

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

**VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO A
PARTIR DE LODOS ANAERÓBIOS GRANULADOS CULTIVADOS
EM MEIO CONTENDO NITROGÊNIO AMONÍACAL E BAIXAS
CONCENTRAÇÕES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS**

DEDALUS - Acervo - EESC



31100006946

KÁTIA VALÉRIA MARQUES CARDOSO PRATES

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



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

SÃO CARLOS

1997

Class.	TESE - EESC
Curr.	4590
Tombo	T. 0027/97

31100006946

S/S 943232

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

P912v Prates, Kátia Valéria Marques Cardoso
Verificação da produção biológica de nitrogênio a
partir de lodos anaeróbios granulados cultivados em
meio contendo nitrogênio amoniacal e baixas
concentrações de compostos orgânicos / Kátia Valéria
Marques Cardoso Prates. -- São Carlos, 1997.

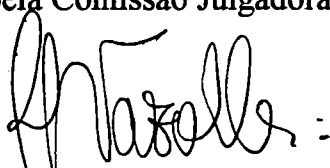
Dissertação (Mestrado). -- Escola de Engenharia
de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1997.
Área: Hidráulica e Saneamento
Orientador: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller.

1. Anaeróbio. 2. Produção biológica de nitrogênio.
I. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: Bacharela **KÁTIA VALÉRIA MARQUES CARDOSO PRATES**


Dissertação defendida e aprovada em 21-11-1997
pela Comissão Julgadora:



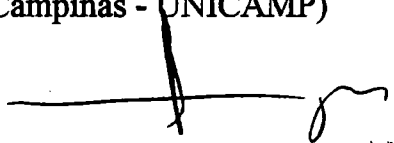
Prof. Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientador)**
(Pesquisadora -Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



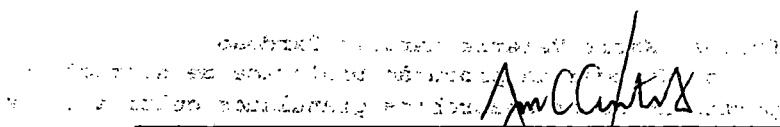
Prof. Titular **EUGENIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



Prof. Doutor **VANDERLEI PEREZ CANHOS**
(Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP)



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



JOSE CARLOS A CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
RUA MARGARETA REA, 100 - SÃO CARLOS - SP - 13506-900
FONE: (019) 231-9100 FAX: (019) 231-9101

“O homem sensato se adapta ao mundo;
o insensato insiste em tentar adaptar o mundo a ele.
Todo o progresso depende, portanto,
do homem insensato.”

George Bernard Shaw

“Muitos são os dons que concedi aos homens, dons
materiais e espirituais:
não os coloquei todos em cada pessoa, para que
fosseis obrigados a vos auxiliar mutuamente.”

Palavras do Cristo a
Santa Catarina de Sena

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller, pela orientação, paciência e dedicação.

Ao Prof. Eugenio Foresti, pelo auxílio e influência na escolha do tema deste trabalho de pesquisa.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - USP pelo apoio científico.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos.

A Bióloga Maria Bernadete Varesche pelo auxílio nos primeiros passos no Laboratório de Processos anaeróbios e a Profa. Elizabeth Mattos Moraes pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Aos técnicos Eloisa Pozzi Gianotti, Francisco Carlos Bergamin e Roberto Bergamo pelo apoio durante a fase experimental dessa pesquisa.

Aos colegas da equipe de Microbiologia do Laboratório de Processos Anaeróbios do SHS-USP, Sérgio F. Larizzatti, pelos momentos divididos durante as disciplinas, execução do trabalho e elaboração da dissertação; Fernando H. Passig, pelas grandes idéias; Silvana de Queiroz Silva, pelo auxílio nos trabalhos de laboratório e nos momentos de descontração; Juliana C. Araújo, pelos momentos de

filosofia de vida, profissional e pessoal; Susy Sarzi e Elizabeth Baraldi pelo companheirismo.

Aos colegas Diana, Marcelo, Márcia, Ariuska, Ivana, Lorena, Lida, Werner, Francisco, Roberto, Maria Helena, Simone, Eraldo, pelos momentos de companheirismo.

Em especial as amigas Deize Dias Lopes e Dorotéia de Fátima Bozano, pela amizade e incentivo a minha vida acadêmica, ajudando-me nos momentos mais difíceis.

Ao querido Ajadir Fazolo pelo auxílio, paciência e carinho durante a fase final deste trabalho.

A minha família, em especial ao meu pai e minha irmã pelo paciência e carinho durante a realização deste trabalho.

E ao grande criador, pelo possibilidade de evoluir a cada nova etapa.

SUMÁRIO

. LISTA DE FIGURAS	i
. LISTA DE TABELAS.....	vi
. LISTA DE SÍMBOLOS	vii
. RESUMO.....	xi
. ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 INTRODUÇÃO.....	7
3.2 FUNDAMENTOS DO METABOLISMO MICROBIANO DO NITROGÊNIO	8
3.3 MECANISMOS BIOLÓGICOS DE REDUÇÃO DO NITRATO	15
3.4 IMPORTÂNCIA DOS PROCESSOS DE TRATAMENTO NA REMOÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS.....	18
3.5 PRESENÇA DE COMPOSTOS NITROGENADOS NA BIODIGESTÃO ANAERÓBIA DE ESGOTOS SANITÁRIOS.....	21
3.6 TRANSFORMAÇÃO BIOLÓGICA ANAERÓBIA DO NITROGÊNIO AMONÍACAL EM NITROGÊNIO GASOSO	26
3.7 TÉCNICAS EMPREGADAS AO ESTUDO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS	35
3.7.1 <i>Microscópios - Enriquecimento de bactérias anaeróbias em ensaios descontínuos</i>	35
3.7.2 <i>Microscopia</i>	38
3.7.3 <i>Cromatografia</i>	39

4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 INTRODUÇÃO.....	43
4.2 ENRIQUECIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS	44
4.2.1 Procedimentos para a manipulação de culturas bacterianas anaeróbias	44
4.2.2 Inóculo.....	48
4.2.3 Meio de Cultivo.....	48
4.2.3.1 Meio Basal Zinder.....	48
4.2.3.2 Soluções-Estoque.....	50
4.2.4 Procedimentos para o enriquecimento das culturas bacterianas	53
4.2.5 Operação dos frascos de reação durante o enriquecimento das culturas bacterianas.....	55
4.2.5.1 Operação dos frascos do primeiro grupo de experimentos.....	55
4.2.5.2 Operação dos frascos do segundo grupo de experimentos	57
4.2.5.3 Operação dos frascos do terceiro grupo de experimentos	58
4.2.5.4 Operação dos frascos do quarto grupo de experimentos.....	58
4.2.6 Análises para o acompanhamento dos ensaios.....	59
4.2.6.1 Análises cromatográficas das culturas bacterianas	59
4.2.6.2 Análises microscópicas das culturas enriquecidas	60
4.2.6.3 Determinação do íon amônio presente nas culturas enriquecidas	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1 PRIMEIRO GRUPO DE EXPERIMENTOS.....	68
5.1.1 Análises Cromatográficas	68
5.1.2 Análises Microscópicas	77
5.2 SEGUNDO GRUPO DE EXPERIMENTOS.....	83
5.2.1 Análises Cromatográficas	83
5.2.2 Análises Microscópicas	91
5.3 TERCEIRO GRUPO DE EXPERIMENTOS	93
5.3.1 Análises Cromatográficas	93

5.3.2 <i>Análises Microscópicas</i>	101
5.4 QUARTO GRUPO DE EXPERIMENTOS	103
5.4.1 <i>Análises Cromatográficas</i>	103
5.4.2 <i>Análises Microscópicas</i>	107
5.4.2.1 Microscopia de campo claro sob contraste de fase e luz ultravioleta.	107
5.4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	113
5.5 UMA BREVE ANÁLISE DO CONJUNTO DE RESULTADOS EXPERIMENTAIS	116
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	123
ANEXO	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 3-1** DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS ESTADOS DE OXIDAÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS NO CICLO DO NITROGÊNIO (RECKLEFS* APUD MCEIDOWNEY ET AL., 1993). 10
- FIGURA 4.1** - PROCEDIMENTOS DA TROCA DE ATMOSFERA DOS FRASCOS DE DURAN CONTENDO MEIO DE CULTURA, UTILIZANDO O SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO SIMULTÂNEA DE GASES E COLUNA CATALÍTICA DO LABORATÓRIO DE PROCESSOS ANAERÓBIOS DO DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO (LPA-SHS-EESC-USP). 45
- FIGURA 4.2** - A) FRASCOS DE 500 ML CONTENDO MEIO DE CULTIVO; 47
- FIGURA 4.3** - FRASCOS DE 250 ML CONTENDO O CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM MEIO DE CULTIVO. 55
- FIGURA 4.4** - FRASCOS DE 500 ML CONTENDO MEIO DE CULTIVO, COM FECHAMENTO ATRAVÉS DE ROLHAS DE BORRACHA DE BUTILA E ROSCA DE PLÁSTICO. 57
- FIGURA 5.1** - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO, PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O PRIMEIRO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 1, (B) FRASCO 2, (C) FRASCO 3, (D) FRASCO 4. 69

- FIGURA 5.2 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO, PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O SEGUNDO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 1, (B) FRASCO 2, (C) FRASCO 3, (D) FRASCO 4..... 72
- FIGURA 5.3 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO, PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O TERCEIRO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 1, (B) FRASCO 2, (C) FRASCO 3, (D) FRASCO 4..... 75
- FIGURA 5.4 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTIVO PERTENCENTES AO PRIMEIRO GRUPO DE EXPERIMENTOS (OCULAR 10, OBJETIVA 100, ZOOM 1,25). (A) E (B) FRASCO 1 (MESMO CAMPO), (C) FRASCO 1, (D) FRASCO 2..... 79
- FIGURA 5.5 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE ALGUMAS MICRORGANISMOS PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTIVO PERTENCENTES AO PRIMEIRO GRUPO DE EXPERIMENTOS (OCULAR 10, OBJETIVA 100, ZOOM 1,25). (A) E (B) FRASCO 3, (C) E (D) FRASCO 4 (MESMO CAMPO) E (E) FRASCO 4. 82
- FIGURA 5.6 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O PRIMEIRO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 7, (B) FRASCO 8, (C) FRASCO 10..... 84
- FIGURA 5.7 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O SEGUNDO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 7, (B) FRASCO 8, (C) FRASCO 10..... 86

- FIGURA 5.8 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O TERCEIRO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 7, (B) FRASCO 8, (C) FRASCO 10.....87
- FIGURA 5.9 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE ALGUMAS BACTÉRIAS PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTIVO PERTENCENTES AO SEGUNDO GRUPO DE EXPERIMENTOS (OCULAR 10, OBJETIVA 100, ZOOM 1,25). (A) E (B) FRASCO 7, (C) FRASCO 9, (D) FRASCO 10.92
- FIGURA 5.10 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA, NO PRIMEIRO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 5, (B) FRASCO 6.94
- FIGURA 5.11 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O SEGUNDO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 5, (B) FRASCO 6.96
- FIGURA 5.12 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O TERCEIRO PERÍODO DE INCUBAÇÃO (A) FRASCO 5, (B) FRASCO 6.98
- FIGURA 5.13 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA DURANTE O QUARTO PERÍODO DE INCUBAÇÃO. (A) FRASCO 5, (B) FRASCO 6.100
- FIGURA 5.14 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE ALGUMAS BACTÉRIAS PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTIVO PERTENCENTES AO TERCEIRO GRUPO DE EXPERIMENTOS (OCULAR 10, OBJETIVA 100, ZOOM 1,25). (A) FRASCO 5, (B) FRASCO 6.103

- FIGURA 5.15 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO, EM MMOLES/L, DE NITROGÊNIO, METANO E DIÓXIDO DE CARBONO PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTURA. (A) FRASCO 5 A, (B) FRASCO 6 A, (C) FRASCO 5 B, (D) FRASCO 6 B, (E) FRASCO 5 C E (F) FRASCO 6 C. 105
- FIGURA 5.16 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE ALGUNS MICRORGANISMOS PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTIVO PERTENCENTES AO QUARTO GRUPO DE EXPERIMENTOS (OCULAR 10, OBJETIVA 100, ZOOM 1,25). (A) E (B) FRASCO 5C, (C) E (D) FRASCO 6C. 109
- FIGURA 5.17 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE ALGUNS MICRORGANISMOS PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTIVO PERTENCENTES AO QUARTO GRUPO DE EXPERIMENTOS (OCULAR 10, OBJETIVA 100, ZOOM 1,25). (A) E (B) FRASCO 5A (MESMO CAMPO), (C) E (D) FRASCO 6B (MESMO CAMPO); (E) E (F) FRASCO 5C (MESMO CAMPO). 110
- FIGURA 5.18 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE ALGUNS MICRORGANISMOS PRESENTES NOS FRASCOS DE CULTIVO PERTENCENTES AS DILUIÇÕES (OCULAR 10, OBJETIVA 100, ZOOM 1,25). 112
- FIGURA 5.19 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MOSTRANDO A MORFOLOGIA PREDOMINANTE NOS FRASCOS DE DILUIÇÃO. 113
- FIGURA 5.20 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MOSTRANDO A MORFOLOGIA PREDOMINANTE NOS FRASCOS DE DILUIÇÃO. 114
- FIGURA 5.21 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MOSTRANDO A MORFOLOGIA PREDOMINANTE NOS FRASCOS DE DILUIÇÃO. 114
- FIGURA 5.22 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MOSTRANDO A MORFOLOGIA PREDOMINANTE NOS FRASCOS DE DILUIÇÃO. 115

- FIGURA 5.23 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MOSTRANDO A MORFOLOGIA PREDOMINANTE NOS FRASCOS DE DILUIÇÃO..... 115
- FIGURA 5.24 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, (A) DE NITROGÊNIO E (B) DE METANO PRESENTE NOS FRASCOS DE REAÇÃO 1 A 10, DURANTE O PRIMEIRO PERÍODO DE ENRIQUECIMENTO. 117
- FIGURA 5.25 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES, EM MMOLES/L, (A) DE NITROGÊNIO E (B) DE METANO PRESENTE NOS FRASCOS DE REAÇÃO 1 A 10, DURANTE O SEGUNDO PERÍODO DE ENRIQUECIMENTO. 117

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1- EXEMPLOS DE GÊNEROS DE BACTÉRIAS ENVOLVIDOS NO CICLO DO NITROGÊNIO.	12
TABELA 3.2 - REAÇÕES DE TRANSFORMAÇÃO DO NITROGÊNIO.....	13
TABELA 3.3 - MECANISMOS DE REDUÇÃO BIOLÓGICA DO NITRATO.....	15
TABELA 3.4- SISTEMAS BIOLÓGICOS E FUNÇÕES ESPECÍFICAS.....	20
TABELA 3.5- CONCENTRAÇÃO DO NITROGÊNIO PRESENTE NO ESGOTO SANITÁRIO, MG/L.....	22
TABELA 3.6 - CARACTERÍSTICAS DO AFLUENTE E EFLUENTE EM RELAÇÃO AOS COMPOSTOS NITROGENADOS PARA O DIGESTOR DE 120 M ³ DURANTE TODO O PERÍODO DE EXPERIMENTO	23
TABELA 3.7 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE NITROGÊNIO PRESENTES NO AFLUENTE E PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DOS MESMOS NO REATOR UASB	24
TABELA 3.8 - ENERGIA LIVRE DE GIBBS DE ALGUMAS REAÇÕES ENVOLVIDAS NA DESNITRIFICAÇÃO E NA OXIDAÇÃO DO ÍON AMÔNIO.	27
TABELA 3.9 - PERFORMANCE DO REATOR DE DESNITRIFICAÇÃO ANTES E DEPOIS DO INÍCIO DA OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DO ÍON AMÔNIO.	28

TABELA 3.10 - CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL NA SOLUÇÃO SINTÉTICA....	34
TABELA 4.1 - COMPOSIÇÃO DO MEIO BASAL ZINDER	49
TABELA 4.2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO ZINDER	49
TABELA 4.3 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO TRAÇO DE METAIS DO MEIO ZINDER.....	51
TABELA 4.4 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE VITAMINAS	52
TABELA 4.5 - FREQUÊNCIA, EM DIAS, DAS ANÁLISES MICROSCÓPICAS	61
TABELA 5.1 - VALORES EM G/L DE NITROGÊNIO AMONÍACAL.....	76
TABELA 5.2 - MORFOLOGIAS PRESENTES NOS FRASCOS DE REAÇÃO DO PRIMEIRO GRUPO DE EXPERIMENTOS.....	78
TABELA 5.3 - VALORES EM G/L DE NITROGÊNIO AMONÍACAL.....	90
TABELA 5.4 - MORFOLOGIAS PRESENTES NOS FRASCOS DE REAÇÃO DO SEGUNDO GRUPO DE EXPERIMENTOS.....	91
TABELA 5.5 - VALORES EM G/L DE NITROGÊNIO AMONÍACAL.....	101
TABELA 5.6 - MORFOLOGIAS PRESENTES NOS FRASCOS DE REAÇÃO DO TERCEIRO GRUPO DE EXPERIMENTOS.....	102
TABELA 5.7 - VALORES EM G/L DE NITROGÊNIO AMONÍACAL.....	107
TABELA 5.8 - MORFOLOGIAS PRESENTES NOS FRASCOS DE REAÇÃO DO QUARTO GRUPO DE EXPERIMENTOS.....	108

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
ΔG°	variação de energia livre de gibbs
μmoles	micromoles
$^{14-14}\text{N}$	ligação entre átomos de nitrogênio não marcado radioativamente
$^{14-15}\text{N}$	ligação entre átomos de nitrogênio marcado e não marcado
$^{15-15}\text{N}$	ligação entre átomos de nitrogênio marcado radioativamente
^{15}N	nitrogênio marcado radioativamente
$^{15}\text{NH}_4^+$	íon amônio marcado radioativamente
^{15}NO	óxido nítrico marcado radioativamente
atm	atmosfera
C/N	relação carbono nitrogênio
CH_4	gás metano
$\text{CH}_4/\text{mol.h}$	metano por mol por hora
CO_2	dióxido de carbono
g/L	grama por litro
H_2	gás hidrogênio
HCO_3^-	bicarbonato
$\text{Kg N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$	quilograma de nitrogênio por metro cúbico por dia
KJ/mol	quilo joule por mol
L	litro
m/z	relação de número atômico
mg	miligrama
mL/h	mililitro por hora
mmoles	milimoles

mV	milivoltes
-NH ₂	aminonitrogênio
M	mol
N	normalidade
N/L	nitrogênio por litro
N ₂	nitrogênio molecular
N ₂ O	óxido nitroso
NaNO ₃	nitrato de sódio
NH ₂ OH	hidroxilamina
NH ₃	amônia
NH ₄ ⁺	íon amônio
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
NH ₄ NO ₃	nitrato de amônio
N-NH ₄ ⁺	nitrogênio na forma de íon amônio
NO ₃ ⁻	nitrato
NTK	nitrogênio total Kjeldahl
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
pH	potencial hidrogeniônico
Q.S.P	quantidade suficiente para
R.D.N.A.	redução desassimilatória do nitrato a íon amônio

rpm	rotações por minuto
S^{-2}	sulfeto
SO_4^{-}	sulfato
SSV	sólidos suspensos voláteis
UASB	upflow anaerobic sludge blanket reactor (reator anaeróbio de manta de lodo com fluxo ascendente)

RESUMO

O presente trabalho avalia a possibilidade de formação biológica de nitrogênio gasoso em biodigestores anaeróbios metanogênicos. Os ensaios consideraram a hipótese da ação do nitrato na transformação anaeróbia do íon amônio em nitrogênio e o efeito de fontes gasosas de H_2 e CO_2 . Os experimentos foram preparados em quatro diferentes condições, utilizando-se, como inóculo, lodo proveniente de um reator UASB operado com esgoto sanitário, enriquecidos com meio de cultivo Zinder acrescido de NH_4Cl ou NH_4NO_3 , como fonte de nitrogênio amoniacal. Sendo, (1) 0,5 g/L de NH_4Cl sob atmosfera de Hélio; (2) 0,6 g/L de NH_4NO_3 sob atmosfera de Hélio; (3) 0,5 g/L de NH_4Cl , sob atmosfera de H_2/CO_2 (70 - 30%); (4) inóculo proveniente de (3) formando por três subgrupos: o primeiro contendo formiato de sódio, sob atmosfera de Hélio, o segundo, atmosfera de CO_2 , e o terceiro, extrato de lodo sob atmosfera de H_2/CO_2 (70 - 30%), todos com NH_4Cl . Os experimentos foram realizados sob condições metanogênicas (anaerobiose estrita), sendo os frascos de cultivo mantidos sob agitação constante (60 rpm) e temperatura de $35 \pm 1^\circ C$. Os resultados foram obtidos através de análises cromatográficas, microscópicas e de determinação de íon amônio, e indicaram a produção biológica de nitrogênio gasoso no terceiro grupo de experimentos. As análises microscópicas evidenciaram a predominância de bactérias metanogênicas com morfologias de bacilos, semelhantes ao gênero *Methanobacterium* sp e *Methanobrevibacter* sp, bactérias filamentosas, além de microrganismos semelhantes a fungos. Os outros grupos de experimentos não apresentaram resultados quanto à produção de nitrogênio.

Palavras-chave: produção anaeróbia de nitrogênio; anaeróbios estritos

ABSTRACT

The present study aims at the evaluation of dinitrogen gas biological formation, under anaerobic methanogenic conditions. The hypothesis supporting this research is the possibility of dinitrogen gas formation from NH_4^+ in the presence of NO_3^- or, alternatively H_2 and CO_2 (70:30%), by anaerobic sludge from a UASB reactor treating municipal wastewater. Experiments were carried out into four different conditions using a mineral medium (called Zinder's medium) as a basal constitution of cell cultures enrichments procedures: (1) 0,5 g/L NH_4Cl ; (2) 0,6 g/L NH_4NO_3 ; (3) 0,5 g/L NH_4Cl under hydrogen and carbon dioxide gas mixture; (4) sludge from (3) subcultivated in 0,5 g/L NH_4Cl plus sodium formate, in 0,5 g/L NH_4Cl under carbon dioxide atmosphere and 0,5 g/L NH_4Cl plus sludge extract under H_2 and CO_2 gas mixture. Helium gas was used as atmosphere in the experiments without gas mixture or CO_2 . The incubation of the fed-batch experiments were done in a completely oxygen-free atmosphere, with agitation, under $35 \pm 1^\circ\text{C}$. The evidence for dinitrogen gas formation, probably mediated by biological activities, was verified during the third group of experiments. In this condition, microscopic analysis showed fluorescent bacillus as the predominant sludge morphologies, which are related with *Methanobacterium* sp and *Methanobrevibacter* sp genera, respectively. It was concluded that anaerobic ammonium oxidation could be related with dinitrogen gas formation under hydrogen and carbon dioxide gas mixture, and it should be persevere in further experiments in order to establish the real metabolic route of dinitrogen gas formation under methanogenic conditions. The experiments were not conclusive to the presence of dinitrogen gas during the order condition studied.

Word-key : anaerobic nitrogen production, strict anaerobic

1. INTRODUÇÃO

A população humana apresenta-se em constante crescimento, enquanto os recursos naturais vão sendo esgotados. Como decorrência desses fatores, os problemas ambientais tendem a aumentar.

Os esgotos sanitários, por exemplo, possuem quantidades excessivas de nitrogênio, as quais, nos processos biológicos de tratamento podem ser ou não efetivamente consumidas para o crescimento microbiano. Portanto, o residual não utilizado, se lançado diretamente nos corpos d'água receptores, poderá ocasionar a eutrofização e toxicidade do meio, com os conseqüentes prejuízos aos sistemas de abastecimento e à saúde pública. Desta forma, o aprimoramento da remoção de compostos nitrogenados nas estações de tratamento de esgotos é de especial interesse, tendo em vista os efeitos que provocam no meio aquático.

Os estudos sobre a ecologia microbiana e seus processos bioquímicos de obtenção de energia podem proporcionar o entendimento das diferentes atividades dos microrganismos na natureza, e como eles interagem entre si e com os organismos superiores. Assim, o conhecimento gerado poderá ser aplicado para resolver problemas ambientais, uma vez empregados os sistemas biotecnológicos para o tratamento de resíduos.

A composição da água residuária pode determinar a seleção dos grupos microbianos nos processos de tratamento. Por exemplo, a presença de nitrogênio sob a forma amoniacal poderia facilitar o crescimento de bactérias nitrificantes, e o

produto metabólico, o nitrato, favoreceria o aparecimento de bactérias desnitrificantes.

Os tratamentos convencionais para compostos de nitrogênio aliam processos aeróbios para a transformação do íon amônio em nitrato e processos anaeróbios para converter o nitrato em nitrogênio gasoso, que é uma forma inerte de nitrogênio. A possibilidade da utilização de um único tipo de sistema de tratamento para a remoção dos compostos de nitrogênio pode resultar em economia de energia e uma menor produção de lodo. Um processo que parece compreender essas vantagens é o tratamento anaeróbio.

Nos processos anaeróbios ou nos sistemas de biodigestão anaeróbia, a degradação da matéria orgânica envolve a atuação de microrganismos anaeróbios obrigatórios e não obrigatórios, cujas espécies predominantes pertencem ao grupo das bactérias hidrolítico-fermentativas, acetogênicas produtoras de hidrogênio e metanogênicas (VAZOLLER, 1995a).

Os organismos da biodigestão anaeróbia apresentam um elevado grau de especialização metabólica, e a eficiência do processo anaeróbio depende, portanto, das interações positivas entre as diversas espécies bacterianas, com diferentes capacidades degradativas. Assim, os intermediários metabólicos de um grupo de bactérias podem servir como nutrientes ao crescimento de outras espécies (VAZOLLER, 1995a).

Trabalhos realizados sobre a biodigestão anaeróbia mesofílica de esgotos sanitários, sintéticos ou naturais, utilizando biodigestores de fluxo ascendente e manta de lodo, revelaram, na composição do biogás gerado, teores elevados do gás nitrogênio (20-30%), pouco comuns aos processos anaeróbios em geral (VIEIRA, 1988; BARBOSA & SANT'ANNA, 1989; TORRES, 1992).

MERGAERT et al. (1992) apresentaram uma revisão sobre a aplicabilidade e tendências do pré-tratamento anaeróbio de esgoto sanitário municipal, em que ressaltaram a presença marcante do gás nitrogênio encontrado em sistemas de biodigestão anaeróbia de esgotos sanitários (BHADRA et al., 1987; van de GRAAF* et al. apud MERGAERT et al., 1992). Nesta revisão, os autores propuseram a existência de vias biológicas em reatores anaeróbios (produção biológica anaeróbia de nitrogênio), o que transformaria os compostos de nitrogênio em uma forma inerte (nitrogênio gasoso).

Nos processos anaeróbios, tem-se, normalmente, o aumento da concentração de nitrogênio amoniacal, como citado, por exemplo, no trabalho desenvolvido por VIEIRA (1984), em que os valores de nitrogênio amoniacal afluente eram de 15 mg/L e no efluente, 21 mg/L.

Em função do interesse pela tecnologia da biodigestão anaeróbia de efluentes sanitários, particularmente no Brasil, através do emprego de biodigestores avançados, acredita-se que a elucidação das reações indicadas por MERGAERT et al. (1992), JETTEN et al. (1997), ou de outras possíveis vias biológicas, seria importante para o desenvolvimento da remoção do nitrogênio dentro de sistemas anaeróbios operados com cargas orgânicas baixas.

O presente trabalho propõe a verificação da ocorrência das vias biológicas apresentadas por MERGAERT et al. (1992), van de GRAAF et al. (1995) e MULDER et al. (1995), através do enriquecimento, com nitrogênio amoniacal na presença de nitrato ou hidrogênio, de um lodo granulado proveniente de um biodigestor de fluxo ascendente e manta de lodo operado com esgotos sanitários (OLIVA, 1997).

* van de GRAAF, A.; MULDER, A.; SLIKHUIS, A.; ROBERTSON, L.; KUENEN, J. G. (1990) Anoxic ammonium oxidation. In *proc. 5th Eur. Congress on Biotechnology*, Mankagaard, Copenhagen, Vol. 1, p. 388-391.

2. OBJETIVOS

- Enriquecer um lodo anaeróbio granulado, oriundo de um biodigestor de fluxo ascendente e manta de lodo operado com esgoto sanitário, em meio de cultivo mineral acrescido de nitrogênio amoniacal, e na presença em separado de nitrato, hidrogênio e dióxido de carbono.
- Caracterizar morfológicamente os grupos bacterianos envolvidos na transformação biológica anaeróbia do nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso, sob condições de metanogênese.
- Avaliar a resposta do metabolismo microbiano anaeróbio, a fim de propor uma possível rota metabólica da transformação biológica do nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso, nas condições estudadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Introdução

O nitrogênio é um composto extremamente importante para os organismos vivos, cuja constituição química é formada de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. As reações para a formação e degradação dos compostos de nitrogênio são realizadas na natureza quase que exclusivamente por microrganismos. Desta forma, o envolvimento microbiano no ciclo do nitrogênio é de grande importância.

As águas residuárias provenientes do esgoto sanitário ou de despejos industriais trazem em sua composição quantidades consideráveis de nitrogênio, que pode apresentar efeitos deletérios para o corpo de água receptor. Muitos compostos de nitrogênio são prejudiciais à atmosfera e podem gerar consequências adversas a ecossistemas, aquáticos e terrestres, como riscos à saúde pública, eutrofização, chuva ácida, toxicidade aos peixes, entre outros (STUMM, 1996).

Devido a estes efeitos, existem trabalhos sobre a remoção de nitrogênio em sistemas de tratamentos de resíduos, em que microrganismos são os mediadores das transformações de compostos inorgânicos de nitrogênio. Essas transformações são basicamente realizadas por bactérias de diversos grupos fisiológicos, que integram o ciclo do nitrogênio, e asseguram a circulação desse elemento na natureza (ABREU, 1994).

Novos trabalhos sobre a remoção de nitrogênio têm abordado formas diferentes para o tratamento biológico de compostos nitrogenados. Em 1992, MERGAERT et al. realizaram um trabalho de revisão sobre a aplicabilidade e

tendências do pré-tratamento anaeróbio do esgoto sanitário municipal. Nesta revisão, os autores indicaram duas possibilidades biológicas para a formação de nitrogênio nos sistemas anaeróbios metanogênicos para a remoção de matéria orgânica. Uma via biológica seria a fermentação da uréia em nitrogênio e metano (BHADRA et al., 1987), e uma segunda proposta (van de GRAAF et al.* apud MERGAERT et al., 1992), seria a ocorrência de uma reação entre o íon amônio (NH_4^+) e o nitrato (NO_3^-) com a formação de gás nitrogênio.

A presente revisão de literatura procurará abordar fundamentalmente o papel dos microrganismos utilizadores de compostos nitrogenados durante o metabolismo energético sob condições anaeróbias.

3.2 Fundamentos do metabolismo microbiano do nitrogênio

A maior parte do nitrogênio global existe sob forma não prontamente disponível para a biota terrestre. O suprimento e a ciclagem ambiental das formas disponíveis deste elemento são largamente dependentes da decomposição biológica do nitrogênio, presente nos componentes acumulados dentro da biota (MCELDOWNEY et al., 1993). A reciclagem de nitrogênio na Terra envolve formas mais facilmente disponíveis, íon amônio e nitrato. Em muitos ambientes, essas formas apresentam-se limitadas, o que estimula a fixação biológica de nitrogênio (BROCK, 1994). O grupo de microrganismos que catalisa a conversão de compostos de nitrogênio compreende diferentes tipos bacterianos, tais como o das bactérias fixadoras de nitrogênio, das amonificantes, das nitrificantes e das desnitrificantes (BROCK, 1994).

Na Biosfera, o nitrogênio encontra-se, principalmente, como um gás altamente estável, que pode ser utilizado pelas "bactérias fixadoras de nitrogênio". A fixação bacteriana do nitrogênio gasoso é um processo metabólico bastante importante para

* van de GRAAF, A.; MULDER, A.; SLIJKHUIS, A.; ROBERTSON, L.; KUENEN, J. G. (1990). Anoxic ammonium oxidation. In proc. 5th Eur. Congress on Biotechnology, Mankagaard, Copenhagen, Vol. 1, p. 388-391.

as plantas e animais, uma vez que fornece um composto nitrogenado assimilável pelos seres vivos, o íon amônio¹ (BROCK, 1994).

O íon amônio produzido pela fixação bacteriana do nitrogênio ou pela amonificação de compostos de nitrogênio orgânico pode ser assimilado para a síntese celular, ou oxidado a nitrato pela atividade de bactérias nitrificantes (processo de nitrificação). Parte do nitrogênio na Biosfera ocorre devido ao metabolismo da desnitrificação, em que o nitrato é convertido em nitrogênio gasoso (BROCK, 1994).

A Figura 3.1 apresenta, de forma esquemática, as transformações que ocorrem com os compostos nitrogenados durante o ciclo do nitrogênio. Podem ser observados todos os processos citados anteriormente, ou seja, fixação, amonificação, nitrificação e desnitrificação, bem como são indicados exemplos de tipos bacterianos (gêneros) responsáveis por esses processos.

¹ A amônia (NH_3) produzida durante a decomposição de compostos de nitrogênio orgânico (amonificação) e a pH neutro encontra-se no meio aquoso como íon amônio (NH_4^+). Portanto, a fim de facilitar a leitura do texto, será considerado o termo íon amônio, para designar as duas formas de nitrogênio amoniacal (NH_3 e NH_4^+).

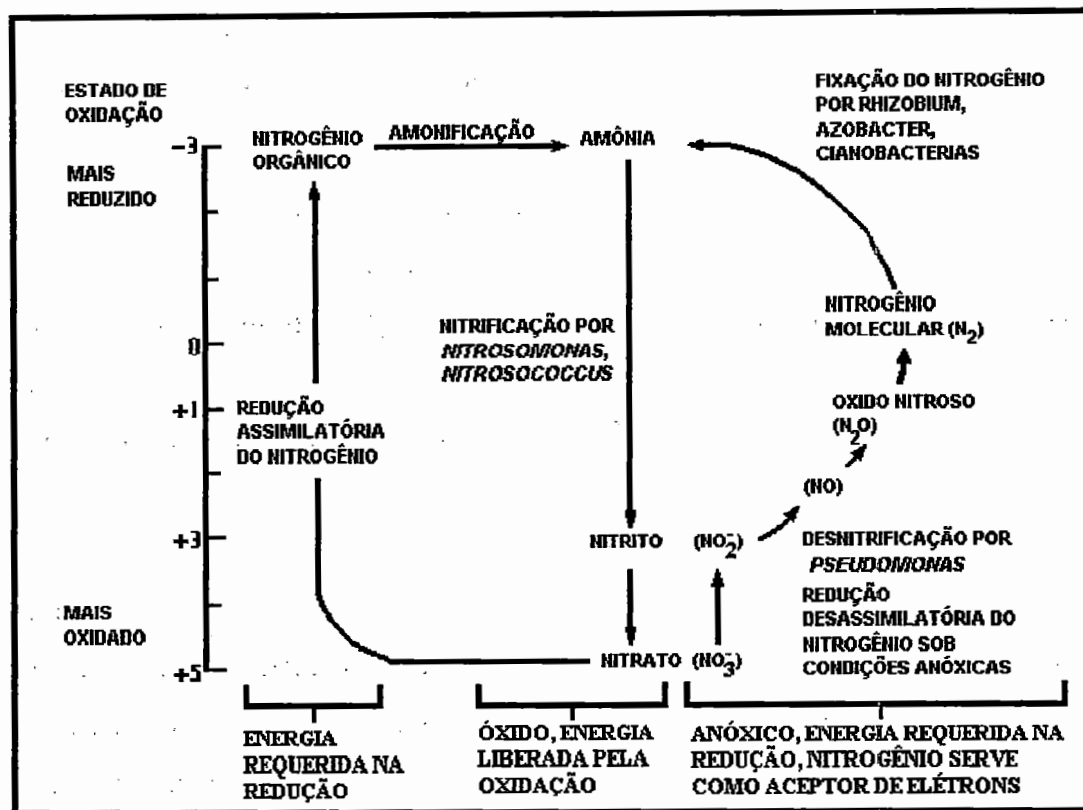


FIGURA 3-1 Diagrama esquemático dos estados de oxidação dos compostos nitrogenados no ciclo do nitrogênio (RECKLEFS* apud MCEIDOWNEY et al., 1993).

A tecnologia dos processos de tratamento de águas residuárias emprega conhecimentos sobre os processos de transformação dos compostos de nitrogênio, como visto na Figura 3.1, a fim de conseguir a forma inerte do nitrogênio, que não causa problemas aos corpos receptores.

Durante a transformação do nitrogênio orgânico presente nas águas residuárias, nos processos biológicos de tratamento, tem-se como produto o íon amônio. A decomposição bacteriana de matéria protéica e uréia ocorre proporcionando o crescimento bacteriano. A liberação do íon amônio é também verificada durante a auto-oxidação e lise celular (ECKENFELDER & ARGAMAN, 1991).

* RECKLEFS, R. E. (1993). *Ecology*. 3 ed. New York, W.H. Freeman and Company.

Os compostos de nitrogênio transformados e assimilados pelas células bacterianas são, então, removidos do meio (ECKENFELDER & ARGAMAN, 1991).

O nitrogênio amoniacal formado pela atividade biológica pode ser oxidado a nitrato através de dois passos, como foi indicado anteriormente na Figura 3.1. Finalmente, nitratos podem ser transformados em gás nitrogênio através da desnitrificação. O gás nitrogênio formado escapa para a atmosfera, porém um residual de nitrogênio orgânico solúvel não degradado permanecerá no efluente (ECKENFELDER & ARGAMAN, 1991).

A maior parte das pesquisas realizadas tem concentrado a atenção na melhoria dos processos clássicos de nitrificação e desnitrificação, com o objetivo de controlar o nitrogênio no tratamento de águas residuárias e água potável. Nesses trabalhos, geralmente não são considerados os processos de fixação e a assimilação do nitrogênio, que também ocorrem durante o tratamento dos resíduos (ECKENFELDER & ARGAMAN, 1991).

A fixação do nitrogênio é uma propriedade encontrada somente entre organismos procariontes. Espécies bacterianas pertencentes a praticamente todas as ordens e famílias conhecidas são capazes de fixar o nitrogênio molecular (GOTTSCHALK, 1988). Alguns exemplos de organismos fixadores de nitrogênio são listados na Tabela 3.1. Além desses, algumas bactérias simbióticas, por exemplo, *Rhizobium sp*, fixam o nitrogênio através de uma associação com plantas leguminosas (BROCK, 1994).

A fixação bacteriana do nitrogênio é um processo metabólico que necessita de energia, devido à alta quantidade necessária para quebrar a tripla ligação ($N\equiv N$) do nitrogênio (BROCK, 1994). A fixação, quando ocorre sob um ambiente com baixo potencial de oxi-redução, em que o hidrogênio está presente, pode ser representada pela reação apresentada na Tabela 3.2 (eq. (1) e (2)).

TABELA 3.1- Exemplos de gêneros de bactérias envolvidos no ciclo do nitrogênio.

Fixadoras de Nitrogênio	Aeróbios	<i>Azotobacter sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Beijerinckia sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Derxia sp.</i> , <i>Azospirillum sp.</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Methylotrrophs sp.</i> , <i>Azomonas sp.</i> , <i>Azospirillum sp.</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Thiobacillus sp.</i>
	Anaeróbios	<i>Clostridium sp.</i> , <i>Chlorobium sp.</i> , <i>Chomatium sp.</i> , <i>Desulfovibrio sp.</i> , <i>Desulfotomaculum sp.</i> , <i>Rhodospirillum</i> <i>sp.</i> , <i>Rhodopseudomonas sp.</i> , <i>Rhodomicrobium sp.</i> , <i>Rhodobacter sp.</i> , <i>Heliobacterium sp.</i> , <i>Methanosarcina sp.</i> , <i>Methanococcus sp.</i>
Nitrificantes	Oxidadoras do íon amônio (aeróbios)	<i>Nitrosomonas sp.</i> , <i>Nitrosococcus sp.</i> , <i>Nitrosospira sp.</i> , <i>Nitrosolobus sp.</i> , <i>Nitrosovibrio sp.</i> , <i>Nitrosocystis sp.</i> , <i>Nitrosogloea sp.</i>
	Oxidadoras do nitrito (aeróbios)	<i>Nitrobacter sp.</i> , <i>Nitrospina sp.</i> , <i>Nitrococcus sp.</i> , <i>Nitrospira sp.</i> , <i>Nitrocystis sp.</i> , <i>Bactoderma sp.</i> , <i>Microderma sp.</i>
Desnitrificantes	Redutoras do nitrato (anaeróbios não obrigatórios)	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Hyphomicrobium sp.</i> , <i>Paracoccus sp.</i> , <i>Spirillum sp.</i> , <i>Thiobacillus sp.</i>
R.D.N.A.*	Anaeróbios obrigatórios e não obrigatórios	<i>Clostridium sp.</i> , <i>Veillonella sp.</i> , <i>Desulfovibrio sp.</i> , <i>Wolinella sp.</i> , <i>Selenomonas sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Serratia</i> <i>sp.</i> , <i>Erwinia sp.</i> , <i>Photobacterium sp.</i> , <i>Vibrio sp.</i>
	Aeróbios	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Neisseria sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>

* Redução desassimilatória do nitrato a íon amônio

Fonte: GOTTSCHALK, 1988; TIEDJE, 1988, ABREU, 1994; BROCK & MADIGAN, 1994.

A fixação do nitrogênio pode também ocorrer quimicamente na atmosfera, via descargas elétricas (relâmpagos), através da fixação industrial (indústria de fertilizantes) e por processos de queima de combustíveis fósseis (BROCK, 1994; STUMM, 1996). Alguns exemplos desse tipo de fixação podem ser observados na Tabela 3.2, equações 3 a 5. Contudo, cerca de 85% da fixação de nitrogênio na Terra

são de origem biológica, sendo que 60% da fixação biológica de nitrogênio ocorrem em ambientes terrestres, e os outros 40% nos oceanos (BROCK, 1994).

Como anteriormente observado, o nitrogênio orgânico presente nas plantas, animais e microrganismos é oxidado a íon amônio (NH_4^+) e aminonitrogênio ($-\text{NH}_2$). A partir da morte e decomposição desses indivíduos, o nitrogênio é liberado tanto no solo como nos ambientes aquáticos como íon amônio (BROCK, 1994).

TABELA 3.2 - Reações de transformação do nitrogênio.

Processos		ΔG° (pH=7) (KJ mol ⁻¹)
Fixação do Nitrogênio		
1) $0,5 \text{ N}_2 (\text{g}) + 1,5 \text{ H}_2 (\text{g}) + \text{H}^+ (10^{-7}\text{M})$	$= \text{NH}_4^+$	- 39,4
2) $0,5 \text{ N}_2 (\text{g}) + 0,75 \{ \text{CH}_2\text{O} \} + 0,75 \text{ H}_2\text{O} + \text{H}^+ (10^{-7}\text{M})$	$= 0,75 \text{ CO}_2 + \text{NH}_4^+$	- 60,3
Oxidação do Nitrogênio (combustão, automóveis, fontes termais)		
3) $0,5 \text{ N}_2 (\text{g}) + 0,5 \text{ O}_2 (\text{g})$	$= \text{NO} (\text{g})$	86,6
4) $\text{NO} (\text{g}) + 0,5 \text{ O}_2 (\text{g})$	$= \text{NO}_2 (\text{g})$	- 35,2
5) $0,5 \text{ N}_2 (\text{g}) + 1,25 \text{ O}_2 (0,2 \text{ atm.}) + 0,5 \text{ H}_2\text{O}$	$= \text{NO}_3^- + \text{H}^+ (10^{-7}\text{M})$	- 25,7
Nitrificação		
6) $\text{NH}_4^+ + 1,5 \text{ O}_2 (0,2 \text{ atm.})$	$= \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+ (10^{-7}\text{M})$	- 290,4
7) $\text{NO}_2^- + 0,5 \text{ O}_2 (0,2 \text{ atm.})$	$= \text{NO}_3^-$	- 72,1
Desnitrificação		
8) $\text{NO}_3^- + 1,25 \{ \text{CH}_2\text{O} \} + \text{H}^+ (10^{-7}\text{M})$	$= 0,5 \text{ N}_2 (\text{g}) + 1,75 \text{ H}_2\text{O} + 1,25 \text{ CO}_2 (\text{g})$	-594,6
Redução Desassimilatória de Nitrato a Íon Amônio (R.D.N.A.)		
9) $\text{NO}_3^- + 2 \{ \text{CH}_2\text{O} \} + 2 \text{ H}^+ (10^{-7}\text{M})$	$= \text{NH}_4^+ + 2 \text{ CO}_2 (\text{g}) + \text{H}_2\text{O}$	- 655

Fonte: STUMM, 1996

O nitrogênio existente na forma de íon amônio servirá como produto para as reações de nitrificação. Nos processos biológicos de transformação do íon amônio, existe a participação de dois grupos de bactérias. O primeiro, responsável pela

oxidação a nitrito é constituído pelas Nitrosobactérias, e o segundo, responsável pela oxidação do nitrito a nitrato, pelas Nitrobactérias (Tabela 3.1). Os compostos reduzidos de nitrogênio são fontes de energia para a bactéria (ABREU, 1994). As reações envolvidas neste processo são apresentadas na Tabela 3.2 (Equações 6 e 7). Estes processos envolvem a incorporação direta do oxigênio molecular a óxidos de nitrogênio, e a liberação de íons hidrogênio provenientes da oxidação do íon amônio. Como pode ser observado na Figura 3.1, a conversão do íon amônio em nitrato resulta na mudança do estado de oxidação do nitrogênio do seu estado mais reduzido (-3) para a forma mais oxidada (+5) (TATE, 1995).

O nitrato pode ser assimilado (redução assimilatória do nitrato) ou desassimilado, através da desnitrificação ou da redução desassimilatória do nitrato a íon amônio (R.D.N.A) (Tabela 3.3). Em ambientes anaeróbios, existe grande concentração de íon amônio e nitrogênio orgânico, os quais inibem ou tornam insignificante o processo de redução assimilatória do nitrato (TIEDJE, 1988), mas favorecem os processos desassimilatórios. As reações de desnitrificação e de R.D.N.A. podem ser observadas na Tabela 3.2, equações 8 e 9.

As reações de transformação dos compostos de nitrogênio envolvem muitas enzimas, como por exemplo a nitrogenase, que leva à formação do íon amônio; a amônia monooxigenase, que produz a hidroxilamina (NH_2OH) e a nitrato redutase, que transforma nitrato em nitrito (GOTTSCHALK, 1988).

TABELA 3.3 - Mecanismos de redução biológica do nitrato.

Processos	Via de intermediários livres	Regulado por	Grupos de organismos
Mecanismo Assimilatório			
Redução assimilatória do nitrato	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	NH_4^+ , nitrogênio orgânico	plantas, fungos, algas e bactérias
Mecanismo Desassimilatório			
Desnitrificação	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	O_2	bactérias aeróbias, que podem crescer utilizando nitrato ou nitrito
R.D.N.A.*	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	O_2	bactérias anaeróbias e facultativas

* Redução desassimilatória do nitrato a íon amônio

Fonte: TIEDJE, 1988

3.3 Mecanismos biológicos de redução do nitrato

Os compostos inorgânicos de nitrogênio são os mais comuns aceptores de elétrons na respiração anaeróbia. Um dos mais comuns aceptores de elétrons é o nitrato (NO_3^-), o qual é convertido em formas mais reduzidas de nitrogênio, N_2O , NO , N_2 (Figura 3.1).

Existem dois mecanismos de redução do nitrato: assimilatória e desassimilatória. A redução assimilatória do nitrato ocorre em todas as plantas e na maioria dos fungos, bem como na maioria dos procariontes, enquanto a redução desassimilatória do nitrato é restrita aos procariontes (BROCK, 1994).

A redução assimilatória do nitrato leva à formação do íon amônio, que será utilizado para a biossíntese celular (Tabela 3.3). Este processo ocorre sob condições aeróbias e anaeróbias, não resultando em rendimento energético, e o produto, íon amônio, não é excretado para o meio. A redução é regulada pelo íon amônio e não é

afetada pelo oxigênio. A quantidade de nitrogênio reduzido é proporcional aos requerimentos celulares para a produção de biomassa (TIEDJE, 1988).

Como a redução assimilatória do nitrato está intimamente ligada à produção de biomassa, esse é catalisado por todos os organismos capazes de usar nitrato como fonte de nitrogênio. O íon amônio, produto final do processo, é incorporado à planta ou à biomassa bacteriana (TATE, 1995).

A redução desassimilatória pode se processar de duas maneiras: desnitrificação ou redução desassimilatória do nitrato a íon amônio (R.D.N.A). Esses processos, ocorrem em ambiente anaeróbico, e são regulados pelo oxigênio, mas não são afetados pelo íon amônio (Tabela 3.3) (TIEDJE, 1988). Ao contrário do que ocorre com a redução assimilatória, o nitrogênio reduzido não é utilizado pela célula (TIEDJE, 1988).

As bactérias desnitrificantes são preferencialmente aeróbias e têm a capacidade alternativa de reduzir óxidos de nitrogênio quando o oxigênio torna-se limitante. Segundo ABREU (1994), a capacidade de realizar a desnitrificação encontra-se em uma ampla variedade de grupos fisiológicos de microrganismos, como pode ser observado na Tabela 3.1. A desnitrificação é um processo de bastante interesse, entre várias razões por remover o excesso de nitrogênio sob a forma de nitrato no tratamento de despejos, completando o ciclo natural do nitrogênio (TIEDJE, 1988).

A R.D.N.A tem sido verificada em bactérias de metabolismo fermentativo, em contraposição à desnitrificação presente em bactérias de metabolismo oxidativo (TIEDJE, 1988). Entre os anaeróbios facultativos, a capacidade de reduzir o nitrato a íon amônio é bastante comum (ABREU, 1994). Alguns exemplos de gêneros de bactérias que realizam a R.D.N.A. estão apresentados na Tabela 3.1. Os microrganismos capazes da R.D.N.A. são amplamente distribuídos na natureza, incluindo habitats tais como, solo, água doce, água do mar, sedimentos, sistemas de tratamento de despejos e trato gastrointestinal de animais.

A principal importância da redução desassimilatória do nitrato a íon amônio é que ela conserva o nitrogênio combinado, em contraste com a desnitrificação, e portanto, seria benéfica em ambientes não eutróficos (TIEDJE, 1988).

A primeira reação na via das R.D.N.A. é a redução do nitrato a nitrito, (Tabela 3.3), denominada respiração do nitrato. Este passo é acoplado à produção de energia na maioria dos organismos. Apesar de necessário, não é o passo limitante na R.D.N.A.. Além do mais, o nitrito formado pelas respiradoras de nitrato da R.D.N.A. poderia prontamente ser convertido em gás pelas desnitrificantes presentes na comunidade. Portanto, o passo crítico na R.D.N.A. é a conversão do nitrito em íon amônio (TIEDJE, 1988).

A R.D.N.A. seria benéfica para a célula bacteriana pois constituiria um mecanismo de retirada do nitrito acumulado no meio, uma reserva de elétrons que permitiria a reoxidação do NADH, e a produção de energia através do transporte de elétrons por fosforilação oxidativa, como ocorre na redução do nitrito pelas desnitrificantes. Desses benefícios, o mais postulado é o da reserva de elétrons (TIEDJE, 1988).

A redução desassimilatória do nitrato em íon amônio pode ocorrer nos mesmos habitats em que ocorre a desnitrificação, gerando uma competição microbiológica pelo nitrato. Segundo ABREU (1994), existem estudos que demonstram que tanto a relação C/N como a natureza da fonte de carbono influem na competição entre a desnitrificação e a R.D.N.A.. Em termos gerais, uma relação C/N alta favorece a R.D.N.A., já que em condições de limitação de aceptores de elétrons, favorece-se a via que permite a eliminação de maior número de elétrons. Ao contrário, em condições de limitação de substrato, favorece-se a desnitrificação, que permite a obtenção de maior quantidade de energia por mol de substrato consumido.

Por outro lado, tem-se demonstrado (AKUNNA* apud ABREU, 1994) que as bactérias fermentadoras de um lodo metanogênico transformam parte do nitrato em nitrogênio amoniacal (R.D.N.A.) quando substratos fermentativos estão presentes.

3.4 Importância dos processos de tratamento na remoção de compostos nitrogenados

Os ecossistemas aquáticos possuem a capacidade de suportar, até um certo limite, a entrada de material proveniente das atividades humanas, devido ao desenvolvimento industrial, comercial e residencial, que provoca a poluição dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos por fertilizantes, pesticidas, inseticidas, óleos, percolados tóxicos de aterros sanitários, enfim uma enorme variedade de efluentes industriais e os sanitários (VAZOLLER, 1995a).

As interferências geradas nos sistemas aquáticos são, portanto, de diferentes origens, e aquelas resultantes do lançamento de efluentes industriais e sanitários são de difícil controle, principalmente devido à diversidade e quantidade das fontes de emissão (VAZOLLER, 1995a).

Os compostos de nitrogênio nos efluentes de estações de tratamento de águas residuárias apresentam interesse de estudo, tendo em vista os efeitos secundários que provocam no meio aquático e na saúde do homem.

Segundo CAMPOS (1989), um fator que deve ser levado em consideração, é que o lançamento de nitrogênio no meio, em determinadas formas, depende das circunstâncias do ambiente (aeróbio, anaeróbio e anóxico) e das condições bióticas e abióticas. A interação dessas condições alteram as formas de nitrogênio e mudam, conseqüentemente, a resposta do impacto que seria provocado pela ação que desencadeou o processo.

* AKUNNA, J. C. (1993). *Dépollution azotée des Efluentes Methanisés*. Tesis de Doctorado. Université Paris XII - Val de Marne.

Elevadas concentrações do íon amônio podem ter implicações ecológicas, como por exemplo, influenciar fortemente a dinâmica do oxigênio dissolvido no meio, uma vez que, para oxidar 1,0 miligrama do íon amônio, são necessários cerca de 4,3 miligramas de oxigênio. Portanto, o lançamento de um efluente contendo um elevado valor de DBO nitrogenada (devido aos compostos de nitrogênio), poderá resultar em consumo de oxigênio, devido à nitrificação, o que pode interferir, de forma bastante negativa, no ambiente e influenciar a comunidade de peixes. Por outro lado, em pH básico o íon amônio se transforma em amônia, que, dependendo de sua concentração, pode ser tóxica para estes organismos (ESTEVES, 1988).

Além disso, a eutrofização artificial, que pode ser considerada como uma reação em cadeia de causas e efeitos bem evidentes, cuja característica principal é a quebra da estabilidade do ecossistema (ESTEVES, 1988), é ocasionada pela liberação de nitratos e fosfatos, nutrientes que favorecem o aumento da massa celular de algas no corpo de água receptor (VAZOLLER, 1995a).

Dependendo das circunstâncias locais, a remoção de todas as formas de nitrogênio ou apenas do íon amônio pode ser requerida. Ambos os objetivos podem ser alcançados economicamente em sistemas biológicos de tratamento.

Estes estão intrinsecamente relacionados ao metabolismo microbiano que selecionam. Em outras palavras, os biorreatores que operam sob condições de aeração possibilitam o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, que através da respiração aeróbia oxidam as moléculas orgânicas (processos biológicos aeróbios de tratamento). Nos biorreatores anaeróbios, por sua vez, são selecionados microrganismos capazes de crescer através do metabolismo fermentativo ou pela respiração anaeróbia (processos biológicos anaeróbios de tratamento). Portanto, a oxidação dos compostos orgânicos pode ocorrer por diferentes vias do metabolismo microbiano, possibilitando o desenvolvimento de vários aspectos da engenharia dos biorreatores e resultando em variantes dos processos tradicionais aeróbios e

anaeróbios (VAZOLLER, 1995a). A Tabela 3.4 lista alguns sistemas biológicos empregados no saneamento básico, bem como algumas de suas funções.

Como pode ser observado na Tabela 3.4, os sistemas para a remoção dos compostos nitrogenados envolvem os mecanismos de nitrificação e desnitrificação. A combinação desses processos nos sistemas de tratamentos convencionais de resíduos é comum e conta com condições apropriadas para estimular ambas as comunidades bacterianas, isto é, bactérias nitrificantes e desnitrificantes.

TABELA 3.4- Sistemas biológicos e funções específicas.

Sistemas biológicos	Funções
Lagoas de estabilização	Fornecimento natural de oxigênio pelo desenvolvimento de algas em lagoas construídas para degradação microbiana de compostos orgânicos poluentes, e conversão em dióxido de carbono e água
Lodos ativados, filtros biológicos, lagoas aeradas e valos de oxidação	Degradação microbiana de compostos orgânicos poluentes através do metabolismo aeróbio, facilitado pela disponibilidade artificial de oxigênio em reatores ou em lagoas, e conversão em dióxido de carbono e água
Sistemas de nitrificação	Conversão de compostos orgânicos nitrogenados e íon amônio em nitratos
Sistemas de desnitrificação	Conversão de nitratos em nitrogênio gasoso
Sistema alternado anóxico e aeróbio para remoção de nutrientes	Remoção de nutrientes, particularmente fosfatos
Biodigestão anaeróbia	Degradação microbiana de compostos orgânicos em ácidos orgânicos, álcoois, hidrogênio, dióxido de carbono e metano

Fonte: VAZOLLER, 1995a

Atualmente novas perspectivas com relação à conversão microbiana de compostos nitrogenados têm sido elucidadas, como mostrado no trabalho de JETTEN et al. (1997), em que são relatados nos últimos anos, os novos processos microbianos e os de aplicação tecnológica. Esse trabalho mostra uma visão dessas pesquisas

incluindo a oxidação anaeróbia do íon amônio, que será abordada posteriormente nesta revisão.

3.5 Presença de compostos nitrogenados na biodigestão anaeróbia de esgotos sanitários

O esgoto sanitário é composto de constituintes físicos, químicos e biológicos. É uma mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas, suspensas ou dissolvidas na água. A maior parte da matéria orgânica consiste em resíduos alimentícios, excretos humanos e de animais, matéria vegetal, sais minerais, e materiais diversos, como sabões e detergentes sintéticos. Alguns destes são sólidos, outros estão em solução e alguns em suspensão coloidal (TORRES, 1992).

Segundo METCALF & EDDY (1991), a água residuária municipal de origem predominantemente doméstica contém nitrogênio nas formas orgânica e íon amônio. Esses são primariamente produtos residuais originados do metabolismo de proteínas no corpo humano. No esgoto sanitário, cerca de 60% do nitrogênio estão na forma orgânica (proteínas e uréia) e 40%, na forma de íon amônio. A decomposição bacteriana de proteínas e a hidrólise da uréia transformam nitrogênio orgânico em íon amônio.

METCALF & EDDY (1991) apresentam a composição do nitrogênio presente no esgoto sanitário dividida em três grupos de acordo com sua concentração: fraca, média e forte, como pode ser observado na Tabela 3.5.

O nitrogênio total inclui o nitrogênio orgânico (nitrogênio na forma de proteínas, aminoácidos e uréia), íon amônio (produzido como primeiro estágio da decomposição do nitrogênio orgânico), nitrito e nitrato (praticamente ausentes no esgoto bruto). O nitrogênio total é um nutriente indispensável para o desenvolvimento dos microrganismos no tratamento biológico. O nitrogênio orgânico e o íon amônio

compreendem o denominado nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (von SPERLING* apud VALLEJOS, 1997).

TABELA 3.5- Concentração do nitrogênio presente no esgoto sanitário, mg/L

Formas de nitrogênio	Concentração		
	Forte	Média	Fraca
Orgânico	35	15	8
Íon amônio	50	25	12
Nitrito	0	0	0
Nitrato	0	0	0
Total	85	40	20

Fonte: METCALF & EDDY (1991)

Em trabalhos anteriormente publicados (VIEIRA, 1988; BARBOSA & SANT'ANNA, 1989) sobre a biodigestão anaeróbia de esgotos sanitários "in natura", observou-se sistematicamente a presença de nitrogênio gasoso nas determinações do biogás produzido, em teores na faixa de 20 a 30%, considerados elevados na fermentação metânica (MERGAERT et al., 1992). TORRES (1992) encontrou teores semelhantes durante a biodigestão anaeróbia de esgoto sanitário sintético.

No trabalho realizado por VIEIRA (1988), foi estudada a biodigestão anaeróbia de esgotos sanitários, empregando-se um biodigestor de fluxo ascendente e manta de lodo (Reator UASB). Numa primeira etapa do trabalho, foi realizado um experimento em escala piloto, que consistiu na operação contínua de um reator com capacidade de 106 L, com esgoto sendo estabilizado por 7 meses à temperatura de 35°C. O lodo de esgoto digerido com 1% de sólidos totais foi utilizado como inóculo. Depois de 4 meses, a estabilidade do processo foi alcançada, e o processo foi então operado por outros três meses com tempo de detenção hidráulico constante (4 horas).

* von SPERLING, M. (1996). *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Vol. 1 e 2. Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais.

O tratamento apresentou uma eficiência de 72% de remoção de DBO, 65% de remoção de DQO, 61% de remoção de sólidos suspensos e 70% de coliformes fecais.

A composição do gás formado neste experimento foi de: 75% de metano, 20% de nitrogênio e 5% de gás carbônico.

Numa segunda fase do trabalho, o reator foi operado com lodo de esgoto doméstico nas condições de temperatura ambiente e tempo de detenção hidráulico de 4 horas. A eficiência de remoção na época do verão e inverno foi basicamente a mesma, devido à pequena variação na temperatura média de 22°C no verão e 20°C no inverno. A eficiência de remoção ficou próxima a 65%. Neste caso, a composição do gás variou muito pouco em relação ao apresentado acima, ou seja, 72% de metano, 22% de nitrogênio e 6% de gás carbônico.

Após a realização do experimento em escala piloto, um novo reator foi construído, com capacidade de 120 m³ e operado com tempo de detenção hidráulico médio de 4 horas. A produção de gás foi continuamente medida e sua composição determinada a cada dia, sendo esta de 70% de metano, 22% de nitrogênio e 8% de gás carbônico.

As características do afluente e do efluente em relação aos compostos de nitrogênio para o biodigestor de 120 m³, durante todo período de experimento, podem ser verificadas na Tabela 3.6.

TABELA 3.6 - Características do afluente e efluente em relação aos compostos nitrogenados para o digestor de 120 m³ durante todo o período de experimento

PARÂMETRO	Afluente (mg/L)	Efluente (mg/L)
NTK	25	26
N-NH ₄ ⁺	15	20

Fonte: VIEIRA (1988)

Os microrganismos encontrados no lodo granulado foram espécies de bactérias metanogênicas *Methanobacterium sp* e *Methanothrix sp*, espécies de redutoras do íon sulfato, *Desulfovibrio sp* e *Desulfotomaculum sp* e acidogênicas pertencentes ao grupo dos clostrídios (NOVAES et al., 1988).

BARBOSA & SANT'ANNA (1989) realizaram um trabalho de pesquisa relacionado ao tratamento de esgoto sanitário em um reator UASB. O experimento desenvolvido com esgoto de uma área residencial típica utilizou um reator de 120 L de capacidade, operando com temperatura variando entre 19 e 28°C e tempo de detenção hidráulico de 4 horas, durante 9 meses.

A Tabela 3.7 mostra as concentrações dos compostos de nitrogênio presentes no afluente. Também é apresentada a porcentagem de remoção dos compostos de nitrogênio, que foi acompanhada durante os nove meses de experimento.

Os dados referentes à composição do gás mostram que foram produzidos 69% de metano, 26% de nitrogênio e 5% de gás carbônico.

TABELA 3.7 - Concentração de compostos de nitrogênio presentes no afluente e porcentagem de remoção dos mesmos no reator UASB

Parâmetro	Afluente (mg N/L)	Remoção (%)
NTK	54	26
N-NH ₄ ⁺	30	-

Fonte: BARBOSA & SANT'ANNA (1989)

Os autores afirmaram (dados não mostrados) ter sido encontrada no efluente uma concentração mais alta de nitrogênio na forma de íon amônio. Isto foi explicado pela conversão biológica do nitrogênio orgânico em nitrogênio na forma de íon amônio durante a degradação da matéria orgânica nitrogenada.

Neste trabalho, foram encontradas diferentes tipos morfológicos formando os grânulos, entre eles cocos, cadeias de cocos, sarcinas e bactérias filamentosas.

No estudo realizado por TORRES (1992), foi utilizado um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), com volume total de 10,5 L, sendo que o mesmo foi operado em duas etapas. A primeira empregou como inóculo a adição de um volume de 4,5 L de lodo digerido, proveniente de um biodigestor aplicado ao tratamento de esgotos sanitários, e numa segunda etapa, foi utilizado lodo granulado proveniente de um biodigestor de uma indústria de suco de laranja.

Na primeira etapa, o reator foi operado à temperatura ambiente (22 a 24°C), com esgoto sintético preparado em laboratório com uma DQO média de 500 mg/L. O sistema foi operado em quatro fases, em que foram modificados o tempo de detenção hidráulico, a vazão e a carga orgânica. Através dos resultados obtidos, foi verificado que a composição do gás apresentava altas concentrações de nitrogênio, sendo a composição do biogás gerado formada de 75% de metano, 22% de nitrogênio e 3% de gás carbônico. Os resultados obtidos neste reator operado com esgoto sintético foram semelhantes aos apresentados nos trabalhos citados anteriormente (VIEIRA, 1988; BARBOSA & SANT'ANNA, 1989), para esgotos sanitários tratados em reatores anaeróbios. Quando o reator foi operado com lodo granulado, todos os parâmetros foram mantidos, e o sistema foi operado em cinco condições diferentes.

Nos dados do autor, verificou-se no afluente o nitrogênio total na faixa de 15 a 99 mg/L e de 1 a 13 mg/L para o nitrogênio amoniacal.

Observações microscópicas do lodo na primeira etapa indicaram a presença de bacilos fluorescentes, de diferentes tamanhos, e alguns cocos e bactérias em formato de sarcina, que também apresentaram autofluorescência. Esse lodo apresentou diferentes morfologias celulares, sem o predomínio de um único tipo morfológico. Para as observações realizadas com o lodo proveniente de um biodigestor de uma indústria de suco de laranja, foi constatada a presença de morfologia típica de células pertencentes ao gênero *Methanothrix sp.* Em pequeno número foi observada a morfologia celular das sarcinas metanogênicas. Após um período de 79 dias de operação foi verificado o predomínio morfológico de bacilos metanogênicos, com

características morfológicas de bactérias hidrogenotróficas (utilizam hidrogênio e dióxido de carbono como substrato).

3.6 Transformação biológica anaeróbia do nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso

O tratamento anaeróbio é um processo cada vez mais aplicado para a diminuição da matéria orgânica em diferentes águas residuárias. Por sua vez, os efluentes do tratamento anaeróbio apresentam todo o nitrogênio na forma de nitrogênio amoniacal, visto que, em condições de metanogênese, o nitrogênio proveniente das proteínas é liberado como íon amônio (ABREU, 1994).

Para minimizar este problema, tem-se procurado associar o tratamento anaeróbio ao aeróbio, com o objetivo de diminuir a concentração de íon amônio no efluente tratado (ABREU, 1994).

Recentemente, têm surgido trabalhos que mostram a transformação biológica anaeróbia do nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso por vias que não necessitam da interação dos sistemas anaeróbios com os aeróbios.

MULDER et al. (1995) demonstraram a ocorrência de uma transformação anaeróbia do nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso por uma “nova” rota, em que se observou a ocorrência da reação apresentada na Tabela 3.8, equação 3, em um reator de leito fluidificado tratando efluente de um biodigestor metanogênico, acrescido de uma fonte de nitrato.

No trabalho de MULDER et al. (1995), assim como em trabalho anterior de van de GRAAF et al. apud MERGAERT et al. (1992), a possibilidade de oxidação do íon amônio em sistemas anaeróbios, desde que na presença de nitrato, seria mediada pela ação de uma bactéria. A variação de energia livre dessa reação, $\Delta G^\circ = -297$ KJ/mol de NH_4^+ , seria suficiente para sustentar o crescimento celular (van de GRAAF

et al., 1995). A existência dessa rota alternativa de formação microbiana de nitrogênio gasoso em sistemas anaeróbios foi denominada ANAMMOX (“Anaerobic Ammonium Oxidation”), e sua ocorrência pode ser observada sob ausência completa de oxigênio (van de GRAAF et al., 1995; JETTEN et al., 1997).

TABELA 3.8 - Energia livre de Gibbs de algumas reações envolvidas na desnitrificação e na oxidação do íon amônio.

Equação	Reação	ΔG°
1	$2NO_3^- + 5H_2 + 2H^+ \rightarrow N_2 + 6H_2O$	- 1.121 KJ/reação
2	$8NO_3^- + 5HS^- + 3H^+ \rightarrow 4N_2 + 5SO_4^{2-} + 4H_2O$	- 3.721 KJ/reação
3	$3NO_3^- + 5NH_4^+ \rightarrow 4N_2 + 9H_2O + 2H^+$	- 297 KJ/mol NH_4^+
4	$NH_4^+ + 2O_2 \rightarrow NO_3^- + H_2O + 2H^+$	-349 KJ/mol NH_4^+
5	$8NH_4^+ + 6O_2 \rightarrow 4N_2 + 12H_2O + 8H^+$	- 315 KJ/mol NH_4^+

Fonte: MULDER et al. (1995)

A Tabela 3.8 mostra algumas reações envolvidas na desnitrificação e oxidação do íon amônio. Observando-se as reações, pode-se verificar que a eq. (1) representa a desnitrificação mediada por microrganismos, sendo uma reação bastante favorável, e tendo como produto o nitrogênio gasoso. Quando comparamos a eq. (3), reação teórica, com a equação 4, reação de nitrificação, pode-se dizer que o balanço de energia livre da primeira é aproximadamente tão favorável quanto o processo de nitrificação, o que em termos energéticos permitiria que os microrganismos realizassem qualquer uma das reações, dependendo da disponibilidade de matéria orgânica.

Os estudos de MULDER et al. (1995) foram realizados, primeiramente, utilizando-se um reator de leito fluidificado operado continuamente. Esse era um reator de leito fluidificado de vidro com capacidade para 23 L, sendo operado a 36°C e pH 7, e inoculado com uma população microbiana proveniente de um reator de desnitrificação. O reator foi inoculado com areia coberta com um biofilme formado por bactérias desnitrificantes, originário de experimentos anteriores. Isto resultou no

rápido crescimento do leito fluidificado, o qual atingiu um volume de 13 L depois de um período de 4 semanas. A altura do leito fluidificado foi mantida a um nível constante pela remoção da areia coberta de biofilme do topo do leito e a adição de areia limpa. O líquido anóxico desgaseificado do topo do reator era recirculado para aumentar o fluxo aproximadamente de 255 L/h, a fim de manter o leito fluidificado à velocidade superficial do líquido de 30 - 34 m/h. O tempo de retenção hidráulico foi de 4,2 h. O afluente do reator de desnitrificação, fornecido à taxa de 5 - 6 L/h, era originado do reator metanogênico, que era operado com água residuária de uma indústria de produção de levedura de pão, e continha (mg/L):, 550 - 750 de DQO; 165 - 190 de COT; 25 -150 de SO_4^{2-} ; 90 - 130 de S^{2-} ; 90 - 130 de NH_4^+ -N. A solução de nitrato (75g NaNO_3/L) foi fornecida separadamente a uma taxa de cerca de 450 mL/h. O potencial redox da água do processo foi mantido continuamente na faixa de 150 a 250 mV, através do controle do fornecimento da água residuária que abastecia o reator.

TABELA 3.9 - Performance do reator de desnitrificação antes e depois do início da oxidação anaeróbia do íon amônio.

	Antes	Depois
Produção de gás (mL/L alimento)	80	200
Produção de sulfato (mg/L)	400	375
Oxidação dos ácidos orgânicos voláteis (mg DQO/L)	20 - 40	25 - 45
Remoção de carbono orgânico total (mg COT/L)	15 - 40	20 - 50
NO_3^- no efluente (mg N/L)	160 - 200	40 - 120
NO_2^- no efluente (mg N/L)	25	0 - 12
"perda" de NH_4^+ (mg N/L)	0	60 - 100
Taxa de remoção de Nitrogênio ($\text{KgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	0,7	1,5
pH	7,2	6,9

Fonte: MULDER et al. (1995)

Na Tabela 3.9, podem ser observadas as análises realizadas antes e depois do início da oxidação anaeróbia do íon amônio, no sistema contínuo. Verifica-se que a

produção de gás aumentou depois do início da oxidação anaeróbia do íon amônio, bem como a taxa de remoção de nitrogênio. A concentração tanto do nitrato quanto do nitrito abaixou após o início da oxidação. Antes do início da oxidação, não havia diminuição da concentração de íon amônio (NH_4^+), o que passou a ocorrer depois do início.

A remoção do íon amônio poderia ser dividida em dois períodos. Durante o primeiro período, a concentração de íon amônio do afluente e efluente era a mesma; e no segundo, a concentração no efluente foi decrescendo constantemente. Ao final do experimento, quase todo o íon amônio tinha sido convertido. Os autores dizem que a explicação vista como óbvia para esta remoção seria a ocorrência da nitrificação aeróbia, resultando na produção de nitrato ou nitrito. No entanto, ela lhes pareceu improvável porque as concentrações desses compostos no efluente haviam decrescido (Tabela 3.9). Além disso, a taxa de remoção do íon amônio devido à nitrificação teria requerido oxigênio disponível para que a reação ocorresse. Isto era muito improvável devido às precauções tomadas para evitar contaminação com oxigênio. No segundo período, a produção de gás e a taxa de consumo de nitrato também aumentou, e o pH caiu. A diminuição na concentração de íon amônio não pode simplesmente ser explicada pela incorporação na biomassa, porque a produção da mesma permaneceu estável durante o experimento. Estes fatores, analisados conjuntamente, indicaram que a melhor explicação para a conversão do íon amônio foi a ocorrência da oxidação anaeróbia do íon amônio a N_2 , reação dada na Tabela 3.8, eq. (3).

Após a realização desse experimento com o reator de leito fluidificado, foi montado um experimento descontínuo, realizado para confirmar a relação entre a conversão de íon amônio e aumento da utilização de nitrato. O inóculo utilizado foi proveniente do reator de leito fluidificado, sendo transferido à temperatura controlada (36°C), para um reator agitado intermitentemente com um volume de 2,4 L. Esse inóculo continha 252,6 g de partículas de areia e 40,1 g de biomassa (SSV), correspondendo à cobertura do biofilme de 159 mg SSV/g. O experimento foi iniciado com a adição de 4,0 g de NH_4NO_3 , seguida por 3 outras de 5,3, 3,3 e 2,3 g

NaNO₃ depois de 123, 341 e 557 h, respectivamente. As concentrações de íon amônio, nitrato e nitrito, a produção de gás e os níveis de redução de sulfato foram monitorados.

Analisando os resultados do experimento descontínuo, pode-se observar que a remoção do íon amônio coincidiu com a remoção de nitrato, cessando a remoção quando o nitrato esgotava, e recomeçando quando nitrato era novamente fornecido. A produção de gás seguia o mesmo comportamento da remoção de íon amônio, ou seja, aumentava durante o período de conversão do íon amônio e parava quando o nitrato era esgotado. A redução do sulfato iniciou quando o nitrato esteve esgotado, e cessou logo que o nitrato era adicionado, confirmando que bactérias desnitrificantes são ativas e mantêm o potencial redox em níveis adequados para a desnitrificação, ao invés da redução do sulfato. A quantidade de nitrato e íon amônio consumida durante o experimento foi equivalente a 2,55 L de N₂. A produção de gás medida dava um valor similar de 2,80 L de N₂, suportando a hipótese que o íon amônio e nitrato estavam sendo usados para produzir N₂ (eq. (3) da Tabela 3.8).

Após a constatação da ocorrência da oxidação anaeróbia do íon amônio através da pesquisa realizada por MULDER et al. (1995), van de GRAAF et al. (1995) realizaram um trabalho visando a verificação da participação microbiológica no processo ANAMMOX. Para a realização dos experimentos, o inóculo foi obtido de um reator de desnitrificação com leito fluidificado (mesmo reator utilizado por MULDER et al., 1995; para os experimentos contínuos). O meio foi suplementado com diferentes concentrações de íon amônio e nitrato para a realização de todos os experimentos descontínuos. Frascos de soro foram estaticamente incubados no escuro a 37°C. Cada frasco continha 460 mL de água residuária tratada (pH 7,0) e 40 mL de lodo (inóculo). A concentração inicial do íon amônio e nitrato foi ajustada pela adição de NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, ou NaNO₃. As concentrações iniciais de NH₄⁺-N e NO₃⁻-N foram de 75 a 115 e 360 a 430 mg/L, respectivamente. A concentração de sulfato-S foi de 80 e 130 mg/L, e dependeu da performance do sistema de tratamento da água

residuária. Foram tomadas várias precauções para evitar a contaminação com oxigênio, a fim de que o experimento fosse realizado sob condições anaeróbias.

Para os experimentos com lodo esterilizado, o mesmo foi submetido ao calor ou irradiação gama. No experimentos de inibição, diferentes quantidades de antibióticos ou inibidores foram adicionados aos frascos antes da incubação, sem informações sobre os tipos de antibióticos e inibidores. Durante a preparação do experimento, diferentes volumes de inóculo foram utilizados (0, 10, 20, 30 e 40 mL), sendo necessário que o volume final dentro dos frascos de soro fosse completado até 500 mL com meio de cultura.

Os experimentos com sistemas operados sob condições descontínuas mostraram que o íon amônio e o nitrato foram convertidos simultaneamente. Segundo os autores, pela estequiometria da eq. (3) (Tabela 3.8), e considerando as concentrações utilizadas de íon amônio e nitrato, somente 30% do nitrato convertido poderiam ser atribuídos à oxidação do íon amônio. Foi assumido que os 70% remanescentes foram desnitrificados durante a degradação da matéria orgânica (eq. (1) da Tabela 3.8). Os estudos da atividade microbiana apresentaram um ponto importante a ser registrado: a atividade de remoção do íon amônio aumentou com o aumento da quantidade de lodo adicionado ao meio, o que confirma a natureza biológica da oxidação anaeróbia do íon amônio. Os experimentos com lodo esterilizado e adicionado de inibidores revelaram que realmente a oxidação anaeróbia do íon amônio ocorreu através da ação microbiana. A esterilização do lodo ou água residuária pela radiação gama ou autoclavagem impediu a remoção do íon amônio durante os experimentos. Frascos de cultivo controle (com lodo não tratado) mostraram um decréscimo de 110 mg/L de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ durante o mesmo período. Sem a adição do lodo, e sempre com água residuária não esterilizada, a concentração de íon amônio não decresceu. Além disso, as concentrações de nitrato, nitrito e sulfato não mudaram em nenhum dos experimentos que usavam amostras de lodo esterilizado ou água residuária.

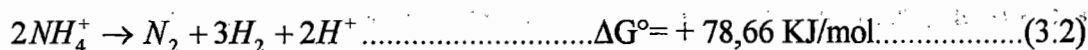
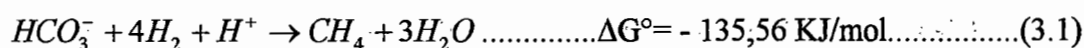
Para a verificação da procedência do gás nitrogênio formado durante o experimento, foram realizados estudos utilizando traçadores. Estes estudos com íon amônio (^{15}N) foram feitos usando-se o reator de leito fluidificado (MULDER et al., 1995), no qual a reação ANAMMOX estava ocorrendo. Durante os experimentos com traçadores, o reator foi operado de forma descontínua, com líquido recirculado sem a alimentação. No início do experimento, 4,5 g de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram fornecidos à cultura no reator, obtendo-se uma concentração final de 45 mg de N/L. Os experimentos-controle foram feitos pela adição de íon amônio não marcado ou sem nenhuma adição. A produção de gás foi monitorada durante o experimento.

Trabalhando-se apenas com N_2 não marcado produzido e precursores de ^{15}N marcados, três combinações de N isótopos foram possíveis, $^{14-14}\text{N}_2$, $^{14-15}\text{N}_2$ e $^{15-15}\text{N}_2$. Após a adição de $^{15}\text{NH}_4^+$, o resultado do N_2 marcado deveria causar uma mudança nos valores da m/z 28, 29 e 30, dependendo como a ligação N-N era formada. Depois que o íon amônio ($^{15}\text{NH}_4^+$) foi adicionado, um grande aumento do m/z 29 $^{14-15}\text{N}_2$ foi observado, e uma pequena quantidade de $^{15-15}\text{N}_2$ (m/z 30) foi também determinada. As m/z 45 e 46 não aumentaram durante esses experimentos, indicando que N_2O marcado não foi formado. O pequeno aumento da m/z 31 foi, portanto, devido à formação do óxido nítrico marcado (^{15}NO). Este representava somente uma quantidade traço do total de produtos finais marcados. Durante os experimentos-controle com íon amônio marcado e não marcado, m/z 29, 30 e 31 não mudaram. Dos estudos realizados com nitrogênio marcado, pôde-se, portanto, concluir que o principal produto da oxidação anaeróbia do íon amônio é o gás nitrogênio.

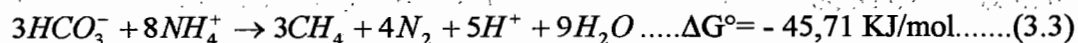
Como pode ser observado os experimentos com íon amônio, nitrogênio do nitrogênio amoniacal foram incorporados no produto final da reação ANAMMOX, N_2 . O gás nitrogênio marcado, $^{14-15}\text{N}_2$, foi o produto dominante, formando 98,2% do total de gás nitrogênio marcado produzido. Somente 1,7% foi $^{15-15}\text{N}_2$. Estas conclusões não estão completamente de acordo com a reação global da equação 3 (Tabela 3.8) proposta por MULDER et al. (1995). Desta reação, era esperado que 75% do nitrogênio marcado seria do tipo $^{14-15}\text{N}_2$ e 25%, do tipo $^{15-15}\text{N}_2$, por causa da

relação estequiométrica 5:3 da oxidação do íon amônio para a redução do nitrato. Por causa da baixa produção de biomassa, a assimilação do íon amônio foi assumido não ser significativo dentro do período do experimento.

No trabalho desenvolvido por BHADRA et al. (1987), é proposta uma outra via biológica para a produção de N₂ nos sistemas anaeróbios. Esta via consiste na fermentação da uréia em íon amônio, e deste em nitrogênio e metano. A estequiometria e os valores de energia livre a pH 7 são mostrados nas reações a seguir:



A reação global é a seguinte:



Desta forma, a reação total que envolveria a redução do bicarbonato e a oxidação do íon amônio e produção de metano é termodinamicamente viável. De acordo com a estequiometria, a conversão de 1 g de uréia [CO(NH₂)₂] poderia produzir 280 mL de metano.

Segundo BHADRA et al. (1987), a oxidação do íon amônio em sistemas metanogênicos seria interessante, pois aumentaria a produção de metano, sendo o íon amônio proveniente da degradação da uréia, uma fonte potencial de hidrogênio. Os autores realizaram um trabalho de pesquisa utilizando um reator de filme fixo com 14 L de capacidade total, operado à temperatura constante de 35°C. O biofilme do material suporte foi desenvolvido pela passagem de uma suspensão celular de crescimento metanogênico em colunas de 20 L, em meio sintético. Após a formação do biofilme, as colunas foram alimentadas utilizando-se água residuária de uma fábrica de papel, e além disso, um meio mineral adicionado de ácidos orgânicos (acético,

propiónico e butírico; 45:1,5:1,5). A produção total de gás foi medida a cada 6 -12 horas com medidor de gás.

A produtividade do metano foi mais alta (cerca de 15%) do que o valor teórico, considerando-se a estequiometria da conversão de ácidos. A mistura sintética, contudo, continha uma fonte não adicional de hidrogênio, e foi considerado o íon amônio (da uréia).

A hipótese acima foi testada através de um experimento contendo uma mistura de ácido acético (2,0 g/L), ácido propiónico (1,0 g/L) e ácido butírico (1,0 g/L) em solução salina basal contendo várias concentrações de uréia. A reação foi deixada por 15 dias contínuos, e amostras foram coletadas em dias alternados para a medida da concentração de ácidos e o nitrogênio total no líquido. O gás envolvido foi passado através de um frasco contendo ácido hidrocloreto 2 N para absorver o íon amônio presente na fase gasosa. Como mostrado na Tabela 3.10, houve uma perda substancial do nitrogênio total no líquido. O grau de nitrogênio perdido foi essencialmente independente da concentração inicial de uréia. A solução de ácido hidrocloreto foi encontrada sem conter N-amoniaco, o que implica que não houve significativa perda de íon amônio no gás. É provável que o íon amônio tenha sido usado como uma fonte de hidrogênio para a redução do dióxido de carbono. Após 15 dias, mais de 90% dos ácidos orgânicos foram consumidos.

TABELA 3.10 - Concentração de nitrogênio total na solução sintética.

Parâmetro	Concentração inicial de uréia (g/L)		
	0,6	1,0	1,5
Concentração inicial de nitrogênio (mg/L)	310	505	730
Concentração final de nitrogênio (mg/L)	120	297	517,3
Remoção de nitrogênio em 15 dias (mg/L)	190	208	212,5
Produção estimada de metano da uréia (mL/L)	114	124,8	127,5

Fonte: BHADRA et al. (1987)

Para a formação final de metano e nitrogênio, tem-se duas reações que poderiam ser realizadas por dois grupos distintos de bactérias, formando uma co-cultura.

O trabalho não apresentou nenhuma informação sobre a produção de nitrogênio gasoso.

3.7 Técnicas empregadas ao estudo de bactérias anaeróbias

3.7.1 Microcosmos - Enriquecimento de bactérias anaeróbias em ensaios descontínuos

Como anteriormente visto, ensaios biológicos descontínuos podem ser utilizados para enriquecer culturas de interesse, intensificando o metabolismo desejado. O enriquecimento de bactérias anaeróbias pode ser facilmente obtido empregando-se as técnicas para a manipulação de anaeróbios.

A retirada do oxigênio da atmosfera nos frascos experimentais e do meio de cultura, bem como, a necessidade de homogeneização dos frascos durante os ensaios, a fim de promover a mistura da atmosfera gasosa empregada, particularmente se o gás for substrato para o crescimento das culturas em estudo, ou usado para controlar o pH do meio, são técnicas importantes aplicadas no enriquecimento de bactérias anaeróbias (VAZOLLER, 1995b).

Os procedimentos possíveis para a remoção do oxigênio e preparação de meios reduzidos seguem as técnicas propostas por HUNGATE* apud VAZOLLER (1995b), denominada "Técnica de Hungate" para a manipulação de anaeróbios estritos.

* HUNGATE, R. E. (1969) A roll-tube for Cultivation of Strict Anaerobes. In: Norris, J. R.; Ribbons, D. W., Eds. *Methods in Microbiology*. New York, Academic. v. 38, p 117-132.

A "Técnica de Hungate" (HUNGATE apud VAZOLLER, 1995b) ficou bastante conhecida, pois desenvolveu o procedimento básico empregado até hoje para a maioria dos sistemas que visam à remoção de traços de oxigênio dos gases a serem utilizados na atmosfera de frascos e tubos de ensaio, durante o cultivo de anaeróbios estritos. Assim, foi adaptada uma coluna de vidro preenchida com limalha de ferro, que aquecida e previamente lavada com fluxo de 100% hidrogênio, mantinha o ferro em seu estado reduzido. Os gases como nitrogênio, dióxido de carbono e hidrogênio, ou mistura dos mesmos, ao passarem por esta coluna, antes de serem introduzidos nos frascos com meio de cultivo, eram descontaminados de traços de oxigênio. A limalha de ferro em seu estado reduzido reagia com o oxigênio presente no gás introduzido, retendo-o no sistema.

Outros pesquisadores, como BALCH* et al. apud VAZOLLER (1995b) construíram um tubo com várias ligações, após a coluna de cobre aquecida, no qual fazia-se passar um gás a ser distribuído em vários frascos (tubos de ensaio, frascos de soro e de antibióticos) ao mesmo tempo, sob pressão controlada. Esse sistema facilitou os trabalhos de distribuição de meios de cultivo e soluções, em anaerobiose.

A técnica de MILLER & WOLLIN* apud VAZOLLER (1995b) foi desenvolvida para a preparação de um meio de cultivo basal sob fluxo gasoso, seguida pela distribuição do meio em frascos de antibiótico ou de soro, fechados com batoque de borracha e lacre de alumínio. A adição de soluções com fontes de carbono, vitaminas, agente redutor e outras, assim como o inóculo, era feita após a autoclavação, através de seringas de insulina, ou de seringas com volumes maiores, se necessário. As soluções adicionadas após a autoclavação eram também mantidas sob anaerobiose.

* BALCH, W. E.; FOX, G. E.; MAGRUM, J. L.; WOESE, C. R.; WOLFE, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*, v. 43, p. 260-96.

* MILLER, T. L.; WOLLIN, M. J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology*, v. 27, p. 985-7.

Como observado por HUNGATE e LJUNGDAHL & WIEGEL* apud VAZOLLER (1995b), que a retirada física do oxigênio dos frascos de ensaio não era suficiente para manter a anaerobiose no meio de cultivo. Para isso, foram utilizados agentes redutores no meio, tais como sulfeto de sódio, cisteína, tiosulfato de sódio e ditionito de sódio. Pelo uso de soluções contendo os agentes redutores (soluções redutoras) garantiram-se potenciais de oxi-redução bastante baixos, como os requeridos pelas metanobactérias, da ordem de -330 mV. As soluções redutoras mais comuns empregadas nos meios de cultivo para bactérias metanogênicas e algumas não-metanogênicas têm sido as constituídas pela mistura de sulfeto de sódio e cisteína hidrocloreídica, ou somente por sulfeto de sódio. As soluções são preparadas de forma mais concentrada para a adição posterior ao meio de cultivo autoclavado, através de alíquotas; e para tanto são estocadas sob atmosfera inerte de 100% nitrogênio. O indicador de potencial de oxi-redução mais comum foi indicado por HUNGATE apud VAZOLLER (1995b), a resazurina, que a -110 mV é incompletamente incolor.

Segundo DUBORGUIER* apud VAZOLLER (1995b), a base do enriquecimento de culturas é a utilização da fonte energética e específica dos diferentes grupos bacterianos. Além disso, o meio basal dos anaeróbios deve conter as fontes de nitrogênio, como amônia, uréia e aminoácidos; fósforo, como fosfato; enxofre, como sulfetos, cisteína, metionina, mercaptanas, tiosulfatos e ditionatos. Os sais, em geral, são os de sódio, potássio, magnésio e cálcio, e os elementos-traço, constituídos basicamente por metais, incluem representantes como o ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio, alumínio, cobalto, níquel, selênio, entre outros. As fontes de vitaminas compreendem a faixa conhecida para os microrganismos, notadamente as vitaminas do complexo B. Fatores de crescimento ou estimulatórios

* LJUNGDAHL, L.; WIEGEL, J. (1984). Working with anaerobic bacteria. In: Manual of industrial microbiology and biotechnology. Eds. A. L. Demain e N. A. Solomon, Washington, *American Society Microbiology*, p. 84-96.

* DUBORGUIER, H. C. (1987). *Curso Ecologia da Digestão Anaeróbia*. São Paulo, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB.

são encontrados no extrato de levedura e nos fluidos de biodigestores e do rúmen de animais. O controle do pH nos meios, pode ser feito pela presença do dióxido de carbono somado às soluções de sais inorgânicos e orgânicos tais como, bicarbonato, fosfato, tris (hidroximetil) amino metano, PIPES piperazina dietanosulfônico e HEPES [(hidroxi-2-etil)-4-piperazinil 1]-2-etanosulfônico.

3.7.2 Microscopia

Para o isolamento e identificação dos microrganismos, são necessários certos conhecimentos em relação às condições de crescimento, morfologia das células e demais características que auxiliem o trabalho experimental (VARESCHE, 1997).

As técnicas para a identificação de espécies de culturas anaeróbias metanogênicas e redutoras do íon sulfato empregam, principalmente, análises microscópicas da morfologia das células, após a obtenção das culturas em meios específicos. A microscopia de campo claro sob contraste de fase, epifluorescência e a laser, bem como a de alta resolução por varredura e transmissão são ferramentas essenciais para a determinação do tamanho, forma e constituição das paredes celulares das diferentes espécies bacterianas (VAZOLLER, 1995b).

DODDEMA & VOGELS* apud VAZOLLER (1995b) foram os primeiros a sugerir a identificação das espécies metanogênicas pela microscopia de fluorescência com filtros de luz apropriados, em função de duas coenzimas específicas para essas bactérias, a F_{420} e a F_{350} , responsáveis pela fluorescência de células metanogênicas jovens e velhas quando submetidas a determinados comprimentos de onda luminosos (420 e 350 nm). A leitura da fluorescência pela técnica apresentada mostrou que a excitação luminosa a 420 e 350 nm, resultava em cores amarelo-esverdeadas e azuladas, respectivamente. Os autores referiram que diferentes filtros usados na

* DODDEMA, H. J.; VOGELS, G. D. (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 36, 752-4.

microscopia podem levar à excitação dos dois fatores em conjunto, e a fluorescência final a ser azul-esverdeada.

A microscopia de fluorescência tem sido amplamente utilizada na análise direta de lodos anaeróbios provenientes de sedimentos aquáticos e biodigestores, o mesmo ocorrendo com a microscopia de campo claro sob contraste de fase, que permite uma clara distinção da morfologia das células metanogênicas e não-metanogênicas predominantes no lodo anaeróbio (VAZOLLER, 1995b).

DUBOURGUIER apud VAZOLLER (1995b) indicou a preparação de amostras de lodos e culturas puras em soluções de diluição e análise imediata sob contraste de fase. Os resultados revelaram as morfologias predominantes em culturas mistas, que suportados pelas respostas de crescimento em fontes orgânicas específicas permitiram a identificação presuntiva das espécies cultivadas.

O exame de amostras de culturas puras e mistas sob microscopia eletrônica de varredura (ARAUJO, 1995) e de transmissão pode auxiliar na identificação das metanogênicas com distintas morfologias e estruturas celulares.

A observação microscópica direta pode ser empregada para análises da composição qualitativa da biomassa bacteriana (VAZOLLER, 1995b).

3.7.3 Cromatografia

A cromatografia gasosa é um instrumento bastante utilizado para a análise quantitativa dos gases liberados ou produzidos durante os processos de enriquecimento de bactérias anaeróbias.

Os processos biológicos de tratamento de rejeitos incorporam uma variedade de espécies microbianas e, portanto, uma versatilidade metabólica bastante grande, verificando-se, por exemplo, bactérias capazes de degradar compostos complexos e

artificialmente sintetizados pela atividade industrial, como também, bactérias que degradam apenas moléculas orgânicas tão simples quanto o ácido acético, e produzem um poderoso combustível, o gás metano (VAZOLLER, 1995b). Essa atividade metabólica pode ser medida através de um acompanhamento cromatográfico da atmosfera dos frascos de cultivo onde está ocorrendo o processo de transformação dos compostos presentes nos frascos.

A técnica da cromatografia gasosa baseia-se na diferente distribuição das substâncias (gases ou substâncias voláteis) da amostra, entre a fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (GIANOTTI, 1994).

Segundo GIANOTTI (1994) e COLLINS (1997), a amostra, através de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização dessas substâncias, que, de acordo com as interações de suas propriedades físico-químicas com as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação dessas substâncias.

A cromatografia gasosa é uma técnica com poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Dependendo do tipo de substância analisada e do detector empregado, detectam-se cerca de 10^{-12} g.

A técnica de desenvolvimento mais usada na cromatografia gasosa é a eluição. Uma corrente de gás passa continuamente pela coluna e, quando a amostra vaporizada é introduzida rapidamente nessa corrente de gás, ela é arrastada através da coluna. As substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detector, que gera um sinal para o registrador.

De acordo com o tipo de fase estacionária usada, a cromatografia gasosa pode ser classificada gás-sólido e cromatografia gás-líquido.

Na cromatografia gás-sólido, um sólido finamente dividido funciona como fase estacionária. A separação baseia-se na adsorção física e química das substâncias presentes na amostra no sólido (fase estacionária) e nas suas volatilidades. Substâncias com a mesma capacidade de serem adsorvidas pela fase estacionária podem ser separadas se apresentarem volatilidades diferentes. Este sólido deve ser constituído de partículas com diâmetros regulares, para que as colunas resultantes apresentem uma maior eficiência. Os principais adsorventes usados em cromatografia gás-sólido são os polímeros porosos como os da "Porapak" e "Chromosorb Century Series".

A fase móvel, sendo gasosa, torna possível um equilíbrio rápido entre ela e a fase estacionária, fazendo da cromatografia gasosa um sistema altamente eficiente.

Um cilindro contendo o gás sob alta pressão serve como fonte de gás de arraste (fase móvel), que levará as substâncias presentes na amostra para fora da coluna, quando não estiverem interagindo com a fase estacionária. Os gases mais usados como fases móveis são o nitrogênio, hélio, hidrogênio e argônio. O gás de arraste não deverá interagir com o recheio da coluna, deverá apresentar alta pureza e ser compatível com a fase estacionária.

Após a obtenção do cromatograma, faz-se a integração dos sinais, que têm por finalidade transformar a intensidade do sinal emitido pelo detector em uma medida relacionada com a quantidade da substância analisada na amostra. A integração dos sinais pode ser feita usando-se os seguintes métodos: altura do pico, área do pico e peso do pedaço de papel delimitado pelo pico. Recentemente têm sido usados integradores eletromecânicos ou eletrônicos.

Para o cálculo da porcentagem da substância presente na amostra, pode ser usada a calibração externa. Este método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas dessa mesma substância em soluções-padrão com concentrações conhecidas. São preparadas várias soluções em diversas concentrações da substância a ser quantificada para a obtenção do cromatograma correspondente a cada uma delas; em um gráfico, são relacionadas as áreas obtidas com as concentrações. Através deste gráfico são calculadas as concentrações da substância na amostra.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Introdução

A análise do comportamento de microrganismos anaeróbios na oxidação do íon amônio, realizada no presente estudo, empregou procedimentos de manipulação de microrganismos anaeróbios estritos, segundo a literatura clássica (HUNGATE; BRYANT; MILLER & WOLIN; BALCH et al. apud VAZOLLER, 1995b), bem como as técnicas comumente utilizadas (DUBOURGUIER, 1987) no Laboratório de Processos Anaeróbios - Área de Microbiologia do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP.

Considerando-se os trabalhos disponíveis (BHADRA et al., 1987; MULDER et al., 1995; van de GRAAF et al., 1995) sobre a oxidação anaeróbia do íon amônio na produção biológica de nitrogênio, os experimentos foram divididos em quatro grupos, a saber: - o primeiro compreendeu ensaios de enriquecimento em meio de cultura mineral (ZINDER et al. apud VAZOLLER, 1995b), contendo como fonte do íon amônio o NH_4Cl ; o segundo empregou, nos ensaios de enriquecimento, meio de cultura mineral acrescido do íon amônio na forma de NH_4NO_3 ; - no terceiro experimento, foram realizados ensaios de enriquecimento em meio de cultura mineral e NH_4Cl como fonte de íon amônio, sob atmosfera de H_2/CO_2 (70 - 30%), - no quarto, os ensaios foram subdivididos em três grupos: o primeiro contendo meio de cultura mineral acrescido de formiato de sódio sob atmosfera de 100% Hélio, o segundo contendo meio mineral e atmosfera de 100% Dióxido de Carbono, e o terceiro, meio de cultura mineral acrescido de extrato de lodo sob atmosfera de H_2/CO_2 (70 - 30%).

Nos quatro grupos de experimentos, foram realizadas modificações nas operações, de acordo com a evolução do sistema e análise dos resultados.

As análises de acompanhamento dos ensaios envolveram: - análises de produção de gás, através de cromatografia gasosa; - análises microscópicas do lodo, através de microscopia de fluorescência, contraste de fase e varredura; - determinações da concentração do íon amônio (KOLOLEFF, 1976).

4.2 Enriquecimento das culturas bacterianas

O enriquecimento das culturas bacterianas teve por objetivo o desenvolvimento de microrganismos capazes de crescer em meio mineral contendo nitrogênio amoniacal como principal fonte de energia. Para isto, foram utilizados meios de cultivo seletivos e condições adequadas para o desenvolvimento das culturas desejadas, a partir dos inóculos estudados.

O crescimento de culturas de bactérias anaeróbias foi obtido através de procedimentos que incluíram a manutenção da anaerobiose estrita no meio.

4.2.1 Procedimentos para a manipulação de culturas bacterianas anaeróbias

Os experimentos foram realizados sob condições de anaerobiose estrita. Para a manutenção da anaerobiose dentro dos frascos de reação (frascos de Duran de 500 mL, e de antibiótico de 250 mL e 30 mL) e dos frascos de soluções-estoque (frascos de soro e de antibióticos), foram utilizados os seguintes gases: - Hélio puro, grau analítico; - mistura de gases 70% de hidrogênio e 30% de dióxido de carbono (padrão dos gases - White-Martins). Os gases foram introduzidos nos frascos através de um sistema de distribuição simultânea de gases descrito por VAZOLLER (1995b). Além disso, antes de chegarem ao sistema de distribuição simultânea, os gases passavam por uma coluna catalítica capaz de reter traços de oxigênio presentes em toda a linha de condução do fluxo gasoso, bem como nos próprios cilindros de gases

(VAZOLLER, 1995b). Este sistema de distribuição simultânea de gases e coluna catalítica pode ser observado na Figura 4.1.

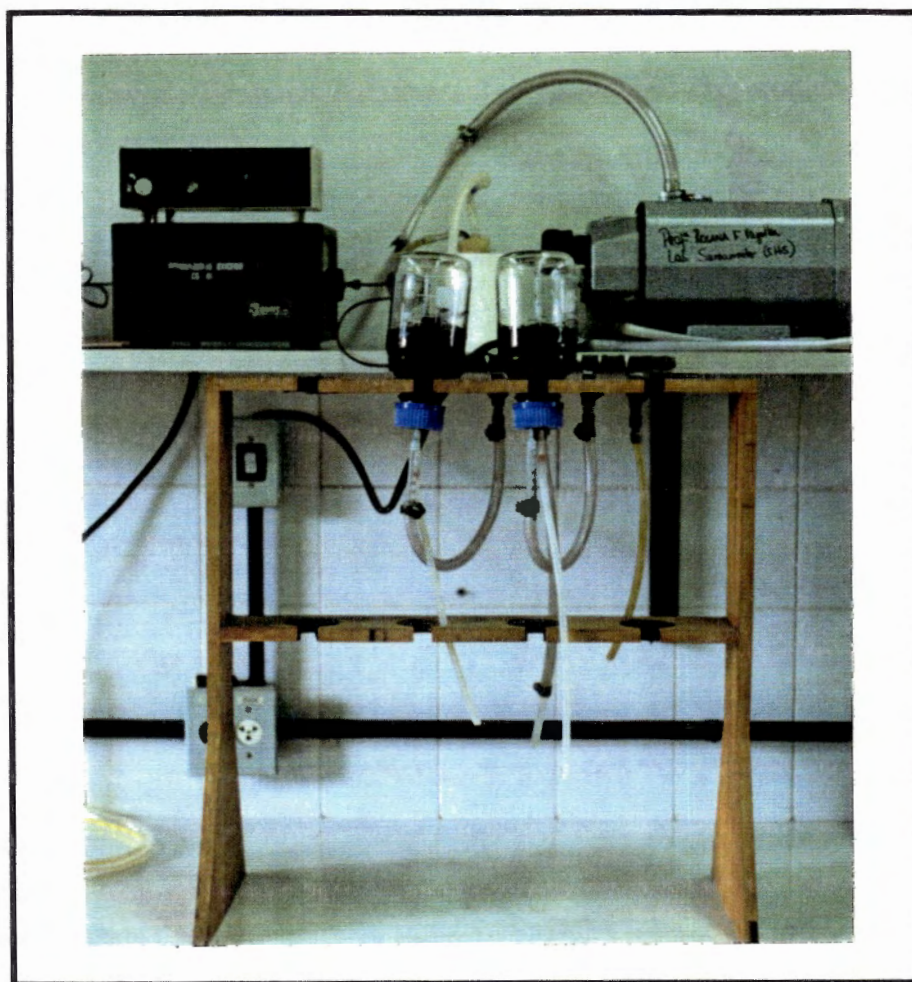


FIGURA 4.1 - Procedimentos da troca de atmosfera dos frascos de Duran contendo meio de cultura, utilizando-se o sistema de distribuição simultânea de gases e coluna catalítica do Laboratório de Processos Anaeróbios do Departamento de Hidráulica e Saneamento (LPA-SHS-EESC-USP).

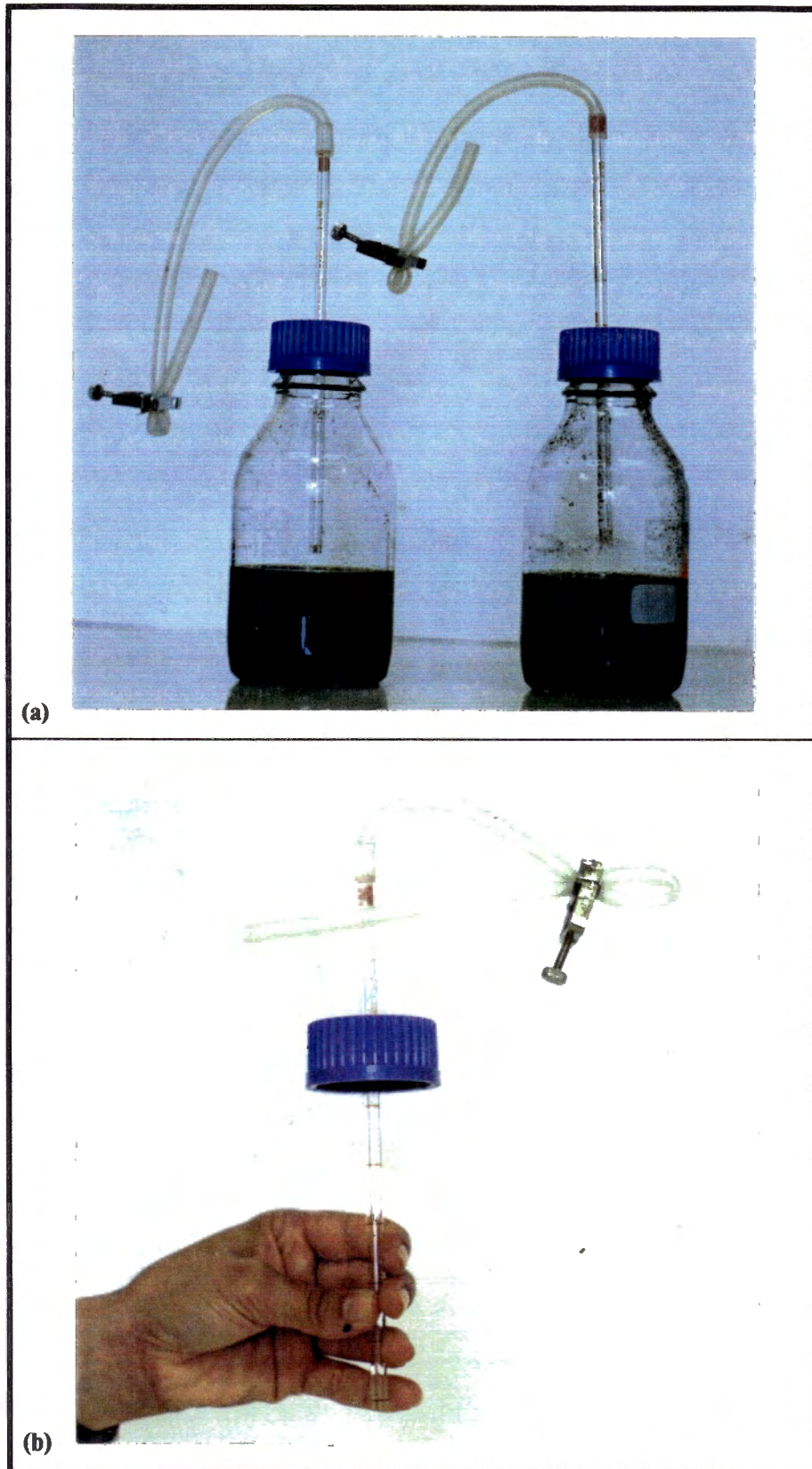
Para a manutenção das condições anaeróbias nos meios e soluções, os frascos devem ser firmemente fechados, através de lacres ou tampas de rosca. Os frascos de Duran de 500 mL foram fechados com rolhas de borracha de butila e roscas de plástico. As rolhas perfuradas foram traspassadas por tubos de vidro, conectados em mangueiras de silicone e fechadas com presilhas do tipo Hoff (Figura 4.2 A e B). Esta adaptação teve por objetivo facilitar a troca de atmosfera dos frascos, visando a

eliminação máxima do nitrogênio comumente encontrado na atmosfera, e portanto, nos frascos de cultivo.

Como pode ser observado na Figura 4.1, durante a troca de atmosfera dos frascos, o gás fornecido pelo sistema de distribuição simultânea de gases era introduzido através de uma agulha estéril (precedida de um filtro ACRODISC - 0,22 μm) conectada ao frasco, e após fluir pela atmosfera livre do frasco, era liberado através da mangueira de silicone. Transcorridos aproximadamente 10 minutos, a mangueira era fechada simultaneamente ao desligamento do fluxo de gás. Por sua vez, os frascos de soro eram fechados com roscas de alumínio e rolhas de borracha de butila; e os frascos de antibióticos, com batoques de borracha de butila e lacres de alumínio, após a troca de atmosfera. Esta era feita utilizando-se agulhas estéreis ligadas ao sistema de distribuição simultânea de gases e a uma bomba de vácuo. A agulha era inserida na rolha de borracha e ligava-se à bomba a vácuo por aproximadamente um minuto, para retirar o gás presente no frasco, e, em seguida, ligava-se o fluxo de gás, para preencher a atmosfera livre do frasco de reação. Esta operação era repetida quatro vezes, com o objetivo de obter uma melhor troca de atmosfera, do mesmo modo que descrito acima, porém sem haver liberação de gás. Era também obrigatório, neste último procedimento, o uso do filtro ACRODISC - 0,22 μm antes da introdução dos gases nos frascos.

A introdução de soluções e inóculos nos frascos de reação, sob condições de anaerobiose, era feita com o auxílio de seringas estéreis, previamente lavadas com atmosfera de 100% de Hélio. A esterilidade do fluxo de gás era garantida pela passagem do gás através de seringas de vidro de 3 mL, preenchidas com algodão e adaptadas na saída de uma das mangueiras do sistema de distribuição simultânea de gases, como indicado em DUBOURGUIER apud VAZOLLER (1995b).

Todo o processo de manipulação do material, meios, soluções e culturas bacterianas foi realizado próximo ao bico de Bunsen, portanto, sob condições de assepsia.



**FIGURA 4.2 - a) Frascos de 500 mL contendo meio de cultivo;
b) Detalhe da tampa para o fechamento dos frascos de Duran de 500mL.**

4.2.2 Inóculo

O inóculo utilizado para a partida dos quatro grupos de experimentos (descritos no item 4.2.4) foi um lodo anaeróbio proveniente de um biodigestor de fluxo ascendente e manta de lodo (reator UASB) operado com esgoto sanitário (OLIVA, 1997). A concentração de inóculo utilizada foi de 20g de SSV/g de NH_4^+ . Para obter esta concentração, foram coletados 5 litros de lodo do reator e, em seguida, o material foi centrifugado a fim de descartar o sobrenadante e aumentar a concentração de SSV/L. O material foi centrifugado (Centrífuga modelo 215 da Fanem) a uma velocidade de 3.000 rpm, por 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante, obteve-se um volume final de 1.000 mL de lodo biológico. Foi determinado o valor de SSV deste material, antes da utilização do lodo como inóculo.

Em uma fase posterior ao enriquecimento das culturas, os frascos do terceiro grupo de experimentos, contendo meio de cultivo e células crescidas, foram utilizados como inóculo para os ensaios do quarto grupo de experimentos. Neste caso, não foram determinados os valores de SSV inoculados nos novos frascos de cultivo. O volume de inóculo utilizado para cada frasco foi de 80 mL.

4.2.3 Meio de Cultivo

4.2.3.1 Meio Basal Zinder

O meio de cultivo basal utilizado na realização dos experimentos (grupo 1, 3 e 4) foi o meio² descrito por ZINDER* et al. apud VAZOLLER (1995b), e está apresentado na Tabela 4.1.

² Será designado no presente trabalho como meio Zinder.

* ZINDER, S. H.; KOCH, M. (1984). Non-acetaclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, v. 138, p. 263-72.

TABELA 4.1 - Composição do meio basal Zinder.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000mL de água padrão Mili-Q
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g
solução de resazurina 0,1%	1,0 mL
solução traço de metais	10,0 mL

Fonte: ZINDER et al. apud VAZOLLER (1995b).

Para os experimentos do grupo 2, utilizando-se NH₄NO₃ como fonte de nitrato e íon amônio, o meio Zinder foi modificado, sendo o NH₄Cl substituído pelo NH₄NO₃. A concentração de NH₄⁺/L foi mantida de acordo com a utilizada no meio Zinder (Tabela 4.2).

TABELA 4.2 - Composição do meio Zinder .

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1000mL de água padrão Mili-Q
NH ₄ NO ₃	0,6 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g
solução de resazurina 0,1%	1,0 mL
solução traço de metais	10,0 mL

Fonte: modificado de ZINDER et al. apud VAZOLLER (1995b).

O meio Zinder foi preparado em erlenmyers de volume igual a 1.000 mL, e os componentes foram adicionados a 500 mL de água padrão Milli-Q (volume final de meio de cultura), de acordo com a ordem apresentada na Tabela 4.1. Após a homogeneização dos componentes, era introduzido no meio um fluxo de 100% de Hélio, através de borbulhamento por 30 minutos. Mantendo-se o fluxo no meio de cultivo, volumes de 180 mL eram distribuídos em frascos de Duran de 500 mL. O fechamento dos frascos era feito como indicado no item 4.2.1. A esterilização prévia do meio basal era feita por autoclavação, durante 20 minutos, a 120°C e 1 atm.



A composição do meio basal Zinder foi acrescida de soluções estoques, após a autoclavação. O preparo das soluções estoque e a concentração final no meio Zinder estão descritas no item 4.2.3.2.

Os ensaios realizados consideraram os aspectos favoráveis para a ocorrência da oxidação anaeróbia do íon amônio propostos na literatura anteriormente comentados, ou seja: - importância do nitrato na oxidação anaeróbia do íon amônio, como indicado por van de GRAAF et al. (1995); - comportamento do íon amônio, sob condições de metanogênese hidrogenotrófica, ou seja, apenas na presença de fontes de hidrogênio e dióxido de carbono, como indicado por BHADRA et al. (1987). Porém, a concentração de íon amônio foi mantida como indicada no meio de cultivo basal Zinder (Tabela 4.1).

4.2.3.2 Soluções-Estoque

A solução-traço de metais descrita na Tabela 4.3 foi preparada adicionando-se primeiramente o NTA à água padrão Mili-Q, seguido pelos outros componentes. O pH foi ajustado para 7,0 com uma solução 10 M de KOH. Aliquotas de 250 mL foram distribuídas em frascos de soro de 500 mL, sob fluxo de 100% de Hélio. Os frascos foram fechados com rosca de alumínio e rolhas de borracha de butila. A manutenção da solução de metais nos frascos fechados sob atmosfera de 100% de Hélio, foi feita sob refrigeração, após a esterilização em autoclave durante 20 minutos, a 120°C e 1 atm.

TABELA 4.3 - Composição da solução traço de metais do meio Zinder.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000mL de água padrão Milli-Q
NTA	4,5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,556g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,086g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,17g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,21g
H ₃ BO ₃	0,19g
NiCl ₂	0,02g
Na ₂ MoO ₄	0,01g

Fonte: ZINDER et al. apud VAZOLLER (1995b).

A solução indicadora do potencial de oxi-redução no meio de cultivo foi a de resazurina 0,1%, preparada com 0,1 g do corante resazurina diluído em 100 mL de água padrão Milli-Q. Ela era mantida sob refrigeração, em frasco âmbar, para posterior utilização.

As soluções de bicarbonato de sódio a 10%, acetato de sódio (2 M) e formiato de sódio (2 M) foram preparadas com o volume do sal dissolvido em água padrão Milli-Q. Após completa dissolução do sal, alíquotas de 10 mL eram distribuídas em frascos de antibiótico de 20 mL, sob fluxo de 100% de Hélio. Os frascos fechados com batoques de borracha de butila e lacres de alumínio eram esterilizados por autoclavação durante 20 minutos, a 120°C e 1 atm. Após a esterilização, os frascos eram mantidos à temperatura ambiente.

As vitaminas foram preparadas adicionando-se as quantidades indicadas na Tabela 4.4, em um volume igual a 1.000 mL de água padrão Milli-Q. Após a completa dissolução das vitaminas, a solução era submetida à esterilização por filtração em sistema Millipore, com filtros de 0,22 µm de porosidade, sob condições de assepsia. A solução era distribuída sob fluxo estéril de 100% de Hélio, em volumes de 250 mL nos frascos de soro de 500 mL previamente esterilizados. Os frascos eram fechados

com rolhas de borracha de butila e roscas de alumínio. A solução de vitaminas era estocada sob refrigeração.

TABELA 4.4 - Composição da solução de vitaminas

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1.000mL de água padrão Mili-Q
biotina	0,002g
ácido fólico	0,002g
tiamina. HCl	0,005g
riboflavina	0,005g
ácido nicotínico	0,005g
pantotenato de cálcio	0,005g
priridoxina. HCl	0,010g
vitamina B ₁₂	0,0001g
ácido lipóico	0,005g

Fonte: TOUZEL & ALBABAGNAC* e DUBOURGUIER apud DUBOURGUIER (1987); VAZOLLER (1995b).

A redução do meio Zinder foi feita pela adição da solução redutora, previamente preparada e mantida em estoque. No preparo desta solução, 5,0 g de Na₂S .9H₂O eram dissolvidos em 100 mL de água padrão Milli-Q. A esterilização da solução era feita por filtração rápida em membrana de 0,22 µm pelo sistema Millipore, sob condições de assepsia. A solução era distribuída em frascos de antibiótico de 20 mL previamente esterilizados, sob fluxo de 100% de Hélio, em volumes de 10 mL. Os frascos eram fechados com batoques estéreis de borracha de butila e lacrados com lacres de alumínio. A solução redutora estéril foi mantida no escuro e à temperatura ambiente.

Como anteriormente referido, o meio Zinder era acrescido de soluções-estoque após autoclavação, com alíquotas determinadas. As soluções tampão de bicarbonato de sódio a 10%, acetato de sódio, formiato de sódio e de vitaminas foram

* TOUZEL, J. P.; ALBAGANC, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiol. Letters*, v. 16, p. 241-5.

adicionadas, cada uma, em volumes de 2,5 mL, e a solução redutora em volumes de 1,25 mL para cada 250 mL de meio no frasco de ensaio.

4.2.4 Procedimentos para o enriquecimento das culturas bacterianas

O enriquecimento das culturas bacterianas foi feito utilizando-se o inóculo proveniente do reator de fluxo ascendente e manta de lodo operado com esgoto sanitário, previamente centrifugado (como descrito no item 4.2.2). As técnicas de enriquecimento empregaram o meio Zinder (ZINDER et al. apud VAZOLLER, 1995b) acrescido das soluções estoque, e distribuído em frasco de Duran (capacidade de 500 mL). Foram montados quatro grupos de experimentos:

A. Primeiro grupo de experimentos: Frascos contendo cloreto de amônio

Estes frascos continham 186,75 mL de meio Zinder acrescidos de 2,5 mL da solução de bicarbonato de sódio, 2,5 mL da solução de vitaminas e 1,25 mL da solução redutora, e por fim 57 mL do inóculo (item 4.2.2). O volume final de meio de cultivo era 250 mL. A concentração de inóculo final foi de 20 g de SSV/g de NH_4^+ . Estes frascos foram denominados Frascos 1 e 2. Nos frascos-controle (Frascos 3 e 4), o meio Zinder foi acrescido de 2,5 mL de acetato de sódio (concentração final no meio de 20 mM), além das soluções acima citadas. O volume final foi de 250 mL, sendo 184,75 mL de meio Zinder, 57 mL de inóculo e as demais soluções adicionadas no volume referido.

B. Segundo grupo de experimentos: Frascos contendo nitrato de amônio

Estes frascos foram preparados como os do primeiro grupo, só diferindo na fonte de íon amônio (NH_4Cl substituído por NH_4NO_3). Eles foram denominados de 7 e 8 e os controles, de 9 e 10.

C. Terceiro grupo de experimentos: Frascos contendo cloreto de amônio sob atmosfera de Hidrogênio e Dióxido de Carbono (70-30%)

Estes frascos foram preparados exatamente como os do primeiro grupo, diferindo somente na atmosfera constituída de uma mistura de hidrogênio e dióxido de carbono (70-30%). Os frascos foram denominados de 5 e 6.

D. Quarto grupo de experimentos: Frascos contendo cloreto de amônio

Frascos 5 A e 6 A - cultura contendo meio Zinder com NH_4Cl + formiato de sódio sob atmosfera de 100% de Hélio

Frasco 5 B e 6 B - cultura contendo meio Zinder com NH_4Cl sob atmosfera de 100% de dióxido de carbono

Frasco 5 C e 6 C - cultura contendo meio Zinder com NH_4Cl + extrato de lodo sob atmosfera de H_2/CO_2 (70 - 30%).

Os frascos utilizados neste experimento foram frascos de antibiótico de 250 mL, como podem ser observados na Figura 4.3. Eles continham 9,65 mL de meio Zinder acrescido de 0,1 mL da solução de bicarbonato de sódio, 0,1 mL da solução de vitaminas e 0,05 mL da solução redutora, e por fim 80 mL do inóculo (item 4.2.2). O volume final de meio de cultivo era 90 mL. A concentração de inóculo final não foi determinada. Os frascos 5 A e 6 A tiveram acrescido ao meio 0,1 mL da solução de formiato (concentração final de 20 mM). Para os frascos 5 C e 6 C foi adicionado 0,1 mL de solução de extrato de lodo (descrito no item 4.2.5.3).

Os frascos do terceiro e quarto grupos, após a inoculação, tiveram a atmosfera de Hélio substituída pelo gás que constituiria a sua atmosfera; o mesmo procedimento não foi utilizado para os frascos do primeiro e segundo grupos, em virtude de estes terem sido fechados sob atmosfera de 100% de Hélio, utilizado para preencher a atmosfera destes frascos.

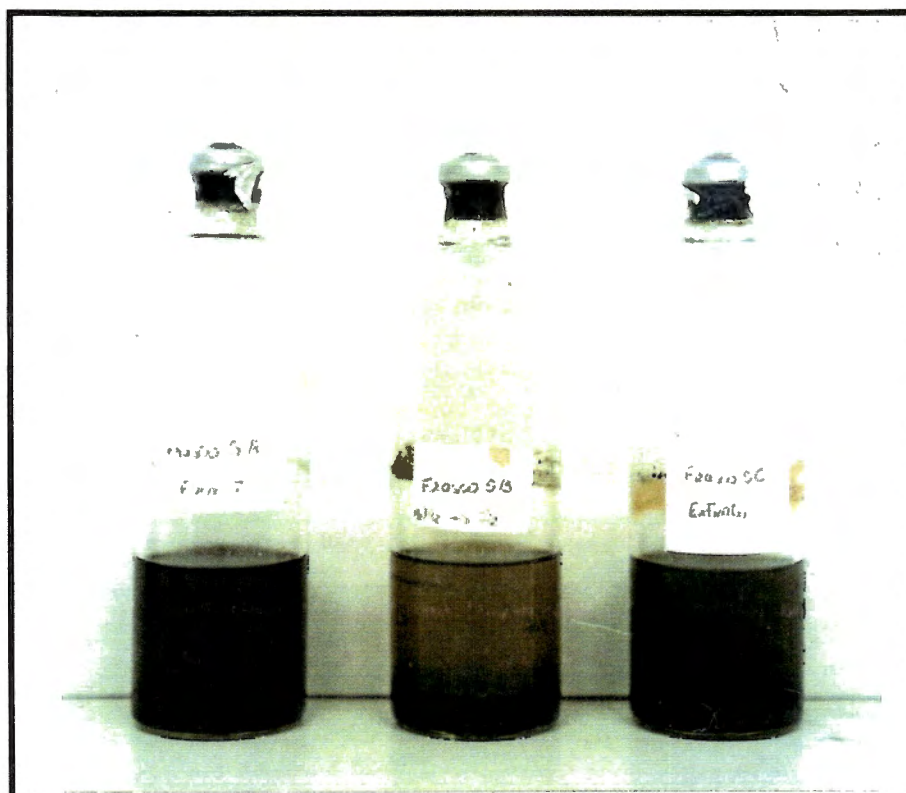


FIGURA 4.3 - .Frascos de 250 mL contendo o crescimento de células em meio de cultivo.

Os frascos foram mantidos em incubadora com agitação controlada a 60 rpm e temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, sob ausência de luz. A incubadora com agitação controlada foi da marca Superohm, modelo G25 (como descrito no item 4.2.1).

4.2.5 Operação dos frascos de reação durante o enriquecimento das culturas bacterianas

A operação dos frascos de reação tiveram como base o acompanhamento dos ensaios de enriquecimento.

4.2.5.1 Operação dos frascos do primeiro grupo de experimentos

Com base nos primeiros resultados, após transcorridos 12 dias de experimento (primeiro período), os frascos de cultivo tiveram sua atmosfera trocada por 100% de Hélio. A operação dos sistemas foi, em sua maior parte, descontínua. Porém, as

culturas receberam duas alimentações após transcorridos 41 e 112 dias de enriquecimento (segundo e terceiro períodos, respectivamente). Durante as alimentações, também a atmosfera dos frascos foi trocada. Quando eles foram acrescidos com 30 mL de meio de cultivo novo, retirou-se e descartou-se igual volume do sobrenadante do meio em reação, o qual teve uma parte utilizada para a determinação da presença de íon amônio no meio de cultivo (ver item 4.2.6.3). As duas alimentações realizadas continham o mesmo meio Zinder e soluções, acrescidos da metade da concentração inicial de íon amônio. No entanto, por volta do 74º dia de experimento, os frascos foram armazenados sob refrigeração (4°C) por 38 dias. Assim, a segunda alimentação das culturas (112 dias, terceiro período) procurou reativá-las. Nessa alimentação, a solução tampão de bicarbonato de sódio não foi acrescentada.

Os frascos desse grupo de ensaio foram monitorados por mais 26 dias, totalizando 138 dias de enriquecimento. Após transcorrido este período, os mesmos tiveram sua operação finalizada.

Depois que os frascos de reação foram retirados da refrigeração, tiveram seu sistema de fechamento trocado. Este procedimento foi realizado para evitar uma possível contaminação com nitrogênio atmosférico através das mangueiras de silicone. Eles passaram a ser fechados somente com rolhas de borracha de butila e rosca de plástico (Figura 4.4). A troca atmosférica foi realizada como descrito no item 4.2.1.



FIGURA 4.4 - Frascos de 500 ml contendo meio de cultivo, com fechamento através de rolhas de borracha de butila e rosca de plástico.

Este grupo de experimentos foi monitorado através de análises cromatográficas (item 4.2.6.1), no início diariamente, e a partir de um determinado período, de acordo com os resultados, a intervalos de dois dias. Depois foram mais espaçadas.

Durante o andamento dos experimentos, foram realizadas observações sob Microscopia óptica de campo claro sob contraste de fase e luz ultravioleta (item 4.2.6.2), a fim de acompanhar a morfologia da cultura ao longo do experimento.

4.2.5.2 Operação dos frascos do segundo grupo de experimentos

Da mesma forma, a operação dos sistemas foi em sua maior parte descontínua. Os frascos deste grupo foram alimentados e tiveram suas trocas atmosféricas após 41, 112 e 138 dias de incubação (segundo, terceiro e quarto períodos, respectivamente).

Os procedimentos de operação foram os mesmos realizados para os frascos do grupo 1, diferindo somente pelo fato de estes frascos terem sido acompanhados por mais 40 dias, tendo desta forma recebido mais uma alimentação e troca atmosférica. Os frascos do segundo grupo foram monitorados durante 178 dias de experimento.

O monitoramento deste grupo foi semelhante ao descrito para os frascos do primeiro grupo, também sendo realizadas cromatografia, análise microscópica e determinação do íon amônio.

4.2.5.3 Operação dos frascos do terceiro grupo de experimentos

Inicialmente, os frascos do grupo 3 tiveram sua operação semelhante à dos outros grupos. Eles foram alimentados e tiveram troca atmosférica após 41, 84 e 112 dias de experimento (segundo, terceiro e quarto períodos). Ao contrário dos frascos do primeiro e segundo grupos de experimentos, os desse grupo não tiveram sua operação interrompida, não foram armazenados sob refrigeração. Depois de 112 dias, estes também tiveram seu sistema de fechamento alterado.

Após 84 dias de experimento, foi verificada a formação de pressão negativa nos frascos 5 e 6, passando-se, portanto, a realizar troca atmosférica a cada 4 dias, ou seja, promovia-se o vácuo na atmosfera livre, e a mistura de hidrogênio e dióxido de carbono (70 - 30%) era introduzida no frasco de reação.

Depois de um período de 124 dias, o seu conteúdo foi subdividido para a montagem dos sistemas do quarto grupo de experimentos.

4.2.5.4 Operação dos frascos do quarto grupo de experimentos

Devido aos resultados obtidos com os frascos do terceiro grupo, o meio de cultivo enriquecido foi subdividido em três frascos nas seguintes condições: - meio Zinder acrescido por formiato na concentração final de 20 mM, sob atmosfera de

100% de Hélio (denominados frascos 5 A e 6 A); - meio Zinder sob atmosfera de 100% de dióxido de carbono (frascos 5 B e 6 B); meio Zinder acrescido por extrato de lodo, além do hidrogênio e dióxido de carbono na atmosfera do frasco (frascos 5 C e 6 C), como descrito no item 4.2.4.

O extrato de lodo utilizado nos frascos 5C e 6C, foi preparado utilizando-se o mesmo lodo empregado na inoculação dos frascos experimentais dos três primeiros grupos. Este foi primeiramente autoclavado, com o objetivo de esterilizar o lodo, e através do aquecimento promover a quebra de macromoléculas. Em seguida, foi filtrado em membranas de 0,22 μm , sob condições de assepsia. O extrato foi então inoculado nos frascos como uma fonte de nutrientes. O mesmo era adicionado em volumes de 0,1 mL para cada 10 mL de meio, mantendo desta forma, o mesmo volume adicionado de solução de vitaminas. O extrato era armazenado sob refrigeração, para posterior utilização.

Os ensaios foram acompanhados através de análises cromatográficas, microscópicas e de determinação do íon amônio durante 52 dias. A alimentação das culturas foi feita após 25 dias de enriquecimento.

Ao final do experimento, foram realizados exames das amostras por microscopia de varredura.

4.2.6 Análises para o acompanhamento dos ensaios

4.2.6.1 Análises cromatográficas das culturas bacterianas

As análises cromatográficas dos ensaios, para a avaliação da produção de gás nitrogênio, no início foram realizadas diariamente e, a partir da obtenção dos resultados foram sendo espaçadas. Para isso, foi determinada a composição do biogás formado por cromatografia gasosa. Foram preparadas curvas de calibração dos gases metano (100%), dióxido de carbônico (100%) e nitrogênio (100%), apresentadas no

Anexo A. Os procedimentos para a preparação das curvas de calibração e cálculos dos valores de cada gás nos experimentos empregaram as orientações para a "Determinação da Atividade Metanogênica em Lodos Anaeróbios", utilizadas no Laboratório de Processos Anaeróbios do SHS-EESC-USP (PENNA, 1994; ARAÚJO, 1995). Os registros davam os resultados em áreas, as quais foram transformadas em número de moles de gás, através das curvas de calibração.

O cromatógrafo a gás utilizado foi da marca Gow Mac. A coluna utilizada foi Porapak Q (comprimento de 2 metros e diâmetro interno de $\frac{1}{4}$ ", 80 a 100 mesh). O detector era de condutividade elétrica (série 150). O gás de arraste utilizado foi o Hidrogênio superseco (padrão dos gases - White-Martins), e o integrador era HP 3396 Série II. Condições de operação dos aparelhos: vazão do gás de arraste/ ca. 30mL/min; temperatura do detector, colunas e injetor = 30°C; corrente = 150mA; volume de injeção = 0,5mL.

Nas análises cromatográficas para a avaliação do gás na atmosfera dos frascos, foram empregadas seringas de vidro Hamilton Gastight de 1,0 mL. Uma válvula com trava Mininert, colocada na extremidade entre a seringa e a agulha, permitia a coleta de amostras da atmosfera dos frascos, sob as mesmas condições de pressão interna do sistema em estudo.

Na seringa, eram conectadas agulhas estéreis para evitar contaminação dos frascos de cultura. A seringa era lavada com gás Hélio antes de se retirar a amostra de gás, evitando-se, assim, a contaminação com nitrogênio atmosférico. Era injetado 0,5 mL de amostra de gás para a análise cromatográfica.

4.2.6.2 Análises microscópicas das culturas enriquecidas

As análises microscópicas das culturas permitiram acompanhar visualmente o processo de enriquecimento das mesmas.

A frequência das análises microscópicas ópticas estão apresentadas na Tabela 4.5, para os quatro grupos de experimentos.

TABELA 4.5 - Frequência, em dias, das análises microscópicas realizadas para os três grupos de experimentos.

Grupo de Experimentos	Tempo de Enriquecimento (dias)
1	0, 20, 41, 67, 120 e 152
2	0, 20, 41, 67, 120 e 198
3	0, 20, 41, 67, 120 e 198
4	0, 25, 52

Os exames sob microscopia óptica de fluorescência e contraste de fase eram realizados antes das alimentações das culturas, em aparelho da marca Olympus BHT. As fotomicrografias realizadas empregaram filmes Kodak ou Fujifilm - ASA 400.

As amostras de cultura bacterianas eram coletadas em volumes de 0,1 a 0,2 mL de meio bem homogeneizado. Elas eram colocadas em "ependorfs" de plástico de 1,5 mL e centrifugadas (Centrífuga Centrimicro modelo 212 da marca Fanem). O sobrenadante era descartado e a massa celular era ressuspensa em água padrão Milli-Q. Este material era colocado em lâminas para os exames microscópicos.

Na microscopia de campo claro sob contraste de fase, as lâminas eram previamente preparadas com uma fina camada de ágar, a qual tinha a função de absorver o excesso de água da amostra, permitindo, desta forma, uma melhor visualização das morfologias presentes no enriquecimento, e possibilitando fotos mais nítidas. As lâminas preparadas para o exame sob microscopia de fluorescência não eram preparadas com ágar.

A análise sob microscopia de varredura foi feita somente nas amostras provenientes dos frascos em que foi detectada produção de nitrogênio. Foi realizado um subcultivo destas amostras, em que um volume de 1 mL de meio cultivado dos frascos 5 C e 6 C serviu de inóculo para frascos de antibiótico de 30 mL, contendo 9

mL de meio Zinder. Estes frascos de antibiótico foram incubados em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ a fim de propiciar o crescimento das culturas bacterianas de interesse.

Para a observação das culturas bacterianas enriquecidas em microscópio eletrônico de varredura, utilizou-se o método de secagem por HMDS (Hexametildisilazano) descrito por NATION* apud ARAÚJO (1995) e ARAÚJO (1995). As amostras foram centrifugadas em "ependorfs" de 1,5 mL e, após descartar-se o sobrenadante, o material foi submetido a um tratamento que consistia na fixação, desidratação e secagem das células.

As células foram fixadas em glutaraldeído (SIGMA) 2,5%, em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3), por um período de 5 horas, à temperatura de 4°C . Após essa etapa, seguiu-se a lavagem do material em tampão fosfato, 0,1 M (pH 7,3) por 10 minutos. Repetiu-se esta lavagem mais duas vezes. A seguir, o material foi desidratado numa série gradativa de álcoois (50, 70, 80, 90, 95 e 100%), ficando cerca de 10 minutos em cada uma das concentrações. Repetiu-se a desidratação em álcool 100% mais duas vezes. Uma vez desidratado o material, ele foi secado com o HMDS. Para tanto, adicionou-se o HMDS (o suficiente para cobrir a amostra) no material por 30 segundos, 2 vezes seguidas. Retirou-se rapidamente o HMDS e deixou-se a amostra secar ao ar por 10 minutos; montaram-se os suportes colando-se o material com base de unha. Na seqüência levou-se o material, já colado, para secar em estufa a 36°C ; o tempo de permanência na estufa foi de aproximadamente 12 horas. Após este procedimento, cobriram-se as amostras com ouro (99,99%) num metalizador (SDC-050 Balzers). As amostras foram então examinadas num microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM-960 de 10 a 20 Kev, além de serem fotografadas.

* NATION, J. L. (1993) A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*, v. 58, n. 6, p 347-351.

4.2.6.3 Determinação do íon amônio presente nas culturas enriquecidas

As determinações das concentrações de íon amônio presentes nos frascos foram realizadas, utilizando-se o sobrenadante retirado durante as alimentações das culturas nos frascos de reação.

A metodologia empregada para a determinação do íon amônio foi descrita por KOLOLEFF (1976). Inicialmente, foi preparada uma solução padrão dissolvendo-se 0,661 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 1000 mL de água destilada. Esta solução-estoque continha 10 mM de NH_4^+ . Em seguida, foi diluído 0,10 mL da solução-estoque para 100 mL, esta nova solução de 10 M foi usada como padrão. Logo após, foram preparados os reagentes. O reagente A foi preparado da seguinte forma: - dissolveram-se 3,5 g de fenol e 0,04 g de nitroferrocianeto de sódio diidratado (sodium nitroprusside- $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$) em 100 mL de água padrão Milli-Q. O reagente foi guardado em recipiente plástico e escuro, sob refrigeração. O reagente B (solução oxidante) foi preparado dissolvendo-se 28 g de citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) em 75 mL de água padrão Milli-Q; em seguida, adicionou-se 2,27 g de hidróxido de sódio, e após a homogeneização foram adicionados 5,6 mL de hipoclorito. Esta solução foi diluída até completar 100 mL. Nos procedimentos de análise, foram feitas antes as checagens dos reagentes. Para isto, adicionou-se em 5 mL de água destilada, recentemente preparada, 0,2 mL do reagente A, e após homogeneização, adicionou-se 0,2 mL do reagente B. Não havendo um significativo desenvolvimento de cor azul em 10 minutos, os reagentes poderiam ser utilizados, por não estarem contaminados.

Para a determinação do nitrogênio amoniacal, eram colocados 5 mL da solução padrão, 5 mL de água padrão Milli-Q e 5 mL de amostra nos respectivos frascos para leitura da absorbância do padrão, brancos e amostras. Posteriormente, em cada frasco, dos padrão, do branco ou das amostras foram adicionados 0,2 mL de cada reagente (A e B) e homogeneizados. Os frascos eram mantidos sob ausência de luz e em temperatura ambiente por 2 horas. Depois de transcorrido este período, lia-se a absorbância das amostras, dos brancos e dos padrões em 630 nm em cubetas

passo óptico de 1 cm (Espectrofotômetro: Spectrophotometer modelo DR/400 Hach).

Para o cálculo da concentração de íon amônio (mM/L), calcula-se primeiramente o fator F pela equação:

$$F = \frac{10}{A_p - A_b}$$

A_p = média da absorvância dos padrões

A_b = média da absorvância dos brancos

em seguida a concentração de íon amônio:

$$M = F (A_s - A_b - A_i)$$

A_s = absorvância da amostra (média das réplicas)

A_b = média da absorvância dos brancos

A_i = absorvância da água padrão Milli-Q, sem os reagentes

Este método abrange a faixa de concentração de 0,02 a 20 mg/L.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

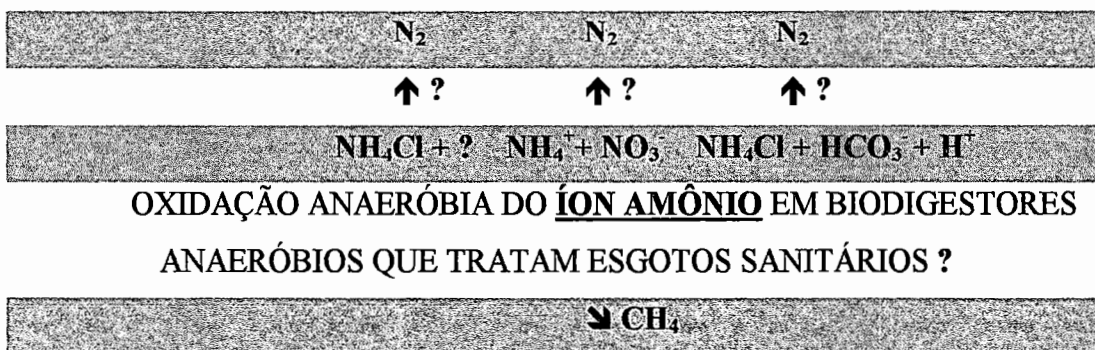
Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos durante os procedimentos para o enriquecimento de culturas bacterianas capazes de participar da produção anaeróbia de nitrogênio gasoso, a partir de nitrogênio amoniacal.

O nitrogênio amoniacal, como anteriormente apresentado no capítulo Revisão de Literatura, pode ser aerobiamente oxidado pela atividade de bactérias autótrofas nitrificantes, desde que elevada quantidade de oxigênio esteja disponível. Este metabolismo, classicamente denominado por nitrificação, é extremamente importante para a remoção de nitrogênio em processos biológicos de tratamento de resíduos, uma vez que nitritos e nitratos possibilitam uma outra ação metabólica, mediada por bactérias desnitrificantes, com a conseqüente formação de nitrogênio gasoso (MULDER et al., 1995). A existência potencial de uma bactéria quimiolitótrofa capaz de oxidar o íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso na presença de nitrato, dióxido de carbono ou oxigênio tem sido especulada desde a revisão teórica de BRODA* apud MULDER et al. (1995), em que a fundamentação desta suposição foi baseada nos cálculos termodinâmicos de reações químicas, como aqueles apresentados na Tabela 3.8, do capítulo Revisão de Literatura.

A oxidação anaeróbia do íon amônio com nitrato presente no meio em reação foi descrita por MULDER et al. (1995) (ver eq. (3) - Tabela 3.8), colaborando com a elucidação de uma das suposições de BRODA* apud MULDER et al. (1995). Além disso, uma outra teoria, formulada por BHADRA et al. (1987), supõe a provável oxidação do íon amônio sob condições metanogênicas, com a ocorrência de

* BRODA, E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17, 491-93.

transferência de hidrogênio entre espécies metanogênicas e não-metanogênicas, essas últimas possíveis responsáveis pela oxidação do íon amônio no meio em reação. As questões a serem analisadas no presente trabalho de pesquisa estão representadas no esquema a seguir:



Ou, redigindo, “*é possível a ocorrência da oxidação anaeróbia do íon amônio, com formação de nitrogênio em biodigestores anaeróbios que tratam esgotos sanitários?*”.

Os resultados dos trabalhos de van de GRAAF et al. (1995) e MULDER et al. (1995), nos quais os autores afirmaram e comprovaram a existência de um novo metabolismo microbiano em direção à “desnitrificação”, sob condições anaeróbias e metanogênicas, implica na necessidade de uma maior compreensão dos sistemas enzimáticos oxidadores do íon amônio e dos conceitos tradicionais de nitrificação e desnitrificação (ROBERTSON & KUENEN, 1991).

Os resultados da presente pesquisa e sua interpretação à luz das suposições e certezas acima mencionadas podem ser analisados sob duas visões de interesse para o processo de biodigestão anaeróbia de despejos. A primeira considera o fato de os ensaios terem sido conduzidos de modo a manter as condições metanogênicas em outras palavras, anaerobiose estrita; e a segunda permite a avaliação de uma provável oxidação do íon amônio, na presença de dióxido de carbono. Soma-se a essas duas visões uma análise crítica de interferências no metabolismo microbiano, decorrentes

dos procedimentos empregados, tradicionalmente descritos para o cultivo de bactérias anaeróbias estritas.

Os experimentos realizados durante este trabalho foram efetuados em frascos de cultivo, em que se procurou reproduzir, em nível de um microcosmo, as prováveis reações de um reator anaeróbio operando sob condições semelhantes às propostas nos experimentos. Os frascos foram operados em batelada, porém efetuaram-se algumas alimentações no sistema após a verificação do conjunto de valores dos gases analisados durante a operação dos sistemas. A utilização de frascos de reação de pequeno volume, o emprego da agitação, e a manutenção da anaerobiose estrita pela introdução do gás Hélio e solução redutora de sulfeto de sódio pareceram adequados para a simulação de um sistema anaeróbio operado em batelada. Os três tipos de análises efetuadas, cromatografia gasosa, microscopia e determinação de íon amônio foram úteis para a avaliação dos experimentos propostos. Particularmente, a análise da composição dos gases produzidos nos sistemas foi escolhida como forma de determinar o nitrogênio formado, e por isso, optou-se pelo Hélio, um gás nobre e inerte, para manter a anaerobiose nos frascos. Em geral, a manipulação de anaeróbios estritos emprega, no preparo de meios de cultivo e soluções, a mistura de nitrogênio e dióxido de carbono ou o nitrogênio puro (VAZOLLER, 1995b).

Os valores dos gases formados durante os experimentos, em mmoles/L, foram calculados a partir de curvas de calibração preparadas com padrões dos gases (grau analítico), nitrogênio, metano e dióxido de carbono (Anexo A). As análises microscópicas efetuadas nas amostras dos lodos biológicos de cada conjunto de experimentos permitiram examinar o desenvolvimento das culturas bacterianas durante o acompanhamento do processo de enriquecimento.

Os resultados estão apresentados segundo a descrição dos procedimentos no capítulo Materiais e Métodos, a saber:

A - Primeiro grupo de experimentos: Frascos contendo cloreto de amônio, sob atmosfera de Hélio

Frascos 1 e 2 - cultura em meio Zinder com NH_4Cl

Frascos 3 e 4 - cultura em meio Zinder com NH_4Cl + acetato de sódio

B - Segundo grupo de experimentos: Frascos contendo nitrato de amônio, sob atmosfera de Hélio

Frascos 7 e 8 - cultura em contendo meio Zinder com NH_4NO_3

Frascos 9 e 10 - cultura em meio Zinder com NH_4NO_3 + acetato de sódio

C - Terceiro grupo de experimentos: Frascos contendo cloreto de amônio, sob atmosfera de hidrogênio e dióxido de carbono (70% - 30%).

Frascos 5 e 6 - cultura em meio Zinder com NH_4Cl

D - Quarto grupo de experimentos: Frascos contendo cloreto de amônio

Frascos 5A e 6A - cultura em meio Zinder com NH_4Cl + formiato de sódio, sob atmosfera de Hélio

Frasco 5B e 6B - cultura em meio Zinder com NH_4Cl , sob atmosfera de dióxido de carbono

Frasco 5C e 6C - cultura em meio Zinder com NH_4Cl + extrato de lodo, sob atmosfera de H_2/CO_2 (70 - 30%).

5.1 Primeiro Grupo de Experimentos

5.1.1 Análises Cromatográficas

Os valores médios das análises de metano, dióxido de carbono e nitrogênio estão mostrados na Figura 5.1 para o primeiro grupo de experimentos (os valores médios das determinações cromatográficas se encontram em tabelas no Anexo B). Na Figura 5.1a a d pode-se avaliar o comportamento da produção dos gases durante 288 horas (12 dias) de incubação dos frascos 1, 2, 3 e 4. A concentração inicial do gás

nitrogênio, observada nos frascos de reação, decorreu provavelmente, dos procedimentos de fechamento dos sistemas de reação sob atmosfera gasosa de Hélio.

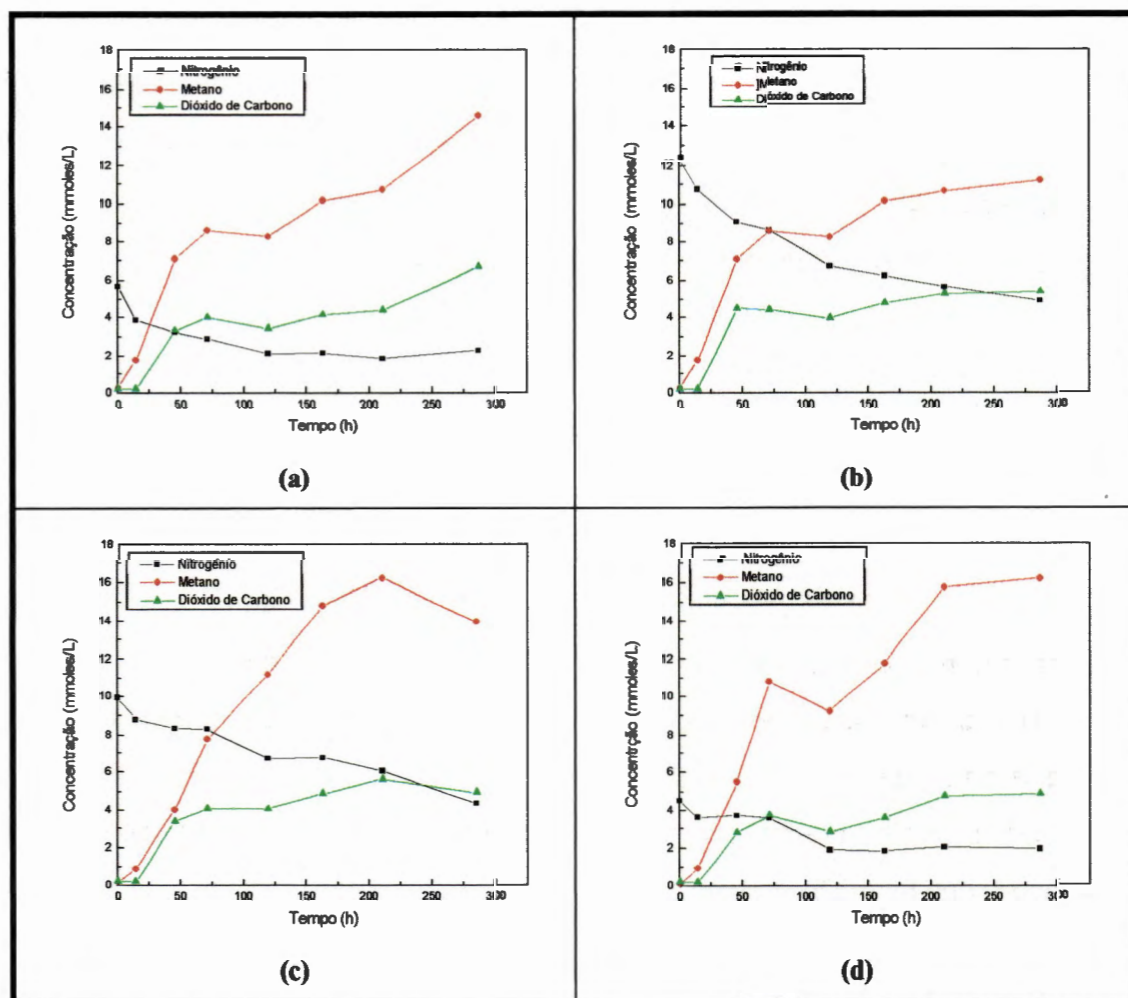


FIGURA 5.1 - Valores das concentrações, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono, presentes nos frascos de cultura durante o primeiro período de incubação. (a) frasco 1, (b) frasco 2, (c) frasco 3, (d) frasco 4.

Com o emprego do gás Hélio para a manutenção da anaerobiose dos sistemas, como anteriormente indicado, buscou-se substituir os gases nitrogênio e dióxido de carbono geralmente utilizados. Nesse sentido, a ausência de uma parcela de dióxido de carbono, componente essencial da atmosfera de sistemas anaeróbios em função do equilíbrio com o bicarbonato de sódio para o tamponamento do meio de cultivo Zinder, foi considerada não prejudicial no início dos ensaios. Isto pôde ser justificado, pois o uso de uma quantidade elevada de inóculo (20 g SSV/g de NH_4^+) e sua

conseqüente atividade, proporcionaria a produção de dióxido de carbono através da fermentação microbiana, comum na etapa inicial do processo de biodigestão anaeróbia. O inóculo foi originado de um reator de fluxo ascendente e manta de lodo operado com esgotos sanitários, cujo pH ao longo da operação do reator esteve em torno de 6,7 (VALLEJOS, 1997). Salienta-se, ainda, que a concentração inicial do gás nitrogênio, diferente para cada frasco de reação, pôde ser também relacionada a uma contaminação não intencional e aleatória com o ar atmosférico, durante a inoculação do lodo proveniente do reator UASB (VALLEJOS, 1997; OLIVA, 1997).

Os ensaios em discussão tiveram como objetivo constatar a formação de nitrogênio a partir de uma concentração de cloreto de amônio presente em meio mineral descrito por ZINDER et al. (1984), sob condições de cultivo controlado de microrganismos anaeróbios estritos. Não se optou por variar as concentrações de íon amônio, nem as fontes de carbono para a biossíntese e produção de metano. Neste experimento, as fontes orgânica e de carbono inorgânico nos frascos 1 e 2 se originariam da fermentação de compostos presentes no lodo biológico utilizado como inóculo. A adição de acetato de sódio nos meios de cultivo dos frascos 3 e 4 teve a intenção de garantir a produção de metano, suplementando as condições disponíveis originalmente no lodo. Observando-se os resultados obtidos nos primeiros 12 dias de incubação, pode-se interpretar que houve atividade microbiana bastante semelhante nos quatro frascos de reação. No entanto, ao considerar-se a produção teórica de metano a partir do SSV (g/L) adicionado e do acetato, respectivamente de 44 e 20 mmoles/L, os valores de metano foram inferiores ao esperado.

A comparação entre as velocidades médias de produção de metano nos frascos 1 e 2 — aproximadamente 0,051 mmoles de $\text{CH}_4/\text{L.h}$ — e as dos frascos 3 e 4 — aproximadamente 0,076 mmoles de $\text{CH}_4/\text{L.h}$ — mostrou que a presença do acetato de sódio influenciou a taxa de produção do gás metano, mas não sua concentração final, medida nas 288 h de incubação. O acetato é fonte de carbono para o crescimento e produção de metano de bactérias metanogênicas acetoclásticas, mas também é estimulatório para o crescimento de muitas bactérias metanogênicas

hidrogenotróficas (OREMLAND, 1988). Assim, é possível que este composto, nos frascos 3 e 4, tenha auxiliado a biossíntese, favorecendo a velocidade de produção de metano. As análises microscópicas indicaram a presença de bacilos fluorescentes, de pequeno tamanho, que foram relacionados, de acordo com a descrição contida no Manual de BERGEY para a Sistemática Bacteriana (1988), ao gênero metanogênico *Methanobrevibacter* sp (Tabela 5.2 e Figuras 5.4 e 5.5).

Constatada a diminuição na produção de metano nos quatro frascos de reação a partir das 288 horas de ensaio, a seqüência da incubação deu-se após a troca da atmosfera dos frascos de reação, empregando-se novamente o gás Hélio. Esta troca foi estabelecida pelo fato de não poder-se concluir sobre o comportamento do nitrogênio, particularmente devido aos procedimentos iniciais, que não permitiram uma completa "lavagem" do nitrogênio da atmosfera dos frascos de reação. Assim, os frascos foram incubados por mais 500 horas (cerca de 20 dias).

O acompanhamento dos experimentos no segundo período (Figura 5.2a a d), após a troca da atmosfera dos frascos de reação, mostrou dois diferentes comportamentos nas réplicas quanto à produção dos gases. A resposta comum foi observada apenas pela baixa concentração de nitrogênio, o que denotou uma adequada troca inicial de atmosfera nos frascos. Os frascos 1 e 2 produziram metano e dióxido de carbono em maiores quantidades que os frascos 3 e 4. As velocidades médias de produção de metano, para as duas primeiras réplicas, decresceram em relação ao primeiro período do experimento, e foram em torno de 0,019 mmoles $\text{CH}_4/\text{L.h}$. A produção de biogás nos frascos de reação 1 e 2 pôde ser justificada pela disponibilidade residual de nutrientes da mistura original do meio de cultivo e inóculo. No entanto, os frascos 3 e 4, que foram suplementados com acetato de sódio em concentrações comumente utilizadas em enriquecimentos de microrganismos anaeróbios metanogênicos acetoclásticos, 20 mM (1.640 mg/L) (DUBOURGUIER, 1987), apresentaram concentrações de metano baixas e no limite de confiabilidade de detecção do aparelho de medição.

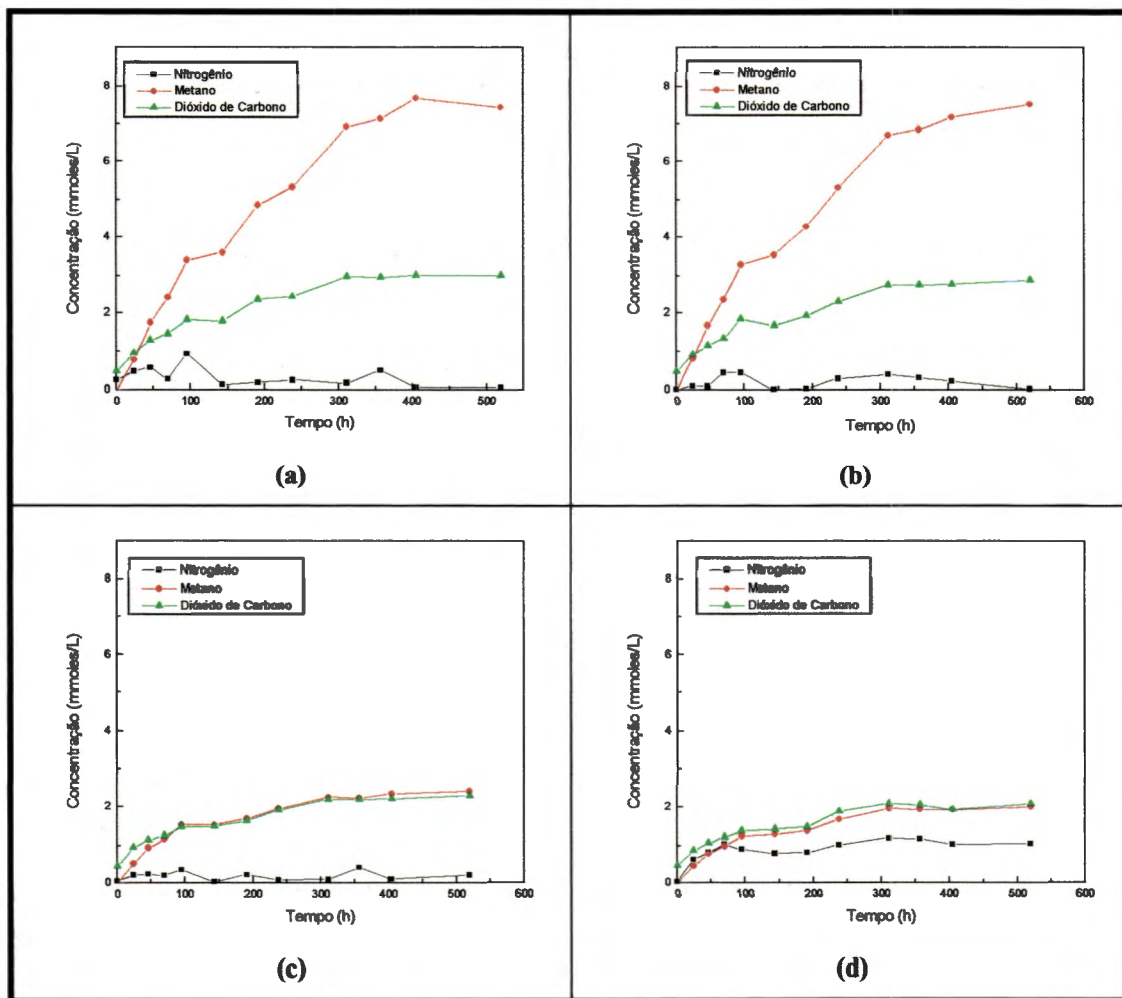
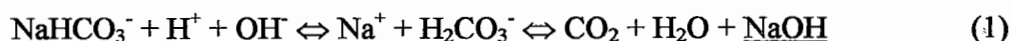


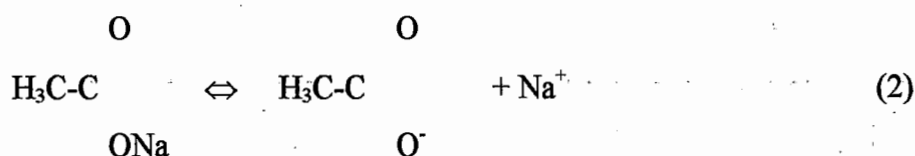
FIGURA 5.2 - Valores das concentrações, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono, presentes nos frascos de cultura durante o segundo período de incubação. (a) frasco 1, (b) frasco 2, (c) frasco 3, (d) frasco 4.

Algumas inferências podem explicar a diminuição da atividade microbiana nos frascos 3 e 4. Os sistemas foram operados em batelada, no período de 20 dias de incubação após a lavagem da atmosfera dos frascos, e a retirada do dióxido de carbono da atmosfera pareceu influenciar a resposta microbiana, provavelmente devido a um aumento de pH no meio. Como este não foi determinado, procurou-se avaliar a seguinte ocorrência, considerando a disponibilidade do acetato de sódio no meio de cultivo:

- a retirada do dióxido de carbono da atmosfera livre dos sistemas pode ter deslocado o equilíbrio da reação (1) para a direita, em direção à formação de uma base forte:



- o acúmulo de NaOH poderia então influenciar o equilíbrio do acetato de sódio para a esquerda, reação (2):



Assim, é provável que um aumento do pH no meio tenha sido um fator para diminuir a atividade das culturas bacterianas, na presença de bicarbonato de sódio e acetato de sódio. É também provável que a retirada do dióxido de carbono da atmosfera dos frascos de reação 1 e 2 influenciaria o pH dos sistemas, porém, a soda formada na ausência do acetato de sódio sofreria a ação de outros compostos do meio, como por exemplo, o cloreto de amônio, originando uma base fraca, hidróxido de amônio, no qual o tampão bicarbonato de sódio agiria em direção à neutralidade do sistema de reação. Determinações de pH não foram realizadas em função da certeza da baixa variação do mesmo, quando da utilização do meio Zinder para enriquecimentos de meios com elevada quantidade de inóculo (ZINDER et al., 1984). No entanto, não se previu a possibilidade da influência marcante da retirada do dióxido de carbono durante as trocas de atmosfera dos frascos.

A retirada de dióxido de carbono também poderia influenciar o metabolismo anaeróbio autótrofo, em que o carbono inorgânico é utilizado para a biossíntese bacteriana, e portanto, necessário. Ainda, se o gêneros metanogênicos hidrogenotróficos, como *Methanobrevibacter* sp, prevaleceram no meio de reação dos quatro frascos, a ausência de dióxido de carbono poderia dificultar a resposta das metanobactérias em direção à redução do dióxido de carbono a metano.

A presença de acetato de sódio nos frascos 3 e 4, como visto no primeiro período de incubação, não afetou a concentração final de metano, mas parece ter apenas favorecido a resposta celular, em termos da velocidade de produção do gás. Assim, como anteriormente afirmado, é provável que o acetato de sódio tenha permanecido no meio, em concentrações que permitissem o aumento do pH nos sistemas. Considerando as concentrações do nitrogênio amoniacal na forma de cloreto de amônio, dos sólidos em suspensão voláteis e do acetato de sódio, estabelecidas no início do processo para os sistemas 3 e 4, respectivamente de 500; 2.000 e 1.640 mg/L, verifica-se que não são coerentes com as relações de macronutrientes indicadas por SPEECE (1996) para os sistemas de digestão anaeróbia operados com baixa carga orgânica, ou seja, relação C:N (carbono : nitrogênio) de 1.000:7, para uma quantidade três vezes maior de sólidos em suspensão voláteis. O lodo estudado, originado do reator piloto UASB para tratamento de esgotos sanitários, apresentou uma relação C:N em torno de 15:1 (VALLEJOS, 1997). Ainda que os procedimentos adotados tenham sido baseados na literatura sobre enriquecimento de culturas anaeróbias metanogênicas, é provável que as práticas empregadas não tenham favorecido a resposta do consórcio microbiano estudado.

O terceiro período de incubação resultou na produção de baixos valores de gases nos 4 sistemas estudados (Figura 5.3a a d).

Esse período caracterizou-se pela alimentação dos sistemas, com a adição aos frascos de 50% das concentrações de NH_4Cl e $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{acetato de sódio}$, respectivamente, empregadas no primeiro período do experimento para o conjunto de frascos 1 e 2, e 3 e 4. Os frascos foram incubados por 779 horas, ou aproximadamente 32 dias. A resposta dos sistemas mostrou que as culturas microbianas foram afetadas, e mais uma vez a perturbação dos mesmos poderia estar relacionada com o pH do meio, nesse caso, ainda mais alterado pela adição de nitrogênio amoniacal em 1 e 2, e nitrogênio amoniacal e acetato de sódio em 3 e 4; além do desfavorecimento das relações nutricionais, como anteriormente abordado. Os frascos foram então mantidos sob refrigeração durante 38 dias e, quando

novamente incubados, após uma segunda alimentação nas mesmas condições anteriores, exceto pela adição da solução tampão, não produziram nenhum gás em um período de 26 dias.

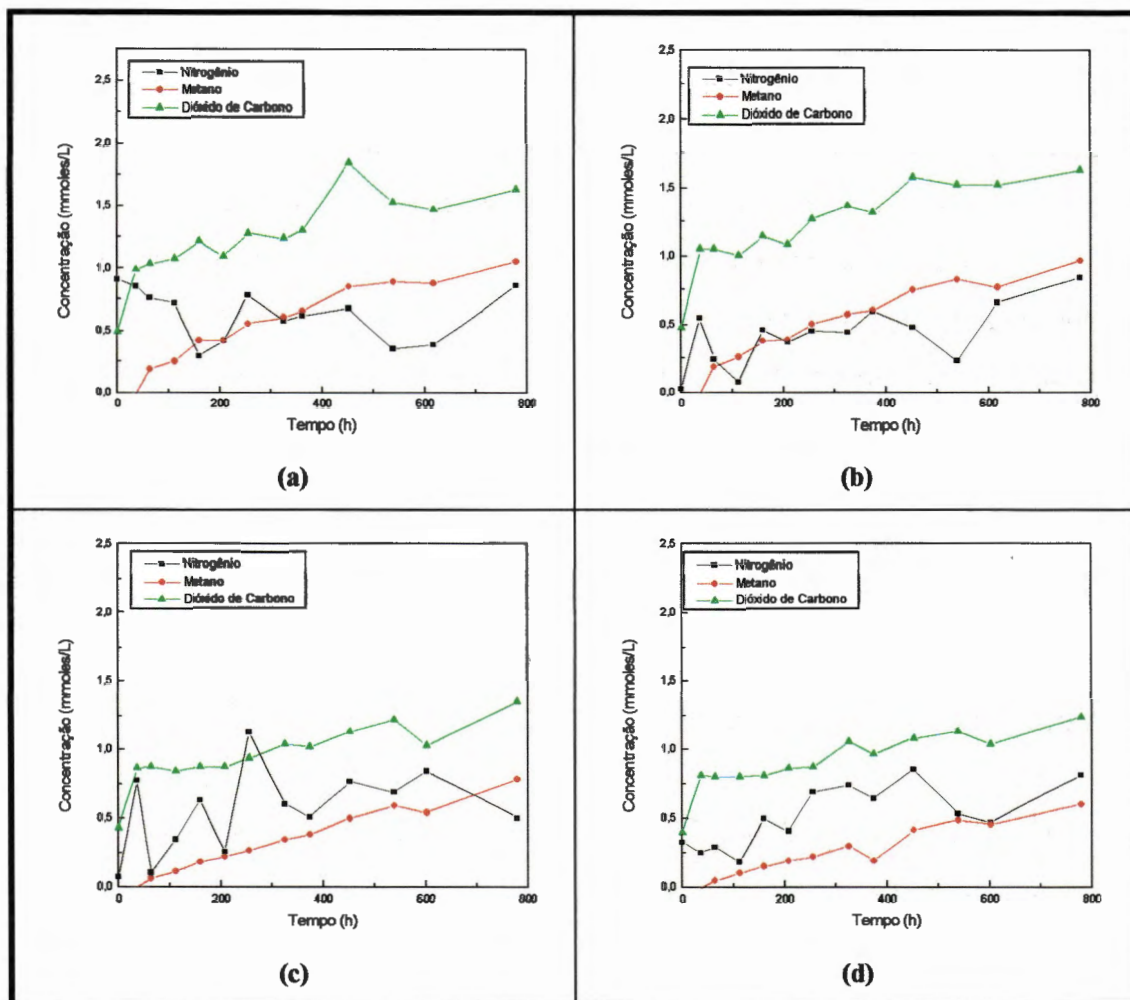


FIGURA 5.3 - Valores das concentrações, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono, presentes nos frascos de cultura durante o terceiro período de incubação. (a) frasco 1, (b) frasco 2, (c) frasco 3, (d) frasco 4.

Em função da produção de nitrogênio não ser evidente ao longo do experimento, buscou-se avaliar a concentração de nitrogênio amoniacal em três diferentes períodos de incubação, a saber: - final do segundo e terceiro período; - término do experimento, ou seja, após a alimentação dos frascos estocados sob refrigeração.

Como observado na Tabela 5.1, as determinações do segundo período mostraram concentrações de nitrogênio amoniacal nos quatro reatores entre 0,62 e 0,75 g/L, próximas àquelas presentes no meio de cultura original (em cloreto de amônio, 0,5g/L). As análises do terceiro período de incubação, em que a faixa de valores de nitrogênio amoniacal situou-se entre 0,76 e 0,80 g/L, corresponderam a resposta à alimentação dos sistemas estocados sob refrigeração. Não se observou variação entre os valores determinados em cada período. É certo, pelas concentrações determinadas, bem como pela inicial estabelecida no meio de cultivo, que os valores de nitrogênio amoniacal foram elevados para o processo de biodigestão anaeróbia, ao considerar-se as informações de SPEECE (1996), que indicam concentrações de nitrogênio amoniacal entre 40 a 70 mg/L como condição ótima para a biodigestão anaeróbia de resíduos em sistemas contínuos, e o conseqüente crescimento microbiano anaeróbio. A relação não adequada dos macronutrientes nos ensaios, como já abordado, também pode ser responsável pela forma de consumo microbiano do nitrogênio.

TABELA 5.1 - Valores em g/L de nitrogênio amoniacal.

Frascos	Final do 2º. período	Final do 3º. período	Final do experimento
1	0,66	0,76	0,85
2	0,62	0,77	0,84
3	0,75	0,80	0,85
4	0,70	0,77	0,83

Os valores do íon amônio mantiveram-se semelhantes ou ligeiramente superiores ao inicial, o que denota que os enriquecimentos utilizaram e produziram íon amônio em uma mesma taxa, pelo menos no primeiro período, em que metano foi detectado nos quatro frascos de reação. A mesma observação seria válida para os frascos 1 e 2 no segundo período de incubação. O íon amônio é a principal fonte de nitrogênio dos anaeróbios estritos (OREMLAND, 1988). Avaliando-se os valores da Tabela 5.1, e a ausência de resposta para a produção de metano nos reatores, nos períodos analisados, pode-se supor que os valores ligeiramente mais elevados foram devidos à adição de substrato amoniacal.

A presente análise dos resultados experimentais levou em conta a relação de macronutrientes indicada como ideal para o processo anaeróbio de biodigestão (SPEECE, 1996) durante a avaliação do comportamento do lodo nas condições estudadas. Porém, uma vez que a abordagem do presente trabalho foi a de verificar a oxidação anaeróbia do íon amônio em nitrogênio gasoso sob condições controladas de enriquecimento de um lodo biológico anaeróbio, empregando-se meio de cultivo e técnicas rotineiras para o enriquecimento de consórcios metanogênicos, considerou-se de menor relevância a relação de macronutrientes para justificar a falta de resposta da microbiota do sistema. É provável que a alteração do pH, e a ausência de um aceptor final de elétrons adequado, como indicado por BRODA apud MULDER et al. (1995) tenha sido mais significativo para o não enriquecimento das culturas oxidadoras do íon amônio, se presentes no sistema. Além disso, a concentração elevada de células no inóculo buscou não limitar qualquer resposta microbiana.

5.1.2 Análises Microscópicas

Foram realizadas observações das morfologias inicialmente predominantes no lodo utilizado como inóculo, e ao longo do primeiro grupo de experimentos. As frequências das análises microscópicas estão apresentadas no item 4.2.6.2.

O exame microscópico inicial das amostras do inóculo permitiu observar a presença de bacilos fluorescentes de diferentes tamanhos, alguns semelhantes a *Methanobrevibacter* sp de acordo com a descrição contida no Manual de BERGEY para a Sistemática Bacteriana (1989), a de vibrios, bacilos espiralados, filamentos longos e curtos (sendo alguns segmentados), agrupamento de cocos e bacilos, além de filamentos que foram relacionados a fungos ou actinomicetos. Dentre os filamentos observados, existiam alguns semelhantes ao gênero *Methanothrix* sp com a descrição contida no Manual de BERGEY para Sistemática Bacteriana (1989). Este lodo era formado por pequenos grânulos de aproximadamente 1 mm.

A Tabela 5.2 apresenta a relação das morfologias presentes nos frascos de reação, ou seja, do primeiro experimento, durante todo o período de incubação das culturas bacterianas. Nesta tabela, estão indicadas a frequência com que as morfologias apareciam e as figuras que as representam.

TABELA 5.2 - Morfologias presentes nos frascos de reação do primeiro grupo de experimentos.

Morfologias	Frequência
bacilos	presença moderada no início, diminuindo ao longo do enriquecimento
bacilos fluorescentes (Figura 5.4b)	presença moderada no início, diminuindo ao longo do enriquecimento
agrupamento de bacilos (Figura 5.9a)	poucos durante todo o enriquecimento
cocos (Figura 5.5b)	poucos agrupamentos durante todo o enriquecimento
vírios e bacilos espiralados (Figura 5.5e)	com diferentes tamanhos, diminuindo o número ao longo do enriquecimento
vírios com formato de grãos de feijão	muitos, somente no início do experimento
filamentos finos e longos (Figura 5.14b)	presença moderada no início, com poucos indivíduos ao final
filamentos espessos e longos (Figura 5.9c)	poucos no início, aumentando durante o enriquecimento
filamentos semelhantes a "fungos" (Figura 5.4c)	presença moderada durante todo o experimento
presença de esporos	ausentes no início, aumentando sua presença até o final do experimento

A Figura 5.4 mostra algumas fotomicrografias das amostras examinadas durante o período de incubação das culturas bacterianas pertencentes aos frascos 1 e 2. As Figuras 5.4 a, b e c são referentes a 138 dias de incubação, e a Figura 5.4d, a 74 dias de incubação.

As Figuras 5.4a e 5.4b, mostram, respectivamente, um floco sob microscopia de campo claro sob contraste de fase, e o mesmo campo observado sob luz ultravioleta. Evidencia-se que, apesar de o floco possuir muito material aglomerado, existiam poucos organismos fluorescentes (bacilos). Ocorreu um decréscimo no

número de bacilos fluorescentes ao longo do experimento. A fluorescência indicou atividade metanogênica dos bacilos, no caso, provavelmente, hidrogenotrófica. Estes bacilos foram relacionados ao gênero *Methanobrevibacter* sp.

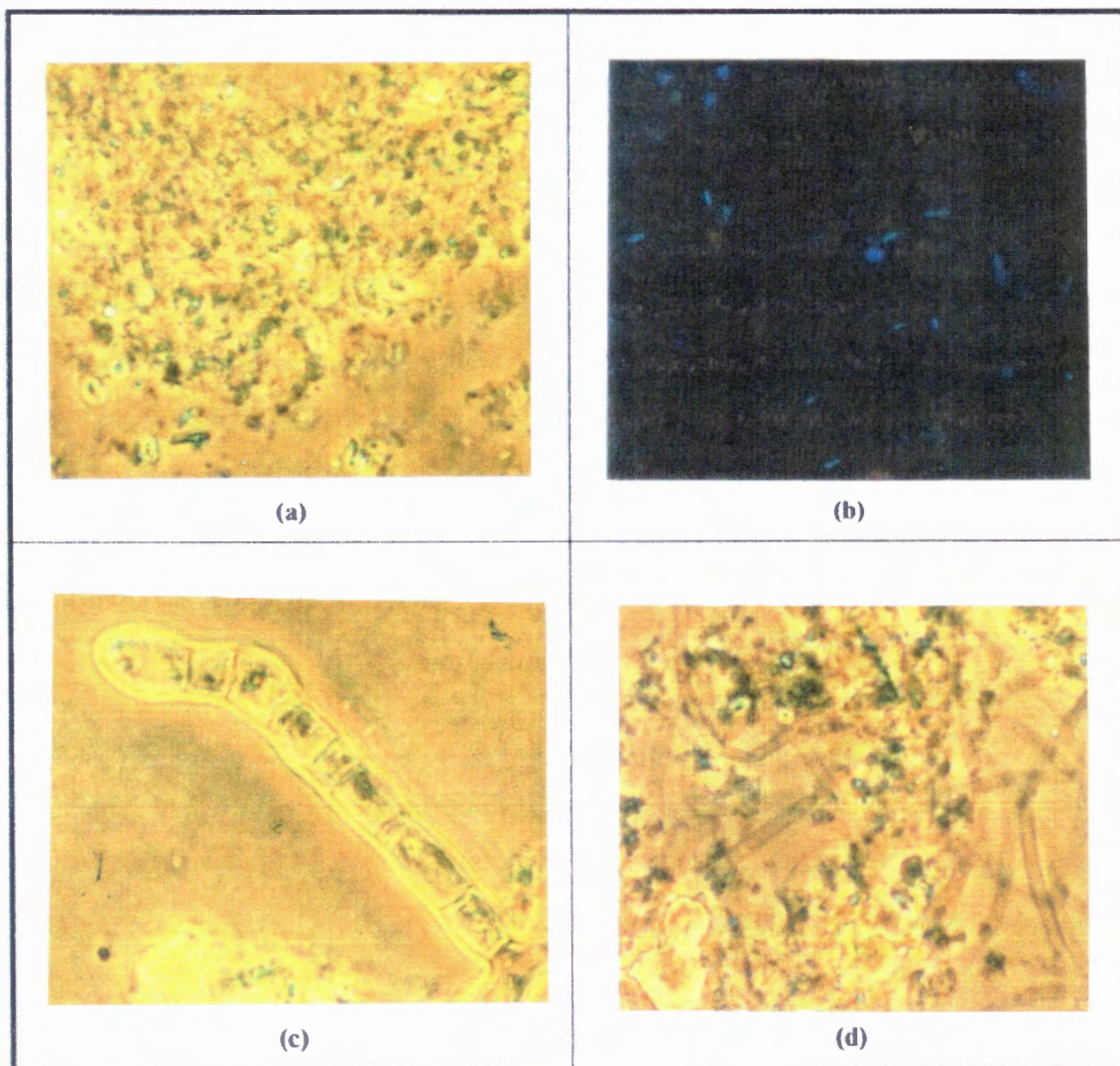


FIGURA 5.4 - Aspectos morfológicos dos microrganismos presentes nos frascos de cultivo pertencentes ao primeiro grupo de experimentos (ocular 10, objetiva 100, zoom 1,25). (a) e (b) frasco 1 (mesmo campo), (c) frasco 1, (d) frasco 2.

A morfologia observada na Figura 5.4c é semelhante à constatada para fungos aeróbios, como verificado por JENKINS et al. (1993) em sistemas de lodos ativados. Este tipo de morfologia foi constatada durante todo o período de enriquecimento, em quantidades moderadas nos quatro grupos de experimentos.

Segundo JENKINS et al. (1993), a presença de um grande número de fungos em sistemas de lodos ativados indica pH baixo ($\text{pH} < 6$) e sugere que o afluente contém ácidos fortes. Alguns sistemas de lodos ativados que promovem a nitrificação, que tratam águas residuárias de baixa alcalinidade, podem exibir baixo pH. Apesar dessa indicação, o mesmo não pode ser comentado para os sistemas estudados, pelas condições de anaerobiose estrita, e tão pouco em função do pH, uma vez que a variação deste pH nos ensaios foi desconhecida.

Existem trabalhos referentes a fungos anaeróbios, entre eles o de CHENG et al. (1990) e o de PESSIN (1997), que relataram a presença de fungos anaeróbios no tratamento de resíduos de celulose. Porém, as morfologias observadas, considerando os diferentes ciclos de vida dos fungos, foram bastante distintas do da Figura 5.4c. Poder-se-ia comentar que esta morfologia estaria relacionada com grupos bacterianos pertencentes aos actinomicetos, células que, em geral, apresentam pleomorfismo e filamentos bastante ramificados, porém de dimensões menores do que aquelas observadas nesse trabalho.

Os microrganismos apresentados na Figura 5.4d são filamentosos, também semelhantes a filamentos encontrados em sistemas aeróbios (JENKINS et al., 1993). A figura sugere a presença neles de espaços vazios. Algumas vezes, foi possível perceber partículas em movimento dentro dos filamentos.

Apesar das semelhanças mencionadas, não é possível discutir a presença de organismos característicos de sistemas aerados provenientes de esgotos sanitários no meio anaeróbio, e sua tolerância aos baixos potenciais de oxi-redução dos meios em reação (-100 mV, indicados pelo corante resazurina), uma vez que são morfologias pouco comuns ao sistema anaeróbio (processos de biodigestão anaeróbia). Além disso, não foi visualizada, nos meios, nenhuma estrutura esbranquiçada característica de crescimento fúngico, que pudesse reforçar a presença desses microrganismos nos sistemas.

O lodo de esgoto sanitário utilizado era flocculento não evidenciando estruturas morfológicas típicas de lodo granulado (VIEIRA, 1986).

Na Figura 5.5, são apresentados os microrganismos pertencentes aos frascos 3 e 4, sendo as Figuras 5.5a e 5.5e referentes a 41 dias de experimento, a Figura 5.5b referente a 74 dias de incubação, e as Figuras 5.5c e 5.5d, a 138 dias de incubação.

Na Figura 5.5a, pode-se observar um filamento semelhante a um fungo, como comentado anteriormente. A Figura 5.5b destaca um aglomerado de cocos que pôde ser visto neste grupo de experimento em pequeno número. A Figura 5.5c e 5.5d apresentam o mesmo campo, sendo a primeira referente a microscopia de campo claro sob contraste de fase, e a segunda sob luz ultravioleta, evidenciando a presença de pequenos bacilos fluorescentes. A figura 5.5e apresenta a morfologia de vibrios e bacilos espiralados, que apareciam em grande número no início do experimento.

Os quatro frascos pertencentes a este grupo de experimentos apresentaram morfologias microbianas e frequência de aparecimento muito semelhantes. Cabe salientar que, apesar da baixa resposta do experimento em relação à produção de gases, a fluorescência celular foi observada ao longo dos 138 dias de incubação (Figuras 5.4b e 5.5d).

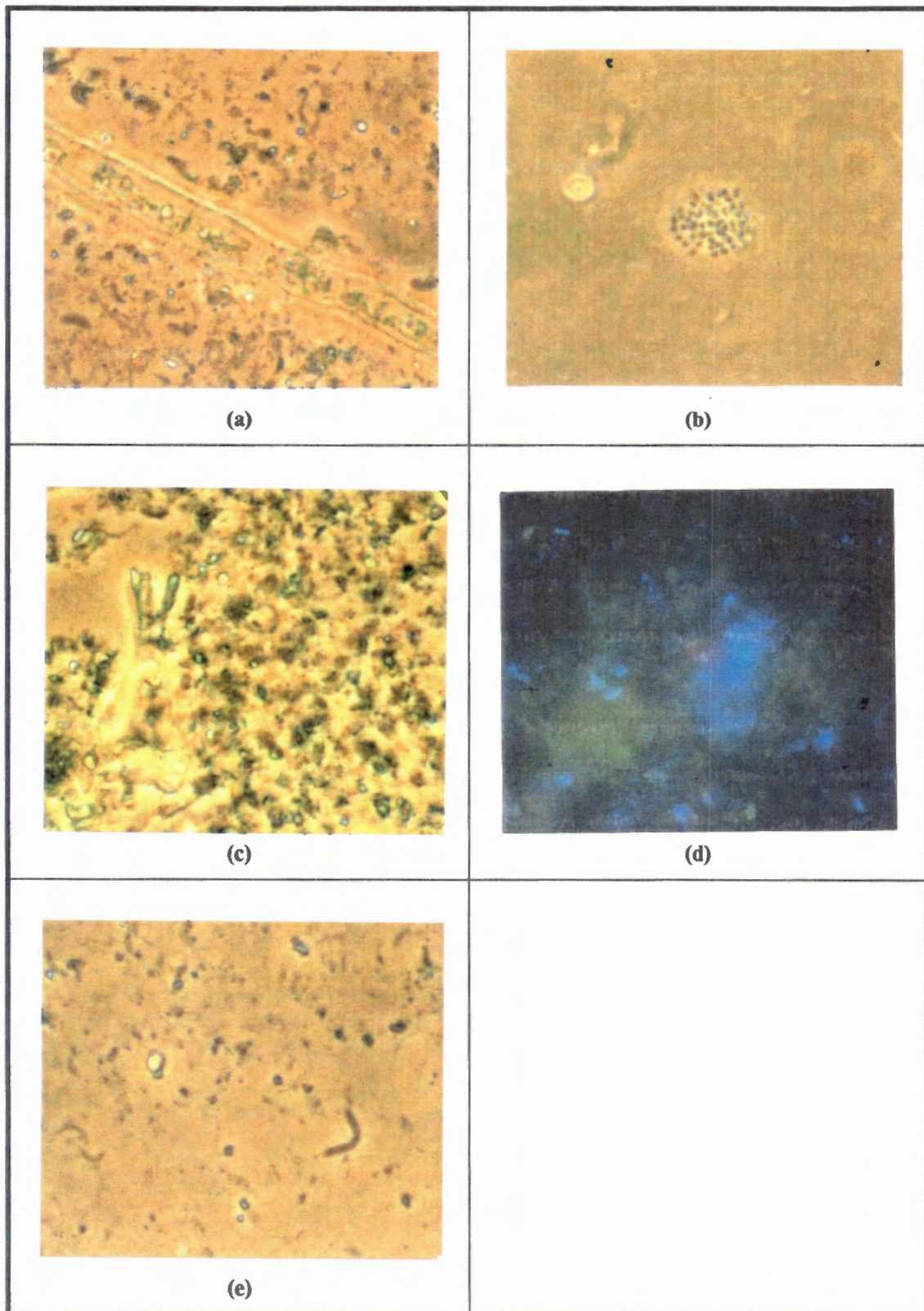


FIGURA 5.5 - Aspectos morfológicos de algumas microrganismos presentes nos frascos de cultivo pertencentes ao primeiro grupo de experimentos (ocular 10, objetiva 100, zoom 1,25). (a) e (b) frasco 3, (c) e (d) frasco 4 (mesmo campo) e (e) frasco 4.

5.2 Segundo Grupo de Experimentos

5.2.1 Análises Cromatográficas

Os frascos de cultura pertencentes a este grupo também foram acompanhados durante o primeiro período de incubação por 12 dias, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.6. O anexo B apresenta os valores médios das determinações cromatográficas (Tabelas B.17 a B.28).

Os procedimentos de operação dos sistemas nesse segundo grupo de experimentos foram semelhantes aos do primeiro grupo, sendo que o emprego do gás Hélio foi também adequado para a manutenção da anaerobiose nos sistemas.

Os experimentos apresentaram apenas uma réplicas para os frascos com NH_4NO_3 . Devido a erros durante os experimentos em que ocorreu perda de inóculo no frasco 9, este foi descartado.

Os ensaios em discussão tinham como objetivo constatar a produção de gás nitrogênio a partir da utilização de NH_4NO_3 , como descrito por MULDER et al. (1995) e van de GRAAF et al. (1995). A quantidade de NH_4NO_3 empregada no meio de cultivo manteve a mesma concentração do íon amônio utilizada no meio mineral descrito por Zinder et al. (1984), e portanto, estudada no primeiro grupo de experimentos. Como comentado para os experimentos do primeiro grupo, não se optou por variar as concentrações de íon amônio, nem as fontes orgânica e de carbono inorgânico nos frascos 7 e 8, os quais seriam provenientes da fermentação de compostos presentes no lodo biológico utilizado como inóculo. Ao frasco 10 foi acrescentado acetato de sódio para garantir a produção de metano.

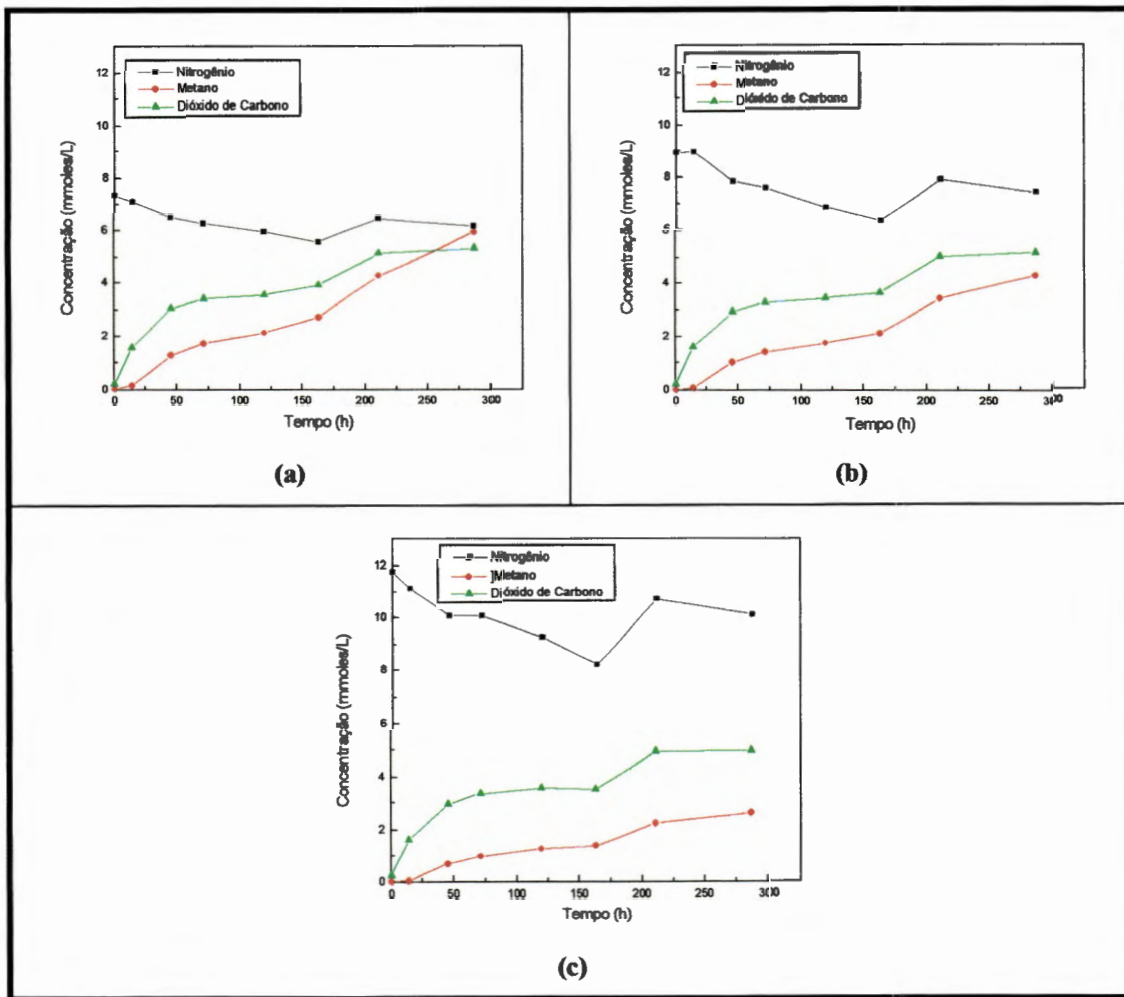


FIGURA 5.6 - Valores das concentrações, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono presentes nos frascos de cultura durante o primeiro período de incubação. (a) frasco 7, (b) frasco 8, (c) frasco 10.

Observando-se os resultados obtidos nos primeiros 12 dias de incubação, pôde-se verificar que houve baixa atividade microbiana, principalmente quando comparada aos resultados do grupo anterior. A produção teórica de metano para estes ensaios seria a mesma comentada para o primeiro grupo de experimentos, ou seja, de 44 mmoles de metano no mínimo. Neste período, as velocidades médias de produção de metano para os frascos 7 e 8 foram respectivamente de 0,02 e 0,015 mmoles de $\text{CH}_4/\text{L.h}$, e para o frasco 10, de 0,01 mmoles de $\text{CH}_4/\text{L.h}$, sendo menores do que as determinadas para o primeiro grupo de experimentos. O frasco 10 apresentou produção de metano inferior aos outros frascos de reação (7 e 8), diferente do esperado.

As concentrações do gás dióxido de carbono mantiveram-se, durante esta fase, superiores à concentração de gás metano, ao contrário do que ocorreu com os frascos do grupo anterior. Além disso, também se verifica na Figura 5.6, a elevada concentração inicial de gás nitrogênio, e um pequeno decréscimo ao longo dos 12 dias de enriquecimento, devido provavelmente às amostragens cromatográficas. A presença inicial de nitrogênio foi também minimizada no segundo período do experimento, uma vez que se procedeu como no primeiro experimento, ou seja, substituiu-se a atmosfera dos frascos de reação.

A modificação da atmosfera parece não ter provocado, ao menos inicialmente, uma resposta semelhante ao proposto para os frascos 3 e 4 do primeiro experimento, ou seja, a retirada do dióxido de carbono alterou o pH do frasco 9. Nesse caso, inicialmente, o que parece ter afetado os três sistemas foi a presença do nitrato. O nitrato influencia o potencial de oxi-redução de um meio anaeróbio, e para os anaeróbios estritos, como os metanogênicos, pode levar a um período de baixa resposta de produção de metano (OREMLAND, 1988), e necessidade de adaptação.

O acompanhamento dos experimentos no segundo período de incubação (Figura 5.7a a c), após a troca da atmosfera dos frascos de reação, mostrou que as quantidades de metano aumentaram, sugerindo uma provável adaptação do lodo às condições de ensaio, ou seja, mesmo após a retirada de dióxido de carbono do sistema.

A observação da Figura 5.7 permite notar que foi realizada uma boa substituição de gases, tendo em vista que a concentração inicial do gás nitrogênio foi bastante reduzida. Esse período teve a duração de 20 dias de incubação.

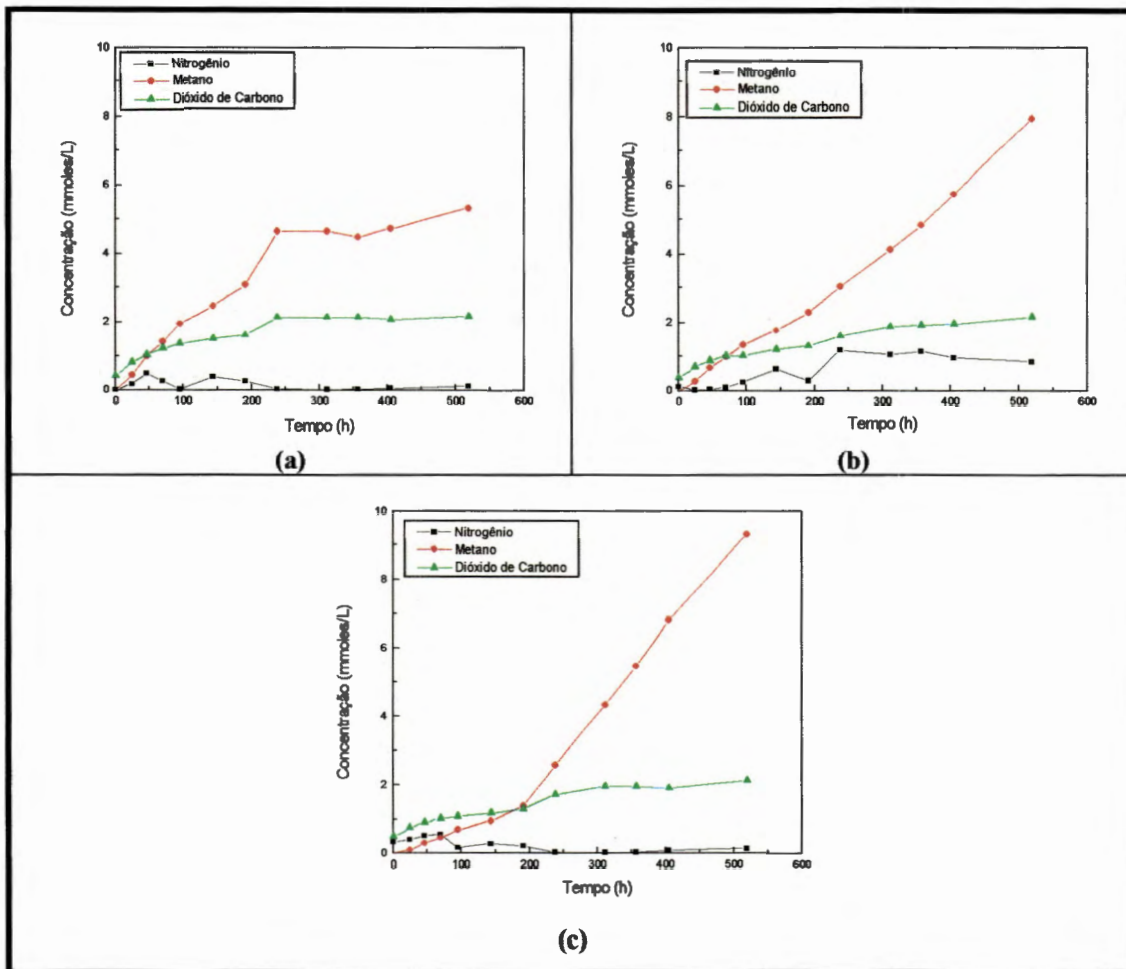


FIGURA 5.7 - Valores das concentrações, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono presentes nos frascos de cultura durante o segundo período de incubação. (a) frasco 7, (b) frasco 8, (c) frasco 10.

Os frascos 8 e 10 apresentaram padrões muito semelhantes de produção de gás, apesar de o frasco 10 ter recebido além do meio de cultivo Zinder com NH_4NO_3 , a adição de acetato de sódio. A presença de acetato deveria estimular uma maior produção de gás metano. Este resultado pode indicar que a adição de acetato de sódio não influenciou na produção de metano. A velocidade média de produção de metano esteve em torno de 0,01, 0,015 e 0,018 mmoles de $\text{CH}_4/\text{L.h}$, para os frascos 7, 8 e 10, respectivamente, sendo apenas um pouco maior para o frasco 10.

É interessante ressaltar que nesse grupo de experimentos, diferentemente do que ocorreu com os frascos do primeiro grupo no segundo período de incubação, a

produção do gás metano aumentou nos frascos 8 e 10 e manteve-se no frasco 7. É possível inferir que a diminuição do gás dióxido de carbono não afetou o sistema, pelo menos nos 20 dias de incubação subsequentes à primeira troca da atmosfera dos frascos de reação.

Após o segundo período, as culturas receberam alimentação, e foram mantidas incubadas por cerca 32 dias, e a evolução dos sistemas nesse período é mostrada na Figura 5.8.

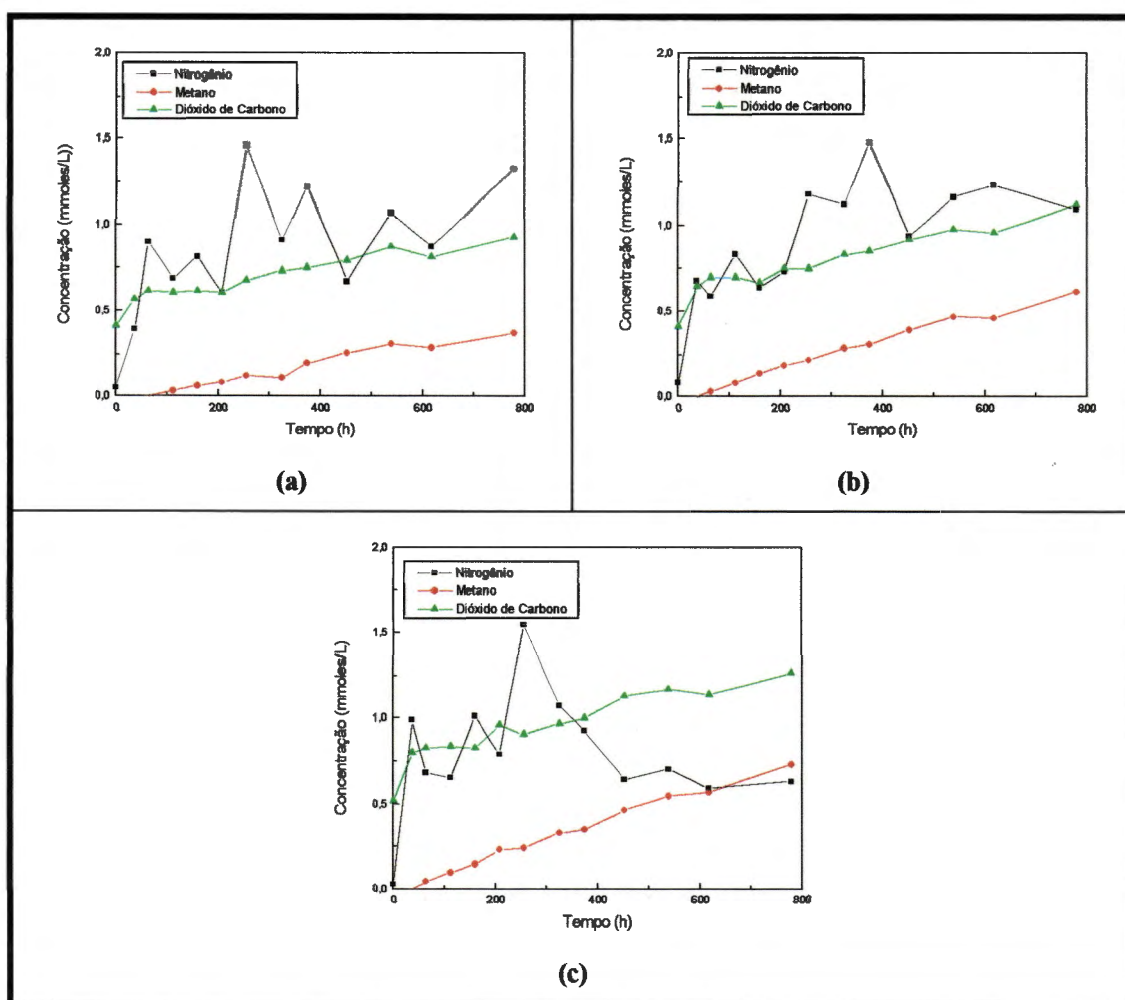


FIGURA 5.8 - Valores das concentrações, em mmol/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono presentes nos frascos de cultura durante o terceiro período de incubação. (a) frasco 7, (b) frasco 8, (c) frasco 10.

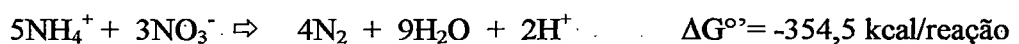
Os frascos desse grupo de experimentos também foram estocados sob refrigeração por 38 dias, após o que, receberam nova alimentação sem adição da solução tampão, e foram mantidos incubados por 26 dias. Nesse período, não se observou nenhuma produção de gás, e os sistemas quando novamente alimentados e acompanhados por mais 40 dias, responderam da mesma forma. Como os resultados não apresentaram modificações com relação aos resultados anteriormente obtidos, os mesmos tiveram sua operação finalizada.

Com relação ao gás nitrogênio, os frascos do segundo grupo tiveram comportamento semelhante ao observado para os frascos de 1 a 4, ou seja, não ocorreu produção biológica de nitrogênio. Depois das alimentações, nas mesmas condições descritas para o primeiro grupo de experimentos, obteve-se uma baixíssima produção de gás. A ausência de produção de gás ou em valores muito baixos, após os dois primeiros períodos do segundo experimento, denota um possível efeito da adição do nitrato, somando-se a efeitos da variação do pH.

Segundo MULDER et al. (1995), em experimentos em batelada, a oxidação do íon amônio ocorreria concomitantemente com a redução do nitrato. Os autores constataram que a remoção do íon amônio coincidiu com a remoção de nitrato no meio. Os ensaios em batelada empregaram a adição de 4 g/L de NH_4NO_3 , seguindo-se por sucessivas adições de NaNO_3 , nas quantidades de 2,3 , 3,3, e 5,3 g/L, a intervalos entre 5 e 9 dias. A fonte de carbono foi uma mistura de ácidos voláteis, e a oxidação do íon amônio ocorreu em torno de 200 h, mantendo-se as taxas de adição. Entre os intermediários medidos, apenas o nitrito chama atenção pelos valores nulos ou baixos encontrados. As taxas de gases produzidos, particularmente o nitrogênio, foram correspondentes às de oxidação do íon amônio.

O presente experimento procurou enriquecer o lodo biológico anaeróbico do piloto para tratamento de esgotos sanitários (VALLEJOS, 1997; OLIVA, 1997), com a mesma finalidade dos testes em batelada realizados por MULDER et al. (1995). Mas, diferentemente dos testes dos autores, os resultados não revelaram produção de

nitrogênio, e sim desequilíbrios dos sistemas no final do experimento. A concentração de NH_4NO_3 foi muito menor do que a empregada pelos autores, ou seja, 0,6 g/L, com uma quantidade muito próxima de biomassa (20 g SSV/g de NH_4^+). Nesse ponto, é importante analisar o fato de que a origem do lodo estudado por MULDER et al. (1995) foi de um sistema operado sob condições contínuas na presença de nitratos, e potenciais de oxi-redução de +230mV. As células enriquecidas nesses sistemas foram então submetidas à avaliação de consumo do nitrogênio amoniacal e nitrato. O trabalho posterior de van de GRAAF et al. (1995), continuação do trabalho prévio de MULDER et al. (1995), confirmou a existência da seguinte reação:



Os resultados obtidos no presente trabalho diferiram dos relatados por MULDER et al. (1995), e talvez, a explicação esteja nos procedimentos iniciais de cada trabalho, especialmente na origem dos inóculos e na concentração dos íons amônio e nitrato. Apesar das diferentes origens do lodo, a hipótese do trabalho ora em discussão foi reproduzir uma condição que possibilitasse a oxidação anaeróbia do íon amônio, na presença de um acceptor final de elétrons, e indicasse uma rota biológica de formação de nitrogênio no sistema de biodigestão anaeróbia de esgotos. É certo que sistemas anaeróbios metanogênicos apresentam quantidades moderadas ou ausência de nitrato (SPEECE, 1996), mas a falta de informações sobre uma via metabólica anaeróbia de produção de nitrogênio, incentivou os experimentos na mesma direção seguida pelos autores MULDER et al. (1995) e van de GRAAF et al. (1995). É inquestionável que a presença do nitrato interfere com a anaerobiose do meio, pelo aumento do potencial de oxi-redução, afetando o desempenho dos microrganismos anaeróbios na direção da produção do metano. Porém, se houve a interferência do nitrato, como já abordado, nos frascos 7, 8 e 10, esta foi menor nos dois primeiros períodos do experimento. Outro aspecto é a concentração de substrato nitrogenado empregada no segundo experimento, talvez muito baixa para estimular a seleção de uma rota metabólica, portanto de bactérias com metabolismo específico. Mas a quantidade baixa empregada deveu-se à preocupação com o nitrato como

componente do meio de cultura, procurando-se evitar a ação deletéria sobre o consórcio metanogênico.

Ao notar a equação anteriormente citada, de van de GRAAF et al. (1995), pode-se perceber a relação entre as quantidades de nitrogênio amoniacal e nitrato necessárias para a ocorrência da desnitrificação anaeróbia da amônia, ou seja, 5:3. Esta relação não foi empregada por MULDER et al. (1995) nos ensaios em batelada; da mesma forma não foi mantida nos experimentos do presente trabalho de pesquisa.

Como os resultados obtidos por meio das análises cromatográficas não evidenciaram a produção de nitrogênio, foi realizada a avaliação da concentração de nitrogênio amoniacal em quatro diferentes períodos de incubação, a saber: - final dos segundo, terceiro e quarto períodos; - término do experimento. Como observado na Tabela 5.3, as determinações do segundo período mostraram concentrações de nitrogênio amoniacal nos três frascos de reação entre 0,67 e 0,73 g/L, valores próximos aos observados no primeiro grupo de experimentos. No terceiro período de incubação, a faixa de valores de nitrogênio esteve em torno de 0,80 e 0,85 g/L. Para o quarto período, os valores encontrados estavam próximos aos do período anterior, ou seja, 0,77 a 0,82 g/L. Ao final do experimento, constatou-se uma pequena queda na concentração do nitrogênio amoniacal, sendo a faixa de valores entre 0,70 a 0,74 g/L. Como comentado anteriormente, se houve consumo de nitrogênio amoniacal, o mesmo foi baixo, ou consumiu-se o que foi produzido, e o pequeno aumento nos valores de nitrogênio amoniacal pode ser referente a adição realizada durante as alimentações.

TABELA 5.3 - Valores em g/L de nitrogênio amoniacal.

Frascos	Final do 2° Período	Final do 3° Período	Final do 4° Período	Final do experimento
7	0,67	0,80	0,82	0,72
8	0,68	0,80	0,79	0,70
10	0,73	0,85	0,77	0,74

5.2.2 Análises Microscópicas

Como descrito para o primeiro grupo de experimentos, foram realizadas análises microscópicas ao longo do enriquecimento das culturas bacterianas. A Tabela 5.4 mostra as morfologias presentes nos frascos deste grupo de experimentos, bem como a frequência com que as mesmas foram observadas.

TABELA 5.4 - Morfologias presentes nos frascos de reação do segundo grupo de experimentos.

Morfologias	Frequência
bacilos	muitos indivíduos até 74 dias de incubação, diminuindo após este período.
Bacilos fluorescentes	muitos indivíduos até 74 dias de incubação, diminuindo após este período.
Agrupamento de bacilos	muitos no início, diminuindo ao longo do experimento
cocos	vários agrupamentos no início, diminuindo ao longo do enriquecimento
vibrios e bacilos espiralados	poucos indivíduos durante o início do enriquecimento
vibrios com formato de grãos de feijão	ausentes
filamentos finos e longos	presença moderada durante o experimento
filamentos grossos e longos	presença moderada durante o experimento
filamentos semelhantes a "fungos"	presença moderada durante todo o enriquecimento
presença de esporos	ausentes no início, aumentando durante o enriquecimento

A Figura 5.9 mostra algumas fotomicrografias que representam o comportamento morfológico durante o enriquecimento das culturas bacterianas. A Figura 5.9a é referente a 41 dias de incubação, e as Figuras 5.9 b, c e d a 138 dias.

A análise das fotomicrografias permite observar a presença de um agrupamento de bacilos na Figura 5.9a, os quais também foram visualizados nos outros grupos de experimento. As Figuras 5.9b e 5.9d apresentam morfologias

semelhantes a fungos, descritas no item 5.1.2. A Figura 5.9c mostra filamentos longos que apareceram durante todo o período de enriquecimento em presença moderada, sendo também observados nos outros grupos.

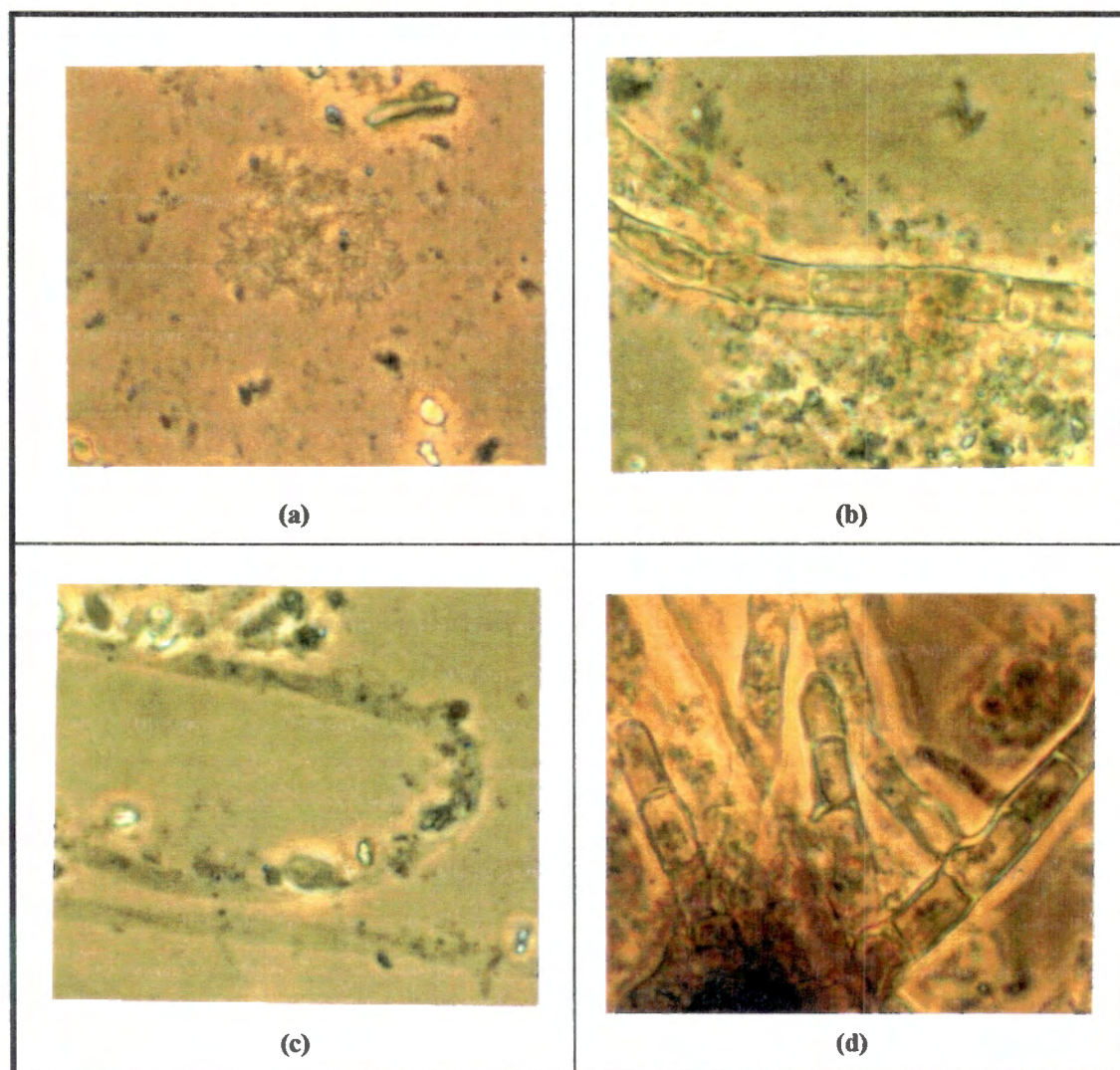


FIGURA 5.9 - Aspectos morfológicos de alguns microrganismos presentes nos frascos de cultivo pertencentes ao segundo grupo de experimentos (ocular 10, objetiva 100, zoom 1,25). (a) e (b) frasco 7, (c) frasco 9, (d) frasco 10.

Considerando-se a semelhança das morfologias bacterianas presentes nos dois grupos de experimentos, e verificando-se a manutenção de fluorescência das células metanogênicas ao longo do segundo experimento, pode-se afirmar a manutenção da atividade celular, ainda que baixa.

5.3 Terceiro Grupo de Experimentos

5.3.1 Análises Cromatográficas

Inicialmente os frascos do terceiro grupo tiveram sua operação semelhante aos frascos dos outros dois grupos de experimentos, diferindo somente na troca e composição da atmosfera após a inoculação do lodo proveniente do reator UASB (ver item 4.2.4). Esta troca inicial permitiu que os valores da concentração inicial de gás nitrogênio fossem baixos, facilitando, desta forma, a observação do comportamento do referido gás. O gás nitrogênio, possivelmente presente na atmosfera dos frascos, foi substituído pela mistura gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono.

A diferença do terceiro grupo de experimentos para os dois primeiros residiu na atmosfera empregada nos frascos de reação. Neste experimento, os gases utilizados foram o hidrogênio e o dióxido de carbono (70 - 30%). Nessas condições, procurou-se reproduzir a hipótese de BHADRA et al. (1987), estabelecendo-se o meio mineral Zinder como base para o crescimento, acrescido somente de fontes orgânicas e inorgânicas oriundas do inóculo.

As Tabelas B.29 a B.36 do anexo B mostram os valores médios das análises cromatográficas realizadas para esse grupo de experimentos. Os resultados referentes ao primeiro período de enriquecimento podem ser observados na Figura 5.10.

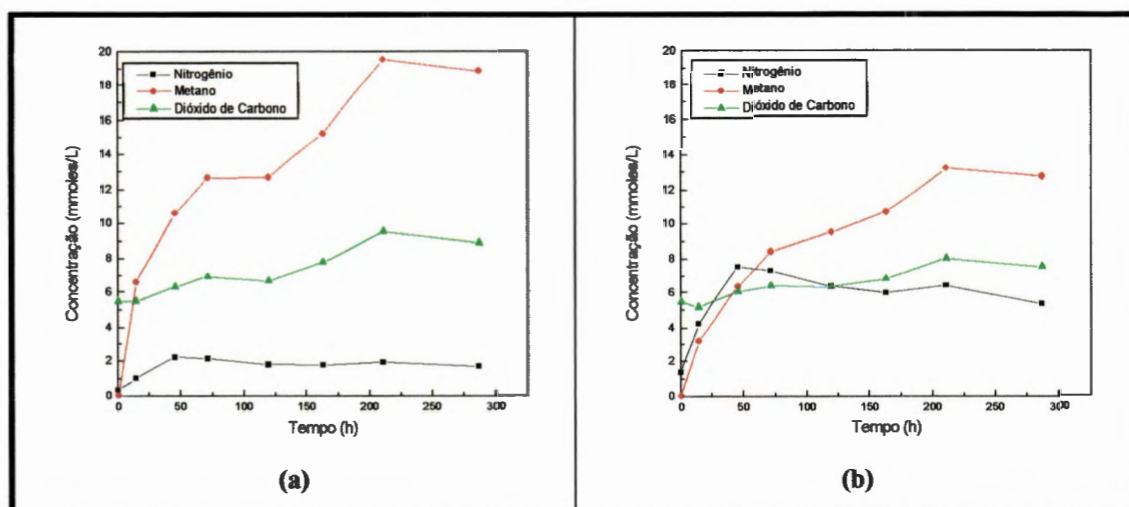


FIGURA 5.10 - Valores das concentrações, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono presentes nos frascos de cultura, no primeiro período de incubação. (a) frasco 5, (b) frasco 6.

Comparando-se a Figura 5.10a com a 5.10b, nota-se que a produção de metano na primeira foi maior do que na segunda, tendo-se praticamente a mesma concentração de dióxido de carbono nos dois frascos. Neste primeiro período, as velocidades médias de produção de metano para os frascos 5 e 6 foram 0,093 e 0,063 mmoles de $\text{CH}_4/\text{L.h}$, respectivamente. Os valores obtidos mostram que estes frascos tiveram uma velocidade média de produção de metano maior do que a observada para os frascos de reação do primeiro grupo, que possuíam, além do meio basal, a adição de acetato de sódio. Desta forma, foi muito evidente que o hidrogênio e dióxido de carbono foram prontamente utilizados para a produção de metano, diferentemente do que ocorreu com os já citados frascos de reação, em que o acetato provavelmente não foi efetivamente utilizado para a produção de metano. Como também mencionado, a presença de bactérias fluorescentes hidrogenotróficas foi sempre marcante nas amostras examinadas sob microscopia de luz ultravioleta.

Nesse primeiro período de avaliação do ensaio, o frasco 6 apresentou um aumento de nitrogênio em relação ao frasco 5, ambos nas mesmas condições de incubação. As Figuras 5.10a e 5.10b mostram o comportamento dos valores do nitrogênio ao longo do experimento. No início, os valores de nitrogênio foram

relacionados ao consumo da mistura de hidrogênio e dióxido de carbono para a produção de metano, o que resultaria na formação de vácuo na atmosfera do frasco, que, se não vedado adequadamente, poderia permitir a entrada de nitrogênio atmosférico no sistema. Porém, observando-se as Figura 5.10a e 5.10b, nota-se claramente que o aumento do nitrogênio não pareceu estar relacionado com a produção de metano. Além disso, os cuidados com o sistema de fechamento dos frascos de reação para a manutenção da anaerobiose dificultariam qualquer entrada de ar atmosférico, o que também seria indicado pela resazurina presente no meio em reação.

A Figura 5.10b revela que, nas primeiras 50 horas de incubação, os gases metano e nitrogênio estiveram em quantidades muito próximas no meio; e que após esse período, a concentração de metano continuou a crescer, e a de nitrogênio manteve-se nos mesmos valores ou com um pequeno decréscimo.

Depois de 288 h de experimento (12 dias), a atmosfera dos frascos foi trocada com o intuito de fornecer fontes para a produção de metano, e não mais apenas para manter baixa a concentração inicial do gás nitrogênio. Porém proporcionou que todos os frascos possuíssem as mesmas condições de operação, facilitando, desta forma, as comparações nas diferentes condições de enriquecimento nos três experimentos. A Figura 5.11 apresenta os valores dos gases formados após a nova troca de hidrogênio e de dióxido de carbono dos frascos de reação, e a incubação de 20 dias. Analisando-se a figura, é possível verificar a produção do gás metano, a variação no dióxido de carbono, com decréscimo em uma das réplicas, e o aumento do gás nitrogênio ao longo do tempo de incubação.

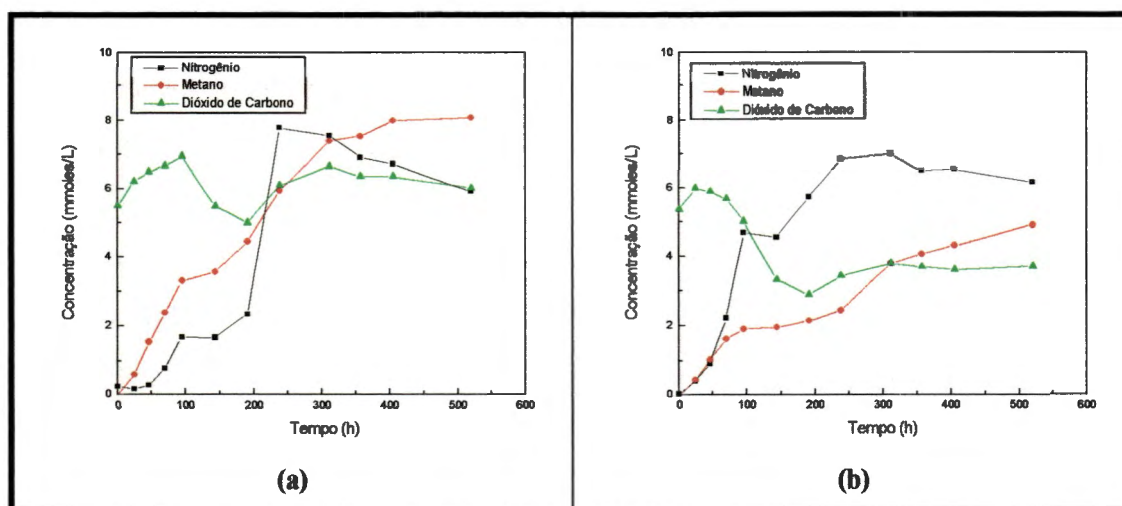


FIGURA 5.11 - Valores da concentração, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono presentes nos frascos de cultura durante o segundo período de incubação. (a) frasco 5, (b) frasco 6.

Nesse período, observa-se novamente a presença do gás nitrogênio em ambos os frascos-reatores, que em uma das réplicas, foi superior à produção do gás metano. A análise cuidadosa dos valores dos gases revela um aumento crescente da concentração do nitrogênio. A Figura 5.11a mostra que o gás metano foi produzido no sistema sem fase de adaptação; já o nitrogênio aparece após 50h de incubação, diferentemente do que se observa na Figura 5.11b, na qual não há fase de adaptação para ambos os gases e o metano é gerado em menores quantidades que o nitrogênio. Particularmente, a Figura 5.11b pode indicar uma maior atividade biológica na direção de geração do nitrogênio, e mais uma vez, colocaria em dúvida a provável presença de nitrogênio atmosférico em função do vácuo formado pelo uso do hidrogênio e dióxido de carbono. É muito pouco provável, como anteriormente afirmado, que o sistema fique exposto à entrada de ar atmosférico. Como observado no trabalho de MULDER et al. (1995), um sistema em batelada utilizando-se gasômetro do tipo frasco de Mariotte permitiu com facilidade a medição dos gases formados, inclusive de nitrogênio, e determinações cromatográficas (GC com coluna Porapak Q) confirmaram a composição dos mesmos. Nesse caso, 68 a 72% eram nitrogênio.

Assim, as análises cromatográficas realizadas no presente experimento revelaram a presença de nitrogênio nos dois primeiros períodos de incubação, indicando a importância do hidrogênio e do dióxido de carbono no meio. Na Figura 5.11a (frasco 5), observa-se que o dióxido de carbono variou menos que no frasco 6, e que o decréscimo nesse gás foi maior (durante 100 e 200 h), enquanto aumentava-se a concentração dos outros dois gases. A utilização do dióxido de carbono pode ser relacionada à síntese de metano por bactérias hidrogenotróficas, como à biossíntese celular dos anaeróbios autótrofos.

Com relação às velocidades médias de produção de metano, esta foi de 0,016 e 0,09 mmoles de $\text{CH}_4/\text{L.h}$ para os frascos 5 e 6, respectivamente. A diminuição nas velocidades médias de produção do gás metano em ambos os frascos de reação, em relação ao primeiro período do experimento, pode estar em função das condições nutricionais do lodo, originalmente superiores.

Após transcorrido o período de 20 dias, foi realizada a adição de meio de cultura Zinder contendo NH_4Cl e solução de bicarbonato de sódio, em 50% da concentração originalmente empregada. Esses frascos foram acompanhados por mais 16 dias, e a Figura 5.12 mostra os valores dos gases obtidos nesse terceiro período de incubação.

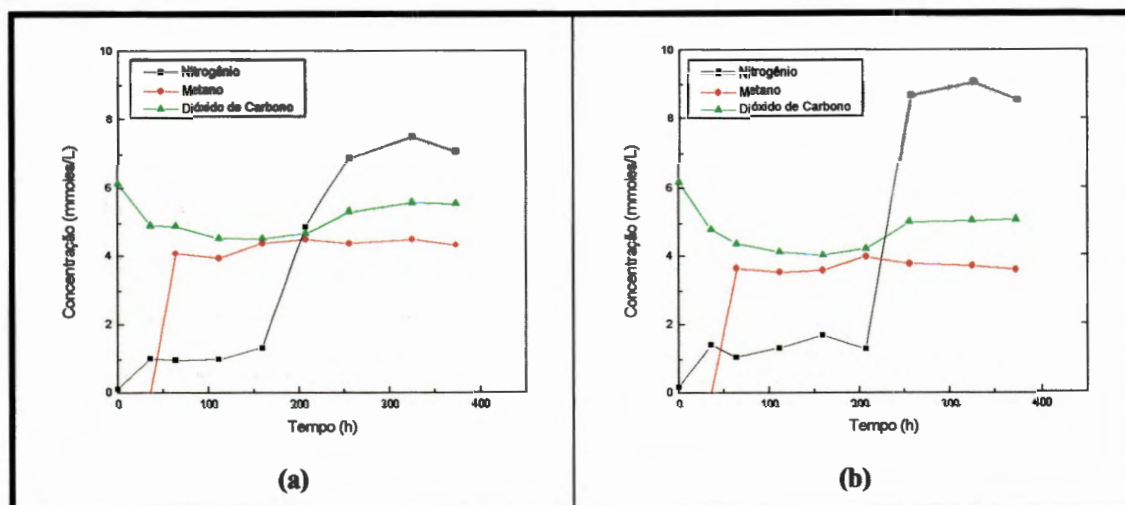


FIGURA 5.12 - Valores da concentração, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono presentes nos frascos de cultura durante o terceiro período de incubação (a) frasco 5, (b) frasco 6.

Os valores dos gases observados na Figura 5.12 indicam uma queda acentuada nos valores de metano em relação ao período de incubação inicial, bem como o início da produção antes das primeiras 50h seguida da estabilização da concentração final. O gás nitrogênio somente apareceu entre 150 e 200 h, período correspondente a um aumento rápido desse gás no sistema, atingindo valores semelhantes aos encontrados nos períodos anteriores de incubação, cuja faixa esteve entre 6 a 8 mmoles/L. A variação de dióxido de carbono foi pequena, e semelhante à dos outros períodos. Nesse experimento, foi observada a formação de vácuo no sistema, mas novamente, não se relacionou a presença de nitrogênio com a provável contaminação com o ar atmosférico, pois os picos relativos aos outros gases não variaram durante as amostragens finais realizadas, o que seria uma resposta comum na composição dos gases presentes na atmosfera dos frascos de reação nas condições de vácuo. A menor concentração de metano pode ser explicada pela falta de fontes nutricionais ao longo do experimento, uma vez que apenas hidrogênio e dióxido de carbono eram adicionados ao meio, e o meio mineral Zinder não foi suficiente para suportar o crescimento celular. A exemplo dos outros dois grupos de experimentos, o meio Zinder acrescido do lodo original não manteve as condições ideais para a metanogênese do lodo em todos os períodos de incubação.

Como a presença de nitrogênio gasoso foi constatada nesse terceiro grupo de experimentos, e a fim de tentar minimizar as dúvidas quanto à possível produção biológica do mesmo, os frascos de reação continuaram a ser incubados, mediante nova adição de meio mineral contendo NH_4Cl e da mistura gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono. Nesse período, superior a 600 h de incubação, as adições dos gases foram feitas a cada estabilização da produção de metano, procurando-se lavar a atmosfera dos frascos com a mistura gasosa, evitando-se a criação de vácuo, e assim verificar se o nitrogênio aparecia de uma forma gradual e concomitante com a formação do metano. A Figura 5.13 mostra o comportamento dos sistemas quando submetidos às sucessivas trocas de atmosfera gasosa. A concentração de dióxido de carbono sempre esteve próxima a 6 mmoles/L quando da troca da atmosfera, e assim, de acordo com os valores observados para este gás no início dos outros períodos. A formação de vácuo não foi constante e não pôde ser correlacionada com a quantidade de metano medida.

Exceto para o período entre 300 e 500 h, os gases nitrogênio e metano estiveram presentes ao mesmo tempo, mas em quantidades bem diferentes. As réplicas não apresentaram resultados comuns, e a concentração de metano foi muito baixa comparada com as incubações anteriores. O metano no frasco 5, em geral, foi inferior ao nitrogênio, e superior na maioria do tempo no reator 6. Este período não revelou concentrações adequadas para inferir sobre a atividade celular, mas a inconstância do comportamento dos gases nitrogênio e metano sugerem não ser possível certificar a origem biológica do nitrogênio, apesar de todos os cuidados com a manutenção da anaerobiose estrita.

O trabalho de BHADRA et al. (1987) não revelou nenhuma informação experimental sobre a teoria da formação de ambos os gases, através da necessária transferência de hidrogênio interespecies proposta pelos autores. As concentrações de nitrogênio amoniacal, como será adiante mostrado, não se alteraram nos experimentos com a mistura gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono, da mesma forma observada anteriormente nos outros dois conjuntos de experimentos, e não

indicaram uma relação entre a presença de nitrogênio gasoso e desaparecimento de nitrogênio amoniacal do sistema. Porém, nitrogênio amoniacal deveria ser no mínimo utilizado pelas células durante a metanogênese nos sistemas. Os resultados de MULDER et al. (1995) permitiram visualizar a formação de metano e nitrogênio em taxas aproximadas de 20:70, o restante sendo dióxido de carbono. Nos experimentos, os autores necessitaram de um período de 450 dias de incubação para que o lodo oxidasse o íon amônio em reatores operados sob condições contínuas, e as taxas mencionadas fossem constantes.

Os tempos de incubação empregados nos três grupos de experimentos foram bastante inferiores aos utilizados no enriquecimento de culturas capazes de oxidar o íon amônio em nitrogênio gasoso, realizado por MULDER et al. (1995). Uma vez obtida a cultura, os experimentos em batelada foram feitos pelos autores em tempos bastante rápidos, da ordem de horas.

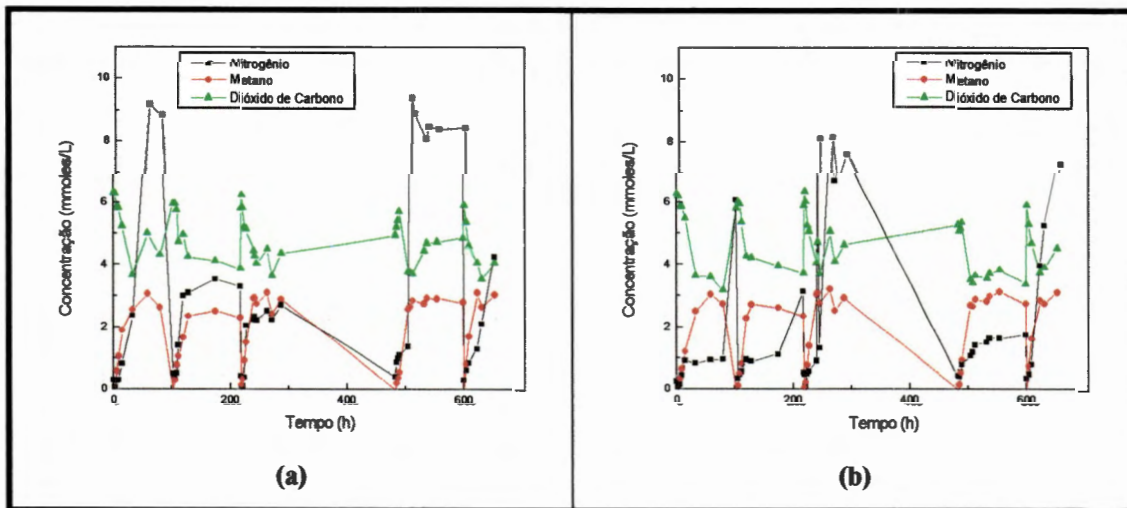


FIGURA 5.13 - Valores da concentração, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono presentes nos frascos de cultura durante o quarto período de incubação. (a) frasco 5, (b) frasco 6.

Após o término da incubação de aproximadamente 25 dias, o meio de cultivo contendo o crescimento celular foi utilizado como inóculo para outros sistemas, que constituíram o quarto grupo de experimentos.

As análises da concentração de nitrogênio amoniacal foram realizadas em quatro diferentes períodos de incubação, a saber, final do segundo, terceiro e quarto período; término do experimento. A Tabela 5.5 apresenta os valores das análises. Pode-se observar que, inicialmente, os frascos de reação tinham valores semelhantes aos da quantidade de nitrogênio amoniacal originalmente adicionada ao meio como cloreto de amônio, ou seja, em torno de 0,5 g/L. Os valores de nitrogênio amoniacal, aumentaram no final do terceiro e quarto períodos, mantendo-se no final do experimento.

Os resultados observados permitiram concluir que os diferentes experimentos apresentaram o mesmo comportamento do nitrogênio amoniacal. Cabe ressaltar que não houve limitação de substrato referente a ele.

TABELA 5.5 - Valores em g/L de nitrogênio amoniacal.

Frascos	Final do 2° Período	Final do 3° Período	Final do 4° Período	Final do experimento
5	0,61	0,79	0,83	0,85
6	0,62	0,68	0,75	0,75

5.3.2 Análises Microscópicas

Este grupo de experimentos foi monitorado por meio de análises microscópicas das amostras ao longo do experimento, e as frequências de aparecimento das morfologias estão indicadas na Tabela 5.6.

TABELA 5.6 - Morfologias presentes nos frascos de reação do terceiro grupo de experimentos.

Morfologias	Frequência
bacilos	muitos indivíduos ao longo do experimento
bacilos fluorescentes	muitos indivíduos ao longo do experimento
agrupamento de bacilos	muitos indivíduos ao longo do experimento
cocos	vários agrupamentos no início, diminuindo ao longo do enriquecimento
vibrios e bacilos espiralados	muitos indivíduos durante o início, diminuindo ao longo do experimento
vibrios com formato de grãos de feijão	ausentes
filamentos finos e longos	presença moderada durante o experimento
filamentos grossos e longos	presença moderada durante o experimento
filamentos semelhantes a “fungos”	presença moderada durante todo o enriquecimento
presença de esporos	ausentes no início, aumentando durante o enriquecimento

A Figura 5.14 mostra algumas fotomicrografias realizadas durante o enriquecimento das culturas bacterianas. As Figuras 5.14a e b são referentes ao segundo período de incubação. A Figura 5.14a apresenta um bacilo espiralado, bastante comum no início do enriquecimento. A Figura 5.14b mostra filamentos finos e longos que tiveram sua frequência aumentada durante o enriquecimento das culturas.

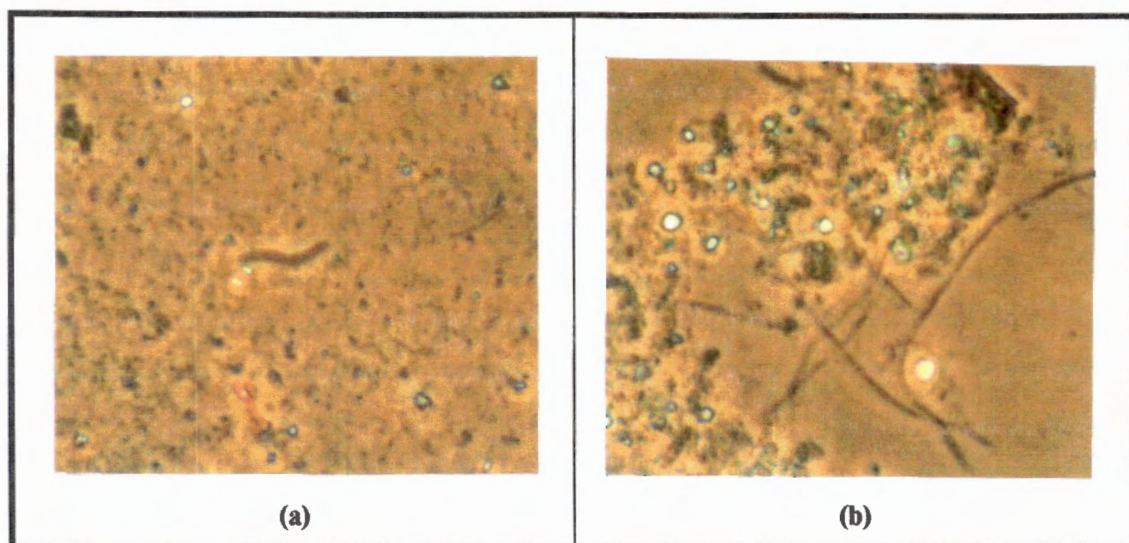


FIGURA 5.14 - Aspectos morfológicos de algumas bactérias presentes nos frascos de cultivo pertencentes ao terceiro grupo de experimentos (ocular 10, objetiva 100, zoom 1,25). (a) frasco 5, (b) frasco 6.

5.4 Quarto Grupo de Experimentos

5.4.1 Análises Cromatográficas

Devido às constantes repetições nos resultados, que mostram uma possível produção biológica de gás nitrogênio no terceiro grupo de experimentos, os meios de cultivo dos frascos 5 e 6 contendo crescimento celular foram então subdivididos em três grupos. Os frascos 5A e 6A foram alimentados com meio Zinder e formiato de sódio com o intuito de fornecer hidrogênio e dióxido de carbono em solução, para as bactérias metanogênicas, sendo mantidos sob atmosfera de 100% de Hélio. Os frasco 5B e 6B foram inicialmente alimentados com meio Zinder e mantidos sob atmosfera composta pela mistura gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono; após três dias a atmosfera foi substituída por outra de 100% de dióxido de carbono, com o intuito de verificar a ocorrência de produção de nitrogênio gasoso somente na presença deste gás. Após 600 h de incubação, os frascos receberam novamente hidrogênio e dióxido de carbono (70 - 30%). Os frascos 5C e 6C foram alimentados com meio Zinder e extrato de esgoto (concentração de 0,1%) e mantidos sob atmosfera de hidrogênio e dióxido de carbono (70 -30%).

O extrato de lodo foi empregado para estimular o crescimento celular. Em função do decréscimo na produção do metano no decorrer do experimento anterior, buscou-se acrescer ao meio de cultivo, que seria mantido sob atmosfera de hidrogênio e dióxido de carbono, micronutrientes presentes no lodo biológico estudado.

O anexo B, Tabelas B.37 a B.42, apresenta os valores médios das análises cromatográficas obtidas para os frascos de reação pertencentes a este grupo de experimentos.

Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 5.15. Os frascos 5A e 6A, acrescidos de formiato de sódio, não apresentaram produção de metano, bem como os gases nitrogênio e dióxido de carbono. As concentrações foram muito baixas, o que revela, após 1.200 h de incubação, que não houve atividade do consórcio microbiano nessas condições. Ao empregar-se o formiato de sódio como fonte para metanogênese, a idéia foi substituir a fonte gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono, ou seja, promover o metabolismo metanogênico hidrogenotrófico por um substrato alternativo e não gasoso. Como indicado por OREMLAND (1988), a produção do metano a partir da redução do dióxido de carbono pela maioria das metanogênicas hidrogenotróficas, pode se dar via hidrogênio gasoso ou formiato.

A ausência de metano pode ser explicada pela seleção de tipos metanogênicos hidrogenotróficos não utilizadores de formiato (autótrofos obrigatórias), como por exemplo algumas espécies de *Methanobacterium*, *M. alcaliphilum*, e *Methanobrevibacter*, *M. arboriphilicus*, ambas comuns em biodigestores de lodos de esgoto (OREMLAND, 1988; JONES, 1991); ou mesmo, pela adição do meio Zinder com pouca fonte de micronutrientes. O objetivo desse cultivo foi verificar se a falta de hidrogênio gasoso no meio influenciaria o aparecimento do nitrogênio, mas não a geração do metano.

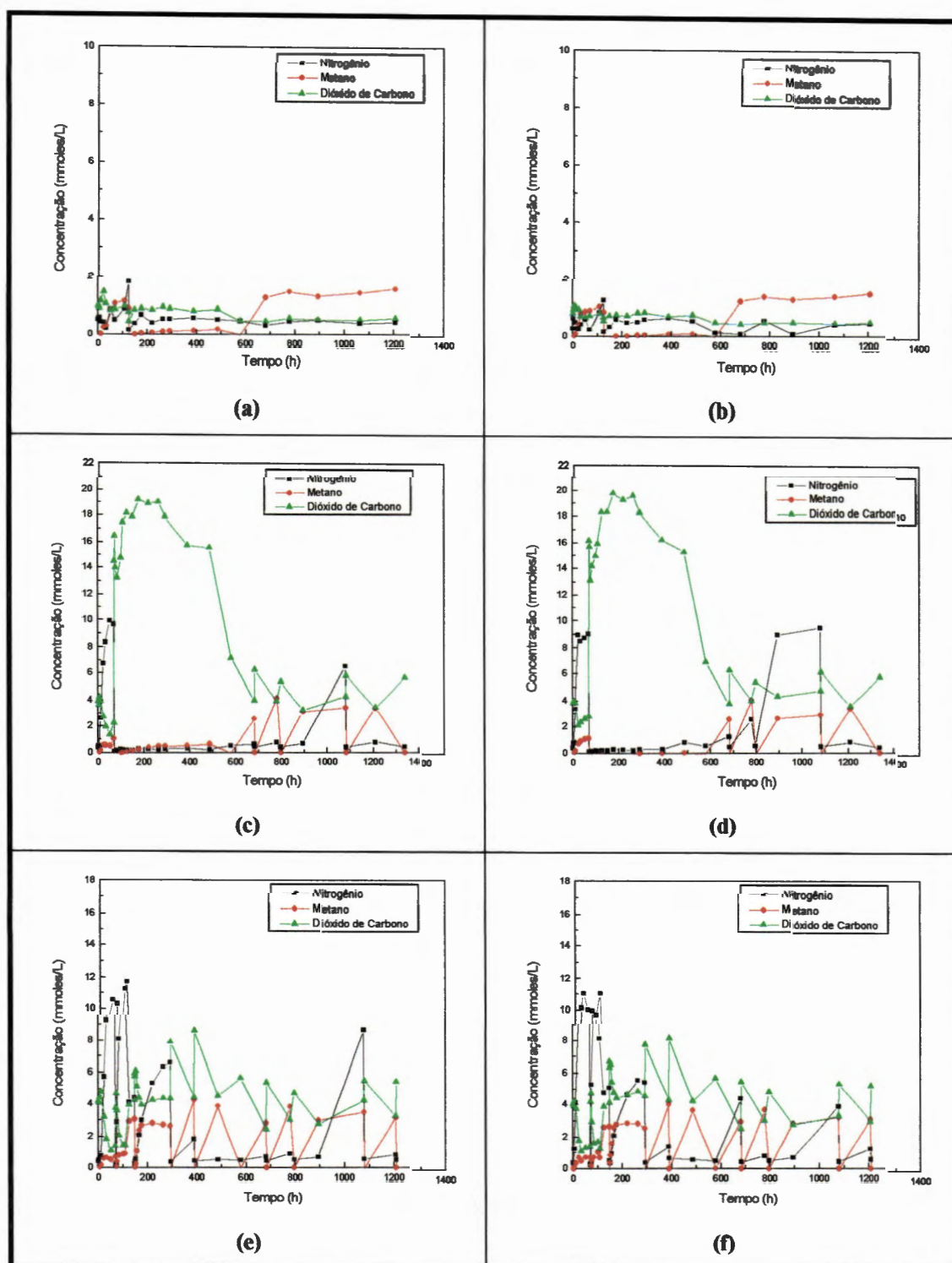


FIGURA 5.15 - Valores da concentração, em mmoles/L, de nitrogênio, metano e dióxido de carbono presentes nos frascos de cultura. (a) frasco 5 A, (b) frasco 6 A, (c) frasco 5 B, (d) frasco 6 B, (e) frasco 5 C e (f) frasco 6 C.

Nos frascos alimentados com dióxido de carbono (Figura 5.15c e d) também não foi constatada a produção de gás nitrogênio e muito pouco de metano, ocorrendo a produção dos dois gases somente na presença dos gases hidrogênio e dióxido de carbono (70 - 30%), adicionados após 600 h de experimento, o que mostra a diminuição da atividade microbiana metanogênica na ausência do hidrogênio. Nos frascos alimentados com extrato de lodo e acrescidos da atmosfera de hidrogênio e dióxido de carbono (70 - 30%), foi constatada uma pequena produção de gás nitrogênio e uma produção de gás metano em torno de 4 mmoles/L. Interessante notar que nos frascos 5C e 6C, a presença de nitrogênio nas 150 h iniciais foi elevada não havendo quantidades significante de metano. Após esse período, observa-se metano e ausência de nitrogênio.

As oscilações observadas nas Figuras 5.15e e f e a partir de 600 h nas Figuras 5.15c e d, são referentes às trocas de atmosfera realizadas para promover o suprimento de hidrogênio e dióxido de carbono, como anteriormente comentado.

Apesar das baixas concentrações de metano, o lodo ativo na presença de hidrogênio e dióxido de carbono, e a quantidade de extrato de lodo utilizada não fez diferença na ação dos microrganismos, uma vez que os frascos 5B e 6B, que não receberam extrato de lodo, apresentaram respostas semelhantes quando na presença da mistura gasosa (após 600 h de ensaio, Figura 5.15c e d). É importante destacar a qualidade das réplicas nas três condições estudadas.

Como descrito para os experimentos anteriores, foram realizadas análises para verificar a presença de nitrogênio amoniacal. Foram efetuadas após 25 dias, final do 1º período e 52 dias de enriquecimento (término do experimento), as referidas análises. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 5.7.

TABELA 5.7 - Valores em g/L de nitrogênio amoniacal.

Frascos	Final do 1º. período	Final do experimento
5 A	0,85	0,66
6 A	0,60	0,59
5 B	0,73	0,77
6 B	0,72	0,72
5 C	0,71	0,76
6 C	0,65	0,65

Os valores no final do primeiro período estiveram na faixa de 0,60 a 0,85 g/L, sendo estes bastante variáveis para os frascos de reação. Possivelmente, a diferença entre as réplicas tenha relação com a distribuição de inóculo durante a montagem dos sistemas. Mais uma vez, a variação na concentração do nitrogênio amoniacal mostra que não houve alteração do íon amônio no decorrer do experimento.

5.4.2 Análises Microscópicas

5.4.2.1 Microscopia de campo claro sob contraste de fase e luz ultravioleta

Este grupo de experimentos possuía, no início, predomínio de bacilos e filamentos finos e longos, ambos fluorescentes. Este predomínio morfológico se deve ao fato de o inóculo ser proveniente dos frascos de reação do terceiro grupo de experimentos, no qual estes microrganismos tiveram seu enriquecimento favorecido. As frequências das análises microscópicas são apresentadas no item 4.2.6.2. Na Tabela 5.8, são mostradas as morfologias presentes nos frascos de reação.

TABELA 5.8 - Morfologias presentes nos frascos de reação do quarto grupo de experimentos.

Morfologias	Frequência
bacilos	muitos indivíduos ao longo do experimento
bacilos fluorescentes	muitos indivíduos ao longo do experimento
agrupamento de bacilos	muitos indivíduos ao longo do enriquecimento
cocos	poucos agrupamentos ao longo do enriquecimento
vibrios	ausentes
vibrios com formato de grãos de feijão	ausentes
filamentos finos e longos	presença moderada no início aumentando durante o experimento
filamentos grossos e longos	presença moderada durante o experimento
filamentos semelhantes a “fungos”	presença moderada durante todo o enriquecimento
presença de esporos	presença moderada durante o enriquecimento

As Figuras 5.16 e 5.17 mostram algumas fotomicrografias realizadas durante o enriquecimento das culturas bacterianas do quarto grupo. Estas fotos são referentes ao término do período de incubação. Pode-se notar a predominância de bacilos e filamentos finos e longos, todos fluorescentes.

Na Figura 5.16, podem ser observadas morfologias associadas ao gênero *Methanobrevibacter* sp (Figura 5.16a), filamentos semelhantes a fungos (Figura 5.16b), além de bacilos e filamentos finos e longos, ambos fluorescentes, nas Figuras 5.16c e d.

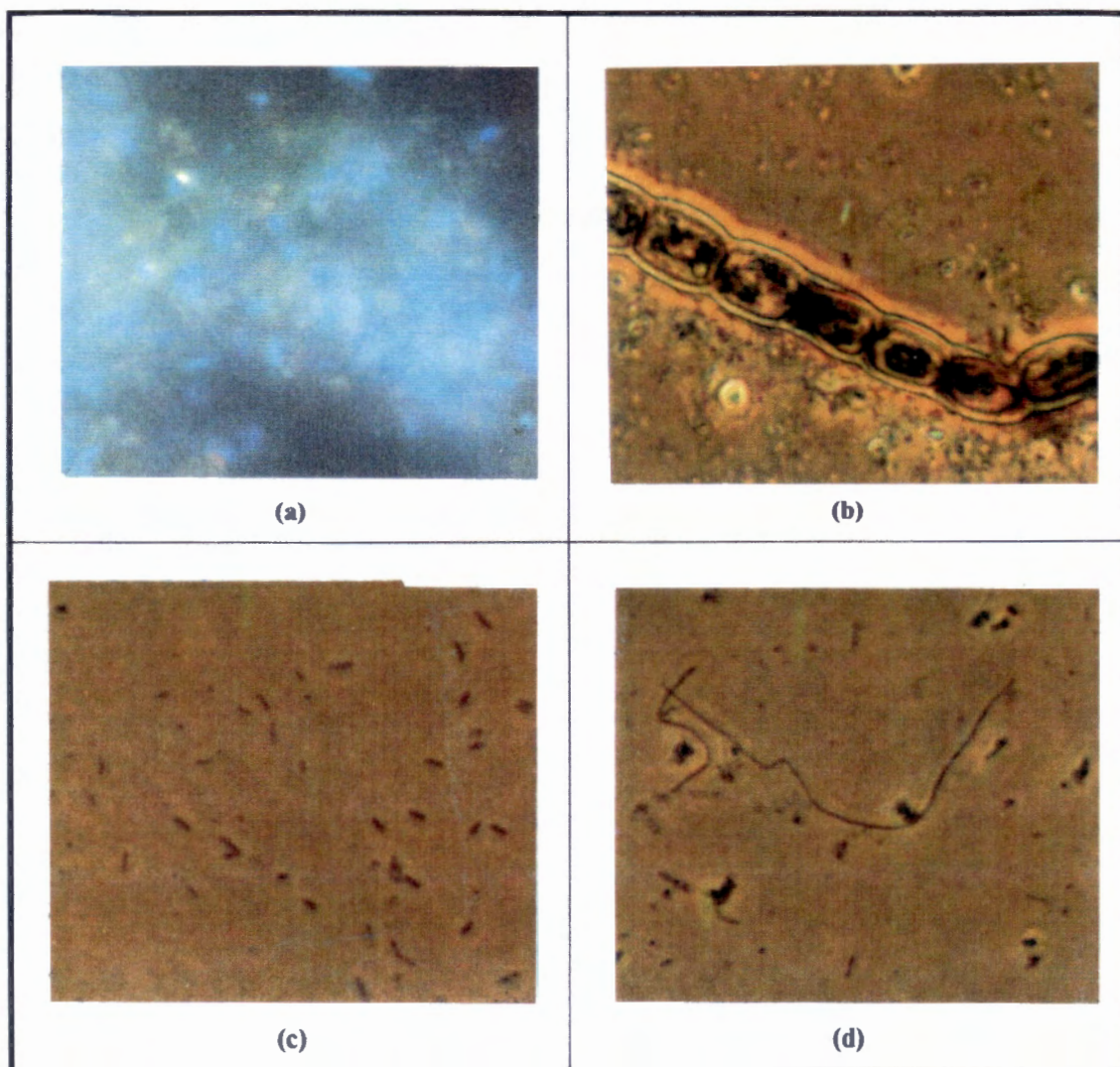


FIGURA 5.16 - Aspectos morfológicos de alguns microrganismos presentes nos frascos de cultivo pertencentes ao quarto grupo de experimentos (ocular 10, objetiva 100, zoom 1,25). (a) e (b) frasco 5C, (c) e (d) frasco 6C.

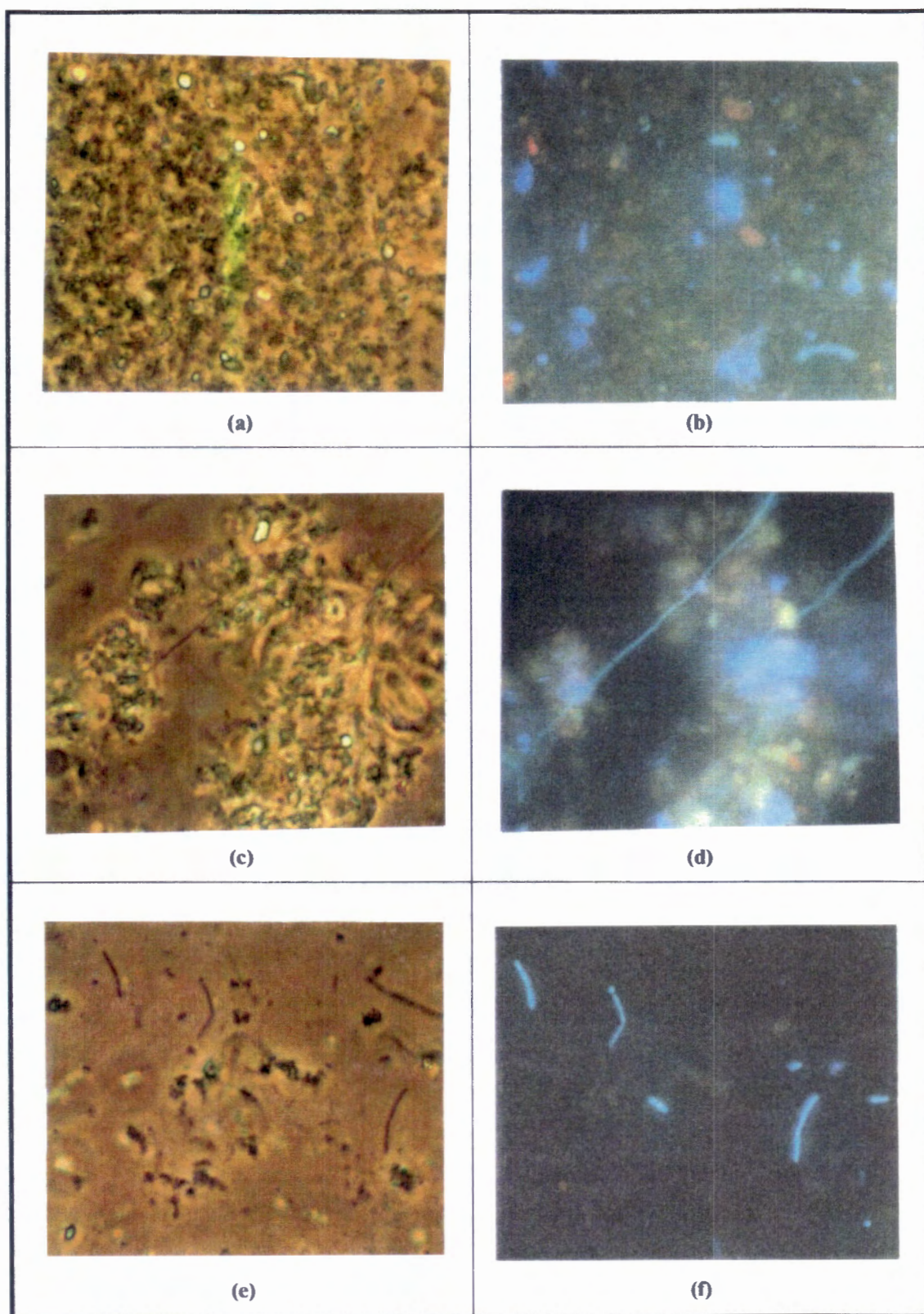


FIGURA 5.17 - Aspectos morfológicos de alguns microrganismos presentes nos frascos de cultivo pertencentes ao quarto grupo de experimentos (ocular 10, objetiva 100, zoom 1,25). (a) e (b) frasco 5A (mesmo campo), (c) e (d) frasco 6B (mesmo campo); (e) e (f) frasco 5C (mesmo campo).

A Figura 5.17 apresenta fotomicrografias referentes ao exame microscópico sob campo claro com contraste de fase (Figuras 5.16 a, c e e) e sob luz ultravioleta (Figura 5.17b, d e f). As Figuras 5.17e e f apresentam morfologias que foram associadas ao gênero *Methanobacterium* sp, como descrito no Manual de BERGEY para Sistemática Bacteriana (1989).

A Figura 5.18 a seguir apresenta o resultado das diluições realizadas com as amostras provenientes dos frasco 5C e 6C, pertencentes ao quarto grupo de experimentos.

Observa-se, na Figura 5.18, a predominância de bacilos e filamentos finos e longos. Além disso, nota-se a formação de aglomerados de bacilos e filamentos, todos fluorescentes. Estes microrganismos foram semelhantes ao gênero *Methanobacterium* sp.

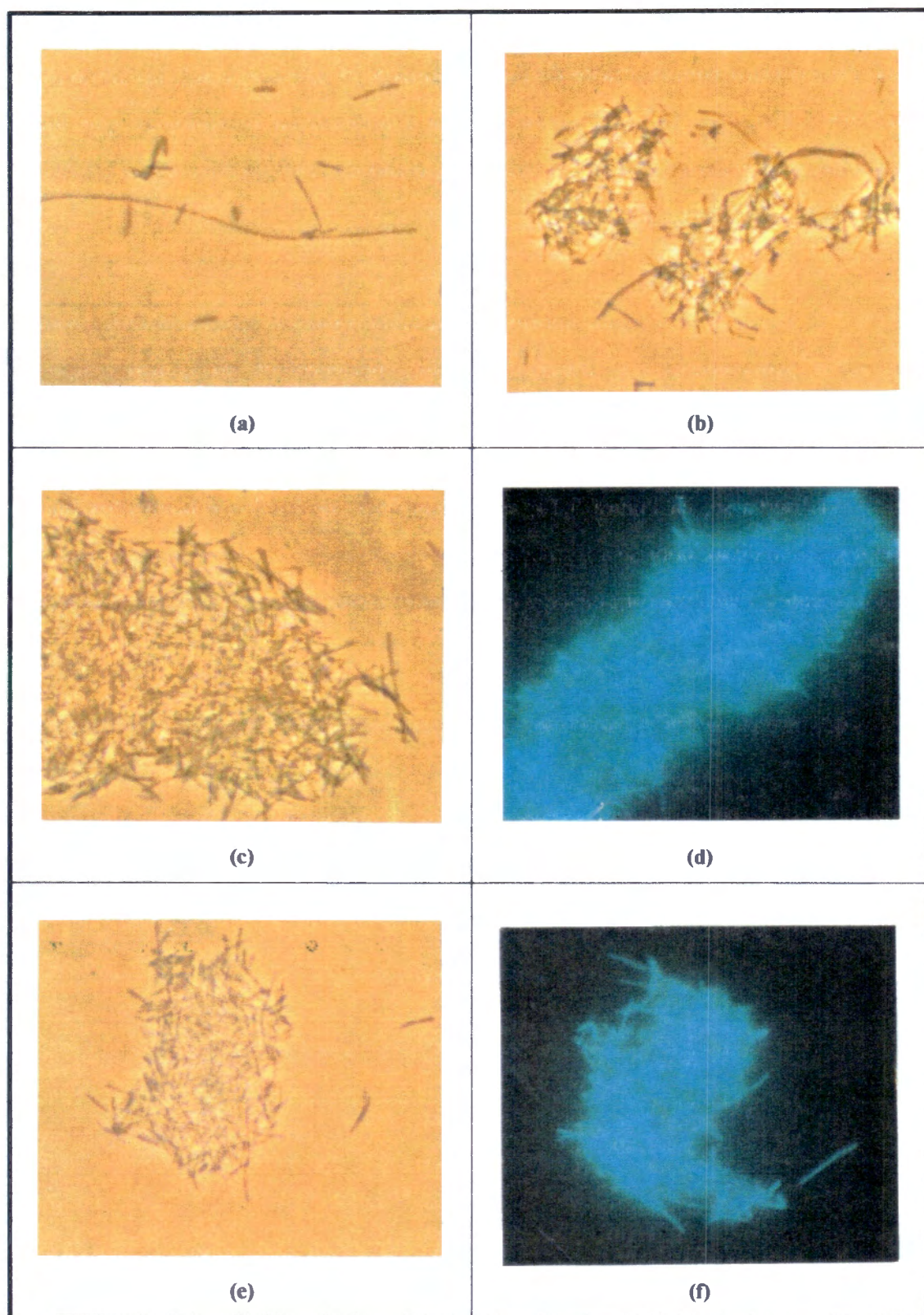


FIGURA 5.18 - Aspectos morfológicos de alguns microrganismos presentes nos frascos de cultivo pertencentes as diluições (ocular 10, objetiva 100, zoom 1,25).

5.4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a obtenção dos resultados referentes ao quarto grupo de experimentos, foi realizada a análise das culturas bacterianas existentes nos frascos 5C e 6C sob microscopia eletrônica de varredura, como descrito no item 4.2.6.2. As figuras a seguir (Figuras 5.19 a 5.23) mostram as fotomicrografias referentes a esta análise.

Examinando-se as figuras, nota-se a presença predominante de bacilos bastante semelhantes ao gênero *Methanobrevibacter* sp, os quais usualmente ocorrem aos pares ou formando cadeias, tendo de 0,5 - 0,7 μm de largura e 0,8 - 1,4 μm de comprimento, e *Methanobacterium* sp, medindo 0,5 - 1,0 μm de largura e de 2 - 15 μm de comprimento.

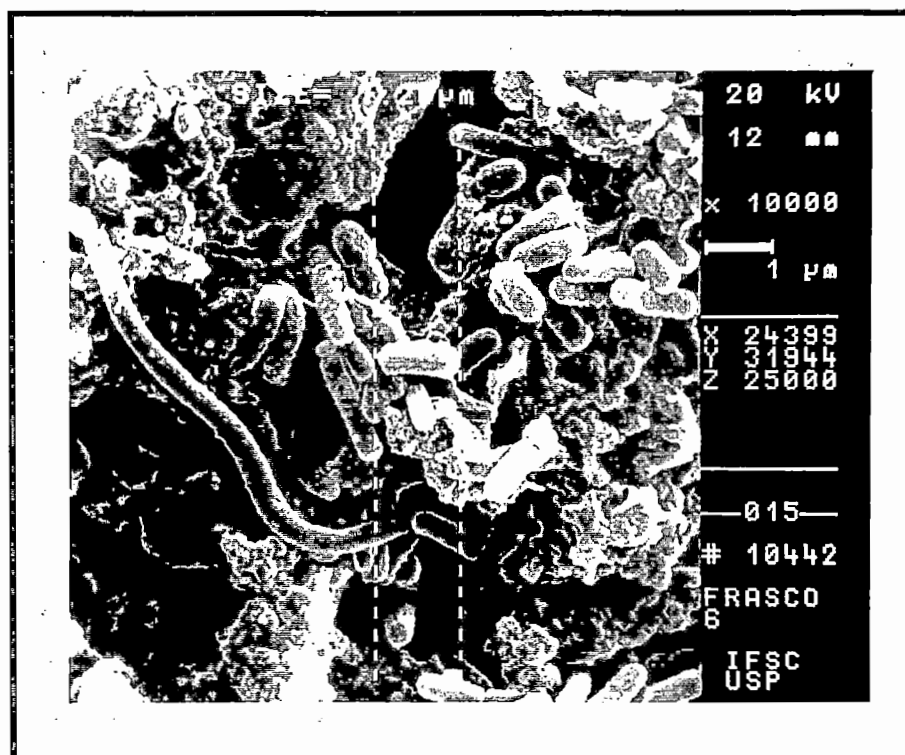


FIGURA 5.19 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia predominante nos frascos de diluição.



FIGURA 5.20 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia predominante nos frascos de diluição.

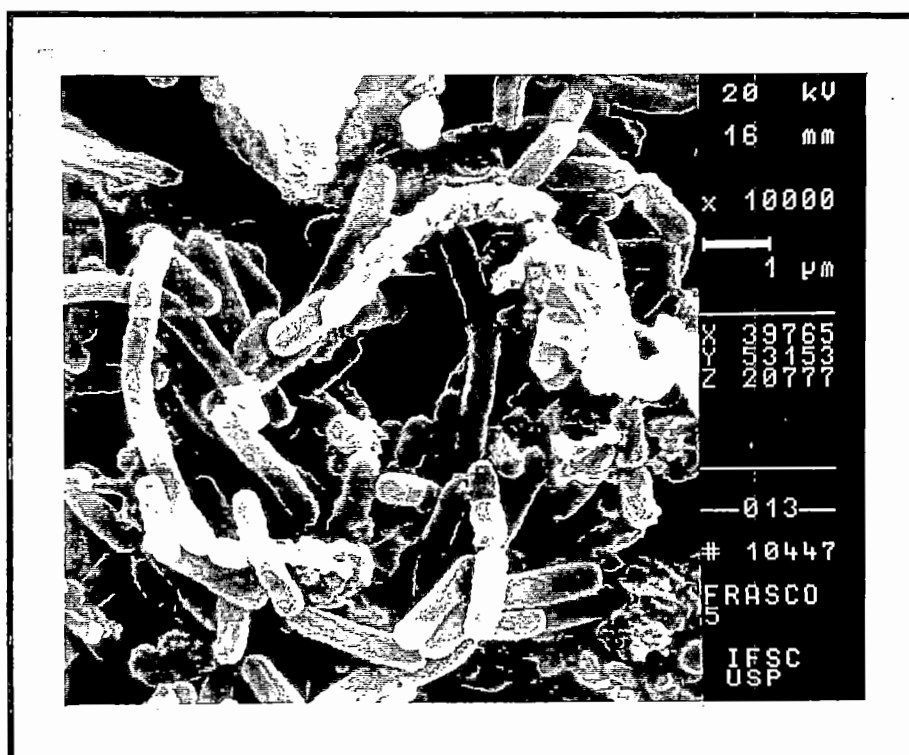


FIGURA 5.21 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia predominante nos frascos de diluição.

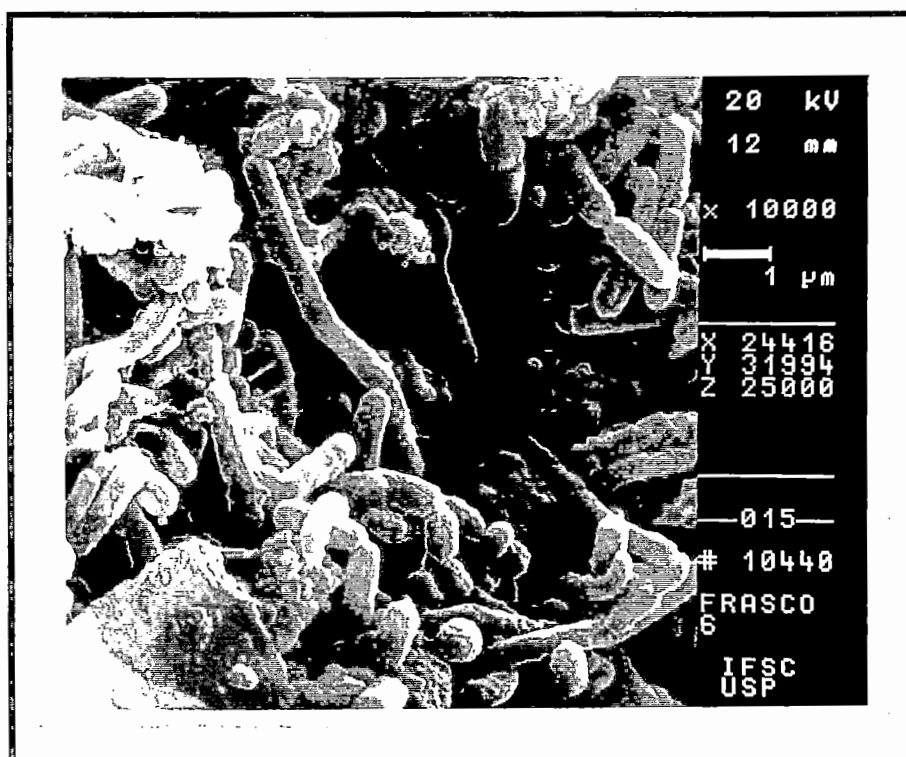


FIGURA 5.22 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia predominante nos frascos de diluição.

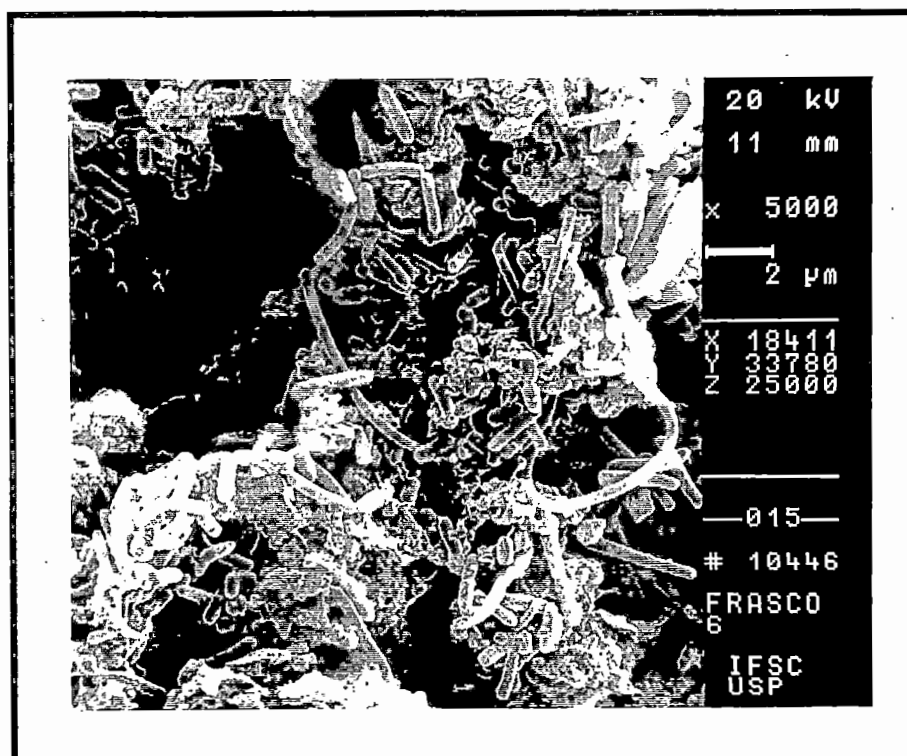


FIGURA 5.23 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia predominante nos frascos de diluição.

5.5 Uma breve análise do conjunto de resultados experimentais

As Figuras 5.24 e 5.25 apresentam os valores dos gases nitrogênio e metano medidos em todos os frascos de reação do primeiro e segundo períodos de incubação.

Estas figuras permitem uma breve análise comparativa do comportamento dos resultados obtidos nos diferentes grupos de experimento.

A determinação dos valores dos gases por meio das análises cromatográficas mostrou-se uma maneira rápida e adequada para avaliar a produção dos gases.

A Figura 5.24 é referente ao primeiro período de incubação. A observação da mesma permite verificar que todos os frascos produziram metano, mas o nitrogênio observado foi relacionado à forma de fechamento inicial dos frascos.

A legenda ao lado correspondente as Figuras 5.24 e 5.25.

—●—	Frasco 1
—●—	Frasco 2
—▲—	Frasco 3
—▼—	Frasco 4
—◆—	Frasco 5
—+—	Frasco 6
—x—	Frasco 7
—*—	Frasco 8
— —	Frasco 10

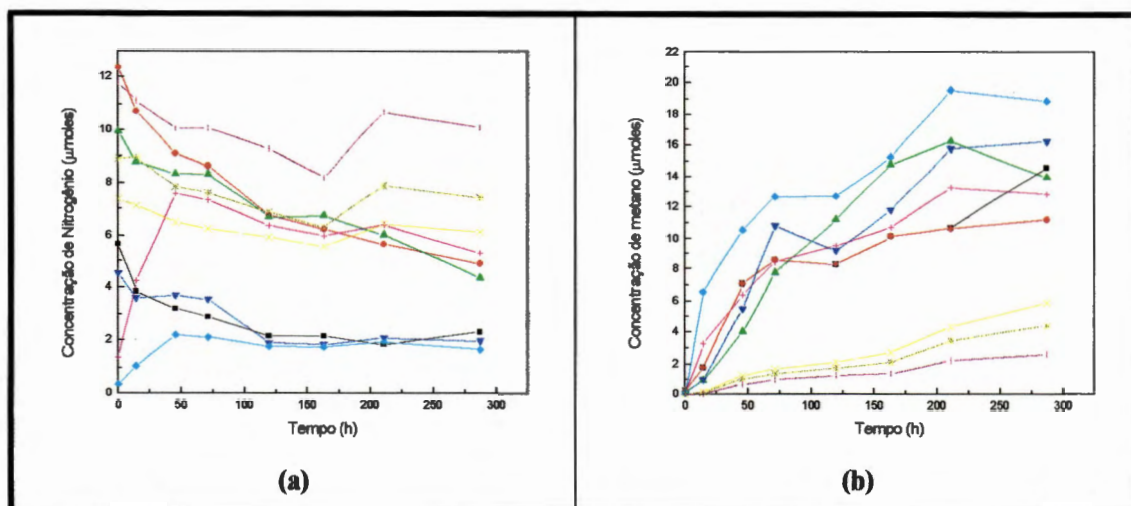


FIGURA 5.24 - Valores das concentrações, em mmoles/L, (a) de nitrogênio e (b) de metano, presente nos frascos de reação 1 a 10, durante o primeiro período de enriquecimento.

A Figura 5.25 mostra que nitrogênio esteve presente nos frascos 5 e 6, e que a troca de atmosfera dos frascos foi adequada. A presença de metano sempre constatada, embora em menores valores, segundo as condições iniciais dos experimentos, ou conseqüências das reações ao longo do tempo de incubação.

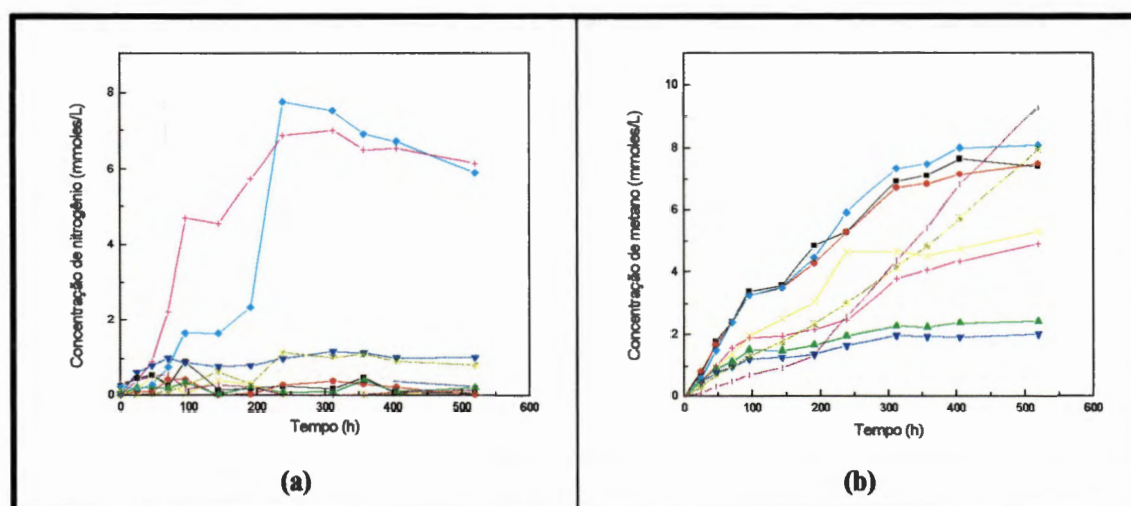


FIGURA 5.25 - Valores das concentrações, em mmoles/L, (a) de nitrogênio e (b) de metano presente, nos frascos de reação 1 a 10, durante o segundo período de enriquecimento.

O terceiro período revelou menor produção de metano em todos os experimentos, o que foi relacionado às condições inadequadas do meio de cultivo.

A discussão que se segue procurou avaliar as premissas de cada experimento realizado nesse trabalho, e as conclusões possíveis dos mesmos à luz da bibliografia utilizada como base fundamental dos experimentos.

A importância da aplicabilidade do tratamento anaeróbio de esgotos sanitários não é mais discutida, uma vez que esta se fundamenta em teses defendidas (VIEIRA, 1988; BARBOSA & SANT'ANNA, 1989; TORRES, 1992; VALLEJOS, 1997; OLIVA, 1997), além da experiência em escala piloto e real (VIEIRA, 1988; CAMPOS, 1994; VIEIRA e CARVALHO, 1995; OLIVA, 1997). Porém, o aprimoramento do processo através da elucidação de alguns aspectos sobre a microbiologia responsável pela degradação dos compostos, por exemplo, nitrogenados, poderia estimular ainda mais sua adoção. A remoção de nutrientes é um aspecto primordial dos processos biológicos de tratamento de despejos, e portanto, remover o nitrogênio amoniacal de sistemas anaeróbios, através da ação de microrganismos atuantes no próprio sistema, será um passo fundamental.

Autores como MERGAERT et al. (1992) e FORESTI (1994, comunicação pessoal) têm destacado essa perspectiva, da oxidação anaeróbia do íon amônio em sistemas de tratamento anaeróbio de esgotos sanitários. MERGAERT et al. (1992) relataram que “no processo anaeróbio de tratamento de esgotos sanitários a remoção de nitrogênio pode estar relacionada a novas e surpreendentes perspectivas, em que a oxidação anaeróbia do nitrogênio amoniacal tem sua ocorrência ligada a duas condições, como já mencionado na revisão de literatura, através da transferência de hidrogênio entre espécies e metanogênese” e/ou do “ANAMOX”.

Os resultados experimentais dessa dissertação de mestrado lançaram pouca evidência sobre enriquecimentos de lodos biológicos originados de um reator de fluxo ascendente e manta de lodo operado com esgotos sanitários (VIEIRA, 1988;

BARBOSA & SANT'ANNA, 1989; TORRES, 1992; VALLEJOS, 1997; OLIVA, 1997) para a produção de nitrogênio gasoso a partir de nitrogênio amoniacal.

O simples cultivo da biomassa em cloreto de amônio não apresentou indicação para a produção de nitrogênio (Figuras 5.24 e 5.25 e comentários anteriores), tão pouco o lodo anaeróbio respondeu ao cultivo na presença de nitrato e íon amônio, como observado no processo "ANAMOX" (MULDER et al., 1995; van de GRAAF et al., 1995). Os resultados do "ANAMOX", como observado por STROUS et al. (1997), são excelentes para a remoção do nitrogênio amoniacal e combinam um passo nitrificante com um posterior sistema anaeróbio para a completa oxidação do íon amônio por uma espécie bacteriana "nova".

Nesse ponto, a possível ocorrência do "ANAMOX" no lodo estudado, necessitaria de passos de enriquecimento apenas com nitrato de amônio, em sistemas contínuos, sem a preocupação com a metanogênese no reator. Os testes realizados em batelada não favoreciam a seleção das culturas. Além disso, apesar de os artigos de MULDER et al. (1995) e van de GRAAF (1995) não indicarem meios de cultivo ricos para o enriquecimento das culturas "ANAMOX", é provável que o meio mineral de Zinder não tenha sido adequado para fornecer as condições necessárias para o lodo biológico estudado. É importante comentar que, no enriquecimento das culturas dos frascos 7 e 8, na presença de nitrato de amônio, foi mantida como condição a ocorrência da metanogênese, pois foi a mesma condição do processo estudado pelos autores MULDER et al. (1995), que nortearam o presente trabalho. É também provável que, nos ensaios com nitrato, a relação nitrogênio amoniacal: nitrato: SSV tenha sido insuficiente para os experimentos em batelada. Os autores utilizaram uma relação de 1 g de NH_4NO_3 para cada 10 g SSV, e nesse trabalho empregou-se 0,5 g NH_4NO_3 para 20 g SSV.

Os resultados de van de GRAAF et al. (1995) e JETTEN et al. (1997) mostraram que uma morfologia típica bacteriana se estabeleceu nos reatores que realizavam o "ANAMOX", mas não relacionaram as mesmas a nenhum gênero

bacteriano que participasse dos passos tradicionais da nitrificação e desnitrificação. No entanto, os autores discutiram que um gênero nitrificante *Nitrosomonas europea*, sob condições de deficiência de oxigênio, poderia utilizar nitrato como acceptor final de elétrons. JETTEN et al. (1997), posteriormente, em uma revisão, indicaram o crescimento anaeróbio da espécie *Nitrosomonas eutropha*, na presença de baixíssimas concentrações de oxigênio, e indicaram o hidrogênio molecular como doador de elétrons para que o nitrito fosse reduzido ao gás nitrogênio. Nesse trabalho, o autor não detectou óxido nitroso, intermediário comum nas reações de desnitrificação.

O presente trabalho não identificou nenhuma morfologia bacteriana peculiar que se destacasse, nem mesmo nos ensaios em que metano e nitrogênio estiveram presentes (frascos 5 e 6 - Figuras 5.24 e 5.25). Porém, é certo que hidrogenotróficas bastante semelhantes aos gêneros *Methanobrevibacter* sp e *Methanobacterium* sp predominaram nos lodos, destacadamente nos frascos 5 e 6.

A conhecida “desnitrificação” por bactérias nitrificantes (ROBERTSON & KUENEN, 1991; JETTEN et al., 1997) foi também verificada em bactérias como *Enterobacter aerogenes*, e nesse caso, assim como para *N. eutropha*, o íon amônio foi doador de elétrons; e o nitrito, o acceptor final de elétrons, desde que o ambiente fosse anóxico (BOCK* et al. apud JETTEN et al., 1997).

A produção de nitrogênio nos ensaios com hidrogênio e dióxido de carbono poderia ser relacionada a metabolismos de bactérias como os acima indicados, pois pouco se conhece sobre todas as espécies presentes em reatores anaeróbios aplicados ao tratamento de esgotos sanitários. Alguns trabalhos mostraram espécies metanogênicas, redutoras de sulfato e hidrolítico-fermentativas (NOVAES et al., 1988), mas são poucos aqueles que estudaram a presença de espécies não anaeróbias estritas, que persistem no reator anaeróbio sob determinadas condições, como é o exemplo do isolamento de *Chromatium* sp de biodigestor de fluxo ascendente quando

* BOCK, E.; SCHMIDT, I.; STUEVEN, R.; ZART, D. (1995). Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* V. 163, 16-20.

se tratam efluentes com baixa carga orgânica e com bactérias fotossintetizantes em nada relacionadas com a metanogênese dos resíduos (VARESCHE, 1997).

A produção de nitrogênio, no entanto, nos experimentos com hidrogênio e dióxido de carbono seria viável, se o nitrito estivesse de alguma forma presente no reator, pois verificou-se que a quantidade do íon amônio não variou no reator. Mesmo assim, a origem do nitrogênio poderia estar ligada a algum consumo do íon amônio. Nos sistemas estudados, as hidrogenações dos possíveis aceptores finais de elétrons, cuja reação resultasse no nitrogênio medido e na liberação de energia, como é o caso da desnitrificação litótrofa proposta, em que o nitrito na presença de hidrogênio gasoso formaria nitrogênio gasoso, com uma variação de energia livre padrão de - 189,8 Kcal/reação (THAUER* apud ZINDER, 1991). Essa quantidade de energia justificaria uma maior produção de nitrogênio em relação ao metano, uma vez que a hidrogenação do dióxido de carbono com metano, como produto final, resulta em energia livre padrão menor, - 32,4 Kcal/reação (THAUER* apud ZINDER, 1991).

Supondo que a teoria de BHADRA et al. (1987), eq. (3.1) e (3.2) do capítulo Revisão de Literatura, realmente possa ser verificada em consórcios metanogênicos, os resultados alcançados no enriquecimento (terceiro grupo experimento) com a mistura gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono na presença de cloreto de amônio e seus desdobramentos (quarto grupo de experimentos) não foram conclusivos, apesar das indicações da presença do nitrogênio. As análises cromatográficas foram adequadas (geralmente, quando o nitrogênio faz parte da composição da atmosfera, sua tendência é diminuir a cada amostragem, se não for produzido), assim como a qualidade de fechamento dos frascos que evita a entrada de ar do meio externo, mas a garantia dessa produção poderia ser dada se ensaios com nitrogênio amoniacal, ou mesmo precursores como uréia e proteínas, marcados radioativamente, fossem realizados (JETTEN et al., 1997). A determinação de possíveis intermediários gasosos como o óxido nítrico não é aconselhável, comum nos passos da

* THAUER, R. K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, v. 41, 100-180.

“desnitrificação tradicional”, pois não se pode certificar sobre a presença desse gás (JETTEN et al., 1997) como intermediário metabólico da “desnitrificação sob anaerobiose estrita”, ou em potenciais de oxi-redução próximos a - 100 mV, considerando também o “ANAMOX”.

O trabalho de BHADRA et al. (1987) garante que, na presença de uma mistura de ácidos orgânicos (acético, propiônico e butírico), em meio salino, ensaios em batelada e uréia foi degradada em 15 dias, e o balanço de nitrogênio no sistema indicou que parte dessa degradação resultou em nitrogênio amoniacal, e o restante teria sido liberado na forma de gás nitrogênio. Com isso, eles concluíram que, além dos ácidos orgânicos, o íon amônio serviu como doador de elétrons para a redução do dióxido de carbono a metano. O enriquecimento com apenas hidrogênio e dióxido de carbono, realizado na presença do íon amônio como cloreto de amônio pode não ter promovido as condições necessárias indicadas pelos autores, como o caminho metabólico da degradação da uréia. MERGAERT et al. (1992) indicaram a uréia como a principal fonte do íon amônio nos reatores anaeróbios de esgotos sanitários, em que 20 a 30% de nitrogênio são sempre encontrados na composição do biogás.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Da análise dos resultados obtidos durante o enriquecimento das culturas bacterianas em frascos de reação, conclui-se que:

- As análises cromatográficas foram adequadas, assim como o sistema de fechamento dos frascos de reação.
- O enriquecimento utilizando meio de cultivo Zinder contendo cloreto de amônio não apresentou indicação para a produção de nitrogênio, tão pouco o lodo anaeróbio respondeu ao cultivo na presença de nitrato e íon amônio.
- Os experimentos realizados em batelada não favoreceram a seleção de culturas para uma possível ocorrência do “ANAMOX” no lodo estudado.
- Os experimentos com a mistura gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono revelaram a presença de nitrogênio nos frascos, atribuída a uma possível atividade biológica. Nos frascos em que a presença de nitrogênio foi certificada, não se observou nenhuma morfologia celular não-fluorescente predominante.
- As morfologias predominantes, principalmente, nos experimentos utilizando cloreto de amônio sob mistura de hidrogênio e dióxido de carbono, foram as hidrogenotróficas bastante semelhantes aos gêneros *Methanobrevibacter* sp e *Methanobacterium* sp

A verificação da produção biológica do gás nitrogênio nos experimentos realizados sob atmosfera de hidrogênio e dióxido de carbono, não foram conclusivas, portanto, recomenda-se:

- Operar um reator sob condições anaeróbias e contínuas de alimentação, utilizando substrato com baixa concentração de matéria orgânica, como os esgotos sanitários, com a finalidade de enriquecer o lodo para a produção de nitrogênio e não apenas metano. Assim, utilizar esgoto sintético, com análise contínua dos compostos de nitrogênio presentes no meio (íon amônio, nitrato e nitrito) bem como nitrogênio gasoso, para um balanço adequado do “caminho da degradação de compostos nitrogenados sob condições de anaerobiose estrita”.
- Realizar testes contínuos e em batelada com nitrogênio marcado radioativamente, na forma de nitrato, nitrito ou íon amônio, para confirmar a procedência do nitrogênio gasoso, na presença da mistura gasosa de hidrogênio e dióxido de carbono.
- Realizar a caracterização sistemática dos grupos microbianos presentes, utilizando técnicas de Biologia Molecular.

ANEXO A

A.1 - Curva de calibração realizada à temperatura mesofílica de 22,5°C e corrigida para as CNTP.

A.1.1 - Curva de calibração para o gás nitrogênio

Considerações:

- Pressão local (São Carlos) = 0,9 atm; Temperatura ambiente = 22,5°C
- Grau de nitrogênio contido no cilindro de gás nitrogênio - White Martins - utilizado para a realização da curva de calibração = 99,99%

Os valores de nitrogênio da Tabela A.1 a seguir estão apresentados em: - volume de nitrogênio em mL injetados e volume de nitrogênio em mL corrigidos para as CNTP; - μ moles de nitrogênio calculados. As áreas de nitrogênio obtidas por cromatografia gasosa são médias de 2 leituras; os desvios-padrão estão apresentados entre parênteses.

TABELA A.1 - Valores de nitrogênio calculados para a realização da curva de calibração.

Volume Injetado (mL) 22,5°C	Volume N₂ (mL) CNTP	μmoles N₂	Área Média Obtida no Cromatograma
0,01	0,009	0,4	6280,50 (\pm 124,50)
0,02	0,018	0,8	13358,00 (\pm 151,00)
0,05	0,045	2,0	34400,50 (\pm 32,50)
0,10	0,091	4,0	76157,00 (\pm 412,00)
0,40	0,363	16,2	291627,00 (\pm 562,00)
0,80	0,726	32,4	587268,00 (\pm 1465,00)
1,00	0,908	40,5	731027,50 (\pm 548,50)

A Figura A.1 apresenta a curva de calibração do gás nitrogênio.

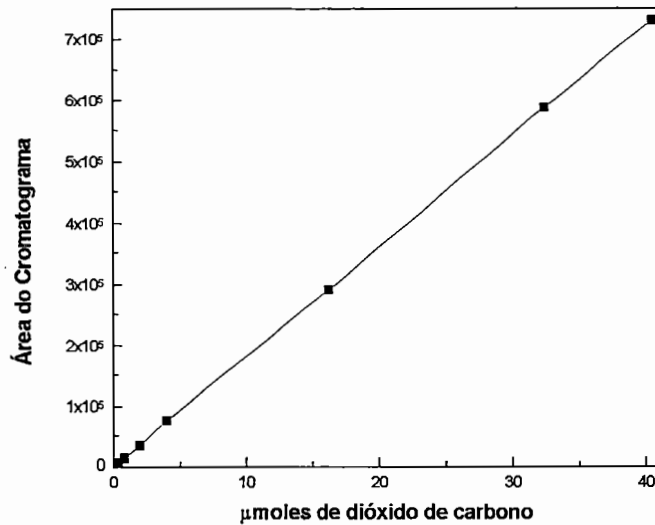


FIGURA A.1 Curva de calibração para o gás nitrogênio ($r = 0,9999$).

A.1.2 - Curva de calibração para o gás metano

Considerações:

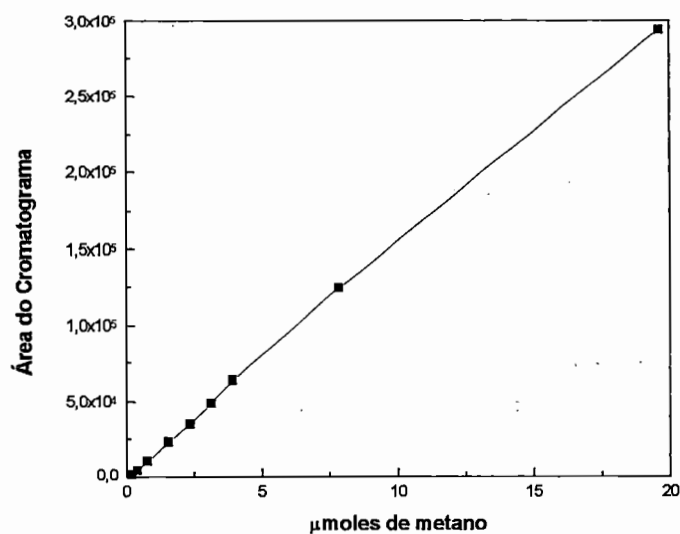
- Pressão local (São Carlos) = 0,9 atm; Temperatura ambiente = 32°C
- Grau de metano contido no cilindro de gás metano- White Martins - utilizado para a realização da curva de calibração = 99,99%

Os valores de metano da Tabela A.2 estão apresentados em: - volume de metano em mL injetados e volume de metano em mL corrigidos para as CNTP; - μmoles de metano calculados. As áreas de metano obtidas por cromatografia gasosa são médias de 2 leituras; os desvios-padrão estão apresentados entre parênteses.

TABELA A.2 - Valores de metano calculados para a realização da curva de calibração.

Volume Injetado (mL) 32°C	Volume CH ₄ (mL) CNTP	μmoles CH ₄	Área Média Obtida no Cromatograma
0,005	0,004	0,20	1550,50 (± 9,50)
0,010	0,009	0,39	4951,00 (± 36,00)
0,020	0,018	0,79	10970,00 (± 115,00)
0,040	0,035	1,57	23068,00 (± 74,00)
0,060	0,053	2,36	34760,00 (± 74,00)
0,080	0,070	3,14	49203,50 (± 754,50)
0,100	0,088	3,93	63968,50 (± 214,50)
0,200	0,176	7,85	124443,00 (± 297,00)
0,500	0,440	19,63	293854,50 (± 2053,00)

A Figura A.2 apresenta a curva de calibração do gás metano.

**FIGURA A.2 - Curva de calibração para o gás metano ($r = 0,9996$).**

A.1.3 - Curva de calibração para o gás dióxido de carbono

Considerações:

- Pressão local (São Carlos) = 0,9 atm; Temperatura ambiente = 32°C

- Grau de dióxido de carbono contido no cilindro de gás dióxido de carbono - White Martins - utilizado para a realização da curva de calibração = 99,99%.

A Tabela A.3 apresenta os valores de: - volume de dióxido de carbono em mL injetados e volume de dióxido de carbono em mL corrigidos para as CNTP; - μ moles de dióxido de carbono calculados. As áreas de dióxido de carbono obtidas por cromatografia gasosa são médias de 2 leituras; os desvios-padrão estão apresentados entre parênteses.

TABELA A.3 - Valores de nitrogênio calculados para a realização da curva de calibração.

Volume Injetado (mL) 32°C	Volume CO ₂ (mL) CNTP	μ moles CO ₂	Área Média Obtida no Cromatograma
0,005	0,004	0,20	2213,50 (\pm 68,50)
0,010	0,009	0,39	4968,50 (\pm 339,50)
0,020	0,018	0,79	11439,00 (\pm 211,00)
0,040	0,035	1,57	27064,00 (\pm 234,00)
0,060	0,053	2,36	41288,50 (\pm 216,50)
0,080	0,070	3,14	55799,50 (\pm 32,50)
0,100	0,088	3,93	71762,50 (\pm 415,50)
0,200	0,176	7,85	144718,00 (\pm 475,00)
0,500	0,440	19,63	383912,00 (\pm 910,00)

A Figura A.3 mostra a curva de calibração para o gás dióxido de carbono.

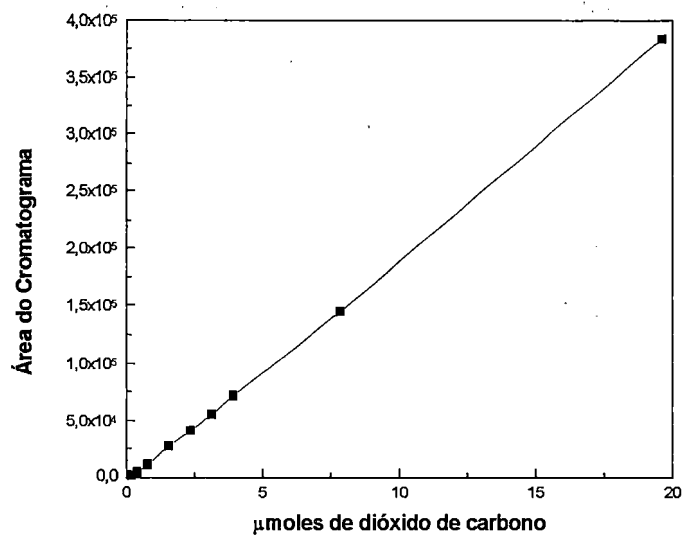


FIGURA A.3 - Curva de calibração para o gás dióxido de carbono.

ANEXO B

B.1. Valores das análises cromatográficas realizadas durante a fase de enriquecimento das culturas

As Tabelas incluídas neste anexo apresentam os valores médios das áreas de hélio, nitrogênio, metano e dióxido de carbono, com suas respectivas porcentagens, e também o número de moles dos gases nitrogênio, metano e dióxido de carbono, além da relação metano/dióxido de carbono.

B.1.1. Primeiro grupo de experimentos

As Tabelas de B.1 a B.4 são referentes aos 12 primeiros dias de enriquecimento.

TABELA B.1 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 1.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00	44269,00	102585,00	4854,50		29,18	67,62	3,21		5,68	0,28	0,23	
13/06/96 09:40	14,00	0,58	36720,50	69428,50	27591,50		27,46	51,91	20,63		3,85	1,79	0,23	
14/06/96 17:00	45,33	1,89	34104,00	58237,00	107771,50	61157,00	13,05	22,28	41,23	23,40	3,23	7,10	3,34	1,76
15/06/96 18:50	71,17	2,97	29584,00	52493,00	130626,00	74282,50	10,31	18,29	45,52	25,88	2,91	8,62	4,01	1,76
17/06/96 19:00	119,33	4,97	21569,00	38673,50	125706,50	63142,50	8,66	15,54	50,46	25,34	2,15	8,29	3,44	1,99
19/06/96 14:25	162,75	6,78	20939,50	38828,50	154116,00	77155,50	7,20	13,33	52,95	26,52	2,16	10,18	4,15	2,00
21/06/96 14:25	210,75	8,78	18551,50	33530,50	162265,00	82214,00	6,25	11,35	54,70	27,70	1,86	10,72	4,41	1,97
24/06/96 18:30	286,83	11,95	21772,50	41481,00	220746,00	127595,50	5,29	10,1	53,63	31,00	2,30	14,60	6,72	1,73

TABELA B.2 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 2.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00	16132,00	223491,00	4854,50		6,59	91,27	2,14		12,37	0,28	0,23	
13/06/96 09:40	14,00	0,58	16395,00	194245,00	27591,50		7,08	83,83	9,10		10,75	1,79	0,23	
14/06/96 17:00	45,33	1,89	14132,50	164513,50	107771,50	84043,50	4,16	48,37	25,50	21,98	9,11	7,10	4,50	1,28
15/06/96 18:50	71,17	2,97	13830,50	156183,00	130626,00	82881,00	3,75	42,30	31,51	22,44	8,65	8,62	4,44	1,58
17/06/96 19:00	119,33	4,97	10213,00	121936,50	125706,50	73920,50	3,18	38,02	35,75	23,04	6,75	8,29	3,99	1,70
19/06/96 14:25	162,75	6,78	9726,00	112595,00	154116,00	90069,50	2,73	31,63	40,32	25,31	6,24	10,18	4,81	1,71
21/06/96 14:25	210,75	8,78	8855,00	102281,00	161612,00	99903,50	2,38	27,45	43,37	26,81	5,67	10,68	5,31	1,62
24/06/96 18:30	286,83	11,95	7975,00	88743,00	170170,50	102403,00	2,16	24,00	46,08	27,73	4,92	11,24	5,44	1,66

TABELA B.3 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 3.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00	21448,00	179630,00	3362,50		10,49	87,86	1,64		9,94	0,18	0,23	
13/06/96 09:40	14,00	0,58	21875,00	159061,00	14838,00		11,17	81,25	7,58		8,81	0,94	0,23	
14/06/96 17:00	45,33	1,89	21207,50	150999,50	61474,00	62131,50	7,17	51,05	20,79	20,99	8,36	4,03	3,39	0,99
15/06/96 18:50	71,17	2,97	21430,50	150501,50	117969,00	76198,00	5,85	41,11	32,22	20,81	8,33	7,78	4,10	1,55
17/06/96 19:00	119,33	4,97	16644,00	120762,50	169758,00	75841,00	4,35	31,53	44,32	19,80	6,69	11,22	4,09	2,24
19/06/96 14:25	162,75	6,78	16220,50	121611,00	224123,00	91861,00	3,57	26,80	49,39	20,24	6,73	14,82	4,90	2,44
21/06/96 14:25	210,75	8,78	15341,00	109143,50	245313,50	106035,50	3,22	22,94	51,56	22,28	6,05	16,23	5,62	2,31
24/06/96 18:30	286,83	11,95	11662,50	78936,50	211277,00	93043,50	2,95	19,99	53,50	23,56	4,37	13,97	4,96	2,27

TABELA B.4 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 4.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00	40895,50	81911,50	2366,50		32,67	65,44	1,89		4,54	0,12	0,23	
13/06/96 09:40	14,00	0,58	42089,00	65394,00	15716,00		34,17	53,08	12,76		3,63	1,00	0,23	
14/06/96 17:00	45,33	1,89	39328,50	67424,00	83876,00	51054,00	16,27	27,90	34,70	21,12	3,74	5,52	2,83	1,64
15/06/96 18:50	71,17	2,97	41095,50	64613,00	164308,50	69284,50	12,11	19,01	48,42	20,40	3,58	10,85	3,75	2,37
17/06/96 19:00	119,33	4,97	20123,50	34459,50	139872,50	51906,50	8,17	13,99	56,77	21,07	1,91	9,23	2,87	2,69
19/06/96 14:25	162,75	6,78	19909,50	33539,50	179018,00	66713,00	6,65	11,20	59,82	22,29	1,86	11,83	3,62	2,68
21/06/96 14:25	210,75	8,78	22610,50	37440,40	238579,50	90158,00	5,93	9,61	61,24	23,14	2,08	15,78	4,81	2,65
24/06/96 18:30	286,83	11,95	20293,50	35695,00	245449,50	92037,50	5,16	9,08	62,38	23,39	1,98	16,23	4,91	2,67

As Tabelas de B.5 a B.8 mostram os resultados obtidos após troca atmosférica para diminuir a quantidade de nitrogênio gasoso presente no interior dos frascos feita após 12 dias do início do enriquecimento.

TABELA B.5 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 1.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	46397,00	4515,00	0,00	4699,00	83,43	8,12	0,00	8,44	0,26	0,00	0,47	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	48681,50	8370,50	12242,00	14264,00	58,31	9,93	14,67	17,09	0,47	0,77	0,96	0,86
27/06/96 16:10	46,00	1,92	53990,00	9970,00	27230,50	21106,00	48,16	8,72	24,29	18,83	0,56	1,76	1,30	1,29
28/06/96 15:40	69,50	2,90	54580,00	4647,00	36845,50	24442,00	45,37	3,73	30,60	20,30	0,27	2,40	1,47	1,51
29/06/96 17:05	94,92	3,95	62282,50	16645,50	51948,50	31434,50	38,44	9,94	32,07	19,45	0,93	3,40	1,83	1,65
01/07/96 17:50	143,37	5,98	49864,00	2440,50	54698,00	30923,50	36,16	1,75	39,67	22,43	0,14	3,59	1,80	1,77
03/07/96 17:15	190,78	7,96	46463,00	3192,50	73897,50	41787,50	22,03	1,47	50,54	25,97	0,19	4,86	2,35	1,77
05/07/96 16:05	237,62	9,91	46463,00	4189,50	80850,50	43298,00	26,59	2,37	46,27	24,78	0,24	5,32	2,43	1,87
08/07/96 17:10	310,70	12,96	45761,00	3090,00	104991,50	53923,50	22,03	1,47	50,54	25,97	0,18	6,92	2,97	1,95
10/07/96 14:50	356,37	14,86	41626,00	8754,00	107952,00	53618,00	19,64	4,13	50,93	25,30	0,49	7,12	2,96	2,01
12/07/96 15:00	404,53	16,87	42987,00	1112,50	116317,00	54630,00	19,99	0,52	54,09	25,40	0,07	7,67	3,01	2,13
17/07/96 09:15	518,78	21,63	35909,50	1024,50	112656,50	54674,00	17,58	0,50	55,15	26,77	0,07	7,43	3,01	2,06

TABELA B.6 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 2.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	45712,00	0,00	0,00	4683,00	90,72	0,00	0,00	9,27	0,01	0,00	0,47	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	50580,50	1818,00	12932,00	13495,50	64,21	2,26	16,40	17,13	0,11	0,82	0,92	0,96
27/06/96 16:10	46,00	1,92	53556,00	1421,50	26100,00	18452,00	53,81	1,43	26,22	18,54	0,09	1,69	1,17	1,41
28/06/96 15:40	69,50	2,90	53320,50	7562,50	36273,50	22264,50	44,69	6,26	30,41	18,66	0,43	2,36	1,36	1,63
29/06/96 17:05	94,92	3,95	59686,50	7692,00	50433,50	31916,50	40,05	4,86	33,80	21,29	0,43	3,30	1,85	1,58
01/07/96 17:50	143,37	5,98	50188,00	0,00	53900,00	28661,50	37,81	0,00	40,61	21,59	0,01	3,53	1,69	1,88
03/07/96 17:15	190,78	7,96	47474,00	318,50	65397,00	33500,50	32,37	0,22	44,58	22,84	0,03	4,29	1,93	1,95
05/07/96 16:05	237,62	9,91	49269,50	4949,00	80761,50	40678,00	27,98	2,82	45,86	23,10	0,28	5,31	2,30	1,99
08/07/96 17:10	310,70	12,96	47094,50	6706,50	101977,00	49742,00	22,92	3,26	49,62	24,21	0,38	6,72	2,76	2,05
10/07/96 14:50	356,37	14,86	44610,00	5348,00	104074,00	49699,00	21,91	2,59	51,11	24,40	0,30	6,86	2,76	2,09
12/07/96 15:00	404,53	16,87	44355,00	3816,00	108715,00	50077,00	21,44	1,83	52,53	24,20	0,22	7,17	2,78	2,17
17/07/96 09:15	518,78	21,63	41129,00	240,50	113914,00	52251,50	19,82	0,12	54,89	25,18	0,02	7,51	2,89	2,18

TABELA B.7 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 3.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	47230,50	717,50	0,00	4562,50	90,00	1,34	0,00	8,66	0,05	0,00	0,46	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	52580,00	3556,00	8671,00	14271,00	66,50	4,48	10,97	18,05	0,21	0,53	0,96	0,61
27/06/96 16:10	46,00	1,92	54506,00	4021,50	14837,00	17892,00	59,75	4,38	16,26	19,01	0,23	0,94	1,14	0,83
28/06/96 15:40	69,50	2,90	55082,50	3390,50	18350,00	20071,50	56,90	3,42	18,96	20,72	0,20	1,17	1,25	0,91
29/06/96 17:05	94,92	3,95	60121,50	6123,00	23591,50	24404,50	52,74	5,18	20,68	21,40	0,35	1,52	1,47	0,97
01/07/96 17:50	143,37	5,98	49695,00	639,50	23335,50	24630,00	50,26	0,65	23,74	25,05	0,04	1,51	1,48	0,95
03/07/96 17:15	190,78	7,96	46529,50	3896,50	25907,50	27289,00	44,94	3,68	25,03	26,35	0,22	1,68	1,62	0,95
05/07/96 16:05	237,62	9,91	48611,00	1374,50	29964,50	33106,50	42,81	1,21	26,39	29,60	0,08	1,95	1,91	0,91
08/07/96 17:10	310,70	12,96	47125,50	1527,50	34726,50	38800,50	38,57	1,25	28,42	31,76	0,09	2,26	2,20	0,90
10/07/96 14:50	356,37	14,86	42772,00	7363,50	34483,00	38815,50	34,72	5,85	27,98	31,46	0,42	2,24	2,20	0,89
12/07/96 15:00	404,53	16,87	43611,00	1802,00	36282,50	39074,00	36,11	1,49	30,04	32,35	0,11	2,36	2,22	0,93
17/07/96 09:15	518,78	21,63	39862,00	3568,00	37092,50	40687,50	32,90	2,91	30,61	33,58	0,21	2,42	2,30	0,91

TABELA B.8 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 4.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	46303,50	474,50	0,00	4878,50	89,64	0,91	0,00	9,45	0,04	0,00	0,48	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	51098,00	11462,00	7844,50	12926,50	61,34	13,75	9,41	15,52	0,64	0,48	0,89	0,61
27/06/96 16:10	46,00	1,92	50891,50	14910,50	12647,50	16574,00	53,72	15,48	13,33	17,48	0,83	0,80	1,07	0,76
28/06/96 15:40	69,50	2,90	52017,00	18381,50	15775,50	19330,50	49,30	17,43	14,96	18,32	1,03	1,00	1,21	0,82
29/06/96 17:05	94,92	3,95	55641,50	16306,50	19476,00	22448,50	48,86	14,32	17,11	19,71	0,91	1,25	1,37	0,87
01/07/96 17:50	143,37	5,98	47030,00	14292,50	20045,00	23311,00	44,96	13,62	19,15	22,28	0,80	1,29	1,42	0,86
03/07/96 17:15	190,78	7,96	42310,00	14904,50	21578,50	24595,50	40,93	14,42	20,87	23,79	0,83	1,39	1,48	0,88
05/07/96 16:05	237,62	9,91	45662,00	18305,00	25885,00	32671,50	37,27	14,94	21,13	26,67	1,02	1,67	1,89	0,79
08/07/96 17:10	310,70	12,96	44206,50	21397,50	30202,00	36759,00	33,37	16,10	22,79	27,74	1,19	1,96	2,10	0,82
10/07/96 14:50	356,37	14,86	40460,00	20853,50	29866,50	35921,50	31,86	16,34	23,52	28,29	1,16	1,94	2,06	0,83
12/07/96 15:00	404,53	16,87	39316,50	18697,00	29782,50	33673,50	32,37	15,40	24,52	27,72	1,04	1,93	1,94	0,88
17/07/96 09:15	518,78	21,63	36037,50	18891,00	30931,50	36512,50	29,46	15,42	25,30	29,83	1,05	2,01	2,09	0,85

Transcorridos 41 dias de enriquecimento, foi realizada a alimentação das culturas. As Tabelas B.9 a B.12 mostram os resultados obtidos após este procedimento.

TABELA B.9 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 1.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	52026,00	16302,00	0,00	5023,00	70,93	22,22	0,00	6,85	0,91	0,00	0,49	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	60068,50	15136,50	2739,00	14973,50	64,67	16,26	2,95	16,12	0,85	0,14	0,99	0,18
26/07/96 14:10	63,42	2,64	54962,50	13568,50	3560,50	15973,50	62,00	15,24	4,02	18,03	0,76	0,19	1,04	0,22
28/07/96 13:50	111,08	4,63	45877,00	12873,00	4417,50	16776,00	57,43	15,98	5,53	21,06	0,72	0,25	1,08	0,26
30/07/96 14:00	159,25	6,64	56115,50	5126,00	6953,00	19415,00	64,16	5,76	7,95	22,14	0,29	0,42	1,22	0,36
01/08/96 14:00	207,25	8,64	47925,00	7518,00	6948,00	17210,00	59,65	9,36	8,65	21,42	0,42	0,42	1,10	0,40
03/08/96 14:00	255,25	10,64	50972,00	13859,50	9049,50	20681,50	53,96	14,58	9,57	21,89	0,78	0,56	1,28	0,44
06/08/96 11:20	324,58	13,52	49295,00	10348,00	9839,50	19938,50	55,13	11,57	11,01	22,30	0,58	0,61	1,24	0,49
08/08/96 11:40	372,92	15,54	48883,00	11092,50	10574,00	21044,00	53,35	12,12	11,55	22,99	0,62	0,66	1,30	0,50
11/08/96 18:20	451,58	18,82	53579,50	12118,00	13491,50	31718,50	47,59	10,46	11,93	27,29	0,68	0,85	1,84	0,44
15/08/96 08:45	538,00	22,42	53827,00	6227,00	14083,50	25573,00	53,99	6,25	14,13	25,65	0,35	0,89	1,53	0,55
18/08/96 16:00	617,25	25,72	48017,00	6718,50	13901,50	24330,50	51,65	7,23	14,96	26,17	0,38	0,88	1,47	0,57
25/08/96 09:00	778,25	32,43	50107,50	15447,00	16621,00	27754,00	45,60	14,04	15,13	25,25	0,86	1,06	1,64	0,60

TABELA B.10 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 2.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	51806,00	338,00	0,00	4985,00	90,68	0,59	0,00	8,73	0,03	0,00	0,48	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	60937,00	9753,50	2818,00	16259,00	67,95	10,78	3,15	10,13	0,55	0,15	1,06	0,31
26/07/96 14:10	63,42	2,64	57115,50	4167,50	3549,00	16274,00	70,48	5,08	4,38	20,07	0,24	0,19	1,06	0,22
28/07/96 13:50	111,08	4,63	48516,00	1230,00	4532,00	15313,00	69,69	1,79	6,52	22,01	0,08	0,26	1,01	0,30
30/07/96 14:00	159,25	6,64	50553,50	8196,50	6317,50	18109,50	60,79	9,84	7,60	21,78	0,46	0,38	1,15	0,35
01/08/96 14:00	207,25	8,64	45492,00	6491,00	6493,00	16818,00	59,74	8,52	8,53	22,09	0,37	0,39	1,09	0,39
03/08/96 14:00	255,25	10,64	48425,00	7915,00	8324,50	20500,00	56,86	9,30	9,77	24,07	0,45	0,51	1,27	0,41
06/08/96 11:20	324,58	13,52	48417,00	7849,50	9426,00	22498,00	54,74	8,88	10,66	24,60	0,44	0,58	1,37	0,43
08/08/96 11:40	372,92	15,54	44299,00	10650,00	9770,50	21436,50	51,95	12,27	11,21	24,58	0,60	0,61	1,32	0,46
11/08/96 18:20	451,58	18,82	49753,50	8556,00	11955,50	26563,00	51,24	8,73	12,31	27,39	0,48	0,75	1,58	0,45
15/08/96 08:45	538,00	22,42	49960,00	3962,00	13135,00	25543,50	53,95	4,28	14,19	27,58	0,23	0,83	1,53	0,51
18/08/96 16:00	617,25	25,72	41617,50	11685,00	12266,50	25658,00	45,63	12,86	13,45	28,08	0,66	0,77	1,53	0,48
25/08/96 09:00	778,25	32,43	45522,00	14949,00	15194,00	27533,00	44,12	14,48	14,73	26,68	0,84	0,97	1,63	0,55

TABELA B.11 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 3.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	53203,00	1074,00	0,00	3839,00	91,55	1,85	0,00	6,61	0,07	0,00	0,43	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	60481,00	13933,50	1048,00	12652,00	68,66	15,79	1,19	14,37	0,78	0,03	0,87	0,08
26/07/96 14:10	63,42	2,64	58415,50	1587,50	1606,50	12840,00	78,48	2,12	2,16	17,24	0,10	0,06	0,88	0,13
28/07/96 13:50	111,08	4,63	51296,50	6169,50	2312,50	12121,50	71,57	8,08	3,43	16,91	0,35	0,11	0,85	0,20
30/07/96 14:00	159,25	6,64	51222,50	11310,50	3381,50	12857,00	65,34	13,98	4,31	16,37	0,63	0,18	0,88	0,26
01/08/96 14:00	207,25	8,64	49721,00	4518,00	3956,00	12707,00	70,13	6,37	5,58	17,92	0,26	0,22	0,88	0,31
03/08/96 14:00	255,25	10,64	46030,00	20303,00	4698,50	13868,50	54,42	23,66	5,56	16,37	1,13	0,27	0,94	0,34
06/08/96 11:20	324,58	13,52	48540,50	10762,50	5934,00	15915,00	59,83	13,25	7,32	19,61	0,60	0,35	1,04	0,37
08/08/96 11:40	372,92	15,54	47172,00	9075,00	6449,50	15546,50	60,30	8,41	8,24	19,87	0,51	0,39	1,02	0,41
11/08/96 18:20	451,58	18,82	51413,00	13700,50	8180,50	17679,00	56,54	15,03	9,00	19,45	0,77	0,50	1,13	0,46
15/08/96 08:45	538,00	22,42	51683,50	12307,00	9522,00	19497,00	55,58	13,23	10,24	20,96	0,69	0,59	1,22	0,49
18/08/96 16:00	617,25	25,72	43103,50	15245,50	8831,50	15723,50	51,97	18,38	10,65	19,01	0,85	0,54	1,03	0,56
25/08/96 09:00	778,25	32,43	52233,00	8794,50	12520,50	22237,00	54,54	9,18	13,07	23,22	0,50	0,79	1,36	0,56

TABELA B.12 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 4.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	53553,00	5854,00	0,00	3314,00	85,38	9,33	0,00	5,28	0,33	0,00	0,40	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	62245,00	4418,00	792,00	11675,50	78,87	5,36	0,53	14,78	0,25	0,02	0,82	0,04
26/07/96 14:10	63,42	2,64	57481,50	5064,50	1383,00	11474,50	76,35	6,58	1,84	15,25	0,29	0,05	0,81	0,12
28/07/96 13:50	111,08	4,63	51756,50	3107,00	2076,00	11342,50	75,82	4,53	3,04	16,62	0,18	0,10	0,81	0,18
30/07/96 14:00	159,25	6,64	51151,00	8950,00	2882,00	11625,50	69,18	11,26	3,89	15,68	0,50	0,15	0,82	0,25
01/08/96 14:00	207,25	8,64	48309,00	7279,00	3429,00	12519,00	67,53	10,18	4,79	17,50	0,41	0,19	0,87	0,27
03/08/96 14:00	255,25	10,64	48048,00	12227,00	3999,50	12860,50	62,33	15,80	5,19	16,68	0,69	0,22	0,88	0,31
06/08/96 11:20	324,58	13,52	49940,00	13268,00	5218,50	16320,00	58,94	15,66	6,16	19,25	0,74	0,30	1,06	0,32
08/08/96 11:40	372,92	15,54	46060,50	11424,00	3549,50	14528,50	59,39	14,73	7,16	18,73	0,64	0,19	0,97	0,38
11/08/96 18:20	451,58	18,82	50939,00	15312,00	6969,50	16750,50	56,64	17,00	7,75	18,62	0,86	0,42	1,08	0,42
15/08/96 08:45	538,00	22,42	52538,50	9487,00	7998,00	17772,00	59,85	10,80	9,11	20,24	0,53	0,49	1,13	0,45
18/08/96 16:00	617,25	25,72	45479,50	8269,50	7606,00	15936,50	58,84	10,70	9,84	20,63	0,47	0,46	1,04	0,48
25/08/96 09:00	778,25	32,43	49705,00	14655,50	9673,00	19930,00	52,90	15,59	10,30	21,22	0,82	0,60	1,24	0,49

Os frascos 1 a 4 foram mantidos sob refrigeração durante 38 dias. Transcorrido este período, as culturas foram alimentadas e acompanhadas sob análise cromatográfica. Os resultados podem ser observados nas Tabelas seguintes (B.13 a B.16).

TABELA B.13 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 1.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
02/10/96 13:30	0,00	0,00	48606,00	5605,50	0,00	4422,00	82,92	9,55	0,00	7,54	0,32	0,00	0,45	0,00
03/10/96 16:30	27,00	1,13	50397,00	8185,50	0,00	11322,00	72,10	11,71	0,00	16,20	0,46	0,00	0,81	0,00
04/10/96 18:00	52,50	2,19	49369,00	7292,50	0,00	11260,50	72,69	10,74	0,00	16,58	0,41	0,00	0,80	0,00
06/10/96 17:40	100,17	4,17	51072,50	6603,00	595,00	12991,00	71,67	9,27	0,84	18,23	0,37	0,01	0,89	0,05
08/10/96 17:10	147,67	6,15	54197,50	8630,50	1058,00	14014,00	69,57	11,09	1,36	17,99	0,49	0,03	0,94	0,08
12/10/96 16:55	243,42	10,14	51677,50	7529,00	1645,00	17364,00	65,84	9,63	2,09	21,50	0,43	0,07	1,11	0,09
17/10/96 09:30	356,00	14,83	51749,00	14174,00	2071,50	15245,50	62,17	17,03	2,49	18,32	0,79	0,10	1,01	0,14
21/10/96 14:00	456,50	19,02	27951,50	5803,50	1603,00	9527,50	59,06	12,26	3,39	20,13	0,33	0,06	0,71	0,17
28/10/96 10:15	620,75	25,86	51846,50	12410,00	3813,50	16832,50	61,09	14,60	4,49	19,83	0,70	0,21	1,09	0,23

TABELA B.14 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 2.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
02/10/96 13:30	0,00	0,00	48606,00	5605,50	0,00	4422,00	82,92	9,55	0,00	7,54	0,32	0,00	0,45	0,00
03/10/96 16:30	27,00	1,13	49054,00	7817,00	0,00	11340,50	71,94	11,43	0,00	16,63	0,44	0,00	0,81	0,00
04/10/96 18:00	52,50	2,19	48627,00	6727,50	0,00	11058,50	73,23	10,13	0,00	16,65	0,38	0,00	0,79	0,00
06/10/96 17:40	100,17	4,17	50377,50	7911,00	656,50	13142,00	69,89	10,98	0,91	18,24	0,45	0,01	0,90	0,05
08/10/96 17:10	147,67	6,15	52533,50	12438,50	958,50	13740,00	65,96	15,59	1,20	17,25	0,70	0,02	0,93	0,07
12/10/96 16:55	243,42	10,14	50846,50	9910,00	1608,50	14898,50	65,07	12,65	2,06	19,06	0,56	0,06	0,99	0,11
17/10/96 09:30	356,00	14,83	50498,50	12062,50	2353,00	15292,50	62,96	15,05	2,94	19,07	0,68	0,11	1,01	0,15
21/10/96 14:00	456,50	19,02	28597,00	10126,00	1934,00	10237,00	53,86	19,11	3,64	19,28	0,57	0,09	0,75	0,19
28/10/96 10:15	620,75	25,86	53244,50	10951,50	4339,00	17768,50	61,73	12,65	5,03	24,60	0,61	0,25	1,13	0,24

TABELA B.15 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 3.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
02/10/96 13:30	0,00	0,00	45733,00	7097,00	0,00	3684,00	80,95	12,55	0,00	6,51	0,40	0,00	0,42	0,00
03/10/96 16:30	27,00	1,13	49222,00	7372,50	0,00	9831,50	74,10	11,11	0,00	14,80	0,42	0,00	0,73	0,00
04/10/96 18:00	52,50	2,19	48360,50	6695,50	0,00	9818,50	74,55	10,33	0,00	15,14	0,38	0,00	0,73	0,00
06/10/96 17:40	100,17	4,17	49853,00	6005,50	692,50	11008,5	73,79	8,89	1,03	16,30	0,34	0,01	0,79	0,06
08/10/96 17:10	147,67	6,15	53256,00	10119,50	994,00	11770,00	69,96	13,27	1,31	15,46	0,57	0,02	0,83	0,08
12/10/96 16:55	243,42	10,14	51394,00	5160,00	1481,50	11730,00	73,67	7,41	2,13	16,81	0,29	0,06	0,83	0,13
17/10/96 09:30	356,00	14,83	51502,50	5043,50	1999,50	12346,00	72,65	7,12	2,82	17,42	0,29	0,09	0,86	0,16
21/10/96 14:00	456,50	19,02	28712,00	7554,50	1486,50	8168,00	59,42	15,58	3,08	16,90	0,43	0,06	0,65	0,18
28/10/96 10:15	620,75	25,86	53026,00	10084,00	3628,50	13822,00	65,83	12,52	4,51	17,16	0,57	0,20	0,93	0,26

TABELA B.16 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 4.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
02/10/96 13:30	0,00	0,00	48297,50	7776,00	0,00	4607,50	79,60	12,82	0,00	7,58	0,44	0,00	0,46	0,00
03/10/96 16:30	27,00	1,13	50562,50	8918,50	0,00	8653,50	74,22	13,09	0,00	12,70	0,50	0,00	0,67	0,00
04/10/96 18:00	52,50	2,19	50224,50	7178,00	0,00	9251,50	75,35	10,77	0,00	13,88	0,41	0,00	0,70	0,00
06/10/96 17:40	100,17	4,17	50291,50	7218,50	605,50	9855,50	74,02	10,60	0,89	14,50	0,41	0,01	0,73	0,06
08/10/96 17:10	147,67	6,15	55561,50	10899,00	927,50	11167,50	70,74	13,87	1,18	14,22	0,61	0,02	0,80	0,08
12/10/96 16:55	243,42	10,14	52548,50	8482,00	1451,50	11779,50	69,85	11,25	1,93	15,69	0,48	0,05	0,83	0,12
17/10/96 09:30	356,00	14,83	52272,00	11753,00	2057,50	11343,50	67,52	15,18	2,66	14,65	0,66	0,09	0,81	0,18
21/10/96 14:00	456,50	19,02	29133,50	9218,00	1522,50	7591,00	58,29	18,45	3,05	15,19	0,52	0,06	0,62	0,20
28/10/96 10:15	620,75	25,86	55170,00	7940,50	3417,00	12803,50	69,59	9,96	4,31	16,15	0,45	0,18	0,88	0,27

B.1.2 - Segundo grupo de experimentos

As Tabelas de B.17 a B.19 são referentes aos 12 primeiros dias de enriquecimento.

TABELA B.17 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 7.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00	33929,50	132954,00	1043,00		20,20	79,17	0,62		7,36	0,03	0,23	
13/06/96 09:40	14,00	0,58	34560,00	128441,00	3232,50	26177,50	17,96	66,76	1,68	13,60	7,11	0,17	1,56	0,12
14/06/96 17:00	45,33	1,89	33341,00	116918,50	19590,50	55627,50	14,79	51,86	8,69	24,67	6,48	1,26	3,06	0,35
15/06/96 18:50	71,17	2,97	31516,00	112700,50	26373,00	62627,50	13,52	48,32	11,31	26,86	6,24	1,71	3,41	0,42
17/06/96 19:00	119,33	4,97	28458,00	107418,00	32877,50	65246,00	12,16	45,91	14,05	27,89	5,95	2,14	3,55	0,50
19/06/96 14:25	162,75	6,78	27363,00	100811,00	42020,50	72625,00	11,27	41,51	17,31	29,91	5,58	2,74	3,92	0,58
21/06/96 14:25	210,75	8,78	33306,50	116069,50	65348,00	97167,00	10,68	37,21	20,96	31,16	6,43	4,29	5,17	0,67
24/06/96 18:30	286,83	11,95	31339,50	110956,00	89848,00	100972,50	9,40	33,29	26,96	30,30	6,15	5,92	5,36	0,89

TABELA B.18 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 8.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00	28072,50	161336,00	768,00		14,64	84,11	0,40		8,93	0,01	0,23	
13/06/96 09:40	14,00	0,58	29145,00	161532,00	2191,00	27300,50	13,23	73,37	1,00	12,40	8,94	0,10	1,62	0,08
14/06/96 17:00	45,33	1,89	25920,00	141572,50	15955,50	53836,00	10,92	59,67	6,73	22,69	7,84	1,02	2,97	0,30
15/06/96 18:50	71,17	2,97	24877,50	137369,50	21844,50	60470,50	10,17	56,17	8,93	24,73	7,61	1,41	3,30	0,36
17/06/96 19:00	119,33	4,97	22839,00	123942,00	27147,00	63699,50	9,61	52,16	11,42	26,81	6,86	1,76	3,47	0,43
19/06/96 14:25	162,75	6,78	21223,00	113847,00	33082,50	67571,50	9,00	48,31	14,04	28,67	6,31	2,15	3,67	0,49
21/06/96 14:25	210,75	8,78	27178,50	142615,50	52666,00	95426,00	8,55	44,86	16,57	30,02	7,90	3,45	5,08	0,55
24/06/96 18:30	286,83	11,95	25227,00	134188,00	66277,50	98282,50	7,79	41,42	20,46	30,34	7,43	4,35	5,23	0,67

TABELA B.19 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 10.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00	20368,00	213032,50	728,50		8,70	90,99	0,31		11,79	0,01	0,23	
13/06/96 09:40	14,00	0,58	20278,50	201329,00	1413,00	27488,50	8,10	80,37	0,57	10,98	11,14	0,05	1,63	0,05
14/06/96 17:00	45,33	1,89	19461,00	181859,50	10990,00	53783,50	7,31	36,17	4,13	20,21	10,07	0,69	2,96	0,20
15/06/96 18:50	71,17	2,97	18596,00	181988,00	15540,50	61830,00	6,69	65,47	5,60	22,25	10,07	0,99	3,37	0,25
17/06/96 19:00	119,33	4,97	17526,00	167859,00	19933,00	65949,00	6,47	61,88	7,35	24,31	9,29	1,28	3,58	0,30
19/06/96 14:25	162,75	6,78	14990,00	148542,50	21935,00	65043,50	5,99	59,30	8,76	25,97	8,22	1,41	3,54	0,34
21/06/96 14:25	210,75	8,78	19913,50	193710,00	34676,00	93002,50	5,84	56,76	10,16	27,25	10,72	2,26	4,96	0,37
24/06/96 18:30	286,83	11,95	18490,50	182544,50	39924,50	93534,00	5,53	54,57	11,94	27,96	10,10	2,61	4,99	0,43

As Tabelas de B.20 a B.22 mostram os resultados obtidos após troca atmosférica para diminuir a quantidade de nitrogênio gasoso presente no interior dos frascos feita após 12 dias do início do enriquecimento.

TABELA B.20 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 7.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	47519	0,00	0,00	4048,50	92,16	0,00	0,00	7,84	0,01	0,00	0,44	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	51181	3084,00	7576,50	11815,00	69,51	4,14	10,30	16,05	0,18	0,46	0,83	0,64
27/06/96 16:10	46,00	1,92	52189	8989,00	15674,50	15923,50	56,35	9,55	16,93	17,17	0,51	1,00	1,04	0,98
28/06/96 15:40	69,50	2,90	55135	4901,00	21915,50	19444,00	54,40	4,80	21,63	19,18	0,28	1,41	1,22	1,13
29/06/96 17:05	94,92	3,95	57497	374,00	29818,00	21955,00	52,44	0,35	27,20	20,03	0,03	1,94	1,35	1,36
01/07/96 17:50	143,37	5,98	50319,00	7316,00	38154,50	24899,50	41,70	6,04	31,63	20,64	0,41	2,49	1,50	1,53
03/07/96 17:15	190,78	7,96	46339,00	5052,50	47042,00	26997,00	36,99	3,93	37,55	21,54	0,29	3,08	1,60	1,74
05/07/96 16:05	237,62	9,91	53918,50	543,50	70976,00	37784,50	33,04	0,34	43,49	23,15	0,04	4,66	2,15	1,88
10/07/96 14:50	356,37	14,86	34643,00	577,50	68688,50	37832,00	24,45	0,40	48,47	26,69	0,04	4,51	2,15	1,82
12/07/96 15:00	404,53	16,87	32754,00	859,50	72055,00	36300,50	23,07	0,61	50,76	25,57	0,06	4,74	2,08	1,98
17/07/96 09:15	518,78	21,63	28827,00	2217,00	81071,00	38077,50	19,20	1,47	53,98	25,35	0,13	5,33	2,17	2,13

TABELA B.21 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 8.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	52611,50	2261,50	0,00	3354,00	90,48	3,77	0,00	5,74	0,13	0,00	0,40	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	58719,00	279,50	5139,50	9415,50	79,84	0,38	6,98	12,80	0,02	0,30	0,71	0,55
27/06/96 16:10	46,00	1,92	60236,00	796,50	11093,50	12823,00	70,92	0,94	13,06	15,10	0,05	0,69	0,88	0,87
28/06/96 15:40	69,50	2,90	60904,50	1867,00	15558,50	15317,50	65,04	1,99	16,62	16,38	0,11	0,99	1,01	1,02
29/06/96 17:05	94,92	3,95	58417,00	4510,00	20719,00	15481,50	58,95	4,54	20,90	15,62	0,26	1,33	1,02	1,34
01/07/96 17:50	143,37	5,98	51196,00	11474,50	27381,50	19091,50	46,94	10,47	25,10	17,50	0,64	1,77	1,20	1,43
03/07/96 17:15	190,78	7,96	45559,50	5429,50	35561,50	21255,50	42,28	5,01	33,00	19,72	0,31	2,32	1,31	1,67
05/07/96 16:05	237,62	9,91	39475,00	20905,50	46427,00	27100,50	29,48	15,61	34,67	20,24	1,17	3,04	1,61	1,71
08/07/96 17:10	310,70	12,96	35796,50	18575,00	63316,50	32619,00	23,82	12,36	42,13	21,70	1,04	4,16	1,89	1,94
10/07/96 14:50	356,37	14,86	32779,00	20310,00	73589,00	33526,50	20,46	12,67	45,94	20,93	1,13	4,84	1,93	2,19
12/07/96 15:00	404,53	16,87	32054,00	16849,00	87467,50	34185,50	18,80	9,88	51,29	20,04	0,94	5,76	1,97	2,56
17/07/96 09:15	518,78	21,63	28060,00	14799,00	120800,50	38077,50	13,93	1,47	53,98	25,35	0,83	7,97	2,17	3,17

TABELA B.22 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 10.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	45556,50	5967,50	0,00	5510,50	79,88	10,45	0,00	9,68	0,34	0,00	0,51	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	51524,00	7483,00	2119,50	10633,00	71,89	10,34	2,95	14,83	0,42	0,10	0,77	0,20
27/06/96 16:10	46,00	1,92	52359,50	9376,00	5243,50	13634,00	65,15	11,40	6,51	16,95	0,53	0,31	0,92	0,38
28/06/96 15:40	69,50	2,90	54996,50	10137,50	7839,50	15648,50	62,33	11,06	8,89	17,72	0,57	0,48	1,03	0,50
29/06/96 17:05	94,92	3,95	57567,50	2856,50	11294,50	16922,00	64,96	3,21	12,75	19,10	0,17	0,71	1,09	0,67
01/07/96 17:50	143,37	5,98	51420,50	4869,00	15065,50	18705,50	57,28	5,18	16,75	20,80	0,28	0,96	1,18	0,81
03/07/96 17:15	190,78	7,96	45687,00	3826,50	21281,00	21128,50	49,72	4,15	23,17	22,98	0,22	1,37	1,30	1,01
05/07/96 16:05	237,62	9,91	53918,50	262,00	39626,50	29121,50	43,83	0,21	32,21	23,67	0,02	2,59	1,71	1,36
08/07/96 17:10	310,70	12,96	49741,50	228,50	66308,50	33965,00	33,11	0,15	44,14	22,61	0,02	4,36	1,96	1,95
10/07/96 14:50	356,37	14,86	45579,50	291,00	82942,00	33749,00	28,04	0,18	51,02	20,76	0,02	5,46	1,95	2,46
12/07/96 15:00	404,53	16,87	42663,00	1543,00	103611,00	33082,50	23,59	0,86	57,28	18,29	0,09	6,83	1,91	3,13
17/07/96 09:15	518,78	21,63	38484,00	2283,00	141187,50	37591,50	17,53	1,04	64,31	17,13	0,14	9,32	2,14	3,76

Transcorridos 41 dias de enriquecimento, foi realizada a alimentação das culturas. As Tabelas B.23 a B.25 mostram os resultados obtidos após este procedimento.

TABELA B.23 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 7.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	54834,00	777,00	0,00	3587,00	92,63	1,31	0,00	6,06	0,05	0,00	0,41	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	62785,00	6878,50	0,00	6695,50	82,23	9,01	0,00	8,77	0,39	0,00	0,57	0,00
26/07/96 14:10	63,42	2,64	54988,00	16128,00	0,00	7701,50	69,81	20,42	0,00	9,78	0,90	0,00	0,62	0,00
28/07/96 13:50	111,08	4,63	50921,50	12315,50	1116,00	7538,50	70,98	16,97	1,55	10,50	0,69	0,03	0,61	0,15
30/07/96 14:00	159,25	6,64	50806,00	14422,00	1604,00	7764,00	68,31	19,08	2,16	10,46	0,81	0,06	0,62	0,21
01/08/96 14:00	207,25	8,64	52924,00	10956,00	1876,00	7495,00	72,25	14,96	2,56	10,23	0,61	0,08	0,61	0,25
03/08/96 14:00	255,25	10,64	46705,00	26209,00	2389,00	8776,00	55,61	31,10	2,85	10,45	1,46	0,12	0,68	0,27
06/08/96 11:20	324,58	13,52	49439,50	16309,50	2364,00	9786,50	62,73	20,59	4,27	12,42	0,91	0,11	0,73	0,34
08/08/96 11:40	372,92	15,54	46480,50	21960,50	3582,50	10138,00	56,72	26,55	4,37	12,37	1,22	0,20	0,75	0,35
11/08/96 18:20	451,58	18,82	52178,00	12032,50	4515,00	11070,50	65,39	15,08	5,66	13,88	0,67	0,26	0,79	0,41
15/08/96 08:45	538,00	22,42	52613,50	19250,50	5347,00	12650,50	58,55	21,42	5,95	14,08	1,07	0,31	0,87	0,42
18/08/96 16:00	617,25	25,72	44676,00	15510,50	5048,00	11343,50	58,42	20,17	6,60	14,81	0,87	0,29	0,81	0,45
25/08/96 09:00	778,25	32,43	51129,00	23804,50	6190,00	13736,50	53,93	25,06	6,53	14,49	1,33	0,37	0,93	0,45

TABELA B.24 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 8.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	53822,00	1258,00	0,00	3473,00	91,92	2,15	0,00	5,93	0,08	0,00	0,41	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	61645,50	12145,00	0,00	8248,50	75,14	14,81	0,00	10,06	0,68	0,00	0,65	0,00
26/07/96 14:10	63,42	2,64	55672,50	10515,50	1012,50	9152,50	72,91	13,77	1,33	11,99	0,59	0,03	0,70	0,11
28/07/96 13:50	111,08	4,63	50989,00	14924,50	1833,50	9226,50	66,40	19,18	2,39	12,03	0,83	0,08	0,70	0,20
30/07/96 14:00	159,25	6,64	51970,50	11365,00	2694,00	8684,00	69,56	15,22	3,61	11,63	0,64	0,14	0,67	0,31
01/08/96 14:00	207,25	8,64	54190,00	13046,00	3513,00	10258,00	65,82	15,85	4,27	12,46	0,73	0,19	0,75	0,34
03/08/96 14:00	255,25	10,64	48202,50	21199,50	3891,00	10160,00	57,85	25,29	4,67	12,20	1,18	0,22	0,75	0,38
06/08/96 11:20	324,58	13,52	49393,00	20106,00	5075,50	11751,50	57,25	23,26	5,89	13,62	1,12	0,29	0,83	0,43
08/08/96 11:40	372,92	15,54	46301,50	26617,50	5320,00	12281,00	51,27	29,26	5,89	13,59	1,48	0,31	0,85	0,43
11/08/96 18:20	451,58	18,82	51272,50	16746,50	6475,50	13493,00	58,28	19,04	7,36	15,34	0,94	0,39	0,92	0,48
15/08/96 08:45	538,00	22,42	52693,00	20868,50	7666,50	14804,00	54,91	21,68	7,99	15,44	1,16	0,47	0,98	0,52
18/08/96 16:00	617,25	25,72	45618,50	22070,00	7559,00	14279,50	51,00	24,59	8,45	15,96	1,23	0,46	0,96	0,53
25/08/95 09:00	778,25	32,43	51152,00	19576,50	10038,50	17598,50	52,00	19,91	10,21	17,89	1,09	0,62	1,12	0,57

TABELA B.25 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 10.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	56255,00	455,00	0,00	5723,00	90,10	0,73	0,00	9,17	0,03	0,00	0,52	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	62174,50	17651,00	758,00	11127,50	67,82	19,22	0,82	12,13	0,99	0,02	0,80	0,07
26/07/96 14:10	63,42	2,64	56736,50	12074,00	1373,00	11799,00	69,21	14,73	1,68	14,40	0,68	0,05	0,83	0,12
28/07/96 13:50	111,08	4,63	52993,00	11532,00	2075,00	12084,00	67,35	14,66	2,64	15,36	0,65	0,10	0,84	0,17
30/07/96 14:00	159,25	6,64	51814,50	18170,00	2827,50	11810,50	61,51	21,12	3,36	14,02	1,01	0,15	0,83	0,24
01/08/96 14:00	207,25	8,64	56680,00	14152,00	4111,00	14442,00	63,41	15,83	4,60	16,16	0,79	0,23	0,96	0,28
03/08/96 14:00	255,25	10,64	47525,50	27922,50	4304,50	13432,50	51,02	29,95	4,62	14,42	1,55	0,24	0,91	0,32
06/08/96 11:20	324,58	13,52	49203,50	19248,00	5546,00	14638,50	55,52	21,70	6,26	16,53	1,07	0,33	0,97	0,38
08/08/96 11:40	372,92	15,54	47346,50	16745,50	5906,50	15193,50	55,63	19,59	6,94	17,84	0,93	0,35	1,00	0,39
11/08/96 18:20	451,58	18,82	52639,50	11485,00	7737,50	17623,50	58,83	12,84	8,65	19,70	0,64	0,47	1,13	0,44
15/08/96 08:45	538,00	22,42	53566,50	12540,00	8982,00	18566,50	57,20	13,38	9,60	19,83	0,70	0,55	1,17	0,48
18/08/96 16:00	617,25	25,72	48038,50	10562,50	9218,00	17890,50	56,05	12,33	10,76	20,87	0,59	0,57	1,14	0,52
25/08/95 09:00	778,25	32,43	47596,00	11254,00	11591,00	20415,50	52,37	12,39	12,76	22,49	0,63	0,73	1,27	0,57

Os frascos 7 a 10 foram mantidos sob refrigeração durante 38 dias. Transcorrido este período, as culturas foram alimentadas e acompanhadas sob análise cromatográfica. Os resultados podem ser observados nas Tabelas seguintes (B.26 a B.28).

TABELA B.26 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 7.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
02/10/96 13:30	0,00	0,00	48926,50	6699,50	0,00	3537,00	82,77	11,27	0,00	5,96	0,38	0,00	0,41	0,00
03/10/96 16:30	27,00	1,13	50597,00	16784,00	0,00	5416,00	69,51	23,06	0,00	7,44	0,94	0,00	0,51	0,00
04/10/96 18:00	52,50	2,19	51323,50	14772,00	0,00	5617,00	71,57	20,60	0,00	7,83	0,83	0,00	0,52	0,00
06/10/96 17:40	100,17	4,17	51092,50	16899,00	0,00	6738,50	68,30	22,60	0,00	9,01	0,94	0,00	0,57	0,00
08/10/96 17:10	147,67	6,15	56256,00	16629,00	0,00	7535,50	69,98	20,65	0,00	9,39	0,93	0,00	0,61	0,00
12/10/96 16:55	243,42	10,14	49735,00	15636,00	943,00	7489,00	67,39	21,19	1,28	10,15	0,87	0,02	0,61	0,13
17/10/96 09:30	356,00	14,83	50103,50	15880,00	1205,50	7829,50	66,81	21,15	1,61	10,45	0,89	0,04	0,63	0,15
21/10/96 14:00	456,50	19,02	27786,00	15717,00	843,50	4877,00	54,41	30,76	1,66	9,55	0,88	0,01	0,48	0,17
28/10/96 10:15	620,75	25,86	55831,50	19701,50	2315,00	10215,00	63,40	22,37	2,63	11,60	1,10	0,11	0,75	0,23
29/10/96 10:35	645,08	26,88	59473,00	8527,50	0,00	2964,00	83,80	12,02	0,00	4,18	0,48	0,00	0,38	0,00
30/10/96 09:10	667,67	27,82	59014,50	8638,50	0,00	5413,50	80,77	11,83	0,00	7,41	0,49	0,00	0,51	0,00
31/10/96 13:45	696,25	29,01	57585,00	17045,00	0,00	5276,50	72,04	21,36	0,00	6,61	0,95	0,00	0,50	0,00
04/11/96 13:00	793,40	33,06	49597,50	16508,50	0,00	5018,50	69,75	23,20	0,00	7,05	0,92	0,00	0,48	0,00
08/11/96 16:05	892,48	37,19	46364,50	16827,50	0,00	4190,50	68,81	24,98	0,00	6,22	0,94	0,00	0,44	0,00
12/11/96 09:45	982,15	40,92	54912,00	8357,50	0,00	2430,50	83,61	12,70	0,00	3,70	0,47	0,00	0,35	0,00
16/11/96 17:45	1086,15	45,26	48839,50	16577,00	0,00	3853,00	70,51	23,93	0,00	5,56	0,93	0,00	0,43	0,00
20/11/96 18:45	1183,15	49,30	54930,50	22412,00	0,00	4721,50	66,97	27,28	0,00	6,45	1,25	0,00	0,47	0,00
25/11/96 13:50	1298,23	54,09	50593,00	19464,50	0,00	4946,00	67,48	25,93	0,00	6,6	1,09	0,00	0,48	0,00
02/12/96 16:45	1463,73	60,99	53286,00	17683,50	799,00	4342,00	70,02	23,23	1,05	5,71	0,99	0,01	0,45	0,18
08/12/96 16:20	1607,31	66,97	57076,50	19900,00	1455,00	5010,00	68,41	23,85	1,74	6,01	1,11	0,05	0,48	0,29

TABELA B.27 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 8.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
02/10/96 13:30	0,00	0,00	48646,50	7448,50	0,00	4278,00	80,57	12,34	0,00	7,09	0,42	0,00	0,45	0,00
03/10/96 16:30	27,00	1,13	50647,00	10560,50	0,00	6537,50	74,76	15,59	0,00	9,65	0,59	0,00	0,56	0,00
04/10/96 18:00	52,50	2,19	50979,50	16723,00	0,00	6774,50	68,45	22,46	0,00	9,10	0,93	0,00	0,57	0,00
06/10/96 17:40	100,17	4,17	49189,50	16785,00	0,00	8070,00	66,44	22,67	0,00	10,90	0,94	0,00	0,64	0,00
08/10/96 17:10	147,67	6,15	56451,50	23173,00	729,00	9125,50	63,09	25,90	0,82	10,20	1,29	0,01	0,69	0,08
12/10/96 16:55	243,42	10,14	51850,00	10576,00	1046,50	8772,00	71,77	14,64	1,45	12,14	0,59	0,03	0,68	0,12
17/10/96 09:30	356,00	14,83	52000,00	10777,50	1369,00	9573,50	70,54	14,62	1,86	12,99	0,60	0,05	0,72	0,14
21/10/96 14:00	456,50	19,02	27871,00	14602,50	1072,50	5754,00	54,24	28,42	2,09	11,20	0,82	0,03	0,52	0,19
28/10/96 10:15	620,75	25,86	56045,00	18335,50	3033,50	11812,50	62,82	20,51	3,40	13,24	1,02	0,16	0,83	0,26
29/10/96 10:35	645,08	26,88	58741,50	443,00	0,00	3960,00	93,04	0,71	0,00	6,26	0,03	0,00	0,43	0,00
30/10/96 09:10	667,67	27,82	59710,00	6528,00	0,00	6865,00	81,69	8,92	0,00	9,40	0,37	0,00	0,58	0,00
31/10/96 13:45	696,25	29,01	56607,50	14289,00	0,00	5445,50	74,15	18,72	0,00	7,13	0,80	0,00	0,51	0,00
04/11/96 13:00	793,40	33,06	50151,00	13576,50	0,00	5346,50	72,62	19,64	0,00	7,74	0,76	0,00	0,50	0,00
08/10/96 16:05	892,48	37,19	48075,50	11925,50	807,00	4438,00	73,68	18,29	1,24	6,80	0,67	0,01	0,46	0,18
12/11/96 09:45	982,15	40,92	57776,00	6179,00	0,00	2823,50	86,58	9,20	0,00	4,23	0,35	0,00	0,37	0,00
16/11/96 17:45	1086,15	45,26	52789,50	6568,00	0,00	3971,50	83,08	10,34	0,00	6,25	0,37	0,00	0,43	0,00
20/11/96 18:45	1183,15	49,30	47039,00	14287,00	0,00	4228,00	71,76	21,79	0,00	6,45	0,80	0,00	0,44	0,00
25/11/96 13:50	1298,23	54,09	43376,50	15890,50	0,00	4316,50	68,30	24,92	0,00	6,78	0,89	0,00	0,45	0,00
02/12/96 16:45	1463,73	60,99	46872,00	13756,00	0,00	4277,50	72,22	22,70	0,00	6,59	0,77	0,00	0,45	0,00
08/12/96 16:20	1607,31	66,97	50214,50	16151,50	0,00	5140,00	70,23	22,59	0,00	7,19	0,90	0,00	0,49	0,00

TABELA B.28 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 10.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
02/10/96 13:30	0,00	0,00	48555,50	9028,50	0,00	4961,00	77,65	14,43	0,00	7,93	0,51	0,00	0,48	0,00
03/10/96 16:30	27,00	1,13	50534,00	8788,00	0,00	9012,50	73,95	12,86	0,00	13,19	0,49	0,00	0,69	0,00
04/10/96 18:00	52,50	2,19	49826,00	10855,00	0,00	6734,50	74,03	16,03	0,00	9,94	0,61	0,00	0,57	0,00
06/10/96 17:40	100,17	4,17	51199,50	9637,50	0,00	7973,00	74,40	14,01	0,00	11,59	0,54	0,00	0,64	0,00
08/10/96 17:10	147,67	6,15	58176,50	15414,50	733,50	9010,50	69,81	18,50	0,88	10,82	0,86	0,01	0,69	0,08
12/10/96 16:55	243,42	10,14	51492,50	10412,00	1064,50	8423,50	71,84	14,83	1,49	11,75	0,58	0,03	0,66	0,13
17/10/96 09:30	356,00	14,83	51108,50	11003,50	1515,50	8927,00	70,44	15,17	2,09	12,31	0,62	0,06	0,68	0,17
21/10/96 14:00	456,50	19,02	30794,00	7002,50	1175,50	5875,00	64,57	14,70	2,47	12,32	0,40	0,04	0,53	0,20
28/10/96 10:15	620,75	25,86	56462,50	13973,00	2787,00	11296,00	66,82	16,53	3,30	13,37	0,78	0,14	0,80	0,25
29/10/96 10:35	645,08	26,88	57948,00	8014,00	0,00	3629,00	83,31	11,49	0,00	5,20	0,45	0,00	0,41	0,00
30/10/96 09:10	667,67	27,82	58538,00	8233,50	0,00	6528,50	79,87	11,23	0,00	8,91	0,46	0,00	0,56	0,00
31/10/96 13:45	696,25	29,01	55928,50	20435,00	0,00	6453,50	67,54	24,57	0,00	7,80	1,14	0,00	0,56	0,00
04/11/96 13:00	793,40	33,06	50842,50	13893,00	0,00	5642,50	72,25	19,74	0,00	8,02	0,78	0,00	0,52	0,00
08/11/96 16:05	892,48	37,19	48116,00	16586,00	794,00	5103,50	68,15	23,50	1,13	7,24	0,93	0,01	0,49	0,16
12/11/96 09:45	982,15	40,92	55430,00	8349,00	0,00	2360,50	83,83	12,61	0,00	3,56	0,47	0,00	0,35	0,00
16/11/96 17:45	1086,15	45,26	49367,00	8572,00	0,00	4495,50	79,07	13,73	0,00	7,21	0,48	0,00	0,46	0,00
20/11/96 18:45	1183,15	49,30	54158,50	16067,50	0,00	5068,00	71,94	21,33	0,00	6,74	0,90	0,00	0,49	0,00
25/11/96 13:50	1298,23	54,09	49123,50	15389,50	0,00	5170,50	70,56	22,04	0,00	7,41	0,86	0,00	0,49	0,00
02/12/96 16:45	1463,73	60,99	54019,50	16362,00	715,50	5063,50	70,93	21,49	0,94	6,65	0,91	0,01	0,49	0,14
08/12/96 16:20	1607,31	66,97	56901,00	10551,50	1145,50	5793,00	76,49	14,19	1,54	7,79	0,59	0,03	0,52	0,20

B.1.3- Terceiro grupo de experimentos

As Tabelas de B.29 e B.30 são referentes aos 12 primeiros dias de enriquecimento.

TABELA B.29 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	%He	% N ₂	%CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00		6450,50	1921,50	111247,00		37,72	14,50	47,78	0,37	0,09	5,78	0,02
13/06/96 09:40	14,00	0,58	320,50	19127,50	100489,50	103424,00	0,14	8,50	45,02	46,35	1,07	6,62	5,49	0,97
14/06/96 17:00	45,33	1,89		39837,00	160601,00	119679,00		12,45	50,17	37,38	2,21	10,61	6,32	1,34
15/06/96 18:50	71,17	2,97		38314,50	191953,50	132009,50		10,58	52,98	36,44	2,13	12,69	6,94	1,45
17/06/96 19:00	119,33	4,97		32031,00	192411,50	126961,50		9,11	54,75	36,13	1,78	12,72	6,69	1,52
19/06/96 14:25	162,75	6,78		31830,50	231090,50	149216,50		7,72	56,07	36,21	1,77	15,28	7,82	1,55
21/06/96 14:25	210,75	8,78		34653,00	296103,00	183747,00		6,71	57,35	35,59	1,93	19,59	9,57	1,61
24/06/96 18:30	286,83	11,95	907,50	30345,50	285871,00	170888,50	0,19	6,21	58,58	35,02	1,69	18,92	8,92	1,67

TABELA B.30 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	%CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
12/06/96 19:40	0,00	0,00	1309,00	25232,50	1730,00	102470,00	4,63	39,20	6,18	54,62	1,40	0,07	0,23	0,02
13/06/96 09:40	14,00	0,58		76954,50	49601,50	97500,00		34,23	22,17	43,61	4,26	3,25	5,19	0,51
14/06/96 17:00	45,33	1,89		136627,50	97270,00	11098,00		39,60	28,19	32,20	7,57	6,41	0,79	8,76
15/06/96 18:50	71,17	2,97	264,00	132416,50	128164,00	121997,00	0,07	34,59	33,48	31,87	7,33	8,46	6,43	1,05
17/06/96 19:00	119,33	4,97		115226,50	144576,00	120692,00		30,29	38,00	31,72	6,38	9,55	6,37	1,20
19/06/96 14:25	162,75	6,78	414,50	108070,00	162625,00	130414,00	0,10	26,92	40,51	32,48	5,99	10,74	6,86	1,25
21/06/96 14:25	210,75	8,78	382,00	115871,50	200681,50	154123,00	0,08	24,60	42,60	32,72	6,42	13,27	8,07	1,30
24/06/96 18:30	286,83	11,95	189,50	96240,50	193836,00	144643,50	0,04	22,13	44,57	33,26	5,33	12,81	7,59	1,34

As Tabelas de B.31 e B.32 mostram os resultados obtidos após troca atmosférica feita após 12 dias do início do enriquecimento.

TABELA B.31 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	0,00	4329,50	0,00	103327,00	0,00	4,01	0,00	95,99	0,25	0,00	5,48	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	0,00	2986,00	9863,00	118037,50	0,00	2,25	7,54	90,20	0,17	0,61	6,23	0,08
27/06/96 16:10	46,00	1,92	0,00	5085,00	23668,00	123250,50	0,00	3,34	15,57	81,09	0,29	1,53	6,50	0,19
28/06/96 15:40	69,50	2,90	0,00	14043,00	36769,00	126720,00	0,00	7,80	20,74	71,47	0,79	2,40	6,67	0,29
29/06/96 17:05	94,92	3,95	0,00	29799,00	50339,50	131984,50	0,00	13,83	23,78	62,39	1,66	3,30	6,94	0,38
01/07/96 17:50	143,37	5,98	0,00	29424,00	54167,50	102940,50	0,00	15,78	29,04	55,19	1,64	3,55	5,46	0,53
03/07/96 17:15	190,78	7,96	386,00	42383,50	68156,00	93857,00	0,19	20,69	33,29	45,84	2,35	4,48	5,00	0,73
05/07/96 16:05	237,62	9,91	0,00	140573,00	90264,00	115575,00	0,00	40,58	26,06	33,37	7,78	5,94	6,11	0,78
08/07/96 17:10	310,70	12,96	0,00	136255,00	111945,50	126449,00	0,00	36,37	29,88	33,75	7,54	7,38	6,66	0,89
10/07/96 14:50	356,37	14,86	0,00	124605,00	114044,50	120806,50	0,00	34,67	31,73	33,61	6,90	7,52	6,37	0,94
12/07/96 15:00	404,53	16,87	0,00	121295,50	121378,50	120742,00	0,00	33,38	33,40	33,22	6,72	8,01	6,37	1,01
17/07/96 09:15	518,78	21,63	366,00	106891,50	122731,50	113908,50	0,11	31,08	35,69	33,12	5,92	8,10	6,02	1,08

TABELA B.32 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
25/06/96 18:10	0,00	0,00	0,00	283,00	0,00	100953,50	0,00	0,28	0,00	99,72	0,02	0,00	5,36	0,00
26/06/96 18:10	24,00	1,00	0,00	7442,50	7344,50	113521,00	0,00	5,77	5,72	88,51	0,42	0,45	6,00	0,06
27/06/96 16:10	46,00	1,92	0,00	16703,00	16303,00	111377,00	0,00	11,57	11,30	77,14	0,93	1,04	5,89	0,15
28/06/96 15:40	69,50	2,90	0,00	40113,50	24722,00	107206,00	0,00	23,25	14,30	62,05	2,23	1,60	5,68	0,23
29/06/96 17:05	94,92	3,95	0,00	84844,00	29498,50	94171,50	0,00	39,76	14,36	45,89	4,70	1,91	5,02	0,31
01/07/96 17:50	143,37	5,98	0,00	64389,50	30076,00	60595,00	0,00	41,52	19,40	39,08	3,57	1,95	3,31	0,50
03/07/96 17:15	190,78	7,96	0,00	103430,00	33105,50	52578,00	0,00	54,69	17,51	27,81	5,73	2,15	2,90	0,63
05/07/96 16:05	237,62	9,91	0,00	123758,00	37670,50	63008,50	0,00	55,15	16,79	28,08	6,85	2,46	3,43	0,60
08/07/96 17:10	310,70	12,96	0,00	126412,50	57955,50	70032,00	0,00	49,70	22,78	27,53	7,00	3,80	3,79	0,83
10/07/96 14:50	356,37	14,86	0,00	117445,00	62110,50	68010,00	0,00	47,44	25,09	27,47	6,50	4,08	3,69	0,91
12/07/96 15:00	404,53	16,87	0,00	118085,50	66106,50	66429,50	0,00	47,12	26,38	26,51	6,54	4,34	3,61	1,00
17/07/96 09:15	518,78	21,63	0,00	111323,00	74740,50	68424,50	0,00	43,75	29,37	26,89	6,17	4,91	3,71	1,09

Transcorridos 41 dias de enriquecimento, foi realizada a alimentação das culturas. As Tabelas B.33 e B.34 mostram os resultados obtidos após este procedimento.

TABELA B.33 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	0,00	1939,00	0,00	116314,00	0,00	1,64	0,00	98,36	0,12	0,00	6,14	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	0,00	18715,00	61221,00	92776,50	0,00	10,80	35,46	53,74	1,04	4,08	4,95	0,66
26/07/96 14:10	63,42	2,64	0,00	17790,00	62382,50	92389,00	0,00	10,31	36,15	53,54	0,99	4,09	4,93	0,68
28/07/96 13:50	111,08	4,63	0,00	18136,50	60122,00	85329,50	0,00	11,05	36,66	52,02	1,01	3,95	4,57	0,70
30/07/96 14:00	159,25	6,64	0,00	23804,00	67200,50	85090,50	0,00	13,51	38,16	48,33	1,33	4,41	4,56	0,79
01/08/96 14:00	207,25	8,64	0,00	88552,00	68929,00	88275,00	0,00	36,03	28,05	35,92	4,91	4,53	4,72	0,78
03/08/96 14:00	255,25	10,64	279,00	124809,00	67127,50	100499,50	0,10	42,64	22,93	34,33	6,91	4,41	5,34	0,67
06/08/96 11:20	324,58	13,52	318,00	135304,50	68998,50	105151,50	0,10	43,68	22,27	33,94	7,49	4,53	5,58	0,66
08/08/96 11:40	372,92	15,54	0,00	127819,50	66169,50	104839,50	0,00	42,77	22,15	35,09	7,08	4,35	5,56	0,63

TABELA B.34 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
23/07/96 22:45	0,00	0,00	0,00	2851,00	0,00	117641,00	0,00	2,37	0,00	97,63	0,17	0,00	6,21	0,00
25/07/96 10:45	36,00	1,50	0,00	25610,00	59644,50	90662,50	0,00	14,54	33,91	51,55	1,43	3,90	4,84	0,66
26/07/96 14:10	63,42	2,64	0,00	19292,50	56019,00	82254,00	0,00	12,25	35,55	52,20	1,08	3,67	4,41	0,68
28/07/96 13:50	111,08	4,63	0,00	24118,00	54349,50	77079,50	0,00	15,51	34,94	49,56	1,34	3,56	4,15	0,71
30/07/96 14:00	159,25	6,64	0,00	30550,50	55287,50	75053,00	0,00	18,99	34,37	46,65	1,70	3,62	4,05	0,74
01/08/96 14:00	207,25	8,64	0,00	23716,00	61013,00	79049,00	0,00	14,48	37,25	48,27	1,32	4,00	4,25	0,77
03/08/96 14:00	255,25	10,64	0,00	157222,00	57796,50	95051,50	0,00	50,71	18,64	30,65	8,70	3,79	5,06	0,61
06/08/96 11:20	324,58	13,52	0,00	163978,50	57186,00	95810,00	0,00	51,73	18,04	30,23	9,08	3,75	5,10	0,60
08/08/96 11:40	372,92	15,54	0,00	154730,50	55319,00	96281,50	0,00	50,51	18,06	31,43	8,57	3,63	5,13	0,57

As Tabelas B.35 e B.36 apresentam os resultados dos frascos 5 e 6, após nova alimentação das culturas.



TABELA B.35 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
15/08/96 09:00	0,00	0,00	0,00	5433,00	0,00	119725,50	0,00	4,22	0,00	95,78	0,31	0,00	6,32	0,00
15/08/96 11:00	2,00	0,08	0,00	1104,00	3658,50	119489,50	0,00	0,89	2,95	96,17	0,07	0,20	6,31	0,03
15/08/96 14:00	5,00	0,21	0,00	4983,50	9609,50	110546,50	0,00	3,69	7,70	88,61	0,28	0,60	5,85	0,09
15/08/96 17:20	8,33	0,35	0,00	5622,50	16405,50	109760,50	0,00	4,26	12,40	82,96	0,32	1,05	5,81	0,15
15/08/96 23:20	14,33	0,60	0,00	14833,50	29102,00	98306,50	0,00	10,38	20,48	69,15	0,83	1,89	5,23	0,30
16/08/96 17:20	32,33	1,35	0,00	42875,00	39500,50	67503,50	0,00	28,56	26,32	44,97	2,38	2,58	3,66	0,59
17/08/96 18:50	57,83	2,41	0,00	165965,50	46999,50	94214,50	0,00	53,99	15,29	30,65	9,19	3,07	5,02	0,50
18/08/96 16:05	79,08	3,30	0,00	159896,00	40581,50	80548,50	0,00	56,90	14,44	28,67	8,85	2,65	4,33	0,50
19/08/96 14:50	101,83	4,24	0,00	8991,50	0,00	112592,50	0,00	7,37	0,00	92,63	0,51	0,00	5,96	0,00
19/08/96 18:00	105,00	4,38	0,00	7622,00	5389,50	112870,00	0,00	6,05	4,29	89,67	0,43	0,32	5,97	0,05
19/08/96 21:00	108,00	4,50	0,00	9384,00	12472,00	108288,50	0,00	7,21	9,59	84,71	0,53	0,79	5,74	0,12
19/08/96 23:50	110,83	4,62	0,00	25233,00	16488,00	89032,00	0,00	19,30	12,61	68,09	1,40	1,05	4,76	0,19
20/08/96 08:30	119,50	4,98	0,00	53976,50	25503,50	93250,00	0,00	31,26	14,77	53,99	2,99	1,65	4,97	0,27
20/08/96 17:00	128,00	5,33	0,00	55654,50	36434,50	79585,00	0,00	32,42	21,22	46,36	3,09	2,37	4,28	0,46
22/08/96 14:45	173,75	7,24	0,00	63525,50	38688,00	76663,50	0,00	35,52	21,63	42,86	3,52	2,52	4,13	0,50
24/08/96 10:10	217,17	9,05	0,00	59371,00	35562,00	71677,00	0,00	35,46	21,23	42,80	3,29	2,32	3,87	0,50
24/08/96 11:00	218,00	9,08	0,00	7635,00	0,00	109484,50	0,00	6,52	0,00	93,48	0,43	0,00	5,80	0,00
24/08/96 12:20	219,33	9,14	0,00	838,00	2977,00	118395,00	0,00	0,69	2,44	96,88	0,06	0,16	6,25	0,03
24/08/96 13:30	220,50	9,19	0,00	2093,00	5908,50	110215,50	0,00	1,77	5,00	93,23	0,12	0,35	5,83	0,05
24/08/96 16:50	223,83	9,33	0,00	6862,50	14538,00	97780,00	0,00	5,76	12,20	82,05	0,39	0,92	5,20	0,15
24/08/96 19:40	226,67	9,44	0,00	36846,00	23202,50	96523,00	0,00	23,51	14,82	61,67	2,05	1,50	5,14	0,24
25/08/96 09:00	240,00	10,00	0,00	40248,50	44911,50	83663,50	0,00	23,84	26,60	49,56	2,23	2,94	4,48	0,54
25/08/96 09:50	240,83	10,03	0,00	42534,50	44768,00	79801,50	0,00	25,45	26,79	47,76	2,36	2,93	4,29	0,56
25/08/96 13:50	244,83	10,20	0,00	39910,50	42442,00	75154,00	0,00	25,36	26,94	47,71	2,22	2,77	4,05	0,56
26/08/96 08:25	263,42	10,98	0,00	45630,00	47320,00	84582,50	0,00	25,71	26,65	47,65	2,53	3,10	4,53	0,56
26/08/96 16:35	271,58	11,32	0,00	40103,00	37344,50	67049,50	0,00	27,76	25,84	46,40	2,23	2,43	3,64	0,56
27/08/96 08:10	287,17	11,97	0,00	48932,00	44344,50	81713,00	0,00	27,64	25,08	46,14	2,72	2,90	4,39	0,54
04/09/96 11:50	482,57	20,11	0,00	7307,00	0,00	92974,00	0,00	7,28	0,00	92,73	0,41	0,00	4,96	0,00
04/09/96 14:00	484,73	20,20	0,00	15597,00	3804,50	97861,00	0,00	13,30	3,25	83,45	0,87	0,21	5,21	0,04
04/09/96 16:20	487,07	20,29	0,00	17998,50	6426,00	102157,00	0,00	14,19	5,08	80,73	1,00	0,38	5,42	0,06
04/09/96 18:05	488,82	20,37	0,00	19534,00	9159,50	107817,50	0,00	14,30	6,71	78,99	1,09	0,57	5,71	0,08

... continuação

TABELA B.35 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
05/09/96	09:30	21,01	0,00	24208,00	39657,50	70072,50	0,00	18,08	29,61	52,31	1,35	2,59	3,79	0,57
05/09/96	13:00	21,16	0,00	169374,50	40926,00	69307,50	0,00	60,58	14,64	24,79	9,38	2,67	3,75	0,59
05/09/96	17:55	21,36	0,00	160759,00	43937,00	68410,00	0,00	58,86	16,09	25,05	8,90	2,87	3,71	0,64
06/09/96	13:10	22,16	0,00	145976,00	42518,50	83458,00	0,00	53,49	15,58	30,58	8,08	2,78	4,47	0,51
06/09/96	18:00	22,36	0,00	153149,50	44892,00	88259,50	0,00	53,50	15,69	30,83	8,48	2,94	4,72	0,51
07/09/96	11:45	23,10	0,00	151833,00	44717,00	88995,00	0,00	53,18	15,66	31,16	8,41	2,92	4,76	0,50
09/09/96	08:00	24,95	0,00	152293,00	42935,50	91260,50	0,00	53,16	15,00	31,85	8,43	2,81	4,87	0,47
09/09/96	09:30	25,01	0,00	5474,50	0,00	111851,50	0,00	4,65	0,00	95,35	0,31	0,00	5,92	0,00
09/09/96	13:30	25,18	0,00	10872,00	13091,50	100919,50	0,00	8,71	10,48	80,82	0,61	0,83	5,36	0,13
09/09/96	17:40	25,35	0,00	15451,50	26141,50	86487,00	0,00	12,07	20,41	67,53	0,86	1,69	4,63	0,30
10/09/96	08:00	25,95	0,00	22915,50	47355,50	75533,00	0,00	15,71	32,48	51,81	1,28	3,10	4,07	0,63
10/09/96	15:45	26,27	0,00	38003,00	40805,50	65078,00	0,00	26,41	28,37	45,23	2,11	2,66	3,54	0,63
11/09/96	14:00	27,20	0,00	77315,50	46462,00	75773,50	0,00	38,75	23,29	37,98	4,28	3,04	4,08	0,61
08/10/96	08:40	53,98	0,00	8992,50	0,00	107943,00	0,00	7,69	0,00	92,31	0,51	0,00	5,72	0,00
12/10/96	16:55	58,32	0,00	18959,00	40730,00	70694,00	0,00	14,67	30,88	53,59	1,06	2,66	3,82	0,58
17/10/96	09:30	63,02	0,00	21743,50	44278,50	67362,00	0,00	16,31	33,20	50,50	1,21	2,89	3,66	0,66

TABELA B.36 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
15/08/96 09:00	0,00	0,00	0,00	4367,00	0,00	119445,00	0,00	3,44	0,00	96,57	0,25	0,00	6,30	0,00
15/08/96 11:00	2,00	0,08	0,00	839,50	2267,00	117901,50	0,00	0,69	1,88	97,43	0,06	0,10	6,23	0,02
15/08/96 14:00	5,00	0,21	0,00	2593,00	5899,00	110782,00	0,00	2,15	4,95	92,90	0,15	0,35	5,86	0,05
15/08/96 17:20	8,33	0,35	0,00	8042,00	10403,00	110618,00	0,00	6,21	8,06	85,73	0,45	0,65	5,86	0,09
15/08/96 23:20	14,33	0,60	0,00	16282,00	18596,00	103236,00	0,00	11,79	13,47	74,75	0,91	1,19	5,48	0,18
16/08/96 17:20	32,33	1,35	0,00	14622,50	38660,00	66862,00	0,00	12,17	32,19	55,65	0,82	2,52	3,63	0,58
17/08/96 18:50	57,83	2,41	0,00	16558,00	46250,50	66295,00	0,00	12,83	35,83	51,35	0,92	3,03	3,60	0,70
18/08/96 16:05	79,08	3,30	0,00	16995,00	42041,50	58104,50	0,00	14,51	35,89	49,61	0,95	2,75	3,18	0,72
19/08/96 14:50	101,83	4,24	0,00	109935,00	0,00	109634,50	0,00	9,07	0,00	90,93	6,09	0,00	5,81	0,00
19/08/96 18:00	105,00	4,38	0,00	6231,00	2556,50	114125,50	0,00	5,08	2,08	92,85	0,35	0,13	6,03	0,02
19/08/96 21:00	108,00	4,50	0,00	8377,50	8500,50	112668,00	0,00	6,45	6,57	86,99	0,47	0,52	5,96	0,08
19/08/96 23:50	110,83	4,62	0,00	10228,00	13205,00	100646,00	0,00	8,24	10,65	81,12	0,57	0,83	5,35	0,13
20/08/96 08:30	119,50	4,98	0,00	16808,00	35193,00	79855,50	0,00	12,75	26,69	60,56	0,94	2,29	4,29	0,44
20/08/96 17:00	128,00	5,33	0,00	15970,50	41874,50	79069,00	0,00	11,60	30,43	57,42	0,89	2,73	4,25	0,53
22/08/96 14:45	173,75	7,24	0,00	19732,00	40389,00	73575,00	0,00	14,77	30,16	54,93	1,10	2,64	3,97	0,55
24/08/96 10:10	217,17	9,05	0,00	56280,00	36191,00	68730,00	0,00	34,92	22,45	42,63	3,12	2,36	3,72	0,53
24/08/96 11:00	218,00	9,08	0,00	9588,00	0,00	111524,00	0,00	7,92	0,00	92,09	0,54	0,00	5,90	0,00
24/08/96 12:20	219,33	9,14	0,00	8359,00	1660,50	120803,00	0,00	6,39	1,27	92,34	0,47	0,07	6,37	0,01
24/08/96 13:30	220,50	9,19	0,00	1314,00	4088,00	114153,50	0,00	1,10	3,42	95,48	0,08	0,23	6,03	0,04
24/08/96 16:50	223,83	9,33	0,00	8915,00	12526,50	98714,50	0,00	7,42	10,43	82,16	0,50	0,79	5,25	0,13
24/08/96 19:40	226,67	9,44	0,00	10516,00	21417,00	95214,50	0,00	16,85	16,85	74,90	0,59	1,38	5,07	0,22
25/08/96 09:00	240,00	10,00	0,00	16134,50	46437,50	75362,00	0,00	33,67	33,67	54,64	0,90	3,04	4,06	0,62
25/08/96 09:50	240,83	10,03	0,00	146558,50	47170,00	88437,50	0,00	51,95	16,72	31,35	8,11	3,09	4,73	0,53
25/08/96 13:50	244,83	10,20	0,00	23184,00	42584,50	68142,00	0,00	17,29	31,81	50,90	1,29	2,78	3,69	0,62
26/08/96 08:25	263,42	10,98	0,00	147161,00	48881,50	95215,00	0,00	50,53		32,69	8,15	3,20	5,07	0,51
26/08/96 16:35	271,58	11,32	0,00	120918,50	39151,50	76557,50	0,00	51,10	16,55	32,35	6,70	2,55	4,12	0,51
27/08/96 08:10	287,17	11,97	0,00	136960,50	44898,50	87175,00	0,00	50,91	16,69	32,40	7,58	2,94	4,66	0,52
04/09/96 11:50	482,57	20,11	0,00	7651,00	0,00	99173,50	0,00	7,16	0,00	92,84	0,43	0,00	5,27	0,00
04/09/96 14:00	484,73	20,20	0,00	7267,50	3223,50	95557,00	0,00	6,85	3,04	90,11	0,41	0,17	5,09	0,03
04/09/96 16:20	487,07	20,29	0,00	9887,00	8844,00	97084,00	0,00	8,54	7,64	83,83	0,56	0,54	5,17	0,09
04/09/96 18:05	488,82	20,37	0,00	14077,50	14804,00	100603,50	0,00	10,87	11,44	77,70	0,79	0,94	5,35	0,15

... continuação

TABELA B.36 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
05/09/96 09:30	504,23	21,01	0,00	18898,50	41546,50	64660,00	0,00	15,10	33,21	51,80	1,05	2,71	3,52	0,64
05/09/96 13:00	507,73	21,16	0,00	20933,00	41044,00	62435,00	0,00	16,83	32,99	50,19	1,17	2,68	3,40	0,66
05/09/96 17:55	512,65	21,36	0,00	25078,00	44184,00	67164,50	0,00	18,39	32,39	49,23	1,40	2,89	3,65	0,66
06/09/96 13:10	531,90	22,16	0,00	26774,00	43356,50	65571,00	0,00	19,73	31,95	48,32	1,49	2,83	3,56	0,66
06/09/96 18:00	536,73	22,36	0,00	29350,00	45787,00	68725,50	0,00	20,40	31,83	47,77	1,63	2,99	3,72	0,67
07/09/96 11:45	554,48	23,10	0,00	29128,00	47693,50	70923,50	0,00	19,72	32,28	48,01	1,62	3,12	3,84	0,67
09/09/96 08:00	598,73	24,95	0,00	31226,50	42199,00	61617,50	0,00	23,13	31,25	45,63	1,74	2,76	3,36	0,68
09/09/96 09:30	600,23	25,01	0,00	6376,00	0,00	111857,00	0,00	5,40	0,00	94,61	0,36	0,00	5,92	0,00
09/09/96 13:30	604,23	25,18	0,00	8452,00	11994,00	99601,00	0,00	7,04	10,00	82,97	0,48	0,75	5,29	0,12
09/09/96 17:40	608,40	25,35	0,00	13952,00	25180,00	87832,00	0,00	10,99	19,83	69,18	0,78	1,63	4,70	0,29
10/09/96 08:00	622,73	25,95	0,00	71640,50	43742,00	69200,00	0,00	38,81	23,70	37,49	3,97	2,86	3,75	0,63
10/09/96 15:45	630,48	26,27	0,00	94318,00	42373,00	72641,00	0,00	45,05	20,25	34,70	5,23	2,77	3,92	0,58
11/09/96 14:00	652,73	27,20	0,00	131209,50	47324,50	85012,50	0,00	49,78	17,96	32,26	7,27	3,10	4,55	0,56
08/10/96 08:40	1295,53	53,98	0,00	9038,00	0,00	106922,00	0,00	7,80	0,00	92,21	0,51	0,00	5,67	0,00
12/10/96 16:55	1399,78	58,32	0,00	16009,50	39951,50	66532,50	0,00	13,07	32,62	54,32	0,89	2,61	3,61	0,60
17/10/96 09:30	1512,37	63,02	0,00	22687,00	40025,50	63534,50	0,00	17,98	31,71	50,33	1,26	2,61	3,46	0,63

B.1.4 - Quarto grupo de experimentos

Após as constantes repetições na possível produção de gás nitrogênio, os frascos 5 e 6 foram subdivididos em três frascos (5A, 5B, 5C, 6 A, 6B, 6C). As Tabelas A.37 a A.42 apresentam os resultados obtidos.

TABELA B 37- Valores das análises cromatográficas do Frasco 5A.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
19/10/96 11:00	0,00	0,00	31991,00	9478,50	0,00	15027,50	54,30	16,21	0,00	25,56	0,53	0,00	0,99	0,00
19/10/96 12:40	1,67	0,07	29132,00	10233,00	0,00	15133,00	50,98	17,90	0,00	26,48	0,57	0,00	1,00	0,00
19/10/96 15:40	4,67	0,19	25713,00	10557,50	0,00	13542,00	49,34	20,12	0,00	26,01	0,59	0,00	0,92	0,00
19/10/96 21:10	10,17	0,42	34674,50	7988,50	1266,00	18581,00	53,65	12,36	1,96	28,76	0,45	0,04	1,17	0,07
20/10/96 09:05	22,08	0,92	46706,00	7705,00	4510,50	24330,00	56,12	9,23	5,42	29,23	0,43	0,26	1,47	0,19
20/10/96 19:00	32,00	1,33	32160,50	3902,50	5331,50	16318,00	53,83	6,54	8,92	27,31	0,22	0,31	1,06	0,33
21/10/96 13:00	50,00	2,08	28315,00	15186,50	13523,00	11905,00	39,88	21,56	19,05	16,76	0,85	0,85	0,84	1,14
22/10/96 07:00	68,00	2,83	32275,50	9264,50	16711,50	12836,50	44,38	12,54	22,98	17,63	0,52	1,07	0,88	1,30
23/10/96 22:00	107,00	4,46	31899,00	15708,00	17988,50	14616,00	38,48	18,89	21,70	17,63	0,88	1,15	0,97	1,23
24/10/96 14:35	123,58	5,15	27057,50	32699,00	14388,00	10756,50	31,05	37,43	16,51	12,36	1,82	0,91	0,78	1,34
24/10/96 15:25	124,42	5,18	36751,00	2997,50	0,00	4563,50	78,93	6,40	0,00	9,74	0,17	0,00	0,46	0,00
25/10/96 15:45	148,75	6,20	51460,50	6951,50	718,00	12098,50	72,25	9,76	1,01	16,99	0,39	0,01	0,85	0,06
26/10/96 18:15	175,25	7,30	56233,00	12311,00	1350,50	13352,50	67,55	14,79	1,62	16,04	0,69	0,05	0,91	0,10
28/10/96 13:35	218,58	9,11	54028,00	7410,00	1895,50	12107,50	71,62	9,82	2,51	16,05	0,42	0,08	0,85	0,16
30/10/96 10:05	263,08	10,96	52531,50	9559,50	2418,50	14378,50	66,59	12,12	3,07	18,22	0,54	0,12	0,96	0,17
31/10/96 14:15	291,25	12,14	49937,00	9752,50	2620,50	13441,50	65,92	12,87	3,46	17,75	0,55	0,13	0,91	0,19
04/11/96 13:55	388,25	16,18	43022,00	10313,00	3059,50	11398,50	63,46	15,21	4,51	16,82	0,58	0,16	0,81	0,27
08/11/96 15:15	485,33	20,22	42075,00	9418,00	3521,50	12859,50	62,01	13,87	5,22	18,94	0,53	0,19	0,88	0,28
12/11/96 11:20	577,42	24,06	56493,00	8590,50	0,00	5111,00	80,48	12,24	0,00	7,28	0,48	0,00	0,49	0,00
16/11/96 18:20	680,42	28,35	47680,00	5879,00	19935,50	4952,50	60,78	7,49	25,42	6,31	0,33	1,28	0,48	4,03
20/11/96 19:25	777,50	32,40	53492,00	8277,50	23017,50	6836,00	58,39	9,04	25,12	7,46	0,47	1,48	0,58	3,37
25/11/96 14:44	892,82	37,20	46653,50	8979,50	20602,00	5849,00	56,84	10,94	25,10	7,12	0,51	1,32	0,53	3,53
02/12/96 17:25	1063,22	44,30	50378,00	7071,50	22398,50	5957,00	58,72	8,24	26,11	6,94	0,40	1,44	0,53	3,76
08/12/96 16:57	1206,75	50,28	52858,00	7819,00	24357,50	6799,50	57,56	8,52	26,52	7,41	0,44	1,57	0,58	3,58

TABELA B.38 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5B.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
19/10/96 11:00	0,00	0,00	0,00	7824,00	0,00	71997,50	0,00	9,42	0,00	86,86	0,44	0,00	3,89	0,00
19/10/96 12:40	1,67	0,07	0,00	9778,50	611,50	66974,00	0,00	12,15	0,76	83,37	0,55	0,01	3,64	0,01
19/10/96 15:40	4,67	0,19	0,00	6484,50	1647,00	78303,00	0,00	7,33	1,87	88,83	0,37	0,07	4,21	0,02
19/10/96 21:10	10,17	0,42	0,00	46602,00	3587,00	72133,50	0,00	37,43	2,88	57,90	2,59	0,20	3,90	0,05
20/10/96 09:05	22,08	0,92	0,00	121600,50	9750,50	48672,50	0,00	66,90	5,37	26,78	6,73	0,60	2,70	0,20
20/10/96 19:00	32,00	1,33	0,00	151542,50	9047,00	33575,00	0,00	77,02	4,60	17,06	8,39	0,56	1,94	0,27
21/10/96 13:00	50,00	2,08	0,00	178968,00	8807,50	21634,00	0,00	84,38	4,16	10,20	9,91	0,54	1,33	0,41
22/10/96 07:00	68,00	2,83	0,00	174329,00	16510,50	39057,50	0,00	75,02	7,11	16,81	9,65	1,05	2,22	0,42
22/10/96 08:45	69,75	2,91	0,00	2050,50	0,00	280051,50	0,00	0,61	0,00	98,62	0,12	0,00	14,47	0,00
22/10/96 10:50	71,83	2,99	0,00	2033,50	0,00	319516,00	0,00	0,63	0,00	98,95	0,12	0,00	16,48	0,00
22/10/96 13:50	74,83	3,12	0,00	1801,50	0,00	270596,50	0,00	0,66	0,00	98,43	0,11	0,00	13,99	0,00
22/10/96 21:30	82,50	3,44	0,00	3265,50	0,00	255942,50	0,00	1,25	0,00	97,63	0,19	0,00	13,25	0,00
23/10/96 14:05	99,08	4,13	0,00	4854,00	894,00	284856,00	0,00	1,66	0,31	97,20	0,28	0,02	14,72	0,00
23/10/96 22:00	107,00	4,46	0,00	4621,00	1399,00	338884,00	0,00	1,37	0,41	97,48	0,26	0,05	17,46	0,00
24/10/96 15:25	124,42	5,18	0,00	3374,50	2296,00	352559,50	0,00	0,95	0,64	98,42	0,20	0,11	18,16	0,01
25/10/96 15:45	148,75	6,20	0,00	3589,00	3337,00	346972,00	0,00	1,02	0,94	98,04	0,21	0,18	17,87	0,01
26/10/96 18:15	175,25	7,30	0,00	5380,00	4833,00	372959,00	0,00	1,41	1,26	97,34	0,31	0,28	19,20	0,01
28/10/96 13:35	218,58	9,11	0,00	4896,50	7108,00	367710,00	0,00	1,29	1,87	96,81	0,28	0,43	18,93	0,02
30/10/96 10:05	263,08	10,96	0,00	4605,00	8097,50	369114,50	0,00	1,21	2,12	96,68	0,26	0,50	19,00	0,02
31/10/96 14:15	291,25	12,14	0,00	5230,00	8296,00	346996,50	0,00	1,45	2,30	96,25	0,30	0,51	17,88	0,02
04/11/96 13:55	388,25	16,18	0,00	5717,00	8968,00	304735,50	0,00	1,79	2,81	95,40	0,33	0,55	15,73	0,03
08/11/96 15:15	485,58	20,23	0,00	4636,00	10642,50	301075,00	0,00	1,47	3,36	95,13	0,27	0,66	15,54	0,04
12/11/96 11:20	577,67	24,07	0,00	9601,50	0,00	136156,00	0,00	6,59	0,00	93,41	0,54	0,00	7,15	0,00
16/11/96 18:20	680,67	28,36	0,00	11568,50	38822,50	73263,00	0,00	9,36	31,40	59,25	0,65	2,53	3,96	0,53
16/11/96 20:00	682,33	28,43	0,00	8043,00	1001,00	118165,00	0,00	6,33	0,79	92,89	0,45	0,02	6,24	0,01
20/11/96 19:30	777,83	32,41	0,00	13551,00	62799,00	72259,00	0,00	9,13	42,26	48,62	0,76	4,12	3,90	0,87
21/11/96 12:45	795,08	33,13	0,00	7492,50	1137,00	100213,50	0,00	6,88	1,05	92,08	0,42	0,03	5,33	0,01
25/11/96 14:45	893,08	37,21	0,00	12682,00	47209,00	58899,50	0,00	10,68	39,74	49,58	0,71	3,09	3,22	0,80
03/12/96 08:20	1078,83	44,95	0,00	117507,50	51763,50	79300,00	0,00	47,27	20,82	31,90	6,51	3,39	4,26	0,65
03/12/96 09:20	1079,83	44,99	0,00	7756,50	1027,50	109057,50	0,00	6,58	0,87	92,55	0,44	0,03	5,78	0,01
08/12/96 16:57	1208,45	50,35	0,00	14546,00	51371,50	62463,50	0,00	11,34	40,01	48,65	0,81	3,36	3,41	0,82

... continuação

TABELA B.38 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5B.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
08/12/96 18:10	1338,28	55,76	0,00	7922,50	1023,00	106562,50	0,00	6,86	0,89	92,25	0,45	0,03	5,65	0,01

TABELA B.39 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5C.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
19/10/96 11:00	0,00	0,00	0,00	7021,00	0,00	77528,50	0,00	8,04	0,00	88,88	0,40	0,00	4,17	0,00
19/10/96 12:40	1,67	0,07	0,00	8804,00	0,00	76381,50	0,00	10,07	0,00	87,27	0,50	0,00	4,11	0,00
19/10/96 15:40	4,67	0,19	0,00	3753,00	1363,50	82613,00	0,00	4,15	1,51	91,33	0,22	0,05	4,43	0,02
19/10/96 21:10	10,17	0,42	0,00	13790,00	3549,00	89884,00	0,00	12,54	3,24	81,96	0,77	0,19	4,80	0,04
20/10/96 09:05	22,08	0,92	0,00	103576,00	9766,00	58638,00	0,00	59,74	5,64	33,81	5,74	0,61	3,21	0,17
20/10/96 19:00	32,00	1,33	0,00	167304,50	10642,50	32149,00	0,00	78,78	5,02	15,17	9,26	0,66	1,86	0,33
21/10/96 13:00	50,00	2,08	0,00	190763,00	8802,50	17356,00	0,00	86,94	4,01	7,91	10,56	0,54	1,11	0,51
22/10/96 07:00	68,00	2,83	0,00	186291,00	11715,00	22796,50	0,00	83,45	5,25	10,22	10,31	0,73	1,39	0,51
22/10/96 08:45	69,75	2,91	0,00	2763,00	0,00	69510,50	0,00	3,64	0,00	92,51	0,16	0,00	3,76	0,00
22/10/96 10:50	71,83	2,99	0,00	3744,00	2044,50	87633,50	0,00	3,95	2,16	92,38	0,22	0,09	4,69	0,02
22/10/96 13:50	74,83	3,12	0,00	52143,00	6595,00	66042,00	0,00	40,93	5,18	51,86	2,89	0,40	3,59	0,10
22/10/96 21:30	82,50	3,44	0,00	146126,50	12783,50	36103,50	0,00	73,88	6,47	18,27	8,09	0,81	2,07	0,35
23/10/96 14:05	99,08	4,13	0,00	203738,50	14025,00	23744,50	0,00	83,28	5,74	9,71	11,28	0,89	1,44	0,59
23/10/96 22:00	107,00	4,46	0,00	212350,00	14191,00	23917,50	0,00	84,05	5,63	9,48	11,75	0,90	1,45	0,59
24/10/96 15:25	124,42	5,18	0,00	74400,50	44842,00	73541,50	0,00	38,59	23,26	38,15	4,12	2,93	3,97	0,61
25/10/96 13:00	146,00	6,08	0,00	79774,50	47084,00	79270,50	0,00	38,68	22,83	38,42	4,42	3,08	4,26	0,59
25/10/96 14:00	147,00	6,13	0,00	4276,50	0,00	112434,00	0,00	3,67	0,00	96,34	0,25	0,00	5,95	0,00
25/10/96 15:45	148,75	6,20	0,00	7936,00	1850,50	109321,50	0,00	6,65	1,56	91,80	0,45	0,08	5,79	0,02
25/10/96 18:05	151,08	6,30	0,00	9966,50	4657,00	115155,00	0,00	7,68	3,59	88,73	0,56	0,27	6,09	0,04
25/10/96 22:05	155,08	6,46	0,00	19282,00	16769,00	96806,50	0,00	14,48	12,59	72,69	1,08	1,07	5,15	0,17
26/10/96 08:05	165,08	6,88	0,00	37790,00	36627,50	81923,50	0,00	24,18	23,43	52,40	2,10	2,39	4,40	0,45
26/10/96 18:15	175,25	7,30	0,00	54252,00	41289,50	73064,50	0,00	32,03	24,37	43,12	3,01	2,70	3,95	0,57
28/10/96 13:35	218,58	9,11	0,00	96138,50	43523,00	79261,00	0,00	43,83	19,86	36,14	5,33	2,84	4,26	0,55
30/10/96 10:05	263,08	10,96	0,00	114725,50	42229,50	81768,00	0,00	47,96	17,66	34,18	6,35	2,76	4,39	0,52
31/10/96 14:15	291,25	12,14	0,00	119056,00	40535,50	81013,50	0,00	49,35	16,80	33,58	6,59	2,65	4,35	0,50

... continuação

TABELA B.39 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 5C.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
31/10/96 17:00	294,00	12,25	0,00	6685,50	0,00	150858,00	0,00	4,25	0,00	95,75	0,38	0,00	7,90	0,00
04/11/96 13:55	388,00	16,17	0,00	33196,00	64856,00	82764,50	0,00	18,36	35,87	45,78	1,84	4,26	4,44	0,78
04/11/96 15:20	389,42	16,23	0,00	7963,00	0,00	164949,50	0,00	4,60	0,00	95,20	0,45	0,00	8,62	0,00
08/11/96 15:15	485,33	20,22	0,00	9204,50	58929,00	84396,00	0,00	6,04	38,63	55,33	0,52	3,87	4,52	0,70
12/11/96 11:20	577,42	24,06	0,00	8110,00	336,50	107005,00	0,00	7,00	0,29	92,21	0,46	0,01	5,67	0,00
16/11/96 18:20	680,42	28,35	0,00	12478,00	43667,00	43829,00	0,00	12,39	43,35	43,51	0,70	2,85	2,46	1,00
16/11/96 20:00	682,08	28,42	0,00	7915,50	1157,00	101402,00	0,00	7,17	1,05	91,79	0,45	0,03	5,39	0,01
20/11/96 19:30	777,58	32,40	0,00	15882,00	58594,00	55621,00	0,00	12,24	45,03	42,74	0,89	3,84	3,06	1,05
21/11/96 12:45	794,83	33,12	0,00	9140,00	1086,50	88165,00	0,00	9,29	1,10	89,61	0,51	0,03	4,71	0,01
25/11/96 14:45	892,83	37,20	0,00	12167,50	45859,50	50345,50	0,00	11,23	42,32	46,46	0,68	3,00	2,79	0,91
03/12/96 08:20	1078,59	44,94	0,00	156177,50	53406,00	78383,00	0,00	54,24	18,55	27,22	8,65	3,50	4,22	0,68
03/12/96 09:20	1079,59	44,98	0,00	9537,00	839,50	103376,00	0,00	8,38	0,79	90,84	0,54	0,02	5,49	0,01
08/12/96 16:57	1207,21	50,30	0,00	14404,50	48430,00	59538,00	0,00	11,78	39,58	48,65	0,81	3,17	3,26	0,81
08/12/96 18:10	1208,43	50,35	0,00	8692,00	1059,50	102178,50	0,00	7,77	0,85	91,29	0,49	0,03	5,43	0,01

TABELA B. 40 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6A.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
19/10/96 11:00	0,00	0,00	30659,50	5076,50	0,00	11398,50	67,84	10,24	0,00	22,99	0,29	0,00	0,81	0,00
19/10/96 12:40	1,67	0,07	30853,50	11461,50	0,00	14225,00	52,09	19,34	0,00	24,02	0,64	0,00	0,95	0,00
19/10/96 15:40	4,67	0,19	39045,00	5162,00	1135,00	16735,50	61,65	8,04	1,80	26,47	0,29	0,03	1,08	0,07
19/10/96 21:10	10,17	0,42	34126,00	8856,50	2217,50	15926,50	53,91	14,00	3,51	25,16	0,50	0,11	1,04	0,14
20/10/96 09:05	22,08	0,92	37182,00	4757,00	7227,00	14422,00	56,88	7,30	11,06	22,07	0,27	0,44	0,96	0,50
20/10/96 19:00	32,00	1,33	29891,00	7623,00	12543,50	9616,00	47,93	12,23	20,12	15,42	0,43	0,79	0,72	1,30
21/10/96 13:00	50,00	2,08	28734,50	10727,50	14078,00	8811,00	44,24	16,47	21,67	13,57	0,60	0,89	0,68	1,60
22/10/96 07:00	68,00	2,83	30976,00	4360,50	14488,50	10081,50	49,85	7,02	23,32	16,23	0,25	0,92	0,74	1,44
23/10/96 22:00	107,00	4,46	33311,00	14996,50	16666,50	11886,00	42,08	18,94	21,05	15,01	0,84	1,06	0,83	1,40
24/10/96 14:35	123,58	5,15	29026,50	22684,50	13681,50	9107,50	38,23	29,87	18,02	12,00	1,26	0,87	0,69	1,50
24/10/96 15:25	124,42	5,18	47688,50	2883,50	0,00	6515,00	83,57	5,02	0,00	11,41	0,17	0,00	0,56	0,00
25/10/96 15:45	148,75	6,20	48281,00	6005,00	0,00	9979,00	75,13	9,35	0,00	15,53	0,34	0,00	0,74	0,00
26/10/96 18:15	175,25	7,30	52495,50	10678,00	866,00	10688,50	69,95	14,66	1,16	14,24	0,60	0,02	0,77	0,08
28/10/96 13:35	218,58	9,11	51707,50	8754,00	1058,50	10026,50	72,27	12,24	1,48	14,01	0,49	0,03	0,74	0,11
30/10/96 10:05	263,08	10,96	51423,00	9038,00	1421,50	12051,50	69,58	12,20	1,93	16,31	0,51	0,05	0,84	0,12
31/10/96 14:15	291,25	12,14	49064,50	10630,50	1612,00	12363,50	66,60	14,43	2,19	16,78	0,60	0,06	0,86	0,13
04/11/96 13:55	388,25	16,18	43275,50	11738,50	2009,50	9887,00	64,70	17,52	3,01	14,78	0,66	0,09	0,73	0,20
08/11/96 15:15	485,33	20,22	41629,50	9561,00	2351,50	10570,50	64,94	14,91	3,67	16,49	0,54	0,11	0,77	0,22
12/11/96 11:20	577,42	24,06	57133,50	2166,50	0,00	5440,50	88,25	3,35	0,00	8,41	0,13	0,00	0,51	0,00
16/11/96 18:20	680,42	28,35	47024,50	1464,50	19256,50	4329,50	65,25	2,03	26,72	6,01	0,09	1,24	0,45	4,45
20/11/96 19:30	777,58	32,40	50707,50	10052,00	21564,00	5514,00	57,73	11,45	24,55	6,28	0,56	1,39	0,51	3,91
25/11/96 14:45	892,83	37,20	47396,00	1385,00	20030,00	5312,00	63,95	1,87	27,02	7,17	0,09	1,29	0,50	3,77
02/12/96 17:25	1063,23	44,30	49453,50	7420,50	21470,50	4588,00	59,63	8,95	25,89	5,54	0,42	1,38	0,46	4,67
08/12/96 16:57	1206,77	50,28	51937,00	7960,00	23146,00	5423,00	58,71	9,00	26,17	6,13	0,45	1,49	0,51	4,27

TABELA B. 41 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6B.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
19/10/96 11:00	0,00	0,00	0,00	7571,00	0,00	70692,50	0,00	9,31	0,00	86,86	0,43	0,00	3,82	0,00
19/10/96 12:40	1,67	0,07	0,00	14302,00	0,00	73335,00	0,00	15,90	0,00	84,10	0,80	0,00	3,96	0,00
19/10/96 15:40	4,67	0,19	0,00	14711,50	2160,50	73276,50	0,00	15,86	2,33	78,99	0,82	0,10	3,96	0,03
19/10/96 21:10	10,17	0,42	0,00	60690,50	4515,00	70323,50	0,00	43,93	3,28	51,04	3,37	0,26	3,81	0,06
20/10/96 09:05	22,08	0,92	0,00	162376,00	12297,50	36411,50	0,00	76,28	5,78	17,13	8,99	0,77	2,08	0,34
20/10/96 19:00	32,00	1,33	0,00	153864,50	14818,50	41490,50	0,00	72,31	6,97	19,50	8,52	0,94	2,34	0,36
21/10/96 13:00	50,00	2,08	0,00	158471,50	17288,50	46374,00	0,00	70,59	7,70	20,66	8,77	1,10	2,59	0,37
22/10/96 07:00	68,00	2,83	0,00	163604,00	18141,50	50308,00	0,00	69,78	7,74	21,46	9,06	1,16	2,79	0,36
22/10/96 08:45	69,75	2,91	0,00	2218,50	0,00	313849,00	0,00	0,69	0,00	98,61	0,13	0,00	16,19	0,00
22/10/96 10:50	71,83	2,99	0,00	2267,00	0,00	303526,50	0,00	0,74	0,00	98,88	0,13	0,00	15,66	0,00
22/10/96 13:50	74,83	3,12	0,00	2294,00	0,00	254538,50	0,00	0,89	0,00	98,05	0,14	0,00	13,17	0,00
22/10/96 21:30	82,50	3,44	0,00	3650,50	0,00	274642,00	0,00	1,30	0,00	97,74	0,21	0,00	14,20	0,00
23/10/96 14:05	99,08	4,13	0,00	4766,00	0,00	289488,50	0,00	1,61	0,00	97,46	0,27	0,00	14,95	0,00
23/10/96 22:00	107,00	4,46	0,00	3426,50	0,00	308784,50	0,00	1,09	0,00	98,15	0,20	0,00	15,93	0,00
24/10/96 15:25	124,42	5,18	0,00	4331,50	0,00	356004,50	0,00	1,20	0,00	98,80	0,25	0,00	18,33	0,00
25/10/96 15:45	148,75	6,20	0,00	3982,00	0,00	356130,00	0,00	1,11	0,00	98,59	0,23	0,00	18,34	0,00
26/10/96 18:15	175,25	7,30	0,00	5659,50	0,00	384989,50	0,00	1,45	0,00	98,55	0,32	0,00	19,81	0,00
28/10/96 13:35	218,58	9,11	0,00	4847,50	295,50	374938,50	0,00	1,28	0,08	98,64	0,28	0,01	19,30	0,00
30/10/96 10:05	263,08	10,96	0,00	4048,00	803,50	380918,50	0,00	1,05	0,21	98,66	0,23	0,02	19,60	0,00
31/10/96 14:15	291,25	12,14	0,00	5558,00	896,50	355296,50	0,00	1,54	0,25	98,22	0,32	0,02	18,30	0,00
04/11/96 13:55	388,25	16,18	0,00	5467,00	1153,00	314673,00	0,00	1,71	0,36	97,94	0,31	0,03	16,23	0,00
08/11/96 15:15	485,58	20,23	0,00	14660,50	1334,50	295129,00	0,00	4,71	0,43	94,86	0,82	0,05	15,24	0,00
12/11/96 11:20	577,67	24,07	0,00	10023,00	0,00	131280,50	0,00	7,09	0,00	92,91	0,56	0,00	6,91	0,00
16/11/96 18:20	680,67	28,36	0,00	22062,00	39192,00	69566,00	0,00	16,86	29,96	53,18	1,23	2,56	3,77	0,56
16/11/96 20:00	682,33	28,43	0,00	8649,50	744,50	119069,00	0,00	6,74	0,58	92,69	0,49	0,01	6,28	0,01
20/11/96 19:30	777,83	32,41	0,00	45256,00	62007,50	74566,50	0,00	24,88	34,11	41,02	2,51	4,07	4,02	0,83
21/11/96 12:45	795,08	33,13	0,00	9890,50	816,00	101632,50	0,00	8,81	0,73	90,47	0,56	0,01	5,40	0,01
25/11/96 14:45	893,08	37,21	0,00	161998,00	40363,00	80584,50	0,00	57,26	14,27	28,48	8,97	2,63	4,33	0,50
03/12/96 08:20	1078,83	44,95	0,00	170741,00	44129,50	89326,00	0,00	56,13	14,51	29,37	9,45	2,88	4,77	0,49
03/12/96 09:20	1079,83	44,99	0,00	9189,00	719,50	116174,00	0,00	7,29	0,57	92,14	0,52	0,01	6,14	0,01
08/12/96 16:57	1208,45	50,35	0,00	15300,50	51278,50	65491,00	0,00	11,58	38,83	49,59	0,86	3,36	3,56	0,78

... continuação

TABELA B. 41 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6B.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
08/12/96 18:10	1338,28	55,76	0,00	7890,00	970,50	109030,50	0,00	6,70	0,82	92,49	0,45	0,02	5,77	0,01

TABELA B. 42 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6C.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
19/10/96 11:00	0,00	0,00	0,00	6709,00	0,00	75304,00	0,00	7,90	0,00	88,72	0,38	0,00	4,06	0,00
19/10/96 12:40	1,67	0,07	0,00	5484,00	1134,50	72653,00	0,00	6,82	1,37	88,34	0,31	0,03	3,92	0,02
19/10/96 15:40	4,67	0,19	0,00	22388,00	2746,00	78208,00	0,00	21,01	2,58	73,37	1,25	0,14	4,21	0,04
19/10/96 21:10	10,17	0,42	0,00	74438,00	6186,50	69445,00	0,00	49,02	4,07	45,74	4,13	0,37	3,76	0,09
20/10/96 09:05	22,08	0,92	0,00	183285,00	11478,00	30602,00	0,00	80,72	5,06	13,49	10,15	0,72	1,79	0,38
20/10/96 19:00	32,00	1,33	0,00	199315,50	8431,00	17444,00	0,00	87,60	3,71	7,68	11,03	0,52	1,12	0,48
21/10/96 13:00	50,00	2,08	0,00	181061,00	11465,50	21787,00	0,00	83,57	5,29	10,06	10,02	0,72	1,34	0,53
22/10/96 07:00	68,00	2,83	0,00	179929,00	11522,00	22972,00	0,00	82,91	5,32	10,61	9,96	0,72	1,40	0,50
22/10/96 08:45	69,75	2,91	0,00	4595,50	0,00	77490,00	0,00	5,45	0,00	91,82	0,26	0,00	4,17	0,00
22/10/96 10:50	71,83	2,99	0,00	5653,50	3718,50	88761,00	0,00	5,66	3,73	88,97	0,32	0,20	4,74	0,04
22/10/96 13:50	74,83	3,12	0,00	95478,00	7829,50	53992,00	0,00	59,89	4,91	33,81	5,29	0,48	2,98	0,15
22/10/96 21:30	82,50	3,44	0,00	175679,00	11517,00	27825,00	0,00	80,66	5,29	12,77	9,72	0,72	1,64	0,41
23/10/96 14:05	99,08	4,13	0,00	199340,50	16519,50	29534,00	0,00	80,33	6,66	11,90	11,03	1,05	1,73	0,56
23/10/96 22:00	107,00	4,46	0,00	146536,00	11067,50	20676,00	0,00	79,84	6,14	11,49	8,11	0,69	1,28	0,53
24/10/96 15:25	124,42	5,18	0,00	85700,50	40411,50	71934,00	0,00	43,12	20,33	36,19	4,75	2,64	3,89	0,56
25/10/96 13:00	146,00	6,08	0,00	91914,50	41306,50	76555,00	0,00	43,66	19,62	36,37	5,09	2,70	4,12	0,54
25/10/96 14:00	147,00	6,13	0,00	8612,00	344,50	127647,50	0,00	6,31	0,25	93,45	0,49	0,01	6,72	0,00
25/10/96 15:45	148,75	6,20	0,00	6145,50	6378,00	120093,00	0,00	4,64	4,81	90,56	0,35	0,38	6,34	0,05
25/10/96 18:05	151,08	6,30	0,00	6700,50	13723,50	123728,50	0,00	4,65	9,52	85,83	0,38	0,87	6,52	0,11
25/10/96 22:05	155,08	6,46	0,00	17026,00	24701,00	102929,00	0,00	11,77	17,08	71,16	0,95	1,60	5,46	0,24
26/10/96 08:05	165,08	6,88	0,00	37789,50	39885,00	89280,00	0,00	22,64	23,89	53,48	2,10	2,60	4,77	0,45
26/10/96 18:15	175,25	7,30	0,00	50510,00	43091,50	82826,50	0,00	28,63	24,43	46,95	2,80	2,82	4,44	0,52
28/10/96 13:35	218,58	9,11	0,00	83449,00	44333,00	86897,00	0,00	38,87	20,65	40,48	4,62	2,90	4,65	0,51
30/10/96 10:05	263,08	10,96	0,00	100394,50	43946,50	91006,00	0,00	42,66	18,68	38,67	5,56	2,87	4,86	0,48
31/10/96 14:15	291,25	12,14	0,00	97781,00	39711,50	84904,50	0,00	43,96	17,86	38,18	5,42	2,59	4,55	0,47

... continuação

TABELA B. 42 - Valores das análises cromatográficas do Frasco 6C.

DATA	HORA	DIAS	ÁREA He	ÁREA N ₂	ÁREA CH ₄	ÁREA CO ₂	% He	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	mmoles N ₂	mmoles CH ₄	mmoles CO ₂	CH ₄ /CO ₂
31/10/96 17:00	294,00	12,25	0,00	6602,00	295,00	147508,00	0,00	4,28	0,19	95,14	0,37	0,01	7,73	0,00
04/11/96 13:55	388,00	16,17	0,00	25140,00	61401,50	79722,00	0,00	15,12	36,93	47,95	1,40	4,03	4,28	0,77
04/11/96 15:20	389,42	16,23	0,00	11267,00	924,50	155660,50	0,00	6,72	0,55	92,74	0,63	0,02	8,15	0,01
08/11/96 15:15	485,33	20,22	0,00	9508,00	55802,50	78508,00	0,00	6,61	38,81	54,59	0,53	3,66	4,22	0,71
12/11/96 11:20	577,42	24,06	0,00	8397,00	1349,50	107307,00	0,00	7,15	1,17	91,68	0,47	0,05	5,69	0,01
16/11/96 18:20	680,42	28,35	0,00	78627,50	45599,50	45684,00	0,00	46,28	26,84	26,89	4,36	2,98	2,55	1,00
16/11/96 20:00	682,08	28,42	0,00	6940,00	945,00	102590,00	0,00	6,28	0,86	92,86	0,39	0,02	5,45	0,01
20/11/96 19:30	777,58	32,40	0,00	13685,50	56302,00	55621,00	0,00	10,82	44,53	44,56	0,77	3,69	3,06	1,00
21/11/96 12:45	794,83	33,12	0,00	8546,00	1020,50	89832,50	0,00	8,06	1,03	49,87	0,48	0,03	4,80	0,02
25/11/96 14:45	892,83	37,20	0,00	12118,50	43856,50	50403,50	0,00	11,39	41,23	47,38	0,68	2,87	2,79	0,87
03/12/96 08:20	1078,59	44,94	0,00	69575,00	49363,50	60836,00	0,00	38,70	27,46	33,84	3,86	3,23	3,32	0,81
03/12/96 09:20	1079,59	44,98	0,00	7402,50	981,00	99591,50	0,00	6,86	0,91	92,24	0,42	0,02	5,29	0,01
08/12/96 16:57	1207,21	50,30	0,00	21700,50	47627,50	54214,00	0,00	17,58	38,55	43,87	1,21	3,12	2,99	0,88
08/12/96 18:10	1208,43	50,35	0,00	10083,00	996,00	97119,50	0,00	9,31	0,92	89,69	0,57	0,02	5,17	0,01



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. M. (1994). Aspectos microbiológicos de los procesos de nitrificación-desnitrificación. III Taller y Seminario Latinoamericano *Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales*, Montivideo, Uruguay, p 55-64.
- ARAÚJO, J. C. (1995). *Caracterização e Evolução do Biofilme em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético*. São Carlos. 158p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- BARBOSA, R. A.; SANT'ANNA, G. L. JR. (1989). Treatment of raw domestic sewage in UASB reactor. *Wat. Res.*, v. 23, p. 1483-90.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. (1989). *Archaeobacteria*. 1 ed. Eds J. T. Staley, M. P. Bryant, N Pfenning, J. G. Holf, Baltimore, Williams & Wilkins., v. 3, p. 2171-2216.
- BHADRA, A.; SCHARER, J. M.; MOO-YONUG, M. (1987). Methanogenesis from volatile fatty acids in dow-flow stationary fixed-film reactor. *Biotechnol. Bioengineering*, v.30, p. 314-9.
- BROCK, T. D. & MADIGAN, M. T. (1994). *Biology of Microorganisms*, New Jersey, Prentice Hall.

- CAMPOS, J. R. (1989). *Remoção de DQO e de Nitrogênio em um sistema de três reatores biológicos de filme fixo em série*. São Carlos. Tese (Livre-Docência) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo,
- CAMPOS, J. R. (1994) *Alternativas para tratamento de esgotos - Pré-tratamento de águas para abastecimento*. Americana: Consórcio intermunicipal das bacias dos rios Piracicaba e Capivari, São Paulo.
- CHENG, K. J.; KUDO, H.; DUNCAN, S. H.; MESBAH, A.; STEWART, C. S.; BERNALIER, A.; FONTY, G.; COSTERTON, J. W. (1991). Prevention of fungal colonization and digestion of cellulose by the addition of methylcellulose. *Can. J. Microbiol.*, v. 37, p. 484-87.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (1997). *Introdução a métodos cromatográficos*, Campinas, Editora da Unicamp.
- DUBOURGUIER, H. C. (1987). *Curso Ecologia da Digestão Anaeróbia*. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, São Paulo.
- ECKENFELDER, W. W. & ARGAMAN, Y. (1991). Principles of Biological and Physical/Chemical Nitrogen Removal. In: Sedlak, R., ed. *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater*. 2 ed. New York, cap. 2, p. 3-42.
- ESTEVES, F. A. (1988). *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro, Ed. Interciência FINEP.
- GIANOTTI, E. P. (1994). *Desnitrificação em uma lagoa marginal do Rio Mogi-Guaçu, Lagoa do Infernã (Estação Ecológica do Itajai - Luiz Antonio - SP)* São Carlos. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos.

- GOTTSCHALK, G. (1988). *Bacterial metabolism* 2 ed. Springer Verlag New York Inc., New York.
- JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGER, G. T. (1993). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. 2 ed. Chelsea, Michigan, Lewis Publishers.
- JETTEN, M. S. M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; ROBERTSON, A.; de Vries, S.; van LOOSDRECHT, M. C. M.; KUENEN, J. G. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 71, p. 75-95.
- JONES, W. J. (1991) Diversity and physiology of methanogens. In: J. E. ROGERS & W. B. WHILMAN eds. *Microbial production and consumption of green-house gases: methane, nitrogen oxides, and halomethanes*. ASM, p 39-55.
- KOLOLEFF, 1976 : In Graffhoffk (Editors). *Methods of seawater Analysees*, VFFLAG CHEME VEINHEIN, p. 117-181.
- MANAHAM, S. E. (1993). *Fundamentals of Environmental Chemistry*. Michigan, Lewis Publishers.
- MCELDOWNEY, S.; HARDMAN, D. J.; WAITE, S. (1993) *Pollution ecology and biotreatment*, London, Longman Scientif & Technical.
- MERGAERT, K.; VANDERHAEGEN, B.; VERSTRAETE, W. (1992). Applicability and trends of anaerobic pre-treatment of municipal wastewater. *Wat. Res.*, v. 26 , n. 8, p. 1025-33.
- METCALF & EDDY, (1991). Inc. Water Engineering: *Treatment, Disposal, Reuse*, 3^a Ed., USA, Mc Graw-Hill.

- MULDER, A.; van de GRAAF; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 16, p. 177-84.
- NOVAES, R. F. V. (1986). Microbiology of Anaerobic Digestion. *Wat. Sci. Tech.*, v. 18, n. 12, p. 1-14.
- NOVAES, R. F. V.; RECH, C. M.; FIGUEIREDO, M. G.; GIAJ-LEURA, L. A. (1988). Bacterial identification of granular sludge from domestic UASB-reactor. In: 5th International Symposium on Anaerobic Digestion. Bologna, Itália, p. 65-8.
- OLIVA, L. C. H. V. (1997). *Tratamento de Esgotos Sanitários com reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) protótipo: desempenho e respostas dinâmicas às sobrecargas hidráulicas*. São Carlos. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- OREMLAND, R. S. (1988). Biogeochemistry of Methanogenic Bacteria. In: Zehnder, A. J. B., ed. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York, John Wiley & Sons, Inc. cap. 12, p. 641-705.
- PENNA, J. A. (1994). *Estudo da Metodologia do Teste de Atividade Metanogênica Específica*. São Carlos. 517p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- PESSIN, N. (1997). *Avaliação de uma metodologia para obtenção de fungos anaeróbios celulolíticos a partir de amostras provenientes de dois ecossistemas distintos: Rúmen e aterro sanitário*. São Carlos. 168p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. (1991). Physiology of nitrifying and denitrifying bacteria. In: ROGERS, J. E.; WHITMAN, W. B. Eds *Microbial*

production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides, and halomethanes. p. 189-99.

SPEECE, R. E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater*. Archae. Press., EUA.

STROUS, M.; van GERVEN, E.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic condition on anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMOX) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, n. 6, p. 2446-8.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. (1996) *Aquatic Chemistry Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, 3° ed., New York, Wiley Interscience.

TATE, R. L. (1995) *Soil Microbiology*. New York, John Willey & Sons, Inc.

TIEDJE, J. M. (1988). Ecology of Denitrification and Dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder, A. J. B., ed. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York, John Wiley & Sons, Inc. cap. 4, p. 179-245.

TORRES, P. (1992). *Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários*. São Carlos. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

VALLEJOS, M. E. H. (1997). *Operação e monitoramento do desempenho de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB), tratando esgotos sanitários*. São Carlos. 114p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Van de GRAAF, A. A.; MULDER, A.; DE BRUIJN, P.; JETTEN, M. S. M.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. (1995). Anaerobic Oxidation of

- Ammonium is a Biologically Mediated Process. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, n. 4, p. 1246-51.
- VARESCHE, M. B. A. (1997) *Estudo com bactérias fototróficas anoxigênicas: enriquecimento, isolamento, caracterização nutricional e cinética de crescimento*. São Carlos. 363p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VAZOLLER, R. F. (1995a). *Microbiologia e Saneamento Ambiental*. Em: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello"©. Bases de Dados Tropical © p1 - 11, dora@bdt.org.br
- VAZOLLER, R. F. (1995b). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termófilicas*. São Carlos. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VIEIRA, S. M. M. (1984) *Tratamento de esgotos por digestores anaeróbios de fluxo ascendente*, São Paulo, CETESB.
- VIEIRA, S. M. M.; SOUZA, M. E. (1986) Development of technology for the use of the UASB reactor in domestic sewage treatment. *Water Science and Technology*, v. 18, p. 109-21.
- VIEIRA, S. M. M. (1988). Anaerobic treatment of domestic sewage in Brazil. Research results and full-scale experience. In: Proc. 5th Int. Symp. On *Anaerobic Digestion*, Bologna, Itália, p. 185-96.
- ZINDER, S. H.; KOCH, M. (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, v. 138, p. 263-72.

ZINDER, S. H. (1991) *Curso Ecologia de Biodigestores Anaeróbios*. Departamento. De Hidráulica e Saneamento, EESC-USP. São Carlos - São Paulo.