à interferência dos mesmos na leitura das amostras e como era esperado as leituras foram similares a dos controles.

A densidade ótica líquida foi calculada subtraindo-se o valor de cada densidade ótica média do valor da densidade ótica (DO) média dos controles. O fator encontrado na curva de

No período entre o tempo zero de incubação dos frascos e 18 h os valores de concentração de proteínas permaneceram praticamente os mesmos. A Figura 21 mostra as concentrações nos tempo zero à 36 horas após a inoculação.

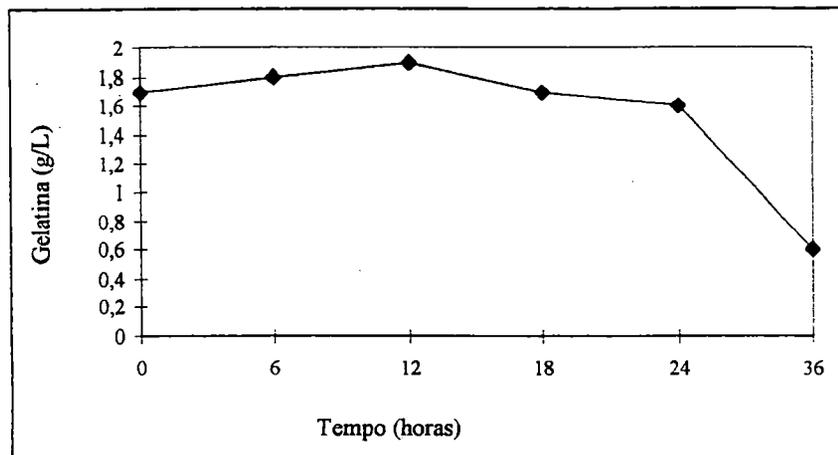


FIGURA 21 - Concentração de proteína nas amostras determinadas pelo método de Lowry.

### 6.2.2- Aminograma da gelatina

A composição da gelatina usada nos experimentos foi caracterizada em termos de porcentagem de seus aminoácidos constituintes.

De acordo com o MERK INDEX (1995), a gelatina é uma mistura heterogênea de proteínas solúveis em água e de alto peso molecular. Não é encontrada na natureza, é obtida por fervura de pele, tendões, ligamentos, ossos, etc, com água. O total de aminoácidos calculados é sobre 100%, porque a água é incorporada nas moléculas de aminoácidos individuais. A gelatina apresenta cor levemente amarela transparente. É solúvel em água quente, glicerol e ácido acético. É insolúvel em solventes orgânicos.

A gelatina representa a estrutura helicoidal rompida do colágeno ou seja, é um enrolamento ao acaso e não mais ordenado (STRAYER, 1988). O colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos, perfazendo um quarto do seu peso total. Está presente também em vasos sanguíneos e dentes e, em alguma extensão em todos os órgãos e serve para manter as células unidas em unidades básicas. Esta proteína está presente em águas residuárias, principalmente de abatedouros (BREURE et al., 1985).

abundante em mamíferos, perfazendo um quarto do seu peso total. Está presente também em vasos sanguíneos e dentes e, em alguma extensão em todos os órgãos e serve para manter as células unidas em unidades básicas. Esta proteína está presente em águas residuárias, principalmente de abatedouros (BREURE et al., 1985).

Duas amostras de gelatina foram hidrolisadas e submetidas ao analisador de aminoácidos (uma de 3 mg e outra de 4,77 mg). As porcentagens de cada aminoácido foram calculadas e estão mostradas na Tabela 20, onde estão comparadas aos dados do MERK INDEX(1995).

Os valores da Tabela 20, indicam que cada 100 moles de gelatina apresentam as porcentagens mostradas dos aminoácidos. Nestas amostras não foi determinado o teor de hidroxiprolina que perfaz cerca de 14% da proteína (o método utilizado não detecta esse composto). A proteína usada no experimento apresentou menores quantidades dos aminoácidos glicina, prolina, asparagina e glutamina enquanto que os demais aminoácidos aparecem em quantidades similares. A gelatina no experimento continha maior quantidade de serina quando comparada aos dados do Merk Index.

**TABELA 20.** Composição de aminoácidos da gelatina e comparação com dados fornecidos na literatura.

Aminoácido	Composição da gelatina usada (%)	Composição fornecida pelo Merk Index(%)
Glicina	17,2	25,5
Alanina	7,96	8,7
Valina	2,13	2,5
Leucina	2,83	3,2
Isoleucina	1,62	1,4
Metionina	1,09	1
Cisteína	nd	0,1
Fenilalanina	2,2	2,2
Prolina	10,3	18
Serina	2,2	0,4
Treonina	1,6	1,9
Tirosina	0,7	0,5
Ac. aspártico	3,6	6,6
Ac. glutâmico	6,4	11,4
Arginina	7,9	8,1
Lisina	3,7	4,1
Histidina	0,9	0,8

\* nd = não detectado

A glicina é um aminoácido importante precisamente porque ocupa muito pouco espaço e assim permite que diferentes cadeias de polipeptídeos permaneçam juntas. A proporção de resíduos de glicina em todas as moléculas de colágeno (proteína da qual a gelatina é derivada) está próximo de um terço. Aproximadamente todo terceiro resíduo é glicina e conseqüentemente seu teor elevado nas amostras. A composição de aminoácidos da gelatina em mmoles /L está mostrada na Tabela 21.

**TABELA 21 - Aminoacidograma da gelatina (média das duas amostras)**

Aminoácido	Amostra 1 (4,777 mg)* (mmoles/L)	Amostra 2 (3,000 mg)* (mmoles/L)	Média das duas amostras (mmoles/L)
Lisina	2479	2559	2519
Histidina	542	595	568,5
Arginina.	4122	4496	4309
Ác. Aspartico.	2812	2527	2669,5
Treonina	1313	1436	1374,5
Serina	2195	2057	2126
Ác. Glutâmico	4496	4162	4329
Prolina	8587	9357	8972
Valina	1717	1901	1809
Metionina	487	624	555,5
Isoleucina	1121	1341	1231
Leucina	2066	2251	2158,5
Glicina	23721	22190	22955,5
Tirosina	345	469	407
Fenilalanina	1249	1450	1349,5
Alanina	8832	9035	8933,5

\* Quantidade de proteína hidrolisada.

### 6.2.3. Aminograma das amostras .

Os aminoácidos foram determinados nas amostras de meio de cultura inoculados com proteína e lodo granulado hidrolisados e sem hidrólise. Para as amostras sem hidrólise foram determinados os valores de aminoácidos nos tempos zero, 6, 12, 18, 24 e 36 horas após a inoculação e estão mostrados na Tabela 22.

Os valores da Tabela 22 representam as médias das amostras em duplicata para cada aminoácido. A partir desses valores foi determinado o teor de aminoácidos livres dividindo-se cada valor obtido nos diferentes tempos pelo valor correspondente no tempo zero como se observa na Tabela 23. As Figuras 22 e 23 ilustram o decréscimo no teor desses aminoácidos nos diferentes tempos de amostragem.

**TABELA 22.** Aminograma das amostras de proteína sem hidrólise (médias das amostras) Os valores estão dados em  $\mu\text{moles/mL}$  de amostra.

Aminoácidos	T0	T6	T12	T18	T24	T36
Lisina	0,0739	0,1120	0,1212	0,0166	0,01395	0,0063
Histidina	0,0153	0,0164	0,0194	0,0053	0,0027	0,0045
Arginina	0,0544	0,0659	0,0617	0,0234	0,0366	0,0011
Ác. Aspártico.	0,0781	0,0464	0,0825	0,0225	0,0055	ND
Treonina	0,1192	0,1105	0,0420	0,0049	0,0084	ND
Serina	0,1652	0,1673	0,0397	0,0080	0,0131	ND
Ac. Glutâmico.	0,1432	0,1216	0,1535	0,0218	0,0236	ND
Prolina	0,0707	0,0557	ND*	ND	ND	ND
Glicina	0,1089	0,1061	0,0870	0,0335	0,0703	0,0058
Alanina	0,2369	0,2507	0,2173	2,9435	0,2068	0,0037
Cisteína	0,0051	0,0101	0,0550	0,1047	0,0657	ND
Valina	0,1472	0,1499	0,1285	0,1190	0,0322	ND
Metionina	0,0290	0,0326	0,0265	ND	ND	ND
Isoleucina	0,1259	0,1348	0,1000	0,0607	0,0089	0,0016
Leucina	0,2242	0,2228	0,1474	0,1099	0,0242	0,0020
Tirosina	0,0231	0,0261	0,0189	0,0022	0,0059	0,0025
Fenilalanina	0,0942	0,0843	0,0660	0,0579	0,0164	0,0026

\*ND = não detectado

**TABELA 23.** Teor de aminoácidos livres nas amostras sem hidrólise em cada período de tempo ( $\mu\text{moles/mL}$  de amostra)

Aminoácidos	T6/T0	T12/T0	T18/T0	T24/T0	T36/T0
Lisina	1,52	1,64	0,22	0,19	0,085
Histidina	1,07	1,26	0,35	0,18	0,294
Arginina	1,21	1,13	0,43	0,67	0,020
Ác. Aspartico.	0,59	1,06	0,29	0,07	0
Treonina	0,93	0,35	0,04	0,07	0
Serina	1,01	0,24	0,05	0,08	0
Ac. Glutâmico.	0,85	1,07	0,15	0,16	0
Prolina	0,79	0,00	0,00	0,00	0
Glicina	0,97	0,80	0,31	0,65	0,053
Alanina	1,06	0,92	12,43	0,87	0,016
Cisteína	1,97	10,78	20,52	12,88	0
Valina	1,02	0,87	0,81	0,22	0
Metionina	1,12	0,91	0,00	0,00	0
Isoleucina	1,07	0,79	0,48	0,07	0,013
Leucina	0,99	0,66	0,49	0,11	0,009
Tirosina	1,13	0,82	0,09	0,26	0,108
Fenilalanina	0,89	0,70	0,61	0,17	0,028

A Figura 22 mostra o decréscimo no teor de aminoácidos nas amostras no período de 6 a 36 horas. A figura mostra o aumento no teor de alguns aminoácidos tais como lisina, histidina, glutamina e asparagina após 6 horas de incubação indicando que foram liberados mas se acumularam no meio provavelmente por serem mais difíceis de serem metabolizados ou porque as condições energéticas não eram favoráveis. O teor da maioria dos aminoácidos cai para próximo de zero com 18 horas de incubação. A quantidade dos aminoácidos isoleucina, arginina e tirosina apresenta leve aumento no período de 24 horas e finalmente cai para zero em 36 horas.

Duas observações podem ser feitas a partir da Figura 22: 1º) Alguns aminoácidos são liberados para o meio e rapidamente absorvidos e/ou metabolizados como é o caso da prolina, metionina e serina e, 2º) Outros aminoácidos são liberados e somente são metabolizados se for necessário às bactérias ou são mais difícil de degradação. A histidina é o aminoácido que permaneceu mais tempo no meio sendo o que se encontra em maior quantidade após 36 horas de incubação.

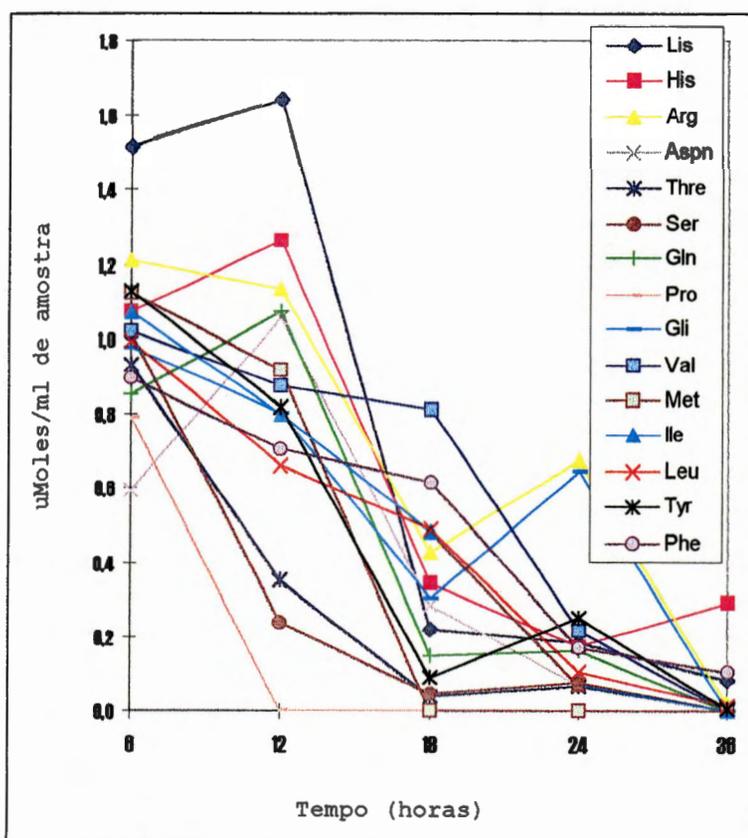


FIGURA 22. Decréscimo no teor dos aminoácidos (exceto alanina e cisteína) durante o período de incubação das amostras sem hidrólise (zero a 36 h). Os valores foram obtidos da Tabela 21.

O decréscimo pode ser melhor visualizado na Figura 23 em que o teor de aminoácidos foi considerado em apenas três períodos de tempo de incubação, isto é, após 6, 18 e 36 horas após a incubação dos frascos.

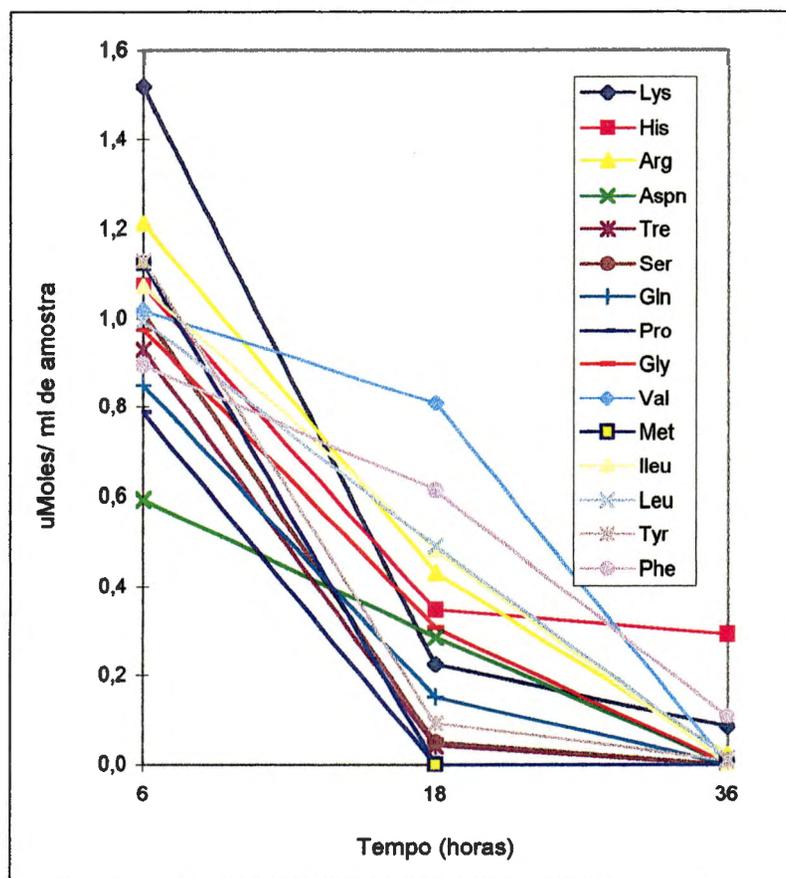


FIGURA 23 - Decréscimo no teor de aminoácidos em três diferentes períodos (6, 18 e 36 horas).

Para as amostras com hidrólise foram determinados além desses tempos, a quantidade de aminoácidos do lodo que foi usado no experimento e os resultados estão apresentados na Tabela 24

TABELA 24 - Aminograma das amostras hidrolisadas (médias). Os valores estão em  $\mu\text{moles/mL}$  de amostra.

AMINOÁCIDOS	Tempo de incubação (horas)						
	T0	T6	T12	T18	T24	T36	LODO
LISINA	0,3746	0,6110	0,4873	0,4200	0,3353	0,0646	0,0174
HISTIDINA	0,0834	0,1324	0,0919	0,5019	0,0701	0,0412	0,0500
ARGININA	0,4144	0,7447	0,5874	0,5407	0,4623	0,0323	0,0848
AC.ASP.	0,5021	0,6608	0,7545	0,6963	0,4657	0,0911	0,0265
TREONINA	0,2455	0,3443	0,2680	0,2185	0,2131	0,0339	0,1301
SERINA	0,3383	0,5393	0,3605	0,4023	0,3559	0,0566	0,0245
ÁC.GLUTÂMICO	0,7528	1,0876	0,6020	0,9806	0,7576	0,1368	0,0245
PROLINA	0,9998	1,7362	1,3452	1,6850	1,3365	0,0951	ND
GLICINA	1,9825	3,0344	3,0390	3,4790	2,7233	0,1589	0,0540
ALANINA	0,9494	1,2212	1,2020	1,3362	1,2147	0,0603	0,0392
CISTEÍNA	ND*	0,0431	0,1096	0,1696	0,1095	ND	ND
VALINA	1,1528	0,4332	0,4343	0,3900	0,2220	0,0250	0,0128
METIONINA	0,3674	0,1473	0,1319	0,1057	0,0943	0,0319	ND
ISOLEUCINA	0,2705	0,3244	0,2983	0,2327	0,1342	0,0287	0,0088
LEUCINA	0,4012	0,5202	0,4593	0,3965	0,2366	0,0347	0,0154
TIROSINA	0,0382	0,0970	0,0691	0,0477	0,0426	0,0250	0,0187
FENILALANINA	0,1904	0,2843	0,2392	0,2269	0,1763	0,0237	0,0167
Soma total	9,06	11,96	10,48	11,83	8,95	0,52	0,94

\*ND= não detectado

Soma de aa (T0) = 9,06		
Para T 6	$\frac{11,96}{9,06}$	x 100 = 132,0
Para T 12	$\frac{10,48}{9,06}$	x 100 = 115,7
Para T 18	$\frac{11,83}{9,06}$	x 100 = 130,6
Para T 24	$\frac{8,95}{9,06}$	x 100 = 98,8
Para T 36	$\frac{0,93}{9,06}$	x 100 = 10,26

A Tabela 24 mostra que houve um aumento no teor de cada aminoácido no período de 6 horas e esse teor diminuiu com o tempo. A diminuição é acentuada no período de 24 a 36 horas e é confirmada quando se observa os cálculos da percentagem de aminoácidos presentes em cada tempo analisado. Este decréscimo no teor é acentuado nesse período de 98,8% a 10,26%.

Comparando-se os valores obtidos na Tabela 23 e na Tabela 24, observa-se que quando as amostras não foram hidrolisadas os aminoácidos estavam disponíveis no meio em quantidades bem menores, como seria de se esperar. Contudo, tanto para as amostras hidrolisadas como para as não hidrolisadas ocorreu diminuição no teor de aminoácidos no período de 24 a 36 horas. Os valores da Tabela 22 indicam que ocorreu pouca atividade de enzimas proteolíticas, ou porque, poucas bactérias proteolíticas estavam presentes, ou poucas enzimas foram lançadas ao meio para degradar proteínas e peptídeos.

A diminuição no teor dos aminoácidos nas amostras indica que os mesmos estão sendo metabolizados (degradados) ou então absorvidos pelas bactérias de alguma forma. Os resultados obtidos no ensaio 3 em que foi analisada a produção de ácidos graxos confirmam essas afirmações. No tempo 18 horas após incubação dos meios, começam a ser detectadas as primeiras quantidades de ácidos graxos e o ácido acético foi o primeiro a ser detectado. Após 36 horas essas quantidades são bem maiores.

Os cálculos de aminoácidos livres sem hidrólise e a porcentagem de proteína livre total para cada período de tempo estão mostrados nas Tabelas 25, 26, 27, 28, 29 e 30, respectivamente para os tempos zero, 6, 12, 18, 24 e 36 horas

**TABELA 25- Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T0**

**T0 = lodo + proteína+ meio de cultura**

**Lodo = lodo granulado (bactérias)**

**1- Calculando a quantidade de aa livres (sem hidrólise)**

Amino ácidos	T0 (hid) (a)	Lodo (hid) (b)	(T0) (sem Hidr) (c)	aa livres(%) (a-b-c)	% de aa livres (c/a)*100
Lys	0,3746	0,0174	0,0739	0,2833	20
His	0,0834	0,0500	0,0153	0,0181	18
Arg	0,4144	0,0848	0,0544	0,2753	13
Ac. Asp.	0,5021	0,0265	0,0781	0,3975	16
Thre	0,2455	0,0296	0,1192	0,0968	49
Ser	0,3383	0,0245	0,1652	0,1487	49
Ac. Glut.	0,7528	0,0245	0,1432	0,5851	19
Pro	0,9998	0,0000	0,0707	0,9291	7
Gly	1,9825	0,0540	0,1089	1,8196	5
Ala	0,9494	0,0392	0,2369	0,6733	25
Cis	ND	ND	0,0051	0	0
Val	1,1528	0,0128	0,1472	0,9928	13
Met	0,3674	ND	0,0290	0	8
Ile	0,2705	0,0088	0,1259	0,1359	47
Leu	0,4012	0,0154	0,2242	0,1617	56
Tyr	0,0382	0,0187	0,0231	-0,0036	60
Phe	0,1904	0,0167	0,0942	0,0795	49

**2- Calculando a % de proteína**

**livre total**

calculo de Co (a-c)	%de prot. livre total (c/Co)*100
0,3007	25
0,0681	22
0,3600	15
0,4240	18
0,1263	94
0,1731	95
0,6096	23
0,9291	8
1,8736	6
0,7125	33
0,0000	0
1,0056	15
0,3384	9
0,1446	87
0,1770	127
0,0151	153
0,0962	98

**TABELA 26- Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T6**

**T0 = lodo + proteína + meio de cultura**

**Lodo = lodo granulado (bactérias)**

**1- Calculando a quantidade de aa livres (sem hidrólise)**

Amino ácidos	T0 (hid) (a)	Lodo (hid) (b)	(T6) ( sem Hidr) (c)	aa livres(%) (a-b-c)	% de aa livres (c/a)*100
Lys	0,3746	0,0174	0,1121	0,2452	30
His	0,0834	0,0500	0,0164	0,0170	20
Arg	0,4144	0,0848	0,0659	0,2637	16
Ac. Asp.	0,5021	0,0265	0,0464	0,4293	9
Thre	0,2455	0,1301	0,1105	0,0049	45
Ser	0,3383	0,0245	0,1663	0,1475	49
Ac. Glut.	0,7528	0,0245	0,1216	0,6068	16
Pro	0,9998	0,0000	0,0557	0,9442	6
Gly	1,9825	0,0540	0,1071	1,8215	5
Ala	0,9494	0,0392	0,2507	0,6595	26
Cis	0,0000	0,0000	0,0101	-0,0101	0
Val	1,1528	0,0128	0,1499	0,9901	13
Met	0,3674	0,0000	0,0326	0,3348	9
Ile	0,2705	0,0088	0,1348	0,1269	50
Leu	0,4012	0,0154	0,2228	0,1630	56
Tyr	0,0382	0,0187	0,0261	-0,0066	68
Phe	0,1904	0,0167	0,0843	0,0895	44

**2- Calculando a % de proteína livre total**

calculo de Co (a-c)	%de prot. livre total (c/Co)*100
0,2626	43
0,0670	24
0,3485	19
0,4558	10
0,1350	82
0,1720	97
0,6313	19
0,9442	6
1,8755	6
0,6987	36
0,0000	0
1,0029	15
0,3348	10
0,1357	99
0,1784	125
0,0121	216
0,1062	79

**TABELA 27- Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T12**

**T0 = lodo + proteína + meio de cultura**

**Lodo = lodo granulado (bactérias)**

**1- Calculando a quantidade de aa livres (sem hidrólise)**

Amino acidos	T0 (hid)	Lodo (hid)	(T12) (sem Hidr)	aa livres(%)	% de aa livres
	(a)	(b)	(c)	(a-b-c)	(c/a)*100
Lys	0,3746	0,0174	0,1212	0,2360	32
His	0,0834	0,0500	0,0194	0,0141	23
Arg	0,4144	0,0848	0,0617	0,2680	15
Ac. Asp.	0,5021	0,0265	0,0824	0,3933	16
Thre	0,2455	0,1301	0,0420	0,0734	17
Ser	0,3383	0,0245	0,0397	0,2742	12
Ac. Glut.	0,7528	0,0245	0,1530	0,5754	20
Pro	0,9998	ND		0,0000	0
Gly	1,9825	0,0540	0,0870	0,0000	0
Ala	0,9494	0,0392	0,2173	0,6930	23
Cis	ND	ND	0,0550	0	0
Val	1,1528	0,0128	0,1209	1,0192	10
Met	0,3674	ND	0,0265	0	7
Ile	0,2705	0,0088	0,1000	0,1617	37
I.eu	0,4012	0,0154	0,1474	0,2385	37
Tyr	0,0382	0,0187	0,0186	0,0009	49
Phe	0,1904	0,0167	0,0666	0,1071	35

**2- Calculando a % de proteína livre total**

cálculo de Co	%de prot.livre total
(a-c)	(c/Co)*100
0,2534	48
0,0641	30
0,3528	17
0,4198	20
0,2035	21
0,2987	13
0,5999	25
0,9998	0
0,0000	0
0,7322	30
0,0000	0
1,0320	12
0,3409	8
0,1705	59
0,2539	58
0,0196	95
0,1238	54

**TABELA 28- Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T18**

**T0 = lodo + proteína + meio de cultura**

**Lodo = lodo granulado (bactérias)**

**1- Calculando a quantidade de aa livres (sem hidrólise)**

Amino ácidos	T0 (hid) (a)	Lodo (hid) (b)	(T18) sem Hidr (c)	aa livres(%) (a-b-c)	l % de aa livres (c/a)*100
Lys	0,3746	0,0174	0,0166	0,3406	4
His	0,0834	0,0500	0,0053	0,0281	6
Arg	0,4144	0,0848	0,0234	0,3062	6
Ac. Asp.	0,5021	0,0265	0,0223	0,4534	4
Thre	0,2455	0,0296	0,0049	0,2110	2
Ser	0,3383	0,0245	0,0080	0,3058	2
Ac. Glut.	0,7528	0,0245	0,0218	0,7065	3
Pro	0,9998	0,0000	0	0,9998	0
Gly	1,9825	0,0540	0	1,8950	2
Ala	0,9494	0,0392	2,9349	-2,0247	309
Cis	0,0000	0,0000	0,1047	0,0000	0
Val	1,1528	0,0128	0,1190	1,0210	10
Met	0,3674	ND		0,0000	0
Ile	0,2705	0,0088	0,0607	0,2011	22
Leu	0,4012	0,0154	0,1099	0,2759	27
Tyr	0,0382	0,0187	0,0022	0,0174	6
Phe	0,1904	0,0167	0,0579	0,1159	30

**2- Calculando a % de proteína livre total**

cálculo de Co (a-c)	%de prot ivre total (c/Co)*100
0,3580	5
0,0781	7
0,3910	6
0,4799	5
0,2406	2
0,3303	2
0,7310	3
0,9998	0
1,9490	2
-1,9855	-148
0,0000	0
1,0338	12
0,3674	0
0,2099	29
0,2913	38
0,0361	6
0,1326	44

**TABELA 29- Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T24**

**T0 = lodo + proteína + meio de cultura**

**Lodo = lodo granulado (bactérias)**

**1- Calculando a quantidade de aa livres (sem hidrólise)**

Amino ácidos	T0 (hid)	Lodo (hid)	(T24) (sem Hidr)	aa livres(%)	% de aa livres
	(a)	(b)	(c)	(a-b-c)	(c/a)*100
Lys	0,3746	0,0174	0,0140	0,3433	4
His	0,0834	0,0500	0,0270	0,0064	32
Arg	0,4144	0,0848	0,0367	0,2929	9
Ac. Asp.	0,5021	0,0265	0,0006	0,4750	0
Thre	0,2455	0,1301	0,0085	0,1070	3
Ser	0,3383	0,0245	0,1305	0,1833	39
Ac. Glut.	0,7528	0,0245	0,0236	0,7047	3
Pro	0,9998	0		0	0
Gly	1,9825	0,0540	0,0703	1,8583	4
Ala	0,9494	0,0392	0,2068	0,7034	22
Cis	ND	ND	0,0657	0,0000	0
Val	1,1528	0,0128	0,0322	1,1079	3
Met	0,3674	0		0	0
Ile	0,2705	0,0088	0,0086	0,2532	3
Leu	0,4012	0,0154	0,0248	0,3610	6
Tyr	0,0382	0,0187	0,0059	0,0136	15
Phe	0,1904	0,0167	0,0164	0,1573	9

**2-Calculando a % de proteína livre total**

calculo de Co	%de prot. livre total
(a-c)	(c/Co)*100
0,3607	4
0,0564	48
0,3777	10
0,5015	0
0,2371	4
0,2078	63
0,7292	3
0,9998	0
1,9123	4
0,7426	28
0	0
1,1207	3
0	0
0,2620	3
0,3764	7
0,0323	18
0,1740	9

**TABELA 30- Cálculo de aminoácidos livres e proteína livre total para T36**

**T0 = lodo + proteína + meio de cultura**

**Lodo = lodo granulado (bactérias)**

**1- Calculando a quantidade de aa livres (sem hidrólise)**

Amino ácidos	T0(hid) (a)	Lodo(hid) (b)	(T36) (sem Hidr) (c)	aa livres(%) (a-b-c)	% de aa livres (c/a)*100
Lys	0,3746	0,0174	0,0063	0,3509	1,7
His	0,0834	0,0500	0,0045	0,0289	5,4
Arg	0,4144	0,0848	0,0011	0,3285	0,3
Ac. Asp.	0,5021	0,0265	0	0,4756	0
Thre	0,2455	0,1301	0	0,1154	0
Ser	0,3383	0,0245	0	0,3138	0
Ac. Glut.	0,7528	0,0245	0	0,7283	0
Pro	0,9998	ND	0	0,0000	0
Gly	1,9825	0,0540	0,0058	1,9227	0,3
Ala	0,9494	0,0392	0,0037	0,9065	0,4
Cis	ND	ND	0	0	0
Val	1,1528	0,0128	0	1,1400	0
Met	0,3674	ND	0	0,0000	0
Ile	0,2705	0,0088	0,0016	0,2601	0,6
Leu	0,4012	0,0154	0,0020	0,3838	0,5
Tyr	0,0382	0,0187	0,0025	0,0170	6,5
Phe	0,1904	0,0167	0,0026	0,1711	1,4

**2- Calculando a % de proteína livre total**

calculo de Co (a-c)	%de prot. livre total (c/Co)*100
0,3683	1,7
0,0789	5,7
0,4133	0,3
0,5021	0
0,2455	0
0,3383	0
0,7528	0
0,9998	0
1,9767	0,3
0,9457	0,4
0,0000	0
1,1528	0
0,0000	0
0,2689	0,6
0,3992	0,5
0,0357	7,0
0,1878	1,4

Nas Tabelas 31 e 32 estão apresentadas as porcentagens calculadas para cada aminoácido livre (provenientes da gelatina) no período de zero a 36 horas calculados a partir das Tabelas 25 a 30.

**TABELA 31.** Porcentagem de aminoácidos livres nos diferentes períodos de incubação.

Aminoácidos	aminoácidos livres (%)					
	T0	T6	T12	T18	T24	T36
Lys	20	30	32	4	4	2
His	18	20	23	6	32	5
Arg	13	16	15	6	9	0
Ac. Asp.	16	9	16	4	0	0
Thre	49	45	17	2	3	0
Ser	49	49	12	2	39	0
Ac. Glut.	19	16	20	3	3	0
Pro	7	6	0	0	0	0
Gly	5	5	0	2	4	0
Ala	25	26	23	309	22	0
Cis	0	0	0	0	0	0
Val	13	13	10	10	3	0
Met	8	9	7	0	0	0
Ile	47	50	37	22	3	1
Leu	56	56	37	27	6	1
Tyr	60	68	49	6	15	7
Phe	49	44	35	30	9	1

**TABELA 32-** Porcentagem de proteína livre nos diferentes períodos de incubação

Amino ácidos	Proteína livre (%)					
	T0	T6	T12	T18	T24	T36
Lys	25	43	48	5	4	1,7
His	22	24	30	7	48	5,7
Arg	15	19	17	6	10	0,3
Ac. Asp.	18	10	20	5	0	0
Thre	94	82	21	2	4	0
Ser	95	97	13	2	63	0
Ac. Glut.	23	19	25	3	3	0
Pro	8	6	0	0	0	0
Gly	6	6	0	2	4	0,3
Ala	33	36	30	0	28	0,4
Cis	0	0	0	0	0	0
Val	15	15	12	12	3	0
Met	9	10	8	0	0	0
Ile	87	99	59	29	3	0,6
Leu	127	125	58	38	7	0,5
Tyr	153	216	95	6	18	7
Phe	98	79	54	44	9	1,4

Como se pode observar a porcentagem de proteína e aminoácidos livres após 36 horas é praticamente zero. Esses resultados concordam com o teste de Lowry para proteínas. Aminoácidos livres presentes representam apenas 10% do original.

Na primeira fase deste ensaio foi realizado um estudo do sistema completo sem discriminação dos componentes entre a parte sólida, bactérias e parte solúvel. Não havia informação se era possível o crescimento das bactérias devido a presença de gelatina entre 24 e 36 horas quando a proteína total verificada pelo método de Lowry sofre um decréscimo. A concentração de aminoácidos livres (sem hidrólise) equivale aos aminoácidos provenientes da gelatina mais aqueles provenientes do próprio lodo. Nas Tabelas 25 a 30 estão calculados os aminoácidos presentes no meio sem ter sofrido hidrólise e subtraídos daqueles provenientes do lodo, o que implica que são provenientes da gelatina.

#### 6. 2. 4. Determinação de proteína (micro-Kjeldhal).

A determinação de proteínas pelo método Micro-Kjeldhal foi realizada com finalidade de se confirmar os dados obtidos nas determinações feitas com o método de Lowry. Este método foi escolhido pois emprega pequenas quantidades de amostra. Uma vez determinada as porcentagens de proteína, os dados de porcentagem foram plotados contra a porcentagem de aminoácidos presentes em cada tempo de amostragem (Figuras 24 e 25). As tabelas com os cálculos de concentração da proteína pelo micro-Kjeldhal estão mostradas no Anexo I.

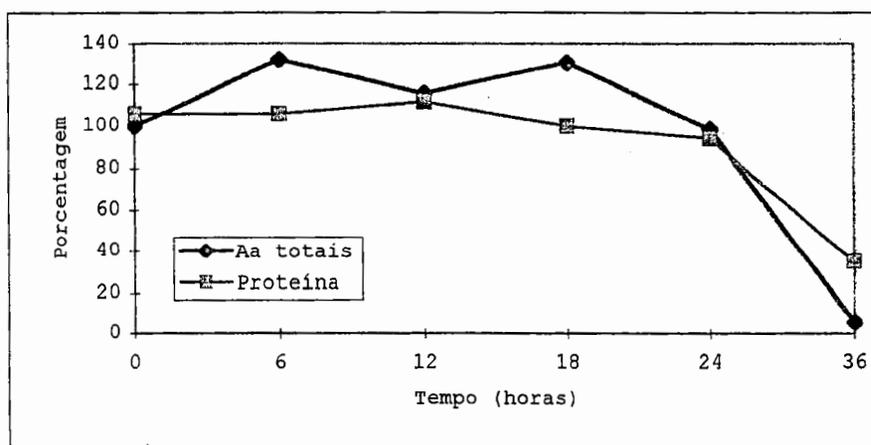


FIGURA 24- Aminoácidos totais (%) em relação à T0 e proteína (Lowry)

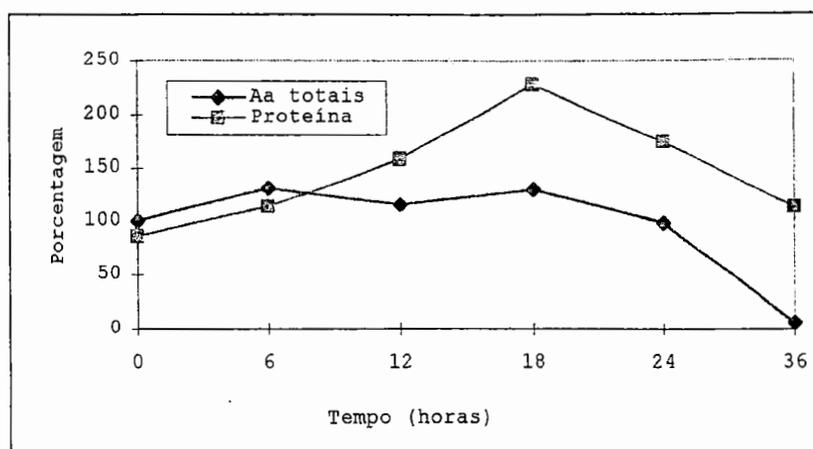


FIGURA 25 - Aminoácidos totais (%) em relação à T0 e proteína (Micro-Kjeldhal = N x 6,25)

A análise do nitrogênio pelo micro-Kjeldhal mostrou um pico após 18 horas (2,5 vezes) que retornou ao valor próximo do original a 36 horas. Se o nitrogênio a 36 horas não é proteína solúvel ou proteína bacteriana, provavelmente é  $\text{NH}_3$  proveniente da hidrólise dos aminoácidos. Isso vem confirmar os resultados para análise de ácidos em que acetato é produzido com liberação de amônia.

Não foi possível identificar o teor de amônia através do analisador de aminoácidos, pois a amônia é liberada de forma acumulativa e os valores foram elevados demais para serem identificados. Além disso, amostras de outras proteínas que não as desse experimento foram analisadas ao mesmo tempo no aparelho.

### 6.3-RESULTADOS DO ENSAIO 3

#### 6.3.1. Resultados da degradação da proteína

Neste ensaio foram usadas quatro diferentes concentrações de proteína com cinco réplicas para cada concentração. As concentrações foram 2,5; 5,0; 10 e 15 g/L de gelatina. Neste caso o lodo granulado inoculado foi obtido do frasco “mãe” original que foi mantido em geladeira e alternando com incubações periódicas a 37° C quando foi alimentado com meio mineral e vitaminas, e não a partir do frasco 3 dos experimentos anteriores com gelatina. Os resultados dessas análises estão mostrados nas Figuras 26, 27, 28 e 29 e no Anexo J, bem como as curvas padrão. Para 10 e 15 g/L de gelatina foi utilizada a mesma curva. Os cálculos de velocidade de degradação das proteínas também estão incluídas neste anexo.

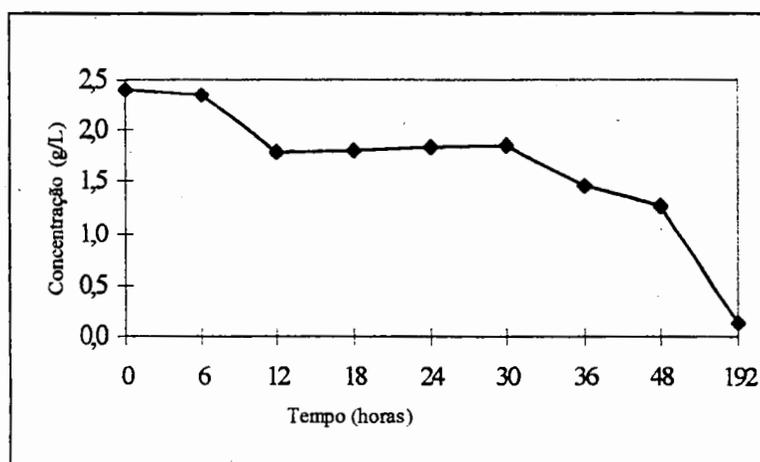


FIGURA 26- Degradação de gelatina (concentração: 2,5 g/L).

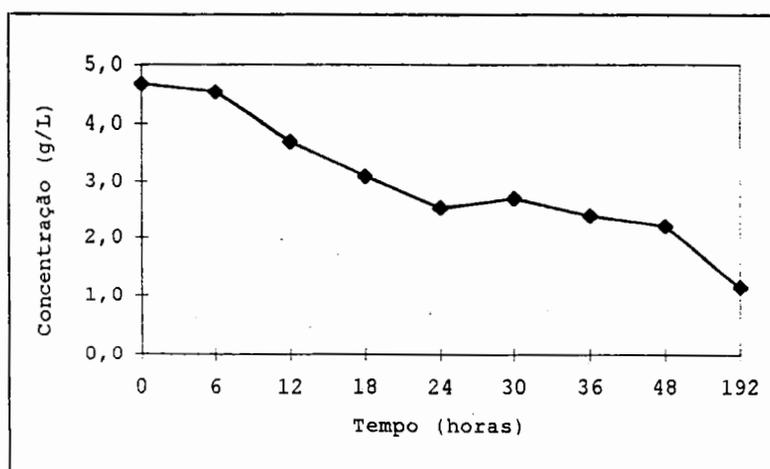


FIGURA 27- Degradação de gelatina (concentração: 5 g/L)

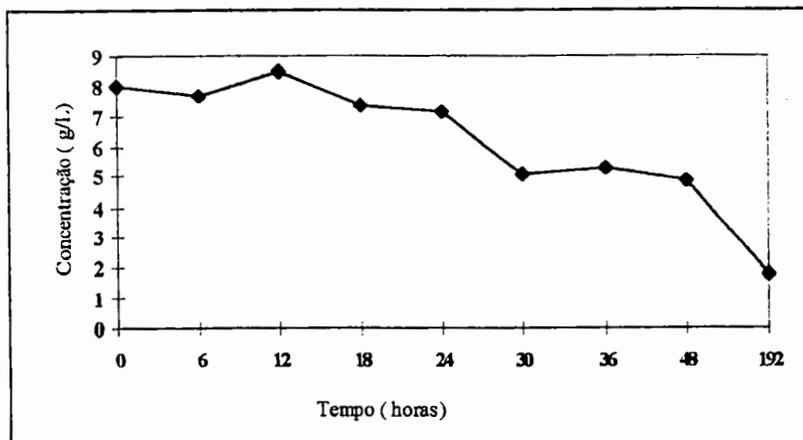


FIGURA 28- Degradação de gelatina (concentração:10g/L)

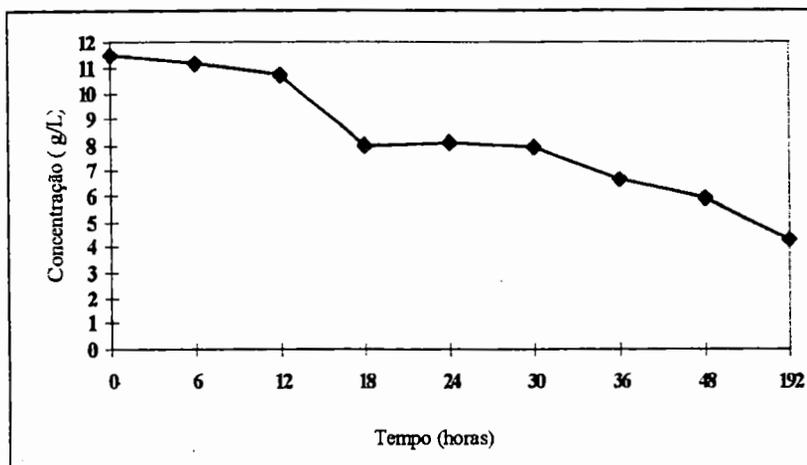


FIGURA 29- Degradação de gelatina (concentração:15 g/L)

Considerando os valores iniciais (tempo zero determinados nas análises) iguais a 100%, os resultados mostram que após 192 horas, 95% da proteína foi degradada nos frascos onde 2,5 g/L de proteína foi adicionada. Para as concentrações de 5 e 10 g/L, no final do experimento, 25 e 22% da gelatina permaneciam ainda no meio e para a maior concentração houve no período uma remoção de 62%.

De acordo com os valores de taxas de hidrólise obtidos para a degradação da proteína os frascos com 10 g/L de gelatina foram os que apresentaram menor velocidade de degradação, enquanto para as outras três concentrações (2,5; 5,0 e 15 g/L), as taxas foram similares. A Tabela 33 mostra as taxas obtidas nestes experimentos.

TABELA 33. Valores obtidos para as velocidades de degradação da gelatina em quatro diferentes concentrações.

Concentração de gelatina (g/L)	Valores de r	r <sup>2</sup>	1/2t
2,5	-0,01528t + 0,9248	0,99	45,36
5,0	-0,01702t + 1,54534	0,98	40,72
10,0	-0,00769t + 2,04893	0,98	90,13
15,0	-0,01508t + 2,4857	0,98	45,96

Esses resultados mostram que as concentrações não interferem na taxa de hidrólise. SCHULZE et al.(1988) usando 5 e 15 g/L de gelatina em meio mineral basal num biodigestor do tipo UASB observou que 91 e 90% da gelatina foi degradada respectivamente para as duas concentrações após um período de 32 e 28 dias, o que significa que naquelas condições com a maior concentração de proteína a velocidade de degradação foi maior. Contudo esse fato não justifica a velocidade de degradação observada para a concentração de 10 g/l utilizada neste trabalho

### 6.3.2. Resultados da análise de ácidos graxos voláteis.

Ácidos graxos foram determinados nas quatro diferentes concentrações de gelatina em quatro períodos de tempo (18, 30, 48 e 192 horas). Os primeiros picos no cromatograma só foram detectados após 18 horas e assim as amostras foram analisadas a partir desse período (Tabela 34). Para as amostras com 5 g/l de gelatina apenas o ácido acético foi detectado. Pode ter ocorrido algum problema com essas amostras durante o período que ficaram estocadas em congelador ou no momento de diluição das mesmas

Os ácidos graxos detectados no período do experimento foram: acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico. As quantidades detectadas de cada ácido estão mostradas na Tabela 34. As curvas padrão utilizadas para os cálculos das concentrações de cada ácido estão mostradas no Anexo J.

**TABELA 34.** Concentração de ácidos graxos detectados para as diferentes concentrações de gelatina.

Tempo (horas)	Gelatina (2,5 g/L)	Ácidos graxos (mg/L)					
		Acético	Propiônico	Butírico	Isobutírico	Valérico	Isovalérico
0	2,4						
6	2,36						
12	1,8						
18	1,81	8,45					
24	1,84						
30	1,86	36,07					
36	1,43						
48	1,27	54,75	5,2		5,9		
192	0,13	1278,56	340,34	156,07	67,59	160,19	31,29

Tempo Horas	Gelatina (5g/L)	Ácidos graxos (mg/L)					
		Acético	Propiônico	Butírico	Isobutírico	Valérico	Isovalérico
0	4,68						
6	4,53						
12	3,68						
18	3,09	6,31					
24	2,54						
30	2,71	10,46					
36	2,41						
48	2,21	55,51					
192	1,17						

Tempo Horas	Gelatina (10g/l)	Ácidos graxos (mg/L)					
		Acético	Propiônico	Butírico	Isobutírico	Valérico	Isovalérico
0	8,03						
6	7,71						
12	8,54						
18	7,85	20,2	6,43				
24	7,17						
30	5,05	313,61		22,07	20,96	7,07	15,27
36	5,29						
48	4,86	728,26	12,7	37,45	37,4		42,98
192	1,83	2133,5	423,8	256,15	65,05	165,15	30,85

Tempo (horas)	Gelatina (15g/L)	Ácidos graxos (mg/L)					
		Acético	Propiônico	Butírico	Isobutírico	Valérico	Isovalérico
0	11,5						
6	11,2						
12	10,7						
18	8	29,49					
24	8,1						
30	7,9	174,32					34,26
36	6,7			9,85	15,4		
48	5,9	1158,45	15,96	17,8	59,97		35,69
192	4,27	2733,81	432,31	413,07	119,65	20,4	94,18

Como se pode observar pela Tabela 34 e Figuras 30 a 33, o ácido acético foi produzido em maior quantidade no período do experimento e começou a aparecer no meio após 18 horas de incubação quando 30% em média da gelatina havia sido hidrolisada, com exceção dos frascos com 10 g/L onde a taxa de degradação foi mais lenta e ácido propiônico também é detectado nesse tempo. Para os frascos com 10 g/L de gelatina outros ácidos como butírico, isobutírico e isovalérico foram detectados antes que para as outras concentrações da proteína.

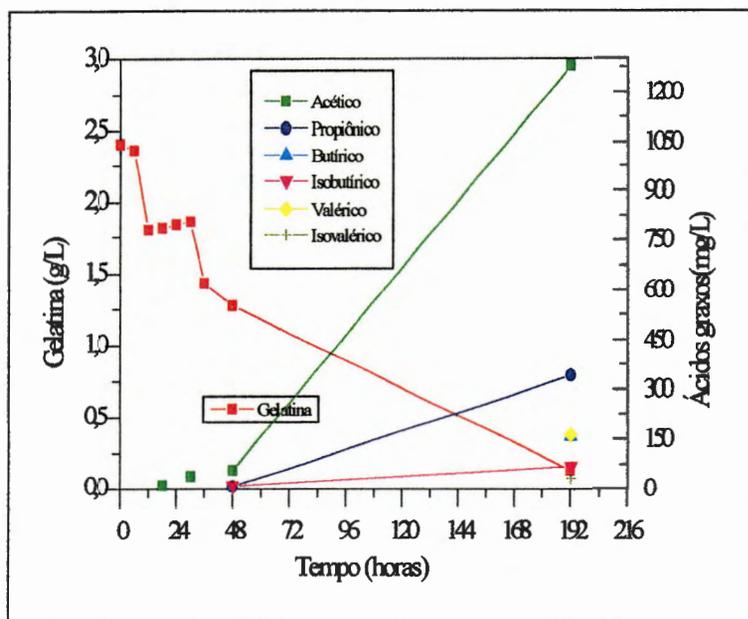


FIGURA 30. Ácidos graxos detectados nos frascos contendo 2,5 g/L de gelatina

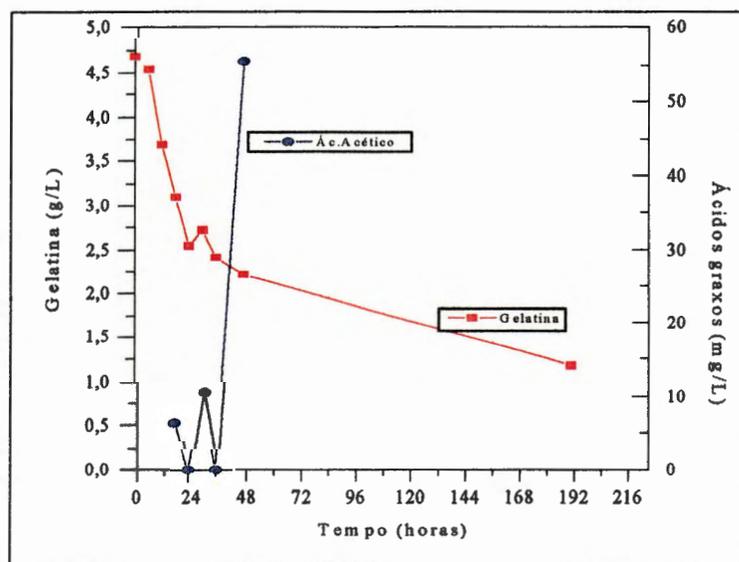


FIGURA 31. Ácido acético detectado nos experimentos com 5 g/L de gelatina

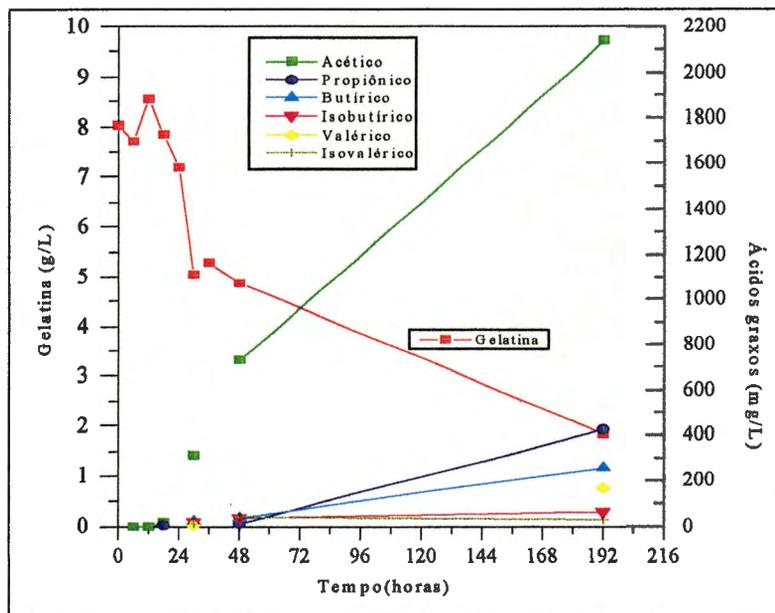


FIGURA 32. Ácidos graxos detectados nos experimentos com 10g/L de gelatina

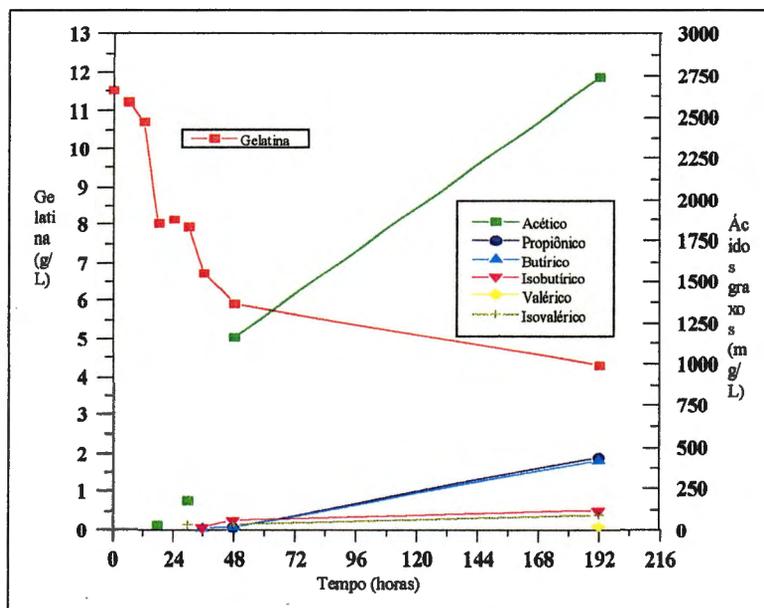


FIGURA 33. Ácidos graxos detectados nos experimentos com 15 g/L de gelatina

Os ácidos analisados foram observados por BREURE e van ANDEL (1984), BREURE et al.(1985), JAIN & ZEIKUS (1989) como os principais produtos na degradação da gelatina e o ácido acético foi detectado em maiores quantidades seguido de menores quantidades dos demais ácidos citados acima. SCHULZE et al.(1988), encontrou que ácido

propiónico apareceu em maior quantidade na partida de um reator contendo sais minerais e 5g/L de gelatina após 91% da proteína ter sido degradada.

Nestes experimentos a gelatina foi rapidamente degradada sob as condições impostas. Contudo, deve-se considerar que a gelatina foi o único substrato adicionado. Águas residuárias apresentam vários outros compostos que podem interferir com a degradação da proteína, como por exemplo, carboidratos que estão frequentemente presentes de forma simultânea nessas águas. Pesquisas realizadas por BREURE et al.(1986) mostraram que a degradação de gelatina foi progressivamente retardada com o aumento na concentração de carboidratos quando usado como um segundo substrato para populações mistas de bactérias adaptadas à gelatina. Os autores também investigaram a possível influência dos ácidos graxos acumulados provenientes da degradação de carboidratos adicionando ácidos graxos às culturas com gelatina e verificaram que não tiveram nenhuma influência na degradação da proteína. O que ocorre é que esses compostos são rapidamente degradados pelas bactérias. Além disso, dados de literatura (GLENN, PANSARE et al.; WIERSMA & HARDER, WHOOLEY et al. apud BREURE et al. (1986) mostram que glicose e outros substratos facilmente degradáveis reprimem a síntese de exoproteases em culturas puras de bactérias.

A oxidação de aminoácidos libera amônia para o meio. Como grandes quantidades de ácidos foram produzidas, evidentemente grande quantidade de amônia poderá ser liberada para o meio podendo causar toxidez às bactérias metanogênicas e inibindo o processo total. A liberação de amônia no meio aumenta o pH. BREURE & van ANDEL (1984) verificaram que a produção de um ou outro tipo de ácido graxo depende do pH. Por exemplo, verificaram que a máxima degradação da gelatina ocorreu a pH 7. Com valores de pH abaixo de 6 a quantidade de acetato diminuiu relativamente ao aumento na produção de propionato. SCHULZE et al. (1988) usando 15 g/L de gelatina não observou nenhum aumento na produtividade de gás após quatro semanas o que só ocorreu após diminuir o pH de 7,8 a 7,6 e 7,4. Ainda, mostraram com seus estudos que usando ácido acético como única fonte de carbono ocorreu uma depreciação do processo metanogênico quando 2g/L de amônia estavam presentes: o consumo de ácido acético e o crescimento bacteriano foram altamente retardados.

### 6. 3. 3. Resultados das determinações de amônia

O nitrogênio presente em águas residuárias de esgoto municipal e doméstico é proveniente primariamente do metabolismo de proteínas e da uréia do corpo humano. No esgoto bruto cerca de 60% do nitrogênio está na forma orgânica e 40% na forma iônica.

A oxidação anaeróbia do amônio foi demonstrada por VAN DE GRAAF et al (1995). Ela depende de nitrato e não requer traços de  $O_2$ . O processo é exergônico, e em teoria pode fornecer energia para o crescimento:



Os valores obtidos para as concentrações de amônia nestes experimentos estão mostrados na Figura 34 e Tabela 35

Com 2,5 g/L de gelatina as concentrações de amônia permaneceram constantes durante o período de zero a 36 horas. Na falta de dados como ocorreu para 48 e 192 horas não se pode afirmar que as concentrações neste caso permaneceram constantes até o final desse experimento. As quantidades de amônia detectadas foram maiores para o frasco contendo 5g/L de gelatina. A maior quantidade de amônia nesta concentração de gelatina foi observada após 12 horas de inoculação, declina em 24 h e novamente se eleva em 36 horas. Após 36 horas apresenta novamente um declíneo para concentrações mais baixas que as observadas inicialmente. Para 10g/l de gelatina a concentração de amônia permaneceu praticamente a mesma até 24 horas e mostrou um declíneo após 36 horas como se sucedeu para todos os frascos.

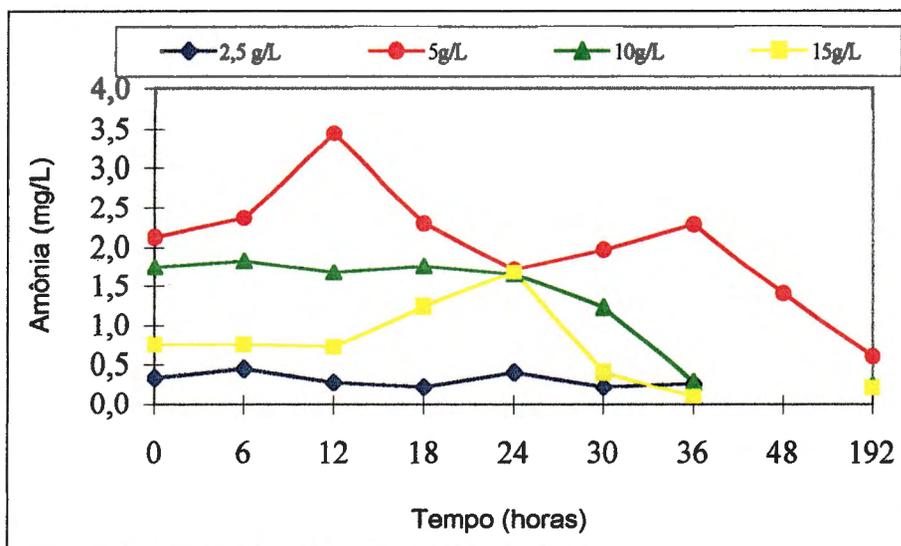


FIGURA 34 -Teor de amônia nos frascos contendo diferentes concentrações de gelatina. As concentrações de gelatina estão mostradas na legenda (2,5; 5; 10 e 15 g/L).

TABELA 35- Concentrações de amônia nas amostras com diferentes concentrações de gelatina

Gelatina	2,5g/L	5g/L	10g/L	15g/L
Tempo (Horas)	Amônia (g/L)			
0	0,34	2,1	1,75	0,75
6	0,45	2,4	1,83	0,75
12	0,29	3,4	1,68	0,72
18	0,23	2,3	1,76	1,24
24	0,41	1,7	1,65	1,68
30	0,23	2,0	1,23	0,4
36	0,27	2,3	0,29	0,11
48		1,4		
192		0,6	0,25	0,22

Os aumentos observados nos níveis de amônia provavelmente são devido a liberação desse composto provenientes da degradação de aminoácidos. Para esse período de experimento, porém, se amônia foi liberada no meio, também foi consumida.

A literatura mostra que a concentração de amônia total foi mais alta em digestores que receberam maiores concentrações de proteína: SCHULZE et al.(1988) observaram a produção de 1 g/L de amônia quando utilizou 5 g/L de gelatina e 2,7g/L de amônia em média com 15 g/L de gelatina após 28 dias. BREURE et al. (1985) observaram a produção de 1400 mg/L de amônia em meio contendo 7,5 g/L de gelatina três semanas após o início do experimento. Deve-se observar que esses valores referem-se a amônia presente após longos períodos de tempo e não se pode comparar com os períodos analisados neste experimento. Contudo, é interessante observar que com 5 g/L de gelatina foram detectados os mais altos valores de concentração de amônia. Coincidentemente KESTERS et al. (1994) verificaram que uma porcentagem máxima de amonificação ocorreu com concentrações de gelatina maiores que 3 e inferiores a 10g/l e diminuiu consideravelmente com concentrações inferiores a 3 g/L. SCHULZE (1988) et al. mostraram que concentrações de 2,7 g/L de amônia mudaram as características do lodo granulado, mas concentrações maiores que essa não causaram nenhuma mudança na eficiência do processo.

BHATTACHARYA & PARKIN (1989), realizaram um estudo sobre o efeito da amônia nos processos de fermentação. Observaram que é possível adaptação das bactérias a altos teores de nitrogênio amoniacal total quando doses crescentes e contínuas são fornecidas ao meio. No entanto quando doses descontínuas são fornecidas, as chances de adaptação são mínimas. Nesse contexto PARKIN & MILLER (1982) apud BHATTACHARYA & PARKIN (1989) verificaram que é possível adaptação das bactérias com 8.000 a 9.000 mg/L de nitrogênio amoniacal total sem nenhum decréscimo na produção metanogênica. KROEKER et al apud BHATTACHARYA & PARKIN (1989) mostraram que é possível adaptação acima de 6.000 mg/L mas um tempo considerável é necessário. Os dados da literatura com relação a toxidez por amônia são muito conflitantes e devem ser considerados caso a caso.

#### **6.3.4. Resultados das análises de fosfato.**

A remoção do fósforo de águas residuárias e industriais é um fator chave para impedir a eutrofização de águas superficiais. Em ambientes anaeróbios onde nenhum aceptor de elétron está presente, bactérias removem o fósforo absorvendo ácidos graxos, principalmente acetato dentro da célula e estocando-os como polihidroxi-alcenoatos, por exemplo, poliidroxibutiratos.

Fosfatos são muito usados na preparação de meios de cultivo porque são os únicos agente inorgânicos que mantêm o pH numa faixa fisiologicamente importante e são relativamente não tóxicos aos microrganismos. Em adição fornecem fonte de fósforo que é um elemento essencial para o crescimento.

Quando uma grande quantidade de ácidos é produzida por uma cultura, as quantidades de fosfato que podem ser usadas, podem se tornar insuficientes para a manutenção de um pH adequado. Então álcalis tem que ser adicionados ao meio para neutralização dos ácidos.

De acordo com os resultados das determinações das concentrações de fosfato nos meios observa-se que as quantidades de fosfato foram maiores apenas para o frasco com menor concentração de gelatina (2,5 g/L). Para as outras três concentrações de gelatina (5, 10 e 15 g/L), as quantidades de fosfato permaneceram praticamente constantes durante o período

analisado em torno de 1,6 mg/L. Para o frasco com 5 g/l de gelatina observa-se um pequeno aumento após 36 horas com um máximo a 48 h e depois a concentração de fosfato declina novamente. Para os frascos com 10 e 15 g/L as concentrações permanecem constantes e nas mesmas quantidades até um leve aumento em 48 horas (Figura 35). De uma maneira geral, as concentrações de fosfato foram menores para os frascos onde a produção de ácidos graxos foi maior.

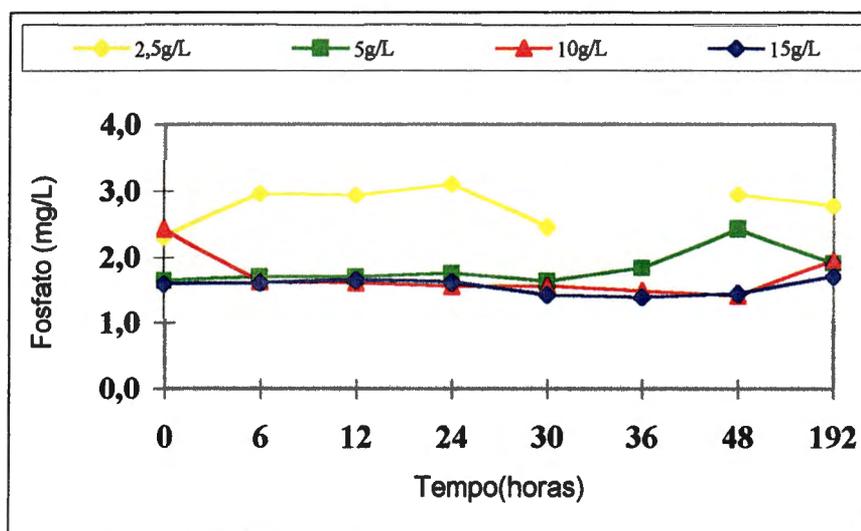


FIGURA 35. Presença de fosfato nas amostras com diferentes concentrações de proteína Os números na parte superior indicam as concentrações de gelatina.

Para as condições do trabalho nenhuma consequência maior foi observada com relação ao fosfato mesmo com as altas concentrações de ácidos obtidas.

#### 6.4- Microscopia do lodo anaeróbio

Amostras do lodo anaeróbio granulado que foi usado como inóculo para os experimentos foram fotografadas em microscópio comum e microscópio eletrônico.

Para fotografias no microscópio de luz comum, alicotas de lodo foram colocadas sobre uma lâmina com auxílio de uma seringa e cobertas com lamínulas. As fotografias revelaram a presença de bacilos de vários tamanhos e formas e também células de formas indefinidas (ver Figura 36, fotos 1 e 2).

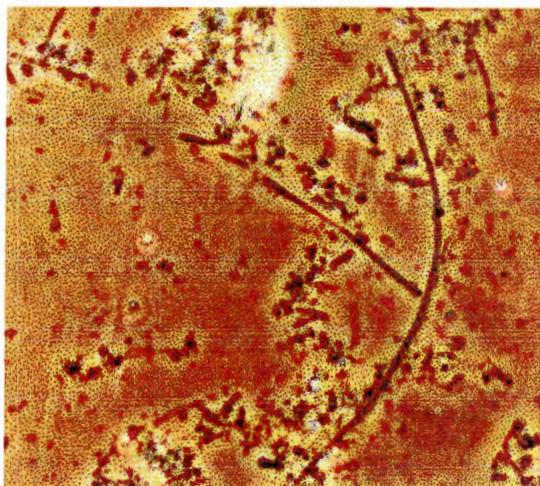


Foto 1

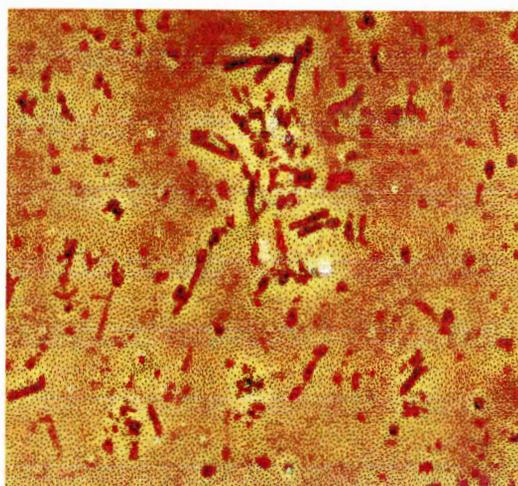


Foto 2

FIGURA 36- Fotografia de amostras do lodo contendo gelatina em meio de cultura. Na foto 1 diferentes formatos de bacilos, destacando-se filamentos semelhantes à morfologia de *Methanosaeta* sp (*Methanothrix* sp) (microscopia de campo claro- ocular 10;objetiva 100; zoom 1,25). Na foto 2 diferentes formatos de bacilos destacando-se ao centro bacilos mais espessos (microscopia de campo claro-ocular 10;objetiva 100; zoom 1,25)

A Figura 37, foto 1 mostra três colônias de bactérias num “roll-tube”, quando foi realizado um experimento com o intuito de se estudar a morfologia das bactérias a partir do meio de cultura. As fotos 2 e 3 mostram detalhes de dois tipos de bactérias presentes nas colônias vistas ao microscópio comum a partir de um “roll-tube.

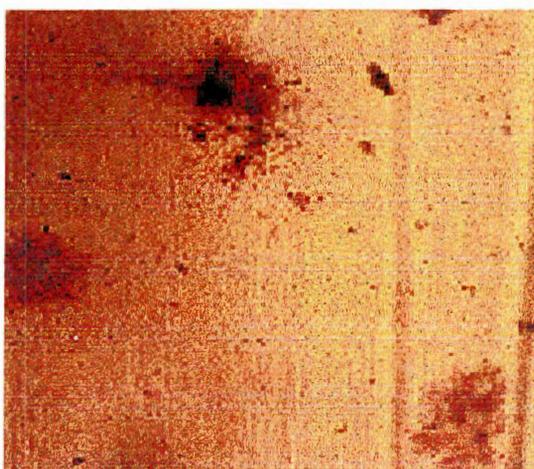
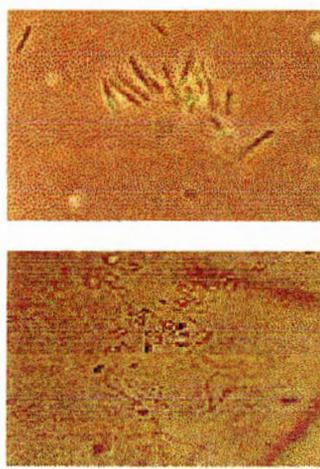


Foto 1



Fotos 2 e 3

FIGURA 37 - Foto 1: Colônias de bactérias proteolíticas, com morfologia ramificada (microscopia de campo claro - ocular 10; objetiva 4; zoom 1,25). Fotos 2 e 3 :Morfologias celulares- bacilos e cocobacilos - originados a partir das colônias crescidas nos “roll-tubes” (microscopia de campo claro - ocular 10;objetiva 100; zoom 1,25).

As amostras fotografadas ao microscópio eletrônico confirmaram as observações da microscopia comum em relação aos diferentes tipos de bactérias presentes no lodo. Na Figura 38 estão mostrados as diversas morfologias e tamanhos de bactérias tais como, bacilos de vários comprimentos e cocos. Na Figura 38 (foto 4) e Figura 39 (fotos 1 e 2) pode-se observar bacilos que apresentam uma protuberância numa das extremidades, provavelmente clostrídios formadores de esporos. Clostrídios são citados na literatura por MEAD (1971), Mc INERNEY (1988) NAGAI & NISHIO (1989) e outros como os principais organismos degradadores de proteínas e aminoácidos em digestores de lodo de esgoto como se pode observar na Tabela 5 (página 34) e de acordo com o VIP Manual (Virginia Polytechnic Institute), os Clostrídios são anaeróbios formadores de esporos.

Na Figura 39, foto 3 observa-se detalhe de um bastonete duplo. Na Figura 39, foto 4 observa-se detalhe de bactérias metanogênicas do gênero *Methanothrix sp* (*Methanosaeta sp*).

De acordo com SMITH & AHRING (1996), bactérias do gênero *Methanosaeta sp* e *Methanosarcina sp*, tem sido identificadas como importantes bactérias metanogênicas acetoclásticas para a granulação inicial e o desenvolvimento do lodo granular. *Methanosarcina sp*, normalmente crescem em agregados com 1 a 3 mm de diâmetro. Essas bactérias utilizam vários substratos metanogênicos, incluindo acetato, metanol, metilaminas e  $H_2/CO_2$ . *Methanosaeta sp* são organismos filamentosos que são conhecidos por utilizar apenas acetato e apresentam um crescimento 5 a 10 vezes menor que *Methanosarcina*. Um dos principais produtos da fermentação de aminoácidos provenientes da degradação de proteínas é o acetato. Assim justifica-se a presença desses organismos nesse tipo de lodo. Em grânulos metanogênicos *Methanosaeta sp* tem sido observado com dois tipos morfológicos: uma bactéria em forma de bastão em fragmentos de quatro a cinco células (como se observa na Figura 39 -foto 4) e um tipo filamentoso consistindo de um longo bastonete multicelular (Figura 36, foto 1). Esta última forma é observada sob condições limitadas de substrato. Essas bactérias perfazem 20% daquelas presentes em lodo granular metanogênico. Contudo, muitos microrganismos formam longos filamentos que lembram *Methanosaeta sp* e a identificação desses organismos não pode ser baseada apenas em observações microscópicas.



Foto 1 - Aumento 18.000 vezes

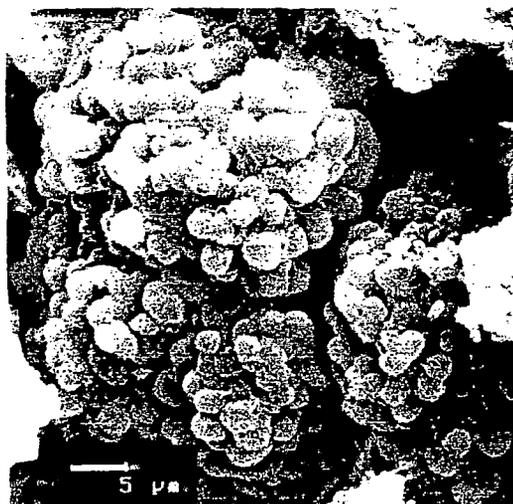


Foto 2 - Aumento 2.000 vezes

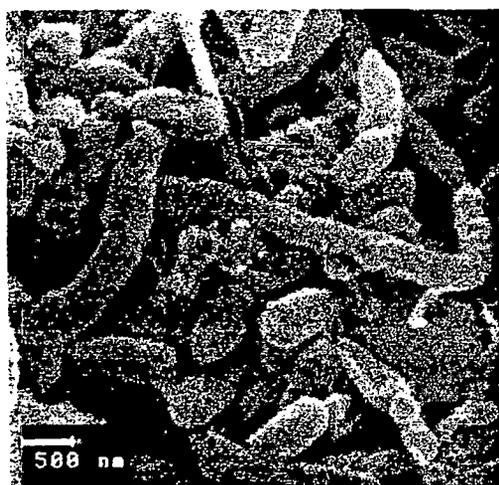


Foto 3 - Aumento 20.000 vezes

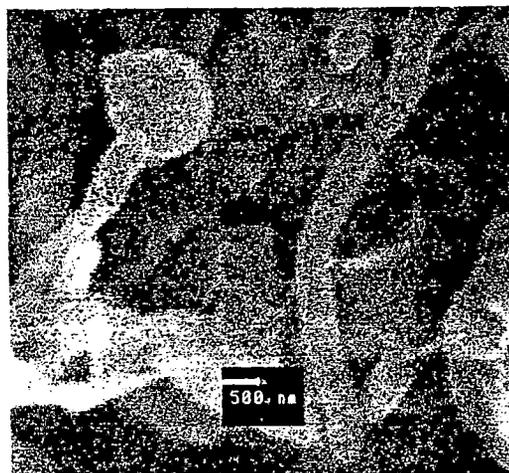


Foto 4 - Aumento 20.000 vezes

FIGURA 38 - Fotografias em microscópio eletrônico de varredura de meio de cultura contendo gelatina. As fotos mostram diferentes tipos morfológicos presentes no lodo. Os cocos observados na foto 2 mostram bactérias com morfologias semelhantes a sarcinas.

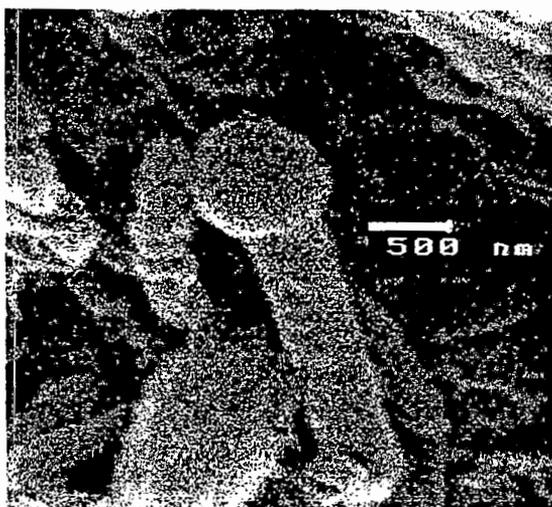


Foto 1 - Aumento 20.000 vezes

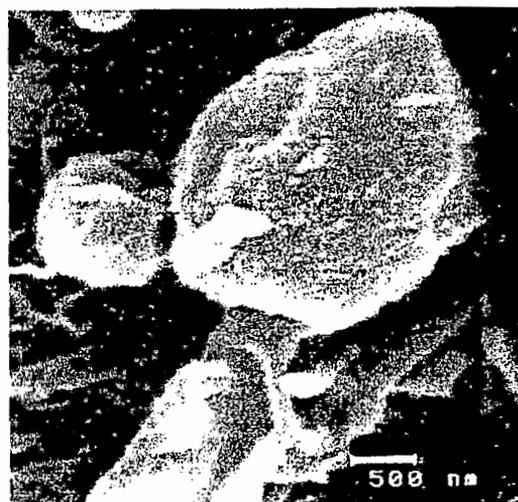


Foto 2 - Aumento 20.000 vezes

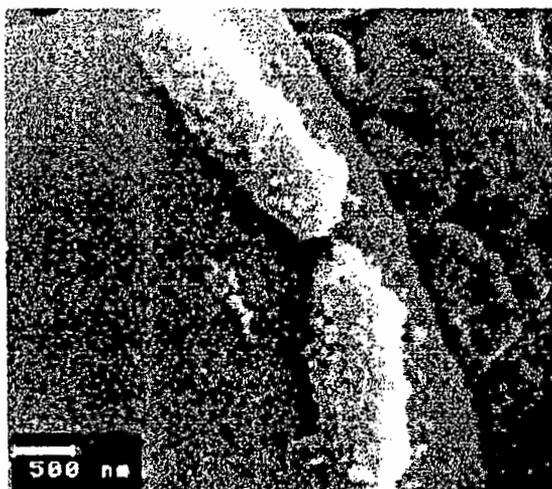


Foto 3 - Aumento 20.000 vezes



Foto 4 - Aumento de 20.000 vezes

FIGURA 39 - Fotografias em microscópio eletrônico de varredura mostrando detalhes de bactérias presentes no meio de cultura com gelatina: Na foto 1 e 2 detalhe de bactérias que apresentam protuberâncias numa das extremidades (esporos). Foto 3 detalhe de um bacilo duplo com superfície rugosa. Foto 4 grupo de bactérias do gênero *Methanosaeta* sp (*Methanothrix* sp)

## 7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

1. Os estudos com degradação anaeróbia da gelatina mostraram que ela se processa de acordo com uma cinética de 1ª ordem nos períodos após adaptação das bactérias ao substrato.

2. A gelatina foi lentamente degradada no início dos experimentos (início do processo de biodigestão) e mais rapidamente degradada nas condições estudadas após um período de adaptação dos microrganismos.

3. A produção de metano mesmo nos meios em que as bactérias estavam adaptadas às concentrações de gelatina só se inicia após o período em que os primeiros aminoácidos são degradados. Esse período é longo principalmente para meios em que não ocorreu adaptação, como ocorreu nos períodos da 1ª incubação. Também deve-se considerar que o tempo de geração de bactérias metanogênicas é bem menor que o das acidogênicas.

4. A produção de metano ocorre até um certo limite e depois declina. Não continua até que todo substrato seja consumido. A produção de metano foi maior nos frascos contendo gelatina e em que os microrganismos foram adaptados, quando comparada com a fase que correspondeu ao início dos experimentos.

5. A degradação de gelatina resultou numa grande quantidade de ácidos graxos voláteis, principalmente Ácido acético, seguido de Propiônico, Butírico, Isobutírico, Valérico e Isovalérico. A degradação de 2,5 g/L de gelatina resultou em 1.278 mg/L de ácido acético, 340 mg/L de ácido propiônico, 156 mg/L de ácido butírico, 160 mg/L de ácido valérico e 31,29 mg/L de isovalérico. Com as concentrações de 10 e 15 g/L de gelatina a concentração de ácido acético dobrou. Os demais ácidos apresentaram-se em quantidades similares para as quatro concentrações estudadas. Para a concentração de 5 g/L essas determinações não foram

possíveis. A fermentação dos aminoácidos não foi observada na sua totalidade. O experimento teve duração de 8 dias e esse tempo não foi suficiente para que todos os ácidos produzidos fossem metabolizados.

6. A degradação de aminoácidos foi rápida uma vez que as culturas eram provenientes de vários subcultivos em meio com gelatina e foi confirmada pelo aparecimento dos ácidos graxos após 18 horas de incubação.

7. Alguns aminoácidos liberados no meio “desapareceram” num período curto de tempo indicando que foram transformados ou absorvidos pelas bactérias, enquanto as quantidades de outros variaram conforme foram liberados e/ou utilizados

8. Diferentes concentrações de gelatina ( 2.5, 5.0, e 15.0 g/L) foram degradadas a mesma velocidade ( $1/2t = 42,5 \text{ g/L.h}^{-1}$ ) mostrando, que nas condições do experimento a degradação não foi dependente da concentração inicial. Para 10 g/L a velocidade de degradação foi 2 vezes menor ( $1/2t = 90 \text{ g/L.h}^{-1}$ ).

9. A amônia e o fosfato analisados não apresentaram alterações durante o período de experimento estudado. Se amônia foi liberada para o meio, ela provavelmente foi também consumida. Para a concentração de 5g/L de gelatina foram obtidas as maiores concentrações de amônia. O teste do micro-Kjeldhal mostrou um aumento no teor de nitrogênio total nas amostras no período de 18 horas seguido de um decréscimo. Esse nitrogênio liberado pode ser amônia, pois esse período coincidiu com a formação de ácidos graxos.

10. Com os resultados obtidos a partir do 3º ensaio com gelatina, os resultados do 2º e 3º ensaio pode-se simular um esquema de degradação da gelatina em culturas adaptadas à essa proteína em que:

a) Tem-se um sistema constituído de meio mineral basal adicionado de gelatina e inoculado com um lodo granulado anaeróbio.

b) A degradação da proteína após 192 horas é quase completa. A produção de metano inicialmente é bastante reduzida mas aumenta rapidamente após o período considerado.

c) Muitos aminoácidos foram liberados para o meio em 6 horas mas alguns foram rapidamente utilizados e desapareceram do meio no 18 horas após a incubação. Esse período foi justamente aquele em que foram detectados os primeiros picos de ácidos graxos (ácido acético).

d) Considerando-se os resultados da degradação de aminoácidos, pode-se dizer que as primeiras concentrações de ácidos graxos detectadas são proveniente da fermentação de aminoácidos tais como prolina, serina, leucina, metionina, que são os primeiros a desaparecerem do meio em 18 horas. O ácido acético é resultante da fermentação de prolina, leucina e treonina. Isovalerato pode vir dos aminoácidos leucina e prolina. O propionato pode ter-se originado da treonina.

11. A gelatina foi degradada por uma população constituída por diferentes tipos de bactérias incluindo bacilos formadores de esporos (provavelmente, clostrídios), e a presença de bactérias metanogênicas, tais como *Methanosaeta* sp (*Methanothrix* sp), foi confirmada como se pode observar nas fotografias tomadas ao microscópio.

12. Com todas as limitações que o trabalho apresenta, ele fornece parâmetros que devem ser considerados para o tratamento de águas residuárias que apresentem teores elevados de proteína. É fato que a degradação de proteínas em meios onde não há um período de adaptação para as bactérias é muito lenta, como ocorreu para o início dos experimentos e ainda deve-se considerar a possível inibição de exoproteases como foi citado por BREURE et al. (1984).

13. A amônia proveniente da degradação de proteínas parece não ser um problema, uma vez que a literatura cita exemplos de adaptação de culturas a concentrações elevadas tais como 8 a 9 g/L.

Para a continuidade desta pesquisa recomenda-se:

1. Que pesquisas sejam realizadas em reatores anaeróbios tratando lodo de esgoto em maior escala e com a presença de todos os outros substratos inerentes a ele. Essas pesquisas devem ser trabalhadas de tal forma que estejam o mais próximo possível da realidade de cada região ou cidade estudada.

2. Os métodos utilizados para determinação de proteínas devem ser analisados e avaliados para cada tipo de resíduo estudado de forma que não deixem dúvidas sobre qual é o melhor para se determinar proteínas em resíduos complexos. Da mesma forma deve-se considerar a metodologia para determinação de amônia.

3. Deve-se fazer um estudo cinético rigoroso em relação à degradação de proteínas em reatores anaeróbios processando resíduos que contenham teores elevados desse tipo de substrato. Esses estudos devem incluir tipos e número de bactérias presentes durante o processo. Também devem ser consideradas as condições físico-químicas do processo, como por exemplo a temperatura, pH e outros parâmetros relacionados.

4. A degradação anaeróbia microbiana de proteínas é um processo complexo tornando-se um problema multidisciplinar e deveria ser estudada por um conjunto de pesquisadores de forma que todos os parâmetros e variáveis do processo fossem abordados

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONZO, N.; HIRS, C.H.W. (1968). Automation of sample application in amino acid analyzers. *Anal. Biochem*, v.23, n.2, p. 272 -288.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURE CHEMISTS. (1975) Official Methods of Analysis Association of Official Agriculture Chemists 12 ed. Washington, 1018p.
- BARKER, H.A. (1961) fermentation of nitrogenous organic compounds. In: GUNSULUS and R. Y. STAINER (eds).The bacteria. vol. 2, Academic Press, N.Y.
- BARKER, H.A. (1981). Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Ann. Rev.Biochem.*, v.50, p 23-40.
- BHATTACHARYA, S.K.; PARKIN, G.F.(1989). The effect of ammonia on methane fermentation process. *J. Water Pollution Control Federation* v. 61, n.1, p. 55-59.
- BLACBURN, T.H.; HOBSON, P.N. (1960). Proteolysis in the sheep rumen by whole and fractionated rumen contents. *J Gen. Microbiol.*,v.22, p. 272-281.
- BLADEN, H.A.; BRYANT, M.P.; DOESTSCH, R.N. (1960) A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolyzate. *App. Microbiol.*v.9, p. 175-180.
- BLUNDI, C. E. (1988). Aplicação de métodos alternativos para a determinação de matéria orgânica e biomassa em águas residuárias. São Carlos. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos- Universidade de São Paulo.

- BORZACCONI, L.; I. LOPEZ; VINAS, M.(1995). Applicationa of anaerobic digestion to the treatment of agroindustrial effluents in Latin America. *Wat. Sci. Tech.*, v. 32, n. 2, p. 105-111.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v.72, p 248-254
- BREURE, A.M; van ANDEL, J.G; BURGER-WIERSMAN, T; GUIJT, VERKUIJLEN, J (1985). Hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin under anaerobic conditions in a laboratory scale upflow reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.21, p. 50-54.
- BREURE, A.M.; MOOIJMAN, K.A., Van ANDEL, J.G. (1986). Protein degradation in anaerobic digestion: Influence of volatile fatty acids and carboydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.24, p. 426-431.
- BROCK, T.D.; MADIGAN. M.T. (1988) *Biology of Microorganisms* .Prentice-Hall, Inc. Englewwood Cliffs, N.J.
- BRYANT, M.P.; DOETSH, R.N.(1954) A study of activily cellulolytic rod-shaped bactreria of the bovine rumen. *J Dairy Sci.*, v. 37, p. 1176-1183.
- BRYANT, M.P. (1972). Commentary on theHungate techniique for culture of anaerobic bacteria. *Amer. J. Clin. Nutr.*, v.25, p.1324-1328.
- CHEN, Y. R.; HASHIMOTO, A G.(1980 Substrate utilization kinetic model, for biological treatment processes. *Biotechnol. Bioeng.*, v.22, p. 2081-2095.
- CHEREMISINOFF, N.,P. (1989). *Handbook of heat and mass transfer. Vol.3: Catalysis, Kinetics, and Reactor Engineering*, p. 701-752
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. (1988). *Introdução a métodos cromatográficos. 3ª edição - editora Unicamp -Campinas -SP.*
- CONTOIS, D.E. (1959) Kinetics of bacterial growth. Relationship between population density and specific growth rate of continous cultures. *J.Gen.Microbiol.*, v.21, p. 40-50.

- CUBA, F.J.T.(1993) Tratamento de esgotos sanitários empregando reator anaeróbio de leito fluidificado São Carlos. ...p Tese (Doutorado)- Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo.
- DOELLE, H.V. (1981). VII Anaerobic metabolic process. In: Biotechnology Vol. 1. Microbial fundamentals. A comprehensive treatise. H.J. Rhen and G.Reeds eds.
- DÜRRE, P.; SPARR, R. & ADRESSEN, J.R. (1983). Glycine fermentation via a glycine reductase in *Peptococcus glycinophilis* and *Peptococcus magnus*. *Arch. Microbiol.*,v.134, p. 127-139.
- EASTMAN, J.A.; FERGUNSON, J.F. (1981).Solubilization of particulated organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.*, v. 53, p. 352-366
- ELSDEN, S.R.; HILTON, M.G.; PARSLEY, K.R.; SELF, R. (1980) The lipid Fatty Acids of Proteolytic Clostridia. *J. Gen. Microbiol.*, v.118, p.115-123
- ELSDEN, S.R.; HILTON, M.G.; WALLER, J.M. (1976). The end products of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia. *Arch. Microbiol.*, v.107, p.283-288.
- ELSDEN, S.R.; HILTON, M.G (1978) Volatile acid production from threonine, valine, leucine, isoleucineby clostridia. *Ar ch Microbiol.*, v.117, p. 165-172.
- EDWARDS,T.; MCBRIDE, B.C. (1975) New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.* v. 29,p.540-545
- FANG, H.H.P.; CHUI, H.K.;LI, Y.Y.; CHEN, T. (1994). Performance and granule characteristics of UASB process treating wastewater with hydrolyzed proteins. *Wat. Sci. Tech.* v. 30, n. 8, p.55-63
- FIELDS, R. (1972). The rapid determination of Amino Groups. In HIRS,C.H.W. & TIMASHEFF, S. N. *Methods in Enzimology*, N. Y ,Academic Press, v. XXV, p. 464-468

- FORESTI, E. (1994). Fundamentos da digestão anaeróbia. Apostila da disciplina "Processos anaeróbios de tratamento de despejos. EESC- USP - SãoCarlos
- FULGHUM, R.S. (1958). The development of differential media for the isolation of proteolytic bacteria from the rumen. M. S. thesis. Virginia Polytecnic Institute, Blacksburg.
- FULGHUM, R.S.; MOORE, W.E.C. (1963) Isolation, enumeration and characteristics of proteolytic ruminal bacteria. *J. Bacteriol.* v. 35, p.808-815
- GERHARDT, P. et al. (1981). Manual of Methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Chap 17, p. 350-364.
- GLEN, A.R. (1976) Production of extracelular proteins by bacteria. *Ann. Ver. Microbiol.*, v. 30, p.41-62.
- GRAU,P. et al.(1975). Kinetics of multicomponent substrate removal by activated sludge. *Wat.Res.*, v. 9, p.637-642.
- GRECO, R.L. et al. (1983) Aluminum -organic interactions influencing anaerobic digestion of coagulated substrates. Technical report- Environmental engeneering Department, Cornell University, Ithaca , N.Y.
- GUANSHENG, C.; PLUGGE, C.M.; ROELOFSEN, W.; HOWEN, F.P.; STAMS, A.J.M (1992). *Selenomonas acidaminovorans* sp. nov., a versatile thermophilic proton-reducing anaerobe able to grow by decarboxylation of succinate to propionate. *Arch. Microbiol.* v. 157, p.169-176.
- GUJER,W.; ZEHNDER, A.J.B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Wat. Sci. Tech.*, v.15, n 8/9 , p 127-167.
- HILLS, D.J. & ROBERTS, D.W. (1980). Methane gas production from dairy manure and fields crop residues. *Proc. 4th Int. Symp.on livestock wastes* in ROBBINS, J.E.; GERHARDT, S.A.; KAPPEL, T.J. (1989). Effects of total ammonia on anaerobic digestion and an exemple of digester performance from cattle manure-protein mixtures. *Biological wastes*, n 27, p.1-14.

- HOBSON, P.N.; SHAW, B.G. (1976). Inhibition of methane production by *Methanobacterium formicicum*. *Water Res.*, v.10, p. 849-52.
- HOBSON, P.N. et al (1981). The microbiology and biochemistry of anaerobic digestion. In *Methane Production from Agricultural and Domestic Wastes*. (Energy from wastes series), Aberdeen, U.K.. Applied Science Publishers Ltd. First edition, p. 10-51.
- HUNGATE, R.E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: NORIS, J.R. & RIBONS, D.W. *Methods in microbiology*, v.3B, Academic Press, N.Y., p. 117-132.
- HUNGATE, R.E. (1982). The microbiology of biodigestion. (1982). In: I Simpósio Latinoamericano sobre Produção de Biogás. Sociedade Brasileira de Microbiologia. Comitê latinoamericano de Microbiologia Ambiental, (ed), 91p.
- HUGHES, D.E. (1980) "What is anaerobic digestion" In: STAFFORD, D.A WHEATLEY, R.I. & HUGHES, D.E. *Anaerobic Digestion*, London, Applied Science Publishers, p.1-14.
- ITZHAKI, R., GILL D.M. (1964). A Micro-Biuret Method for Estimating Proteins. *Anal. Biochem*, v.9 p.401-410.
- JAIN, M.K.; ZEIKUS, J.G.(1985). A defined starter culture for biomethanation of proteinaceous wastes, p 125-139. In: A. A. Antonopoulos (ed.). *Biotechnological advances in processing municipal wastes for fuels and chemicals*. Argonne National Laboratory, Argonne III.
- JAIN, M.K.; ZEIKUS, J.G. (1989). Bioconversion of Gelatin to Methane by a Coculture of *Clostridium collagenovorans* and *Methanosarcina barkeri* *Appl. Environ Microbiol.*, v.55, n.2, p.366-371.
- KESTERS, I.; HOUWEN, F.; VERSTRAETE, W. (1994). Thermophilic anaerobic degradation of gelatin by *Thermobacteroides proteolyticus*. *Biotechnology Letters*, v.15, n.9, p.931-936.

- KOROLEFF, F. (1976). Determination of nutrients .In GRAFFHOFFK(editors). Methods of seawater analysis. Verlag Cheme Veinhein, p 117-18.
- LAW, B. A. (1980) Transport and Utilization of Proteins by Bacteria In Microorganisms and Nitrogen Sources. John Willey & Sons Ltd 870p.
- LAWRENCE, A W.; McCARTY, P.L. (1970) Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment. *J.Wat. Poll.Cont. Fed.*, v. 41, p. R1-R17
- LAWRENCE, A W. (1971). Application of process kinetics to design of anaerobic process. In: *Anaerobic Biological Treatment Processes.*, F.G. Pholand (ed.). *Advances in Chemistry Series* No. 105, p. 163-189. American Chemical Society, Washington, D.C.
- LEHNINGER, A.L. et al. (1995). Princípios de Bioquímica. Capítulos 5 e 6 e 7, p.81-143. Editora Sarvier. São Paulo.
- LOWRY ,O.H. et al. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. BIOL. CHEM.*, v.193, p.265-276.
- MANZOLLI, I.M. (1989). Emprego de métodos analíticos alternativos no estudo da degradação anaeróbia de um substrato multicomposto. Tese (Mestrado)-Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo. p. 49.
- MARTY, B. (1986). Microbiology of Anaerobic Digestion In: BRUCE, M; KOUSELI-KATSIRI e P.J. NEWMAN "Anaerobic Digestion of Sewage sludge and organic agricultural wastes " Elsevier Appl. Sci. Publishers, London, N.Y.
- Mc CARTY, P.I.; McKINNEY, R.E. (1961) Sal toxicity, synergism, and antagonism in anaerobic treatment. *J. Water Pollut. Control., Fed.*, v. 33, p 399
- Mc INERNEY, M.J. (1988). Anaerobic Hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: ZEHNDER, J.B. "Biology of Anaerobic Microorganisms" John Willey & Sons eds cap. 8, p 373 - 416.

- MACKIE, R.I.; BRYANT, M.P. (1990). Efficiency of bacterial protein synthesis during anaerobic degradation of cattle waste. *App. Environ. Microbiol.*, v.56, n.1, p.87-92.
- MEAD, G.C. (1971). The amino acid-fermenting clostridia. *J. Gen. Microbiol.*,v.67, p. 47-56.
- MERK INDEX (1989/95). An encyclopedia of chemicals drugs and Biologicals.17 e 19 eds. Merck & Co., Inc, Rahway, N.J. USA.
- METCALF & EDDY, Inc. (1979) Wastewater Engineering: Treatment Disposal, Reuse. 2° ed., USA, McGraw-Hill, 920p
- MILLER,T.L.; WOLLIN, M.J. (1974). A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. *Appl. Microbiol.*, v. 27, n.5, p.985-987.
- MONOD, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.3 p.371-376
- MOORE, S., SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. (1958). Chromatography of amino acids on sulphonated polystyrene resins. *Anal. Biochem.*,v.30, n.7, p 1185-1190.
- MOOSBRUGGER, U.M; LEEWENTHAL; R.E; MARAIS, G.V.R. (1990). Pelletisation in a UASB system with protein (casein) as substrate. *Water SA* v.16, n.3, July.
- MOSER, H. (1958) The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. Carnegie Institute, Washington Pub.,n° 614.
- NAGASSE, M.; MATSUO, T (1982). Interactions Between Amino Acid-Degrading Bacteria and Methanogenic Bacteria in Anaerobic Digestion. *Biotechnol. Bioeng.* V l..XXIV, p 2227 - 2239.
- NATION, J.L. (1983) A new method using Hexametildisilane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Staim Technol.*, v. 58, n. 6, p. 347 -351
- NISMAN, B. (1954). The Stickland reaction. *Bacteriol. Rev.*, v. 18, p 16-42.

- NORTH, M.J. (1982). Comparative Biochemistry of the proteinases of Eucaryotic Microorganisms. *Microbiol. Rev.*, v. 46, n. 3, p.308-340.
- NOVAES, R.F.V. (1986). Microbiology of Anaerobic Digestion. *Wat. Sci. Technol.*, v. 18 , n. 18, p. 1-4.
- O'ROURKE, J.T. (1968) Kinetics of anaerobic treatment at Reduced Temperatures. Ph.D. Thesis, Stanford University, Stanford, California.
- ÖRLYGSSON, J; HOUWEN, F.P; SVENSSON, B.H. (1995) Thermophilic anaerobic aminoacid degradation: deamination rates and end- product formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 43, p.235-241.
- PAAVILAINEN ,S.; KORPELA,T. (1993). Comparison of high performance liquid and gas chromatography in the determination of organics acids in culture media of the aliphatic bacteria. *Journal of Chromatography*, n.634, p.273-280.
- PARKIN, G.F.; MILLER, S.W. (1982) Response of methane Fermentation to continous addition of selected industrial toxicants. "Proc. 37th Pardue Indust. Waste Conf. West Lafayette, ind.
- PAVLOSTATHS, S.G.; GOSSETT, J.M. (1988). Preliminary conversion mechanism in anaerobic digestion of biological sludge. *J. Environ. Eng., ASCE*, v. 114, p. 575-592.
- PAVLOSTATHS, S.G.; GIRALDO-GOMEZ (1991). Kinetics of anaerobic treatment. *Water Sci. Tech.* v.24, n.8, p 35-39
- PERLE, M.; KIMCHIE, S.; SHELEF, G. (1995). Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Wat. Res.*v.29, n.6, p.1549-1554.
- POLLOCK , M.R. (1962). Exoenzymes .In: The bacteria .vol. IV (I.C GUNSALUS,. & R.Y. STANIER, eds ) Academic Press, N.Y. London., p. 121-178.

- POOLMAN, B; KUNJI, E. R. S.; HAGTING, A.; JUILLARD, V.; KONINGS, W.N. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. App. Bact. Symp. Supplement*, v.79, p 65s-75s.
- PRIEST, F.G. (1983). Extracellular enzymes. In: *Aspects of Microbiology* 9, pg 79.
- ROBINS, J.E.; GERHARDT, S.A.; KAPPEL, T.J.(1989). Effects of total ammonia on anaerobic digestion and an example of digester performance from cattle manure-protein mixtures. *Biological wastes*, n 27, p.1-14
- RUSSELL, J.B.; ONODERA, R.; HINO, T. (1991) Ruminant Protein Fermentation: New Perspectives on Previous Contradictions. *Proceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology*, p 681-695
- SAYED, S.K.I. (1987). Anaerobic Treatment of Slaughterhouse Wastewater using the UASB process. Ch.1, p.1-28.
- SAYED, S.K.I; CAMPEN, L.V.; LETTINGA, G. (1987). Anaerobic Treatment of Slaughterhouse Waste Using a Granular Sludge UASB Reactor. *Biol. Wastes* , v.21, p. 11-28
- SIEBERT, M.L.;TOERIEN. D.F. (1969). The proteolytic bacteria present in the anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*, v.3, p 241-250.
- SCHULZE, D.; MENKHAUS; M.; FIEBIG; R.; DELLWEG, H. (1988a) Anaerobic treatment of protein-containing waste waters: correlation between coenzyme F<sub>420</sub> and methane production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.29, p.506-510
- SCHULZE, D.; FIEBIG, R.; DELLWEG, H. (1988b). Development of granular sludge in the UASB-treatment of model waste waters containing gelatine. *Biotechnol. Letters*, v.10, n.5, p.319-324.
- SEDLAK, R. (1991) Phosphorus and nitrogen Removal from Municipal Wastewater. Principles and practice. Second edition, ch. 2, p 3-41.

- SEDLACK, T.J.; GROSSBERG, S.T. (1977). A rapid sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.*, v.79, p.544-552.
- SCHMIDT, J. E.; B. K. AHRINH (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludg blanket (UASB) reactors. Review *.Biotechnol. & Bioeng.*, v. 49, p. 229-246.
- SMITH, P.K. et al. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal.Biochem.* v.150, p76-86.
- SOUBES, M (1994). Microbiologia de la digestion anaerobia. In III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de aguas residuales". Montevideo -Uruguai-25 a 28 de Octubre, p. 15-40.
- SPACKMAN,D.H.; STEIN,W.H.; MOORE, S (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography on ultrasphere- octadecyltrimetilosylane. *Anal. Biochem.*, v.104, n. 2, p. 464-468.
- SPEECE,R.E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.*, v. 17,p.416-427.
- STAMS, A.J.M.; SKRABANJA, A.T.P.; PLUGGE, C.M. (1994). Degradation of glutamate and other amino acids by syntrophic associations of fermenting and methanogenic bacteria. In: III Taller y Seminario Latinoamericano 'Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales'. Montevideo -Uruguai. p 84-96.
- STAMS, J.M. (1994). Metabolic interactions between anaerobic in methanogenic environments. *Antonie van Leewenhoek*, v. 66, p. 271-294
- STANDARD METHODS for Examination of Water and Wastewater (1995). 19th edition. American Public Health Association, Washington.
- STRYER,L. (1988). Biochemistry. Connective -Tissue Proteins. W.H. FREEMAN & Co/ New York, chp 11 p. 262-281.

- STRONACH, S.M.; RUD, T.; LESTER, J.N. (1986). Anaerobic digestion process in industrial wastewater treatment. Springer -Verlag, Berlin, 184p.
- THAVEESRI, J; GERNAEY, K.; KAONGA, B.; BOUCNEAU; G.; VERSTRAETE, W (1994). Organic and ammonium nitrogen and oxygen in relation to granular sludge growth in lab -scale UASB reactors. *Wat. Sci Tech.* v.30, n.12, p.43-53.
- TOERIEN, D.F.; SIEBERT M.L.:(1967). The bacterial nature of the acid-forming phase of anaerobic digestion. *Water Research*, v.1, p 497-507.
- TOERIEN, D.F.; HATTINGH. W.H.J. (1969). Anaerobic digestion. I. The microbiology of anaerobic digestion. *Water reseach*, v. 3, p.385-416.
- TORRES, P.(1992). Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sintéticos. São Carlos, 174p. . Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain Mc3. *FEMS Microbiol. Letters*, v.16, p 241-246.
- VAN DE GRAAF, A.A. et al. (1995). Anaerobic Oxidation of Ammonium is a Biologically Mediated Process. *Appl Environ. Microbiol.*,v.61, n.4, p.1246-1251
- VAN DEMARK, P. J.; BATZING, B.L. (1986). The Microbes. Microbial Metabolism. Energy Conservation. Benjamin/Cummings, Publishing Company Inc Chap. 6, p. 209-274.
- VAZOLLER, R.F. (1988). Manual Técnico do Curso de Ecologia da Digestão Anaeróbia. PADCT/ CNPq/ FINEP, 150pp.
- VICTORIA, J.A.R. (1993). Nitrificação de efluente de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) em filtro anaeróbio. São Carlos, 116p. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- VIEIRA, S.M. (1988). Anaerobic Treatment of Domestic Sewage in Brazil. Research results and full-scale experience. In: Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion. Bologna, Italy, p 185- 196.
- VILLAS BÔAS, D.M.F. (1990). Estudo da microbiota anaeróbia hidrolítica fermentativa em aterro sanitário. Trabalho apresentado ao Depto de Hidráulica e Saneamento da EESC. USP. 110p.
- WALLACE, R. J.; BRAMMALL, M.L.(1985). The Role of Different Species of Bacteria in the Hydrolysis of Protein in the rumen. *J. Gen. Microbiol.*, v.131, p 821-832.
- WRIGHT, D.E.; R.E. HUNGATE. (1967). Amino Acid concentrations in rumen fluid. *Appl. Microbiol.* v. 15, p 148-151.
- WOLIN, J. M. (1988). The Rumen Fermentation: A Model for Microbial Interactions in Anaerobic Ecosystems. In: *Adv. Microb. Ecol.* M. Alexander (ed.), p.49-77.
- YEMM, E.W.; COOKING, (1954). Determination of Amino-acids with Ninhydrin. *The Analyst*, v.80,p.209-213.
- ZEIKUS, J.G. (1980). Microbial populations in digesters. In: STAFFORD, D.A WHEATLEY,R.I. & HUGHES, D.E. Anaerobic Digestion, London, Applied Science Publishers, p.61-89.
- ZINDER, S.H.; KOCH, M. (1984). Non acetoclastic Methanogenesis from acetate: Acetate Oxidation by a thermophilic syntrophic coculture *Arch. Microbiol.*v.138, p.263-72

**ANEXOS**

## Anexo A

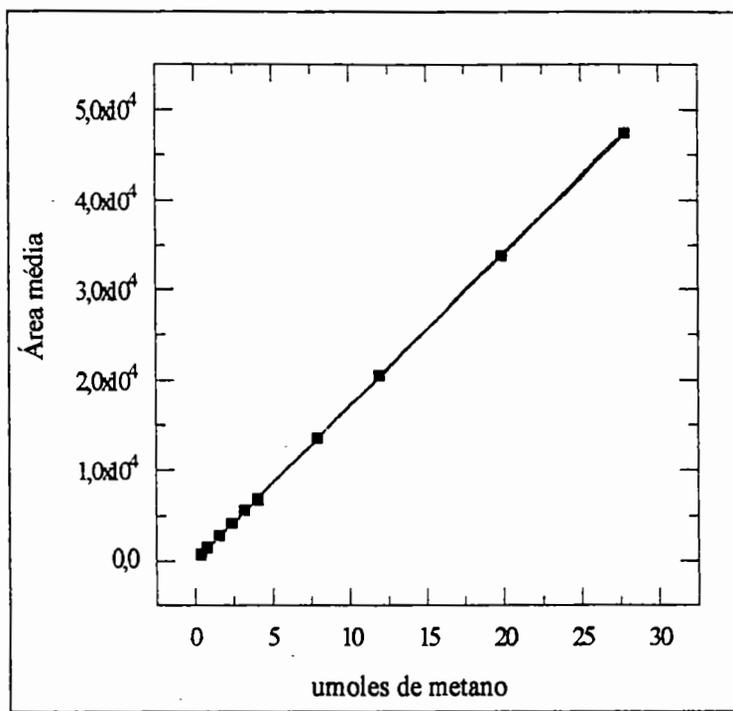
Curva analítica para cálculo da produção de metano

**Dados para cálculo da curva analítica de metano**

Volume injetado (mL)	CH <sub>4</sub> na CNTP (mL)	CH <sub>4</sub> (μmoles) 98% do calculado	Área média
0,01	0,00909	0,398	640
0,02	0,01818	0,795	1372
0,04	0,03637	1,591	2751,75
0,06	0,05455	2,387	4171
0,08	0,07273	3,184	5630,40
0,10	0,09092	4,059	6783,78
0,20	0,18183	7,955	13583,75
0,30	0,27275	11,933	20503,80
0,50	0,45458	19,888	33843,75
0,70	0,63641	27,843	47422,75

Curva analítica de metano

## Curva analítica de metano



Metano	Área
0,398	640
0,795	1372
1,591	2751,75
2,387	4171
3,184	5630,4
4,059	6873,75
7,955	13583,75
11,933	20503,8
19,888	33843,75
27,843	47422,75

Regressão linear		
Y= A+ B*X		
Parâmetros	valores	sd
A	47,65468	46,02412
B	1702,12791	3,87308
R=	0,99998	
SD=	107,5816	N= 10
P=	8,0476E -19	

**ANEXO B**  
**Tabelas do 1º teste de produção de metano -Peptona**

## Produção de metano (cálculos)- Frascos 1- 1ª incubação

Frasco 1	Peptona			Y= A + B*X		A=47,65468
						B=1702,12791
Inoculação						
Horas	Área (y)	x	umol/HS (b)	HS +b	μmoles/litro	
0	0	0	0	0	0	
24	7601	4,44	1459,97	1464,40	8889	
48	7241	4,23	1390,38	1399,05	8492	
72	7021	4,10	1347,86	1360,62	8259	
336	7469	4,36	1434,45	1451,57	8811	
1ª alimentação						
0	0	0	0	0	0	
24	906	0,50	165,91	166,41	1010	
48	2120	1,22	400,56	402,28	2442	
72	2571	1,48	487,73	490,94	2980	
96	3476	2,01	662,66	667,87	4054	
144	6707	3,91	1287,17	1295,79	7865	
2ª Alimentação						
0	0	0	0	0	0	
24	1408	0,80	262,94	263,74	1601	
48	2039	1,17	384,90	386,87	2348	
72	2826	1,63	537,02	540,62	3282	
96	2849	1,65	541,46	546,71	3319	
192	5102	2,97	976,94	985,16	5980	
216	7061	4,12	1355,59	1367,93	8303	
240	7420	4,33	1424,98	1441,65	8751	
264	7759	4,53	1490,51	1511,71	9176	
312	9597	5,61	1845,77	1872,58	11367	
336	9592	5,61	1844,80	1877,22	11395	
360	10100	5,91	1942,99	1981,31	12027	
384	10000	5,85	1923,66	1967,83	11945	
408	10482	6,13	2016,83	2067,13	12547	

y = área medida

b = mMol em 0,5 mL de amostra

HS = Head space

(Cont.)

Ensaio 1                      Peptona                       $Y = A + BX$        $A=47,65468$   
 Frasco 2                       $B=1702,12791$

**Inoculação**

Horas	Área(y)	x	umol/HS	HS+b	μmol/litro
0	0	0	0	0	0
24	3052	1,77	580,70	582,47	3536
48	7257	4,24	1393,48	1399,48	8495
72	8531	4,98	1639,72	1650,71	10020
336	7927	4,63	1522,98	1538,59	9339

**1ª Alimentação**

0	0	0	0	0	0
24	1255	0,71	233,36	234,07	1421
48	1913	1,10	360,55	362,35	2199
72	2337	1,34	442,50	445,65	2705
96	2488	1,43	471,69	476,27	2891
144	4667	2,71	892,86	900,16	5464

**2ª Alimentação**

0	0			0	0
24	1214	0,69	225,44	226,13	1373
48	883	0,49	161,46	161,95	983
72	1087	0,61	200,89	202,68	1230
96	1196	0,67	221,96	224,42	1362
192	2156	1,24	407,52	411,22	2496
216	3001	1,74	570,84	576,28	3498
240	3776	2,19	720,64	728,27	4421
264	4048	2,35	773,22	783,19	4754
312	4099	2,38	783,07	795,43	4828
336	4169	2,42	796,60	811,38	4925
360	4481	2,60	856,91	874,29	5307
384	4862	2,83	930,55	950,76	5771
408	4987	2,90	954,71	977,83	5935

Y = área

b= umoles em 0,5 ml de amostra

HS= head space (164,5 ml em média)

(Cont.)

Ensaio1	Peptona				
Frasco 3				Y = A + Bx	A = 47,65468 B = 1702,12791
Horas	Área (y)	x	umol /HS (b)	HS+ b	µmol/litro
<b>Inoculação</b>					
0	0	0	0	0	0
24	13216	7,74	2545,28	2553,01	15497
48	14900	8,73	2870,77	2887,23	17526
72	16576	9,71	3194,72	3220,89	19551
336	17445	10,22	3362,69	3399,08	20632
<b>1ª Alimentação</b>					
0	0	0	0	0	0
24	7445	4,35	1429,81	1434,16	8705
48	12952	7,58	2494,25	2506,18	15212
72	13135	7,69	2529,62	2549,24	15474
96	14649	8,58	2822,26	2850,45	17302
144	17247	10,10	3324,42	3362,72	20412
<b>2ª Alimentação</b>					
0	0	0	0	0	0
24	12389	7,25	2385,43	2395,53	14541
48	10719	6,27	2062,64	2076,16	12602
72	11347	6,64	2184,02	2204,18	13379
96	11966	7,00	2303,67	2330,83	14148
192	11281	6,60	2171,26	2205,02	13385
216	15125	8,86	2914,26	2956,88	17948
240	15501	9,08	2986,94	3038,63	18445
264	15020	8,80	2893,97	2954,46	17934
312	16113	9,44	3105,23	3175,16	19273
336	16226	9,50	3127,07	3206,51	19464
360	16129	9,45	3108,32	3197,21	19407
384	15689	9,19	3023,28	3121,35	18947
408	16011	9,38	3085,51	3192,97	19381

y = área medida

b = umoles/L em 0,5 ml de amostra

HS = Head space (164,5 ml)

(Cont.)

Ensaio 1	Peptona				
Frasco 4				$Y = A + Bx$	$A = 47,65468$ $B = 1702,12791$
Horas	área (y)	x	umol /HS (b)	HS+ b	μmol/litro
<b>Inoculação</b>					
0	0	0	0	0	0
24	12887	7,54	2481,68	2489,23	15110
48	19201	11,25	3702,10	3720,90	22586
72	17338	10,16	3342,01	3370,96	20462
336	18237	10,69	3515,77	3555,41	21581
<b>1ª alimentação</b>					
24	7404	4,32	1421,89	1426,21	8657
48	11215	6,56	2158,51	2169,39	13168
72	11621	6,80	2236,98	2254,66	13686
96	13880	8,13	2673,62	2699,43	16386
144	21580	12,65	4161,93	4200,39	25496
<b>2ª alimentação</b>					
0	0		0	0	0
24	3959	2,30	756,01	758,31	4603
48	13232	7,75	2548,37	2558,41	15530
72	13035	7,63	2510,29	2527,96	15345
96	13823	8,09	2662,60	2688,37	16318
192	14610	8,56	2814,72	2849,04	17294
216	15025	8,80	2894,93	2938,05	17834
240	15585	9,13	3003,17	3055,42	18546
264	15958	9,35	3075,27	3136,87	19041
312	17721	10,38	3416,04	3488,02	21172
336	18248	10,69	3517,90	3600,57	21855
360	17066	10,00	3289,43	3382,10	20529
384	16936	9,92	3264,31	3366,90	20437
408	17125	10,03	3300,84	3413,46	20720

y = área medida

b = mmoles em 0,5 mL de amostra

HS = Head space = 164,5 mL

Produção de metano - 1º período de incubação para os 4 frascos- Peptona

Frasco 1					
$Y = A + Bx$					
$A = 47,65468$ $B = 1702,12791$					
Horas	Área (y)	x	$\mu\text{moles/HS}$	HS + x	$\mu\text{moles/litro}$
0	0	0	0	0	0
24	7601	4,44	1459,97	1464,40	8889
48	7241	4,23	1390,38	1399,05	8492
72	7021	4,10	1347,86	1360,62	8259
336	7469	4,36	1434,45	1451,57	8811

Frasco 2					
0	0	0	0	0	0
24	3052	1,77	580,70	582,47	3536
48	7257	4,24	1393,48	1399,48	8495
72	8531	4,98	1639,72	1650,71	10020
336	7927	4,63	1522,98	1538,59	9339

Frasco 3					
0	0	0	0	0	0
24	13216	7,74	2545,28	2553,01	15497
48	14900	8,73	2870,77	2887,23	17526
72	16576	9,71	3194,72	3220,89	19551
336	17445	10,22	3362,69	3399,08	20632

Frasco 4					
0	0	0	0	0	0
24	12887	7,54	2481,68	2489,23	15110
48	19201	11,25	3702,10	3720,90	22586
72	17338	10,16	3342,01	3370,96	20462
336	18237	10,69	3515,77	3555,41	21581

y = área medida

b = mmoles em 0,5 mL de amostra

HS = Head space = 164,5 mL

## Produção de metano - 1ª realimentação para os 4 frascos - Peptona

Ensaio 1	Peptona	$y = A + B \cdot x$	A = 47,65468
1ª alimentação			B = 1702,12791

## Frasco 1

Horas	Área (y)	x	$\mu\text{moles/HS}$	HS + x	$\mu\text{moles/litro}$
0	0	0	b	0	0
24	906	0,50	165,91	166,41	1010
48	2120	1,22	400,56	402,28	2442
72	2571	1,48	487,73	490,94	2980
96	3476	2,01	662,66	667,87	4054
144	6707	3,91	1287,17	1295,79	7865

## Frasco 2

0	0	0	0	0	0
24	1255	0,71	233,36	234,07	1421
48	1913	1,10	360,55	362,35	2199
72	2337	1,34	442,50	445,65	2705
96	2488	1,43	471,69	476,27	2891
144	4667	2,71	892,86	900,16	5464

## Frasco 3

0	0	0	0	0	0
24	7445	4,35	1429,81	1434,16	8705
48	12952	7,58	2494,25	2506,18	15212
72	13135	7,69	2529,62	2549,24	15474
96	14649	8,58	2822,26	2850,45	17302
144	17247	10,10	3324,42	3362,72	20412

## Frasco 4

0	0	0	0	0	0
24	7404	4,32	1421,89	1426,21	8657
48	11215	6,56	2158,51	2169,39	13168
72	11621	6,80	2236,98	2254,66	13686
96	13880	8,13	2673,62	2699,43	16386
144	21580	12,65	4161,93	4200,39	25496

y = área medida

b = mmoles em 0,5 mL de amostra

HS = Head space = 164,5 mL

## Produção de metano - 2ª alimentação - Peptona.

Ensaio 1	Peptona		
2ª Alimentação		$y = A + B \cdot x$	A = 47,65468 B = 1702,12791

## Frasco 1

Horas	área(y)	x	μmoles/HS	HS+x	μmoles/L
0	0	0	0	0	0
24	1408	0,80	262,94	263,74	1601
48	2039	1,17	384,90	386,87	2348
72	2826	1,63	537,02	540,62	3282
96	2849	1,65	541,46	546,71	3319
192	5102	2,97	976,94	985,16	5980
216	7061	4,12	1355,59	1367,93	8303
240	7420	4,33	1424,98	1441,65	8751
264	7759	4,53	1490,51	1511,71	9176
312	9597	5,61	1845,77	1872,58	11367
336	9592	5,61	1844,80	1877,22	11395
360	10100	5,91	1942,99	1981,31	12027
384	10000	5,85	1923,66	1967,83	11945
408	10482	6,13	2016,83	2067,13	12547

## Frasco 2

0	0			0	0
24	1214	0,69	225,44	226,13	1373
48	883	0,49	161,46	161,95	983
72	1087	0,61	200,89	202,68	1230
96	1196	0,67	221,96	224,42	1362
192	2156	1,24	407,52	411,22	2496
216	3001	1,74	570,84	576,28	3498
240	3776	2,19	720,64	728,27	4421
264	4048	2,35	773,22	783,19	4754
312	4099	2,38	783,07	795,43	4828
336	4169	2,42	796,60	811,38	4925
360	4481	2,60	856,91	874,29	5307
384	4862	2,83	930,55	950,76	5771
408	4987	2,90	954,71	977,83	5935

## . Produção de metano - 2ª alimentação - Peptona.

Ensaio 1	Peptona	$y = A + B \cdot x$	A = 47,65468
2ª Alimentação			B = 1702,12791

## Frasco 3

Horas	Área (y)	x	$\mu\text{moles/HS}$	HS + x	$\mu\text{moles/litro}$
0	0	0,00	0	0	0
24	12389	7,25	2385,43	2395,53	14541
48	10719	6,27	2062,64	2076,16	12602
72	11347	6,64	2184,02	2204,18	13379
96	11966	7,00	2303,67	2330,83	14148
192	11281	6,60	2171,26	2205,02	13385
216	15125	8,86	2914,26	2956,88	17948
240	15501	9,08	2986,94	3038,63	18445
264	15020	8,80	2893,97	2954,46	17934
312	16113	9,44	3105,23	3175,16	19273
336	16226	9,50	3127,07	3206,51	19464
360	16129	9,45	3108,32	3197,21	19407
384	15689	9,19	3023,28	3121,35	18947
408	16011	9,38	3085,51	3192,97	19381

## Frasco 4

0	0		0	0	0
24	3959	2,30	756,01	758,31	4603
48	13232	7,75	2548,37	2558,41	15530
72	13035	7,63	2510,29	2527,96	15345
96	13823	8,09	2662,60	2688,37	16318
192	14610	8,56	2814,72	2849,04	17294
216	15025	8,80	2894,93	2938,05	17834
240	15585	9,13	3003,17	3055,42	18546
264	15958	9,35	3075,27	3136,87	19041
312	17721	10,38	3416,04	3488,02	21172
336	18248	10,69	3517,90	3600,57	21855
360	17066	10,00	3289,43	3382,10	20529
384	16936	9,92	3264,31	3366,90	20437
408	17125	10,03	3300,84	3413,46	20720

y = área medida

b = mmoles em 0,5 mL de amostra

HS = Head space = 164,5 mL

Metano produzido nos três períodos: 1ª incubação, 1ª alimentação e 2ª alimentação

$$y = A + B \cdot x \quad A = 47,65468$$

$$B = 1702,12791$$

1ª Incubação	Metano ( $\mu$ moles/L)			
Horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4
0	0	0	0	0
24	8889	3536	15497	15110
48	8492	8495	17526	22586
72	8259	10020	19551	20462
336	8811	9339	20632	21581

1ª alimentação	Metano ( $\mu$ moles/L)			
Horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4
0	0	0	0	0
24	1010	1421	8705	8657
48	2442	2199	15212	13168
72	2980	2705	15474	13686
96	4054	2891	17302	16386
144	7865	5464	20412	25496

2ª alimentação	Metano ( $\mu$ moles/L)			
Horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4
0	0	0	0	0
24	1601	1373	14541	4603
48	2348	983	12602	15530
72	3282	1230	13379	15345
96	3319	1362	14148	16318
192	5980	2496	13385	17294
216	8303	3498	17948	17834
240	8751	4421	18445	18546
264	9176	4754	17934	19041
312	11367	4828	19273	21172
336	11395	4925	19464	21855
360	12027	5307	19407	20529
384	11945	5771	18947	20437
408	12547	5935	19381	20720

. Metano produzido no Frasco 1 (mmoles/L e porcentagem)

#### Inoculação

Horas	Metano $\mu$ moles/litro
0	0
24	8859
48	8462
72	8910
336	8782

#### 1ª alimentação

Horas	Metano $\mu$ moles/litro
0	0
24	1007
48	2434
72	2971
96	4042
144	7845

#### 2ª Alimentação

Horas	Metano $\mu$ moles/litro
0	0
24	1596
48	2341
72	3272
96	3309
192	5962
216	8278
240	8725
264	9149
312	11332
336	11361
360	11991
384	11909
408	12510

## Metano produzido no Frasco 2 (mmoles/L)

## Inoculação

Horas	Metano $\mu$ moles/litro
0	0
24	3536
48	8495
72	10020
336	9339

## 1ª alimentação

Horas	Metano $\mu$ moles/litro
0	0
24	1421
48	2199
72	2705
96	2891
144	5464

## 2ª Alimentação

Horas	Metano $\mu$ moles/litro
0	0
24	1373
48	983
72	1230
96	1362
192	2496
216	3498
240	4421
264	4754
312	4828
336	4925
360	5307
384	5771
408	5935

Metano produzido no Frasco 3 ( $\mu\text{moles/L}$ )

## Inoculação

Horas	Metano $\mu\text{moles/litro}$
0	0
24	15497
48	17526
72	19551
336	20632

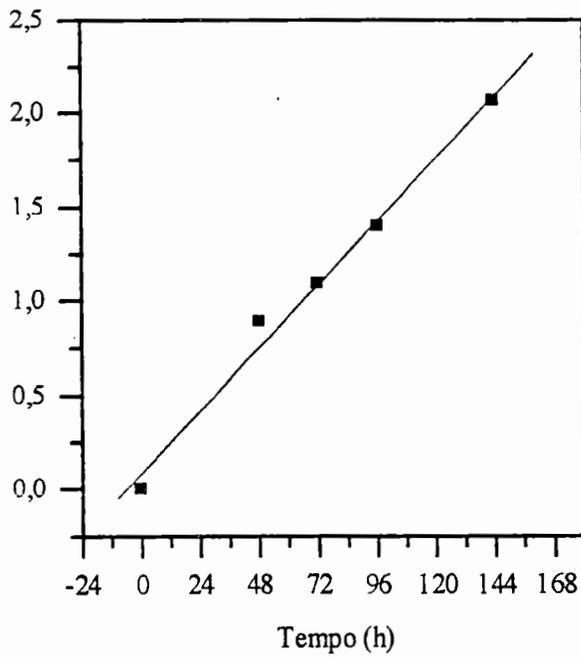
## 1ª alimentação

Horas	Metano $\mu\text{moles/litro}$
0	0
24	8705
48	15212
72	15474
96	17302
144	20412

## 2ª Alimentação

Horas	Metano $\mu\text{moles/litro}$
0	0
24	14541
48	12602
72	13379
96	14148
192	13385
216	17948
240	18445
264	17934
312	19273
336	19464
360	19407
384	18947
408	19381

## Cinética da produção de metano nos frascos com peptona - 1ª alimentação

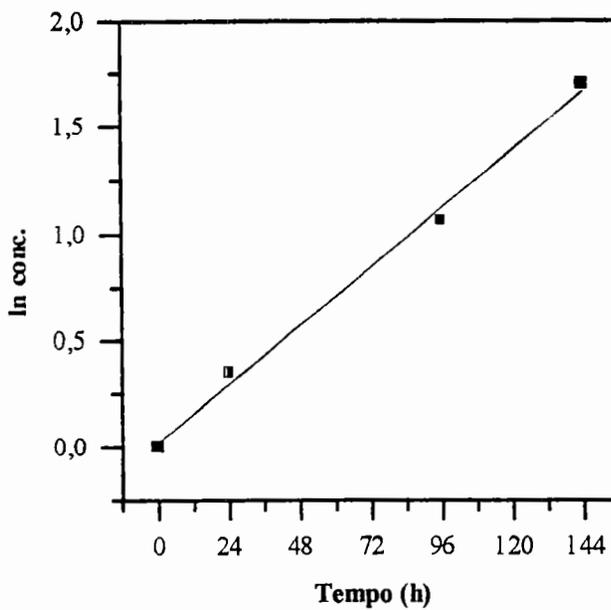


F1 - 1ª alim- met-pep

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	
A	0,08521	0,07782	
B	0,01394	8,99317E-4	
R	SD	N	P
0,99382	0,09652	5	5,8281E-4



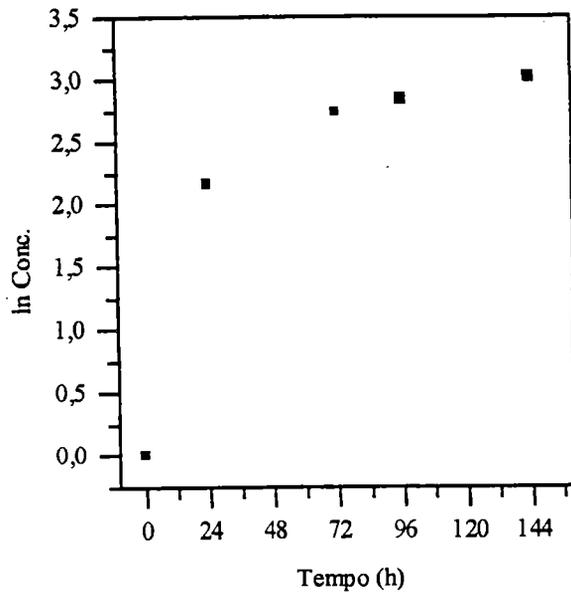
F2- 1ªalim- met-pep

Linear Regression

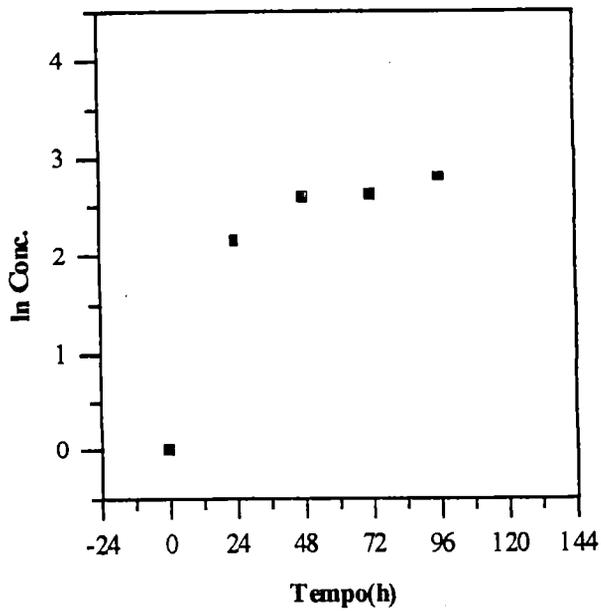
$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	
A	0,02455	0,04745	
B	0,01141	5,43195E-4	
R	SD	N	P
0,99774	0,06218	4	0,00226

## Cinética da produção de metano nos frascos com peptona - 1ª alimentação (Cont.)

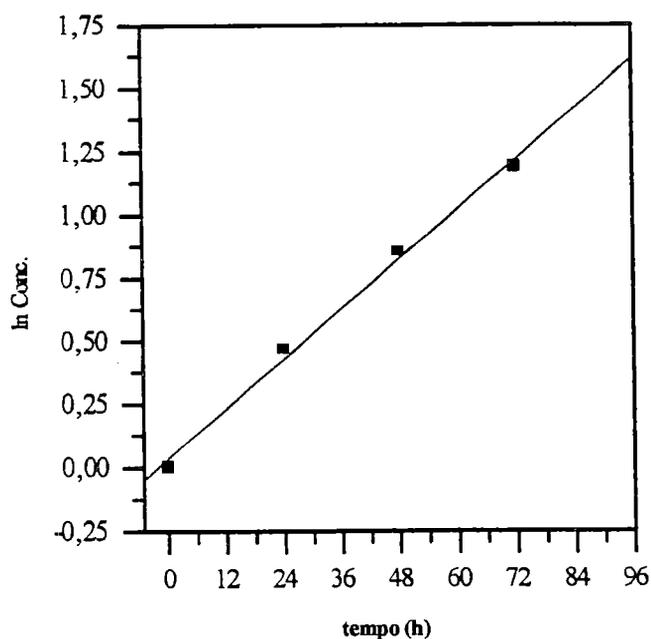


F3- 1ª alim- met- pep



F4-1ª alim-met-pep

## Cinética de metano nos frascos com peptona – 2ª alimentação



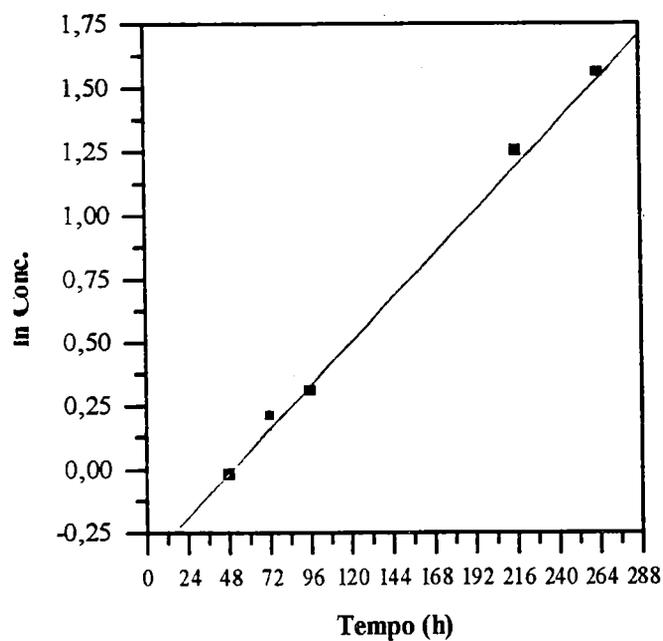
F1-2ªalim-met-pep

Linear Regression:

$$Y = A + B * X$$

Parameter Value Error

A	0,03592	0,04049
B	0,01645	9,01858E-4
R	SD	N P
0,99701	0,0484	4 0,00299



F2-2a alim -met- pep

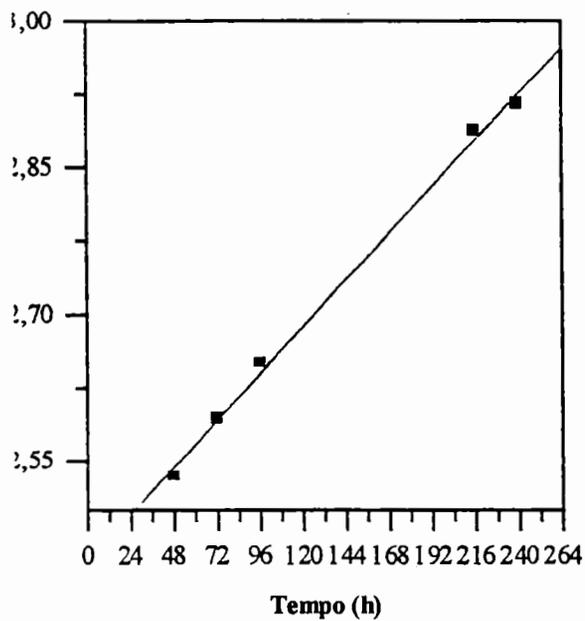
Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter Value Error

A	-0,35757	0,05755
B	0,00717	3,41956E-4
R	SD	N P
0,99549	0,06709	6 <0.0001

## Cinética da Segunda alimentação (cont.)



F3- 2ªalim- met- Pep

Linear Regression

 $Y = A + B * X$ 

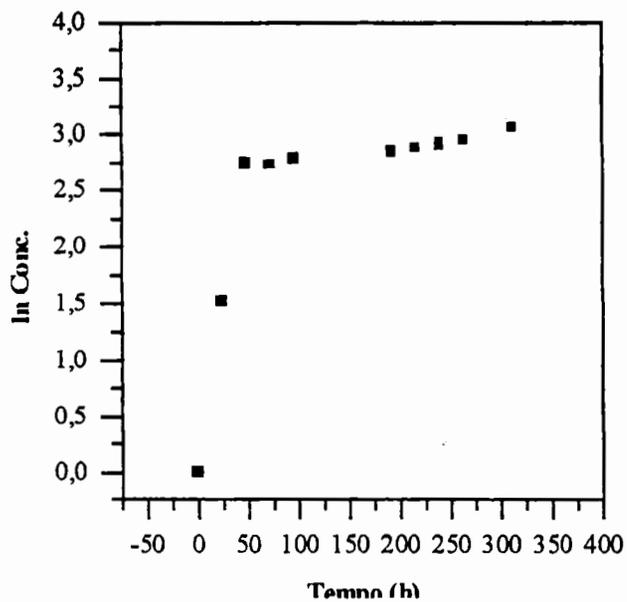
Parameter Value Error

A 2,44875 0,0105

B 0,00199 6,74926E-5

R SD N P

0,99827 0,01181 5 &lt;0.0001



F4 -2ª alim-met- pep

## ANEXO C

Tabela do 1ª teste de produção de metano em meio com gelatina

## Cálculo da concentração de metano (frasco 1)-Gelatina

Ensaio 1		Gelatina		Teste 2		A = 47,65468	
Frasco 1*						Y = A + B X B = 1702,12791	
Horas	Área	b	HS	HS+b	mmoles/L		
0	0	0	0	0	0		
24	2357	1,36	446,4	447,7	2,718		
48	2232	1,28	446,4	449,0	2,725		
72	2872	1,66	422,2	425,1	2,581		
96	3430	1,99	545,9	549,6	3,336		
168	5081	2,96	653,7	658,7	3,998		
192	5579	3,25	972,9	979,1	5,943		
216	5251	3,06	1069,1	1075,4	6,528		
240	5093	2,96	1005,7	1011,8	6,141		
288	6399	3,73	975,2	981,9	5,960		
312	6339	3,70	1227,6	1235,1	7,497		
336	6384	3,72	1216,0	1223,4	7,426		
360	6700	3,91	1224,7	1232,3	7,480		
384	6942	4,05	1285,7	1293,7	7,853		
456	7647	4,46	1332,6	1341,1	8,140		
480	7795	4,55	1468,9	1477,9	8,971		
528	8743	5,11	1497,5	1507,1	9,148		
576	7959	4,65	1680,7	1690,4	10,261		
600	8568	5,01	1529,1	1538,8	9,340		
624	8373	4,89	1646,9	1656,8	10,057		
648	8712	5,09	1609,2	1619,1	9,828		
672	9043	5,28	1674,7	1685,1	10,228		

Cálculo da concentração de metano (frasco 2)-Gelatina.

Ensaio 1		Gelatina		Teste 2		A = 47,65468	
Frasco 2*						Y = A + B X    B = 1702,12791	
Horas	Área (y)	x	mMol/ HS	HS + b	mmoles /L		
0	0	0	0	0	0		
24	9.036	5,3	1737,3	1737,3	10,546		
48	12.614	7,4	2428,9	2441,5	14,820		
72	16.315	9,0	2951,0	2967,4	18,012		
96	14.100	8,3	2716,1	2733,3	16,591		
168	13140	7,692	2531	2546,5	15,457		
192	13.104	7,7	2523,6	2539,6	15,415		
216	16.272	9,5	3136,0	3153,2	19,140		
240	17.784	10,4	3428,2	3448,2	20,930		
288	14.976	8,8	2885,5	2904,7	17,631		
312	16.228	8,9	2934,2	2951,9	17,918		
336	17.273	10,1	3329,4	3348,4	20,325		
360	16.920	9,9	3261,2	3281,2	19,917		
384	16.846	9,9	3246,9	3266,7	19,829		
456	16.848	9,9	3247,3	3267,0	19,831		
480	16.488	9,7	3177,7	3197,2	19,407		
528	17.172	10,1	3309,9	3329,6	20,211		
576	17.640	10,3	3400,4	3420,8	20,764		
600	16.612	9,7	3201,6	3221,7	19,556		
624	17.172	10,1	3309,9	3329,7	20,211		
648	17.602	10,3	3393,0	3413,4	20,719		
672	17.892	10,5	3449,1	3469,9	21,062		

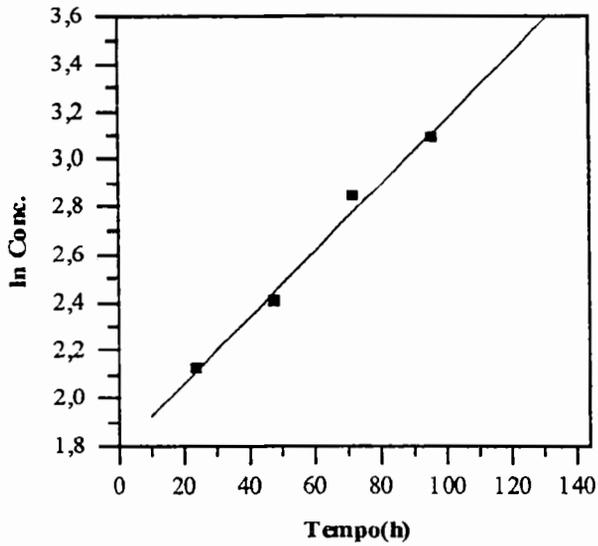
Cálculo da concentração de metano (frasco 3)- Gelatina.

Ensaio 1	Gelatina	Teste 2	Y = A +BX		
Frasco 3*			A = 47,65468 B =1702,12791		
Horas	Área (y)	x	mMol/ HS	HS+-b	mmoles/L
0	0	0	0	0	0
24	7156	4,18	1374	1378	8,365
48	9974	5,83	1919	1929	11,707
72	14599	8,55	2813	2827	17,159
96	18569	10,88	3580	3599	21,848
168	18337	10,74	3535	3557	21,589
192	21083	12,36	4066	4089	24,820
216	20526	12,03	3958	3983	24,174
240	19328	11,33	3727	3750	22,763
288	19932	11,68	3843	3866	23,469
312	19726	11,56	3804	3827	23,229
336	17249	10,11	3325	3346	20,313
360	15628	9,15	3011	3031	18,396
384	13821	8,09	2662	2679	16,264
456	12078	7,07	2325	2340	14,207
480	11539	6,75	2221	2235	13,566
528	12497	7,31	2406	2420	14,692
576	11407	6,67	2196	2210	13,412
600	11190	6,55	2154	2167	13,153
624	10740	6,28	2067	2080	12,623
648	10258	6,00	1974	1986	12,054
672	9335	5,46	1795	1807	10,966

## Metano produzido nos três frascos com gelatina

Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)		
	F1	F2	F3
0	0	0	0
24	2,718	10,546	8,365
48	2,725	14,820	11,707
72	2,581	18,012	17,159
96	3,336	16,591	21,848
168	3,998	15,457	21,589
192	5,943	15,415	24,820
216	6,528	19,140	24,174
240	6,141	20,930	22,763
288	5,960	17,631	23,469
312	7,497	17,918	23,229
336	7,426	20,325	20,313
360	7,480	19,917	18,396
384	7,853	19,829	16,264
456	8,140	19,831	14,207
480	8,971	19,407	13,566
528	9,148	20,211	14,692
576	10,261	20,764	13,412
600	9,340	19,556	13,153
624	10,057	20,211	12,623
648	9,828	20,719	12,054
672	10,228	21,062	10,966

Cinética da produção de metano no 1º teste com gelatina.



**E1-F3 gel-met**

Linear Regression for

$$Y = A + B * X$$

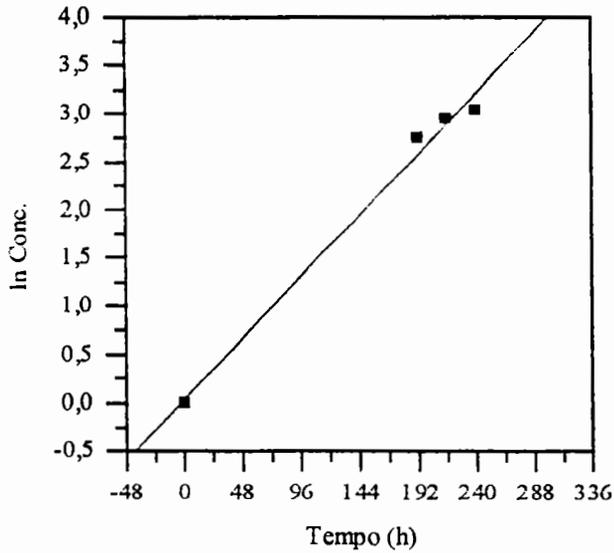
Parameter Value Error

A 1,786 0,06733

B 0,0138 0,00102

R SD N P

0,99453 0,05498 4 0,00547



**F2-E1-GEL-Met**

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter Value Error

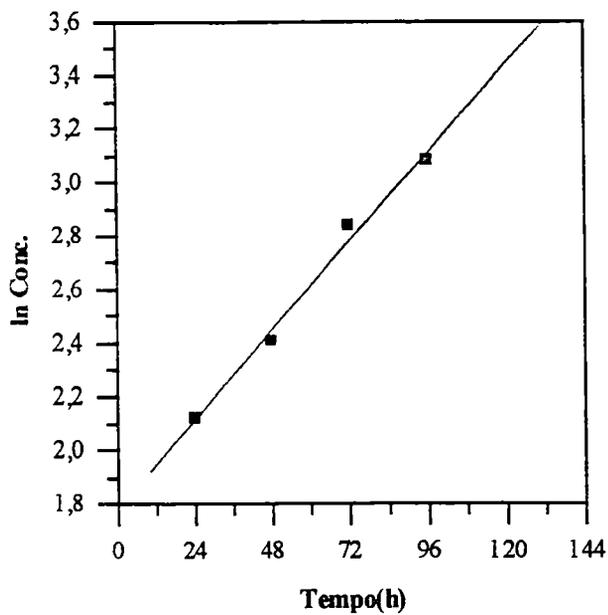
A 0,03664 0,16949

B 0,01324 9,02364E-4

R SD N P

0,99539 0,17155 4 0,00461

## Cinética da produção de metano no 1º teste com gelatina (cont.)



E1-F3 gel-met

Linear Regression for Data1\_B:

$$Y = A + B * X$$

Parameter ValueError

A 1,786 0,06733

B 0,0138 0,00102

R SD N P

0,99453 0,05498 4 0,00547

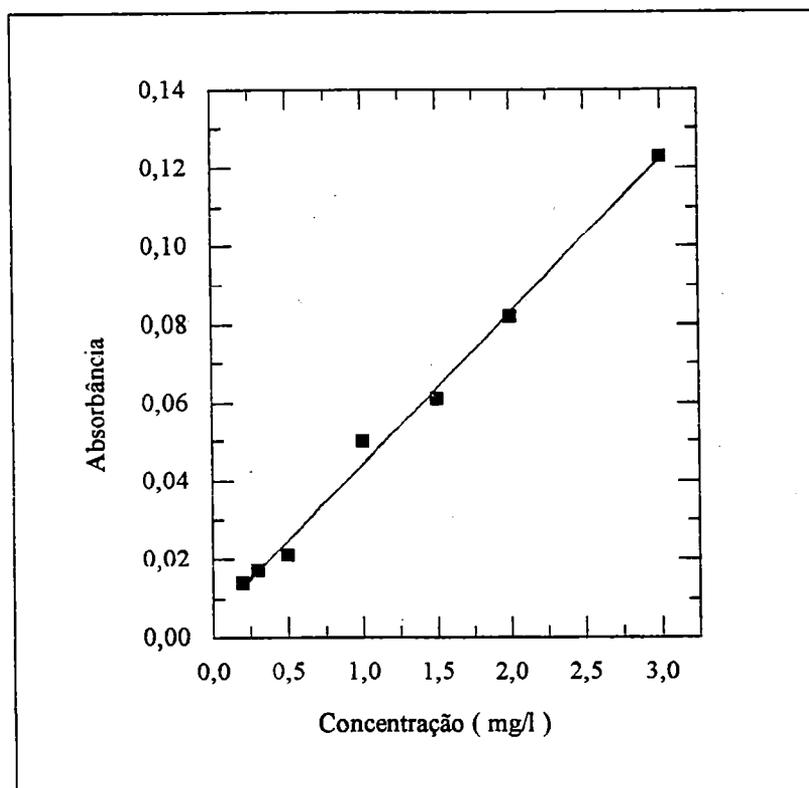
ANEXO D  
Tabelas do 2º teste com peptona

Valores das absorvâncias de proteínas (métodos do Biureto e Lowry)

Ensaio 2		Biureto	
Peptona			
Frascos 3 e 4		$X = (\text{abs} - 0,00521) / 0,039$	
Tempo (horas)	Absorbâncias médias		
	F3	F4	
0			
24	0,14	0,118	
48	0,07	0,088	
72	0,06	0,062	
96	0,06	0,059	
120	0,06	0,052	
144	0,04	0,042	
168	0,06	0,04	
192	0,07	0,049	
216	0,06	0,043	
240	0,06	0,057	
288	0,06	0,053	

Ensaio 1		Lowry	
Peptona			
Frascos 3 e 4		$X = (y - 0,12829) / 0,29978$	
Horas	Absorbâncias médias.		
	F3	F4	
0			
24	1,547	1,605	
48	1,394	1,603	
72	1,343	1,552	
96	1,332	1,513	
120	1,273	1,448	
144	1,273	1,421	
168	1,237	1,395	
192	1,230	1,354	
216	1,181	1,331	
240	1,170	1,309	
274	1,099	1,208	
288	1,080	1,176	

Curva padrão para peptona-



Concentração	Absorbância
0,2	0,014
0,3	0,017
0,5	0,021
1	0,05
1,5	0,061
2	0,082
3	0,123

Regressão linear	
$Y = A + B \cdot X$	
A = 0,0521	0,00208
B = 0,039	0,00135
R = 0,99701	
Sd = 0,0034	N=7 P = 9,401E-7

Metano produzido e proteína degradada (**Biureto**) - Frascos 3 e 4 do segundo teste com peptona.

Tempo (horas)	Peptona (g/L)		Metano (mmoles/L)	
	F3	F4	F3	F4
0			0	0
24	2,9	3,3	0,28	0,21
48	2,1	1,6	0,68	0,89
72	1,5	1,4	-	--
96	1,4	1,4		
120	1,2	1,4	3,04	7,62
144	0,9	0,9	5,59	5,43
168	0,9	1,3	5,5	5,81
192	1,1	1,5	8,79	7,52
216	1	1,5	12,51	11,32
288	1,3	1,4	26,72	24,46
336	1,2	1,4	23,8	29,1
480			44,37	41,57
504			39,06	33,42
552			40,05	27,52

Metano produzido e proteína degradada (**Lowry**)- Frascos 3 e 4.

Tempo (horas)	Peptona (g/L)		Metano (mmoles/L)	
	F3	F4	F3	F4
0			0	0
24	4,73	4,92	0,28	0,21
48	4,22	4,91	0,68	0,89
72	4,05	4,86	-	--
96	4,01	4,64		
120	3,81	4,39	3,04	7,62
144	3,81	4,33	5,59	5,43
168	3,7	4,22	5,5	5,81
192	3,68	4,11	8,79	7,52
216	3,51	4	12,51	11,32
288	3,47	3,91	26,72	24,46
336	3,23	3,59	23,8	29,1
480	3,17	3,42	44,37	41,57
504			39,06	33,42
552			40,05	27,52

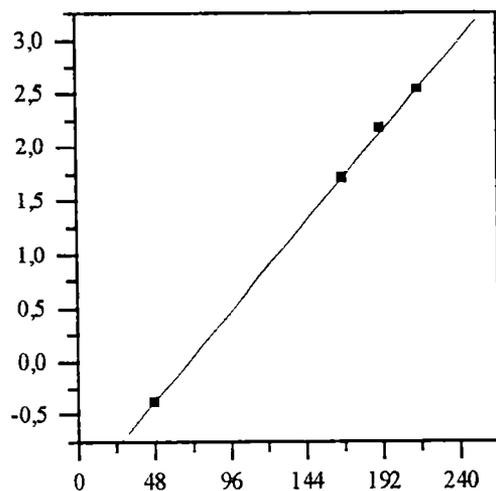
## Produção de metano (mmoles /L) (Frasco 3)

Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)
0	0
24	0,28
48	0,68
72	-
96	
120	3,04
144	5,59
168	5,5
192	8,79
216	12,51
288	26,72
336	23,8
480	44,37
504	39,06
552	40,05

## Produção de metano (mmoles /L) (Frasco 4)

Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)
0	0
24	0,21
48	0,89
72	
96	
120	7,62
144	5,43
168	5,81
192	7,52
216	11,32
288	24,46
336	29,1
480	41,57
504	33,42
552	27,52

## Cinética de formação de metano para o 2º teste com peptona

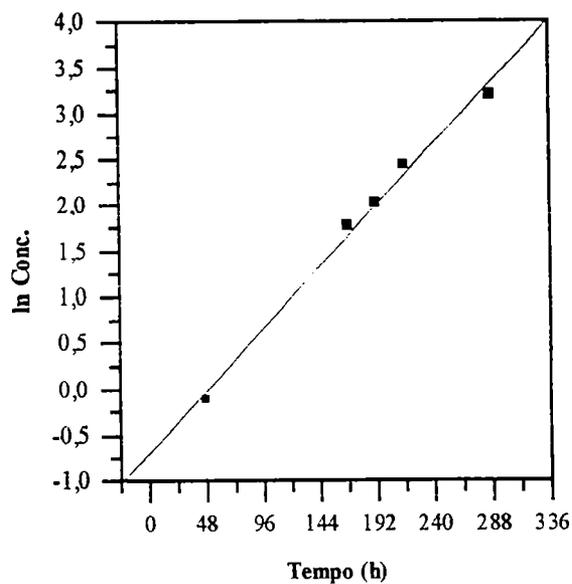


E2-F3 - pep-met

Linear Regression

$$Y = A + B \cdot X$$

Parameter	Value	Error
A	-1,22138	0,04572
B	0,01747	2,7074E-4
R	0,99976	SD N P
	0,034	4 2,39972E-4



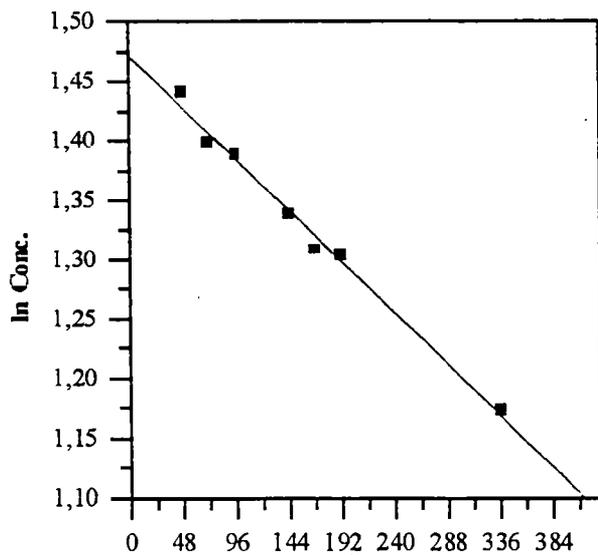
E2-F4 - pep-met

Linear Regression

$$Y = A + B \cdot X$$

Parameter	Value	Error
A	-0,69779	0,14382
B	0,01399	7,24581E-4
R	0,996	SD N P
	0,12684	5 3,03456E-4

## Cinética da degradação de peptona -2º teste para peptona



E2-F3 -peptona

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

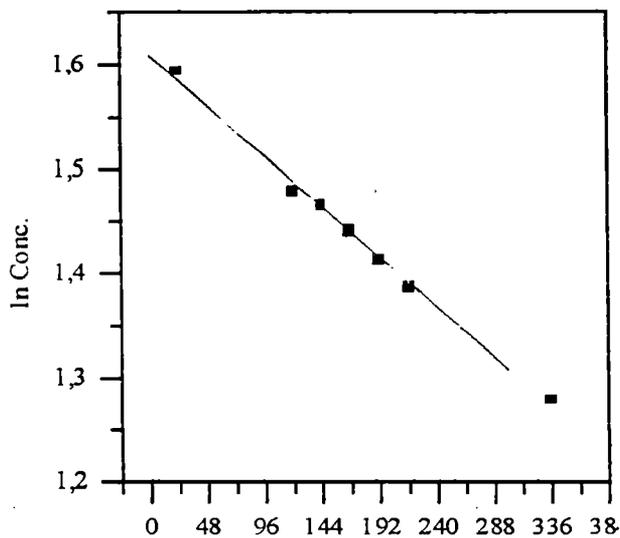
Parameter Value Error

A 1,4716 0,00663

B -9,02199E-4 3,77688E-5

R SD N P

-0,99565 0,00895 7 &lt;0.0001



E2-f4 -peptona

Linear Regression:

$$Y = A + B * X$$

Parameter Value Error

A 1,60867 0,00579

B -0,001 3,00333E-5

R SD N P

-0,99777 0,00702 7 &lt;0.0001

## ANEXO E

Tabelas do segundo teste com gelatina (Biureto e Lowry)

**Produção de metano. Teste 2 - Gelatina (frasco 2)**

Ensaio 1		Gelatina		Y = A+ BX		A= 47,65468
Frasco 2*						B= 1702,12791
Horas	Área	b	Hs	Hs + b	uMol /L	
0	0	0	0	0	0	0
24	655	0,36	117,39	63,08	0,383	
48	740	0,41	133,82	134,18	0,814	
72	762	0,42	138,07	138,84	0,843	
96	860	0,48	157,02	158,20	0,960	
168	637	0,35	113,91	115,57	0,702	
192	827	0,46	150,64	152,64	0,927	
216	850	0,47	155,08	157,55	0,956	
240	1198	0,68	222,35	225,28	1,367	
264	1219	0,69	226,41	230,02	1,396	
336	2188	1,26	413,70	418,00	2,537	
384	5784	3,37	1108,76	1114,32	6,764	
528	17647	10,34	3401,73	3410,66	20,703	
552	17896	10,49	3449,86	3468,77	21,055	
600	17000	9,96	3276,68	3305,67	20,065	

**Produção de metano. Teste 2 - Gelatina (frasco 3)**

Ensaio 1		Gelatina		Y = A+ BX		A= 47,65468
Frasco 3*						B= 1702,12791
Horas	Área	b	Hs	Hs + b	uMol /L	
0	0	0	0	0	0	0
24	11	-0,02	-7,08	63,08	0,383	
48	510	0,27	89,37	89,34	0,542	
72	744	0,41	134,59	134,84	0,819	
96	681	0,37	122,42	123,08	0,747	
168	1329	0,75	247,67	248,70	1,510	
192	1642	0,94	308,17	309,95	1,881	
216	1344	0,76	250,57	253,29	1,537	
240	1592	0,91	298,50	301,98	1,833	
264	2026	1,16	382,39	386,78	2,348	
336	3716	2,16	709,05	714,60	4,338	
384	4838	2,81	925,91	933,62	5,667	
528	17336	10,16	3341,62	3352,14	20,348	
552	44321	26,01	8557,48	8578,16	52,069	
600	25696	15,07	4957,50	5004,21	30,376	

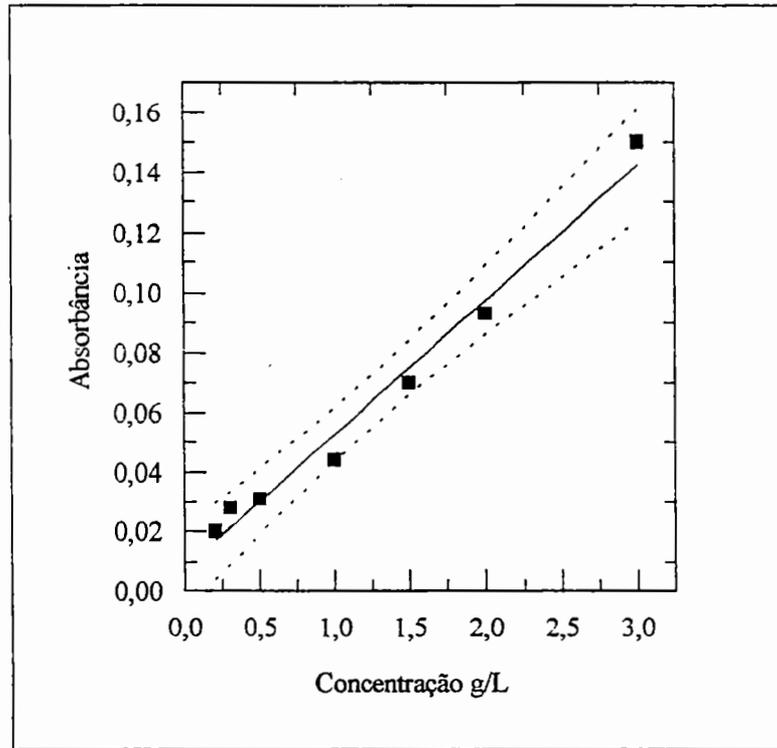
**Valores das absorvâncias de proteína (método do Biureto).**

Ensaio 1		Biureto	
Gelatina		Y= A+BX	
		A=0,00772 B=0,04493	
Horas	Absorbâncias médias		
	F2	F3	
0	0	0	
24	0,096	0,12	
48	0,084	0,065	
72	0,068	0,062	
96	0,052	0,059	
120	0,049	0,041	
144	0,043	0,031	
168	0,031	0,029	
192	0,026	0,023	
216	0,028	0,049	
240	0,029	0,039	
264	0,02	0,042	
288	0,033	0,039	
312	0,03	0,042	
336	0,034	0,046	

**Valores das absorvâncias de proteína (método de Lowry).**

Ensaio 1		Lowry	
Gelatina		y = ( x-0,12618)/0, 32797	
Horas	Absorbâncias médias		
	F2	F3	
24	1,416	1,579	
48	1,415	1,570	
72	1,37	1,460	
96	1,341	1,431	
144	1,329	1,430	
168	1,322	1,387	
192	1,318	1,291	
216	1,316	1,286	
240	1,274	1,275	
272	1,258	1,263	
296	1,245	1,247	
320	1,218	1,223	
344	1,21	1,219	
368	1,201	1,208	

## Curva padrão de gelatina- Biureto

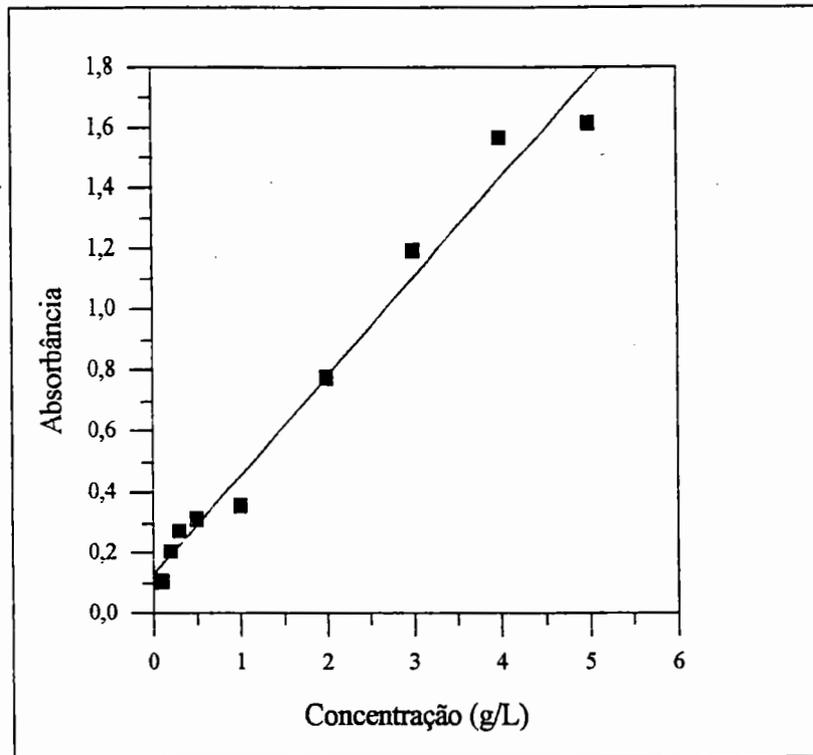


Concentração (g/l)	Absorbância
0,2	0,02
0,3	0,028
0,5	0,031
1	0,044
1,5	0,07
2	0,093
3	0,15

Regressão linear		
$Y = A + B * X$		
Param	Value	sd
A	0,00772	0,00421
B	0,04493	0,00273
R = 0,99087		
SD = 0,00687, N = 7		
P = 0,00002		



## Curva padrão de gelatina- Lowry



Concentração. (g/L)	Absorbância
0,1	0,106
0,2	0,203
0,3	0,274
0,5	0,313
1	0,353
2	0,776
3	1,192
4	1,568
5	1,631

Regressão linear			
$Y = A + B * X$			
Parameter	Value	Error	
A	0,12618	0,04379	
B	0,32797	0,01765	
R	SD	N	P
0,99001	0,09102	9	<0.0001

**Proteína degradada e metano produzido (frascos 2 e 3)(Biureto)**

Tempo (horas)	Gelatina (g/L)		Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)	
	F2	F3		F2	F3
0			0	0	0
24	2,5	1,96	24	0,38	0,38
48	1,3	1,7	48	0,81	0,54
72	1,2	1,34	72	0,84	0,82
96	1,1	0,99	96	0,96	0,75
168	0,5	0,52	168	0,7	1,51
192	0,3	0,41	192	0,93	1,88
216	0,9	0,45	216	0,96	1,54
240	0,7	0,47	240	1,37	1,83
264	0,8	0,27	264	1,4	2,25
336	0,9	0,58	336	2,54	4,34
			384	6,76	5,67
			528	20,7	20,35
			552	21,06	52,07
			600	20,1	30,38

**Proteína degradada e metano produzido Frascos 2 e 3)(Lowry)**

Tempo (horas)	Gelatina (g/L)		Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)	
	F2	F3		F2	F3
0			0	0	0
24	3,9	4,4	24	0,38	0,38
48	3,9	4,4	48	0,81	0,54
72	3,8	4,1	72	0,84	0,82
96	3,7	4	96	0,96	0,75
144	3,7	4	168	0,7	1,51
168	3,7	3,8	192	0,93	1,88
192	3,6	3,6	216	0,96	1,54
216	3,6	3,5	240	1,37	1,83
240	3,5	3,5	264	1,4	2,25
272	3,5	3,5	336	2,54	4,34
296	3,4	3,4	384	6,76	5,67
320	3,3	3,3	528	20,7	20,35
344	3,3	3,3	552	21,06	52,07
368	3,3	3,3	600	20,1	30,38

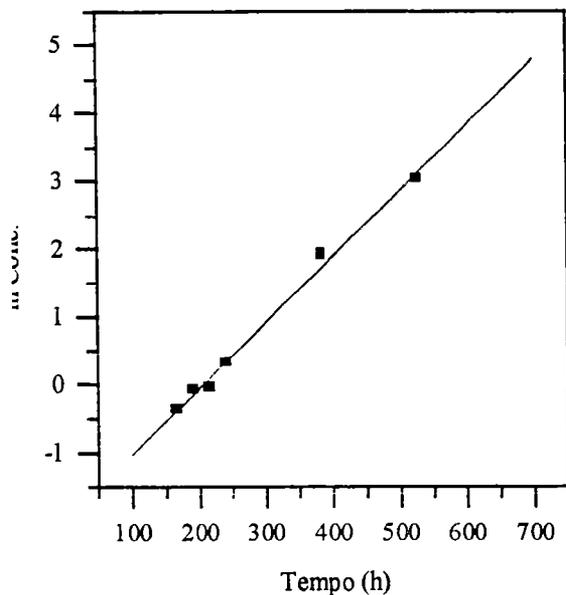
**Produção de metano em mmoles/L****Frasco 2**

Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)
0	0
24	0,38
48	0,81
72	0,84
96	0,96
168	0,7
192	0,93
216	0,96
240	1,37
264	1,4
336	2,54
384	6,76
528	20,7
552	21,06
600	20,1

**Produção de metano em mmoles/L****Frasco 3**

Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)
0	0
24	0,38
48	0,54
72	0,82
96	0,75
168	1,51
192	1,88
216	1,54
240	1,83
264	2,25
336	4,34
384	5,67
528	20,35
552	52,07
600	30,38

## Cinética da produção de metano (frascos 2 e 3) no 2º teste com gelatina



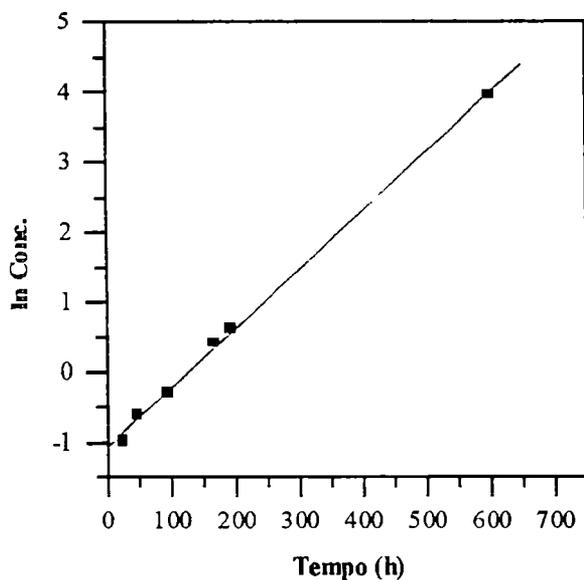
E2 - F2 - gel - met

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter Value Error

A	-2,0376	0,14618
B	0,00973	4,74177E-4
R	SD	N P
	0,99412	0,14875 7 <0.0001



E2 - F3 - gel - metano

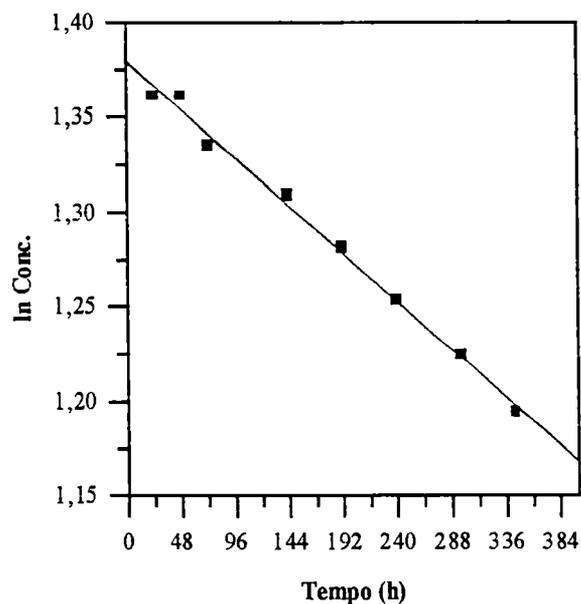
Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter Value Error

A	-1,06082	0,04533
B	0,00841	1,67914E-4
R	SD	N P
	0,9992	0,07967 6 <0.0001

## Cinética da degradação de proteína.(frascos 2 e 3 -Lowry)

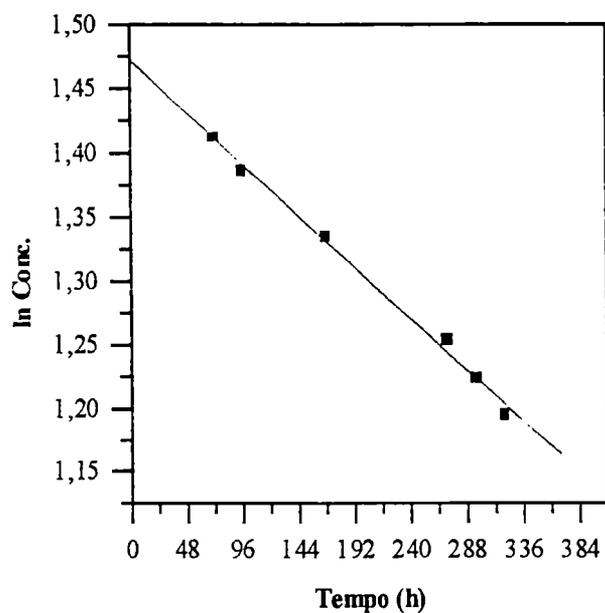


E2- F2- gelatina

Linear Regression :

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	1,37931	0,00344
B	-5,27836E-4	1,69422E-5
R	SD	N P
	-0,99692	0,0053 8 <0.0001



E2 - F3 - gelatina

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	1,47104	0,0092
B	-8,4809E-4	4,03121E-5
R	SD	N P
	-0,9944	0,00971 7 <0.0001

ANEXO E

tabelas de concentração de gelatina pelo biureto

Ensaio 1		Biureto	
Frasco 2		Gelatina	
		$[x] = (\text{abs.} - 0,00772)/0,04493$	
Tempo horas	Absorbâncias médias	Concentração (g/L)	
12	0,101	2,08	
18	0,107	2,21	
24	0,108	2,22	
30	0,034	0,58	
36	0,034	0,58	
42	0,034	0,57	
48	0,058	1,12	
54	0,040	0,72	
60	0,027	0,42	
66	0,019	0,25	
72	0,016	0,18	
78	0,048	0,89	
84	0,027	0,42	
90	0,029	0,47	
102	0,043	0,79	
120	0,028	0,45	
150	0,024	0,35	
198	0,073	1,44	
242	0,085	1,71	
266	0,083	1,66	
314	0,091	1,85	
334	0,086	1,74	
358	0,102	2,10	
382	0,111	2,30	
406	0,09	1,83	

Ensaio 1		Biureto
Frasco 3	Gelatina	$[x] = (\text{abs.} - 0,00772)/0,04493$
Horas	Absorb. média	[ X ]
12	0,115	2,4
18	0,109	2,3
24	0,114	2,4
30	0,119	2,5
36	0,115	2,4
42	0,107	2,2
48	0,092	1,9
54	0,063	1,2
60	0,090	1,8
66	0,074	1,5
72	0,033	0,6
78	0,035	0,6
84	0,040	0,7
90	0,052	1,0
102	0,055	1,1
120	0,063	1,2
150	0,085	1,7
198		
242		
266		
314		
334	0,095	1,9
358	0,111	2,3
382	0,118	2,5
406	0,125	2,6

## ANEXO G

Tabelas do 3ª teste com gelatina

### Cálculo da produção de metano (frascos 2)

Ensaio 1 Frasco 2*	Gelatina	Teste 3	X= ( Y-47,65468)/1702,12791		
Horas	Área	b	Hs	Hs + b	µmoles /L
0	0	0	0	0	0
24	374	0,19	63,08	63,08	383
48	386	0,20	65,40	65,59	398
72	456	0,24	78,93	79,32	481
96	350	0,18	58,44	59,07	359
168	1227	0,69	227,95	228,76	1389
192	1210	0,68	224,67	226,17	1373
240	1078	0,61	199,15	201,34	1222
264	1576	0,90	295,41	298,20	1810
336	2888	1,67	549,00	552,69	3355
360	7442	4,34	1429,23	1434,59	8708
384	9921	5,80	1908,39	1918,09	11643
408	9931	5,81	1910,33	1925,83	11690
432	10469	6,12	2014,32	2035,62	12356
576	22056	12,93	4253,94	4281,37	25988
600	36964	21,69	7135,47	7175,83	43557
744	39547	23,21	7634,73	7696,78	46719
840	38306	22,48	7394,86	7480,11	45404

### Cálculo da produção de metano (frascos 3)

Ensaio 1 Frasco 3*	Gelatina	X= ( Y-47,65468)/1702,12791			
horas	área	b	Hs	Hs+ b	µmoles /L
0	0	0	0	0	0
24	690	0,38	124,16	124,16	754
48	550	0,30	97,10	97,47	592
72	440	0,23	75,84	76,51	464
96	584	0,32	103,67	104,57	635
168	705	0,39	127,06	128,27	779
192	876	0,49	160,11	161,71	982
240	1198	0,68	222,35	224,44	1362
264	1528	0,87	286,13	288,90	1754
336	2677	1,54	508,22	511,86	3107
360	3885	2,25	741,71	746,89	4534
384	4399	2,56	841,06	848,50	5150
408	5128	2,98	981,97	991,96	6021
432	6868	4,01	1318,29	1331,26	8081
576	24824	14,56	4788,96	4805,94	29172
600	27599	16,19	5325,33	5356,87	32516
744	31560	18,51	6090,94	6138,67	37262
840	25547	14,98	4928,70	4994,94	30319

### Valores da absorbância de proteínas( frascos 2 e 3)

Ensaio 1		Gelatina	
Teste 3		$x = (y - 0,126180) / 0,32797$	
Horas	Absorbâncias médias		
	F2	F3	
12	1,461	1,567	
18	1,448	1,434	
24	1,426	1,43	
30	0,903	1,431	
36	0,716	1,428	
42	0,654	1,427	
62	0,592	1,327	
72	0,552	1,224	
96	0,416	0,96	
144	0,415	0,807	
168	0,413	0,73	
192	0,37	0,395	
216	0,341	0,284	
272	0,271	0,243	
368	0,199	0,215	

### Metano produzido e gelatina degradada (frascos 2 e 3)

Horas	Gelatina(g/L)		Horas	Metano (mmoles/L)	
	F2	F3		F2	F3
0			0	0	0
12	4.1	4.4	24	0.76.	0.38
18	4	4	48	0.59	0.4
24	4	4	72	0.46	0.48
30	2.4	4	96	0.63	0.36
36	1.8	4	168	0.78	1.39
42	1.6	4	192	0.98	1.37
66	1.4	3.7	240	1.36	1.22
72	1.3	3.3	264	1.75	1.81
96	0.9	2.5	336	3.11	3.36
144	0.9	2.1	360	4.53	8.71
168	0.9	1.8	384	6.15	11.64
192	0.7	0.8	408	6.02	11.69
216	0.7	0.5	432	8.08	12.36
272	0.4	0.4	576	29.17	26.99
368	0.2	0.3	600	32.52	43.56
			744	37.26	46.72
			840	30.32	46.4

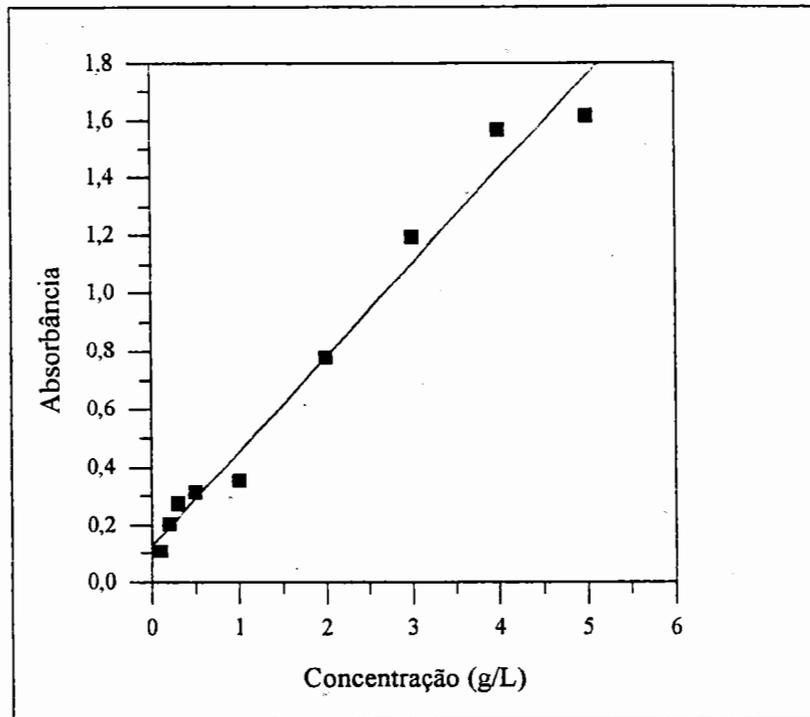
**Produção de metano em mmoles****Frasco 2**

Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)
0	0
24	0.76
48	0.59
72	0.46
96	0.63
168	0.78
192	0.98
240	1.36
264	1.75
336	3.11
360	4.53
384	6.15
408	6.02
432	8.08
576	29.17
600	32.52
744	37.26
840	30.32

**Produção de metano em mmoles****Frasco 3**

Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)
0	0
24	0.38
48	0.4
72	0.48
96	0.36
168	1.39
192	1.37
240	1.22
264	1.81
336	3.36
360	8.71
384	11.64
408	11.69
432	12.36
576	26.99
600	43.56
744	46.72
840	46.4

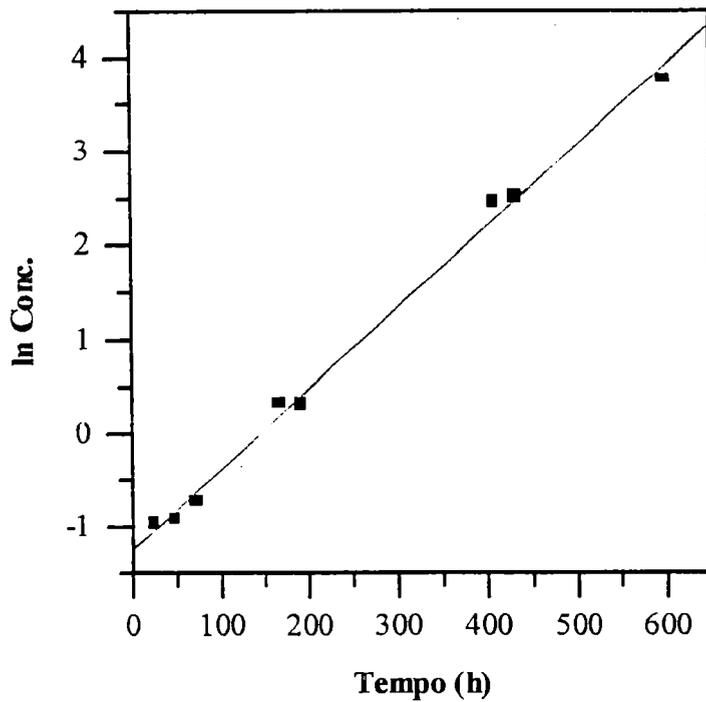
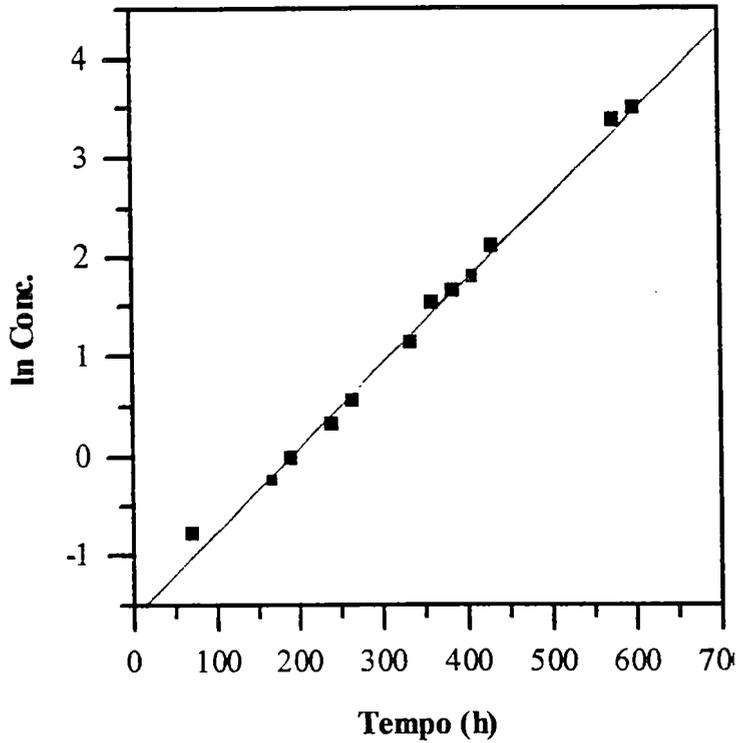
## .Curva padrão para gelatina



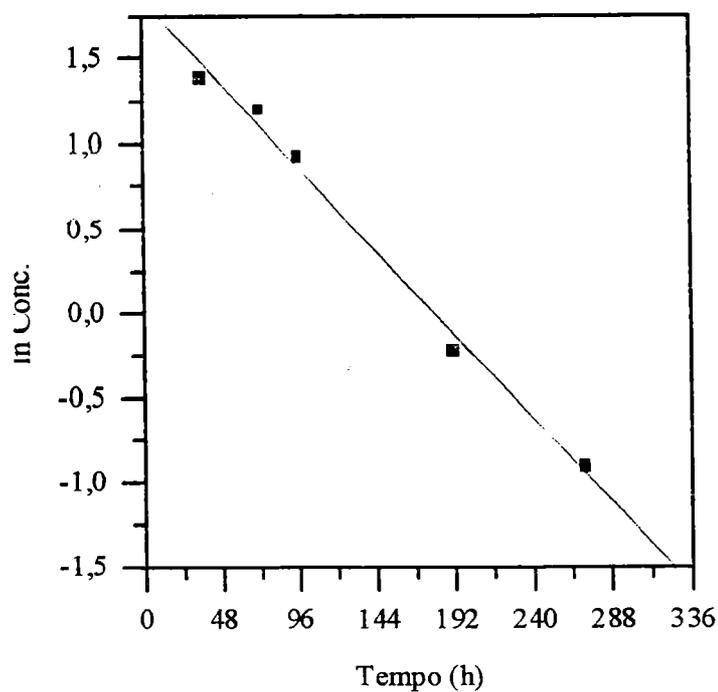
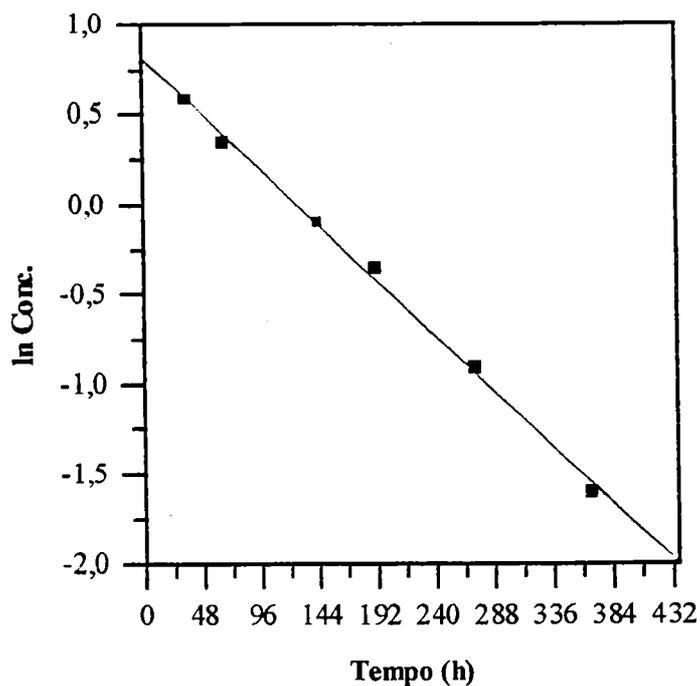
Concentração.	Absorbância
0,1	0,106
0,2	0,203
0,3	0,274
0,5	0,313
1	0,353
2	0,776
3	1,192
4	1,568
5	1,631

Regressão linear			
$Y = A + B * X$			
Parameter	Value	Error	
A	0,12618	0,04379	
B	0,32797	0,01765	
R	SD	N	P
0,99001	0,09102	9	<0.0001

## Cinética da produção de metano (frascos 2 e 3)



## Cinética da degradação de gelatina( frascos 2 e 3).



**ANEXO H**  
**Tabelas do 4º teste com gelatina**

### Cálculo da produção de metano (frasco 3)- Gelatina

Ensaio 1		Gelatina		Teste 4	
Frasco 3					$X = (Y - 47,65468) / 1702,12791$
Horas	área	b	Hs	Hs + b	mmoles /L
0	0	0	0	0	0
24	217	0,10	32,75	63,08	0,38
48	710	0,39	128,01	128,11	0,78
72	1000	0,56	184,09	184,58	1,12
96	1341	0,76	249,99	251,04	1,52
144	1039	0,58	191,61	193,41	1,17
216	1210	0,68	224,59	226,88	1,37
240	1898	1,09	357,63	360,22	2,18
336	2559	1,48	485,32	488,43	2,96

### Valores das absorbâncias da proteína.

Gelatina		Teste 4	
Lowry		$x = (y - 0,12618) / 0,32797$	
Horas	Absorbância média		
0			
12	1,1780		
24	1,1225		
30	0,4580		
36	0,3105		
42	0,2735		
48	0,2455		
72	0,2055		

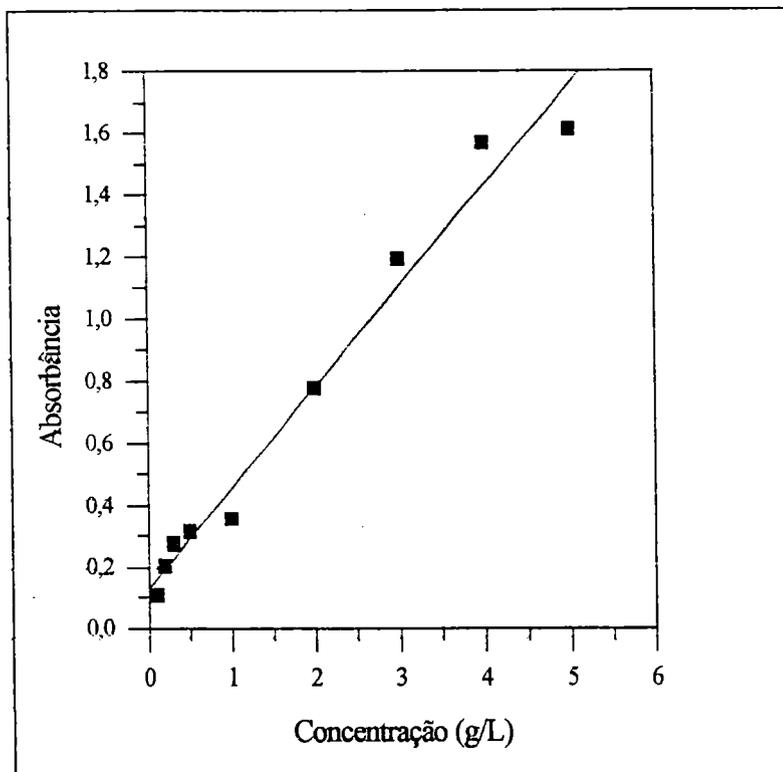
## Metano produzido e proteína degradada frasco -teste 4 )-gelatina

Frasco 3	Gelatina	Metano
Lowry	$x = (y - 0,12618) / 0,32797$	$X = (Y - 47,65468) / 1702,12791$
Horas	Proteína (g/L)	Metano (mmoles/L)
0		0
12	3,36	0,38
24	3,09	0,78
30	1,03	1,12
36	0,57	1,52
42	0,46	1,17
48	0,37	1,37
72	0,25	2,18

## Produção de metano em mmoles

Tempo (horas)	Metano (mmoles/L)
0	0
24	0,38
48	0,78
72	1,12
96	1,52
144	1,17
216	1,37
240	2,18
336	2,96

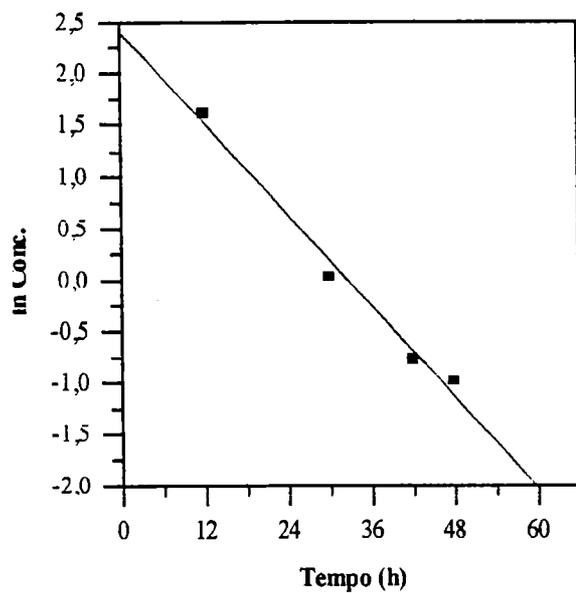
## Curva padrão de gelatina



Concentração.	Absorbância
0,1	0,106
0,2	0,203
0,3	0,274
0,5	0,313
1	0,353
2	0,776
3	1,192
4	1,568
5	1,631

Regressão linear			
$Y = A + B * X$			
Parameter	Value	Error	
A	0,12618	0,04379	
B	0,32797	0,01765	
R	SD	N	P
0,99001	0,09102	9	<0.0001

## Cinética da produção de metano e da degradação de proteína

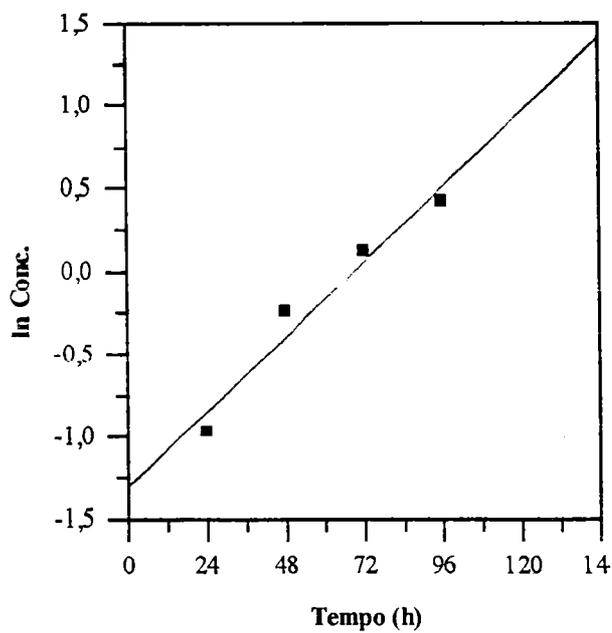


E4 - F3-Gelatina

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	2,40228	0,22768
B	-0,07379	0,00637
R	SD	N P
	0,99263	0,17511 4 0,0073



E4 -F3- GEL-METANO

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	-1,3012	0,18838
B	0,01884	0,00287
R	SD	N P
	0,97762	0,15381 4 0,02238

ANEXO H  
Curva padrão para determinação de proteínas -ensaio 2

## Curva padrão para dosagem de proteínas (método de Lowry).

Concentração de gelatina (µg/100 µl)	Densidade Ótica (DO) 660nm	DO* média	DO* líquida	Fator Concentração/Absorbância
0	0,025	0,024		
0	0,023		0,024	
25	0,049	0,052		
25	0,054		0,028	892,86
50	0,075	0,078		
50	0,080		0,054	925,92
80	0,101	0,105		
80	0,108		0,081	987,65
100	0,130	0,132		
100	0,133		0,108	925,92
200	0,207	0,209		
200	0,210		0,108	1081,08
				média =962,69
				Equivalentes de gelatina
Lodo - 50*	0,062	0,061	0,037	35,90
Lodo - 50	0,059			
L+ M- 100**	0,048	0,049	0,025	24,26
L+ M- 100	0,050			
T0- 100***	0,190	0,188	0,164	158,65
T0- 100	0,185			

\*DO= densidade ótica

\*Lodo - 50 = Foi determinada a concentração de gelatina (equivalentes de gelatina) em 50µl do lodo

L+ M- 100\*\* = foram utilizados 100µl de lodo granulado + meio mineral mínimo (Zinder)

T0-100\*\*\* = foram utilizados 100µl de meio de cultura inoculado com lodo granulado mais gelatina no tempo zero

ANEXO I  
Tabelas de degradação de proteínas e curvas padrão  
Cálculos das taxas de degradação de proteína

## Leitura das absorvâncias da proteína

Concentração = 2,5 g/L

Tempo (horas)	Absorbâncias	Médias		Tempo (horas)	Absorbâncias	Médias
0	0,862 0,931 0,889 0,902 0,914	0,8996		24	0,974 0,943 0,988 0,938 0,997	0,968
6	0,82 0,775 0,751 0,763 0,559	0,7336		30	0,729 0,719 0,716 0,729 0,73	0,726
12	0,909 0,882 0,901 0,921 0,957	0,914		36	0,72 0,682 0,697 0,742 0,703	0,708
18	1,076 1,046 0,982 1,033 1,079	1,0432		48	0,696 0,663 0,687 0,721 0,616	0,6566
				192	0,18 0,201 0,193 0,191 0,187	0,153

## Leitura das absorbâncias da proteína

Concentração = 5 g/L

Tempo (Horas)	Absorbâncias	Médias		Tempo (horas)	Absorbâncias	Médias
0	1,263 1,171 1,137 1,109 1,233	1,183		24	1,148 1,208 0,924 1,328 1,036	1,1288
6	1,112 0,912 1,308 1,195 1,432	1,1918		30	1,149 1,273 1,178 1,172 1,18	1,19
12	0,99 1,046 1,927 1,13 0,937	1,206		36	0,949 1,055 1,366 0,986 1,019	1,075
18	1,007 0,914 1,01 1,093 0,987	1,0022		48	0,932 1,015 1,071 0,987 0,957	0,9906
				192	0,56 0,576 0,579 0,542 0,577	0,565

## Leitura das absorbâncias da proteína.

Concentração = 10 g/L

Tempo (Horas)	Absorbâncias	Médias		Tempo (horas)	Absorbâncias.	Médias
0	1,531 1,5 1,488 1,548 1,549	1,5052		24	1,304 1,381 1,43 1,471 1,419	1,401
6	1,473 1,476 1,454 1,428 1,503	1,4668		30	1,131 1,184 1,09 1,193 1,133	1,1462
12	1,536 1,578 1,574 1,539 1,603	1,566		36	1,539 1,148 1,136 1,01 1,037	1,174
18	1,034 1,278 1,277 1,38 1,346	1,263		48	1,411 1,063 1,061 1,441 1,171	1,2294
				192	0,751 0,776 0,736 0,801 0,72	0,7568

Leitura das absorbâncias da proteína.

Concentração = 15 g/L

Tempo (Horas)	Absorbâncias	Médias		Tempo (horas)	Absorbâncias.	Médias
0	1,193 1,882 1,927 1,926 1,957	1,3856		24	1,792 1,357 1,397 1,304 1,703	1,5106
6	1,889 1,852 1,875 1,859 1,94	1,883		30	1,407 1,507 1,466 1,542 1,546	1,4936
12	1,853 1,929 1,802 1,729	1,828		36	1,32 1,395 1,342 1,28 1,365	1,340
18	1,195 1,179 1,257 1,114 1,123	1,1736		48	1,21 1,285 1,264 1,201 1,284	1,249
				192	1,032 1,009 1,071 1,068 1,071	1,0502

## Cálculo da concentração de gelatina

Amostra = 2,5 g/L		
$Y = A + B \cdot X$ $A = 0,09343$ $B = 0,47649$		
Tempo (horas)	Absorbância (médias)	Concentração (g/L)
0	1,2390	2,40
6	1,2190	2,36
12	0,9520	1,80
18	0,9580	1,81
24	0,9710	1,84
30	0,9800	1,86
36	0,7920	1,47
48	0,6980	1,27
192	0,1530	0,13

## Cálculo da concentração de gelatina

Amostra = 5 g/L		
$Y = A + B \cdot X$ $A = 0,1015$ $B = 0,40127$		
Tempo (horas)	Absorbância (médias)	Concentração (g/L)
0	1,98	4,68
6	1,92	4,53
12	1,58	3,68
18	1,34	3,09
24	1,12	2,54
30	1,19	2,71
36	1,07	2,41
48	0,99	2,21
192	0,57	1,17

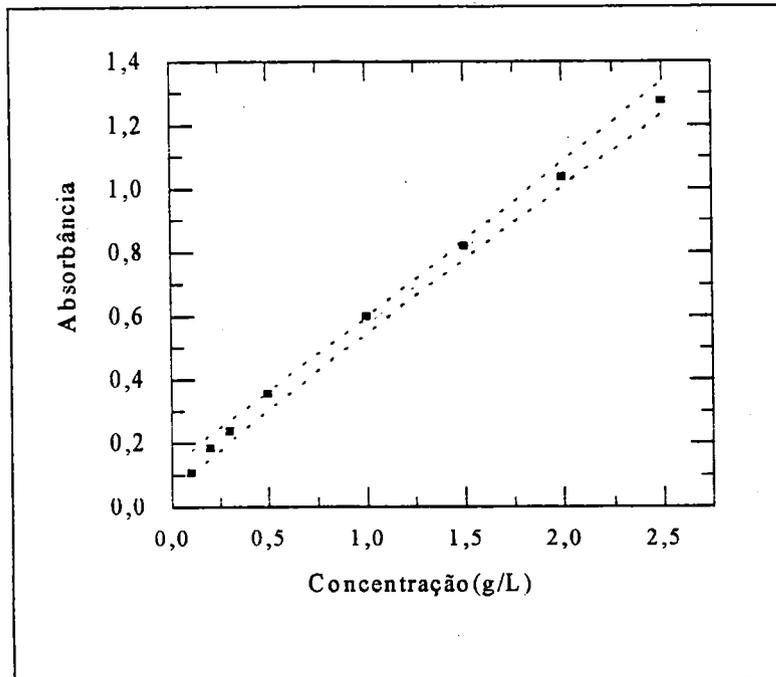
## Cálculo da concentração de gelatina

Amostra = 10g/L		
Y= A+ B*X      A=0,53664 B = 0,12059		
Tempo (horas)	Absorbância (médias)	Concentração (g/L)
0	1,505	8,03
6	1,467	7,71
12	1,566	8,54
18	1,463	7,68
24	1,401	7,17
30	1,146	5,05
36	1,174	5,29
48	1,123	4,86
192	0,757	1,83

## Cálculo da concentração de gelatina

Amostra = 15g/L		
Y= A+ B*X      A=0,53664 B = 0,12059		
Tempo (horas)	Absorbância (médias)	Concentração (g/L)
0	1,921	11,48
6	1,883	11,16
12	1,828	10,71
18	1,6336	9,39
24	1,5106	8,08
30	1,4936	7,94
36	1,340	6,66
48	1,249	5,91
192	1,0502	4,27

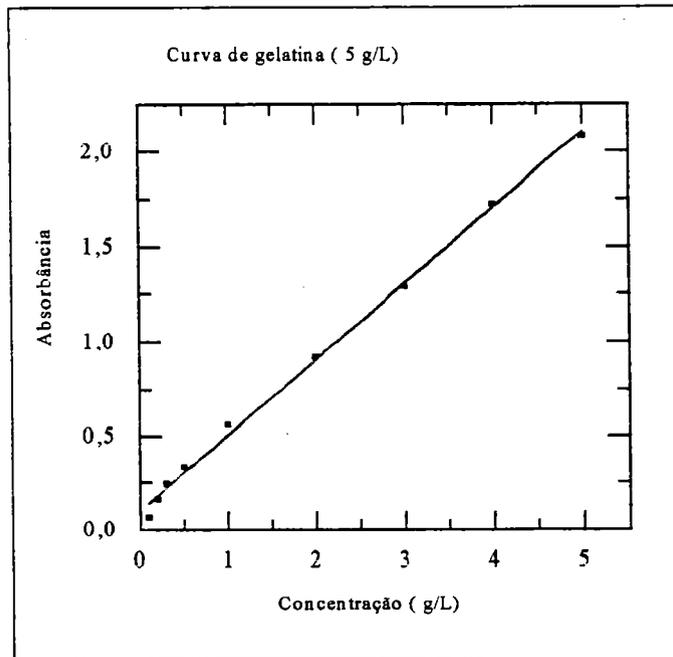
Curva padrão para 2,5 g/L de gelatina



Concentração (g/L)	Absorbância.
0,1	0,107
0,2	0,1877
0,3	0,234
0,5	0,357
1	0,598
1,5	0,819
2	1,035
2,5	1,273

Regressão linear		
$Y = A + B * X$		
Param	Value	sd
A	0,09343	0,01236
B	0,47649	0,00938
R = 0,99884		
SD = 0,02237, N = 8		
P = 3,9027E-9		

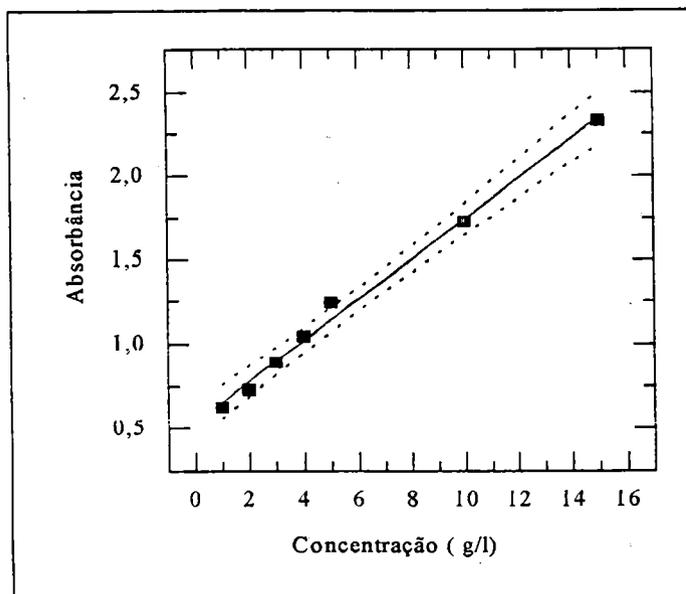
## Curva padrão para 5 g/L de gelatina



Concentração (g/L)	Absorbância
0,1	0,066
0,2	0,165
0,3	0,242
0,5	0,331
1	0,556
2	0,915
3	1,287
4	1,724
5	2,088

Regressão linear		
$Y = A + B * X$		
Param	Value	sd
A	0,1015	0,01927
B	0,40127	0,00777
R = 0,99869		
SD = 0,04004, N = 9		
P = 2,6633E-10		

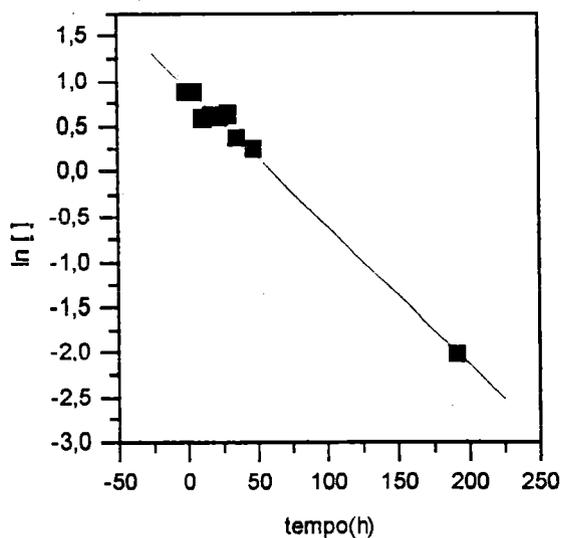
. Curva padrão para 15 g/L de gelatina



Concentração (g/L)	Absorbância
1	0,625
2	0,729
3	0,887
4	1,045
5	1,24
10	1,729
15	2,325

Regressão linear		
$Y = A + B * X$		
Param	Value	sd
A =	0,53664	0,0327
B =	0,12059	0,00444
R = 0,99663		
SD = 0,05461, N = 7		
P = 1,2634E-6		

**Cinética da degradação de proteína para 2,5 e 5,0 g/L de gelatina-ensaio 3**

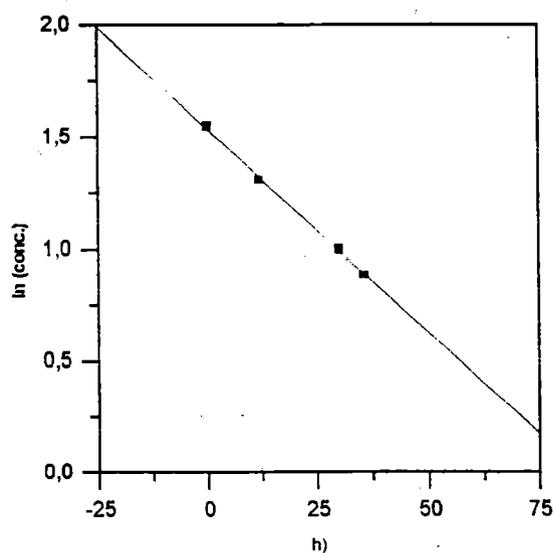


**E 3 -gelatina = 2,5 g/L**

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter	value	Error
A	0,92032	0,03795
B	-0,01527	5,52673E-4
R	SD	N P
	-0,99545	0,09175 9 <0.0001

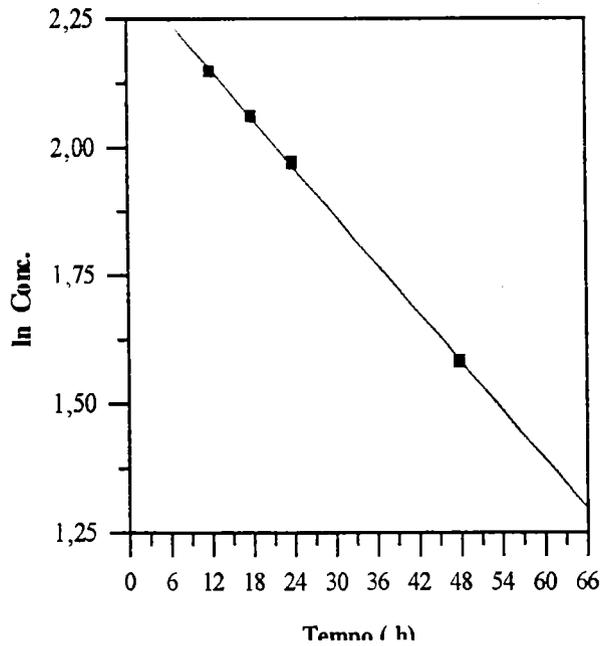


**E3- Gelatina -5g/L**

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	1,53501	0,01062
B	-0,01817	4,38913E-4
R	SD	N P
	-0,99942	0,01256 4 5,82836E-4



**E3-gelatina -10 g/L**

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

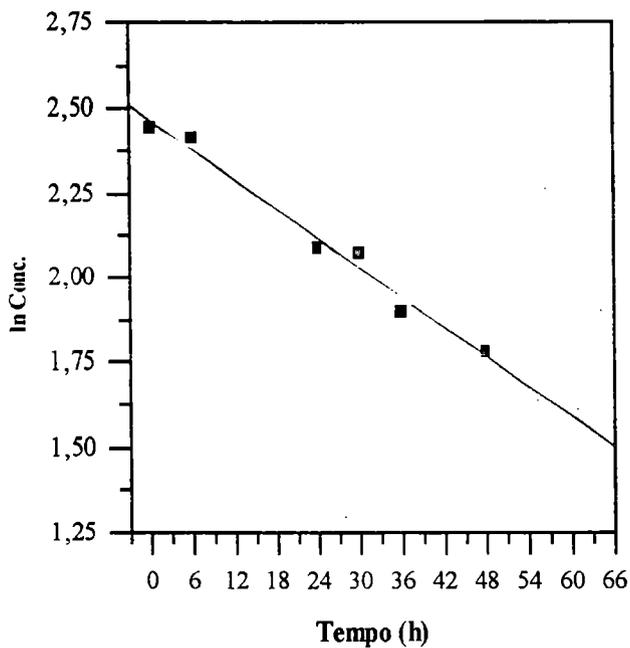
Parameter Value Error

A 2,34148 0,00836

B -0,01578 2,88814E-4

R SD N P

-0,99967 0,00789 4 3,34706E-4



**E3-gelatina-15 g/L**

Linear Regression

$$Y = A + B * X$$

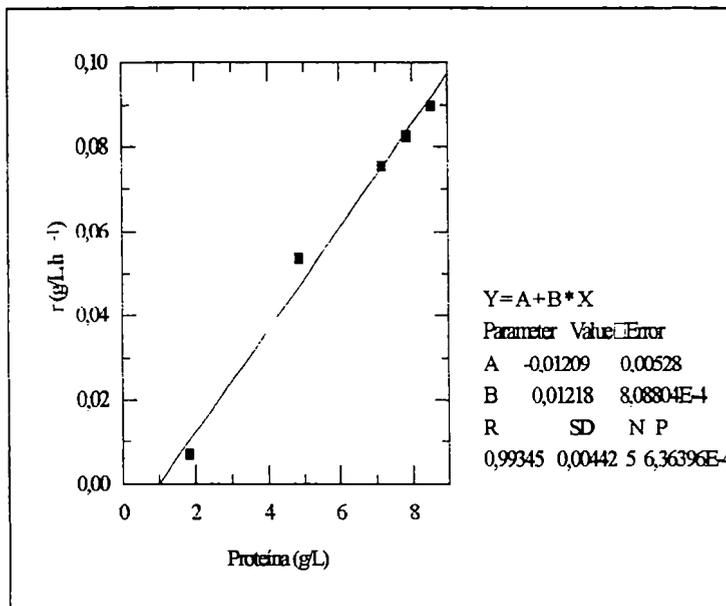
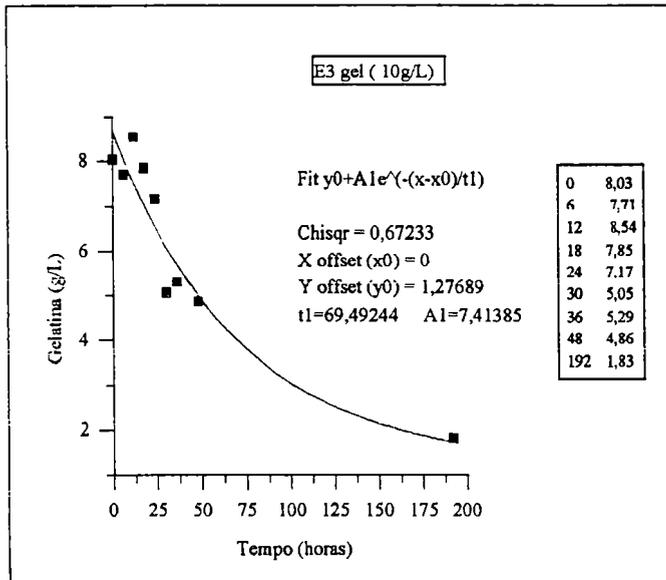
Parameter Value Error

A 2,46476 0,02892

B -0,01459 9,90657E-4

R SD N P

-0,99091 0,04031 6 1,23566E-4



## ANEXO I

Tabela de cálculo de proteína pelo Micro-Kjeldahl - Ensaio 2

## Curva de proteína para amostras retiradas nos diferentes períodos de tempo

TEMPO (H)	DO 660	DO MÉDIA	mg/mL
T0 T0	0,191 0,206	0,294	1,7
T6 T6	0,209 0,216	0,317	1,8
T12 T12	0,219 0,213	0,216	1,9
T18 T18	0,202 0,208	0,205	1,7
T24 T24	0,189 0,188	0,1885	1,6
T36 T36	0,086 0,086	0,086	0,6

## Nitrogênio e porcentagem de proteína calculados pelo micro-Kjeldahl

Horas	Nitrogênio em mg/100mL	Nitrogênio em 250 mL	Nitrogênio/L	% de Proteína
0	0,14	0,35	1,4	0,87
6	0,18	0,45	1,8	1,14
12	0,25	0,63	2,5	1,57
18	0,36	0,90	3,6	2,27
24	0,28	0,70	2,8	1,75
30	0,21	0,53	2,1	1,31
36	0,18	0,45	1,8	1,14
42	0,21	0,53	2,1	1,31
60	0,20	0,49	2,0	1,22
66	0,20	0,49	2,0	1,22
146	0,19	0,47	1,9	1,18

**ANEXO J****Tabelas de produção de ácidos graxos e curvas padrão**

Cálculo da concentração de ácido acético

$$Y = A + B \cdot X \quad A = 0,00053$$

$$B = 0,00189$$

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
2,5 g/L	18	0,0132	0,0165	8,45
		0,0198		
	30	0,0658	0,0687	36,07
		0,0716		
48	0,103	0,104	54,75	
	0,105			
192	2,77	2,417	1278,56	
	2,064			

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
5 g/L	18	0,0176	0,01245	6,31
		0,01245		
		0,0073		
30	0,014	0,014	0,0203	10,46
		0,014		
		0,0329		
48	0,1079	0,10545	55,51	
	0,103			

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
10g/L	18	0,0104	0,0387	20,20
		0,067		
	30	0,6165	0,59325	313,61
		0,57		
48	1,316	1,37695	728,26	
	1,4379			
192	0,8044	0,807	2133,7	
	0,8096			

Cálculo da concentração de ácido acético(contin.)

$$Y = A + B \cdot X \quad A = 0,00053$$

$$B = 0,00189$$

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
15 g/L	18	0,042 0,05 0,0768	0,06	29,49
	30	0,32 0,32 0,35	0,33	174,32
	48	2,13 2,35 2,09	2,19	1158,45
	192	0,9098 1,042 0,958	0,97	2733,81

Acético		PM=60		
gelatina	t'(horas)	mg/L	moles/L	mMoles em 250 mL
2,5 g/L/	18	8,45	0,14	0,04
	30	36,07	0,60	0,15
	48	54,75	0,91	0,23
	192	1278,56	21,31	5,33

6.0 g/L	18	6,31	0,11	0,03
	30	10,46	0,17	0,04
	48	55,51	0,93	0,23

10g/L	18	20,19	0,34	0,08
	30	313,61	5,23	1,31
	48	728,26	12,14	3,03
	192	2.133,50	35,56	8,89

15g/L	18	29,49	0,49	0,12
	30	174,32	2,91	0,73
	48	1.158,45	19,31	4,83
	192	2.733,81	45,56	11,39

## Cálculo da concentração de ácido Propiônico

$$Y = A = B * X \quad A = -0,01501$$

$$B = 0,00357$$

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
2,5g/L	48	0,0059 0,0012	0,00355	5,20
	192	1,24 1,29 1,07	1,2	340,34

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
10g/L	30	0,0034 0,01252	0,00796	6,43
	48	0,01678 0,04388	0,03033	12,70
		0,29012		
	192	0,28078 0,2918	0,28757	423,80

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
15 g/L	48	0,04412 0,0398	0,04196	15,96
	192	0,258 0,289 0,2767	0,27457	432,163

Propiônico		Pm =73		
gelatina	(horas)	(mg/L)	mMoles/L	mMoles em 250 mL
2,5g/L	48	5,20	0,07	0,02
	192	340,34	4,66	1,17

10g/L	30	6,43	0,09	0,02
	48	12,70	0,17	0,04
	192	423,80	5,81	1,45

15 g/L	48	15,96	0,22	0,05
	192	432,31	5,92	1,48

## Cálculo da concentração de ácido butírico

$$y=A+B \cdot X \quad A=0,0152$$

$$B=0,003$$

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
2,5 g/L	192	0,4664	0,453	156,07
		0,4396		

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
10 g/L	30	0,038	0,051	22,07
		0,064		
	48	0,0991	0,09715	37,45
192	0,1273	0,1497	0,1385	256,15

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
15 g/L	30	0,0142	0,01435	9,85
		0,0145		
	48	0,3469	0,03633	17,18
192	0,2173	0,2173	0,2173	413,07

Butírico		PM= 88		
gelatina	t'(horas)	mg/L	mMoles/L	mMoles em 250 mL
2,5 g/L	192	156,07	1,77	0,44

10 g/L	30	22,07	0,25	0,06
	48	37,45	0,43	0,11
	192	256,15	2,91	0,73

15 g/L	30	9,85	0,11	0,03
	48	17,18	0,20	0,05
	192	413,07	4,69	1,17

## Cálculo da concentração de ácido Isobutírico

$$Y = A + B \cdot X \quad A = -0,02644$$

$$B = 0,00472$$

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
2,5 g/L	48	0,000838 0,001976	0,001407	5,90
	192	0,2962 0,289	0,2926	67,59

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
10 g/L	30	0,0781 0,0669	0,0725	20,96
	48	0,1493 0,15088	0,15009	37,40
	192	0,033 0,035	0,034	65,05

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
15g/L	30	0,054 0,036	0,045	15,14
	48	0,2496 0,2636	0,2566	59,97
	192	0,086 0,087	0,0865	119,65

Isobutírico		PM= 88		
gelatina	t'(horas)	mg/L	mMoles/L	mMoles em 250 mL
2,5 g/L	48	5,9	0,07	0,02
	192	67,59	0,77	0,19

10 g/L	30	20,96	0,24	0,06
	48	37,40	0,43	0,11
	192	64,03	0,73	0,18

15g/L	30	15,14	0,17	0,04
	48	59,97	0,68	0,17
	192	127,49	1,45	0,36

## Cálculo da concentração de ácido Valérico

$$Y=A+B \cdot X$$

A=-0,0247  
B=0,00959

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
2,5 g/L	192	1,533	1,5115	160,19
		1,49		

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
10 g/L	30	0,0642 0,0214	0,0428	7,04
	192	0,2234 0,3607	0,29205	165,15

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
15g/L	192	0	0,012	20,41

<b>Valérico</b>	<b>Pm =102</b>			
-----------------	----------------	--	--	--

Gelatina	(horas)	(mg/L)	mMoles/L	mMoles em 250 mL
2,5 g/L	192	160,19	1,5705	0,3926

10 g/L	30	7,04	0,07	0,02
	192	165,15	1,62	0,40

15g/L	192	20.41	0,20	0,05
-------	-----	-------	------	------

## Cálculo da concentração de ácido Isovalérico

$$Y = A + B * X$$

A=0,02095  
B=0,00993

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
2,5 g/L	192	0,336	0,33165	31,29
		0,3273		

Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
10 g/L	30	0,2141	0,1726	15,27
		0,131		
	48	0,4764	0,4478	42,98
		0,4191		
	192	0,126	0,0823	30,85
		0,0603		
		0,0605		

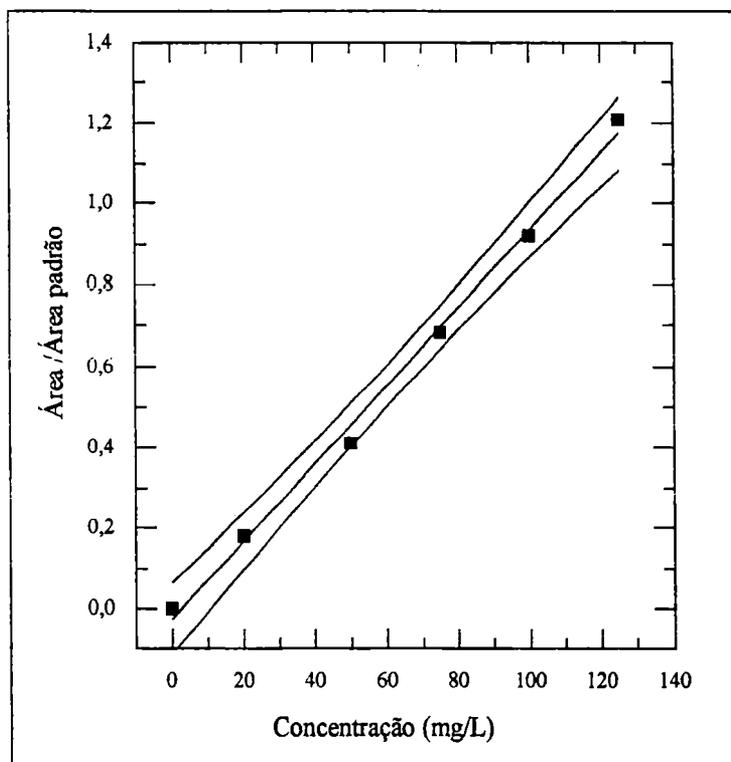
Concentração de gelatina	Tempo (horas)	Áreas	Área média	Concentração (mg/L)
15 g/L	30	0,1147	0,3612	34,26
		0,6077		
	48	0,5701	0,3754	35,69
		0,1806		
	192	0,2128	0,1965	94,18
		0,1801		

Isovalérico		PM =102		
gelatina	(horas)	(mg/L)	mMoles/L	mMoles em 250 mL
2,5 g/L	192	31,29	0,31	0,08
	30	15,27	0,15	0,04

10 g/L	48	42,98	0,42	0,11
	192	30,85	0,30	0,08

15 g/L	30	34,26	0,34	0,08
	48	35,69	0,35	0,09
	192	94,81	929,51	232,38

Curva padrão de ácido Valérico



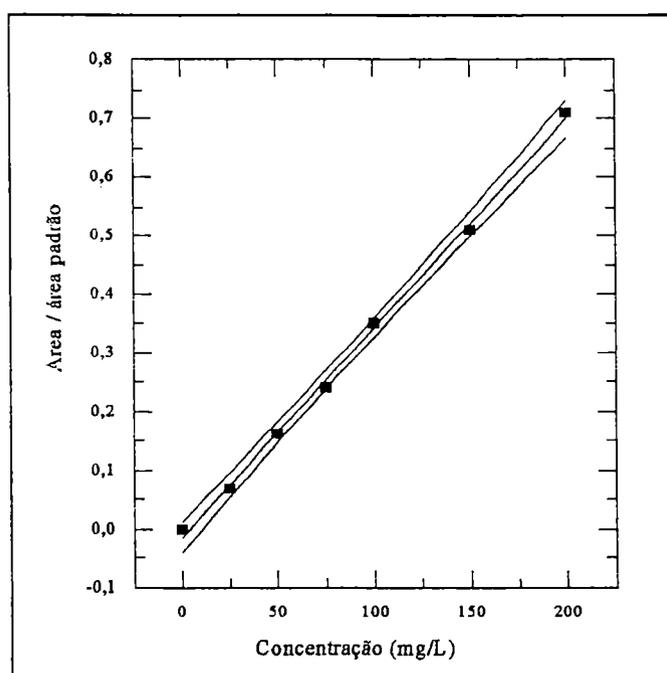
Concentração (mg/L)	Área
0	0
20	0,18
50	0,41
75	0,68
100	0,92
125	1,21

Regressão linear

$$Y = A + B \cdot X$$

Param	Valor	sd
A=	-0,0247	0,02375
B=	0,00959	0,00031
R =	0,99785	
SD =	0,03351, N = 6	
P =	6,9165E-6	

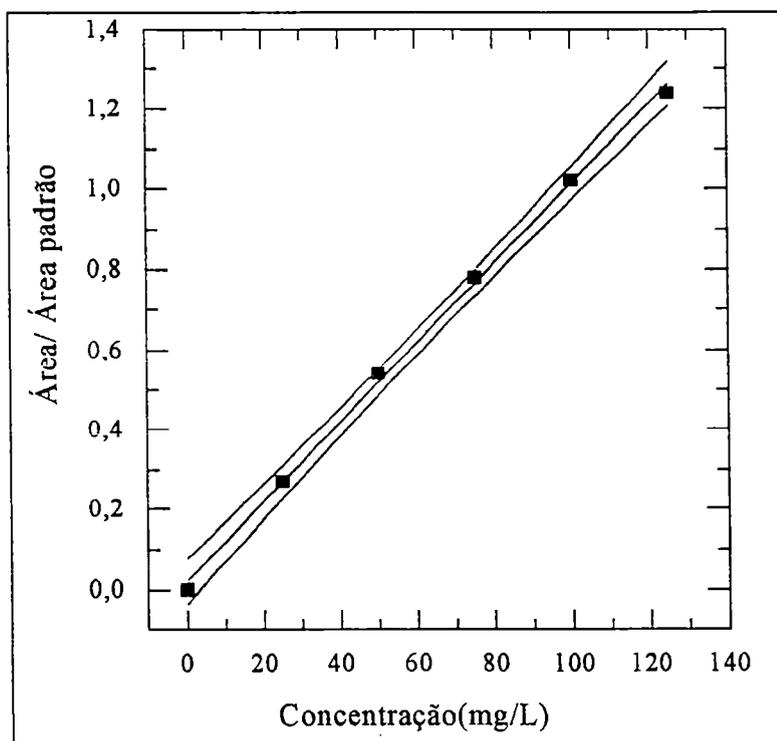
Curva padrão para ácido propiônico



Concentração (mg/L)	Área
0	0
25	0,068
50	0,16
75	0,24
100	0,35
150	0,51
200	0,71

Regressão linear		
$Y = A + B * X$		
Param	Valor	sd
A=	-0,01501	0,0756
B=	0,00357	0,00007
R = 0,99904		
SD = 0,01212, N = 7		
P = 5,5265E-8		

Curva padrão de ácido Isovalérico



Concentração (mg/L)	Área
0	0
25	0,27
50	0,54
75	0,78
100	1,02
125	1,24
0	

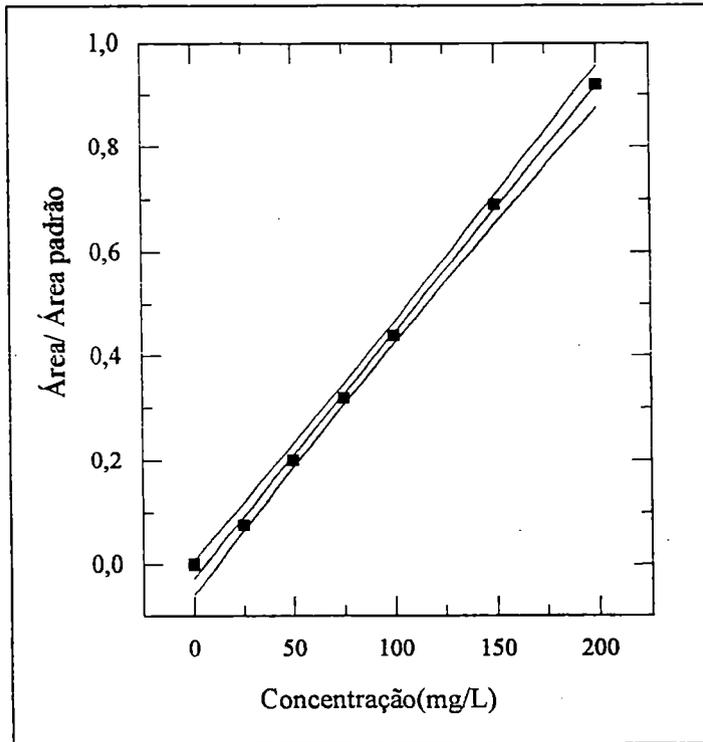
## Regressão linear

$$Y = A + B * X$$

Param	Valor	sd
A=	0,02095	0,01484
B=	0,00993	0,0002

R = 0,99922  
SD = 0,02051, N = 6  
P = 9,0912E-7

Curva padrão para ácido Isobutírico



Concentração (mg/L)	Área
0	0
25	0,075
50	0,2
75	0,32
100	0,44
150	0,69
200	0,92

## Regressão linear

$$Y = A + B * X$$

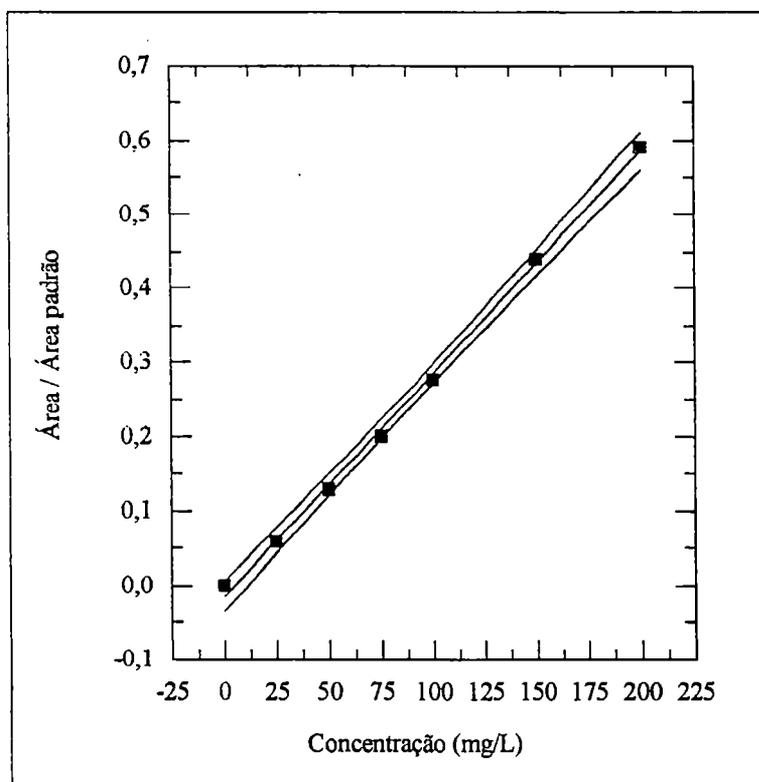
Param	Valor	sd
A=	-0,02644	0,00978
B=	0,00472	0,00009

$$R = 0,99907$$

$$SD = 0,01568, N = 7$$

$$P = 4,9957E-8$$

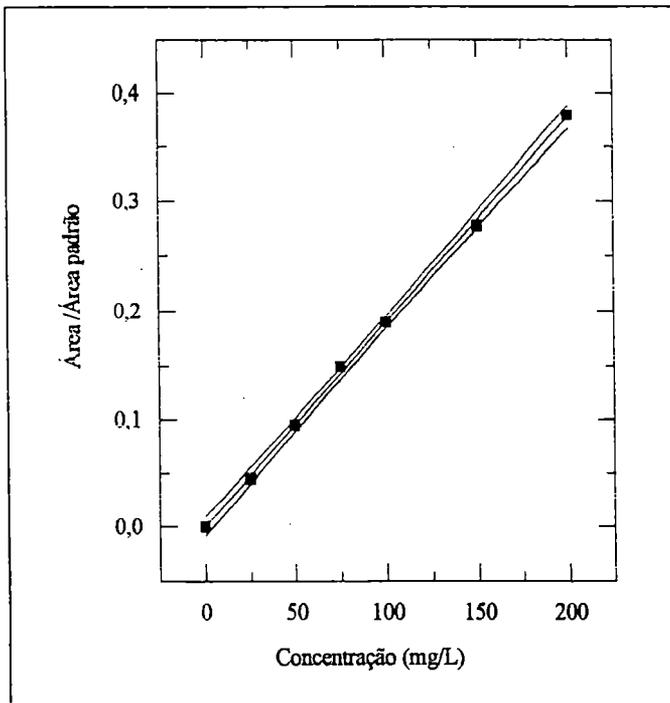
Curva padrão para ácido Butírico



Concentração (mg/L)	Área
0	0
25	0,058
50	0,128
75	0,2
100	0,277
150	0,44
200	0,59

Regressão linear		
$Y = A + B * X$		
Param	Valor	sd
A	-0,0152	0,00618
B	0,003	0,00006
R = 0,99909		
SD = 0,00991, N = 7		
P = 4,8588E-8		

Curva padrão para ácido Acético



Concentração (mg/L)	Área
0	0
25	0,045
50	0,095
75	0,149
100	0,189
150	0,278
200	0,38

## Regressão linear

$$Y = A + B * X$$

Param	Valor	sd
A	0,00053	0,00267
B	0,00189	0,00002

$$R = 0,99957$$

$$SD = 0,00427, N = 7$$

$$P = 7,3463E-9$$