

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Departamento de Hidráulica e Saneamento
CENTRO DE RECURSOS HÍDRICOS E ECOLOGIA APLICADA

Avaliação da Atividade Microbiana
Anaeróbia de Sedimentos Lacustre e de
Lodos de um Biodigestor Anaeróbio
Termofílico na Degradação de Tricloroetileno
(TCE)

Silvia Helena Saboya Arruda Fatibello

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

DEDALUS - Acervo - EESC



31100017297



São Carlos/SP
2000

**Avaliação da Atividade Microbiana
Anaeróbia de Sedimentos Lacustre e de
Lodos de um Biodigestor Anaeróbio
Termofílico na Degradação de Tricloroetileno
(TCE)**

Silvia Helena Saboya Arruda Fatibello*

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller

Dissertação apresentada ao Centro de Recursos Hídrico e Ecologia Aplicada da Escola de Engenharia de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental

* Bolsista da FAPESP (98/03365-8)

São Carlos/SP
2000

Class.	TESE - EESC
Cutt.	2039
Tombo	0087/01

31100017297

1170991

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

F253a Fatibello, Silvia Helena Saboya Arruda
Avaliação da atividade microbiana anaeróbia de
sedimentos lacustre e de lodos de um biodigestor
anaeróbio termofílico na degradação de tricloroetileno
(TCE) / Silvia Helena Saboya Arruda Fatibello. -- São
Carlos, 2000.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São
Carlos-Universidade de São Paulo, 2000.
Área: Ciências da Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosana Filomena Vazoller.

1. Anaeróbia. 2. Termofílico. 3. Mesofílico.
4. Tricloroetileno. 5. Biodegradação. I. Título.

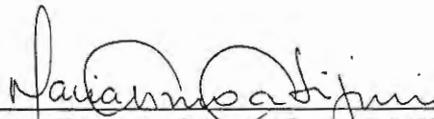
FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: Licenciada **SILVIA HELENA SABOYA ARRUDA FATIBELLO**

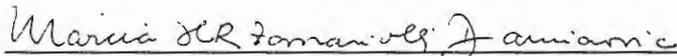
Dissertação defendida e aprovada em 19-01-2001
pela Comissão Julgadora:



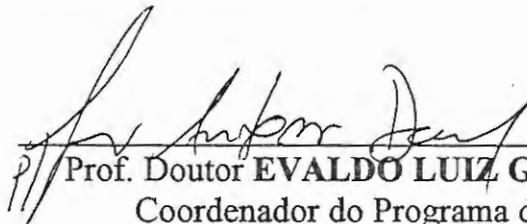
Profa. Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**
(Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia)



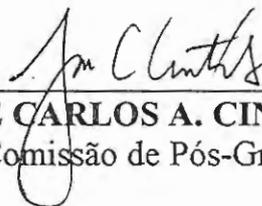
Profa. Associada **MARIA DO CARMO CALIJURI**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



Doutora **MÁRCIA HELENA RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC**
(Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia)



Prof. Doutor **IVALDO LUIZ GAETA ESPÍNDOLA**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Engenharia Ambiental



JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

Ao meu companheiro e esposo Ling (Orlando), pelo amor e sacrifícios sempre devotados, principalmente por ter me ensinado a dividir os nossos sonhos e a realidade e pela ajuda em realizá-los: Márcio, Maurício e Marcel (nossos filhos). Obrigado pelo amor de vocês e por entenderem minha necessidade de buscar um lugar.

Ao meu pai (*in memoria*), à minha mãe e ao meu irmão, Sérgio, por terem me ensinado tudo e pelo apoio de sempre. Principalmente por terem sempre acreditado nos meus sonhos e me ajudado a realizá-los. Muito obrigado.

CAPITALISMO IMPULSIVO

Quando olho para o céu,
vejo as estrelas do passado
e a escuridão do amanhã

Quando toco o solo,
sinto a risada dos homens
e as lágrimas da Terra

Quando respiro o ar,
inspiro a queima
e o desespero das árvores

Quando ouço o cantar dos pássaros,
escuto o cantar de despedida

Quando vejo os homens
sinto a tristeza de um lado
e de outro não sinto nada.

Maurício Arruda Fatibello
São Carlos, outubro de 1998.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho apresentado foi possível graças a ajuda e a participação direta ou indireta de diversas pessoas, assim sendo agradeço a todos e, especialmente:

À Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller, pela orientação segura, dedicação e confiança em mim depositada e, principalmente pela amizade e possibilidade de me ensinar e me abrir horizontes.

Ao meu esposo Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pelo apoio, leitura do texto original, ensinamentos e incentivo constante.

Ao Prof. Dr. Arthur Mattos pela oportunidade criada, atenção e principalmente pela amizade e confiança.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Calijuri pela amizade, ensinamentos e ajuda nas coletas, principalmente pela nossa primeira conversa em 1995, muito antes do início deste.

À minha amiga Ju (Juliana C. Araújo), pela constante ajuda no trabalho e principalmente pelo ombro cedido nas horas de tristeza.

À Profa. Elizabeth de Mattos Moraes pela paciência, discussões e auxílios prestados, pela amizade e dedicação e também pelas análises cromatográficas.

À minha amiga Dra. Walkíria D.S. M. Vilar pela ajuda e atenção com os meus filhos e também, juntamente com a Soledad M. Miron, pela confecção dos sacos de pano dos reatores.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat, pelas discussões científicas de parte desse trabalho.

À Dra. Maria Bernadete A. V. Silva pelo auxílio no laboratório e extensas reuniões.

À Dra. Eloísa P. Gianotti e MSc. Maria Angela Talarico pela ajuda prestada durante o desenvolvimento desse trabalho e convivência agradável.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento que colaboraram com grande disponibilidade e amizade.

Na figura da Marinha (Mara Costa) agradeço todos os meus muitos amigos e colegas do CRHEA (Broa) que me fizeram retornar e me sentir como uma jovem de 20 anos, principalmente pela alegria do convívio e ensinamentos transmitidos.

Ao químico Luis A. Ramos, pela confecção dos esquemas.

Ao MSc André Cordeiro Alves dos Santos, pela confecção dos mapas.

Aos técnicos do Broa, Marcelo, Beto e Luci, pelas coletas de amostras de sedimento.

À Flavinha da contabilidade pela ajuda constante com as contas da FAPESP.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida (98/03365-8).

Aos amigos e colegas de dentro e de fora do nosso ambiente de trabalho que sempre fizeram o dia-a-dia mais ameno e agradável.

Sobretudo a Deus por guiar minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	5
3.REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1.Metabolismo de microrganismos na natureza.....	10
3.2.Biotransformação de compostos resistentes com ênfase no tricloroetileno.....	13
3.2.1.Biodegradação de TCE sob condições aeróbias.....	15
3.2.2.Biodegradação de TCE sob condições anaeróbias.....	24
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1.Equipamentos.....	42
4.1.1.Sistema de distribuição simultânea de gases.....	42
4.1.2.Coluna catalítica para remoção de traços de oxigênio.....	43
4.1.3.Microscópio.....	43
4.1.4.Cromatógrafos.....	44
4.1.5.Manômetro.....	46
4.1.6.Potenciômetro.....	46
4.1.7.Agitador com temperatura controlada.....	46
4.1.8.Estufa bacteriológica.....	46
4.1.9.Outros equipamentos.....	46

4.2. Vidraria e outros materiais.....	47
4.3. Procedimentos experimentais.....	48
4.3.1. Coletas e manutenção dos lodos no laboratório.....	48
4.3.2. Procedimentos para a preparação, distribuição e preservação das soluções estoques	51
4.3.2.1. Limpeza e esterilização.....	51
4.3.2.1.1. Limpeza de vidraria.....	52
4.3.2.1.2. Tampas de borracha butila e revestida com Teflon.....	52
4.3.2.1.3. Esterilização à calor úmido, em autoclave.....	52
4.3.2.1.4. Esterilização a frio em sistema Millipore.....	53
4.3.3. Procedimentos para a preparação do meio de cultivo e demais soluções	53
4.3.3.1. Composição e preparo do meio de cultivo.....	54
4.3.3.2. Solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v).....	55
4.3.3.3. Solução de vitaminas.....	55
4.3.3.4. Solução traço de metais.....	56
4.3.3.5. Solução redutora de sulfeto de sódio	56
4.3.3.6. Solução indicadora de resazurina 0,1% (m/v).....	57
4.3.3.7. Solução de extrato de levedura 2%(m/v).....	57
4.3.3.8. Solução anaeróbia de diluição.....	57
4.3.4. Preparo das soluções estoques do substratos orgânicos.....	58
4.3.4.1. Solução estoque e soluções padrão de TCE em metanol.....	58
4.3.4.2. Soluções de referência de TCE para curva de calibração.....	59
4.4. Procedimento para determinação dos sólidos totais voláteis (STV)....	60
4.5. Procedimentos para ativação da metanogênese das amostras	61
4.5.1. Procedimento para ativação da metanogênese do lodo termófilo....	61
4.5.2. Procedimento para ativação da metanogênese do lodo mesófilo.....	63
4.6. Procedimentos para a avaliação quantitativa dos grupos microbianos anaeróbios metanogênicos e não metanogênicos.....	64
4.7. Procedimentos para os estudos sobre decaimento do TCE.....	67
4.7.1. Procedimentos para os estudos sobre o decaimento termofílico do TCE.....	68

4.7.2.Procedimentos para os estudos sobre o decaimento mesofílico do TCE.....	70
4.8.Procedimentos para as determinações cromatográficas	71
4.8.1.Procedimentos para a determinação cromatográfica do TCE.....	71
4.8.2.Procedimentos para a determinação cromatográfica do metano.....	73
4.8.3.Procedimentos para determinação cromatográfica de ácidos orgânicos voláteis (AOV).....	73
4.9.Procedimentos para os exames microscópicos.....	74
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.1.Amostras- coleta e caracterização microscópica.....	76
5.1.1.Lodo granulado termófilo.....	77
5.1.2.Sedimentos da Represa do Lobo.....	78
5.2.Cultivo para a ativação metonogênica das amostras.....	79
5.2.1. Lodo granulado termófilo.....	80
5.2.2. Sedimentos da Represa do Lobo.....	85
5.3.Avaliação quantitativo dos grupos microbianos enriquecido- método do NMP.....	91
5.3.1.Lodo granulado termófilo.....	91
5.3.2. Sedimentos da Represa do Lobo.....	105
5.4.Estudos sobre o decaimento anaeróbio do composto tricloroetileno (TCE).....	114
5.4.1. Decaimento do TCE pelo lodo termófilo (dois ensaios).....	118
5.4.1.1.Valores de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) do lodo termófilo.....	118
5.4.1.2.Produção de ácidos orgânicos e gás metano durante a degradação de TCE.....	119
5.4.2.Decaimento do TCE utilizando o lodo mesófilo.....	137
5.4.2.1.Produção de ácidos orgânicos e gás metano durante o decaimento do TCE.....	147
5.5.Análise das características morfológicas dos organismos presentes	

durante a biodegradação do TCE.....	151
5.5.1.Lodo granulado termófilo.....	151
5.5.2.Segmentos da represa do lobo.....	151
5.6.Avaliação quantitativa dos grupos anaeróbios termófilos e mesófilos em diferentes substratos orgânicos após os ensaios de degradação do TCE.....	154
6.CONCLUSÕES.....	168
ANEXO 1.....	171
ANEXO 2.....	172
ANEXO 3.....	173
ANEXO 4.....	177
ANEXO 5.....	179
ANEXO 6	180
ANEXO 7.....	181
ANEXO 8.....	188
ANEXO 9.....	192
ANEXO 10.....	196
ANEXO 11.....	203
ANEXO 12.....	205
ANEXO 13.....	207
ANEXO 14.....	209
ANEXO 15.....	210
ANEXO 16.....	211
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	213

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema que representa o fluxo de carbono durante a decomposição anaeróbia da matéria orgânica complexa a metano Fonte: MADIGAN et al. (1997).....	12
Figura 2.	Esquema da biotransformação do PCE a CO ₂ envolvendo desalogenação redutiva. Fonte: VOGUEL & McCARTY (1985)...	26
Figura 3.	Mapa com a localização da Represa do Lobo (Broa)-Itirapina/SP e da Usina São Martinho, Pradópolis/SP.....	37
Figura 4.	Reator de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo - UASB da Usina São Martinho, Município de Pradópolis, Estado de São Paulo.....	38
Figura 5.	Visão geral da Represa do Lobo a partir de um ponto do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada -EESC-USP, Município de Itirapina, Estado de São Paulo.....	39
Figura 6.	Esquema das etapas experimentais realizadas com o lodo termófilo na presente Dissertação de Mestrado.....	41
Figura 7.	Esquema das etapas experimentais realizadas com o lodo mesófilo na presente Dissertação de Mestrado.....	41
Figura 8.	Sistema de distribuição simultânea de gases do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP.....	42
Figura 9.	Microscópio Olympus, modelo BHT2, com video camera system Optronics – CCD.....	43
Figura 10.	Cromatógrafo a gás, para a determinação da composição concentração do metano (Gow-Mac).....	44
Figura 11.	Cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo CG, HP 6890, para análises dos ácidos orgânicos voláteis (AOV).....	45
Figura 12.	Visão das tomeiras no reator termofílico do UASB durante a coleta do lodo da Usina São Martinho.....	49
Figura 13.	Representação esquemática dos pontos da coleta dos sedimentos da Represa do Lobo.....	50
Figura 14.	Visão da coleta de sedimentos e da draga (Ekman) empregada na coleta de sedimentos.....	51

Figura 15.	Frascos reatores utilizados na ativação da metanogênese do lodo termófilo (A) e lodo mesófilo (B)	63
Figura 16.	Frascos reatores utilizados no decaimento do TCE: A - reatores sem o saco de pano preto; B – reatores coberto com os sacos pretos e C - reator de controle químico (abiótico).....	71
Figura 17.	Fotomicrografias apresentam a morfologia das células no lodo termófilo ativado em meio Zinder, com 2 dias de ativação(ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25)	84
Figura 18.	Fotomicrografias apresentam a morfologia das células no lodo mesófilo ativado em meio Zinder, com 15 dias de ativação (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	88
Figura 19.	Fotomicrografias apresentam a morfologia das células no lodo mesófilo ativado em meio Zinder, com 38 dias de ativação (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	90
Figura 20.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termofílo na fonte orgânica glicose 10 mmoles/L, (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	93
Figura 21.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termofílo na fonte energética hidrogênio e dióxido de carbono (80:20 % v/v), (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25). 94	94
Figura 22.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termofílo na fonte orgânica formiato de sódio 20 mmoles/L, (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	95
Figura 23.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termofílo na fonte orgânica lactato de sódio 20 mmoles/L e sulfato de sódio 10 mmoles/L, (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	96
Figura 24.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termofílo na fonte orgânica metanol 20 mmoles/L, (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	98
Figura 25.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termofílo na fonte orgânica acetato de sódio 20 mmoles/L e sulfato de sódio 10 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	99
Figura 26.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com	

	lodo termófilo na fonte orgânica propionato de sódio 20 mmoles/L e sulfato de sódio 10 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	100
Figura 27.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termófilo na fonte orgânica butirato de sódio 20 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	100
Figura 28.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termófilo sem adição de fonte energética, sob atmosfera gasosa de N ₂ /CO ₂ 70:30 % v/v (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	101
Figura 29.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termófilo na fonte orgânica glicerol 20 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	102
Figura 30.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termófilo na fonte orgânica acetato de sódio 20 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	103
Figura 31.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo termófilo na fonte orgânica propionato de sódio 20 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	104
Figura 32.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo mesófilo na fonte orgânica lactato de sódio 20 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	107
Figura 33.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo mesófilo na fonte orgânica acetato de sódio 20 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	109
Figura 34.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo mesófilo sem adição de fonte energética, sob atmosfera gasosa de N ₂ /CO ₂ 70:30 % v/v (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	111
Figura 35.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo mesófilo na fonte orgânica metanol 20 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	112
Figura 36.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo mesófilo na fonte orgânica formiato de sódio 20 mmoles/L (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	113
Figura 37.	Fotomicrografias de amostras das contagens de NNP com lodo mesófilo na fonte orgânica etanol 20 mmoles/L (ocular	

	10, objetiva 100 e zoom 1,25).....	114
Figura 38.	Rotas hipotéticas das metanogênicas e acetogênicas na desalogenação de PCE.....	116
Figura 39.	Decaimento da concentração de TCE nos reatores T_1 a T_5 (biótico) e T_8 e T_9 (abiótico) com o tempo.....	122
Figura 40.	Decaimento da concentração de TCE nos reatores T_{12} a T_{52} e T_{82}	124
Figura 41.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_6	126
Figura 42.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_7	126
Figura 43.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_1	127
Figura 44.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_2	127
Figura 45.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_3	128
Figura 46.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_4	128
Figura 47.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_5	128
Figura 48.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_{62}	134
Figura 49.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_{72}	134
Figura 50.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_{12}	135
Figura 51.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_{22}	135
Figura 52.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_{32}	135

Figura 53.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_{42}	136
Figura 54.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator T_{52}	136
Figura 55.	Remoção abiótica (M_8 e M_9) e biótica (M_1 ; M_2 ; M_3 ; M_4 e M_5) de TCE durante 48 dias, sob mesófilas ($T=25^{\circ}\text{ C}$).....	139
Figura 56.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator M_6	141
Figura 57.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator M_7	142
Figura 58.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator M_1	142
Figura 59.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator M_2	143
Figura 60.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator M_3	143
Figura 61.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator M_4	143
Figura 62.	Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/ L}$) no reator M_5	144
Figura 63.	Fotomicrografias das amostras do reator T_2 presentes durante a degradação termófila do TCE.....	152
Figura 64.	Fotomicrografias das amostras do reator M_4 presentes durante a degradação mesófila do TCE.....	153
Figura 65.	Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de glicose 10 mmoles/L, segundo NMP.....	155
Figura 66.	Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de H_2/CO_2 (80: 20% v/v) , segundo NMP.....	156
Figura 67.	Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de formiato de sódio 20 mmoles/L , segundo NMP.....	157
Figura 68.	Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de metanol 20 mmoles/L , segundo NMP.....	159

Figura 69. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de acetato de sódio 20 mmoles/L e sulfato de sódio 10 mmoles/L, segundo NMP.....	159
Figura 70. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de N ₂ /CO ₂ (70: 30% v/v), segundo NMP.....	160
Figura 71. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de lactato de sódio 20 mmoles/L, segundo NMP (mesófilo).....	162
Figura 72. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de N ₂ /CO ₂ (70: 30% v/v), segundo NMP (mesófilo).....	164
Figura 73. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de metanol 20 mmoles/L, segundo NMP (mesófilo).....	165
Figura 74. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de formiato de sódio 20 mmoles/L, segundo NMP (mesófilo).....	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Oxigênio e sua relação com os microrganismos.....	10
Tabela 2.	Alguns gêneros de microrganismos aeróbios que degradam compostos organoclorados	19
Tabela 3.	Reações de transformação anaeróbia de compostos alifáticos clorados: reações de substituição e redução.....	25
Tabela 4.	Alguns gêneros de microrganismos anaeróbios que degradam compostos organoclorados.....	35
Tabela 5.	Composição básica do meio Zinder.....	54
Tabela 6.	Composição da solução de vitaminas.....	55
Tabela 7.	Composição da solução traço de metais.....	56
Tabela 8.	Concentração final e volume das soluções usados na ativação metanogênica do lodo termófilo T	62
Tabela 9.	Concentração e volume das soluções usados na ativação metanogênica do lodo mesofílico B.....	64
Tabela 10.	Concentração das soluções usadas nos testes de decaimento do TCE sob condições termofílicas.....	69
Tabela 11.	Concentração das soluções usadas nos testes de decaimento do TCE sob condições mesofílicas.....	70
Tabela 12.	Valores de metano ao longo do ensaio de enriquecimento do lodo termófilo	81
Tabela 13.	Valores de metano ao longo do ensaio de enriquecimento do lodo mesófilo.....	86
Tabela 14.	Valores estimados de NNP/mL do lodo termófilo enriquecido...	92
Tabela 15.	Valores estimados de NNP/mL do lodo mesófilo ativado sob condições metanogênicas.....	106
Tabela 16.	Valores das percentagens das áreas de metano nos reatores utilizados na biodegradação do TCE.....	129

Tabela 17. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) (reatores T ₈ e T ₉).....	131
Tabela 18. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T ₁	131
Tabela 19. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T ₂	131
Tabela 20. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T ₃	131
Tabela 21. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T ₄	132
Tabela 22. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T ₅	132
Tabela 23. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T ₆	133
Tabela 24. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T ₇	133
Tabela 25. Valores das percentagens das áreas de metano nos reatores utilizados na biodegradação do TCE - segundo ensaio.....	137
Tabela 26. Valores das percentagens das áreas de metano nos reatores utilizados na biodegradação do TCE- lodo mesófilo	145
Tabela 27. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) (reator M ₈).....	147
Tabela 28. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) (reator M ₉).....	147
Tabela 29. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M ₆	148
Tabela 30. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M ₇	148
Tabela 31. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M ₁	149
Tabela 32. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M ₂	149

Tabela 33. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M ₃	149
Tabela 34. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M ₄	150
Tabela 35. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M ₅	150
Tabela 36. Valores estimados de NNP/mL do lodo termófilo enriquecido, segunda contagem	155
Tabela 37. Valores estimados de NNP/mL do lodo mesófilo enriquecido, segunda contagem	161

RESUMO

Este trabalho de mestrado descreve o estudo da capacidade de degradação de tricloroetileno (TCE) pela atividade de dois lodos biológicos, sob condições anaeróbia estritas e de temperaturas termofílica e mesofílica.

No primeiro estudo, empregou-se um lodo granulado anaeróbio oriundo de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) operado sob condições termofílicas (55 ± 2 °C) para o tratamento de vinhaça. Após amostragem e ativação metanogênica desse lodo, procedeu-se uma contagem do Número Mais Provável (NMP) do consórcio microbiano nas seguintes fontes de carbono: glicose, formiato de sódio, lactato de sódio/sulfato de sódio, metanol, acetato de sódio/sulfato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio, H_2/CO_2 , glicerol, propionato de sódio e acetato de sódio, sob atmosfera de N_2/CO_2 . A maior concentração celular encontrada foi de $1,6 \times 10^9$ células de NMP/mL na solução de glicose 10 mmoles/L. Para as metanogênicas, o melhor crescimento celular foi na fonte de carbono H_2/CO_2 10% v/v com concentração celular de $3,9 \times 10^7$ células de NMP/mL. Foram identificadas alguns gêneros como as *Methanobacterium sp*, *Methanosarcinas sp*, *Methanococcus sp* e *Methanosaeta sp*. Ademais, foram também observados bacilos do gênero *Desulfotomaculum sp* e *Desulfobacter sp*. Foram então realizados estudos de degradação de TCE (5mg TCE/g de STV), empregando-se esse inóculo termófilo em meio Zinder acrescido das fontes de carbono seguintes: acetato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio, glicose, lactato de sódio, sulfato de sódio, metanol e levedura em nove frascos reatores, sob agitação de 150 rpm e a 55 ± 2 °C. A biodegradação desse organoclorado foi feita monitorando-se a concentração de metano no "headspace" e a concentração de TCE remanescente no meio reacional, por cromatografia gasosa, durante 34 dias. Nesse período houve uma degradação abiótica e biótica de TCE de 30% e 85%, mostrando assim a habilidade do lodo termófilo em biodegradar esse solvente organoclorado. Uma segunda contagem de NMP feita após a degradação de TCE, confirmou maior concentração de células para a fonte glicose de $2,6 \times 10^7$ células de NMP/mL e para as metanogênicas uma contagem de $6,8 \times 10^6$ células de

NMP/mL na fonte H_2/CO_2 . Nessa segunda contagem houve um predomínio de bacilos do gênero *Methanobacterium sp.* Observou-se uma redução de *Methanosarcina sp.*

[No segundo estudo, foi empregado um sedimento mesófilo da Represa do Lobo (Broa), que após coleta e ativação metanogênica, efetuou-se contagem do NMP do consórcio microbiano com as fontes orgânicas seguintes: formiato de sódio, lactato de sódio, metanol, acetato de sódio e etanol sob atmosfera de N_2/CO_2 . A maior concentração celular encontrada foi de $4,5 \times 10^7$ células de NMP/mL na solução de lactato de sódio 20 mmoles/L. Para as metanogênicas, o melhor crescimento celular foi obtido em formiato de sódio 20 mmoles/L sendo obtido concentração $5,6 \times 10^3$ células de NMP/mL. Foram identificados alguns gêneros como as *Metanobacterium sp.*, *Methanosarcinas sp* e *Methanosaeta sp.* Observaram-se bacilos do gênero *Desulfovibrio sp* e *Desulfobulbus sp.* No estudo da degradação de TCE foi empregado uma concentração de 5mg TCE/g de STV, esse sedimento mesófilo em meio Zinder acrescido das fontes de carbono seguintes: acetato de sódio, butirato de sódio, lactato de sódio, formiato de sódio, metanol e etanol em nove frascos reatores, sob agitação de 200 rpm e a 25 ± 2 °C. A biodegradação desse organoclorado foi feita monitorando-se a concentração de metano no "headspace" e a concentração de TCE remanescente no meio reacional, por cromatografia gasosa, durante 48 dias. Nesse período houve uma degradação abiótica e biótica de TCE de 23% e 79%, respectivamente, mostrando assim a habilidade do lodo mesófilo em biodegradar esse solvente organoclorado. Após essa degradação, fez-se uma segunda contagem de NMP encontrando-se uma concentração de $3,0 \times 10^7$ células de NMP/mL em lactato de sódio 20 mmoles/L e para as metanogênicas uma contagem de $1,1 \times 10^6$ células de NMP/mL foi observado na mesma fonte de carbono. Foi observado nessa segunda contagem um predomínio de *Methanosarcina sp* e *Methanobacterium sp* e na fluorescência observou-se um aumento da diversidade de microrganismos.

ABSTRACT

This MSc Thesis work describes the study of the capacity of trichloroethylene (TCE) degradation by the activity of two biological sludges, under strict anaerobic conditions at thermophilic and mesophilic temperatures.

In the first study, it was used an anaerobic granular sludge from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) operated under thermophilic conditions (55 ± 2 °C) for the vinasse treatment. After sampling and methanogenic activation of this sludge, the consortium of methanogenic cultures was enumerated using the Most Probable Number (NMP) in the following sources of carbon: glucose, sodium formiate, sodium lactate/sodium sulfate, methanol, sodium acetate/sodium sulfate, sodium propionate, sodium butyrate, H_2/CO_2 , glycerol, sodium propionate and sodium acetate, under atmosphere of N_2/CO_2 . The largest cellular concentration of 1.6×10^9 cells of NMP/mL was found in the 10 mmoles/L glucose solution. For the methanogenics, the best cellular growth was in 10% v/v H_2/CO_2 with cellular concentration of 3.9×10^7 cells of NMP/mL. It was identified some genus such as the *Methanobacterium sp*, *Methanosarcinas sp*, *Methanococcus sp* and *Methanosaeta sp*. In addition, it was also observed members of some genera such as *Desulfotomaculum sp* and *Desulfobacter sp*. Then, the TCE degradation studies (5mg TCE/g of STV) were carried out using the thermophilic sludge in the Zinder's mineral medium with the following carbon sources such as sodium acetate, sodium propionate, sodium butyrate, glucose, sodium lactate, sodium sulfate, methanol and yeast in nine flask-reactors, under 150 rpm and 55 ± 2 °C. The biodegradation of this chlorinated compound was made by monitoring methane concentration in the headspace and TCE remaining concentration in the reactional medium, using gas chromatography, for 34 days. In this period, there were 30% and 85% of abiotic and biotic TCE degradation, respectively, showing thus the ability of this thermophilic sludge to biodegrade this chlorinated solvent. A second

NMP enumeration done after the TCE degradation, confirmed a larger cells concentration for the glucose source of 2.6×10^7 cells of NMP/mL and for the methanogenic enumeration a 6.8×10^6 cells of NMP/mL in the H_2/CO_2 source. In this second enumeration there was rod *Methanobacterium* sp predominancy. A decrease of *Methanosarcina* sp was observed.

In the second study, a Represa do Lobo (Broa) mesophilic sediment was used, which after collection and methanogenic activation, the NMP enumeration of the microbial consortium was made with the following organic sources: sodium formiate, sodium lactate, methanol, sodium acetate and ethanol under atmosphere of N_2/CO_2 . The largest cells concentration of 4.5×10^7 cells of NMP/mL was found in the 20 mmoles/L sodium lactate solution. For the methanogenics, the best cellular growth of 5.6×10^3 cells of NMP/mL was obtained in 20 mmoles/L sodium formiate solution. It was identified some genus such as *Metanobacterium* sp, *Methanosarcinas* sp and *Methanosaeta* sp. Rods of the *Desulfovibrio* sp and *Desulfobulbus* sp genus were also observed. In the study of the TCE degradation it was employed a concentration of 5mg TCE/g of STV, this mesophilic sediment in the Zinder's medium with the following carbon sources: sodium acetate, sodium butyrate, sodium lactate, sodium formiate, methanol and ethanol in nine flask-reactors, under 200 rpm and for 25 ± 2 °C. The biodegradation of this chlorinated substance was made monitoring the methane concentration in the headspace and the remaining TCE concentration in the medium, using gas chromatography, for 48 days. In this period there were an abiotic and biotic TCE degradation of 23% and 79%, respectively, showing the ability of the mesophilic sludge to biodegrade this chlorinate solvent. After this degradation, a second NMP enumeration was carried out and a concentration of 3.0×10^7 cells of NMP/mL in 20 mmoles/L sodium lactate was found; and for the methanogenics a cells concentration of 1.1×10^6 cells of NMP/mL was observed in the same carbon source. It was observed in this second NMP enumeration a prevalence of *Methanosarcina* sp and *Methanobacterium* sp and in the fluorescence it was observed an increase of the microorganisms diversity.

1.INTRODUÇÃO

De todas as intervenções humanas na ordem natural dos ecossistemas, nenhuma está se acelerando de forma tão alarmante como a geração de compostos químicos no ambiente. Na década de 50, os Estados Unidos da América produziram cerca de mil novos compostos químicos ao ano (ODUM, 1988). Em 1987, aproximadamente 70 mil substâncias químicas estavam disponíveis, muitas delas representando um benefício inegável para a humanidade. Entretanto, não existe um estudo preciso sobre os efeitos tóxicos que 79% desses resíduos, como detritos tóxicos, produtos químicos industriais, agrotóxicos, lixo nuclear entre outros, podem causar à saúde humana (CORSON, 1996).

Um volume crescente de resíduos tóxicos, que a cada ano é lançado no ambiente, pode ser transportado por centenas ou milhares de quilômetros contaminando águas superficiais, subterrâneas e aquíferos profundos, utilizados no abastecimento de cidades, indústrias e agricultura, e seus efeitos danosos podem ser sentidos muitas vezes durante décadas após sua exposição, aumentando assim a necessidade de desenvolver novas técnicas e/ou processos de tratamento destes resíduos (ODUM, 1988).

A descarga desses resíduos tóxicos sem critério tem causado poluição do ar, do solo, de águas superficiais e águas subterrâneas, fazendo com que muitos ambientes ultrapassem sua capacidade de suporte. Surge então, a necessidade urgente para o desenvolvimento de novos métodos de redução da toxicidade dos resíduos, bem como de sua quantidade, que devem estar combinados a uma mudança drástica do comportamento da população humana (consumidores e empresários). Em direção ao desenvolvimento sustentável, busca-se uma indústria com interesse na

redução de gastos com matéria prima e energia, processos que mitigarão os custos da degradação ambiental.

Desde a emergência e o desenvolvimento da Biotecnologia Ambiental, alguns novos caminhos têm sido explorados pela sociedade e pela indústria. Os processos biológicos utilizando microrganismos que como consequência da evolução dos sistemas enzimáticos possuem a notável habilidade de degradar compostos naturais ou sintéticos sendo responsáveis pela maior parte dos tratamentos de efluentes industriais. Esses processos possuem um custo relativamente baixo em relação aos processos físico-químicos que podem, ainda, gerar produtos recalcitrantes ou tóxicos (VAZOLLER, 1995a).

A utilização de microrganismos na degradação de resíduos tóxicos tem se mostrado bastante eficiente, e é consequência da evolução dos sistemas enzimáticos de células procariontes e eucariontes, as quais vêm coexistindo umas com as outras durante bilhões de anos. Esta resposta do metabolismo de certos microrganismos, sem dúvida, confere algumas vantagens adicionais às células microbianas, tais como: a exploração de novos nichos ecológicos e fontes energéticas. O tratamento de compostos orgânicos poluentes emprega a ação conjunta de espécies diferentes de microrganismos, em biorreatores, que tem como principal produto a despoluição ambiental (VAZOLLER, 1995a).

Os microrganismos são encontrados na natureza em praticamente todos os ambientes (e.g. ar, águas superficiais e subterrâneas, solo, mar, corpo humano, etc). Podem ocorrer em abundância onde encontram nutrientes, umidade e temperatura adequada para o seu crescimento e multiplicação (PELCZAR et al., 1993). Em geral, os microrganismos existem como populações e/ou comunidades que interagem, e suas atividades podem afetar as propriedades químicas e físicas de seus habitats (MADIGAN et al., 1997).

O tricloroetileno (TCE) e vários organoclorados alifáticos, bem como um grande número de hidrocarbonetos aromáticos são amplamente usados como solventes e desengraxantes de máquinas em diversos processos industriais (WACKETT et al., 1989 e NELSON et al., 1986). Em 1985, foi

registrado que algumas indústrias dos Estados Unidos da América usaram aproximadamente 90 mil toneladas de TCE. A combinação entre um amplo e indiscriminado emprego de TCE com técnicas inadequadas de uso tem resultado na contaminação de águas subterrâneas, trazendo como consequência a classificação desse produto, pela USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América), como um dos principais contaminantes de águas subterrâneas da América do Norte (STRANDBERG et al., 1989; PHELPS et al., 1990). Segundo McCULLOCH & MIDGLEY (1996) a emissão global de tricloroetileno durante o ano de 1992 foi de 197.000 ton.

A degradação microbiana do TCE, bem como de sub-produtos de sua biotransformação (cloreto de vinila), pode levar a completa mineralização desse composto, a redução e/ou eliminação de sua toxicidade, essa última relacionada a um potencial carcinogênico e mutagênico em mamíferos (NELSON et al., 1987; FLIERMANS et al., 1988). A vantagem do uso de microrganismos para degradar poluentes tóxicos ou não está no baixo custo e alta eficiência dos sistemas biológicos de tratamento. Além disso, alguns processos biológicos, como os anaeróbios, podem gerar energia (gás metano), durante a estabilização de compostos orgânicos (LARIZZATTI, 1997).

No Brasil, os processos biológicos anaeróbios metanogênicos de tratamento de resíduos têm grande importância tanto para a estabilização da matéria orgânica poluente de origem doméstica, como a de origem industrial, cujos os rejeitos podem conter diferentes compostos recalcitrantes (LARIZZATTI, 1997). Portanto, a avaliação do potencial de lodos biológicos anaeróbios, oriundos de diferentes fontes, na degradação de compostos organohalogenados pode orientar possíveis fontes de inóculos para sistemas de tratamento de águas residuárias e resíduos sólidos contendo substâncias tóxicas.

A presente proposta de estudo visa verificar a atividade microbiana anaeróbia na degradação do composto TCE, através da avaliação de dois lodos biológicos, a saber: lodo granulado do biodigestor anaeróbio termofílico de fluxo ascendente e manta de lodo utilizado para o tratamento

de vinhaça da Usina São Martinho, Pradópolis/SP e o sedimento da Represa do Lobo (Broa)-Itirapina/SP. Os lodos foram cultivados sob condições de metanogênese em meio de cultura mineral contendo TCE, através de procedimentos para o enriquecimento de culturas bacterianas hábeis na degradação do composto alvo. A atividade das culturas foi acompanhada por análises cromatográficas (cromatografia gasosa) para determinação da remoção do composto no meio cultivado, de ácidos orgânicos e de gás metano. Amostras dos sistemas enriquecidos foram examinadas através de microscopia de luz comum, fluorescência e contraste de fase, a fim de constatar morfologias de bactérias predominantes nos lodos estudados. Determinações quantitativas pelo método do Número Mais Provável (NMP) também foram realizadas com o intuito de avaliar as populações metanogênicas e não metanogênicas presentes nas amostras em estudo.

O trabalho de pesquisa realizado procurou também, em última análise, colaborar com as pesquisas sobre diversidade microbiana em ecossistemas anaeróbios tropicais e em biofilmes anaeróbios, que vêm sendo empreendidas no Laboratório de Processos Biológicos, Área de Microbiologia do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (LPB SHS EESC-USP).

2.OBJETIVOS

- Avaliar a capacidade de degradação do TCE pela atividade dos lodos biológicos, sob condições estritas de anaerobiose e de temperaturas termofílica e mesofílica, respectivamente, por meio de análises cromatográficas do composto organoclorado degradado e da formação de produtos (biogás).
- Verificar e quantificar os tipos morfológicos de microrganismos predominantes, metanogênicos e não metanogênicos, dos lodos termofílico e mesofílico, anterior à adição do TCE e ao final do processo de degradação desse composto.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Com a crescente preocupação dos impactos da atividade humana sobre os recursos naturais da Terra, foi criada, em 1983, através da Assembléia Geral das Nações Unidas, a Comissão Mundial sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (CMMAD). Em seu primeiro relatório (1987) foram registrados resultados positivos, tais como, aumento da expectativa de vida e da produção de alimentos, progressos científicos e tecnológicos, bem como os negativos, como o aumento da erosão dos solos, desaparecimento de florestas, introdução de substâncias tóxicas pelas indústrias e agricultura nas cadeias alimentares e nos aquíferos usados para o abastecimento de água. O relatório concluiu que tais mudanças estavam ultrapassando os "limites" de sustentabilidade dos recursos naturais (CORSON, 1996). No Brasil, o controle sobre os problemas relacionados com os impactos ambientais ainda é insuficiente. Segundo a CETESB, das 820 mil toneladas de resíduos tóxicos produzidos no país por ano, 376 mil toneladas são geradas somente na região metropolitana de São Paulo (NOGUEIRA & JARDIM, 1998). Estima-se que 92% de todo o esgoto gerado no Brasil são lançados *in natura* nos ecossistemas aquáticos, que possuem funções ambientais de indiscutível valor (VAZOLLER, 1995a).

Visando a recuperação e manutenção dos ecossistemas poluídos pela presença de matéria orgânica residual tóxica e não tóxica, tem-se empregado os processos biológicos de tratamento de resíduos ou biotratamento, pelos quais os poluentes são estabilizados e/ou mineralizados em biorreatores. Outra prática mais recente é a remediação biológica ou biorremediação, que propõe a recuperação pelo tratamento de ambientes degradados *in situ*, especialmente aqueles que possuem uma

grande quantidade de poluentes tóxicos (FATHEPURE & VOGUEL, 1991 e VAZOLLER, 1995a).

Microrganismos desempenham um papel fundamental em todos estes processos, devido à sua habilidade em degradar diferentes compostos químicos. Essa habilidade é consequência da evolução dos sistemas enzimáticos que durante bilhões de anos vem coexistindo com substâncias, algumas tóxicas e recalcitrantes, geradas pelas atividades antropogênicas (FATHEPURE & VOGUEL, 1991).

Os microrganismos são encontrados em vários ambientes aquáticos e terrestres, bem como no ar, algumas vezes vivendo sob condições bastante adversas. Esses seres vivos habitam o Planeta há pelo menos 3,6 bilhões de anos (MADIGAN et al., 1997). A diversidade de vida é verdadeiramente surpreendente, embora todos os organismos tenham um processo comum de se perpetuarem, através da replicação de seu material genético (UCMP Phylogeny Wing: The Phylogeny of Life, 1999).

Para que os microrganismos cresçam em ambientes naturais e/ou em laboratório, há necessidade da disponibilidade de fontes nutricionais e condições físico-químicas adequadas, como temperatura, pH, disponibilidade de água, luz, entre outros. O habitat de um organismo é o lugar onde ele vive, sendo que esse habitat define um nicho para cada microrganismo em particular. Aquele nicho onde o microrganismo estiver mais adaptado, é conhecido como "nicho principal". Incontáveis nichos existem na Terra e são em parte responsáveis pela biodiversidade e diversidade metabólica dos microrganismos que conhecemos hoje (ODUM, 1988).

O termo microambiente é usado para descrever o habitat de microrganismos em pequenos espaços. Por exemplo, em uma partícula de solo de 3 mm de diâmetro pode-se encontrar diferentes microambientes e/ou nichos, onde a distribuição de nutrientes e oxigênio, bem como as condições físico-químicas podem sofrer alterações instantâneas em termos de espaço e tempo. Assim pode-se dizer que os microambientes são bastante heterogêneos e com alta diversidade microbiológica (MADIGAN et al., 1997).

A alta diversidade microbiológica e metabólica pode ser considerada como um evento significativo e amplo da Biosfera, e de grande importância na renovação dos elementos químicos através de vias circulares que são os ciclos biogeoquímicos, particularmente o ciclo do carbono, o ciclo do nitrogênio, o ciclo do fósforo e o ciclo do enxofre. Dos mais de 90 elementos conhecidos na natureza, sabe-se que mais de 30 são necessários aos organismos vivos (ODUM, 1988).

As células podem obter os elementos que necessitam diretamente da natureza ou por intermédio da biossíntese, transformá-los em moléculas menores. Os elementos principais que formam as macromoléculas e/ou moléculas orgânicas de menor massa molar são o carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio. Outros elementos menos abundantes podem participar do metabolismo das células como o fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio, cobalto e outros elementos. Os nutrientes estão divididos em duas classes: os macronutrientes (e.g. carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, sódio e ferro) que são requerido pelas células em larga quantidades e os micronutrientes (ou elementos traços como os metais), que são requeridos em pequenas quantidades, mas que se ausente podem comprometer as funções celulares (e.g. estruturas de enzimas que catalisam biotransformações celulares). Ainda outros micronutrientes como as vitaminas, amino ácidos, purinas e pirimidinas, são requeridos em pouca quantidade, mas são necessários como fator de crescimento celular (BITTON, 1994; MADIGAN et al., 1997)..

Os microrganismos participam da degradação de compostos antropogênicos que são lançados no ambiente e que tanto dano tem causado ao mesmo. Muitos estudos têm sido realizados no sentido de determinar se microrganismos podem ou não degradar compostos organohalogenados (BITTON, 1994).

Os compostos organoclorados sintetizados pelo homem representam os principais poluentes ambientais, devido a sua grande utilização, introdução no meio ambiente em grandes quantidades e também seu

caracter recalcitrante, podendo alguns ficarem no ambiente por mais de cinquenta anos (MADIGAN et al., 1997).

O tricloroetileno é um dos contaminantes organoclorados mais comuns em águas subterrâneas e superficiais. Descrito pela ENVIRONMENTAL HEALTH CENTER (EHC) em 1997 como um líquido incolor que a temperatura ambiente possui um odor doce similar ao do éter ou clorofórmio. Não ocorrendo naturalmente no ambiente, pertence a uma grande lista de poluentes sintéticos. Além do seu amplo uso como solvente e removedor de graxas, particularmente usado pela indústria de metais e automobilística, pode ser encontrado em alguns produtos de uso doméstico, como removedores de tinta e/ou adesivos e produtos para limpeza de tapetes. Ainda pode ser usado como anestésico em cirurgias. Devido ao seu uso freqüente e estocagem inadequada, o TCE vem sendo encontrado na maioria dos ambientes poluídos. Em virtude de sua alta solubilidade em água (1,1 g/L), esse solvente tem alta mobilidade no solo e também em aquíferos, infiltrando-se até em águas subterrâneas (FATHEPURE & BOYD, 1988a e MALACHOWSKY et al., 1994).

O TCE pode ser classificado como cancerígeno, segundo o National Institute for Occupational Safety and Health dos Estados Unidos da América (DREISBACH, 1977). Diversas pessoas tem inalado TCE por causa de seus efeitos narcóticos. A exposição a quantidades moderadas pode causar dores de cabeça, vertigem, distúrbios visuais e tremores. A exposição à grande quantidades pode causar tontura ou sonolência, e quando inalado em grandes quantidades pode causar morte. O LD₅₀ desse composto em ratos é de 4,97 mL/kg e o valor limite de tolerância (TLV) é de 100 ppm, sendo que para indivíduos adultos a dose fatal para ingestão é de aproximadamente 5 mL. Existem registros sobre danos à órgãos vitais humanos, como o fígado, rins, entre outros. Constituem grupos de risco pessoas que vivem próximas às indústrias e/ou trabalham em indústrias que utilizam o tricloroetileno como desengraxante, bem como os que o acondicionam inadequadamente e/ou lançam seus resíduos em águas que são usadas para abastecer as cidades (DREISBACH, 1977).

3.1 Metabolismo de microrganismos na natureza

Em Microbiologia, “crescimento” é definido como o aumento de células. Como as células microbianas têm um tempo de vida relativamente curto, o crescimento contínuo de uma espécie é a forma de manter sua presença no espaço conquistado. Os fatores ambientais que podem influenciar o crescimento de microrganismos são a temperatura, o pH, a qualidade da água e o oxigênio. Os microrganismos podem ser divididos em grupos em função da necessidade e tolerância à concentração de oxigênio, conforme apresentado na Tabela 1 (MADIGAN et al., 1997).

Tabela 1. Oxigênio e sua relação com os microrganismos

Grupos	Necessidade de O ₂	Tipos de Metabolismo	Habitats	Exemplos
Aeróbios				
Obrigatórios	sim	Respiração	pele, poeira	<i>Micrococcus luteus</i>
Facultativos	não; porém, crescem melhor com O ₂	Respiração aeróbia e anaeróbia, fermentação	intestino grosso de mamíferos	<i>Escherichia coli</i>
Microaerófilos	sim, em níveis inferiores ao do ar	Respiração	água de lagos	<i>Spirillum volutans</i>
Anaeróbios				
Aerotolerantes	não; não crescem com O ₂	Respiração anaeróbia	trato respiratório	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Obrigatórios	O ₂ é letal	Respiração anaeróbia, fermentação	Biotratamento de esgotos, sedimentos de lagos	<i>Methanobacterium formicicum</i>

Fonte: adaptado de MADIGAN et al. (1997).

Os microrganismos aeróbios utilizam o oxigênio na respiração - aeróbia, como o receptor final de elétrons. Os anaeróbios, por sua vez, são aqueles no qual o processo respiratório possui diferentes tipos de receptores finais de elétrons (sulfato, nitrato, dióxido de carbono, entre outros), mas não o oxigênio, e podem realizar metabolismo fermentativo. Esses se dividem em dois grupos menores, a saber: os aerotolerantes que vivem e crescem na presença de oxigênio, mas não o utiliza em seu metabolismo e os obrigatórios que morrem na presença de oxigênio. A morte pode estar relacionada com a capacidade de se intoxicar na presença de

alguns produtos do metabolismo do oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion peróxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-). Diversos microrganismos anaeróbios obrigatórios possuem uma grande quantidade de flavina que podem reagir espontaneamente com os produtos do metabolismo do oxigênio, levando a intoxicação desses. Isto não ocorre com os microrganismos aeróbios, uma vez que esses possuem enzima(s) que decompõe(m) os produtos tóxicos das reações com o oxigênio (MADIGAN et al., 1997).

Os microrganismos anaeróbios não são tão raros como parecem, pois há ambientes anóxicos em todos os lugares do planeta Terra, como sedimentos de lagos, rios e oceanos; lama; pântanos; brejos; solos alagados; alimentos enlatados; trato intestinal de alguns animais; sistema de tratamento de esgoto e na cavidade bucal ao redor dos dentes (PELCZAR et al., 1993).

Os microrganismos anaeróbios atuam, em sua maioria, em conjunto. A biodegradação anaeróbia de compostos poliméricos complexos, por exemplo, a celulose, ou mais simples (açúcares e aminoácidos) à dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4) envolve a interação cooperativa de vários grupos de microrganismos procariontes. Em diversos ambientes anóxicos os precursores imediatos de metano (CH_4) são o H_2 e o CO_2 , substratos esses produzidos em atividades fermentativas anaeróbias, bem como durante a respiração anaeróbia de alguns compostos. A Figura 1 apresenta um esquema da decomposição anaeróbia da matéria orgânica complexa, envolvendo cinco grupos principais de microrganismos anaeróbios (MADIGAN et al, 1997).

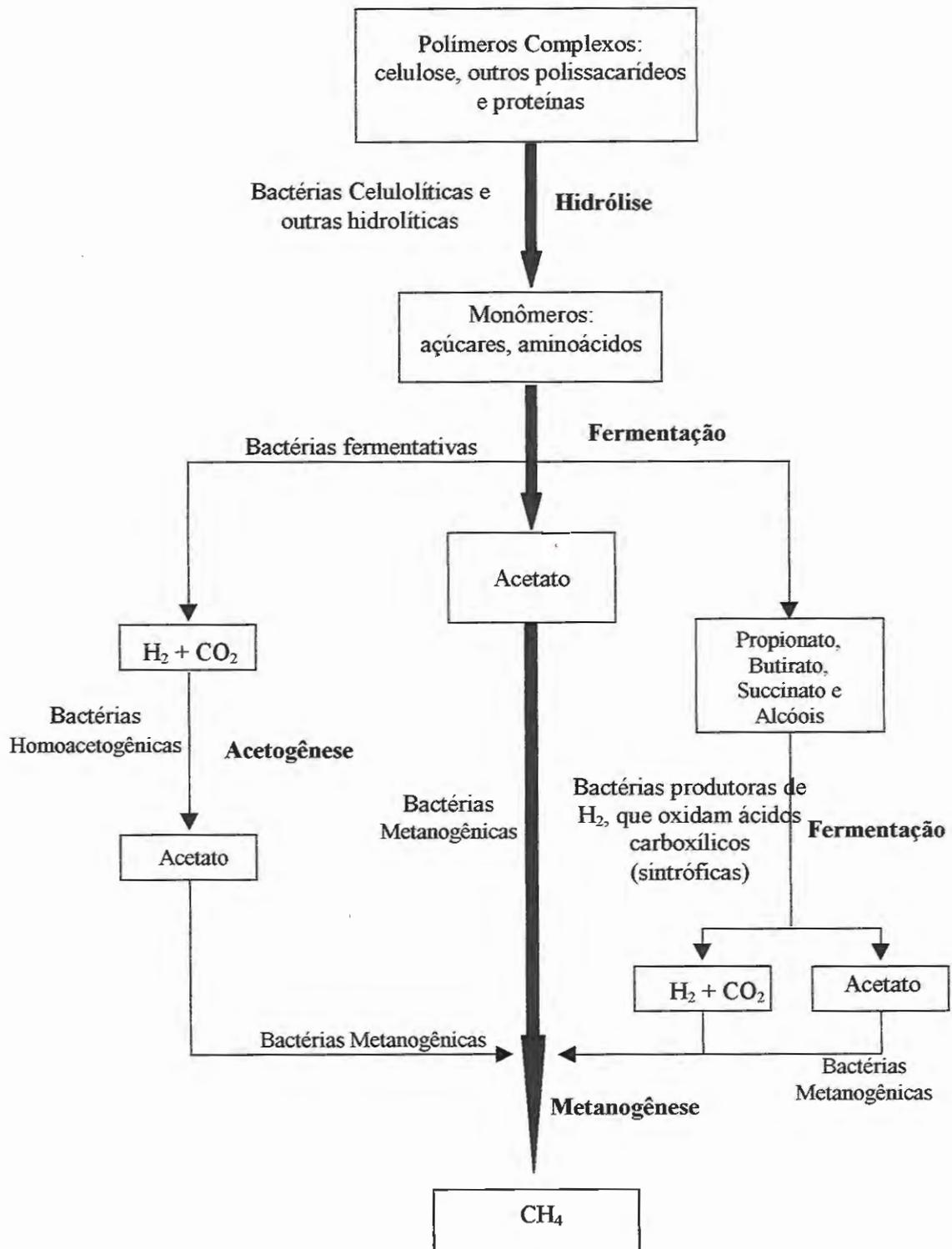


Figura 1. Esquema que representa o fluxo de carbono durante a decomposição anaeróbica da matéria orgânica complexa a metano.

Fonte: MADIGAN et al. (1997).

Assim, os microrganismos celulolíticos clivam por hidrólise os polímeros de alto peso molecular (e.g. celulose), em dímeros (e.g. celobiose = glicose + glicose) e/ou monômeros (e.g. glicose), que são fermentados (bactérias fermentativas) à uma variedade de produtos de fermentação (e.g. acetato, propionato, butirato, succinato, álcool, H₂ e CO₂). Qualquer teor de H₂ produzido nessa primeira fermentação é imediatamente consumido (sintrofismo) pelas bactérias homoacetogênicas, arqueas metanogênicas e/ou bactérias redutoras de sulfato (não mostradas no esquema). O produto dos metabolismos redutivos são o gás metano e o dióxido de carbono, bem como o ácido acético. Ademais, o ácido acético pode ser convertido diretamente a metano por arqueas metanogênicas e os ácidos propiônico, butírico, succínico e alguns álcoois (etanol, propanol, etc.) a H₂ e CO₂ ou ao ácido acético por bactérias produtoras de H₂ que oxidam ácidos carboxílicos e álcoois (MADIGAN et al., 1997).

3.2. Biotransformação de compostos resistentes com ênfase no tricloroetileno

Durante as últimas décadas, muitos compostos orgânicos recalcitrantes e não naturais (xenobióticos), têm sido introduzidos no ambiente. Esses compostos (e.g. organoclorados, pesticidas, inseticidas, fungicidas, solventes orgânicos, compostos poliaromáticos e outros), podem causar danos incalculáveis ao ambiente bem como à saúde humana (CORSON, 1996).

A Biotecnologia Ambiental se insere com sucesso na tentativa de recuperar o ambiente, através do trabalho de pesquisa, ao desenvolver novas tecnologias de reatores e novos processos que têm como objetivo final a recuperação de ecossistemas aquáticos e terrestres (VAZOLLER, 1995a).

Segundo BITTON (1994), a biotransformação é a alteração de compostos orgânicos pela ação de microrganismos, muitas vezes pela

atuação de consórcios microbianos, podendo resultar na mineralização, acumulação ou polimerização desses compostos.

A adaptação dos organismos em degradar um determinado composto ocorre de duas maneiras, a adaptação bioquímica em que o composto é reconhecido como alimento e a adaptação genética, em que o composto não é reconhecido e uma alteração no código genético se faz necessária para que as enzimas atuem no novo substrato (LARIZZATTI, 1997).

Os microorganismos podem biotransformar os compostos organohalogenados com sucesso incluindo mecanismos de remoção do halogênio, quebra do esqueleto de carbono (compostos aromáticos ou alifáticos). Segundo WACKETT (1995) as transformações principais incluem: a) metabolismo pela via bioquímica principal, b) uso de organohalogenado como receptor final de elétrons para formar ATP por meio de transferência de elétrons e c) via co-metabolismo.

O processo co-metabólico, também chamado de reação “gratuita”, ocorre segundo ATLAS & BARTHA apud MONTENEGRO (1999) quando um composto é transformado por um microrganismo, ainda que o organismo seja incapaz de crescer com este composto e não obter energia, carbono ou qualquer outro nutriente da transformação. Este metabolismo ocorre entre as bactérias que expressam ampla especificidade de enzimas catabólicas podendo transformar organo-halogenados sem uma ligação direta com o seu metabolismo energético ou do carbono. Estas reações são executadas de forma não específica, como definido por HOLLIGER & SCHUMACHER (1994), numa reação de desvio por certos sistemas enzimáticos.

O co-metabolismo pode ser importante para a remoção do tóxico ambiental, uma vez que através deste metabolismo, a ligação carbono-halogênio é quebrada. Os produtos metabólicos do co-metabolismo podem ser tanto resistentes a futuras biotransformações, como transformados por outras reações co-metabólicas ou utilizados por outro microrganismo como substrato gerador de carbono e/ou energia. Tem sido demonstrado como um metabolismo presente em culturas de consórcios microbianos hábeis em degradar uma grande quantidade de xenobióticos, e bastante comum

(BITTON, 1994; LARIZZATTI, 1997; OLIVEIRA, 1998; MONTENEGRO, 1999).

Por ser muito importante o entendimento do mecanismo gerador de energia nos processos co-metabólicos, este tem sido objeto de vários estudos envolvendo a desalogenação redutiva. Muitos exemplos de desalogenação redutiva são definidos como mecanismos co-metabólicos, por não servirem como fonte de carbono e energia aos microrganismos envolvidos. Este fato é descrito, freqüentemente, em processos aeróbios, cujos compostos orgânicos halogenados não servem como aceptores finais de elétrons. A desalogenação redutiva envolve a remoção de um halogênio por reações de oxi-redução. Os microrganismos devem ser capazes de quebrar a ligação carbono-halogênio e substituir este halogênio por um hidrogênio. Essa é uma reação característica do metabolismo anaeróbio, e envolve, principalmente, organismos metanogênicos e enzimas específicas (PEREIRA, 1993; BITTON, 1994 e LARIZZATTI, 1997).

Muitos pesquisadores têm isolado e identificado culturas puras de aeróbios e anaeróbios ou consórcio de microrganismos que são capazes de degradar parcialmente ou totalmente muitos compostos recalcitrantes, entre eles o tricloroetileno. Mais recentemente, os esforços têm sido na direção de entender a genética da biodegradação com ênfase no estudo de plasmídios, cujo código pode levar a degradação de compostos xenobióticos e a criação de linhagens geneticamente modificadas (GMOs) para serem usadas em biorremediação. (VAN DER MEER et al., 1992 e 1994).

3.2.1 Biodegradação de TCE sob condições aeróbias

Na maioria dos trabalhos envolvendo a degradação do tricloroetileno por microrganismos aeróbios ou anaeróbios, os autores acreditavam que os primeiros tinham um metabolismo mais versátil, uma vez que utilizavam um grande número de substratos e, portanto, seriam os agentes primordiais da transformação do TCE. Soma-se a isso, o maior conhecimento sobre as enzimas responsáveis pela degradação aeróbia de diferentes compostos.

Já os anaeróbios, de difícil cultivo e crescimento lento (PEREIRA, 1993), são assim menos conhecidos.

Alguns trabalhos mostraram a eficiência da degradação do TCE por consórcios microbianos aeróbios. WILSON & WILSON (1985) demonstraram que o TCE pôde ser degradado a dióxido de carbono em uma coluna de solo não saturada. A biodegradação foi atribuída a atividade metabólica de bactérias metanotróficas.

Os autores FOGEL et al. (1986) concluíram que bactérias metanotróficas podiam degradar etilenos clorados pela ação da enzima *metano monooxygenase* (MMO), e demonstraram que 57% do TCE marcado com carbono radioativo pôde ser transformado em $^{14}\text{CO}_2$ e biomassa.

FLIERMANS et al. (1988) coletaram sedimento superficial de rio (profundidades variando de 5-15 m) contaminado com hidrocarbonetos clorados contendo um consórcio microbiano. Esse sedimento foi então empregado em estudos de biodegradação de TCE em concentrações variando de 50 a 300 mg/L. Nas melhores condições experimentais encontradas como: temperatura 22-37°C e pH 7-8,1, TCE em concentrações iguais ou menor que 50 mg/L foi degradado 99% em 21 dias. TCE em concentração de 150 mg/L foi degradado 50% no mesmo período e em concentrações maiores ou igual a 200 mg/L, a degradação foi desprezível.

STRANDBERG et al. (1989) relataram que um consórcio de metanotróficas através de co-metabolismo foi capaz de degradar TCE e trans 1,2 DCE, mineralizando-os em 60% a CO_2 .

Um estudo realizado por PHELPS et al. (1990), constatou que mais de 90% do TCE foi degradado por um consórcio aeróbio, na presença de propano e/ou metano como substratos. O propano se mostrou mais eficiente como auxiliar à degradação do TCE, cerca de 95% ou mais do composto foi degradado após 5 dias de incubação. Finalmente, este estudo indicou o potencial para biorremediação de ambientes contaminados por eteno clorado.

Em 1991, COHEN & McCARTY estudando uma cultura mista de metanotróficas em temperatura ambiente concluíram que a transformação de TCE ocorre em menor tempo quando as células estão sob agitação e

aeração, e a habilidade em transformar o TCE é preservada quando as células são estocadas sob condições anóxicas.

PHELPS et al. (1991) avaliaram um consórcio microbiano proveniente de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos clorados que se mostrou hábil na degradação de uma mistura de poluentes orgânicos entre eles o TCE. O consórcio microbiano empregado na biodegradação de TCE foi capaz de degradar de 80 a 95% desse composto em uma concentração inicial de 20 mg/L. Esses resultados foram confirmados posteriormente em estudos executados em laboratório.

Um estudo piloto demonstrou que é possível ocorrer a degradação de TCE *in situ* por consórcio microbiano aeróbio, através de co-metabolismo e na presença de fenol e oxigênio. Nesse estudo foi utilizado um lodo proveniente de um aquífero da região Moffett Field e que demonstrou ser apto a degradar 88% do TCE em uma concentração 0,0062-0,5 mg/L. Em concentrações superiores a 1 mg/L, a remoção de TCE foi de 77%, podendo essa eficiência ser aumentada para 90%, na presença de fenol em concentrações de 25 mg/L. Esses resultados de biodegradação foram posteriormente confirmados em estudos laboratoriais. (HOPKINS et al., 1993).

Em um estudo realizado por ENSLEY & KURISKO (1994) relatou-se que microrganismos presentes em uma coluna de sedimento proveniente do rio Savannah foram capazes, por co-metabolismo, de degradar de 90 a 95% da concentração inicial de TCE (concentrações iniciais variando de 0,3 a 4 mg/L) em um período de 10 meses.

ARCANGELI & ARVIN (1997) investigaram a degradação de TCE por co-metabolismo usando uma cultura mista de microrganismos aeróbios em um sistema com formação de biofilmes. O propósito foi o de quantificar a influência do tolueno na taxa de remoção do TCE, e o efeito inibitório do TCE na taxa de remoção do tolueno. A interação entre tolueno e TCE foi estudada para gerar um modelo cinético que pudesse ser usado em um processo de tratamento e recuperação ambiental. A degradação de TCE é dependente da concentração de tolueno até 1 mg/L. Acima dessa concentração de tolueno, a degradação de TCE é fortemente inibida.

Similarmente, TCE inibe a degradação de tolueno em concentrações maiores e igual a 0,05 mg/L, indicando assim a ocorrência de co-metabolismo em intervalos restritos de concentrações desses compostos.

TRAVIS & ROSENBERG (1997) tendo o rio Savannah como objeto de estudo demonstraram, *in situ*, como um consórcio de bactérias metanotróficas foi capaz de degradar TCE quando metano e oxigênio estavam presentes. O sistema aumentou em 25% a eficiência da degradação de TCE em relação a esse mesmo sistema na ausência de ar.. Análises indicaram que a toxicidade dos intermediários de TCE em metanotróficos pode afetar a eficiência de práticas de biorremediação.

McCARTY et al. (1998) estudaram a biodegradação metabólica de 0,5-1,2 mg/L de TCE em água subterrânea na presença de 7-13,4 mg/L de tolueno, oxigênio e peróxido de hidrogênio (substâncias adicionadas no aquífero) durante um período de 410 dias. Após o período de 312 dias, $87 \pm 8\%$ de TCE foi degradado.

A literatura apresenta diversos trabalhos sobre a degradação de TCE e seus intermediários utilizando culturas puras de bactérias aeróbias. No presente texto, alguns desses trabalhos estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Alguns gêneros de microrganismos aeróbios que degradam compostos organoclorados

Microrganismo	Substrato	Enzima	Mecanismo	Referência
<i>Acinetobacter</i> sp linhagem G4	TCE	ND	O	Nelson et al. (1986)
<i>Acinetobacter</i> sp linhagem NCIB 9871	TCE	CHM	O	Wackett et al. (1989)
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	TCE	C-2	O	Wackett et al. (1989)
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	TCE	TMO	Nitrificação	Leahy et al. (1996); Mars et al. (1996); Mars et al. (1998)
<i>Burkholderia pickettii</i> PK01	TCE	TMO	Denitrifi.	Leahy et al. (1996)
<i>Escherichia coli</i> linhagem JM 109/pDTG601	TCE	TODO	O	Zylstra (1989); Jaahng & Wood (1994)
<i>Hansenula mrakii</i>	TCE	NDO	O	Wackett et al. (1989)
(Methanotrophs) linhagem 46-1	TCE	MMO	O	Little et al. (1988)
<i>Methylobacter marinus</i> A 45	TCE	MMOp	O	DiSpirito et al. (1992)
<i>Methylobacter</i> sp linhagem BB5.1	TCE	MMOp	O	Smith et al. (1997)
<i>Methylococcus Capsulais</i>	Triclorometano	MMO	O	Fogel et al.(1986); Green & Dalton (1989)
	TCE		Co	

Continuação da Tabela 2

<i>Methylomonas</i> linhagem 68-1	<i>methanica</i>	TCE	MMOs	O	Little et al. (1988); Koh et al. (1993)
<i>Methylomonas</i> sp	linhagem MM2	TCE	MMO	Co, O	Henry & Grbic-Galic (1991)
<i>Methylosinus</i> OB3b	<i>trichosporium</i>	TCE	MMO	O	Tsien et al. (1989); Fox et al. (1990); Brusseau et al. (1990); Koh et al. (1993); Jaahng & Wood (1994); Landa et al (1994); Lontoh & Semrau (1998)
<i>Methylosinus</i> OB3b PP358	<i>trichosporium</i>	TCE	MMOs	O	Fitch et al. (1996)
<i>Mycobacterium convolutum</i>		TCE	PrMO	O	Wackett et al. (1989)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5		1,1DCE, trans1,2DCE, cis1,2 DCE, TCE, VC	PrMO	O	Wackett et al. (1989)
<i>Mycobacterium. Rhodochrous</i> W-24		TCE	PrMO	O	Wackett et al. (1989)
<i>Mycobacterium. Rhodochrous</i> W-25		TCE	PrMO	O	Wackett et al. (1989)
<i>Nitrosomonas europaea</i>		TCE	AMO	O	Aciero et al. (1989); Vannelli et al. (1990)

Continuação da Tabela 2

<i>P. putida</i> F1/pSMMO20	TCE	MMOs	O	Jaahng e Wood (1994)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 473	TCE	HMO	O	Wackett et al. (1989)
<i>Pseudomonas cepacia</i> G4	TCE	ND	Co, O	Folsom et al. (1990)
<i>Pseudomonas cepacia</i> G4-5223-PR1	1,1DCE, trans1,2DCE, cis1,2 DCE, TCE	TOM	Co, O	Shields & Reagin (1992); Krumme et al. (1993)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CFS215	TCE	TODO	Nitrificação	Leahy et al. (1996)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TCE	TOM	O	Vaandenbergh & Kunka (1988); Malachowsky et al. (1994)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2-79	TCE	TOM	GMO	Yee et al. (1998)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2-79 T	TCE	TOMs	GMO	Yee et al. (1998)
<i>Pseudomonas mendosina</i>	TCE	TDO		Winter et al. (1989); Wackett et al. (1989)
<i>Pseudomonas mendosina</i> kr-1	TCE	T4MO	O	Ensley & Kurisko (1994), McClay et al. (1995) Leahy et al. (1996)
<i>Pseudomonas oloovorans</i> PpG6	TCE	HMO	O	Wackett et al. (1989)

Continuação da Tabela 2

<i>Pseudomonas putida</i>	TCE	TOM	Co	Mars et al. (1998)
<i>Pseudomonas putida</i> 3400	TCE	MBO	O	Wackett et al. (1989)
<i>Pseudomonas putida</i> B5	TCE	TDO, DD	O	Nelson et al. (1988)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	TCE, DCE	TDO	O	Wackett & Gibson (1988); Zylstra et al. (1989); Wackett & Householder (1989); Leahy et al. (1996); Mars et al. (1998)
<i>Pseudomonas putida</i> G786	TCE	C-3	O	Wackett et al. (1989)
<i>Pseudomonas putida</i> PpF1	TCE	TDO, DD	O	Nelson et al. (1988)
<i>Pseudomonas</i> sp linhagem ENVPC5	TCE	TDO	Co	McClay et al. (1995)
<i>Pseudomonas</i> sp linhagem JS150	TCE	TDO	O	Leahy et al. (1996)
<i>Pseudomonas</i> sp linhagem W31	TCE	TDO	Denitrifi..	Leahy et al. (1996)
<i>Rhodococcus</i> ATCC 21197	TCE, VC	MMOp e/ouTOM	O	Malachowsky et al. (1994)
<i>Rhodococcus</i> sp linhagem Sm-1	TCE, VC	MMOp e/ou TOM	O	Malachowsky et al. (1994)

Continuação da Tabela 2

<i>Streptomyces griseus</i>	ATCC	TCE	PMO	O	Wackett et al. (1989)
13273					
<i>Streptomyces griseus</i>	NRRL	TCE	PMO	O	Wackett et al. (1989)
8090					

Tipo IV <i>actinomycete</i>		TCE, VC	ND	O	Malachowsky et al. (1994)
-----------------------------	--	---------	----	---	---------------------------

MMO = *metano monooxygenase*; TOD = *tolueno dioxigenase*; DD = *2,cis-dihidrodiol dehidrogenase*; MMOs = *Metano monooxygenase solúvel*; NDO = *Nitropropane dioxigenase*; CMO = *ciclohexanone monooxygenase*; C-2 = *Cytochrome p-450_{meg}*; C-3 = *Cytochrome p-450_{cam}*;

MBO = *4 Metoxibenzoato monooxygenase*; PMO = *Preoceno monooxygenase*; HMO = *Hexano monooxygenase*; PrMO = *Propano monooxygenase*; AMO = *Amônia monooxygenase*; MMOp = *Metano monooxygenase particulado*; T4MO = *Tolueno 4 monooxygenase*; TMO = *Tolueno monooxygenase*. PCE = *tetracloroetileno*; TCE = *tricloroetileno*; DCE = *dicloroetileno*; VC = *cloroeto de vinila* O = *processo oxidativo, podendo envolver oxigenases*; Co = *co-metabolismo*; GMO = *geneticamente modificadas*; ND = *não determinada*

3.2.2. Biodegradação de TCE sob condições anaeróbias

A digestão anaeróbia envolve uma série de processos microbianos em que os compostos orgânicos são convertidos a metano e gás carbônico. A metanogênese como um processo natural foi descrito há mais de um século. É um processo largamente usado para o tratamento de esgotos sanitários e de águas residuárias industriais, o que tem auxiliado a melhor compreensão sobre a Microbiologia do processo, bem como o avanço da tecnologia com o desenvolvimento de novos reatores (BITTON, 1994).

Segundo VAZOLLER (1995b), a vantagem da utilização de processos anaeróbios para o tratamento de resíduos sobre os processos aeróbios são:

- baixa produção de lodo;
- poucos requerimentos nutricionais à fermentação;
- baixo ou nenhum gasto de energia;
- aplicação de elevadas cargas orgânicas;
- potencial de recuperação de energia na forma de biogás;
- degradação de certos compostos tóxicos, tais como os xenobióticos;
- habilidade em preservar o lodo por longos períodos sob a ausência de alimentação.

As transformações anaeróbias de compostos organoclorados, como mostrado na Tabela 3, envolvem geralmente reações de substituição (equações químicas 1 e 2) e/ou reações de redução com a participação de dois elétrons. Na primeira reação química, água ou outro reagente nucleofílico substitui o átomo de cloro, liberando cloreto na forma de ácido clorídrico. Na deidrohalogenação (equação química 2), hidrogênio e cloro são removidos simultaneamente, resultando também em um composto com menor número de átomos de cloro com formação de uma dupla ligação química entre os átomos de carbono. A terceira equação, representa uma reação de dihaloeliminação com eliminação de dois átomos de cloro por redução (átomos de cloro foram redutivamente substituídos por átomos de hidrogênio) envolvendo dois elétrons e formação de íon cloreto e de um hidrocarboneto com dupla ligação química. Finalmente, a quarta equação

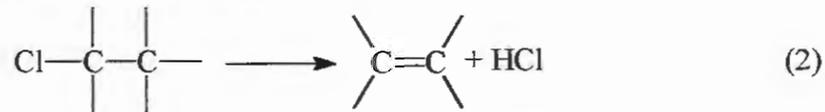
representa uma reação de redução de cloro e substituição por um átomo de hidrogênio na molécula do hidrocarboneto (FERGUSON & PIETARI, 2000).

Tabela 3. Reações de transformação anaeróbia de compostos alifáticos clorados: reações de substituição e redução

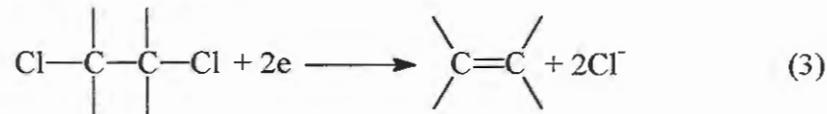
Hidrólise e outras substituições nucleofílicas



Deidrohalogenação



Dicloroeliminação



Descloração redutiva



Fonte: FERGUSON & PIETARI (2000)

Essas transformações anaeróbias são de extrema importância nos processos de biotransformação de compostos organoclorados, necessitando-se de condições redutoras, que são freqüentemente encontradas nos ecossistemas com atividade microbiana anaeróbia (FERGUSON & PIETARI, 2000).

VOGEL & McCARTY (1985) estudaram a biotransformação anaeróbia do tetracloroetileno (PCE) à CO_2 sob condições metanogênicas utilizando culturas mistas de microrganismos anaeróbios, e sugeriram a provável ocorrência de completa mineralização desse composto em solos, aquíferos e processos de tratamento biológicos. O processo de degradação do PCE, como mostrado na Figura 2 (opt. cit.), envolve a desalogenação redutiva

desse composto, com produção do tricloroetileno (TCE) numa primeira etapa, seguido pela formação de dicloroetileno (DCE) e seus isômeros e, finalmente, cloreto de vinila (CV).

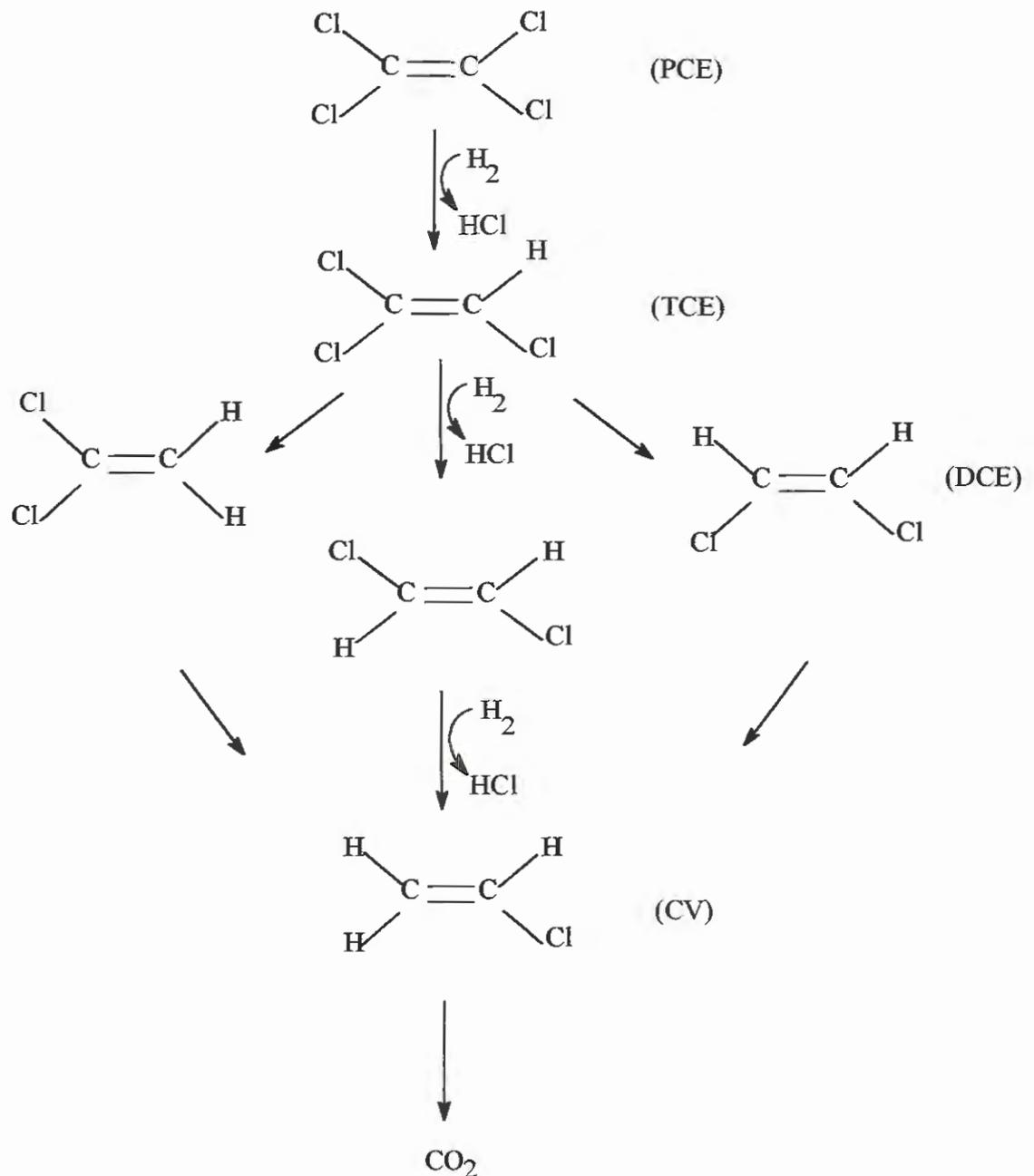


Figura 2. Esquema da biotransformação do PCE a CO₂ envolvendo desalogenação reductiva.
Fonte: VOGEL & McCARTY (1985)

A transformação de CV em dióxido de carbono parece envolver a adição de água na dupla ligação do CV formando o 2-cloroetanol, com posterior oxidação completa deste composto a CO_2 (VOGEL & McCARTY, 1985)

O estudo em um aterro sanitário contaminado por descarga industrial, mostrou o comportamento de uma comunidade anaeróbia metanogênica e seu potencial para biotransformar hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos halogenados sob condições anóxicas, e que o desaparecimento de todos os contaminantes se deu após o início da fase lag. Entre os compostos alifáticos halogenados estava o tricloroetileno, que se transformou nos seguintes produtos: 1,2-dicloroetileno e cloreto de vinila. Para uma concentração inicial do TCE de 155 $\mu\text{g/L}$, registrou-se, após 16 semanas de incubação da comunidade metanogênica com o TCE, uma redução da concentração de TCE de 115 $\mu\text{g/L}$ e, após 40 semanas, a concentração de TCE remanescente foi menor que 47 $\mu\text{g/L}$ (WILSON et al., 1986).

FREEDMAN & GOSSET (1989) afirmaram que um processo biológico para a biorremediação de águas subterrâneas contaminadas só poderia ser aplicado se o produto de sua transformação fosse um produto ambientalmente aceito. Os autores (opt. cit.) demonstraram com esse estudo, que culturas mistas anaeróbias são aptas, sob condições metanogênicas, em desalogenar PCE e TCE a etileno, um produto que não agride o meio ambiente. Nesse estudo, trabalhando-se com carbono radioativo, encontraram [^{14}C] etileno como o principal produto da degradação de [^{14}C]PCE, não sendo significativo o aparecimento de $^{14}\text{CO}_2$ e $^{14}\text{CH}_4$ como produto final. Além disso, verificou-se a necessidade dos organismos de fontes complementares, como doadores de elétrons, sendo hidrogênio, formiato, acetato, glicose e metanol relevantes e, o metanol o de maior eficiência. A metanogênese, sem dúvida, desempenhou um papel importante na biotransformação do PCE e TCE em etileno (ETH), mas não na formação de CO_2 .

EGLI et al. (1987); FATHEPURE et al. (1987) e FATHEPURE & BOYD (1988b) também encontraram nos respectivos estudos a biotransformação de PCE a TCE por culturas puras metanogênicas incluindo

a *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* e *Methanosarcina* sp, linhagem DCM

D_ISTEFANO et al. (1991) constataram a completa degradação de altas concentrações de PCE (550 µM ou 91 mg/L) a etileno, sob condições anaeróbias. As transformações ocorreram na ausência de metanogênese, que pode ter sido inibida pela alta concentração de PCE (acima de 275 µmol /Ldia). Uma alta taxa volumétrica de desalogenação de PCE e uma relativa faixa de suprimentos de elétrons doadores usados nesse processo, indicaram que a desalogenação redutiva pode ser aproveitada para a biorremediação de ambientes contaminados por PCE.

PAVLOSTATHIS & ZHUANG (1991) observaram que o tricloroetileno foi biotransformado a cis-1,2-dicloroetileno, por desalogenação redutiva, onde a metanogênese foi insignificante e a atividade de uma cultura mista de sulfato-redutora manteve o excesso de sulfato.

KÄSTNER (1991) utilizou um aquífero subterrâneo (Alemanha) contaminado com solventes aromáticos, álcoois e compostos clorados como o PCE e TCE, para estudar a biodegradação desses compostos em condições aeróbias e anaeróbias. Estudo em bancada, mostrou a desalogenação redutiva de PCE e TCE em cDCE, sob condições anaeróbias nos primeiros 4 dias, após a incubação em reatores em batelada. Apenas dois tipos de anaeróbios puderam ser identificados, a saber: bactéria facultativa na forma de bacilo com capacidade de formar esporos (*Bacillus* sp.) e um bacilo espiralado sufidogênico com capacidade de formar esporos (*Desulfotomaculum* sp). Não foi possível detectar organismos metanogênicos nesse estudo.

Na busca da descontaminação do ambiente, DE BRUIN et al. (1992), descreveram a completa transformação por desalogenação redutiva do tetracloroetileno (PCE) a eteno e, posteriormente, a etano, utilizando-se uma coluna contendo como inóculo uma mistura de sedimento anaeróbio proveniente do rio Reno e lodo anaeróbio granulado oriundo de um reator do tipo UASB usado no tratamento da água residuária de produção de açúcar de beterraba. Estudos realizados à temperatura de 10 °C e 20°C . Para temperaturas inferiores a 10 °C, foi necessário um tempo de 2 semanas para

a adaptação das culturas para obter-se a mesma eficiência na desalogenação redutiva do PCE em temperatura de 20 °C. Foi também observado que a desalogenação redutiva tem-se mostrado um método atrativo na remoção de PCE em processos de biorremediação, isto se deve a alta taxa de desalogenação (3,7 $\mu\text{mol/Lh}$).

Em um outro trabalho, descrito por DiSTEFANO et al. (1992), culturas mistas anaeróbias foram enriquecidas com PCE, metanol e hidrogênio. Os resultados evidenciaram que o hidrogênio é o doador direto de elétrons na redução do PCE.

BOUCQUEY et al (1995) estudaram a biodegradação simultânea de 30 compostos clorados tóxicos, entre eles o TCE. Nesse estudo de biorremediação foi empregada inicialmente uma comunidade metanogênica que foi aclimatada na mistura de compostos clorados em um biorreator de leito fixo em filme de poliuretano, o qual permitiu trabalhar sob condições altamente poluídas, similarmente àquelas encontradas na natureza. Com esse biorreator operado em pH de 7,5 e temperatura de 35 °C, foi possível degradar os organoclorados em concentrações acima de suas solubilidades (em torno de 10g/L). No sistema, observou-se a completa degradação dos seguintes organoclorados: octaclorociclopenteno, tetracloreto de carbono, tricloroetileno, tetracloroetileno e hexacloro-1,3-butadieno. Para os últimos 4 compostos, o balanço de massa observado no biorreator foi em torno de 10 $\mu\text{mol/Ldia}$. Esses resultados mostraram que o enriquecimento da cultura utilizada nos experimentos demonstrou alta capacidade de desalogenação, similar àquela descrita para culturas puras ou culturas anaeróbias enriquecidas quando em contato com um único composto. Os resultados revelaram um grande potencial das culturas mistas anaeróbias metanogênicas quando aclimatadas progressivamente para serem aplicadas em biorremediação (degradação *in situ*) para contaminantes em aquíferos e/ou solo, apresentando uma velocidade de decomposição superior às concentrações de diversos poluentes encontrados no ambiente.

ROSNER et al (1997) estudaram a desalogenação redutiva do cloreto de vinila (CV) utilizando uma cultura mista de bactérias anaeróbias. Nos experimentos de crescimento, o CV foi transformado exponencialmente em

eteno à uma taxa de aproximadamente de $0,019 \text{ h}^{-1}$. A desalogenação redutiva de CV foi acompanhada in vitro utilizando-se um extrato de células de culturas mistas. Esses autores concluíram que a atividade redutora de desalogenação de CV estava associada a membrana celular. O extrato de células catalisou a desalogenação redutiva de cis-1,2-DCE e, em baixas velocidades, o TCE. O PCE não sofreu nenhuma transformação.

ZINDER e colaboradores (1997) e (1999) vem empregando cultura anaeróbia contendo *Dehalococcoides ethenogenes* 195 para degradar redutivamente PCE a eteno. Quando 2% v/v desse microrganismo foi inoculado em meio de cultura contendo TCE, c-DCE, 1,1-DCE ou 1,2-DCA como aceptores de elétrons, esses compostos organoclorados foram consumidos em velocidades crescentes com o tempo, indicando assim a ocorrência de crescimento dessa cultura. Ademais, o número de células aumentou quando esses organoclorados estavam presentes. PCE, TCE, DCE foram convertidos principalmente em CV e então a eteno (ETH).

MAGNUSON et al. (1998) extraíram e purificaram as enzimas *PCE-redutiva desalogenase (PCE-Rdase; 51 kDa)* e *TCE-redutiva desalogenase (TCE-Rdase, 61 kDa)* de cultura anaeróbia contendo *Dehalococcoides ethenogenes* 195 e as utilizaram nos estudos de desalogenação de PCE e TCE, respectivamente. A *PCE-Rdase* desalogenou PCE a TCE a uma velocidade de $20 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e a *TCE-Rdase* desalogenou TCE a eteno a uma velocidade de $8 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

YAGER et al. (1997) utilizaram a combinação de métodos hidrogeológicos, geoquímicos e microbiológicos na biotransformação do tricloroetileno a eteno e a completa mineralização dos compostos um aquífero. Análises de águas subterrâneas mostraram que o TCE foi transformado em 1,2-DCE, CV e eteno. Testes realizados em microcosmo revelaram que a desalogenação redutiva ocorreu no centro da pluma e não na periferia da mesma. A atividade de desalogenação indicou que os microorganismos autóctones ao local tem se adaptado para utilizar etenos clorados e sugeriram que a dehalorespiração, ao invés do co-metabolismo, é o metabolismo responsável por esse processo. No trabalho enfatizou-se a

importância da biodegradação de etenos clorados para a descontaminação ambiental.

Em um estudo conduzido com a bactéria anaeróbia *Dehalospirillum multivorans*, presente em um biofilme de um reator de leito fluidificado, constatou-se a habilidade desse organismo em desalogenar redutivamente PCE via TCE e DCE (cis-1,2-dicloroetano). O reator foi projetado e operado em escala de laboratório sob condições contínuas, a 20°C. A conversão do PCE a TCE ocorreu à uma velocidade máxima de 55 nmol/min/mg de proteína, e de TCE a DCE de 90 nmol/min/mg de proteína. Os autores comentaram que as velocidades de conversão podem ser otimizadas por um fator de 3,5 se no reator forem cultivadas células a 30°C. Substâncias normalmente encontradas em águas subterrâneas como nitrato e sulfato, em concentrações de 5 mmol/L, não interferiram nas reações de desalogenação (EISENBEIS et al., 1997)

Um estudo realizado por cerca dois anos e meio, sobre a biodegradação anaeróbia de altas concentrações de PCE, foi conduzido por ISALOU et al. (1998). Nesse estudo, uma coluna preenchida com areia inoculada com biomassa de um biodigestor anaeróbio foi alimentada com concentrações iniciais de PCE variando de 12 a 600 µmol/L e metanol como doador de elétron. Nos primeiros 21 meses, o principal produto de conversão foi o CV, sendo também detectado etileno. Os mesmos produtos foram obtidos na desalogenação de TCE.

YANG & MCCARTY (1998) estudaram o efeito da concentração de hidrogênio sobre a desalogenação redutiva de solventes clorados como o PCE e TCE. Foi investigada a competição entre desalogenantes e outros microorganismos existentes em uma cultura mista metanogênica aclimatada para desalogenar aqueles compostos em meio de benzoato. Os resultados encontrados mostraram que os organismos desalogenantes competiram desfavoravelmente com as metanogênicas e homoacetogênicas quando a concentração de hidrogênio esteve entre 2 e 11 nmol/L. A concentração de 2 nmol/L de hidrogênio representou a concentração crítica para a desalogenação de DCE. Essa concentração crítica de hidrogênio foi confirmada em estudos posteriores empregando-se reatores em batelada e

de fluxo contínuo. Os estudos em que o benzoato e o propionato foram utilizados como doadores de elétrons revelaram que o primeiro possibilitou a produção de três vezes mais metano que o segundo na degradação do DCE. Os autores concluíram que diferentes métodos e/ou condições devem favorecer a desalogenação na existência de competição com outros microorganismos.

A manipulação de biomassa pode ser de fundamental importância no aprimoramento de técnicas de degradação de compostos resistentes HÖRBER et al. (1998) utilizaram reatores UASB na presença e ausência da bactéria *Dehalospirillum multivorans* imobilizados em lodos granulares em estudos comparativos de desalogenação de PCE. No reator contendo o inóculo, 93% (mol/mol) desse composto halogenado foi degradado.

Um estudo sobre a degradação de tetracloroetano (PCA) e TCE sob condições metanogênicas foi conduzido por LORAH & OLSEN (1999), empregando-se sedimentos de áreas alagadas e água subterrânea de locais contaminados com esses organoclorados (área de despejo). Dois conjuntos de microcosmos, um estéril (controle) preparado com formaldeído 1% v/v e outro teste, com os organoclorados e inóculo. Os microcosmos foram constituídos por frascos de soro contendo 1,5:1 v/v da água subterrânea e dos sedimentos, com a concentração inicial de 1,5 $\mu\text{moles/L}$ de PCA. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de PCA e de seus produtos de degradação estavam abaixo do limite de detecção da técnica cromatográfica empregada, após 34 dias de experimento. Estudos similares foram feitos com TCE. Os (opt. cit.) autores concluíram que a biodegradação anaeróbia natural de PCA e/ou TCE in situ (terras alagadas) foi completa, não ocorrendo contaminação das águas subterrâneas.

Estudos sobre a biodegradação do TCE, empregando-se sedimentos de duas áreas distintas geologicamente, foram conduzidos sob condições metanogênicas por BRADLEY & CHAPELLE (1999). Os autores (opt. cit.) utilizaram detecção radiométrica de ^{14}C no TCE e nos produtos da biodegradação desse organoclorado. Os resultados obtidos mostraram que além do eteno, etano e dióxido de carbono, a produção de metano foi

significativa na biodegradação do TCE em alguns sedimentos metanogênicos.

Um estudo sobre o efeito do TCE na digestão anaeróbia de água residuária sintética (com sacarose e traço de diversos cátions metálicos) foi realizado com especial ênfase à tolerância e adaptação de uma comunidade de um reator UASB contendo lodo granulado (NAVARRETE et al., 1999). Foi verificado que o lodo do reator possuiu grande tolerância e adaptou-se ao TCE, sendo que a adição contínua desse organoclorado afetou a eficiência do sistema apenas na concentração de 100 mg/L, porém a eficiência de remoção foi de aproximadamente 90%. Foram necessários 5 a 6 dias para uma nova readaptação do sistema a concentrações mais elevadas, e 400 mg/L de TCE o reator estabilizou-se. Esse sistema mostrou-se adequado ao tratamento anaeróbio do TCE, mesmo que sofrendo cargas esporádicas com concentrações superiores as rotineiras de TCE.

Colunas contendo solo e lactato, lactado e metanol, butirato, glutamato e 1,2-propanodiol ou tolueno como doadores de elétrons, combinados com vitaminas e outros suplementos nutricionais foram utilizados na desalogenação de TCE a cis-dicloroetano (cis-DCE) por HARKNESS et al. (1999). Após estabilização da cultura nas colunas, a desalogenação do TCE a eteno ocorreu com concentrações iguais a 4 mg/L nos primeiros centímetros da coluna. A coluna foi também considerada apta para desalogenar TCE a eteno em concentração igual ou maior que 170 mg/L.

KAO & LEI (2000) utilizaram solos de turfa para descontaminar aquíferos contendo PCE e TCE e monitoraram a demanda química de oxigênio (DQO) na avaliação da biodegradabilidade desses compostos. Os autores (opt. cit.) encontraram que a DQO decresceu em 0,5 g de solo de turfeira em aproximadamente 6 mg (concentrações iniciais de TCE de 8 $\mu\text{mol/L}$ e PCE 9 $\mu\text{mol/L}$), assim com um potencial de conversão de 1,5 mg de PCE a etileno. A utilização de terreno turfoso na biodegradação de solventes clorados pareceu uma boa , e econômica para a descontaminação de águas subterrâneas.

ELLIS et al. (2000) estimularam o crescimento de biomassa em um aquífero contaminado com TCE e cis-DCE a fim de acelerar a biorremediação anaeróbia in situ. Nesse estudo, a degradação de 4800 µg/L de TCE e 1200 µg/L de cis-DCE, presentes respectivamente em média no aquífero, foi acompanhada durante 568 dias. Após 269 dias de acompanhamento, verificou-se que uma concentração significativa de TCE foi transformada em cis-DCE (~80%), sendo esse último composto o principal contaminante no aquífero. Após adição de uma cultura mista e um período de 90 dias (fase lag), CV e eteno começaram a aparecer nas águas subterrâneas, e após 509 dias TCE e cis-DCE foram completamente convertidos a eteno.

PRAKASH & GUPTA (2000) empregaram lodo anaeróbio granular proveniente de um biodigestor municipal contaminado com PCE em reator do tipo UASB, operado em temperatura ambiente, para estudar desalogenação desse organoclorado. PCE em concentrações iniciais de 5 a 20 mg/L foi desalogenado para concentrações de 0,1 a 0,45 mg/L, com taxa de remoção em torno de 98,5±1%. O tamanho dos grânulos atingiram diâmetros variando de 0,25 a 4 mm. As principais bactérias encontradas nos grânulos, após 36 horas de operação do reator, eram *Methanosaeta* sp.(anteriormente *Methanotrix* sp) e *Methanosarcina* sp. Os grânulos aclimatados com PCE apresentaram maior taxa de remoção desse composto, sendo obtido uma taxa de 14,28 mg PCE/g SSV.

A Tabela 4 apresenta os principais trabalhos encontrados na literatura especializada envolvendo a biodegradação de compostos organoclorados, especialmente TCE, sob condições de anaerobiose.

Tabela 4. Alguns gêneros de microrganismos anaeróbios que degradam compostos organoclorados

Microrganismos	Substrato	Enzima	Mecanismo	Referência
<i>Acetobacterium woodii</i>	PCE	ND	Resp-desal	Egli et al. (1988), Holliger & Schumacher (1994)
<i>Bacillus</i> sp	PCE, TCE, DCE	ND	Dc	Kästner (1991)
<i>Dehalobacter restrictus</i>	PCE	H; PCER	Resp-desal.	Holliger et al. (1993), Holliger & Schumacher (1994)
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	PCE TCE, 1,1-DCE or DCA, CV	ND	D R	Maymó-Gatell et al.(1997) Maymó-Gatell et al.(1999)
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	PCE	ND	Resp-desal	Holliger et al. (1993), Holliger & Schumacher (1994); Hörber et al (1998)
<i>Desulfitobacterium frappiere</i> TCE1	PCE e TCE	ND	D R	Gerritse et al (1999)
<i>Desulfobacterium linhagem</i> DCB-1	PCE	co-M	D R	Pavlostathis & Zhuang (1991), Schols-Muramatsu et al. (1990), Fathepure et al. (1987), DE Bruin et al. (1992)
<i>Desulfotomaculum</i> sp	PCE, TCE, DCE	ND	Dc	Kästner (1991)

Continuação da Tabela 4

<i>Methanobacterium</i> sp	1,2 DCA ; PCE, TCE	ND	Biotransf.	Egli et al. (1987), Freedman & Gosset (1989)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	1,2 DCM, PCE, TCE	Mco-MR	D R	Belay & Daniels (1987), Freedman & Gosset (1989)
<i>Methanococcus deltae</i>	1,2 DCA, PCE, TCE	Mco-MR	D R	Belay & Daniels (1987), Freedman & Gosset (1989)
<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	1,2 DCA, PCE, TCE	Mco-MR	D R	Belay & Daniels (1987), Freedman & Gosset (1989)
<i>Methanosarcina mazei</i>	PCE	ND	Dc	Freedman & Gosset 1989)
<i>Methanosarcina</i> sp	PCE	ND	Resp-desal	Fatherpure et al. (1987), Holliger & Schumacher (1994); Prakash & Gupta (2000)
<i>Methanosarcina</i> sp linhagem DCM	PCE, TCE	ND	Dc	Fathepure & Boyd (1988b), Freedman & Gosset (1989)
<i>Methanosaeta</i> sp	PCE	ND	D R	Prakash & Gupta (2000)

DCM = diclorometano; DCA = dicloroetano; DCE = dicloroetileno; TCE = tricloroetileno; PCE = tetracloroetileno; CV = cloreto de vinila.

Com-MR = metil coenzima M redutase; H = hidrogenase; PCER = PCE redutase; ND = não determinada

D R = desalogenação redutiva; Resp-desal. = respiração por desalogenação; Dc = descloração; Biotrans. = biotransformação.

4.MATERIAL E MÉTODOS

Dois lodos biológicos foram estudados, a saber: um lodo granulado do biodigestor anaeróbio termofílico de fluxo ascendente e manta de lodo utilizado para o tratamento de vinhaça da Usina São Martinho, Pradópolis/SP e o sedimento da Represa do Lobo (Broa)-Itirapina/SP (Figura 3).

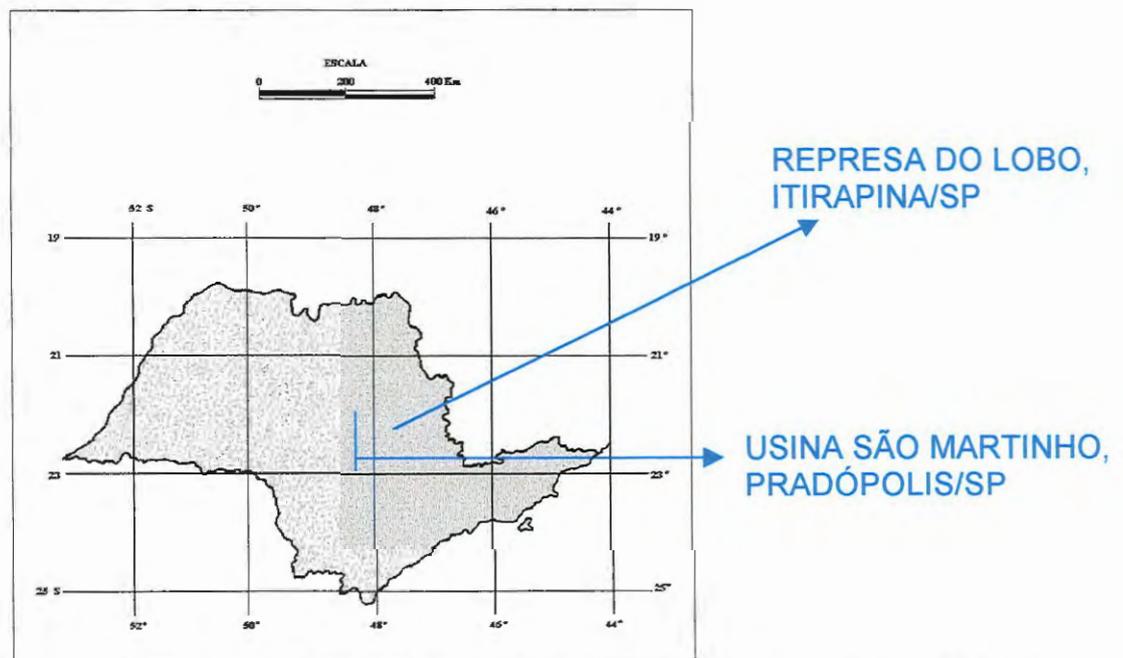


Figura 3. Mapa com a localização da Represa do Lobo (Broa)-Itirapina/SP e da Usina São Martinho, Pradópolis/SP

O biodigestor anaeróbio termofílico de fluxo ascendente de manta de lodo (UASB), tem demonstrado enorme potencial no tratamento de águas residuárias com elevada concentração de matéria orgânica e no tratamento da vinhaça.

A vinhaça é o principal resíduo líquido gerado pelas usinas de álcool e açúcares, com uma temperatura de 80 a 100⁰C e uma carga orgânica expressa em DQO de 45 g/L. No Brasil, cerca de 1,5 x 10¹¹ L de vinhaça são lançados no meio ambiente todos os anos, causando danos à vida animal, vegetal e bem como ao solo, levando assim à queda da qualidade de vida (VAZOLLER,1995b).

A aplicação de digestão anaeróbia termofílica em águas residuárias industriais tem sido muito restrita e apenas encontra-se relatos na literatura de trabalhos técnicos e científicos realizados pelo grupo de apoio técnico da Usina São Martinho, do Grupo Monte Sereno, Pradópolis-São Paulo, que após alguns anos de experiência com um reator em escala piloto (75m³), operado a uma temperatura aproximada de 55⁰C e cargas orgânicas de 25 a 30 DQO/m³ vem produzindo 60% de biogás metano, um rendimento considerado eficiente (VAZOLLER, 1995b).

Atualmente a Usina São Martinho possui um biodigestor anaeróbio termofílico de fluxo ascendente de manta de lodo (UASB), em escala industrial (5000 m³), operando à 55⁰C±2 °C (Figura 4).

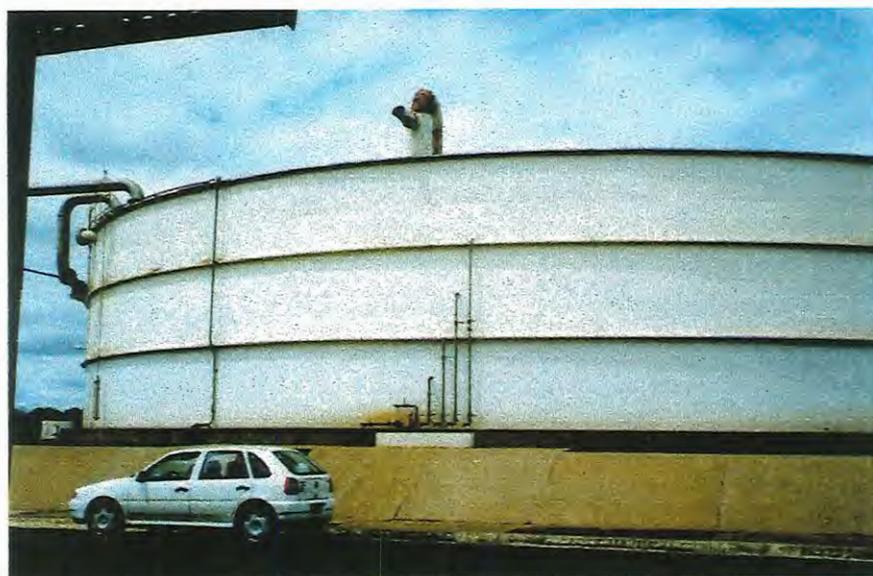


Figura 4. Reator de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo - UASB da Usina São Martinho, Município de Pradópolis, Estado de São Paulo.

O reator possui a capacidade para tratar $1,7 \times 10^8$ L de vinhaça/ano, metade da vinhaça gerada pela usina e como produto o biogás (metano) que vem sendo utilizado na queima e transformação do bagaço da cana em ração para aves e peixes, produto exportado para alguns países da Ásia e que tem contribuído significativamente para o aumento de sua receita (SOUZA,1999)¹.

Muitos foram os reservatórios construídos neste país tendo como principal finalidade gerar energia elétrica. Assim no ano de 1936 foi construída no Município de Itirapina/SP, pelas Centrais Elétricas do Estado de São Paulo (CESP) a Represa da Usina do Lobo (conhecida como Represa do Broa).



Figura 5. Visão geral da Represa do Lobo a partir de um ponto do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada -EESC-USP, Município de Itirapina, Estado de São Paulo.

A represa possui a seguinte localização, segundo GODINHO, (1976): Latitude – $22^{\circ} 15' S$; Longitude – $47^{\circ} 49' W$; Comprimento máximo – 7,5 km; Largura máxima – 2,2 km; Profundidade máxima – 12,0 m; Profundidade média – 3,0 m; Perímetro – 21,0 km; Superfície – $6,8 \text{ km}^2$; Volume de água – $22.000.000 \text{ m}^3$; Altitude – 705m.

¹Comunicação pessoal

A bacia hidrográfica da Represa do Lobo é originada, principalmente, pela captação artificial dos Ribeirões do Lobo e Itaqueri e pelos córregos do Geraldo e Perdizes (MARINS apud CALIJURI, 1985). O Ribeirão do Lobo tem sua nascente no alto da Serra de Itaqueri, onde o nível freático é definido pelo contato do arenito Bauru com o basalto, entre 900-940 m (MESSINA, 1998).

Desde 1971, a Represa do Lobo vem sendo alvo de muitos estudos sobre Ecologia Aquática, intensificados com a criação do Curso de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, e que pertence ao Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC – USP. Existem alguns loteamentos à margem da represa, e hoje seu principal uso está ligado à área de turismo e lazer devido principalmente à qualidade de suas águas. A Figura 5 mostra uma visão da área.

Os experimentos realizados na presente Dissertação de Mestrado, com as amostras coletadas na Usina São Martinho (lodo termófilo) e na Represa do Lobo (lodo mesófilo) foram organizados em esquemas apresentados nas Figuras 6 e 7. Assim, os lodos foram coletados, enriquecidos em meio de cultura acrescido de fontes orgânicas para estimular a metanogênese, avaliados quantitativamente pelo método do Número Mais Provável e testados na presença do composto poluente tricloroetileno (TCE) quanto a sua capacidade em degradar esse organohalogenado. Particularmente, o lodo termófilo foi previamente ativado em três frascos-reatores, no qual um deles deu origem a maioria dos ensaios realizados (frasco T). Os três frascos, não descritos no âmbito dessa Dissertação de Mestrado, fazem parte do projeto maior sobre “Avaliação de Biofilmes Microbianos em Reator Anaeróbio Termofílico: desenvolvimento, diversidade populacional e metabólica”, FAPESP número 98/10730-4 (1999-2001). O frasco T escolhido ativado nas mesmas condições descritas no item 4.5.1 desse capítulo, apresentou 60% de metano para o início dos experimentos. A contagem celular foi realizada com amostras oriundas de um dos três sistemas.

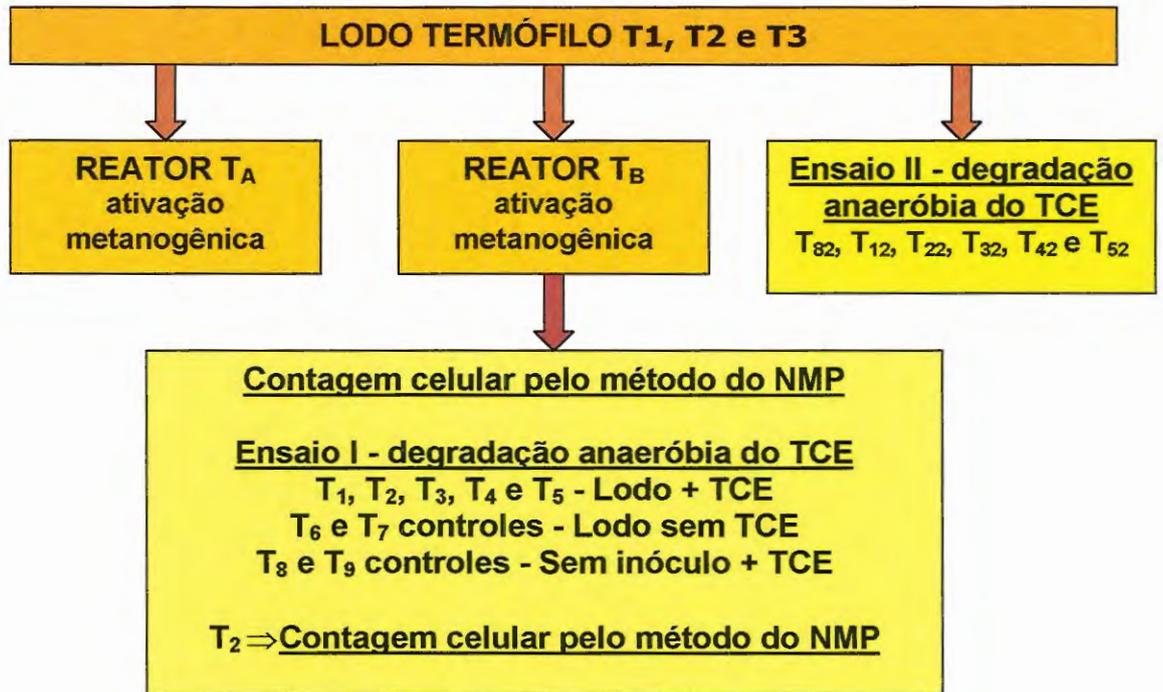


Figura 6. Esquema das etapas experimentais realizadas com o lodo termófilo na presente Dissertação de Mestrado.



Figura 7. Esquema das etapas experimentais realizadas com o lodo mesófilo na presente Dissertação de Mestrado.

4.1.Equipamentos

4.1.1.Sistema de distribuição simultânea de gases

O sistema de distribuição simultânea de gases foi essencial para manter as condições anaeróbias nos frascos utilizados durante os experimentos. Compreende um sistema tubular (tubos de cobre) de transporte dos gases dos cilindros estoque (White Martins) para quatro saídas com válvulas de agulha, que controlam a vazão do gás durante a sua utilização. A cada válvula, uma mangueira de 30 cm de material não permeável a gases é conectada, e na outra extremidade da mangueira uma seringa plástica de 3 mL é então acoplada. Para o uso de gases em sistemas estéreis, emprega-se um filtro estéril da marca Corning ligado à seringa, constituído de uma membrana com porosidade de 0,25 μ m, e pelo qual o gás atravessa, sendo então introduzido nos frascos ou tubos de ensaio através de uma agulha esterilizada, como pode ser observado na Figura 8. Esse sistema foi adaptado por VAZOLLER (1995b).

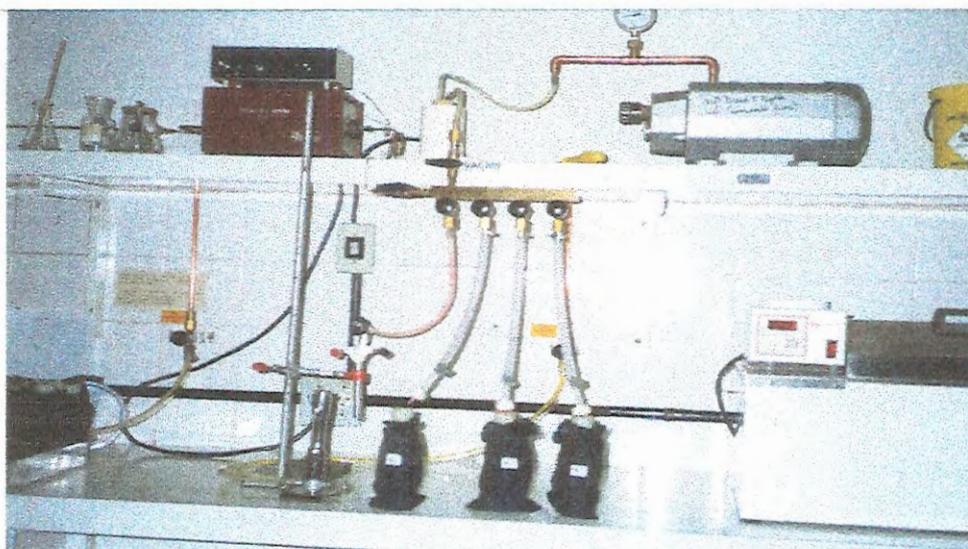


Figura 8. Sistema de distribuição simultânea de gases do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP.

4.1.2. Coluna catalítica para remoção de traços de oxigênio

A coluna catalítica para remoção de traços de oxigênio dos gases-forno de aquecimento para remoção de oxigênio da Instrumentos Científicos C.G, modelo CG 01, consiste de uma caixa de ferro, revestida internamente por amianto, um sistema de aquecimento elétrico com capacidade para atingir a temperatura de até 300°C e um tubo de cobre com aproximadamente 20 cm, preenchido com pedaços de cobre metálico. O gás atravessa o forno antes do sistema de distribuição simultânea de gases.

4.1.3. Microscópio

Os exames microscópicos foram realizados sob luz comum e contraste de fase, bem como sob fluorescência. O microscópio foi da marca Olympus, modelo BHT2, acoplado a um sistema de câmara da Olympus, modelo U-PMTVC, nº 8C14730 e sistema analisador de imagem Optronic – CCD video camera system (Figura 9). Foram usadas as seguintes condições de aumento: ocular 10, objetiva 40 ou 100 e “zoom” de 1,25.

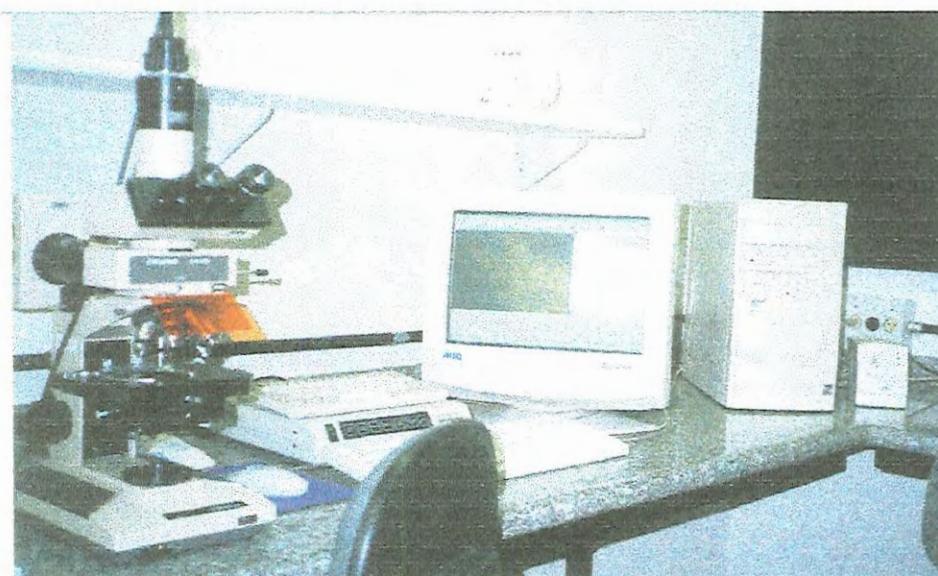


Figura 9. Microscópio Olympus, modelo BHT2, com video camera system Optronic – CCD

4.1.4.Cromatógrafos

Para a determinação da composição e concentração do metano na atmosfera dos frascos reatores utilizou-se o cromatógrafo a gás Gow-Mac (Figura 10). Instrument Co., modelo 69. A coluna cromatográfica foi uma Poropak-Q, com comprimento de 2,0 m e diâmetro interno de $\frac{1}{4}$ " e o detector foi de condutividade térmica, série 150. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio super seco (White Martins). O integrador era da marca Hewlett-Packard, modelo HP 3396, série II. As condições de operação do aparelho foram: vazão do gás de arraste 1 mL, temperatura do detector, coluna e injetor, 55°C e corrente 150 mA. O volume de injeção era igual a 0,5 mL, retirado da atmosfera de frascos e tubos de ensaio com o auxílio de uma seringa com válvula de trava (0,5 mL da VICI precision sampling, Inc.).



Figura 10. Cromatógrafo a gás, para a determinação da composição concentração do metano (Gow-Mac).

As análises dos ácidos orgânicos voláteis foram feitas em um cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo CG, HP 6890, série US00020933 (Figura 11), com uma coluna HP – INNOWAX de comprimento de 30 m e diâmetro interno de 25 mm e espessura 25 μ m. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, com vazão de 30 mL/min e o detector foi de ionização de chama. O aparelho foi operado sob as seguintes condições: temperatura do detector igual a 300°C e do injetor 250°C, a coluna foi aquecida a 100°C por

3 minutos e em seguida aplicou-se um gradiente de temperatura (rampa de aquecimento) de 5°C/min até atingir 180°C, e um fluxo de ar de 300 mL/min. O volume injetado foi de 1 µL, usando-se uma seringa SGE de 10 µL.

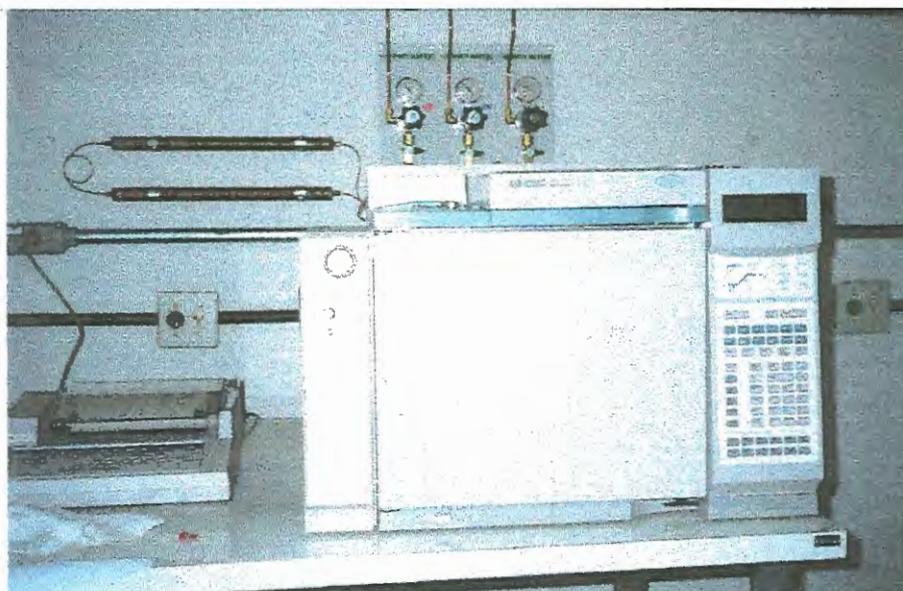


Figura 11. Cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo CG, HP 6890, para análises dos ácidos orgânicos voláteis (AOV)

Os teores de TCE foram determinados por cromatografia gasosa pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Campinas (UNICAMP). As determinações foram feitas em um cromatógrafo Shimadzu CG, modelo 14B equipado com um Detector de Captura de Elétrons. A coluna foi inicialmente mantida por 2 minutos em 40°C, sendo em seguida aplicado um gradiente de temperatura (rampa de aquecimento) de 5°C/min até atingir 70°C. A temperatura do injetor foi de 160°C e do detector 260°C. Corrente utilizada foi de 0,2 nA. A coluna empregada foi uma INNOWAX-HP. O modo de injeção SPLIT e a vazão da purga 30 mL/min. A seringa utilizada foi de 5 µL da marca Hamilton-Gastight, e o volume da amostra injetado foi igual a 1,0 µL.

4.1.5.Manômetro

Os reatores sofreram purgas rotineiras para evitar o aumento de pressão interna dos gases. Para isso utilizou-se T&S Equipamentos, modelo PD 400, munido de mangueira plástica e agulha estéril descartável.

4.1.6.Potenciômetro

As medidas de pH foram feitas com o uso de potenciômetro – Digimed, modelo DMpH–2 e eletrodo conjugado de vidro Analion, modelo V620.

4.1.7.Agitador com temperatura controlada

Os estudos da degradação do TCE pelos lodos termofílico e mesofílico foram feitos em frascos reatores sob condições de agitação e temperatura constantes, utilizando-se uma incubadora refrigerada e agitada da marca Marconi, modelo MA 830. Para o segundo experimento com lodo termofílico empregou-se uma incubadora refrigerada Marconi, modelo MA 830/A.

4.1.8.Estufa bacteriológica

As incubações das culturas para a determinação do Número Mais Provável (NMP) foram realizadas em estufas incubadoras da marca Fanem Ltda, modelo 002 CB (lodo termofílico) e 347 F (lodo mesofílico).

4.1.9.Outros equipamentos

Os demais instrumentos utilizados foram: draga Ekman, -multisonda U10 Horiba, - autoclave vertical Phoenix; - sistema de água destilada– Biomatic; - sistema de água Milli-Q–Millipore, modelo Milli-Q plus; - balança semi - analítica, com precisão de duas casas, Helmac, modelo Hm 1000; -

balança analítica, com precisão de quatro casas (décimo de mg), Denver Instrument, modelo AA-160; - estufa de secagem e esterilização Fanem Ltda, modelo 315 SE; - placa aquecedora Corning, modelo CP 420; -sistema de filtração Millipore®; - membrana para filtração 0,22 µm Millipore®, modelo GSWP 04700; - mufla EDG Equipamentos, modelo EDGCON 3P.

4.2.Vidraria e outros materiais

A vidraria foi a rotineiramente usada no LPB (Laboratório de Processos Biológicos) – Área de Microbiologia, do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC- USP, como descrito a seguir.

Na preparação das soluções estoque, meios de cultura e soluções padrão para cromatografia empregaram-se balões de fundo chato de diferentes volumes, provetas de 100 e 1000 mL, erlenmeyers de 1000 e 2000 mL, pipetas graduadas de 1, 2, 5 e 10 mL, beckers de 50, 100, 200, 500 e 1000 mL, funis de separação de 60 e 1000 mL, funis comuns, placas de relógio, placas de Petri e bastão de vidro. Para armazenar as soluções foram empregados frascos de antibióticos de 20, 30 e 50 mL, frascos de vidro de borossilicato de 250 mL e frascos de Duran SCHOTT de 500 mL.

Nos experimentos para ativação metanogênica do lodo foram utilizados como reatores frascos de Duran SCHOTT de 1000 e 2000 mL, e nos ensaios para avaliar a degradação do TCE, os reatores foram frascos de vidro de borossilicato de 250 mL.

Os frascos de antibiótico empregados para a determinação do NMP foram fechados com batoques de borracha de butila e lacre de alumínio. Nos estudos da biodegradação de TCE foram empregados frascos de borossilicato fechados com batoques de borracha de butila revestidos internamente com Teflon (Wheaton). Os frascos de Duran de 500, 1000 e 2000 mL foram fechados com tampas com rosca e borracha de butila. Para a preparação do NMP, os lodos foram previamente macerados e homogeneizados com o auxílio de pérolas de vidro de 6 mm em diâmetro.

A inoculação dos lodos, adições de soluções e retirada de amostras foram feitas utilizando-se seringas estéreis descartáveis de 1, 3, 5, 10 e 20 mL, acopladas a agulhas, também estéreis e descartáveis de diferentes calibres. Na determinação do STV (Sólidos Totais Voláteis) utilizaram-se cápsulas de porcelana de 150 mL para a queima na mufla.

Na preparação dos padrões e amostras para a cromatografia dos ácidos orgânicos voláteis foram utilizadas micropipetas Gilson® com diferentes volumes.

Os gases utilizados nos diferentes ensaios foram fornecidos pela White-Martins, e foram: - metano (100%) para determinação da curva analítica (calibração) do metano; - nitrogênio puro grau analítico; - mistura gasosa N₂/CO₂ (70:30% v/v); - H₂/CO₂ (80:20% v/v).

4.3.Procedimentos experimentais

4.3.1.Coletas e manutenção dos lodos no laboratório

Foram estudados dois tipos de lodos, um de origem termofílica e outro de origem mesofílica. O lodo termofílico, T, foi coletado em um biodigestor anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) da Usina São Martinho, do Grupo Monte Sereno, Pradópolis-São Paulo, operado a 55±2°C (VAZOLLER, 1995). A amostra foi coletada no período de entre-safra da produção de álcool, em Fevereiro de 1999, diretamente no reator, através de uma torneira situada na parte inferior do mesmo, como mostrado na Figura 12. A amostra foi acondicionada em um recipiente de plástico previamente lavado com detergente Extran preparado em água destilada (5% v/v). O transporte do lodo até o laboratório foi feito à temperatura ambiente, por cerca de duas horas. A amostra foi então mantida sob refrigeração, a temperatura de 4°C, no mesmo recipiente de coleta.

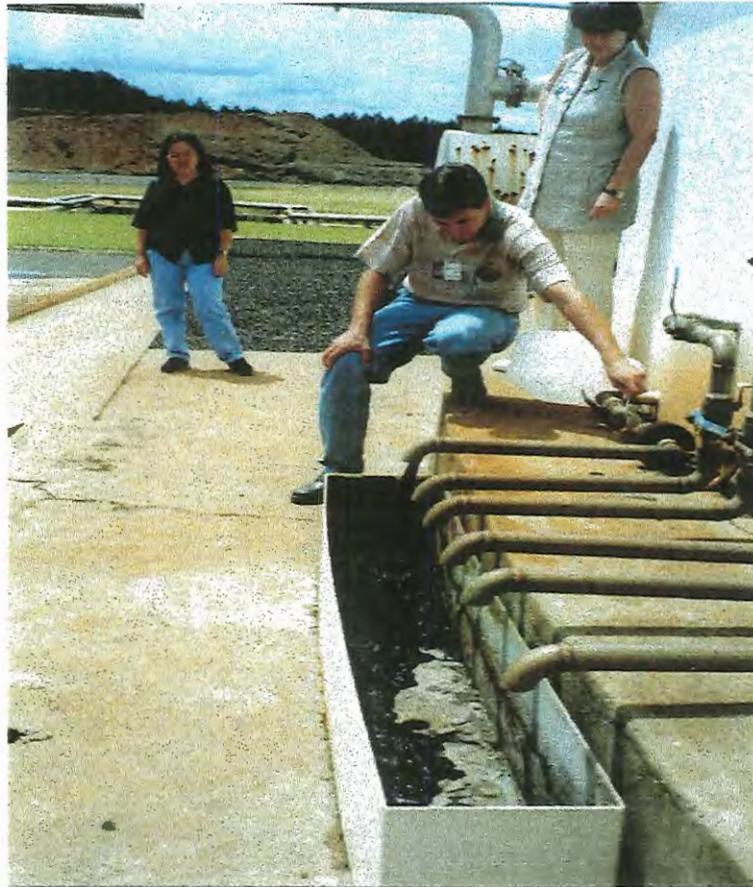


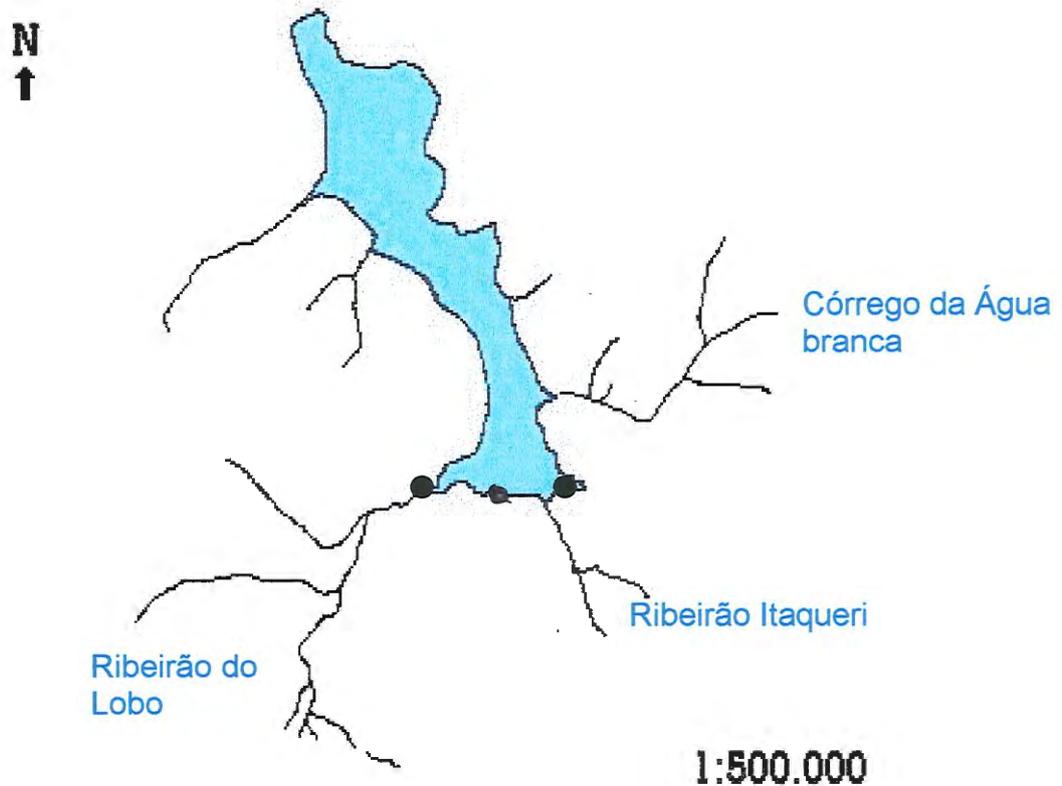
Figura 12. Visão das torneiras do reator termofílico do UASB durante a coleta do lodo - Usina São Martinho.

A coleta de amostra de sedimento da Represa do Lobo (Broa)-Itirapina/SP foi realizada em 15 de Junho de 1999, por volta das 14 horas.

Foram amostrados 3 pontos, cujas amostras foram homogeneizadas no laboratório imediatamente após a coleta. Os pontos escolhidos estavam próximos ao Ribeirão Itaqueri e Ribeirão do Lobo, como mostrado na Figura 13. As amostras coletadas foram mantidas sob refrigeração (4°C). Essa coleta foi sugerida e supervisionada pela Profa. Assoc. Maria do Carmo Calijuri.

Com o auxílio de uma multisonda U10 da Horiba foram determinados os seguintes parâmetros durante a coleta: temperatura do sedimento variou de 18°C a 22°C , a uma profundidade que variou de 0,80 a 3,0 m e os teores de oxigênio dissolvido no sedimento foram de $3 \text{ mgO}_2/\text{L}$.

Represa do Lobo, Itirapina.



●→ pontos de amostragem

Figura 13. Representação esquemática dos pontos da coleta dos sedimentos da Represa do Lobo.

A coleta seguiu as rotinas utilizadas pelos pesquisadores do Centro de Recurso Hídricos e Ecologia Aplicada – SHS – EESC –USP, ou seja, empregou-se uma draga - tipo de Ekman, e o sedimento foi depositado em 3 sacos plásticos estéreis e transportado para o laboratório. O transporte das amostras para o laboratório foi realizado à temperatura ambiente, e durou cerca de meia hora após as coletas. Como já observado, das amostras coletadas retiraram-se alíquotas iguais que foram homogeneizadas, colocadas em um recipiente plástico previamente lavado com detergente Extran em água destilada (5% v/v) e armazenadas sob refrigeração a 4°C.



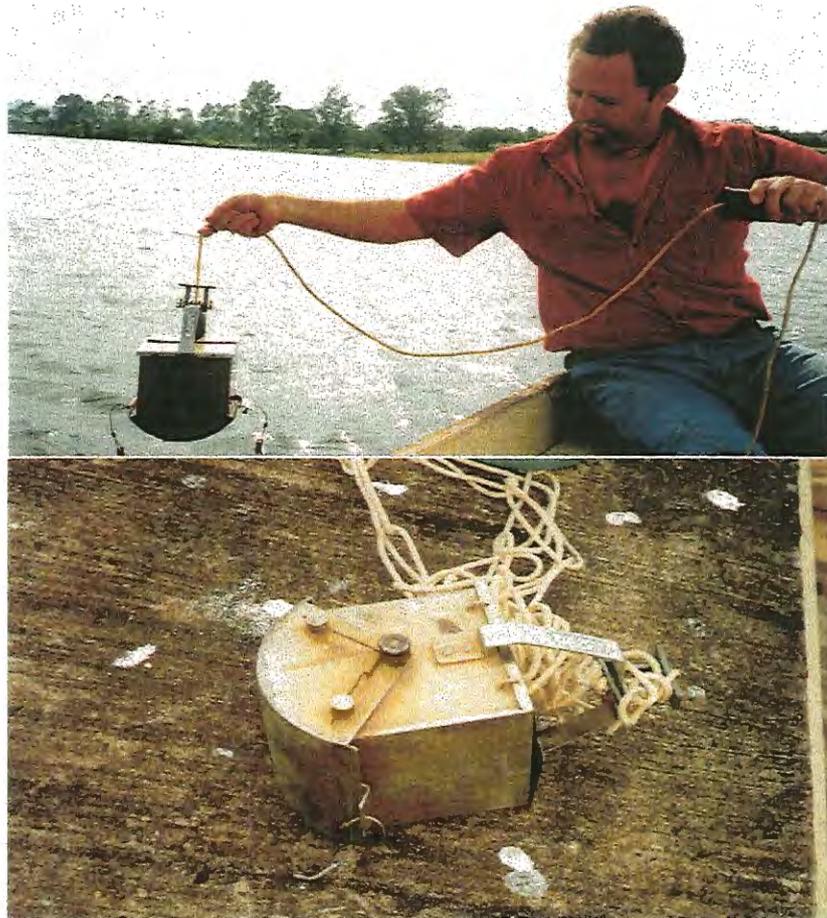


Figura 14. Visão da coleta de sedimentos e da draga (Ekman) empregada na coleta de sedimentos

4.3.2 Procedimentos para a preparação, distribuição e preservação das soluções estoques

Os procedimentos usados na preparação, distribuição e preservação das soluções estoques e meio de cultivo foram os recomendados pela área de Microbiologia do LPB-SHS-EESC-USP descritos por VAZOLLER (1995b).

4.3.2.1. Limpeza e esterilização

Os experimentos realizados sob condições anaeróbias adotaram determinados procedimentos de limpeza e assepsia, descritos a seguir:

4.3.2.1.1.Limpeza de vidraria

A vidraria utilizada foi lavada com Extran diluído em água destilada (5% v/v), e enxaguada em água corrente por diversas vezes para a remoção total do detergente. Após secagem, a vidraria foi lavada com solução sulfocrômica e enxaguada abundantemente com água corrente e então enxaguada com água destilada, por no mínimo três vezes.

4.3.2.1.2.Tampas de borracha butila e revestida com Teflon

As tampas de borracha butila e as tampas de borracha de butila revestidas com Teflon® foram fervidas durante 40 min em solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v). Após resfriamento, a solução de bicarbonato de sódio foi descartada e as tampas foram enxaguadas em água corrente e água destilada.

4.3.2.1.3.Esterilização à calor úmido em autoclave

Os frascos de antibiótico e/ou de soro foram colocados esterilizados a calor úmido, em autoclave, com as respectivas bocas cobertas com papel alumínio, além de serem embrulhados em papel comum (comercial rosa). As tampas de borracha butila foram colocadas dentro de uma placa de Petri para serem autoclavadas antes de seu uso.

O sistema de filtração Millipore (suporte de membranas, membranas, e kitassato), empregado na esterilização a frio de soluções, foi também esterilizado por autoclavação. As membranas para filtração foram embrulhadas individualmente com papel alumínio e colocadas em uma placa de Petri. Pipetas e mangueiras foram acopladas e tiveram as extremidades cobertas por papel alumínio, assim como o kitassato. As pinças tiveram a ponta coberta com papel alumínio e as seringas e as agulhas foram colocadas em caixas de metal, embrulhadas em papel, rotuladas, e acondicionadas em beckers de aço inoxidável.

A esterilização por autoclavação foi feita a 120°C e 15 psi, por 20 min.

4.3.2.1.4. Esterilização a frio em sistema Millipore.

A filtração em sistema Millipore empregou membrana de 0,22 μm . As soluções de vitaminas, tampão (bicarbonato de sódio) e redutora - sulfeto, que serão descritas posteriormente foram esterilizadas a frio. Os procedimentos foram adotados buscando-se manter condições de anaerobiose, imediatamente antes e após a filtração das soluções. Para isso, o forno removedor de oxigênio foi ligado, assim como foi deixado um bico de Bunsen aceso, próximo ao local destinado a montagem do sistema de filtração. Um fluxo de nitrogênio (100%) foi introduzido no kitassato, por uma das mangueiras do sistema de distribuição simultâneo de gases, por 20 min. Após o que, montou-se o sistema de Millipore, e então fechou-se o fluxo de nitrogênio. Procedeu-se a filtração à vácuo, e novamente um fluxo de nitrogênio (100%) foi introduzido, sob condições estéreis. A solução em questão, foi então distribuída com um auxílio de uma pipeta, em frascos adequados, também sob fluxo de nitrogênio (100%).

4.3.3. Procedimentos para a preparação do meio de cultivo e demais soluções

Foram adotados procedimentos para a remoção de traços de oxigênio de todas as soluções e meio de cultura utilizados, sendo eles o uso de um gás isento de oxigênio (como descrito no item 4.1.1) e o emprego de solução redutora de sulfeto de sódio. Para a manutenção das condições de assepsia e anaerobiose, a adição do inóculo e/ou das soluções preparadas (eg. fonte de carbono) foram feitas utilizando-se seringas estéreis, previamente lavadas com N_2 (100%). Para tal foi utilizada uma seringa de vidro de 3 mL preenchida com algodão e acoplada ao sistema de distribuição de gases por uma mangueira. Para evitar um aumento de pressão interna em cada um desses frascos, foi colocada uma agulha estéril na tampa de borracha para o escape de vapores/gases antes das determinações da concentração de metano no "headspace". As tampas dos frascos foram flambadas a cada inoculação. Esse procedimento foi o seguido no Laboratório de Microbiologia

do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP (VAZOLLER, 1995).

4.3.3.1. Composição e preparo do meio de cultivo

O meio de cultura empregado foi denominado Zinder, anteriormente utilizado por VAZOLLER (1995); SAKAMOTO (1996); LARIZZATTI (1997) e OLIVEIRA (1998), e descrito na Tabela 5. O meio Zinder foi sempre preparado em 1.000 mL de água padrão Milli-Q previamente fervida, em um Erlenmeyer de 2000 mL. Os sais e reagentes foram dissolvidos em um volume de 500 mL de água Milli-Q fervida, na ordem dada na Tabela 5, após o que o volume era completado a 1.000 mL. Fazia-se a introdução de um fluxo de nitrogênio (100%) por 30 min. O meio Zinder era então distribuído em frascos de antibióticos sob o fluxo de nitrogênio (100%), em alíquotas específicas de até 10 mL para as contagens por NMP, ou volumes superiores nos frascos de reação para os testes de degradação. Os frascos eram fechados com o batoque de borracha de butila (podendo ser revestido com Teflon®) e lacrados com lacre de alumínio ou tampa de rosca perfurada centralmente. Eram autoclavados por 20 min, a 120°C e 15psi. O meio de cultivo basal era armazenado à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Tabela 5. Composição básica do meio Zinder

Componentes	Água padrão Milli-Q / q.s.p. 1000 mL
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% m/v	1,0 mL
Solução traços de metais	10,0 mL

Fonte: VAZOLLER (1995a).

4.3.3.2.Solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v)

A solução estoque de bicarbonato de sódio 10 % (m/v) foi preparada pela dissolução de 100 g desse reagente em 1 L de água Milli-Q previamente fervida em um erlenmeyer de 2 L, por 15 min. Após resfriamento da água à temperatura de aproximadamente 40°C, dissolveu-se o bicarbonato de sódio, e então borbulhou-se o gás nitrogênio (100%), durante 20 min, introduzido no frasco com o auxílio de uma pipeta invertida. A solução foi então esterilizada a frio no sistema Millipore, o fluxo de nitrogênio foi mantido até o término da distribuição da solução em frascos de antibióticos de 50 mL previamente esterilizados. Os frascos foram armazenados à temperatura ambiente, sob ausência de luz.

4.3.3.3.Solução de vitaminas

As vitaminas foram pesadas e adicionadas na ordem dada na Tabela 6, em água padrão Milli-Q fervida por aproximadamente 15 min, contida em um erlenmeyer de 2 L, e sob fluxo de nitrogênio (100%). A solução foi esterilizada à frio, em sistema Millipore, e o fluxo de nitrogênio foi mantido até o término da distribuição da solução de vitaminas em frascos de soro de 250 mL, previamente autoclavados. Os frascos foram fechados sob anaerobiose e armazenados sob refrigeração, protegidos da luz.

Tabela 6. Composição da solução de vitaminas

Componentes	Água padrão Milli-Q / q.s.p. 1000 mL
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina.HCl	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantetonato de cálcio	0,005 g
Piridoxina.HCl	0,010 g
Vitamina B ₁₂	0,0001 g

Fonte: VAZOLLER (1995b).

4.3.3.4. Solução traço de metais

A solução traço de metais foi preparada pela dissolução inicial de NTA (ácido nitrilotriacético) em 200 mL de água padrão Milli-Q. Elevou-se então o pH para 7 com uma solução de KOH 10% m/v e adicionou-se mais 600 mL de água padrão Milli-Q. Posteriormente, dissolveu-se os demais sais na ordem e quantidade apresentada na Tabela 7, e completou-se o volume para 1000 mL com água Milli-Q. Sob fluxo de nitrogênio (100%), por 20 min, a solução foi dividida em 2 frascos de 500 mL. Os frascos foram então fechados sob anaerobiose, autoclavados e armazenados sob refrigeração.

Tabela 7. Composição da solução traço de metais

Componentes	Água padrão Milli-Q / q.s.p. 1000 mL
Ácido nitriloacético (NTA)	4,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,086 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21 g
H ₃ BO ₃	0,19 g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,0366 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g

Fonte: VAZOLLER (1995a)

4.3.3.5. Solução redutora de sulfeto de sódio

Para o preparo da solução redutora de Na₂S.9H₂O 5% m/v, antes da pesagem do sal, este foi colocado para secar em papel de filtro para retirar o excesso de água. Água padrão Milli-Q foi fervida para a retirada do oxigênio e então sob fluxo de nitrogênio foi resfriada à temperatura de 40°C. O sal foi dissolvido e a solução foi homogeneizada e esterilizada em membrana 0,22 µm da Millipore, sempre sob o fluxo de nitrogênio (100%). Essa solução foi, em seguida, distribuída em frascos de antibióticos de 50 mL, previamente

esterilizados em autoclave. Os frascos foram fechados sob anaerobiose, armazenados à temperatura ambiente e na ausência de luz.

4.3.3.6.Solução indicadora de resazurina 0,1% (m/v)

A solução indicadora do potencial de oxi-redução do meio de cultivo foi a resazurina 0,1% m/v. Pesou-se 1g desse corante e diluiu-se em 100 mL de água Milli-Q. A solução indicadora foi mantida sob refrigeração, em frasco âmbar.

4.3.3.7.Solução de extrato de levedura 2% (m/v)

No preparo da solução de extrato de levedura, 4 g de extrato de levedura foram dissolvidos em 200 mL de água padrão Milli-Q, e um fluxo de nitrogênio (100%) foi introduzido na solução por 10 min. A solução foi distribuída em frascos de antibióticos, sob fluxo de nitrogênio. Os frascos foram fechados sob anaerobiose, autoclavados, armazenados à temperatura ambiente e na ausência de luz.

4.3.3.8.Solução anaeróbia de diluição

A solução anaeróbia de diluição foi utilizada nos ensaios do método do NMP. Ferveu-se 1 L de água padrão Milli-Q e borbulhou-se N_2/CO_2 (70:30% v/v) até a temperatura atingir 40°C, então adicionou-se 2,0 mL de solução de resazurina 0,1% m/v, 3,98 g de bicarbonato de potássio e 6,6 g de tris-hidroximetilaminometano. O pH foi ajustado para 7,0 com uma solução de KOH 3 moles/L. Borbulhou-se N_2/CO_2 (70:30% v/v) por 30 minutos e ainda sob o fluxo, a solução foi distribuída em alíquotas de 8,8 mL para frascos de antibióticos de 20 mL. Em seguida, esses frascos foram etiquetados, autoclavados e armazenados à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Antes de usar a solução anaeróbia de diluição, adicionou-se nessa solução 0,2 mL de solução redutora de sulfeto de sódio, elevando-se assim o volume final para 9,0 mL.

4.3.4.Preparo das soluções estoques de substratos orgânicos

Na preparação das soluções de acetato de sódio (54,43 g, Synth) 2 moles/L, formiato de sódio (27,21 g, Vetec) 2 moles/L, propionato de sódio (38,81 g, Aldrich) 2 moles/L, succinato de sódio (54,03 g, BDH-GPR™, Limited Poole England) 1 mol/L, butirato de sódio (22,46 g, Aldrich) 1 mol/L, sulfato de sódio (28,40 g, Synth) 1 mol/L, glicerol (36,02 g, Synth) 2 moles/L, metanol (1,75 mL Mallinckrodt) 2 moles/L, etanol (2,63 g, Synth) 2 moles/L e lactato de sódio (100 mL ácido láctico 4 mol/L (Reagen), com 100 mL NaOH 4 mol/L (Merk)) 2 moles/L, seguiu-se o mesmo procedimento. Após a pesagem do reagente, esse foi dissolvido em água padrão Milli-Q e transferido para um balão volumétrico de 200 mL. Cada solução preparada foi então transferida para um erlenmeyer de 500 mL e borbulhou-se nitrogênio (100%) por 20 min e, então, sob o mesmo fluxo de nitrogênio procedeu-se a distribuição de alíquotas em frascos de antibiótico de 50 mL. As soluções foram esterilizadas por autoclavação, e etiquetadas, após o que foram armazenadas à temperatura ambiente e na ausência de luz.

4.3.4.1.Solução estoque e soluções padrão de TCE em metanol

A solução estoque de TCE (Supelco) foi preparada, pesando-se em uma balança analítica, 0,5600 g desse composto organoclorado com auxílio de uma seringa de 1 mL. Essa massa foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 10 mL, sendo esse volume completado com metanol p.a., previamente esterilizado e sob atmosfera anaeróbia. Em seguida, transferiu-se essa solução para um frasco de antibiótico de 30 mL coberto com papel alumínio. O frasco foi fechado com um batoque de borracha butila revestido com Teflon® e lacre de alumínio. Essa solução, contendo uma concentração de 56 mg TCE/mL, foi então armazenada em

um congelador (temperatura ~ -20 °C), e utilizada na preparação das soluções padrões.

Uma solução padrão de TCE 1,157 mg/mL em metanol 2 moles/L foi preparada a partir da solução estoque. Um volume de 2,1 mL dessa solução estoque de TCE em metanol foi transferido para um frasco de borossilicato de 250 mL, previamente esterilizado. Em seguida, adicionaram-se 92 mL de água Milli-Q e 5,9 mL de metanol p.a. esterilizados e livres de oxigênio.

Uma solução padrão de TCE 0,4368 mg/mL em metanol 2 moles/L foi preparada a partir da solução estoque. Um volume de 0,78 mL dessa solução estoque de TCE em metanol foi transferido para um frasco de borossilicato de 250 mL, previamente esterilizado. Em seguida, adicionaram-se 92 mL de água Milli-Q e 7,22 mL de metanol p.a. esterilizados e livres de oxigênio.

4.3.4.2. Soluções de referência de TCE para curva de calibração

As soluções de referência de TCE usadas para a determinação da curva de calibração foram preparadas em um balão de 20 mL, em que adicionou-se 17,2 µL da solução estoque de TCE em metanol (item 4.3.4.1.) ao meio de cultura basal Zinder. Foram adicionadas no meio previamente tamponado, reduzido e acrescido das soluções nutrientes, ou seja, após a adição das soluções tampão de bicarbonato de sódio, redutora de sulfeto de sódio, vitaminas e fontes de carbono, sob atmosfera de N₂/CO₂ (70:30% v/v), composição e concentrações usadas no estudo da biodegradação do TCE. Após homogeneização manual foi retirada uma alíquota de 2 mL. Esse volume foi transferido quantitativamente para um funil de separação e o TCE da solução aquosa foi extraído 3 vezes com 5 mL de hexano. Em cada uma das etapas de extração, agitou-se a alíquota manualmente por 1 minuto. As soluções de referência de TCE empregadas foram: 5ppb; 20ppb; 50ppb; 100ppb; 300ppb; 400ppb e 600ppb, preparadas à partir de uma solução de 1 ppm. Todas essas soluções de referência foram acondicionadas em frasco de antibiótico de 25 mL, previamente recoberto com papel alumínio,

etiquetado e fechado com batoque de butila revestido com Teflon® e lacre de alumínio. Esses frascos foram armazenados em um congelador à - 20°C.

4.4.Procedimento para determinação dos sólidos totais voláteis (STV)

As determinações dos sólidos totais voláteis (STV) dos lodos usados foram feitas no início e no final de cada reativação dos lodos. Ademais, determinou-se o STV após cada estudo de degradação do TCE com os lodos termofílico e mesofílico, realizados em duplicata ou triplicata.

Duas cápsulas de porcelana de tamanho médio foram lavadas com Extran 5% (m/v) e enxaguada em água corrente e água destilada, após secagem a temperatura ambiente as cápsulas foram marcadas e então colocadas em uma mufla para serem calcinadas à $550 \pm 50^\circ\text{C}$ até peso constante. Desligou-se a mufla e esperou a temperatura da mesma atingir 150°C . Em seguida, transferiu-se as cápsulas para uma estufa e depois para um dessecador de vidro até atingir a temperatura ambiente, sendo então pesadas, obtendo-se o valor de P_0 .

Após homogeneização do lodo, alíquotas de 20 mL foram transferidas quantitativamente para cápsulas de porcelanas com o auxílio de uma proveta. Essas cápsulas eram novamente levadas à estufa à temperatura de $103\text{-}105^\circ\text{C}$, por 24 horas, e então pesadas para a obtenção do valor de P_1 . Em seguida, foram transferidas para uma mufla e calcinadas à temperatura de $550 \pm 50^\circ\text{C}$ até peso constante, sendo então pesadas para a obtenção de P_2 .

O valor dos sólidos totais foi calculado empregando-se a Equação 1:

$$\text{mg de sólidos totais/L} = ((P_1 - P_0) \times 1000) / \text{vol. da amostra em L}$$

O valor dos sólidos totais voláteis foram calculados empregando-se a Equação 2:

$$\text{mg de sólidos totais voláteis/L} = ((P_1 - P_2) \times 1000) / \text{vol. da amostra em L}$$

Nesse trabalho, expressar-se-ão os resultados de ST e STV em g/L.

4.5.Procedimentos para ativação da metanogênese das amostras

Adotou-se prática de amostragem conhecida para a coleta do lodo termófilo (VAZOLLER, 1995b) e procurou-se adaptar uma forma menos agressiva aos microrganismos anaeróbios, para a coleta dos sedimentos da Represa de Broa, como geralmente utilizado em outros trabalhos de Limnologia (SILVERIO, 1999; CARMO, 2000).

4.5.1.Procedimento para ativação da metanogênese do lodo termófilo

O lodo termófilo estudado foi oriundo do biodigestor anaeróbio da Usina São Martinho, operado sob condições termofílicas a $55\pm 2^\circ\text{C}$. No período de coleta das amostras, período de entressafra da usina, o biorreator estava sob condição estacionária de operação há cinco meses, sendo mantido com uma carga orgânica inferior a da vinhaça. As amostras de lodo anaeróbio termófilo foram armazenadas após a coleta por 14 dias, sob refrigeração.

A reativação do lodo após o armazenamento foi feita em duplicata (reatores T_A e T_B) e em meio mineral Zinder (item 4.3.3.1) enriquecido com fontes orgânicas. Foram inoculados no meio previamente tamponado, reduzido e acrescido das soluções nutrientes, ou seja, após a adição das soluções tampão de bicarbonato de sódio, redutora de sulfeto de sódio, vitaminas e fontes de carbono, sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v). Os frascos reatores foram de 1 L (Duran), com um volume útil de 500 mL. A composição do meio utilizado para ativar a metanogênese do lodo termófilo está apresentada na Tabela 8.

A inoculação foi feita com o lodo termófilo à temperatura ambiente, e após ser homogeneizado com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, foi transferido para um béquer e mantido sob um de fluxo da mistura dos gases nitrogênio e dióxido de carbono (70/30%v/v), por 20 min. Com o auxílio de uma proveta mediu-se 100 mL de lodo, que foi imediatamente transferido para o frasco contendo o meio de cultura Zinder suplementado. Os procedimentos foram feitos sob condições de assepsia e fluxo constante

da mistura gasosa. Os frascos foram fechados com batoque de butila e tampa de rosca.

A despressurização dos reatores foi feita antes da coleta de amostras para determinação do metano por cromatografia gasosa, empregando-se um manômetro (a pressão era então igualada a 1 atm).

Os frascos foram incubados sob agitação controlada a 150 rpm e temperatura de $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A Figura 15A, apresentada no item 4.5.2, mostra o frasco contendo o lodo termófilo T, que foi incubado por 219 dias. Durante o tempo de incubação do lodo termofílico, esse foi realimentado a cada 20 dias aproximadamente (especificamente no 22°, 44°, 66°, 88°, 110°, 131°, 154°, 176° e 199° dias de incubação), com 5 mL de glicose 1 mol/L e 5mL de acetato de sódio 2 moles/L e rotineiramente determinou-se a concentração de metano no "headspace". Essas determinações foram interrompidas nos dias 88° a 130°, quando o cromatógrafo foi para a oficina para reparos e também troca da coluna.

Tabela 8. Concentração final e volume das soluções usados na ativação metanogênica do lodo termófilo T.

Componentes	VOLUME adicionado/mL	Concentração Final
Meio Zinder	342,50	-
Bicarbonato de sódio 10% (m/v)	5	0,1% (m/v)
Solução de vitamina	5	-
Redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v)	5	0,05% (m/v)
Acetato de sódio 2 moles/L	5	20 mmoles/L
Propionato de sódio 2 moles/L	5	20 mmoles /L
Glicose 1 mol/L	5	10 mmoles /L
Butirato de sódio 1 mol/L	10	20 mmoles /L
Lactato de sódio 2 moles/L	5	20 mmoles /L
Sulfato de sódio 1 mol/L	5	10 mmoles /L
Metanol 2 moles/L	5	10 mmoles /L
Extrato de levedura 2% (m/v)	2,5	0,01% (m/v)
Inóculo	100	-



Figura 15. Frascos reatores utilizados na ativação da metanogênese do lodo termófilo (A) e lodo mesófilo (B)

4.5.2. Procedimento para ativação da metanogênese do lodo mesófilo

Os sedimentos ou lodo mesofílico denominado reator B foi ativado 8 dias após a sua coleta. Para a ativação do lodo foram usados frascos de Duran de 1 L com um volume útil de 500 mL, em duplicata (B₁ e B₂). Os procedimentos foram os mesmos descrito para a reativação metanogênica do lodo termófilo. Após a coleta o lodo foi armazenado até a ativação por 8 dias sob refrigeração a 4°C. As concentrações e volumes das soluções usados na ativação dos lodos B₁ e B₂ estão apresentadas na Tabela 9. Os frascos reatores B₁ e B₂ foram incubados por 190 dias, em uma estufa sob agitação controlada de 200 rpm e temperatura de 25 ± 2°C. A Figura 15B mostra o frasco contendo o lodo mesófilo B. Durante o tempo de ativação metanogênica do lodo mesofílico esse foi realimentado em intervalos de 40 dias (especificamente 40^o, 80^o, 120^o, 160^o) com 5 mL de formiato de sódio 2 moles/L e 2,5 mL de metanol 2 moles/L. Como acima exposto, houve uma interrupção das determinações de metano entre os dias 57 e 101.

Tabela 9. Concentração e volume das soluções usados na ativação metanogênica do lodo mesófilo B

Componentes	Volume adicionado/mL	Concentração Final
Meio Zinder	355	
Bicarbonato de sódio 10% <i>m/v</i>	5	0,1% (<i>m/v</i>)
Solução de vitamina	5	-
Redutora de sulfeto de sódio 5% <i>m/v</i>	5	0,05% (<i>m/v</i>)
Acetato de sódio 2 moles/L	5	20 mmoles/L
Formiato de sódio 2 moles/L	5	20 mmoles/L
Butirato de sódio 1 mol/L	10	20 mmoles/L
Lactato de sódio 2 moles/L	2,5	10 mmoles/L
Metanol 2 moles/L	2,5	10 mmoles/L
Etanol 2 moles/L	5	20 mmoles/L
Inóculo	100	-

4.6. Procedimentos para a avaliação quantitativa dos grupos microbianos anaeróbios metanogênicos e não metanogênicos

Para quantificar os grupos microbianos anaeróbios termófilos e mesófilos metanogênicos e não metanogênicos escolheu-se a técnica do NMP (Número Mais Provável). Segundo VAZOLLER (1995a), a técnica mais usual na avaliação quantitativa da biomassa anaeróbia é a contagem do NMP. Essa técnica é considerada bastante simples e de fácil manuseio, como a inoculação de culturas anaeróbias em meio líquido por intermédio de pipetas e/ou seringas. Pelos resultados do método pode-se indicar a ordem de magnitude das culturas presentes nas amostras com certa precisão.

Para avaliar a presença de grupos de microrganismos específicos pode-se levar em conta aspectos relacionados ao metabolismo celular, uma vez que as fontes nutricionais (fontes de carbono) podem ser utilizadas em separado nos ensaios.

O método do NMP permite ainda avaliar a presença de diferentes grupos microbianos mesmo sem eliminar as interações microbianas em pequenos flocos, e ainda permite combinações para culturas específicas de microrganismos em amostras de diferentes procedências (DOLFING et al., 1985; SAKAMOTO, 1996).

O método do NMP ou método da diluição foi adaptado pelo Laboratório de Processos Anaeróbios (L.P.A.-SHS-EESC-USP) para ser utilizado na avaliação da comunidade de anaeróbios estritos em amostras de biorreatores, resíduos e ambientais (DUBOURGUIER, 1987; VAZOLLER, 1995; SAKAMOTO, 1996).

O método consistiu na inoculação dos lodos metanogênicos, ou seja, depois que sofreram ativação (item 4.5.1 e 4.5.2) em frascos preparados com meio de cultura contendo fontes orgânicas específicas para o crescimento de grupos de microrganismos presentes nas etapas da digestão anaeróbia (Figura 1). Após o período de incubação, o crescimento dos organismos (frascos positivos) foi avaliado pela presença de turbidez, e formação de produtos, no caso o gás metano e exames microscópicos, sobretudo pela presença de fluorescência das células metanogênicas.

Combinações das respostas positivas foram a base do cálculo para estimar o NMP, utilizando-se a Tabela Padrão de Probabilidade (APHA-AWWA, 1992), que confere o limite de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

Para as contagens do NMP do lodo termófilo foram utilizados frascos de antibióticos de 30 mL, com um volume útil final de 10 mL. Os frascos foram incubados à $55 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 20 dias. As diluições estiveram na faixa de 10^{-1} a 10^{-9} , e foram feitas em quintuplicata.

O meio de cultura foi o basal Zinder acrescido das seguintes soluções, após autoclavação: 0,1 mL de solução de bicarbonato de sódio 10% m/v, 0,1 mL de solução de vitaminas, 0,1 mL de solução redutora de sulfeto de sódio 5% m/v e adição separada das fontes de carbono: 0,1 mL de uma solução de acetato de sódio a 2 moles/L; 0,1 mL de uma solução de formiato de sódio a 2 moles/L; 0,1 mL de uma solução de butirato de sódio a 2 moles/L; 0,1 mL de uma solução de propionato de sódio a 2 moles/L; 0,1

mL de uma solução de metanol a 2 moles/L; 0,2 mL de uma solução de glicose a 1 mol/L; 0,1 mL de uma solução de glicerol a 2 moles/L; cinco frascos contendo 0,1 mL de uma solução de acetato de sódio a 2 moles/L e 0,1 mL de uma solução de sulfato de sódio a 1 mol/L; cinco frascos contendo 0,1 mL de uma solução de lactato de sódio a 2 moles/L e 0,1 mL de uma solução de sulfato de sódio a 1 mol/L; cinco frascos contendo 0,1 mL de uma solução de propionato de sódio a 2 moles/L e 0,1 mL de uma solução de sulfato de sódio a 1 mol/L, sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v). Cinco frascos foram fechados sob atmosfera de H_2/CO_2 (80:20% v/v), a 1 atm de pressão e outros cinco frascos controle foram fechados sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v), a 1 atm de pressão, sem adição de fontes orgânicas.

Os frascos foram inoculados com 1 mL da amostra do lodo anaeróbio termófilo ativado. Para cada ensaio de NMP foi retirado com o auxílio de seringas estéreis um volume de 12 mL do lodo, sendo transferido sob atmosfera de nitrogênio (100%) para um frasco de antibiótico de 50 mL contendo 10 g de pérolas de vidro, previamente esterilizadas. O lodo foi então homogeneizado manualmente, por 30 minutos. Os grânulos forma desfeitos ou rompidos por essa técnica.

Seguindo os procedimentos do NMP, 1 mL do lodo homogeneizado foi transferido para os frascos contendo 9 mL de solução de diluição anaeróbia, perfazendo um volume de 10 mL, então 1 mL distribuído para os frascos contendo os meios de cultura específicos. As diluições e inoculações foram feitas utilizando seringas de insulina estéreis de 1 mL. Os frascos foram fechados com batoque de borracha de butila e lacrados com selo de alumínio. A incubação foi estática em estufa com temperatura controlada a $55 \pm 1^\circ C$. Após 20 dias, foi realizada a leitura.

Para a quantificação dos lodos mesófilos os procedimentos foram semelhantes aos ensaios de NMP descritos para os termófilos, observando-se as seguintes diferenças, a temperatura de armazenamento foi de $25 \pm 1^\circ C$; a leitura das análises microscópicas e cromatográficas foram feitas após 30 dias, pois o lodo mesófilo necessita de um período maior de incubação. Além disso, o meio de cultura basal Zinder foi acrescido das seguintes soluções após autoclavação: 0,1 mL de solução de bicarbonato de

sódio 10% (m/v), 0,1 mL de solução de vitaminas, 0,1 mL da solução redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v) e adição separada das fontes de carbono: 0,1 mL de uma solução de acetato de sódio a 2 moles/L; 0,1 mL de uma solução de formiato de sódio a 2 moles/L; 0,1 mL de uma solução de etanol a 2 moles/L; 0,05 mL de uma solução de lactato de sódio a 2 moles/L; 0,05 mL de uma solução de metanol a 2 moles/L; sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v). Cinco frascos controle foram fechados sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v), a 1 atm de pressão, sem adição de fontes orgânicas.

Após o ensaio da degradação do TCE realizou-se uma nova contagem do NMP com o lodo termófilo. Neste ensaio os procedimentos foram os mesmos adotados na primeira contagem do NMP. As fontes de carbono escolhidas foram: - uma solução de formiato de sódio a 2 moles/L; uma solução de metanol a 2 moles/L; uma solução de glicose a 1 mol/L; uma solução de acetato de sódio a 2 moles/L; uma solução de sulfato de sódio a 1 mol/L; H_2/CO_2 (80:20% v/v) e os controles foram fechados sob a atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v), sem adição de outra fonte orgânica. Os melhores resultados obtidos da primeira contagem, quanto à produção do gás metano e pelos exames microscópicos, determinaram a escolha das fontes de carbono na segunda contagem.

Para a segunda contagem dos organismos mesófilos ao término do ensaio da biodegradação do TCE foram escolhidas as seguintes fontes de carbono: - uma solução de formiato de sódio a 2 moles/L; uma solução de lactato de sódio a 2 moles/L; uma solução de metanol a 2 moles/L; os controles foram fechados sob a atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v), sem adição de fonte orgânica. Os procedimentos foram os mesmos adotados na primeira contagem e a escolha das fontes foi relacionada com os resultados obtidos na primeira contagem.

4.7.Procedimentos para os estudos sobre decaimento de TCE

Os ensaios sobre o decaimento (biodegradação) do TCE foram realizados em frascos de vidro de borossilicato de 250 mL, especialmente construídos com uma abertura (boca) específica para adaptar os batoques

revestidos internamente com Teflon® e fechá-los com tampas de rosca furadas no centro. Para estudos com compostos orgânicos clorados a rolha com Teflon® é necessária devido a volatilização dos mesmos. Os reatores foram montados seguindo os mesmos procedimentos utilizados para a ativação metanogênica do lodo termófilo.

Foram conduzidos três experimentos, a saber:

- Acompanhamento do decaimento do TCE no lodo termófilo;
- Acompanhamento do decaimento do TCE no lodo mesófilo;
- Acompanhamento do decaimento do TCE no lodo termófilo (segundo experimento).

A concentração inicial de TCE nos reatores foi de 5mg TCE/g STV, para ambas as condições de temperatura. Para a determinação da concentração inicial de TCE do segundo experimento com o lodo termofílico supôs-se que o STV era o mesmo, pois o lodo utilizado teve a mesma origem e foi reativado seguindo o mesmo protocolo.

4.7.1. Procedimentos para os estudos sobre o decaimento termofílico do TCE

Foram feitos dois conjuntos de ensaios com o lodo termófilo, como observado na Figura 6. No primeiro experimento, foram preparadas: (a) quintuplicata (T_1 , T_2 , T_3 , T_4 e T_5) dos frascos reatores contendo TCE; (b) duplicata do controle (T_6 e T_7) sem a adição do TCE; (c) duplicata dos reatores sem inóculo (branco) (T_8 e T_9), com TCE.

A composição do meio de cultura e os volumes das soluções utilizados nos frascos reatores estão apresentados na Tabela 10. Após a montagem dos reatores estes foram colocados em sacos de pano preto (Figura 16), ficando assim protegidos da ação da luz, pois o TCE é fotossensível. A incubação foi à $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação controlada a 150 rpm. Os frascos reatores foram rotineiramente monitorados quanto à degradação do TCE, produção do gás metano, ácidos orgânicos voláteis (AOV), pH e por exame microscópico por contraste de fase e fluorescência.

Após o 62^o dia, os reatores T₁, T₂, T₅, T₆ e T₇ foram realimentados com as mesmas fontes de carbono empregadas no início das degradações e os reatores T₃ e T₄ não foram realimentados.

Tabela 10. Concentração das soluções usadas nos testes de decaimento do TCE sob condições termofílicas.

Componentes	Concentração Final
Meio Zinder	-
Bicarbonato de sódio 10% (m/v)	0,1% (m/v)
Solução de vitamina	-
Redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v)	0,05 (m/v)
Acetato de sódio 2 moles/L	20 mmoles /L
Propionato de sódio 2 mol/L	20 mmoles/L
Glicose 1 mol/L	10 mmol/L
Butirato de sódio 1 mol/L	20 mmoles/L
Lactato de sódio 2 moles/L	20 mmoles/L
Sulfato de sódio 1 mol/L	10 mmoles/L
Metanol 2 moles/L	10 mmoles/L
Extrato de levedura 2% (m/v)	0,01% m/v
Metanol 2 moles/L + TCE	20 mmoles/L e 4785 ppb
Inóculo	-
Volume útil	100 mL

O segundo experimento para o decaimento do TCE foi montado utilizando o mesmo protocolo adotado no primeiro experimento : (a) quintuplicata (T₁₂, T₂₂, T₃₂, T₄₂ e T₅₂) dos frascos reatores contendo TCE; (b) duplicata do controle (T₆₂ e T₇₂) sem a adição do TCE; (c) duplicata dos reatores sem inóculo (branco) (T₈₂ e T₉₂), com TCE. Nesse experimento foram acompanhadas a biodegradação do TCE e a atividade metanogênica do lodo termofílico.

4.7.2. Procedimentos para os estudos sobre o decaimento mesofílico do TCE

Os procedimentos adotados nos estudos com os sedimentos da Represa do Lobo, com os lodos mesófilos, foram semelhantes àqueles empreendidos com o lodo termófilo (Figura 7). A Tabela 11 apresenta a composição do meio de cultura e os volumes das soluções utilizados nos frascos reatores nesse experimento. Esse foi montado seguindo o protocolo descrito para o lodo termofílico, foram preparadas: (a) quintuplicata (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5) dos frascos reatores contendo TCE; (b) duplicata do controle (M_6 e M_7) sem a adição do TCE; (c) duplicata dos reatores sem inóculo (branco) (M_8 e M_9), com TCE.

Tabela 11. Concentração das soluções usadas nos testes do decaimento do TCE sob condições mesofílicas.

Componentes	Concentração Final
Meio Zinder	-
Bicarbonato de sódio 10% (m/v)	0,1% (m/v)
Solução de vitamina	-
Redutora de sulfeto de sódio 5% (m/v)	0,05 m/v
Acetato de sódio 2 moles/L	20 mmoles/L
Formiato de sódio 2 moles/L	20 mmoles/L
Butirato de sódio 1 mol/L	20 mmoles/L
Lactato de sódio 2 moles/L	10 mmoles/L
Etanol 2 moles/L	20mmoles/L
Metanol 2 moles/L	10 mmoles/L
Metanol 2 moles/L + TCE	10 mmoles/L e 2065 ppb
Inóculo	-
Volume útil	-100 mL



Figura 16. Frascos reatores utilizados no decaimento do TCE: **A** - reatores sem o saco de pano preto; **B** - reatores coberto com os sacos pretos e **C** - reator de controle químico (abiótico).

Os frascos reatores foram abrigados da luz, colocando-os dentro de sacos de pano preto e incubados à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação controlada de 200 rpm. Os frascos reatores foram rotineiramente monitorados quanto à degradação do TCE, produção do gás metano, ácidos orgânicos voláteis (AOV), pH e por exame microscópico por contraste de fase e fluorescência. Após o 62º dia, os reatores M_2 , M_3 , M_4 , M_6 e M_7 foram realimentados com as mesmas fontes de carbono empregadas no início das degradações e os reatores M_1 e M_5 não foram realimentados.

4.8. Procedimentos para as determinações cromatográficas

4.8.1. Procedimentos para a determinação cromatográfica do TCE

Os teores de TCE remanescentes nos frascos reatores termofílicos e mesofílicos foram determinados por cromatografia gasosa no Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da Universidade Estadual de

Campinas (UNICAMP), segundo procedimento recomendado pela US-EPA (United States Environmental Protection Agency) com pequena modificação. No lugar do pentano foi utilizado hexano nas extrações por solventes do TCE, por ser esse de menor custo, de menor volatibilidade e possuir o mesmo poder de extração daquele primeiro solvente (NELSON et al, 1987: APHA-AWWA, 1992).

O hexano (Mallinckrodt) empregado na extração do TCE, foi inicialmente purificado seguindo-se o protocolo recomendado por (PERRIN *et al*, 1980). Em um balão de fundo chato de 6 L foi adicionado 2 L de hexano e 200 mL de H₂SO₄ (concentrado). Essa mistura foi mantida sob agitação por 4 horas, sendo o ácido sulfúrico separado do solvente orgânico em um funil de separação de 1 L. O hexano foi então transferido para um balão de fundo chato de 6 L, adicionou-se 500 mL de água destilada, sendo essa mistura agitada por 20 minutos. Logo após, com o auxílio de um funil de separação a água usada na lavagem do hexano foi descartada.

Em uma etapa seguinte, ao hexano acrescentou-se 300 mL de solução de NaOH 3 moles/L, agitou-se por 2 horas, e então a solução de NaOH foi descartada em um frasco plástico e o hexano foi novamente lavado com água destilada. Para a secagem do hexano utilizou-se sulfato de sódio sólido. Finalmente, o hexano foi transferido para um balão de destilação de 2 L e colocado sob uma placa aquecedora a 150°C. A destilação do hexano foi conduzida lentamente por 12 horas e posteriormente armazenado em frasco âmbar e a temperatura ambiente.

Com o auxílio de uma seringa estéril descartável de 3 mL, retirou-se uma alíquota de 2 mL do volume útil de cada frasco reator. Esse volume foi transferido quantitativamente para um funil de separação e o TCE da solução aquosa foi extraído 3 vezes com 5 mL de hexano. Em cada uma destas etapas de extração, agitou-se manualmente por 1 minuto as duas fases. O TCE extraído no hexano foi transferido para um balão volumétrico de 20 mL e seu volume foi completado com hexano e transferido para um frasco de antibiótico de 30 mL, previamente recoberto com papel alumínio, etiquetado e fechado com batoque de butila revestido com Teflon® e lacre de alumínio. Esses frascos foram armazenados em um congelador à - 20°C,

dados a característica volátil do solvente, para posterior transporte em caixa de isopor com tampa lacrada com fita adesiva e determinação do teor de TCE no IQ da UNICAMP (ANEXO 8).

4.8.2.Procedimentos para a determinação cromatográfica do metano

O monitoramento dos frascos enriquecidos, quanto ao crescimento microbiano e a produção de gás metano foi feito por cromatografia gasosa, por meio da análise do biogás produzido pelas culturas microbianas. Alíquotas de 0,5 mL do "headspace" dos frascos reatores eram retiradas com auxílio de uma seringa com trava e analisadas no cromatógrafo a gás.

Para o cálculo da concentração do gás metano (μmol de CH_4/L), foram preparadas curvas analíticas (calibração) de metano. O Anexo 1 mostra um exemplo das curvas obtidas para o presente trabalho de pesquisa. O Anexo 13 mostra cromatogramas obtidos durante a contagem do NMP.

4.8.3.Procedimentos para determinação cromatográfica de ácidos orgânicos voláteis (AOV)

Para a determinação cromatográfica gasosa dos ácidos orgânicos voláteis, retirou-se dos frascos reatores alíquotas de 0,5 mL, com o auxílio de seringa estéreis descartáveis de 1 mL. Essas alíquotas foram diluídas em meio de esgoto sintético CALLADO (1992), para atingirem o volume final de 2 mL e então transferidas para tubos de ensaio, onde eram adicionados 0,5 g de NaCl, 50 μL de solução de H_2SO_4 , 70 μL de solução de ácido crotônico (padrão interno) e 0,60 mL de éter etílico. Os frascos eram tampados e as amostras foram agitadas por 1 minuto e então centrifugadas à 1000 rpm por 1 minuto e então armazenadas em congelador.

As curvas analítica (calibração) para os ácidos também foram preparadas utilizando o meio de esgoto sintético Torres (1994) e as concentrações de 10 a 100 mg/L. O Anexo 13 mostra um cromatograma obtido nas determinações dos ácidos orgânicos voláteis.

4.9.Procedimentos para os exames microscópicos

As observações sob microscopia foram realizadas para evidenciar a morfologia das células microbianas predominantes. As amostras examinadas ao microscópio foram os lodos utilizados como inóculo, culturas ativadas e as provenientes dos experimentos de contagem por NMP. As amostras foram examinadas sob luz comum, contraste de fase e fluorescência. Para diminuir o movimento das células nas amostras, alíquotas foram dispostas em lâminas com ágar a 2% solidificado (DSM apud OLIVEIRA, 1998).

O exame microscópico sob luz ultra-violeta confirmou a presença de organismos metanogênicos autofluorescentes, visto que em plena atividade metabólica e boas condições de crescimento estes fluorescem na cor azul esverdeada (DODDEMA & VOGELS, 1978). As lâminas eram preparadas rapidamente, colocando uma alíquota da amostra diretamente sobre a lâmina, cobrindo-a com uma lamínula.

5.RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sobre as características e atividade microbiana das amostras estudadas são apresentados e discutidos a seguir. O lodo anaeróbio termófilo granulado, oriundo do sistema de tratamento de resíduos da Usina São Martinho, um biodigestor modelo UASB - reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, e o sedimento da Represa de Broa, foram escolhidos com o fim de verificar a capacidade de duas fontes diferentes de microrganismos anaeróbios na biodegradação de um composto orgânico clorado, em geral, disposto no meio ambiente pela ação antrópica.

A primeira amostra foi considerada uma amostra "artificial", por constituir-se de um lodo cultivado em biorreator, ou seja, um sistema de tratamento de resíduos que selecionou consórcios microbianos capazes de degradar e estabilizar a matéria orgânica presente na água residuária originada da produção de álcool, a vinhaça. VAZOLLER (1995a) relatou a composição microbiana do sistema piloto operado nessa mesma usina, sob condições semelhantes às determinadas para o reator estudado na presente dissertação de mestrado, mostrando que organismos anaeróbios foram selecionados em função da composição do meio nutriente, bem como da operação e modelo do reator adotados.

No segundo caso, os sedimentos de uma represa compuseram uma amostra ambiental, em que os grupos microbianos presentes foram selecionados pelas condições naturais de um ecossistema aquático tropical considerado, no caso, não poluído. Foi constatado que algumas regiões da Represa do Lobo são zonas eutróficas, o que constituiu um critério para a escolha dos pontos a serem amostrados. A entrada da represa, como observado na Figura 13 do capítulo Material e Métodos, local das

amostragens, indica esquematicamente dois dos rios que contribuem com o sistema, Ribeirão do Lobo e Ribeirão Itaqueri, e como observado por CALIJURI¹, pontos de maior disponibilidade de matéria orgânica.

A realização de estudos que visam a diversidade da microbiota de sistemas "artificiais" e naturais contribuem para o entendimento da ação microbiana nos ciclos de nutrientes, mas sobretudo, para a compreensão da ainda imensurável capacidade degradativa dos microrganismos (CANHOS & VAZOLLER, 1999). A biodegradação de compostos orgânicos clorados ou organohalogenados é tema bastante estudado, tanto para a descoberta de novas rotas metabólicas como para a escolha de inóculos adequados ao biotratamento de resíduos ou à prática da biorremediação (VAZOLLER, 1995b).

Como apresentado nas Figuras 6 e 7, que mostram os esquemas das coletas realizadas para os lodos estudados, os experimentos foram feitos em etapas desde a coleta e cultivo para ativação metanogênica dos lodos, avaliações quantitativas e ensaios de biodegradação do TCE.

5.1. Amostras - coleta e caracterização microscópica

As maiores dificuldades para a obtenção de amostras representativas na natureza ou mesmo em biorreatores são notáveis (EMBLEY & STACKEBRANDT, 1996), principalmente em relação aos microrganismos anaeróbios. No presente trabalho, adotou-se prática de amostragem conhecida para a coleta do lodo termófilo (VAZOLLER, 1995b) (Figura 12) e utilizou-se os procedimentos comuns de outros trabalhos em Limnologia (FREITAS, 1989; SELEGHIM, 1992; CARMO, 2000) durante a coleta dos sedimentos da Represa do Lobo, atendendo alguns cuidados para evitar uma ação agressiva (promoção de aeração, por exemplo) aos sedimentos contendo os microrganismos anaeróbios.

¹ Comunicado pessoal da Profa. Dra. Maria do Carmo Calijuri.

Os pontos da coleta de sedimentos da Represa do Lobo foram determinados após um cuidadoso exame no local, sendo escolhidos os locais onde a água estava praticamente estática, ou seja, próximos à margem dessa represa. O odor era característico de pântano e constatou-se a presença de gás quando a draga entrava em contato com o sedimento. Como existiam muitos bancos de areia e de macrófitas alguns pontos da coleta foram desprezados. A draga Elkman que segundo o APHA-AWWA (1992) é descrita como ideal para coleta em locais de água parada, permitiu que o lodo fosse coletado na superfície do sedimento, ou seja interface lodo e fundo do corpo d'água. Segundo estudo anterior (SELEGHIM, 1992), a interface sedimento água é o compartimento da represa que apresenta as mais elevadas densidades microbianas.

O transporte e armazenamento do lodo foi feito seguindo os protocolos determinados (VAZOLLER, 1995b) para o lodo termófilo e descritos em 4.3.1. O presente estudo mostrou que a metodologia de coleta, transporte e armazenamento foram adequadas, uma vez que a comunidade de microorganismos anaeróbios metanogênicos presentes no sedimento da Represa do Lobo apresentaram boa atividade metanogênica. No entanto, a coleta com a draga Elkman (Figura 14) pode não ser a mais indicada em função da entrada de água durante o caminho de retirada dos sedimentos através da coluna d'água, o que pode promover a agitação e aeração da amostra.

5.1.1.Lodo granulado termófilo

A coleta do lodo granulado termófilo foi feita na entressafra (Fevereiro de 1999), período em que o biodigestor encontrava-se alimentado com melaço diluído² e mantido a temperatura de $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As amostras do lodo apresentaram coloração escura e com odor semelhante ao liberado do melaço de caldo de cana-de-açúcar.

² Comunicação pessoal dos técnicos da Usina São Martinho.

O exame microscópico sob fluorescência das amostras do lodo granulado termófilo maceradas entre lâmina e lâminula revelou o predomínio de dois tipos morfológicos de organismos metanogênicos, sarcinas semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp e bacilos semelhantes ao gênero *Methanobacterium* sp.

5.1.2. Sedimentos da Represa do Lobo

A coleta dos sedimentos da Represa do Lobo, denominados também no âmbito desse trabalho por lodo mesófilo ou lodo B, foi realizada 15 de Junho de 1999, nos três pontos mostrados na Figura 13 (Item 4.3.1), próximos ao Ribeirão do Lobo e Ribeirão Itaqueri. Foi fundamental para a determinação dos pontos de coleta a falta de agitação da água e a determinação da concentração de oxigênio no sedimento. Assim, com o auxílio de uma multisonda U10 determinou-se a concentração de oxigênio. Nesses pontos, mostrados na Figura 11, e considerando a coleta na região de interface sedimento - corpo d'água, a concentração de oxigênio foi de 3 mg O₂/L. A concentração encontrada foi semelhante a determinada para um reservatório eutrofizado do interior do Estado de São Paulo, Reservatório de Salto Grande, em coleta durante o mês de maio determinou 2,54 mg O₂/L. Essa medida também foi feita utilizando uma multisonda U10 (CARMO, 2000).

As amostras de sedimentos coletadas apresentaram coloração marron-avermelhada e continham uma grande quantidade de raízes de plantas. Essas foram separadas manualmente e descartadas antes da homogeneização do lodo.

O exame microscópico realizado quatro dias após a coleta revelou pouca diversidade morfológica, com predomínio de bacilos pequenos (1-2 µm) e cocos, não sendo observada a presença de sarcinas. Observou-se uma grande quantidade de pequenas raízes e carapaças de algas. Sob fluorescência somente foi possível a observação de cocos que, segundo a descrição de BERGEY, (1989), assemelharam-se a *Methanococcus* sp.

5.2. Cultivo para a ativação metanogênica das amostras

Ambas as amostras T e B foram inicialmente cultivadas sob condições controladas em laboratório, com o fim de estimular e enriquecer o processo metanogênico. Mesmo que a origem do lodo garantisse a ocorrência da metanogênese, como é o caso do lodo termófilo, pois o reator UASB estava sendo operado sob condições metanogênicas, esse também foi submetido às condições de ativação em laboratório por um período de 219 dias. Por sua vez, não se conhecia o potencial da atividade metanogênica dos sedimentos da Represa do Lobo, e assim a ativação sob condições controladas deu-se em um período de 190 dias. Procurou-se com isso, estabelecer situações semelhantes para ambos os lodos, em que as culturas anaeróbias fossem estimuladas através da disponibilidade da mesma fração orgânica.

Em geral, os estudos que visam a degradação anaeróbia de compostos tóxicos halogenados, como no caso o TCE, utilizam o enriquecimento prévio das culturas em meios contendo fontes orgânicas facilmente assimiláveis pelo metabolismo anaeróbio metanogênico. GAO et al. (1995) estudando o efeito da temperatura na atividade de consórcios metanogênicos para a degradação do PCE, oriundos de sedimentos do delta do Rio Yakima (Estado de Washington, EUA), alimentaram previamente uma certa quantidade de sedimento (20g) em meio mineral semelhante ao meio Zinder acrescido de 3 g/L de metanol, sob condições de anaerobiose estrita em frascos de soro de 100 mL. No trabalho de FOGEL et al. (1995) empregou-se culturas anaeróbias degradadoras de compostos como o PCE, TCE, DCE e VC sob condições metanogênicas, que foram mantidas em três fontes de carbono - metanol, acetato e glicose, bem como na presença de hidrogênio e dióxido de carbono.

Os lodos T e B foram cultivados em meio mineral Zinder (VAZOLLER, 1995) acrescido de glicose, acetato de sódio, formiato de sódio, butirato de sódio, lactato de sódio, metanol e etanol, em iguais concentrações. As fontes e concentrações escolhidas foram baseadas em trabalhos de outros autores (DOLFING et al., 1985; DUBOURGUIER et al., 1987; DiSTEFANO et al., 1991 e 1992; VAZOLLER et al., 1995; GAO et al., 1995; FOGEL et al., 1995) que

buscavam estimular a metanogênese dos resíduos em todas as suas etapas (vide etapas no esquema da Figura 1), e alguns deles (DiSTEFANO et al., 1991 e 1992; GAO et al., 1995; FOGEL et al., 1995) com vistas a degradação do PCE, TCE, DCE e VC.

O lodo T foi homogeneizado e inoculado diretamente nos frascos reatores, T_A e T_B, após 14 dias da coleta; e o lodo B (reatores B₁ e B₂) foi inoculado após 8 dias de estocagem sob refrigeração. A amostra da Represa do Lobo foi obtida em três diferentes pontos, mas sempre cultivada após homogeneização da mesma em laboratório.

5.2.1. Lodo granulado termófilo

Segundo VAZOLLER (1995b), o significado da palavra metanogênese está relacionado as transformações biológicas em ambientes ricos em matéria orgânica com a geração de gás metano e dióxido de carbono ou então as vias bioquímicas energéticas pelas quais as metanobactérias produzem metano. O crescimento e a produção de metano das metanogênicas está relacionada com a especificidade do substrato. O inóculo termófilo proveniente de um biodigestor anaeróbico alimentado com água residuária com alto teor de matéria orgânica (os açúcares compostos comuns da matéria prima da vinhaça), quando enriquecidos no laboratório demonstrou que as condições nutricionais empregadas nesses ensaios foram adequadas e resultaram na seleção de uma comunidade metanogênica.

Como o lodo do reator termófilo foi coletado na entressafra, houve necessidade de reativá-lo para que a biomassa atingisse uma boa atividade metanogênica. A Tabela 12 apresenta os valores das áreas de metano e suas porcentagens na composição do biogás formado ao longo dos períodos de ativação da metanogênese sob temperatura de 55°C e sob agitação constante de 150 rpm. O acompanhamento da metanogênese foi feito pela determinação de metano cromatograficamente, durante o período de 219 dias.

Para a manutenção da metanogênese, que foi acompanhada através de determinações por cromatografia gasosa, os frascos-reatores foram rotineiramente alimentados. A re-alimentação foi feita aproximadamente a cada 20 dias (especificamente no 22°, 44°, 66°, 88°, 110°, 131°, 154°, 176° e 199° dias de incubação), sempre tendo a porcentagem de metano no "headspace" monitorada em torno de 60%. O meio de reação (volume adicionado de 5mL) foi acrescido com soluções de glicose (1 mol/L) e de acetato de sódio (2 moles/L). Duas curvas de calibração de metano foram utilizadas para auxiliar a estimativa dos valores de metano em $\mu\text{moles/L}$, como apresentado nos Anexos 1 e 2. A primeira realizada para o período de amostragem inicial até o 131° dia de incubação, e a segunda até a finalização do experimento. Lembrando que no período entre o 88° e 130° as determinações de metano foram interrompidas devido a problemas com o aparelho de medição.

Após 25 dias da ativação metanogênica foram realizadas as primeiras contagens celulares por NMP. Os valores serão discutidos em item a parte. Após 219 dias de incubação e antes de iniciar-se os ensaios sobre a biodegradação do TCE, amostras do reator T_B foram retiradas para a determinação de STV (sólidos totais voláteis) e pH. A massa celular desse reator foi escolhida para os ensaios com TCE, em função da produção de metano (ver seqüência de trabalho apresentada no esquema da Figura 6).

Tabela 12. Valores de metano ao longo do ensaio de enriquecimento do lodo termófilo.

T_A				T_B			
tempo (d)	A	B ($\mu\text{moles/L}$)	CH ₄ (%)	tempo (d)	A	B ($\mu\text{moles/L}$)	CH ₄ (%)
1	95012	5,47	15,90	1	95098	5,47	12,15
2	152751	8,61	28,86	2	160814	9,05	23,31
3	150097	8,47	29,50	3	140433	7,94	29,96
4	175459	9,85	32,15	4	153678	8,66	26,15
7	183827	10,30	36,55	7	270173	15,00	38,47
8	194690	10,89	39,90	8	320297	17,73	47,77
9	202908	11,34	41,80	9	349868	19,33	52,13
10	213987	11,94	43,59	10	361308	19,96	56,90
14	248596	13,82	47,64	14	374236	20,66	57,91
15	228789	12,75	46,76	15	285088	15,81	55,81
16	247179	13,75	49,45	16	304208	16,85	56,16

Continuação da Tabela 12

17	256394	14,25	47,19	17	327015	18,09	54,66
18	238329	13,27	50,28	18	322518	17,85	55,86
22	234766	13,07	55,88	22	305631	16,93	60,11
23	341061	18,85	58,10	23	433754	23,90	63,19
25	297173	16,47	46,65	25	336414	18,60	47,85
29	409499	22,58	56,75	29	211771	11,82	45,39
30	325461	18,01	58,40	30	235900	13,13	45,52
31	368887	20,37	57,15	31	237365	13,21	45,39
37	387035	21,36	61,89	37	203302	11,36	44,91
39	344039	19,02	68,86	39	219519	12,24	46,11
44	400346	22,08	67,81	44	287919	15,96	46,53
45	244410	13,60	55,34	45	356299	19,68	55,67
56	278533	15,45	63,75	56	247638	13,77	55,57
58	333097	18,42	62,66	58	354679	19,60	53,76
59	381070	21,03	52,31	59	408163	22,51	51,86
63	285002	15,81	59,14	63	498024	27,39	50,48
66	238998	13,30	60,75	66	298344	16,53	55,64
70	329798	18,24	58,33	70	250270	13,92	56,69
71	351585	19,43	58,97	71	254227	14,13	55,95
72	269717	14,97	57,59	72	266699	14,81	57,76
84	308644	17,09	63,42	84	322304	17,83	60,77
87	280446	15,56	61,56	87	367925	20,32	60,51
131	201738	19,44	61,07	131	243611	23,37	60,90
134	143203	13,95	58,06	134	260879	24,99	63,75
138	161953	15,71	58,98	138	279948	26,78	63,50
142	127000	12,43	58,15	142	231230	22,21	64,64
146	173181	16,76	58,74	146	308637	29,47	64,26
150	187101	18,07	44,51	150	221715	21,31	49,32
154	131901	12,89	42,28	154	205741	19,82	50,83
160	158560	15,39	42,68	160	243148	23,33	52,44
163	132369	12,93	44,08	163	194813	18,79	56,20
167	142455	13,88	55,89	167	207839	20,01	66,08
171	165301	16,02	57,78	171	244218	23,43	67,81
174	154111	14,97	59,65	174	244153	23,42	56,27
182	207289	19,96	52,87	182	296598	28,34	55,07
188	163006	15,81	56,59	188	275120	26,32	62,90
192	194312	18,74	58,48	192	283974	27,16	60,80
196	200466	19,32	56,62	196	142739	13,90	63,81
199	160686	15,59	62,02	199	119653	11,74	63,80
203	150299	14,61	60,13	203	137044	13,37	65,97
208	114915	11,29	53,36	208	127423	12,47	61,04
211	151678	14,74	49,66	211	178342	17,24	69,58
215	149473	14,54	51,05	215	177162	17,13	68,10
219	205578	19,80	55,28	219	155022	15,06	68,15

A = Área do metano obtida por cromatografia

B = Número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C = % da área de metano, obtida no cromatograma

Em negrito, destacam-se os dias após a ativação dos reatores.

As fontes escolhidas para a re-alimentação do lodo termófilo foram adequadas para a metanogênese dos sistemas. A glicose, em geral, favorece a ação de bactérias sacarolíticas, muitas delas bacilos retos e cocobacilos. No estudo realizado por VAZOLLER (1995a), a fermentação de amostras coletadas no reator piloto da Usina São Martinho, produziu importantes intermediários como ácido láctico, acético e metanol, intermediários que favorecem o aparecimento de sarcinas metanogênicas. Nas amostras de mesma origem, enriquecidas nos frascos T_A e T_B, observou-se o predomínio de dois tipos morfológicos de organismos metanogênicos: sarcinas (semelhantes ao gênero *Methanosarcina*) e bacilos (semelhantes ao gênero *Methanobacterium*), como mostrado nas Figuras 17 (a), no segundo dia após a reativação. Foram também observadas muitas estruturas arredondadas com tamanho > 2 µm, semelhantes a cistos, que são comuns em alguns cultivos de espécies de sarcinas metanogênicas (BERGEY, 1989). A Figura 17 (b) mostra fluorescência das células semelhante a cistos.

O lodo termófilo usado nesse trabalho teve a mesma procedência daqueles lodos utilizados por VAZOLLER (1995) e OLIVEIRA (1998), sendo observado grande semelhança de morfologias, como bacilos, sarcinas e cocos como os observados por esses autores. Talvez a maior diferença foi a observação de estruturas arredondadas na forma de cistos, comuns para alguns estágios de organismos metanogênicos da Família *Methanobacteriaceae*. O aparecimento de organismos acetoclásticos provavelmente dos gêneros *Methanosarcina* sp e *Methanosaeta* sp foram citados por VAZOLLER (1995a), além de uma co-cultura hábil na degradação do acetato de sódio, um gênero emprega o acetato formando o hidrogênio e o outro gênero utiliza o hidrogênio para a formação de metano. Esse último metabolismo foi bastante estudado por ZINDER & KOCH (1984), e parece ser mesmo eficiente na degradação e metanogênese do acetato. No presente trabalho, observou-se bacilos fluorescentes metanogênicos, que foram relacionados ao gênero *Methanobacterium*, um grupo hidrogenotrófico.

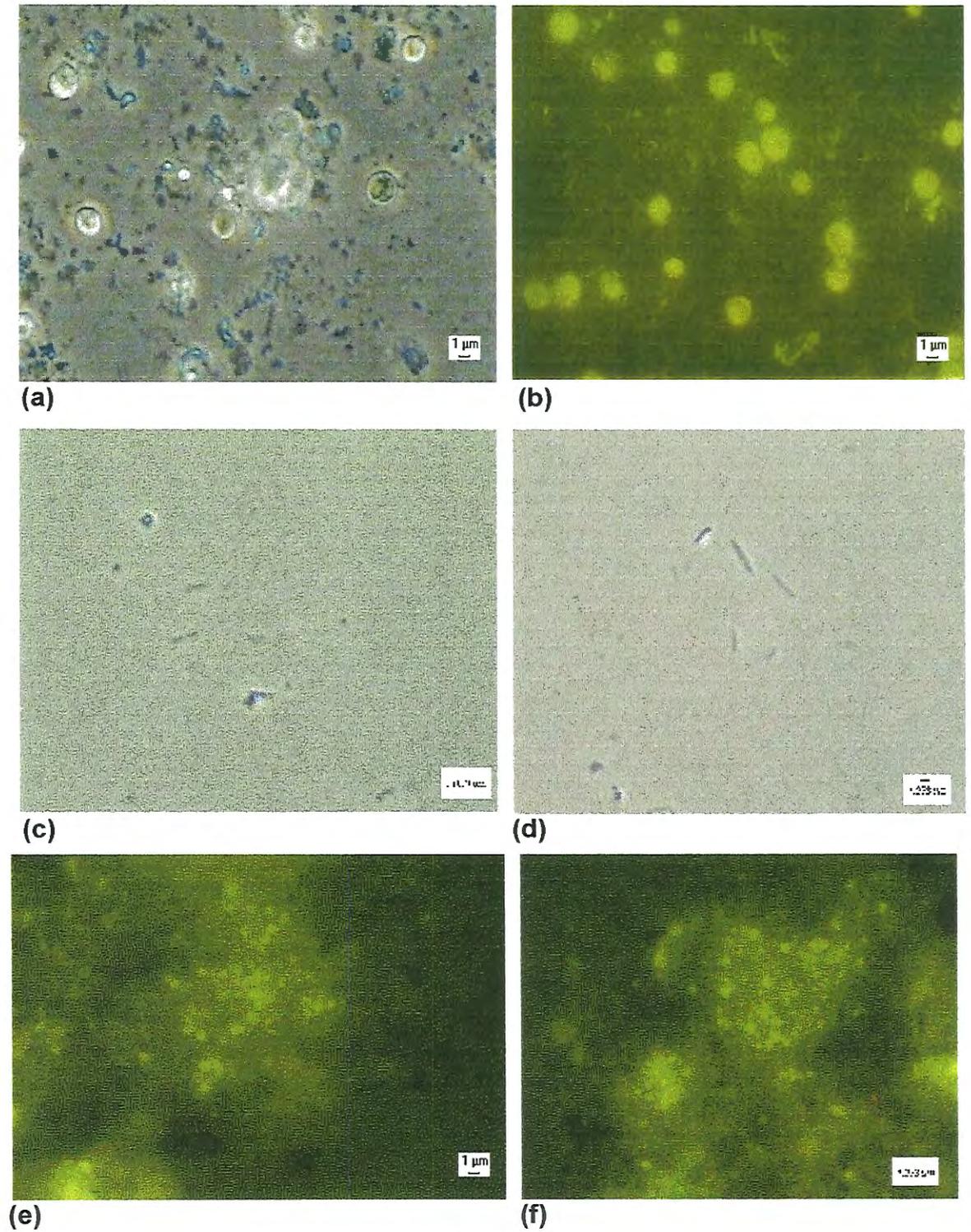


Figura 17. Fotomicrografias apresentam a morfologia das células no lodo termófilo ativado em meio Zinder (a); (c) e (d) sob contraste de fase, (b); (e) e (f) sob fluorescência. (a) e (b) com 2 dias da ativação; as demais com 20 dias da ativação (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25)

5.2.2. Sedimentos da Represa do Lobo

A Tabela 13 relaciona os valores das áreas cromatográficas de metano e suas porcentagens na composição do biogás formado ao longo dos períodos de ativação da metanogênese, sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, para o lodo mesófilo. O acompanhamento da metanogênese foi feito pela determinação de metano cromatograficamente.

Os lodos responderam mais lentamente a ativação com as fontes orgânicas, se comparados com os ensaios com o lodo termófilo. A porcentagem de metano atingiu cerca de 60% (em relação a área total do cromatograma), após um período de incubação de 40 dias. A cada 40 dias (especificamente no 40^o, 80^o, 120^o, 160^o dia de incubação) os reatores B₁ e B₂ foram alimentados com 5 mL de solução de formiato de sódio a 20 mmoles/L e 2,5 mL de solução metanol 10 mmoles/L. As re-alimentações foram necessárias para a manutenção da atividade metanogênica. Nesse período, os reatores B₁ e B₂ foram incubados à temperatura constante de 25°C, sob agitação controlada de 200 rpm.

Arqueas metanogênicas são organismos utilizadores dos substratos gasosos hidrogênio e dióxido de carbono e dos ácidos orgânicos acético e fórmico (VAZOLLER, 1995b). As espécies metanogênicas realizam reações catabólicas que incluem principalmente a redução do dióxido de carbono pelo hidrogênio ou do formiato a metano (ZINDER, 1992). Esses substratos irão favorecer o aparecimento de organismos hidrogenotróficos.

FLORENCIO (1994) observou que metanol pode ser convertido diretamente a metano por organismos metanogênicos metilotróficos, com uma afinidade 60 vezes maior que algumas acetogênicas, também utilizadoras de metanol. Quando a concentração de metanol no reator está aproximadamente menor que 80 mmoles/L, a autora descreveu o desenvolvimento de microrganismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina*, que é a metanogênica capaz de converter metanol a metano.

Após a ativação da metanogênese do lodo mesófilo, constatou-se o aumento de organismos semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp e de bacilos hidrogenotróficos semelhantes a *Methanobacterium* sp.

Tabela13. Valores de metano ao longo do ensaio de enriquecimento do lodo mesófilo.

B1				B2			
tempo (d)	A	B (μmoles/L)	CH ₄ (%)	tempo (d)	A	B (μmoles/L)	CH ₄ (%)
1	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND
6	628	0,33	0,72	6	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	7	624	0,33	0,72
8	1096	0,36	0,78	8	870	0,35	0,75
9	1434	0,38	0,82	9	1644	0,39	0,84
12	12928	1,00	2,17	12	3162	0,47	1,02
13	26860	1,76	3,81	13	3425	0,49	1,05
14	45983	2,80	6,05	14	5964	0,63	1,35
15	47316	2,87	6,21	15	6775	0,67	1,45
16	125601	7,13	15,41	16	9830	0,84	1,80
20	164252	9,24	19,95	20	25852	1,71	3,69
21	191398	10,71	23,14	21	43303	2,66	5,74
22	222172	12,39	26,75	22	93947	5,41	11,69
24	256257	14,24	30,76	24	181974	10,20	22,03
27	374226	20,66	44,62	27	239204	13,31	28,76
30	392907	21,68	46,81	30	217495	12,13	26,20
33	434790	23,95	51,74	33	316860	17,54	37,88
36	458856	25,26	54,56	36	321224	17,78	38,39
40	508603	27,97	60,41	40	366880	20,26	43,76
42	357835	19,77	42,69	42	277035	15,37	33,20
44	276304	15,33	33,11	44	287035	15,92	34,37
45	300658	16,66	35,98	45	253800	14,11	30,47
49	308686	17,09	36,92	49	235712	13,12	28,34
52	280805	15,58	33,64	52	246960	13,74	29,67
56	276393	15,34	33,12	56	276671	15,35	33,16
57	312434	17,30	37,36	57	278720	15,46	33,40
101	205389	19,78	42,73	101	211210	20,33	43,91
105	242417	23,26	50,23	105	199960	19,27	41,63
109	204144	19,67	42,47	109	208029	20,03	43,26
113	253754	24,32	52,53	113	216898	20,86	45,06
117	235754	22,63	48,88	117	221937	21,33	46,08
121	252000	24,16	52,17	121	231227	22,21	47,96
125	280796	26,86	58,01	125	250525	24,02	51,87

Continuação da Tabela 13

129	190604	18,40	39,73	129	143234	13,95	30,13
132	200808	19,35	41,80	132	150512	14,63	31,61
136	200938	19,36	41,82	136	144392	14,06	30,37
140	207900	20,02	43,24	140	159482	15,47	33,42
143	214647	20,65	44,60	143	151967	14,77	31,90
152	239812	23,01	49,70	152	128494	12,57	27,14
157	279719	26,76	57,79	157	149719	14,56	31,44
161	276876	26,49	57,21	161	141573	13,79	29,79
165	153661	14,93	32,24	165	134327	13,11	28,33
168	142627	13,89	30,01	168	133119	13,00	28,08
171	159259	15,45	33,38	171	147730	14,37	31,04
173	139657	13,61	29,41	173	122080	11,97	25,84
177	171682	16,62	35,90	177	162046	15,72	33,94
181	151055	14,68	31,72	181	167049	16,18	34,96
184	143153	13,94	30,11	184	158672	15,40	33,26
187	152203	14,79	31,95	187	188644	18,21	39,33
190	165311	15,21	48,53	190	159466	15,47	33,42

A = Área do metano obtida por cromatografia

B = Número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C = % da área de metano, obtida no cromatograma

Destaque para os dias após a reativação dos reatores.

Os reatores B₁ e B₂ (duplicatas) foram mantidos sob controle por 190 dias, ou seja foram operados sob condições que favoreceram a metanogênese, até a montagem dos reatores para o estudo da biodegradação do TCE. Duas curvas de calibração de metano foram utilizadas para auxiliar a estimativa dos valores de metano em $\mu\text{moles/L}$, como apresentado nos Anexos 1 e 2. A primeira realizada para o período de amostragem inicial de incubação, e a segunda até a finalização do experimento. Lembrando que no período entre o 57° a 101° as determinações de metano foram interrompidas devido a problemas com o cromatógrafo gasoso.

O reator B₁ foi o que apresentou melhor resposta em relação a produção do metano, sendo então selecionado para a realização da avaliação quantitativa pelo método do NMP e para os estudos sobre a biodegradação de TCE. As análises microscópicas feitas 15 dias após a ativação do lodo mesófilo mostraram a presença de sarcinas, muitos cocos (1-2 μm), e alguns bacilos móveis pequenos (variando de 1 a 2,5 μm de

comprimento), que se assemelhavam a *Methanomicrobiales*, segundo a descrição de organismos pertencentes a essa ordem (BALCH et al., 1979). Esses organismos podem crescer por oxidação de hidrogênio ou formiato, transformando-se em metano e dióxido de carbono ou também pela oxidação do metanol ou acetato a metano e dióxido de carbono. Algumas linhagens podem oxidar etanol, propanol ou butanol a acetato ou propionato e respectivamente reduzir o acetato a metano e dióxido de carbono. Esses organismos podem ocupar muitos habitats anaeróbios como os sedimentos aquáticos e podem crescer em temperaturas ótimas de 25-40°C (mesofílicas), em pH 7,0 e concentração de sódio de 0,15 mol/L (BALCH et al., 1979). Nesse trabalho de mestrado, empregou-se parâmetros físico-químicos similares aqueles empregados por BALCH et al (1979), a saber: temperatura do reator 25 °C, pH 7 e concentração total de Na⁺ de 0,11 mol/L.

Além daquelas células descritas (bacilos e cocos), foram também observadas células arredondadas com diâmetros variando de 1,5 a 4,0 µm, assemelhando-se a cistos. Esses cistos podem ser considerados como uma fase morfológica da cultura microbiana, em que as células são recobertas por uma membrana externa, ou seja um invólucro que contém células cocóides, facilmente observadas através da microscopia eletrônica. Os organismos que apresentam tais estruturas pertencem à família *Methanosarcinaceae* (BERGEY, 1989). As morfologias descritas acima podem ser observadas nas fotomicrografias da Figura 18.

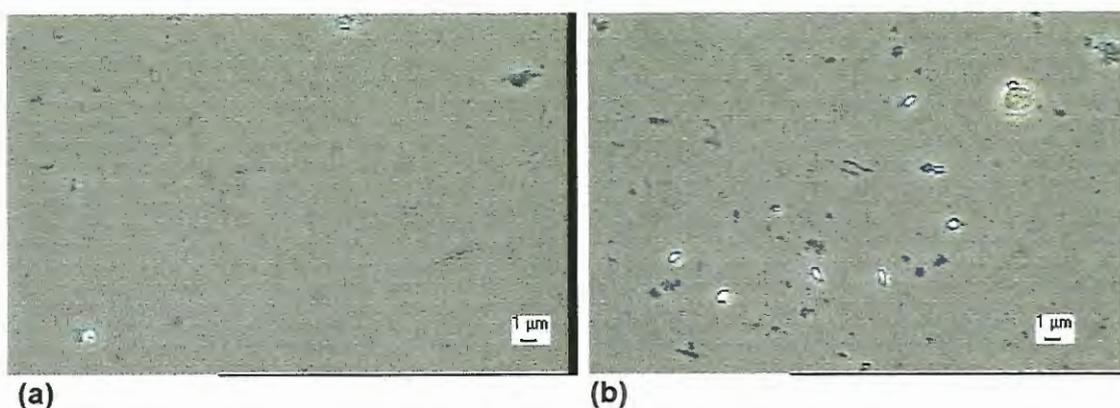


Figura 18. Fotomicrografias apresentam a morfologia das células no lodo mesófilo ativado em meio Zinder (a) e (b), sob contraste de fase, com 15 dias da ativação (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

A Figura 19 mostra as fotomicrografias obtidas com as amostras do lodo mesófilo (Represa do Lobo), após 38 dias de ativação. Nesse período foi observado uma redução das estruturas semelhantes a cistos, e quando esses estavam presentes, mediram entre 2 a 4 μm de diâmetro. Ademais, algumas sarcinas puderam também ser observadas. Também notou-se uma maior diversidade de bacilos com predomínio de bacilos médios, alguns com comprimentos entre 2 e 5 μm , e presença de esporos.

As Figuras 19 (a) e (b) mostram a morfologia de uma sarcina sob microscopia de contraste de fase e fluorescência, respectivamente. Ademais, essa última (Figura 19 b) apresentou uma fluorescência esverdeada, que pode estar relacionada com a presença de coenzimas específicas, como a F_{420} e F_{350} , que fluorescem sob comprimentos de onda de 420 e 350 nm, respectivamente (DODDEMA & VOGEL, 1978).

As Figuras 19 (c) e (d) revelam morfologias de bacilos com presença de esporos, e algumas estruturas semelhantes a cistos.

A Figura 19 (e) mostra cocos sob microscopia de fluorescência e a Figura 19 (f) estruturas semelhantes a cistos.

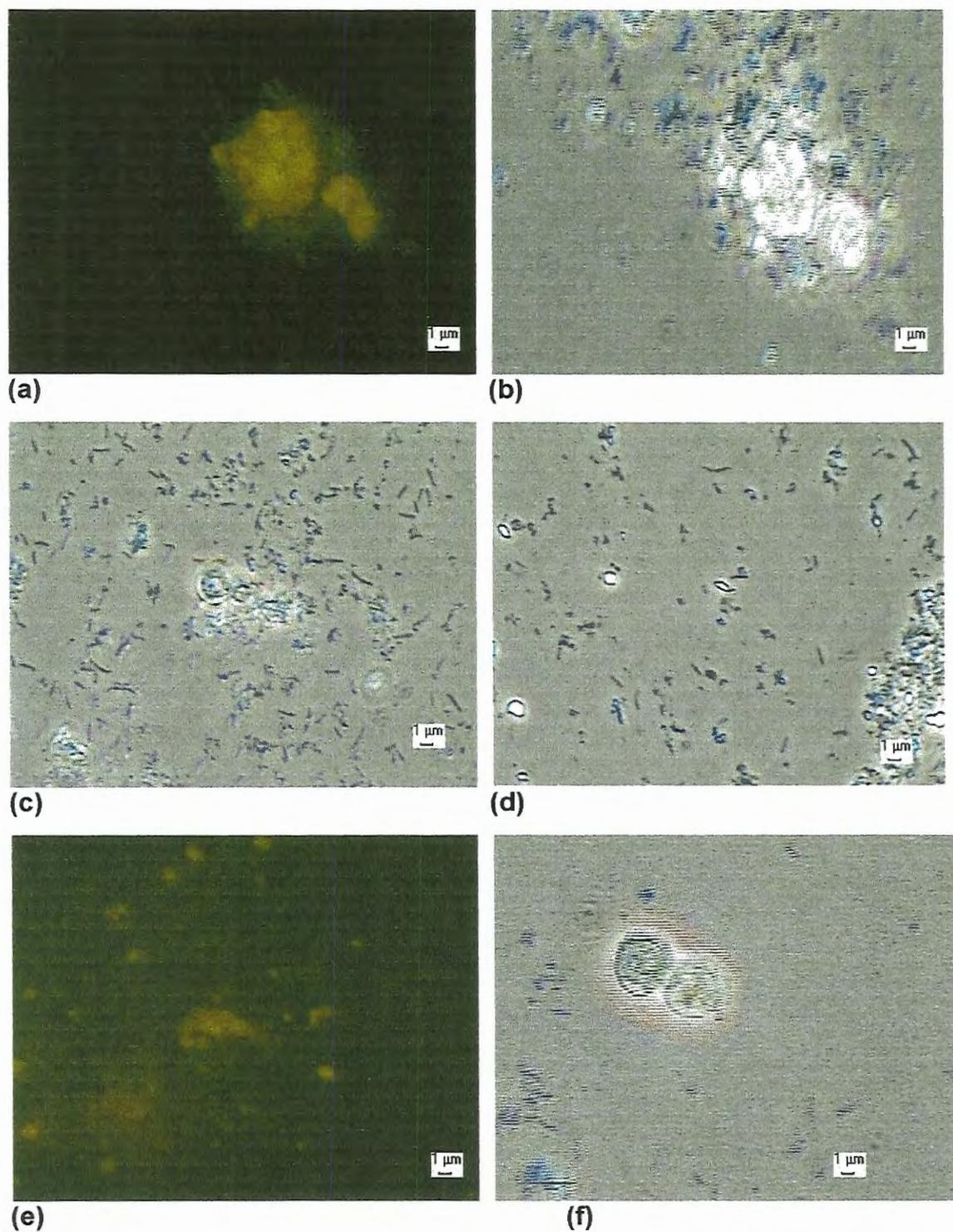


Figura 19. Fotomicrografias apresentam a morfologia das células no lodo mesófilo ativado em meio Zinder (a) e (e) sob fluorescência, (c) ;(d) e (f) sob contraste de fase, com 38 dias da ativação (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

5.3 Avaliação quantitativa dos grupos microbianos enriquecidos - Método do NMP

As contagens microbianas realizadas nas amostras dos lodos termófilos e mesófilos tiveram como objetivo avaliar a condição de cada amostra em termos dos grupos anaeróbios presentes. Enumerando os tipos metanogênicos e não metanogênicos predominantes, após a adição das fontes de carbono e dos elevados tempos para o enriquecimento dos lodos, foi possível conhecer previamente a condição de inoculação dos sistemas para avaliar a biodegradação do TCE. As fontes orgânicas que foram escolhidas basearam-se em trabalhos anteriores (DOLFING et al 1985; DUBOURGUIER et al., 1987; VAZOLLER, 1995b), e foram adequadas para estimar as interações microbianas da digestão anaeróbia da matéria orgânica, e também os possíveis caminhos dos substratos para a metanogênese. As fontes determinadas para contagem do NMP do lodo termófilo estão descritas na Tabela 14 e essas foram escolhidas baseadas em algumas características orgânicas da vinhaça, água residuária tratada no reator termofílico anteriormente ao período da entressafra, e para o lodo mesófilo (Tabela 15). Segundo ZINDER (1991), o fluxo do carbono nos sedimentos de água doce é bastante semelhante ao que acontece nos biorreatores, sendo exceção a carga orgânica e por isso menores concentrações de hidrogênio e ácido acético podem ser encontradas.

5.3.1.Lodo granulado termófilo

As amostras do lodo termófilo foram tomadas a partir do 25^o dia de incubação de ativação metanogênica. A enumeração pelo NMP também possibilitou a avaliação dos tipos morfológicos presentes.

O Número Mais Provável (NMP) de células procarióticas anaeróbias termófilas foi feito pela leitura dos cinco frascos inoculados em cada série da diluição, como descrito no Item 4.6.1. Os frascos positivos ou negativos foram considerados de acordo com a leitura da presença de turbidez do

meio de cultura, e o crescimento celular metanogênico foi confirmado pela dosagem do gás metano. A Tabela 14 apresenta os valores estimados de NMP/mL para cada fonte de carbono utilizada nos ensaios com o lodo termófilo, após 20 dias de incubação à temperatura de 55°C. O Anexo 3 apresenta as tabelas de leitura da turbidez e da presença de metano para cada fonte utilizada no ensaio de NMP para avaliação do lodo termófilo enriquecido.

Tabela 14. Valores estimados de NMP/mL do lodo termófilo enriquecido.

Condições	NMP/mL Leitura Turbidez	NMP/mL Leitura de Metano
Glicose (10 mmoles/L)	$1,6 \times 10^9$	$2,8 \times 10^4$
H ₂ /CO ₂ (80:20% v/v).	$3,9 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$
Formiato de sódio (20 mmoles/L)	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
Lactato de sódio (20 mmoles/L) e sulfato de sódio (10 mmoles/L)	$3,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$
Metanol (20)	$2,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$
Acetato de sódio (20 mmoles/L) e sulfato de sódio (10 mmoles/L)	$1,6 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$
Propionato de sódio (20 mmoles/L) e sulfato de sódio (10 mmoles/L)	$9,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$
Butirato de sódio (20 mmoles/L)	$\geq 1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
Controle –apenas N ₂ /CO ₂ (70:30% v/v).	$\geq 1,6 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$
Glicerol (20 mmoles/L)	$9,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$
Propionato de sódio (20 mmoles/L)	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
Acetato de sódio (20 mmoles/L)	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$

Na presença da fonte de carbono glicose encontrou-se a maior concentração celular, $1,6 \times 10^9$ células NMP/mL, com o predomínio de bacilos retos. Com relação as metanogênicas, apareceram células como sarcinas, bacilos e cocos fluorescentes. O crescimento de organismos fermentadores no meio de cultivo tornou intensa a turvação do meio, de aspecto leitoso, o que foi também observado por VAZOLLER (1995b), estudando amostra de mesma origem. O aparecimento desses organismos fermentadores sacarolíticos pode estar relacionado a origem do lodo termófilo, ou seja, um biorreator alimentado com vinhaça, que é a água residuária da produção de álcool a partir da cana de açúcar, ou mesmo no

caso da alimentação com melaço no período de entressafra. A Figura 20 apresenta as principais morfologias encontradas no meio alimentado com glicose.

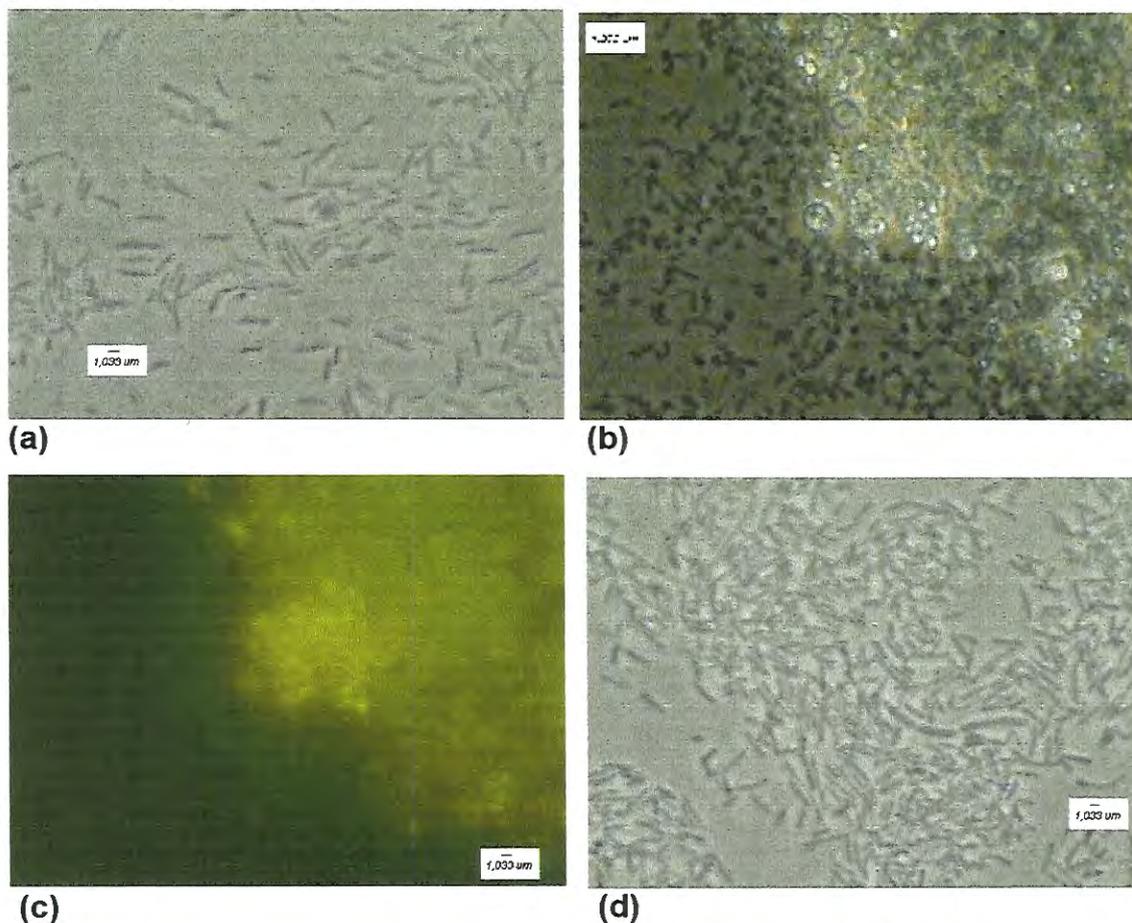


Figura 20. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica glicose (10 mmoles/L). (a) e (b) diluição 10^{-9} , (c) e (d) diluição 10^{-3} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Em hidrogênio e dióxido de carbono (80:20 % v/v), sob 1 atm de pressão, encontrou-se a concentração de células da ordem de $3,9 \times 10^7$ células de NMP/mL, sendo a mesma concentração encontrada para as células metanogênicas. Nessa fonte energética, o predomínio foi de bacilos fluorescentes hidrogenotróficos semelhantes ao gênero *Methanobacterium* sp, sendo pouco observada a presença de sarcinas fluorescentes relacionadas ao gênero *Methanosarcina* sp. Segundo BALCH et al. apud VAZOLLER (1995), a utilização de um determinado substrato orgânico é uma característica comum a um gênero metanogênico, apesar de alguns tipos serem mais versáteis em relação a fonte energética. No presente estudo foi

estudo foi evidenciado que o emprego de hidrogênio e dióxido de carbono favoreceu o crescimento de células metanogênicas semelhantes ao gênero *Methanobacterium* sp, provavelmente da espécie *Methanobacterium thermoautotrophicum*, única metanogênica autótrofa conhecida, que como descrito no BERGEY (1989), são bacilos delgados com um comprimento que varia de 3 a 7 μm , formadora de filamentos, com uma temperatura de crescimento ótima de 55 °C e pH entre 7 e 8. Esses organismos podem se desenvolver rapidamente em meio mineral e são os únicos organismos metanogênicos capazes de utilizar o monóxido de carbono como fonte única de carbono para o seu crescimento, extraindo os elétrons desse gás pela ação da enzima *monóxido de carbono desidrogenase*, na presença de hidrogênio (ZINDER, 1991; VAZOLLER, 1995). A Figura 21 mostra algumas morfologias crescidas nessa condição.

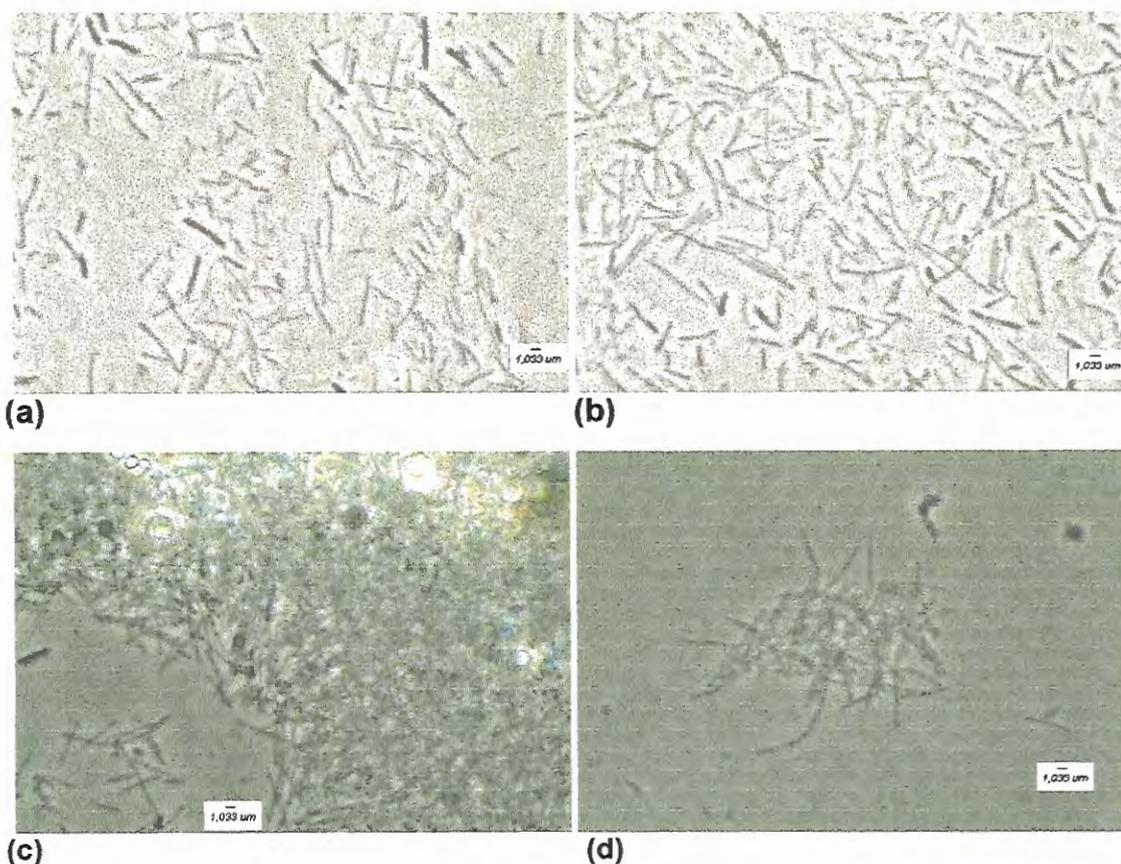


Figura 21. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte energética hidrogênio e dióxido de carbono (80:20 % v/v, 1 atm). (a) diluição 10^{-3} e (b) diluição 10^{-4} , (c) e (d) diluição 10^{-6} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Utilizando o formiato de sódio como substrato, verificou-se o crescimento de bacilos hidrogenotróficos. Assim, pode-se supor que o valor de 10^6 células de NMP/mL encontrado foi devido, principalmente, ao crescimento do gênero *Methanobacterium* sp. Segundo TOUZEL et al. apud VAZOLLER (1995), tem-se constatado que apenas um gênero de bacilo hidrogenotrófico (*Methanobacterium* FTF) é capaz de crescer na faixa de temperatura de 30 a 75°C e utilizar o formiato como fonte energética. Na fonte orgânica formiato, ocorreu o predomínio de bacilos hidrogenotróficos com 2 a 5 μm de comprimento, ligeiramente curvos, que sob fluorescência mostraram-se resposta intensa. Pode-se dizer que esses bacilos se assemelharam aos descritos anteriormente por TOUZEL (1988). Considerando os dados do Manual de BERGEY (1989) foi possível relacioná-los ao gênero *Methanobacterium*. A Figura 22 destaca as principais morfologias encontradas no ensaio do NMP nessa fonte de carbono.

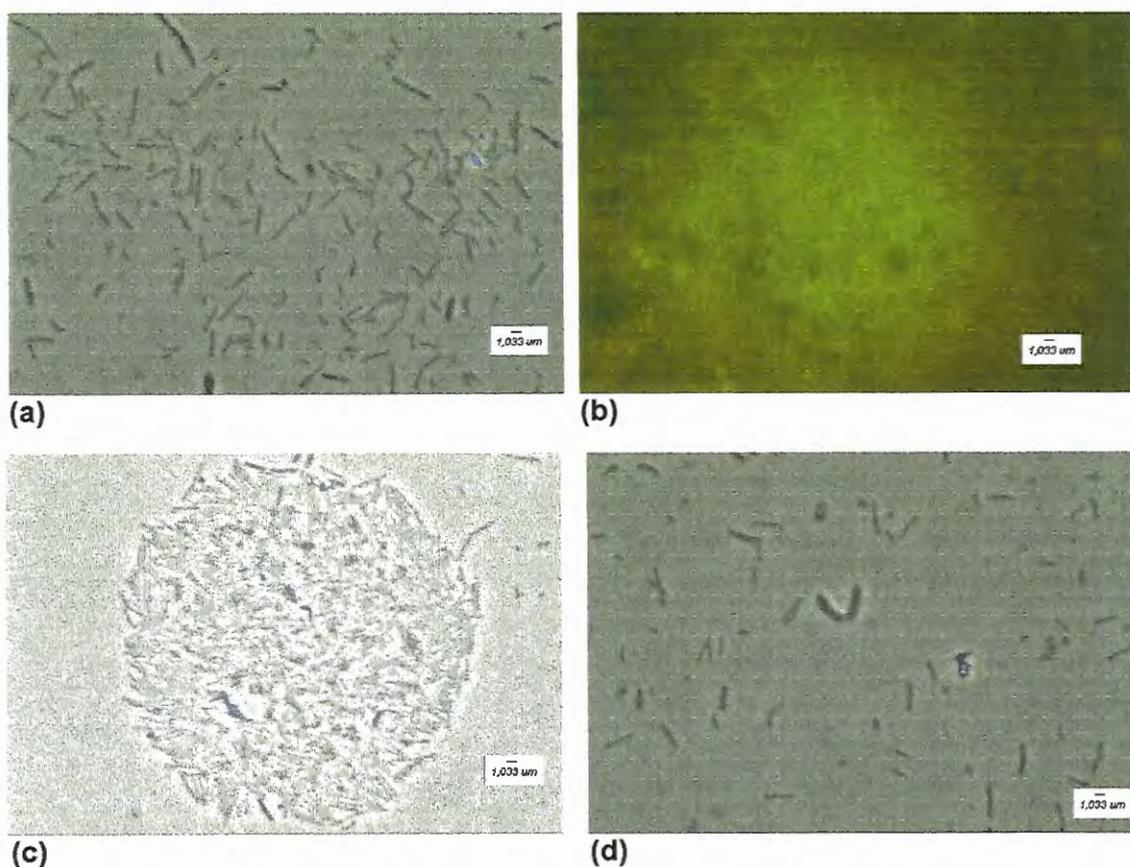


Figura 22. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica formiato de sódio (20 mmoles/L). (a) diluição 10^{-2} , (c) e (d) diluição 10^{-4} , (b) diluição 10^{-2} microscopia de fluorescência (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

A degradação de lactato de sódio na presença de sulfato de sódio resulta na produção do ácido acético e é o resultado da ação de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (VAZOLLER, 1995b). Na presença de lactato de sódio e sulfato de sódio, observou-se o aparecimento de bacilos longos com extremidades afiladas, vários bacilos esporulados, poucos cocos e bacilos curvos e retos. Houve um predomínio de bacilos longos (aproximadamente 5 μm), com as pontas afiladas e alguns poucos cocos sob fluorescência, Os bacilos delgados, retos, com tamanho médio de 2-5 μm de comprimento, apresentaram esporos e podem pertencer ao gênero *Desulfotomaculum* sp (Figura 23 d), que segundo WIDDEL (1989), são organismos que crescem utilizando as fontes lactato e sulfato. A Figura 23 apresenta as diferentes morfologias encontradas nas condições de cultivo.

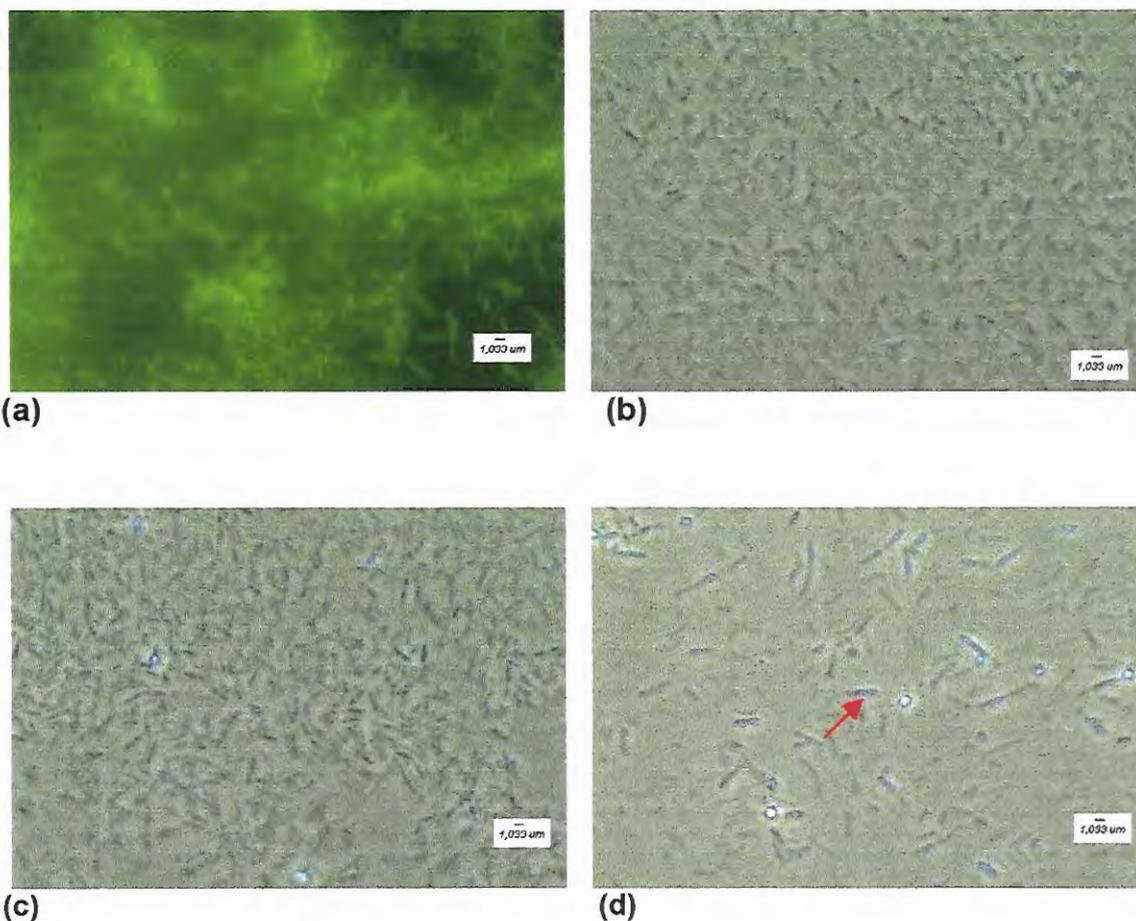


Figura 23. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica lactato de sódio (20 mmoles/L) e sulfato de sódio (10 mmoles/L). (a) diluição 10^{-2} sob fluorescência e (b) diluição 10^{-2} , (c) diluição 10^{-5} , (d) diluição 10^{-6} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Em relação ao metanol, foi visualmente constatado o aparecimento de grumos amarelos claros, que sob agitação, eram facilmente desintegrados. Os grumos quando examinados ao microscópio mostraram agrupamentos de células semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp. Segundo ZINDER (1991), os grumos podem ser facilmente desfeitos agitando-se os meios com crescimento, ou quando colocado o grumo entre lamínas e lamínulas e com o auxílio de pérolas de vidro. A concentração de células em metanol foi da ordem de $2,8 \times 10^5$ células de NMP/mL, para as células metanogênicas de $1,6 \times 10^4$ células de NMP/mL. O metanol é um substrato metabolizado pelas espécies de *Methanosarcina* sp mesófilas e termófilas. VAZOLLER (1995) e FLORENCIO (1994) descreveram tipos semelhantes às *Methanosarcina* sp como sendo as metanogênicas responsáveis pela conversão de metanol em metano. FLORENCIO utilizou em seu trabalho um lodo anaeróbio granular proveniente de reator UASB que tratava água residuária de uma usina de álcool na Holanda. O fator crescimento e predominância de um microrganismo está ligado à competição pelo substrato, assim acetogênicas e metanogênicas crescem em metanol. Segundo FLORENCIO, as acetogênicas podem crescer a uma concentração de metanol de 2,7 mmoles/L e para as metanogênicas como *Methanosarcina barkeri* a uma concentração de 0,18 mmoles/L. Sob condições termofílicas, sarcinas metanogênicas são relatadas como pertencentes à espécie *Methanosarcina thermophila*, descrita por ZINDER(1991) como um organismo anaeróbio estrito, que tem por habitat, em geral, biodigestores anaeróbios operados sob condições termofílicas, que usa metanol como substrato, com um ótimo de temperatura para crescimento entre 35 e 55 °C em pH 6,0. Outras morfologias foram também observadas, como bacilos fluorescentes, bacilos não fluorescentes e estruturas arredondadas fluorescentes semelhantes a cistos. Essas diferentes morfologias encontradas estão apresentadas na Figura 24.

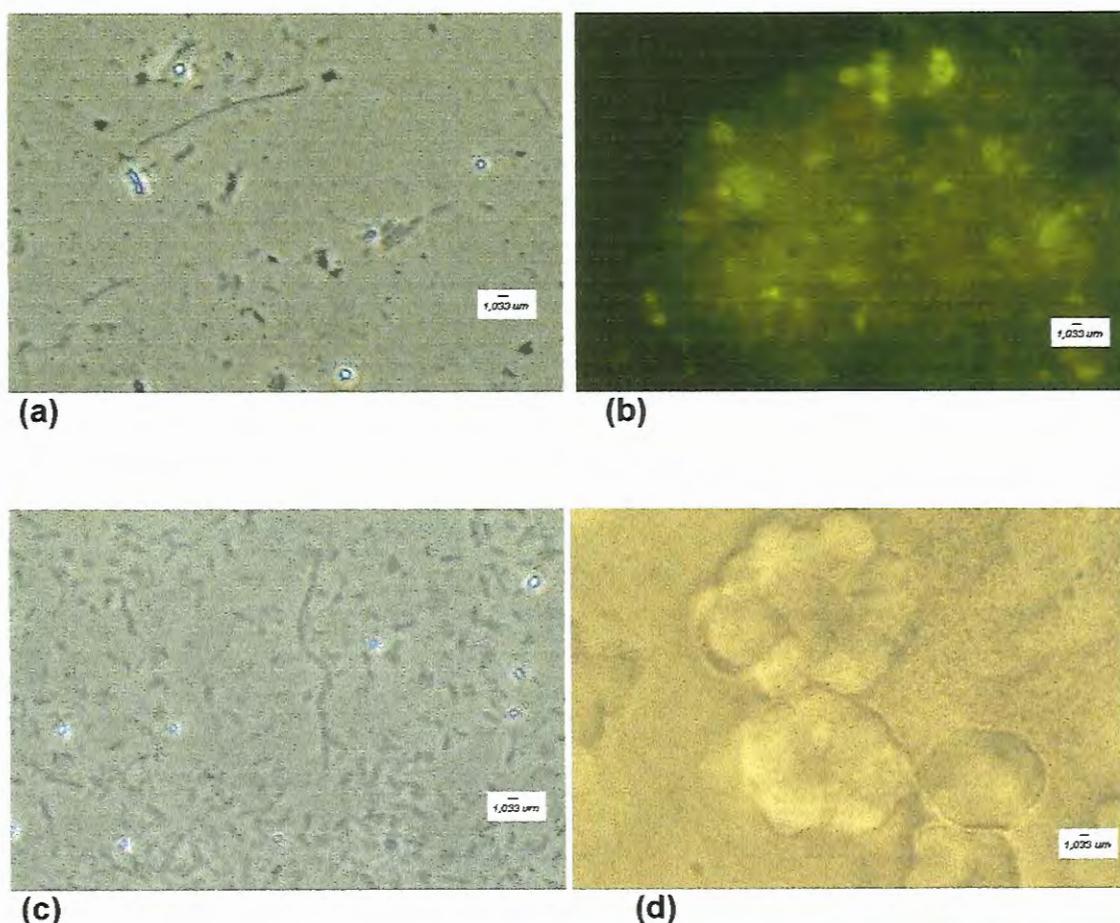


Figura 24. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica metanol (20 mmol/L). (a) e (b) diluição 10^{-4} , (c) diluição 10^{-5} , (d) diluição 10^{-6} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

A contagem em acetato de sódio e sulfato de sódio apresentou uma concentração de células de $1,6 \times 10^5$ células de NMP/mL com predomínio de aglomerados de sarcinas e bacilos longos. Com relação ao metano, uma concentração de células de $9,0 \times 10^4$ células de NMP/mL foi encontrada, podendo esse valor estar relacionado com a presença de metanogênicas acetoclásticas como do gênero *Methanosarcina* sp. Quanto aos bacilos, ainda foram observados bacilos médios, curvos e espiralados. Os bacilos se assemelharam a morfologias descritas para BRS que formam esporos pertencentes ao gênero *Desulfotomaculum* sp (WIDDEL, 1988). A espécie descrita para as células desse gênero é a *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* (VAZOLLER, 1995b; SAKAMOTO, 1996).

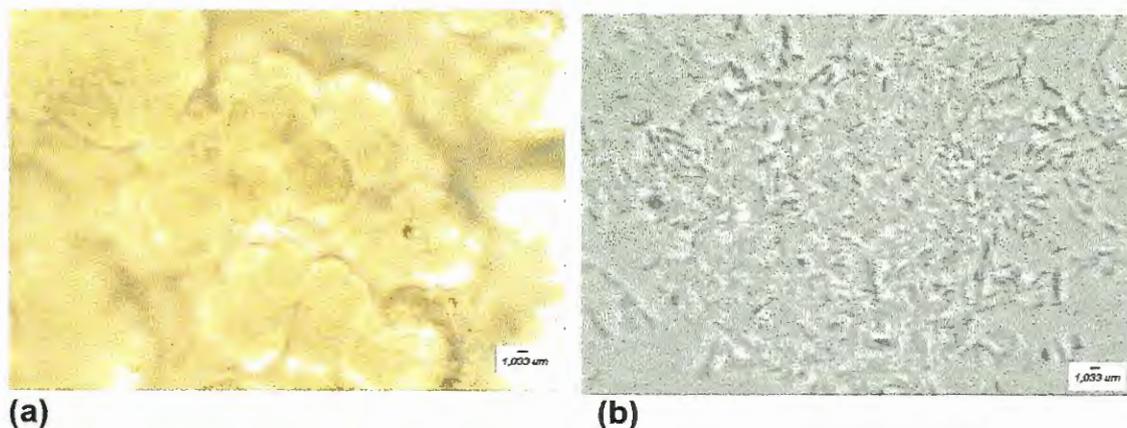
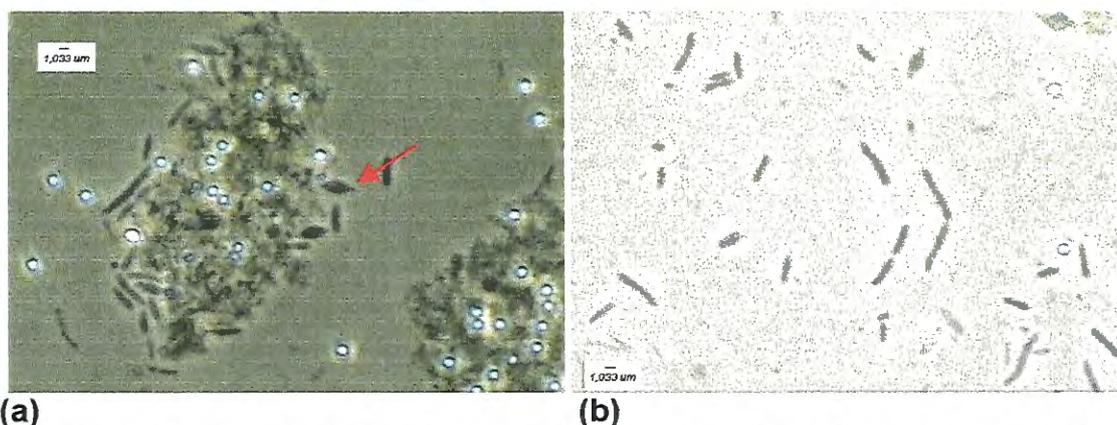


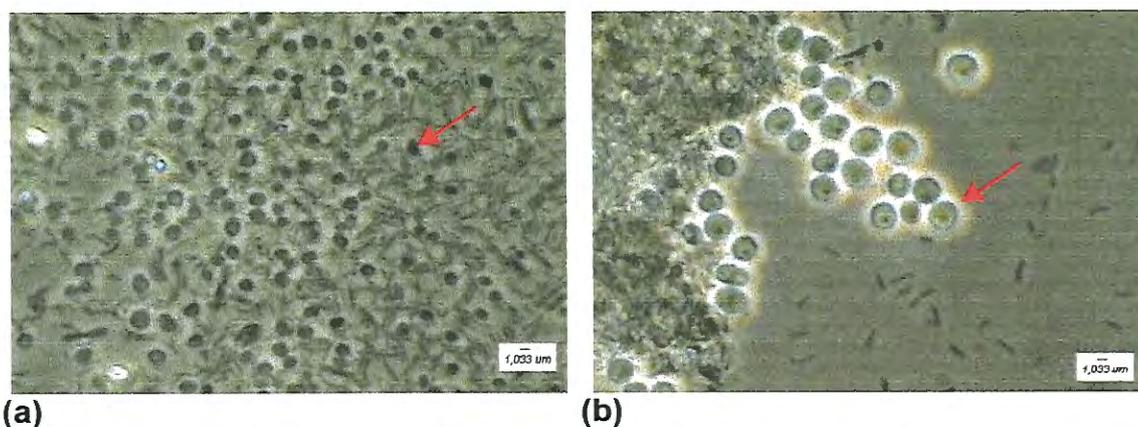
Figura 25. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica acetato de sódio (20 mmoles/L) e sulfato de sódio 10 (mmoles/L). (a) e (b) diluição 10^{-5} , (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Na presença de propionato de sódio e sulfato de sódio foi determinado um valor de $9,0 \times 10^4$ NMP/mL e para as células metanogênicas $1,7 \times 10^3$ NMP/mL, sendo observados bacilos pequenos e alguns bacilos longos. Nessa fonte foram observados muitos aglomerados de bacilos e os grumos de sarcina não foram observados. Não foi possível constatar células fluorescentes. WIDDEL (1988) relacionou o gênero *Desulfobulbus* sp como organismos capazes de degradar o propionato por diversos caminhos. Esses bacilos foram descritos em BERGEY (1989) como células elipsoidais semelhantes a um "limão", com um comprimento de 1,5 a 2 μm e de largura 1-1,3 μm . Segundo VAZOLLER (1995b), sub-cultivos enriquecidos em meio Zinder contendo propionato de sódio e sulfato de sódio podem resultar na formação de ácido acético, na proporção de 1 mol de ácido propiônico para 1 mol de ácido acético. Essa reação indicou a seleção de culturas redutoras de íon sulfato, que promoviam uma oxidação incompleta do propionato de sódio, com produção de sulfetos. Em seu estudo, VAZOLLER (1995b) descreveu organismos provavelmente pertencentes ao gênero *Desulfobulbus* sp como morfologia predominante no enriquecimento com propionato de sódio e sulfato de sódio. A Figura 26 mostra as principais morfologias encontradas quando a fonte empregada foi o propionato de sódio e sulfato de sódio.



(a) **(b)**
Figura 26. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica propionato de sódio (20 mmoles/L) e sulfato de sódio (10 mmoles/L). (a) diluição 10^{-3} , (b) diluição 10^{-5} , (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Nas contagens realizadas em meio contendo butirato de sódio foram encontradas 10^4 células NMP/mL, sendo a mesma concentração encontrada para células metanogênicas. Destacam-se as morfologias como bacilos fluorescentes, bacilos ligeiramente curvos e não fluorescentes, bacilos retos fluorescentes e as semelhantes ao gênero *Methanosarcina* sp, bacilos com esporos e células como cistos (mostrado pela seta vermelha). A Figura 27 mostra a diversidade morfológica encontrada em butirato de sódio.



(a) **(b)**
Figura 27. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica butirato de sódio (20 mmoles/L). (a) diluição 10^{-2} na microscopia de fluorescência, (b) diluição 10^{-4} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).



As contagens realizadas na ausência de substrato orgânico e da mistura gasosa, em que as amostras foram incubadas em meio mineral basal Zinder sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30 % v/v), obteve-se uma concentração de células de $1,6 \times 10^4$ células NMP/mL, com grande diversidade morfológica de bacilos como os longos, curvos, delgados, pequenos e em cadeia. Com relação às metanogênicas houve uma redução da concentração de células ($5,0 \times 10^2$ células de NMP/ mL) e empregando-se a microscopia de fluorescência foi possível observar cocos e "estruturas esféricas". A baixa diversidade de morfologias está ligada à carência nutricional. Porém, como o lodo termófilo foi ativado anteriormente nos ensaios de enriquecimento, isso pode explicar o crescimento que ocorreu mesmo em meio mineral basal Zinder sem fontes energéticas. A baixa concentração de substrato poderia então justificar a ausência de sarcinas (Figura 28).

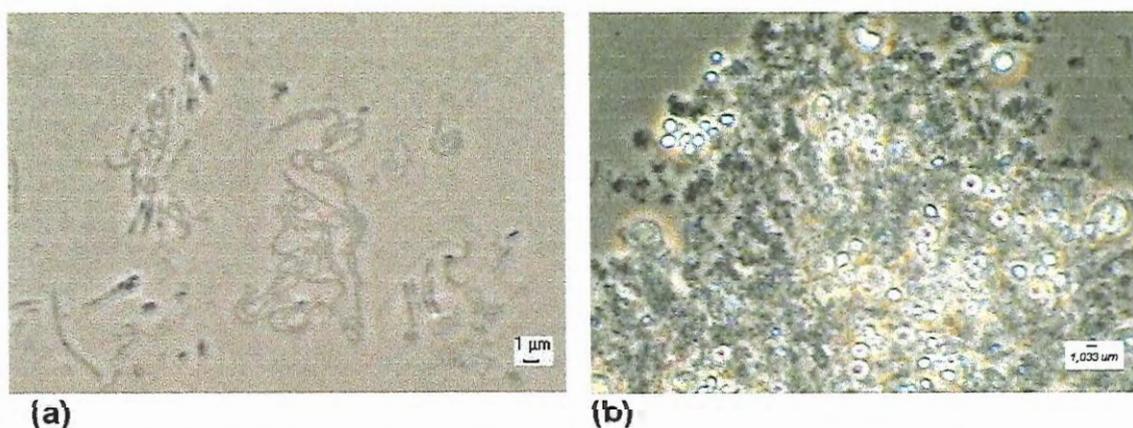


Figura 28. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo sem adição de fonte energética, sob atmosfera gasosa de N_2/CO_2 70:30 % v/v : (a) e (b) diluição 10^{-3} , (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

O glicerol é o maior componente alcóolico da vinhaça e pode ser degradado a propionato e acetato. As reações ocorrem na etapa denominada acidogênica da biodigestão anaeróbia (VAZOLLER, 1995b). As bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação de álcoois (glicerol e etanol) em substratos que podem ser degradados pelas metanogênicas como hidrogênio, dióxido de carbono e acetato (DOLFING, 1988). Na presença de glicerol, registrou-se uma concentração de $9,0 \times 10^4$ células de MNP/mL. VAZOLLER (1995b) realizando contagens com o lodo termófilo

com a mesma origem, para a mesma fonte glicerol, determinou uma concentração celular de $9,0 \times 10^6$ células de MNP/mL. Essa diferença de concentração de células pode estar relacionada à mudanças possíveis na diversidade do lodo, na carência nutricional, período distinto da coleta ou tempo de armazenamento do lodo sob refrigeração. Na microscopia observou-se um predomínio de bacilos curvos e bacilos filamentosos muitos com mais de $30 \mu\text{m}$ não fluorescentes e cocos ($1-3 \mu\text{m}$). Quanto as metanogênicas, a concentração de células de 10^4 células de NMP/mL foi possível observar bacilos delgados fluorescentes, com cocos fluorescentes e muitas estruturas esféricas parecidas com cistos. As diferentes morfologias estão apresentadas na Figura 29.

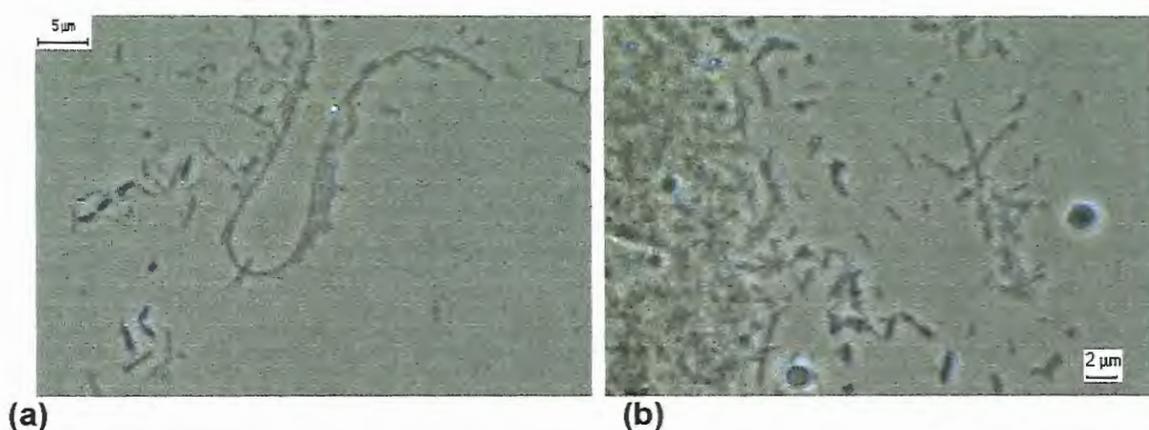


Figura 29. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica glicerol (20 mmoles/L). (a) diluição 10^{-5} , (b) diluição 10^{-3} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

O acetato foi o primeiro substrato reconhecido utilizado pelas metanogênicas e dois terços do metano produzido na natureza é produto da transformação desse substrato. Metanogênicas acetoclásticas são organismos que utilizam o acetato como substrato para produzir metano. Dentre esses, os principais gêneros são *Methanosarcina* sp e *Methanosaeta* sp (VOGELS, et al. 1988). ZINDER & KOCH (1984) estimaram que 60 a 90% do metano produzido em um biodigestor anaeróbio provem da conversão do acetato. Sob condições termofílicas, dois organismos diferentes na forma de bacilos participaram dessa conversão. Uma dessas culturas foi uma co-cultura não metanogênica que foi capaz de oxidar acetato a CO_2 e

hidrogênio. A outra é uma cultura metanogênica hidrogenotrófica (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) que reduziu CO₂ a metano.

Nesse trabalho, no substrato orgânico acetato de sódio, foi determinada a concentração de 10³ células NMP/mL. Houve um predomínio de bacilos e sarcinas fluorescentes. Observaram-se também outras morfologias como cocos, cocos bacilos, cocos fluorescentes e a presença de *Methanosaeta* sp. O aparecimento de grumos e da turvação do meio foram relacionados à presença de *Methanosarcina* sp. No trabalho realizado por VAZOLLER (1995b), a concentração de bactérias metanogênicas encontrada para o lodo termófilo de mesma origem foi da ordem de 10⁸ enquanto o medido nesse trabalho foi de 10³ células NMP/mL. Essa diferença de valores de NMP encontrados pode ser associada às características fisiológicas do inóculo. VAZOLLER (1995b) observou em uma primeira microscopia sarcinas e bacilos com fluorescência, enquanto nesse trabalho, observou-se baixa concentração de bacilos no lodo, não sendo observado a presença de sarcinas, mas estruturas na forma de cistos foram observadas. A ativação metanogênica do lodo mostrou uma maior diversidade de bacilos quando acetato foi empregado como fonte energética, e bacilos formadores de filamentos do gênero *Methanosaeta* sp. (Figura 30a) e aglomerados de *Methanosarcina* sp. (Figura 30b) As morfologias encontradas estão apresentadas na Figura 30.

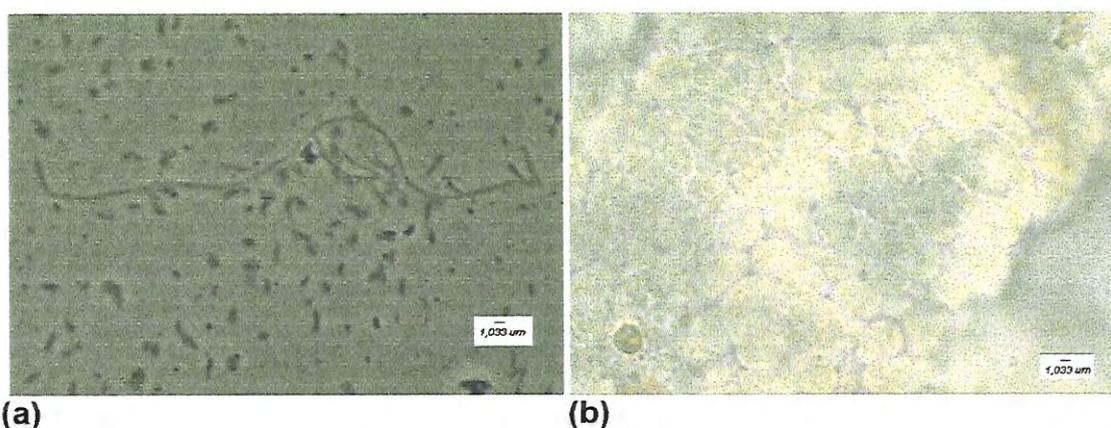


Figura 30. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica acetato de sódio (20 mmoles/L). (a) e (b) diluição 10⁻³ (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Segundo WIEGANT apud VAZOLLER (1995b), no processo termofílico de digestão anaeróbia, a degradação do ácido propiônico pode ter algumas restrições, principalmente em meios acidificados, uma vez que alguns organismos que participam desse processo apresentam baixa velocidade específica de crescimento, com relação aos organismos hidrogenotróficos. Em reatores UASB, foi observado que a degradação do propionato acontece em regiões onde a concentração de hidrogênio é menor. Como o hidrogênio é um produto da oxidação anaeróbia da matéria orgânica, a sua produção influencia o curso das reações nos ecossistemas anaeróbios (DOLFING, 1988).

Nesse trabalho, as contagens em apenas propionato de sódio como fonte de carbono, registrou-se uma concentração de células $1,7 \times 10^3$ células de NMP/mL, sendo encontrado a mesma concentração para as metanogênicas. Verificou-se morfologias de sarcinas e bacilos, com um predomínio celular caracterizado por bacilos curvos não fluorescentes. Na fluorescência observou-se um predomínio de sarcinas, porém foram registrados bacilos pequenos fluorescentes e cocos fluorescentes. A Figura 31 apresenta as principais morfologias observadas no ensaio com propionato.

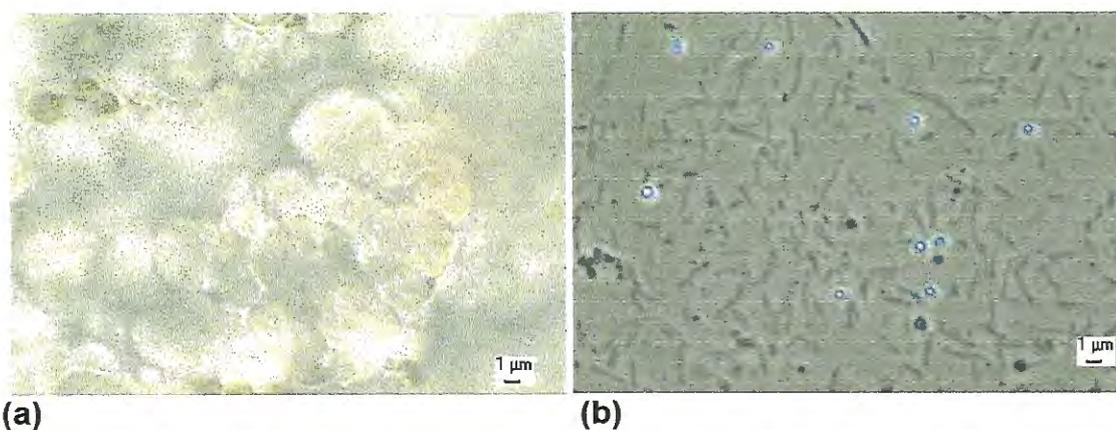


Figura 31. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo termófilo na fonte orgânica propionato de sódio (20 mmoles/L) (a) e (b) diluição 10^{-4} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Sob condições metanogênicas, a transferência de hidrogênio entre as espécies foi melhor compreendida nos estudos sobre a degradação anaeróbia da matéria orgânica complexa (HOUWEN, 1990). Assim, nos

meios de contagem utilizados, a primeira etapa a hidrólise de polímeros complexos a monômeros não foi estimulada, mas a fermentação do açúcar pela adição do substrato glicose foi verificada. A etapa seguinte, fase acetogênica, as bactérias acetogênicas sintróficas foram estimuladas pela presença de ácidos orgânicos como butírico, propiônico e láctico, na sua forma de sal, com ou sem sulfato de sódio, específico para estimular o desenvolvimento de BRS. O crescimento em glicerol, um álcool passível de fermentação, também pode ocorrer por bactérias da fase acetogênica. Os substratos orgânicos, ácidos acético e fórmico e o álcool metanol, bem como a mistura gasosa de dióxido de carbono e hidrogênio serviram como base para o desenvolvimento das metanogênicas, ou seja, a conversão desses compostos em metano e dióxido de carbono. Particularmente, as reações acetogênicas para a degradação dos ácidos butírico e propiônico só são facilitadas mediante a retirada de hidrogênio do sistema (STAMS et al., 1992), realizada pelas células hidrogenotróficas, dentre elas as metanogênicas. Segundo WINTER & ZELLER apud VAZOLLER (1995b) todo o hidrogênio produzido no meio de cultura sintrófica pode ser utilizado pela *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

5.3.2 Sedimentos da Represa do Lobo

Segundo VAZOLLER (1995), o fluxo de carbono durante a degradação de anaeróbia de polímeros, por exemplo a celulose, é o mesmo para microrganismos mesófilos e termófilos, uma vez que a degradação de polímeros na fermentação de carboidratos e a formação dos produtos intermediários são mediados pela eficiência da remoção do hidrogênio pelas espécies de células procarióticas anaeróbias.

Empregando-se a técnica de contagem estimativa do NMP foram identificadas e quantificadas células procarióticas anaeróbias mesófilas provenientes do sedimento da Represa do Lobo. Os experimentos de contagem foram realizados utilizando-se o meio basal Zinder acrescido separadamente dos seguintes substratos orgânicos: acetato de sódio, formiato de sódio, etanol, metanol, lactato de sódio e a mistura de gás

N_2/CO_2 (70:20% v/v). Nesses ensaios, também foram identificadas diferentes morfologias presentes nos lodos anaeróbios.

O NMP foi obtido pela leitura de cinco frascos inoculados em cada série da diluição, como anteriormente apresentado. As leituras do crescimento celular metanogênico nos frascos foram confirmados pela produção de metano (as leituras estão apresentadas no Anexo 4) nas diferentes diluições, além da determinação de turbidez para os demais frascos incubados. A Tabela 15 apresenta os valores estimados de NMP para as contagens realizadas do lodo mesófilo, amostra B₂₁.

Tabela 15. Valores estimados de NMP/mL do lodo mesófilo ativado sob condições metanogênicas.

Condições	NMP/mL Leitura Turbidez	NMP/mL Leitura de Metano
Lactato de sódio (20 mmoles/L)	$4,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^2$
Acetato de sódio (20 mmoles/L)	$1,7 \times 10^7$	$9,2 \times 10$
N_2/CO_2 (70:30% v/v) - controle	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^3$
Metanol (20 mmoles/L)	$9,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^2$
Formiato de sódio (20 mmoles/L)	$3,7 \times 10^6$	$5,6 \times 10^3$
Etanol (20 mmoles/L)	$1,6 \times 10^6$	8,2

Na presença da fonte de carbono lactato de sódio, encontrou-se a maior concentração celular, $4,5 \times 10^7$ células NMP/mL, com o predomínio de bacilos de diversos tamanhos e formas. Foi possível visualizar bacilos curvos não fluorescentes, com comprimento superior a $2,5 \mu m$, e que foi cultivado à $25^\circ C$ e que são semelhantes ao gênero *Desulfovibrio* sp (Figura 33a) e outros bacilos curvos com forma elipsoidal, comprimento maior que $1,5 \mu m$ e que se assemelham aos organismos do gênero *Desulfobulbus* sp, (Figura 33b) considerando a descrição apresentada no Manual de BERGEY (1989), segundo POSTGATE (1979) esses organismos redutores do íon sulfato que podem utilizar o lactato como substrato energético, na presença ou na ausência de sulfato de sódio. O sulfato se presente, estimula a condição metabólica de desassimilação redutiva do íon sulfato. O lactato tem sido usado para o enriquecimento e cultivo de culturas BRS, em que é oxidado

completamente ou incompletamente por várias espécies como *Desulfovibrio* sp, *Desulfotomaculum* sp. e *Desulfobacter* sp. Nos ecossistemas anaeróbios, a degradação do lactato leva as redutoras de sulfato a competirem com as bactérias fermentativas (WIDDEL, 1988).

De acordo com VAZOLLER (1995b), o lactato é um importante intermediário metabólico na digestão anaeróbia de resíduos orgânicos, e pode ser degradado por diferentes rotas bioquímicas cujos produtos são acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, se fermentado pelas BRS. Assim, o hidrogênio formado pode ser removido por bactérias hidrogenotróficas, configurando a relação sintrófica entre BRS produtoras de hidrogênio e as consumidoras desse gás. Outra rota pode originar o dióxido de carbono, acetato e sulfeto de hidrogênio, pela redução de compostos sulfurosos, ou a respiração anaeróbia do sulfato. Além disso, outra rota pode levar o lactato a ser degradado a propionato, acetato e dióxido de carbono. Com relação as metanogênicas, foi possível detectar a presença de sarcinas (Figura 32d), alguns bacilos fluorescentes e cocos fluorescentes, esses últimos mais raros. O predomínio de células do tipo sarcina que apresentaram boa fluorescência, (não foi possível registrar). As Figura 32 (a)-(d) mostram as principais morfologias encontradas no meio alimentado com lactato.



Figura 32a



Figura 32b (ver legenda na p. 108)

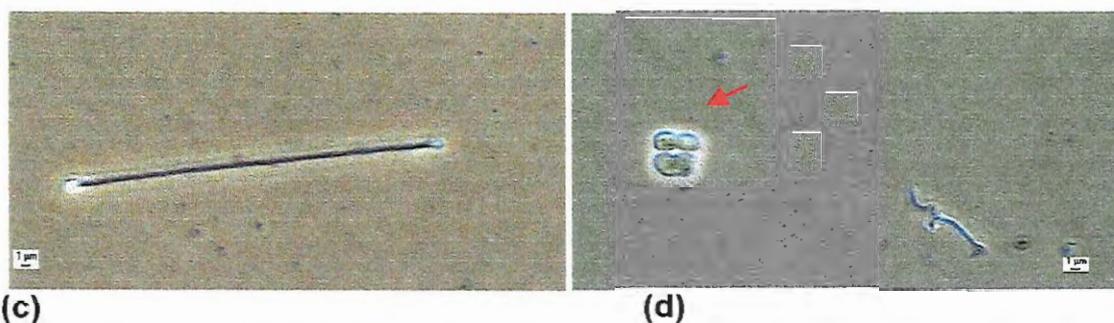


Figura 32. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo mesófilo na fonte orgânica de lactato de sódio (20 mmoles/L). (a) e (b) diluição 10^{-6} , (c) diluição 10^{-5} (d) diluição 10^{-3} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Segundo OREMLAND (1988), ambos acetato e hidrogênio são importantes precursores de metano nos sedimentos aquáticos. O acetato é um dos substratos mais comuns como precursor de metano na natureza, e estima-se que 70% do metano formado em sedimentos lacustres são produtos da degradação do acetato. Os organismos responsáveis por essa degradação são as bactérias metanogênicas acetoclásticas, como os gêneros *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e *Methanococcus* sp. (OREMLAND, 1988). Em sedimentos de lagos, no solo, ou em águas subterrâneas muitos organismos participam das rotas metanogênicas da transformação de compostos. Ao conjunto desses organismos dá-se a denominação de consórcios anaeróbios metanogênicos e, em geral, são identificadas espécies como *Methanobacterium formicium* e *Methanospirillum hungatei*, sendo esses organismos utilizadores de hidrogênio (OREMLAND, 1988; BERGEY, 1989). No presente trabalho foi determinada a concentração de $1,7 \times 10^7$ células NMP/mL para o substrato orgânico acetato de sódio, e observou-se um predomínio de bacilos e sarcinas fluorescentes. As sarcinas foram semelhantes a descrição da espécie *Methanosarcina barkeri*, que pode ser encontrada em sedimentos lacustres, e reduz o acetato a metano (BERGEY, 1989; BALCH et al., 1979). Outras morfologias observadas foram cocos fluorescentes, muitos cocobacilos, bacilos espiralados e alguns bacilos filamentosos. Observou-se também a presença de alguns bacilos que pareciam movimentar-se rapidamente. Nesses casos, as fotomicrografias

foram aprimoradas pela preparação das lâminas cobertas com uma solução de ágar-ágar liqüefeito (2 %m/v) que facilita a absorção da água das amostras a serem visualizadas. As diversas morfologias encontradas estão apresentadas na Figura 33.

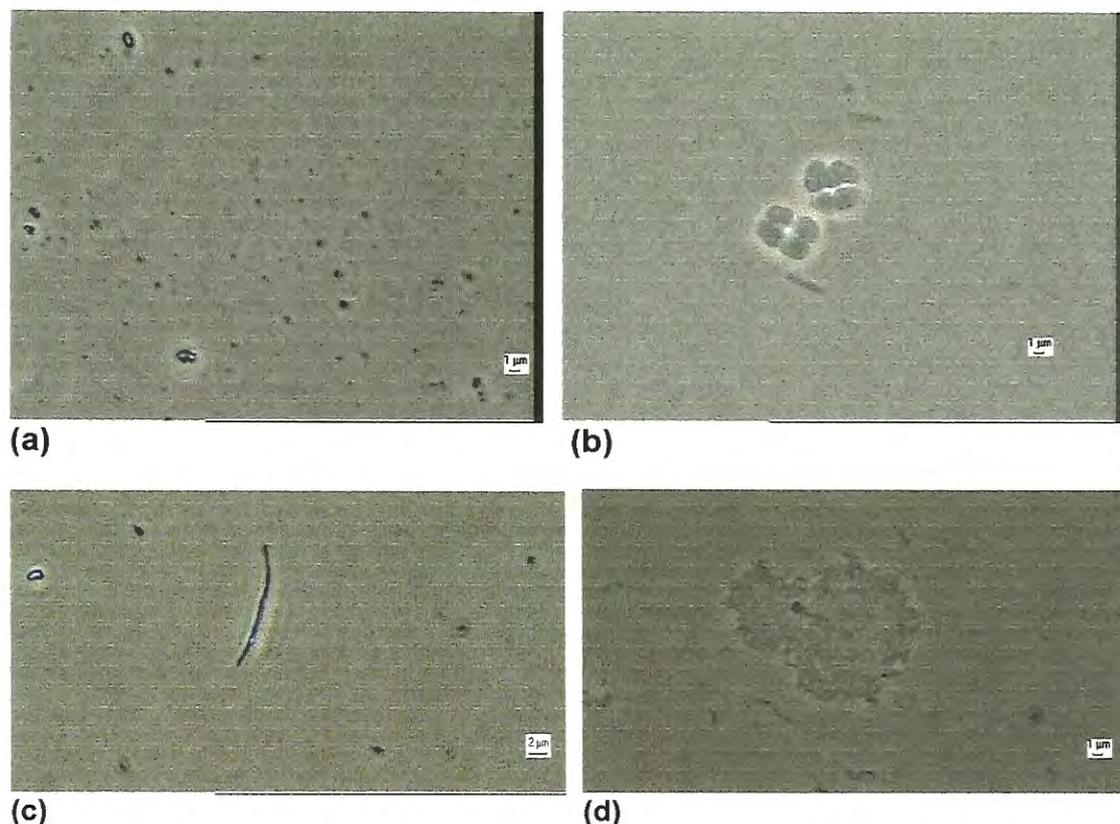


Figura 33. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo mesófilo na fonte orgânica acetato de sódio (20 mmoles/L). (a) e (b) diluição 10^{-4} (c) e (d) diluição 10^{-6} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

OREMLAND (1988) demonstrou que o processo da metanogênese em sedimentos aquáticos pode ter como fator limitante o hidrogênio, portanto substratos como acetato poderiam ser melhor utilizados por amostras como as da Represa de Broa. A ativação metanogênica do lodo mesófilo foi realizada utilizando as fontes descritas na Tabela 9 e essa ativação se fez necessária para favorecer o consórcio metanogênico presentes no sedimento da represa do Lobo. Segundo MADIGAN (1997) muitos organismos metanogênicos utilizam no processo de respiração anaeróbia o CO_2 como acceptor final de elétrons e o hidrogênio como elétron doador, sendo os organismos metanogênicos hidrogenotróficos importantes, na manutenção da digestão anaeróbia, uma vez que consomem o hidrogênio

produzido nas fases anteriores e ajudam a manter a pressão parcial do hidrogênio no meio. A fonte formiato foi utilizada na ativação do lodo para favorecer as metanogênicas hidrogênotróficas.

Outras fontes como o butirato, lactato e etanol, foram utilizadas na ativação do lodo como precursores do acetato, pelas acetogênicas (metanogênicas acetoclásticas), que certamente estimularam a seleção de determinados grupos microbianos. O acetato e metanol são fontes utilizadas pelo gênero *Methanosarcina* sp como precursor de metano e gás carbono.

As metanogênicas se utilizam de um limitado espectro de substratos. Seus principais substratos são acetato, dióxido de carbono, metanol e hidrogênio (H₂). As moléculas com mais de dois carbonos (exceto isopropanol) não são convertidas a metano e também os seus elétrons não podem ser usados para reduzir dióxido de carbono a metano na presença de metanogênica. Metanogênicas dependem de outros organismos como as acidogênicas para obter alguns substratos, participando assim de uma relação sintrófica com esses organismos (ZEHNDER, 1988). As contagens de NMP foram realizadas usando fontes diversas para favorecer organismos que participam dessa relação sintrófica e assim transformar substratos como propionato, butirato e etanol em produtos que podem ser utilizados pelas metanogênicas. Nessa contagem em que nenhum substrato foi adicionado, pode-se observar quais os organismos que se desenvolveram durante a ativação do lodo.

As contagens realizadas na ausência de substrato orgânico, sob atmosfera de N₂/CO₂ 70:30 % v/v resultou em uma concentração de células de 1.2×10^7 células NMP/mL. Nessas condições, também observou-se uma grande diversidade morfológica, como sarcinas, bacilos e cocos, com predomínio de bacilos e cocos muito pequenos (Figura 34 a). Alguns desses bacilos não fluorescentes observados tem a morfologia semelhante as descrições dos bacilos pertencentes ao gênero *Desulfobacter* sp (Figura 34 c) feitas no manual BERGEY (1989), esses organismos também tem por habitat lodo anaeróbio de água doce. Quanto as metanogênicas observou-se predomínio de sarcinas fluorescentes e também bacilos fluorescentes e

pequenos cocos. A Figura 34 retrata as diferentes morfologias presentes no referido ensaio.

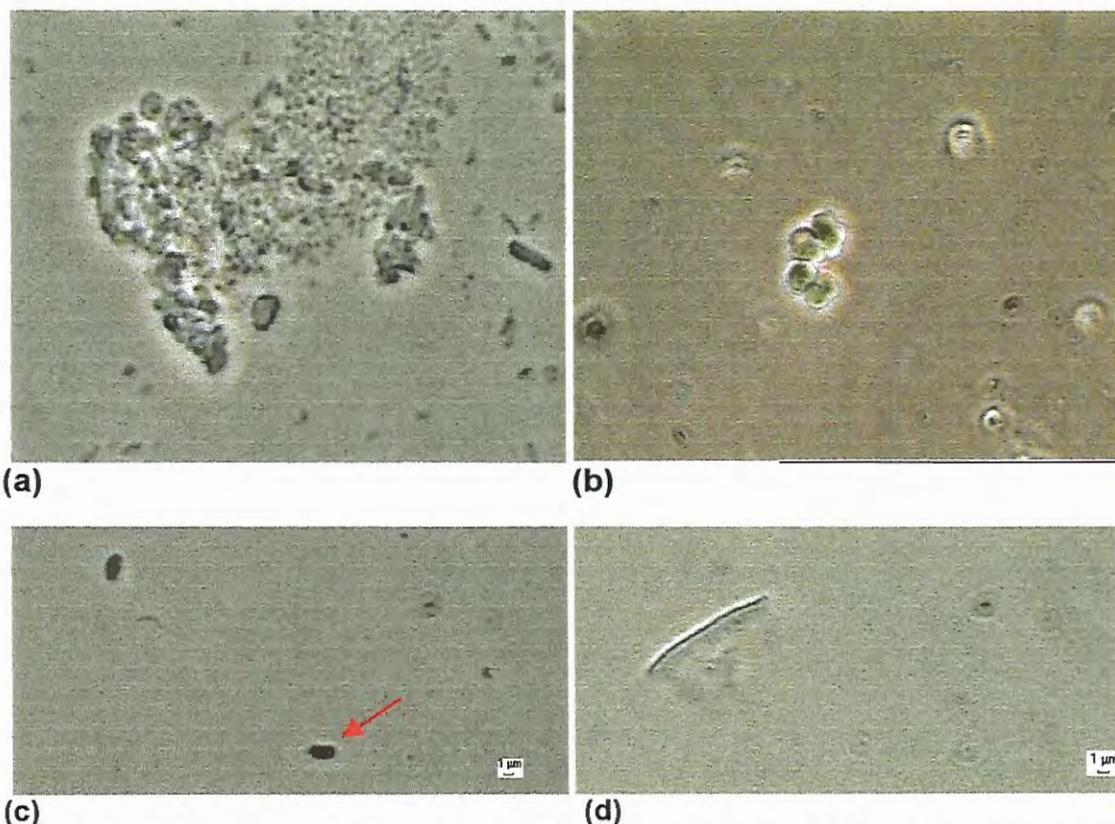


Figura 34. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo mesófilo sem adição de fonte energética, sob atmosfera gasosa de N_2/CO_2 70/30 % v/v. (a) diluição 10^{-6} e (b) diluição 10^{-3} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Na natureza, o metanol é derivado da biodegradação da pectina e de compostos aromáticos metoxilados. A ocorrência da biodegradação da pectina em ecossistemas anaeróbios estabelece nichos para os organismos metilotróficos. Esses microrganismos anaeróbios metilotróficos podem estar presentes em todo tipo de ambientes como sedimentos de água doce e marinhos, biodigestores de águas residuárias e rumem. Metanol é um substrato mais eficiente que o acetato e é utilizado pelas metanogênicas e acetogênicas (FLORENCIO, 1994). Um organismo semelhante a *Methanosarcina* foi descrito como a principal metanogênica responsável pela conversão de metanol a metano. Em relação as contagens de NMP em

metanol, uma concentração de células de $9,0 \times 10^6$ células NMP/mL foi obtida. Foram observadas sarcinas formadas por células pequenas e também outras morfologias, como bacilos fluorescentes, bacilos delgados e longos, livres ou aglomerados e não fluorescentes, bem como cocos. Algumas morfologias podem ser vistas na Figura 35.

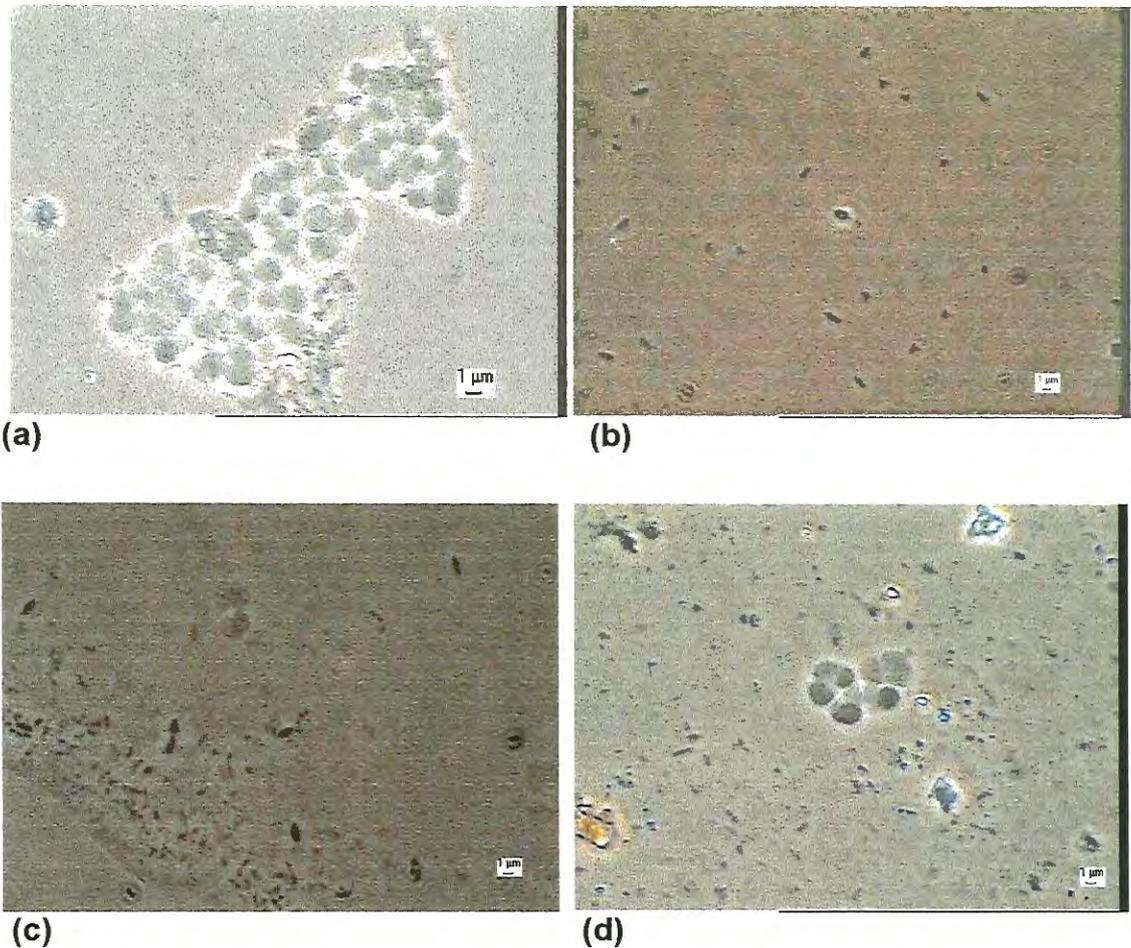


Figura 35. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo mesófilo em metanol (20 mmoles/L). (a) diluição 10^{-4} , (b) diluição 10^{-6} , (c) e (d) diluição 10^{-2} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Nos sedimentos de água doce as cargas orgânicas presentes são bem mais baixas que aquelas cargas observadas nos reatores (VAZOLLER, 1995b). Então, a concentração de hidrogênio liberada na degradação da matéria orgânica é pequena, sendo então necessário acrescentar fonte de carbono que favoreça o aparecimento de uma comunidade de hidrogenotrófica. A fonte formiato foi também utilizada para as contagens a

fim de verificar as hidrogenotróficas metanogênicas, como aquelas pertencentes a espécie *Methanobacterium formicicum*, comuns em sedimentos lacustres. Esses organismos são responsáveis pelo consumo de hidrogênio produzido nas fases anteriores da digestão anaeróbia. Na fonte orgânica formiato de sódio, ocorreu o crescimento de bacilos hidrogenotróficos. A turvação do meio de cultura foi relacionada a esse crescimento celular, numericamente de 10^6 células NMP/mL. Provavelmente essas células pertencem ao gênero *Methanobacterium* sp (Figura 34a). Nesse meio de cultivo a predominância morfológica foi a de bacilos. Foram observados bacilos delgados e compridos e poucas sarcinas e cocos. A Figura 36 destaca as principais morfologias encontradas no ensaio do NMP, nessa fonte de carbono.

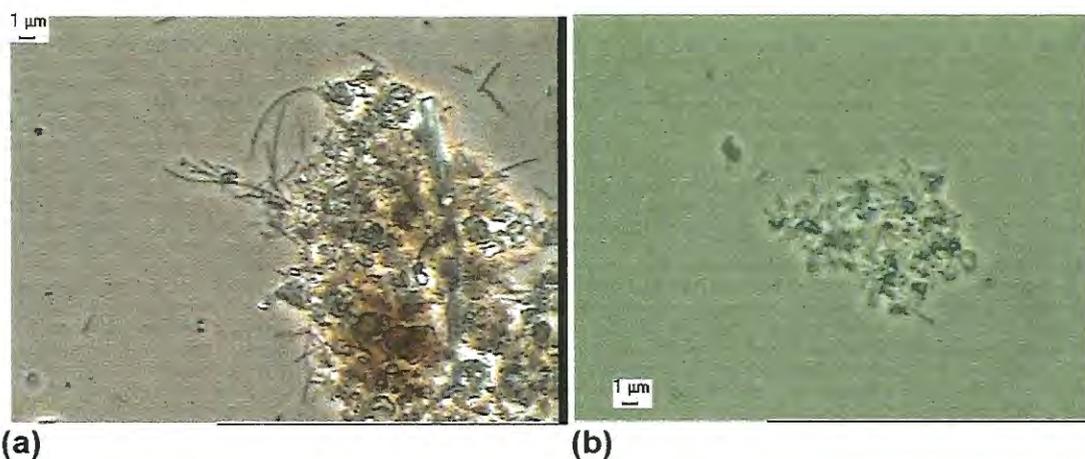


Figura 36. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo mesófilo em formiato de sódio (20 mmoles/L). (a) diluição 10^{-2} , (b) diluição 10^{-3} , (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

O etanol é um dos produtos da degradação da glicose por bactérias fermentativas. O resultado sobre o consumo de etanol é indispensável à análise da transferência de hidrogênio entre as espécies. O etanol é metabolizado a acetato e hidrogênio por organismos fermentativos do tipo clostrídios e pelas bactérias redutoras do íon sulfato durante a etapa acetogênica da biodigestão anaeróbia (VAZOLLER, 1995b). A contagem pelo NMP que teve como fonte o etanol, sendo observado o predomínio de sarcinas fluorescentes. A concentração de células foi $1,6 \times 10^6$ NMP/mL.

Além das sarcinas fluorescentes, foram constatados bacilos e cocos fluorescentes, bacilos não fluorescentes e alguns bacilos delgados e longos. A Figura 37 mostra as morfologias observadas no ensaio com etanol.

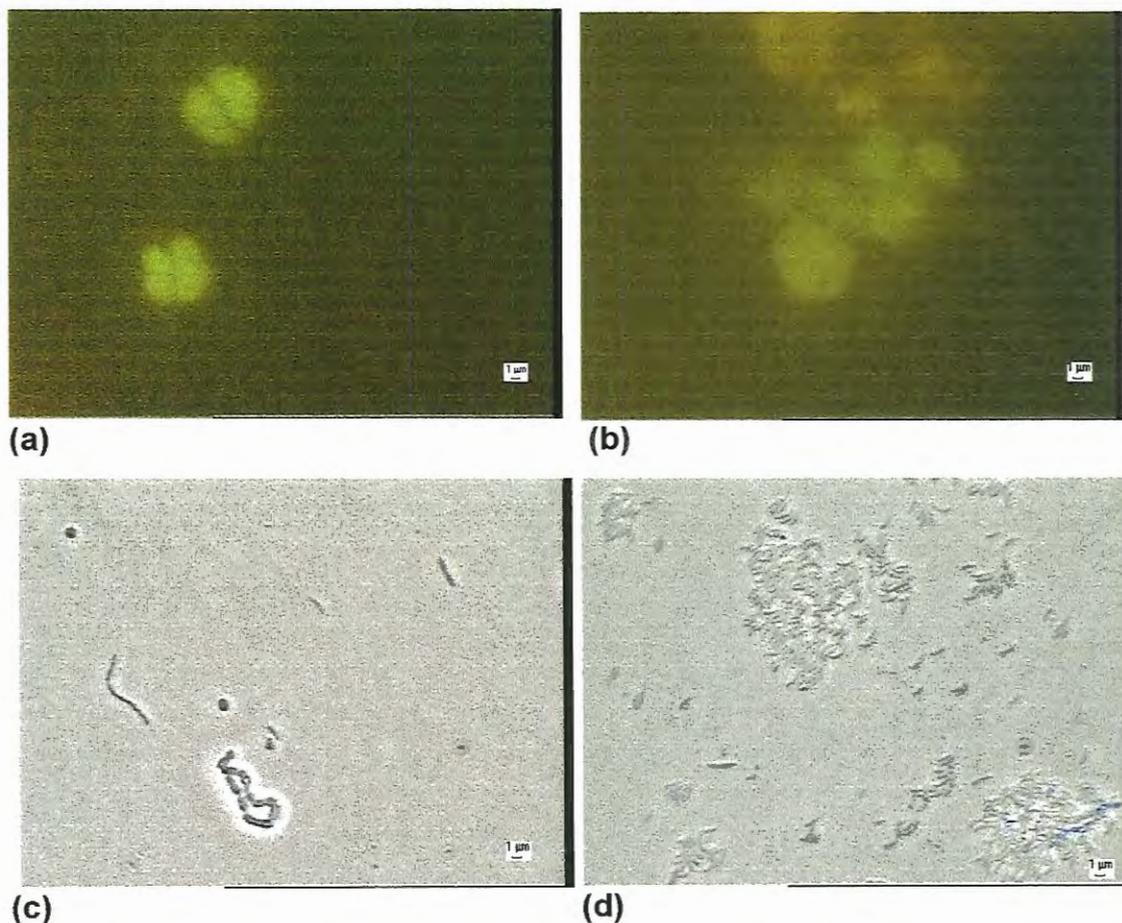


Figura 37. Fotomicrografias de amostras das contagens de NMP com lodo mesófilo em etanol (20 mmoles/L). (a) e (b) diluição 10^{-2} , sob fluorescência (c) diluição 10^{-5} , (d) diluição 10^{-8} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

5.4. Estudos sobre o decaimento anaeróbico do composto tricloroetileno (TCE)

O decaimento do composto TCE por microrganismos anaeróbios vem sendo intensamente estudada, como pode ser observado no texto apresentado na revisão da literatura (Capítulo 3). A Figura 2, mostrada nesse capítulo, constitui um dos principais esquemas propostos sobre as etapas da degradação anaeróbia do TCE a dióxido de carbono (McCARTY & VOGELS,

1985), revelando possíveis rotas para a estabilização metanogênica do composto. Alguns de seus intermediários podem também ser tóxicos, como por exemplo, o cloreto de vinila (CV).

Sob condições metanogênicas, o esquema de DiSTEFANO et al. (1992), observado na Figura 38, propõem rotas semelhantes para a biodegradação de PCE. Como pode ser observado nesse esquema, além da produção do dióxido de carbono, o gás metano e o etileno (ETH) são também produzidos. DiSTEFANO et al. (1992), trabalhando com vancomicina (antibiótico natural produzido por *Etrepitomyces orientalis* da Indonésia) e BES (ácido 2-broetanossulfônico) em sistemas alimentados com PCE-metanol e PCE-hidrogênio mostraram que os organismos que desalogenaram o PCE utilizaram o hidrogênio, e foram possivelmente as metanogênicas. Esses estudos demonstraram que na presença de vancomicina (que inibe a acetogênese), sugerem que as acetogênicas provavelmente não desalogenaram o PCE. A inibição no esquema mostrado na Figura 38 é representada por X. Assim, o esquema mostrado na Figura 38 apresenta as rotas hipotéticas das metanogênicas e acetogênicas em culturas enriquecidas com PCE-metanol, em que altas concentrações de PCE podem inibir a metanogênese do metanol, acetato e hidrogênio (inibição indicada por X). Como discutido, a vancomicina inibe a acetogênese, bloqueando assim a transformação de metanol em acetato. Esses autores então sugerem que a desalogenação de PCE ou outro organoclorado como TCE é implementada em sistemas alimentados diretamente por hidrogênio (doador de elétrons) ou em culturas mistas que empregando substratos como a glicose, acetato, formiato, sacarose, lactato, propionato, crotonato, butirato, etanol e metano, que produzem pequena concentração de hidrogênio, suficiente para participar da desalogenação redutiva dos compostos clorados.

Em outro estudo conduzido por FREEDMAN & GOSSETT (1989), foi demonstrado que 0,5 mmoles/L de BES (ácido 2-broetanossulfônico) foi suficiente para cessar completamente a metanogênese e a desalogenação de TCE por culturas mistas em águas subterrâneas contaminadas.

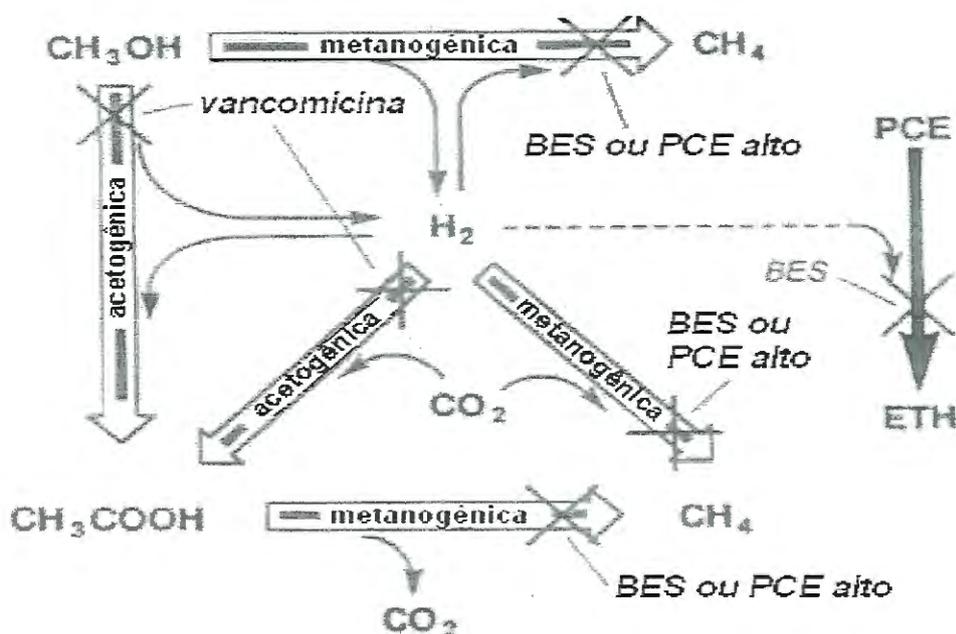


Figura38 Rotas hipotéticas das metanogênicas e acetogênicas na desalogenação de PCE.

Fonte: DiSTEFANO et al. (1992).

No presente trabalho procurou-se verificar a ocorrência da ação de organismos cultivados sob condições metanogênicas sobre o TCE, a partir das duas diferentes fontes de microrganismos, sem contudo poder certificar qual a cultura ou culturas microbianas ativas na degradação do composto testado. A escolha de ensaios em frascos-reatores de pequeno volume, procurando enriquecer as amostras em fontes orgânicas, seguiu as sugestões propostas por diferentes autores (DOLFING et al., 1985; FREEDMAN & GOSSET, 1989; DiSTEFANO et al., 1991 e 1992; WU et al., 1993; VAZOLLER et al., 1995; GAO et al., 1995; LARIZATTI, 1997). As amostras enriquecidas com fontes orgânicas e alimentadas com TCE foram monitoradas em relação a produção de metano, degradação do composto clorado, produção de ácidos orgânicos intermediários e presença numérica de grupos microbianos frente as fontes orgânicas específicas. Os procedimentos de monitoramento da atividade anaeróbia nos frascos reatores foram baseados nos trabalhos de VAZOLLER et al. (1995);

LARIZATTI (1997); OLIVEIRA (1998). A concentração de TCE estudada foi escolhida com base nos estudos anteriores de WU et al. (1993) e LARIZATTI (1997), porém buscando relacioná-la à quantidade de células encontradas nas amostras. Sendo assim, determinou-se a concentração de sólidos totais e sólidos totais voláteis, a fim de se conhecer a quantidade de biomassa presente nos reatores e amostras ambientais. Esse tipo de determinação é usual na área de saneamento.

LARIZATTI (1997) trabalhou com um lodo anaeróbio proveniente de um reator UASB de uma estação de tratamento de água residuária de uma indústria de papel e celulose, que foi cultivado em frascos-reatores em escala de laboratório com pentaclorofenol (PCP). Os sistemas operados a 30°C, apresentaram redução de atividade metanogênica quando alimentados com PCP em concentrações superiores a 10 mg/L. O pesquisador trabalhou com uma concentração inicial de PCP de 5 mg/gSSV.

OLIVEIRA (1998), utilizando lodo termófilo de mesma procedência do presente trabalho de mestrado, empregou uma concentração inicial de 2,5 mg de PCP/L e 2,3 g SSV/L, ou seja 1,09 mg de PCP/g de SSV. Nesse trabalho, foi possível degradar PCP nessa concentração, sem inibir a comunidade metanogênica.

Considerando os estudos anteriores do grupo (LARIZATTI, 1997; OLIVEIRA, 1998), em relação a compostos aromáticos clorados e os resultados anteriores de ZINDER et al. (1991) e DiSTEFANO et al. (1992), decidiu-se estudar a degradação do TCE na concentração de 5 mg/g STV. Sendo um composto alifático clorado, de reconhecida degradação sob metanogênese, as respostas a serem conhecidas estariam relacionadas aos dois tipos de lodos escolhidos para o estudo, sempre sob condições metanogênicas.

A seguir, são apresentados os resultados individualmente obtidos com as duas amostras, nos testes sobre a biodegradação de TCE. O último item dessa etapa de apresentação dos resultados faz uma comparação sobre a eficiência de cada amostra na degradação anaeróbia do TCE.

5.4.1 Decaimento do TCE pelo lodo termófilo (2 ensaios)

5.4.1.1 Valores de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) do lodo termófilo

As determinações das concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) do lodo termófilo foram feitas em triplicata no início do estudo da biodegradação do TCE, com a intenção de poder calcular a quantidade de TCE a ser adicionada, de modo a manter a relação de 5mgTCE/gSTV. A determinação foi feita após a fase sem enriquecimento ou ativação metanogênica da amostra original. Além disso, ao final dos experimentos sobre a biodegradação do TCE foram realizadas as mesmas determinações. Lembrando que os valores iniciais apresentados para ST e STV, respectivamente de 29,3 e 11,6 g/L não são correspondentes aos inoculados, pois esses sofreram diluição no meio (diluição de 5 vezes, uma vez que tomou-se uma alíquota de 100 mL do lodo termófilo e esse foi reativado em um volume final total de 500 mL. Essa diluição de 5 vezes foi praticamente mantida para o valor de STV e aquela diferença verificada para os valores de ST pode estar relacionada com a heterogeneidade das amostras de lodo analisadas. O valor esperado de ST seria em torno 20,2, e foi determinado um valor de 29,3 g/L. Os valores finais foram os retirados do meio de reação, do reator T₂, e corresponderam para ST e STV 1,7 e 0,65 g/L, respectivamente. Esses valores encontrados estão dentro do intervalo de erro esperado nesse tipo de determinação e também da diluição feita (1/10 v/v), uma vez que tomou-se alíquotas de 10 mL do lodo ativado e esses foram colocados em cada reator contendo TCE com volume final de 100 mL. O protocolo da biodegradação de TCE utilizando-se o lodo termófilo foi descrito no item 4.7.1. As composições e concentrações das soluções contidas nos reatores foram apresentadas na Tabela 10.

VAZOLLER (1995) e OLIVEIRA (1998) encontraram para o mesmo lodo oriundo do reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) valores de STV da ordem de 20,00 g/L e 23,00 g/L, respectivamente. O teor inicial de STV encontrado nesse trabalho, cerca de 12 g/L, está

aquém dos citados pelos autores (opt. cit.), indicando um menor conteúdo de biomassa.

Para o segundo ensaio do estudo da biodegradação do TCE não foram determinadas as concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV), uma vez que foi empregado o mesmo lodo termófilo proveniente da Usina São Martinho.

Foi empregado o mesmo lodo, e sendo assim, foram consideradas as mesmas concentrações iniciais de STV do lodo ativado (11,6 g/L) para o cálculo do teor de TCE a ser adicionado, a fim de manter a relação de 5mg TCE/g STV.

5.4.1.2. Produção de ácidos orgânicos e gás metano durante a degradação do TCE

O protocolo do estudo da biodegradação de TCE utilizando-se o lodo termófilo foi descrito no item 4.7.1. As composições e concentrações das soluções contidas nos frascos reatores foram apresentadas na Tabela 10.

Para o cálculo da concentração do TCE remanescente nos reatores durante os ensaios de degradação utilizou-se a curva analítica (calibração) de TCE preparada no Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. O Anexo 5 apresenta essa curva obtida.

As quintuplicatas dos reatores foram denominadas: T₁; T₂; T₃; T₄ e T₅ e todos foram montados seguindo o mesmo protocolo. Os reatores de controle (controle biótico) não contendo TCE, foram denominados T₆ e T₇. A remoção abiótica (controle abiótico) de TCE foi acompanhada nos reatores T₈ e T₉ isentos do inóculo.

No ensaio II, estudou-se novamente a degradação de TCE empregando-se o lodo termófilo. A degradação de TCE (biótica e abiótica) foi acompanhada com mais 9 reatores (T₁₂ até T₉₂). No segundo dia (48 horas) após a montagem dos reatores, ao examinar-se os reatores, notou-se que o meio líquido do reator T₉₂ havia se tornado rosa intenso, sinal de que o meio estava oxidado (aeróbio). Então, esse reator foi descartado, sendo assim o estudo da degradação de TCE foi realizado com 8 reatores (T₁₂ até T₈₂).

Mais adiante, uma comparação dos estudos de degradação de TCE será mostrado.

Os seguintes parâmetros, a saber: pH, concentração de metano no "headspace", ácidos orgânicos voláteis (AOV) e concentração de TCE remanescente foram acompanhados rotineiramente, até o término desse ensaio (período de 91 dias). Ao final do estudo da biodegradação de TCE, foi montado um segundo ensaio de NMP.

Cada reator foi inicialmente preparado com um volume total de solução de 100 mL (volume útil). Foi fixado um volume de 10 mL, como volume máximo de retirada de alíquotas, objetivando não exceder 10 % do volume inicial. Sendo assim, para cada reator, foram retiradas 3 ou 4 alíquotas de 2 mL para a determinação cromatográfica da concentração de TCE remanescente em cada reator e ainda 4 alíquotas de 0,5 mL para as determinações de AOV e pH.

O valor de pH determinado nas amostras retiradas dos reatores de T_1 a T_7 nos dias: 2, 7, 14, 21, 28 e 34 foi de aproximadamente 8,0, e nos reatores T_8 e T_9 , no mesmo período, foi em torno de 7,0.

O frasco reator T_2 foi selecionado para a avaliação quantitativa das células por NMP. Os valores de pH do reator T_2 foram determinados em triplicata com o auxílio de potenciômetro, sendo encontrado em média 8,0 (valores: 8,0; 7,9 e 7,8). Esses valores de pH foram semelhantes aos determinados com a fita de papel.

O Anexo 14 mostra uma tabela das concentrações de TCE (ppb) encontradas no estudo de decaimento desse composto para os reatores de T_1 a T_5 (biótico) e T_8 e T_9 (abiótico) em função do tempo em dias, apresentado na Figura 19.

A Figura 39 mostra a remoção abiótica de TCE correspondente aos reatores T_8 e T_9 e o decaimento da concentração de TCE encontrados na biodegradação de TCE nos reatores de T_1 a T_5 contendo o inóculo termofílico. Como discutido anteriormente, os reatores T_8 e T_9 não foram inoculados, servindo assim como reatores controle, e a fim de avaliar a possível degradação química do TCE. Como pode ser observado, houve

decréscimo na concentração do TCE de aproximadamente 30% durante os 35 dias de incubação. Em geral, o TCE pode estar em solução e na atmosfera do sistema. A temperatura de incubação dos sistemas poderia facilitar o escape do composto para a atmosfera. No entanto, não pode se descartar possíveis perdas durante a extração, ou mesmo a degradação química devida a interação com compostos do meio.

BRADLEY & CHAPELLE (1999) estudaram a degradação (abiótica e biótica) de TCE e DCE. No estudo da degradação química de TCE, partindo de uma concentração inicial de TCE de 20 ppb, após 10 dias de incubação, houve uma degradação química desse composto de 25%. A percentagem de degradação de TCE obtido nesse trabalho de dissertação foi semelhante a obtida por esses autores. Esses autores estudaram a degradação química do TCE em um período de 250 dias, sendo então obtida uma degradação de TCE de aproximadamente 35% daquela concentração inicial, mostrando assim a relativa estabilidade desse organoclorado.

Analisando-se as curvas de degradação de TCE obtidas nos reatores contendo o inóculo (T_1 - T_5) (Figura 39), pode-se constatar que pelo menos 70% da concentração inicial de TCE foi degradada durante os primeiros 15 dias, sendo que no reator T_2 houve uma degradação de 80% no mesmo período. Entre o 15^o e o 34^o dias de incubação o decaimento da concentração de TCE foi pouco acentuado. Os resultados comparados com os reatores controle podem ser relacionados a uma ação biótica no reator, como a atuação dos microrganismos termófilos. Como será visto posteriormente, a metanogênese não foi afetada pela presença do TCE. Não foram realizados testes em que adsorção do composto nas células poderia ser constatada. DAMIANOVIC (1997), estudou a adsorção de pentaclorofenol em lodos anaeróbios granulados e em espuma de poliuretano, e conclui que o composto clorado não foi adsorvido no lodo.

No presente estudo, ocorreu uma taxa de decaimento entre 70 e 80% de TCE nos 15 primeiros dias de incubação do lodo termofílico. BRADLEY & CHAPELLE (1999), empregando sedimento lacustre contaminado com compostos clorados obtiveram uma biodegradação de TCE de apenas 55%,

indicando assim uma menor eficiência de remoção de TCE que aquela obtida no presente estudo. No entanto, esses autores obtiveram uma remoção de TCE de 88% em 34 dias de incubação.

DISTEFANO et al. (1991, 1992) estudaram a degradação de PCE e TCE em frascos reatores de 160 mL e volume útil de 100mL, sob condições anaeróbias e a 35°C, empregando uma cultura mista de um reator de laboratório que é mantido em condições anaeróbias, cujo inóculo foi oriundo de lodo de uma usina de tratamento de esgoto da cidade de Ithaca, Estados Unidos da América. A fonte de carbono empregada foi metanol e PCE foi degradado inteiramente em TCE, DCE, CV e eteno em um período entre 14 e 40 dias em função da concentração de hidrogênio no headspace desses reatores anaeróbios de bancada.

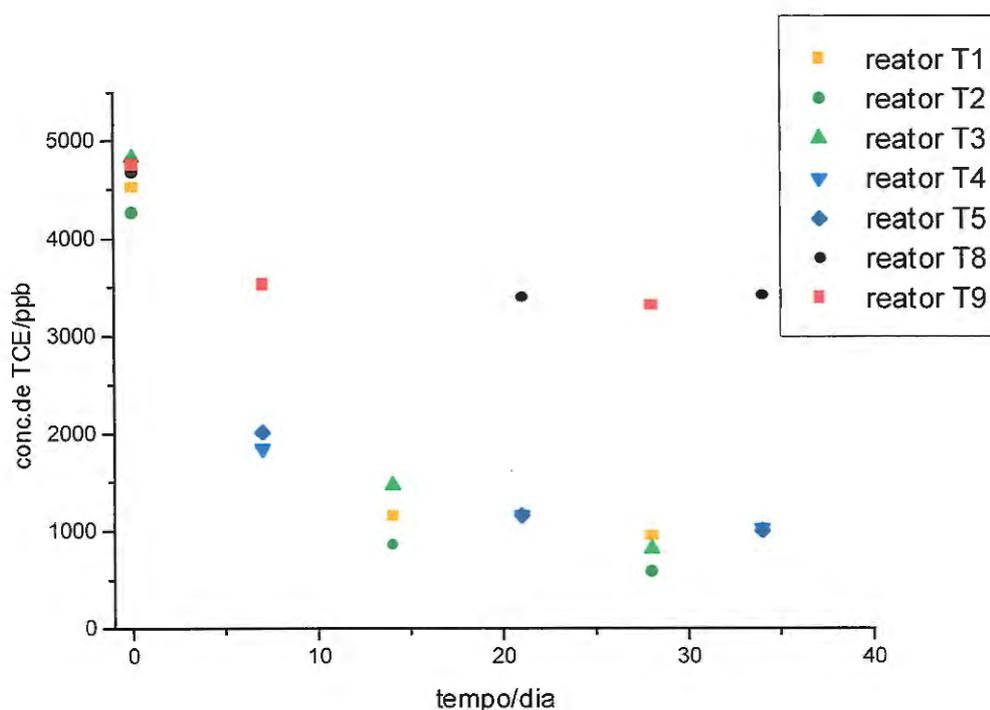


Figura 39.Decaimento da concentração de TCE nos reatores T₁ a T₅ (biótico) e T₈ e T₉ (abiótico) com o tempo

Após a reativação inicial do lodo termófilo, como descrito no item 4.5.1, foi feita a primeira contagem de NMP utilizando as fontes descritas na Tabela 14, com o objetivo de caracterizar e quantificar os organismos metanogênicos e não metanogênicos presentes anteriormente à biodegradação de TCE que possam estar envolvidos nesse processo de degradação.

Nas diversas fontes de carbono empregadas na contagem do NMP houve um predomínio de bacilos hidrogenotróficos semelhantes ao gênero *Methanobacterium sp.* Foram também observados *Methanosarcina sp.*, *Methanonosaeta sp.* e bactérias redutoras de sulfato como as *Desulfotomaculum sp.* e *Desulfobulbus.*

Nas contagens iniciais de NMP nas fontes metanol, acetato de sódio/sulfato de sódio, butirato de sódio, acetato de sódio, glicerol, foram observados organismos semelhantes as *Methanosarcina sp.* PRAKASH & GRUPTA (2000) estudaram a biodegradação de TCE em um reator UASB e encontraram que *Methanosarcina sp.* e *Methanonosaeta sp.* presentes predominantemente nos grânulos foram os responsáveis pela remoção de altas concentrações de PCE. Convém salientar que nessa degradação 97,5 % PCE é convertido em TCE e 90% desse último composto é convertido em DCE, CV e etileno, respectivamente. Os resultados dos autores (opt. cit.) corroboram com aqueles resultados obtidos no presente trabalho, pois os organismos presentes nos estudos metanogênicos sobre a degradação do TCE, *Methanosarcina sp.* sempre parece estar presente. Outro ponto, considerando que nos experimentos realizados nessa dissertação, cujos resultados alcançam 80% de degradação de TCE, esse grupo metanogênico sempre esteve presente, é possível comentar que as observações recentes do envolvimento de culturas puras de sarcinas metanogênicas na utilização do TCE (FATHEPURE & BOYD, 1988; FREEDMAN & GOSSETT, 1989) é um caminho para o estímulo a digestão anaeróbia desse composto.

Segundo DiSTEFANO *et al.* (1991 e 1992), a degradação do TCE envolve principalmente um consórcio de organismos metanogênicos com produção de metano e CO₂. O hidrogênio serve como doador de elétrons na

desalogenação reductiva do PCE, TCE a CV e ETH, participando desse processo organismos como as acetogênicas que consomem acetato e as metanogênicas acetoclásticas, como as sarcinas metanogênicas.

PAVLOSTATHIS & ZHUANHG (1991) estudaram a degradação de TCE por culturas enriquecidas com bactérias redutoras de sulfato à 35 °C. Uma taxa de degradação de TCE em DCE de 213 $\mu\text{mol/L}$ por dia foi obtida e entretanto a conversão de DCE em CV e/ou etileno não foi observada nesse meio de cultura.

No presente trabalho, na contagem de NMP, foram encontrados bactérias redutoras de sulfato na fonte lactato de sódio/sulfato de sódio, acetato de sódio/ sulfato de sódio, propionato de sódio/ sulfato de sódio parecida com organismos semelhantes ao gênero *Desulfotomaculum* sp e *Desulfobulbus* sp.

Com relação ao segundo estudo feito com o lodo termófilo para o acompanhamento da biodegradação de TCE, observa-se um decaimento de 75-80% de TCE nos 15 primeiros dias, sendo pouco acentuada entre os dias 15^o e o 34^o (~85%). Esses resultados quando comparados com o reator controle (T₈₂) apresentaram um decaimento de TCE de 38% em 14 dias (Figura 40 e Anexo 14). Esses teores se mantiveram inalterados até o 34^o dia, confirmando assim a habilidade do lodo termófilo em biodegradar o TCE.

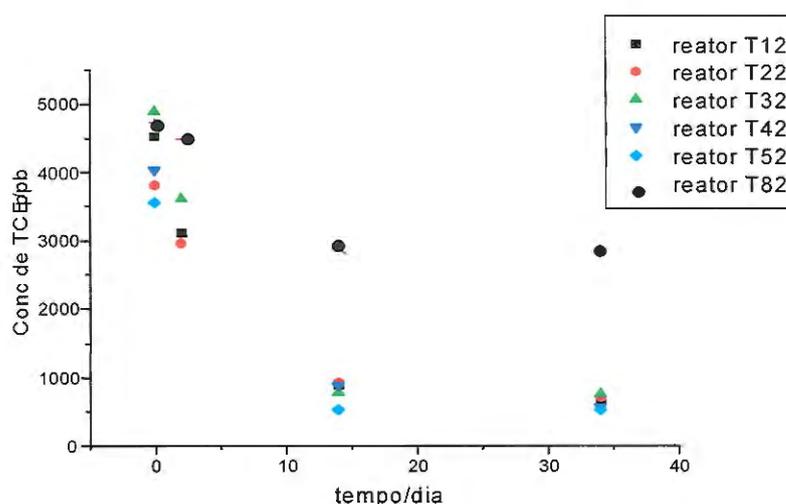


Figura 40.Decaimento da concentração de TCE nos reatores T₁₂ - T₅₂ e T₈₂

As Figuras de 41 a 47 apresentam as concentrações de metano ($\mu\text{moles/L}$), a partir da curva analítica de calibração 3 (Anexo 6), dos reatores T_1 a T_7 (os valores estão apresentados nos Anexos 7). Cabe lembrar que essas concentrações são estimadas, pois para os reatores não operarem sob condições de pressurização, esses foram despressurizados antes de cada amostragem. Assim, não foram determinadas as concentrações absolutas. No entanto, essas determinações de concentração de metano permitiram o acompanhamento da metanogênese ao longo dos experimentos.

Apesar da origem dos lodos utilizados nos reatores para o estudo da degradação de TCE ser a mesma, a comunidade de microorganismos pode ser diferente em cada reator, em função da inoculação, que por mais aprimorada, ainda pode levar à pequenas quantidades de amostra a mais ou a menos em cada reator. Segundo LARIZZATI (1997) a quantidade inicial de células presentes pode ser diferente em cada frasco reator, devido à formação de flocos ou grânulos que pode dificultar a homogeneização do lodo anaeróbico (mesófilo e termófilo) A diferença nas quantidades de lodo inoculadas pode levar a valores de metano ligeiramente diferentes entre as duplicatas.

Os reatores T_6 (Figura 41) e T_7 (Figura 42) ao final do 35^o dia continham um volume útil de 96,5 mL, uma vez que 3 alíquotas de 0,5 mL haviam sido retiradas para a determinação de AOV e uma de 2,0 mL para a determinação da concentração de TCE. Já, os reatores T_1 a T_5 , no final desse período, continham um volume útil de 92 mL, pois 3 alíquotas de 2,0 mL para determinação do TCE e 4 alíquotas de 0,5 mL para determinação de AOV haviam sido retiradas, totalizando assim um volume de 8% do volume inicial do meio de reação.

As Figuras 41 e 42 apresentam as concentrações de metano em função do tempo para os reatores sem TCE (T_6 e T_7). Observou-se um acréscimo da concentração estimada de metano na primeira semana, e essa decresceu em seguida mantendo-se praticamente constante até o dia 31^o. Em relação ao reator T_6 , houve um aumento da concentração estimada de

metano, indicando uma comunidade metanogênica mais ativa. No dia 62, houve uma re-alimentação desses dois reatores com as mesmas fontes de carbono empregadas no início das degradações levando assim a um aumento significativo da concentração estimada de metano.

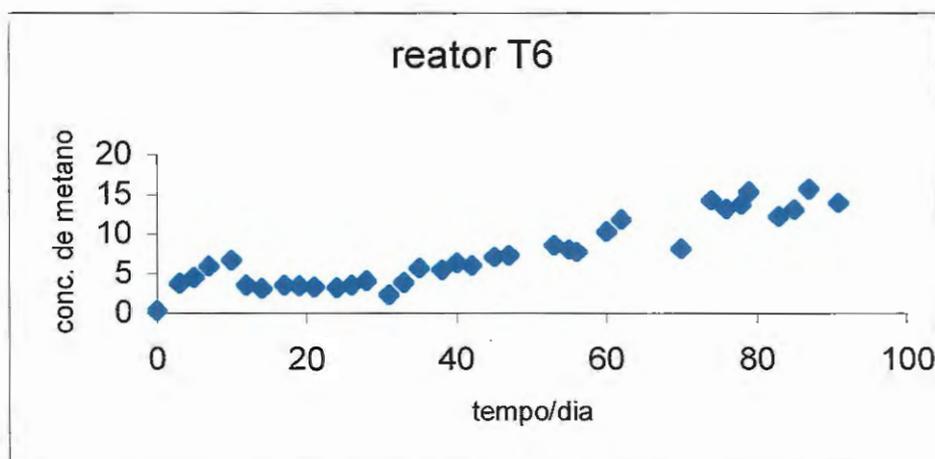


Figura 41. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T₆

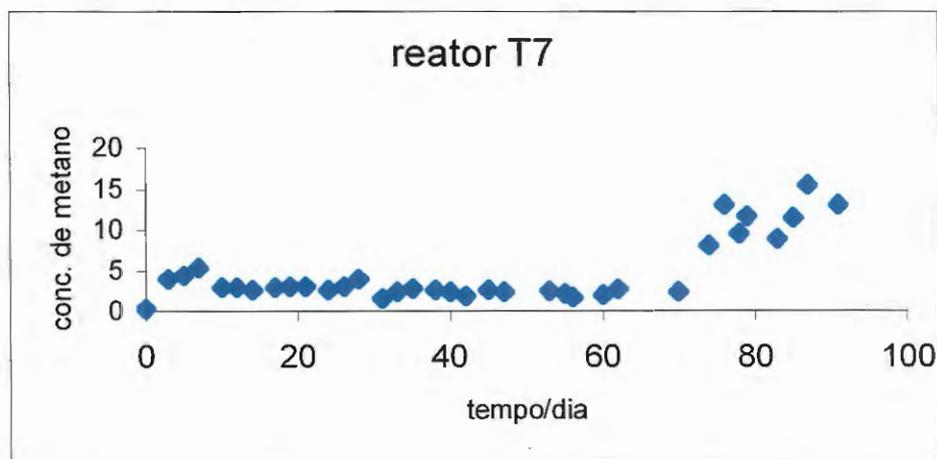


Figura 42. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T₇

As Figuras de 43 a 47 mostram as concentrações estimadas de metano encontradas no "headspace" dos reatores de T₁ a T₅ contendo TCE. Houve um aumento da concentração estimada de metano nesses reatores nos primeiros 14 dias, decrescendo em seguida e mantendo-se praticamente constante até o dia 62. Os reatores T₁, T₂ e T₅ foram então re-alimentados

levando a um aumento significativo da concentração estimada de metano no "headspace" dos mesmos, indicando assim alta atividade metanogênica. No caso dos reatores T₃ e T₄ (Figuras 45 e 46), a carência de substratos nutricionais manteve a mesma atividade metanogênica nesses reatores, uma vez que a concentração estimada de metano permaneceu a mesma até o final do experimento (em torno de 3-5 $\mu\text{mol/L}$).

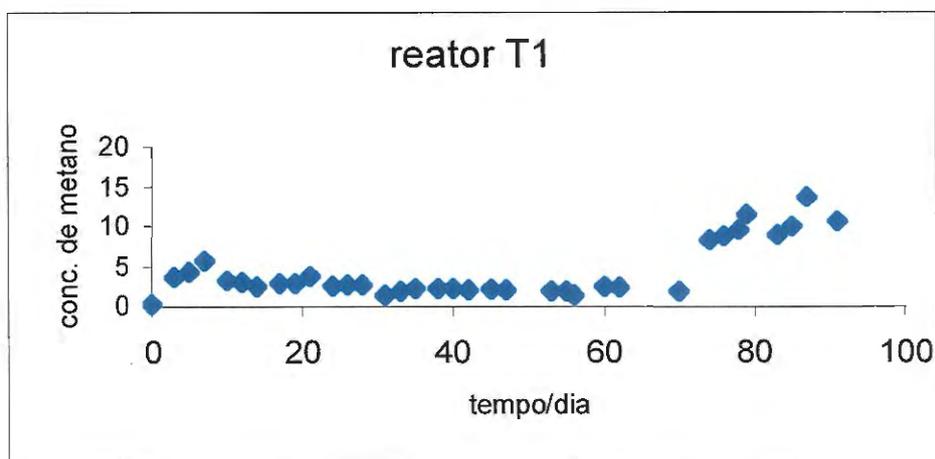


Figura 43. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T₁

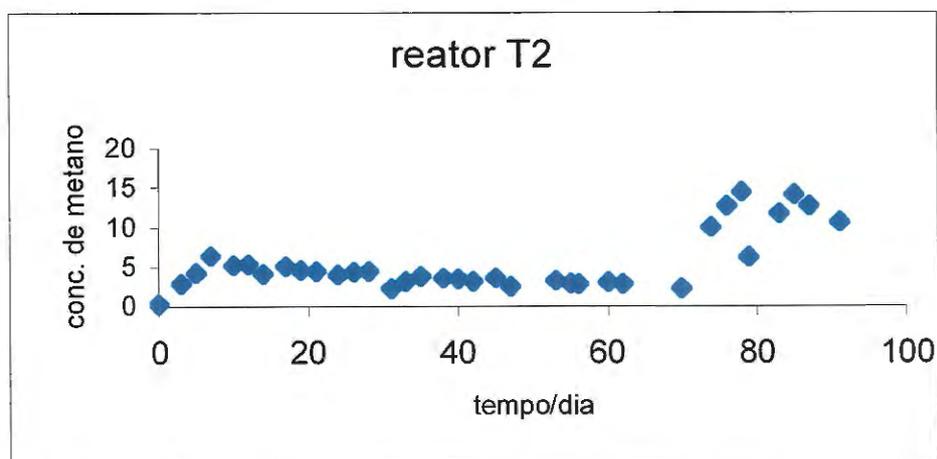


Figura 44. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T₂

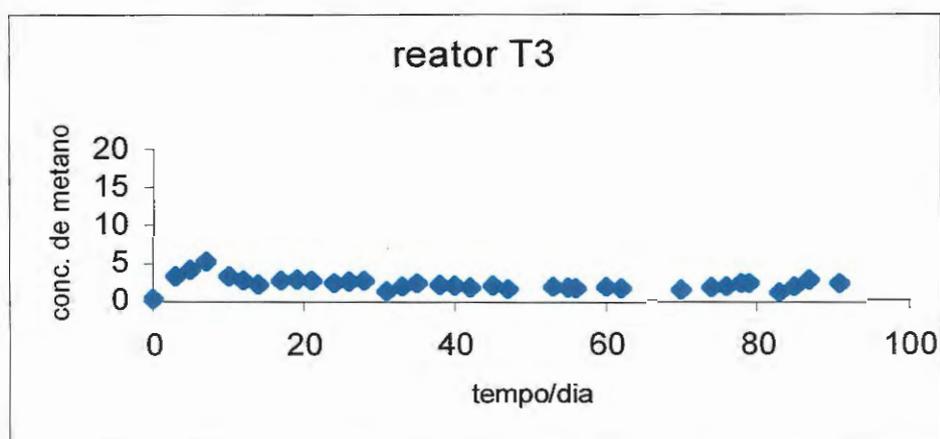


Figura 45. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_3 .

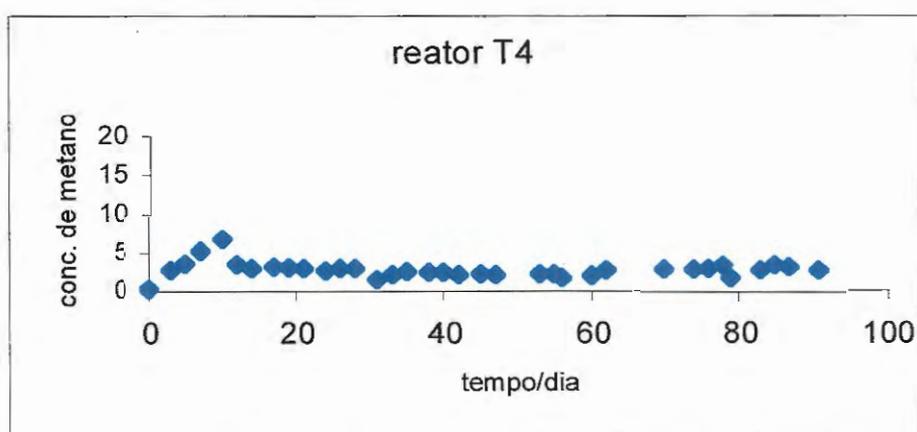


Figura 46. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_4 .

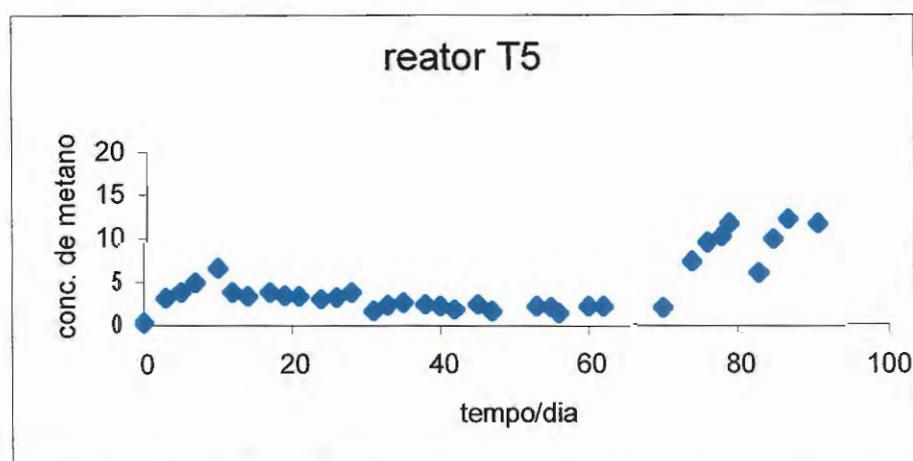


Figura 47. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_5 .

A Tabela 16 apresenta as percentagens de área de metano obtidas nos cromatogramas correspondentes aos reatores de T₁ a T₇ durante os 91 dias de operação desses reatores em condições termófilas. Comparando-se os valores de área de metano obtidas para os reatores T₆ e T₇ (sem TCE) e aquelas obtidas para os reatores de T₁ a T₅ (com TCE), nos primeiros 14 dias, pode-se concluir que aquelas áreas para os reatores sem TCE foram menores que aquelas obtidas para os reatores com TCE, indicando assim que o TCE foi usado como substrato orgânico no metabolismo de metanogênicas. Essa variação de área cromatográfica para os reatores de T₁ a T₅ coincidiu justamente com o período de 14 dias onde ocorreu a maior degradação de TCE. Após esse período inicial, houve uma diminuição das áreas cromatográficas do metano a partir da terceira semana, mantendo-se então praticamente constante até o 62^o dia, quando os reatores T₁, T₂ e T₅ foram re-alimentados. Como pode ser observado nessa tabela, os reatores T₁, T₂ e T₅ tiveram um aumento de área de metano acentuada, indicando assim boa atividade metanogênica. Desses reatores, o T₂ foi o que apresentou a maior atividade metanogênica, sendo então selecionado para a segunda contagem do NMP.

Tabela 16. Valores das percentagens das áreas de metano nos reatores utilizados na biodegradação do TCE.

Tempo/dia	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	0,37	0,44	0,31	0,31	0,37	0,24	0,26
3	8,99	12,73	8,12	8,36	9,4	3,57	3,47
5	10,06	16,53	9,69	9,97	11,21	8,52	6,21
7	13,09	21,03	12,66	13,25	13,67	7,47	8,31
10	14,35	23,36	14,07	15,75	16,75	9,68	9,04
12	12,39	23,2	11,86	15,24	15,7	10,2	10,68
14	12,27	25,12	23,73	13,42	15,87	12,2	11,87
17	11,94	23,17	12,12	12,72	15,22	12,76	12,35
19	12	22,26	12,12	13,41	15,4	13,98	13,48
21	11,56	20,04	11,81	12,46	13,93	14,19	13,34
24	11,44	19,89	11,88	12,13	14,3	15,33	12,8
26	11,13	19,68	11,57	12,10	13,71	15,84	12,79
28	10,41	18,7	10,52	11,72	13,52	16,78	12,23

Continuação da Tabela 16

31	9,94	18,1	10,1	11,66	14,34	20,39	12,02
33	9,62	18,05	10,28	11,52	12,47	22,07	12,47
35	10,29	17,47	10,17	11,78	12,11	23,8	11,76
38	9,58	17,63	10,81	11,28	12,22	26,49	11,81
40	9,33	17,89	10,32	10,61	12,01	30,49	10,21
42	10,19	17,07	10,31	10,76	11,83	30,66	11,65
45	9,99	17,53	10,03	10,68	11,67	34,14	11,75
47	9,31	16,57	10,38	9,98	12,1	36,13	11,1
53	8,86	15,54	9,9	10,57	11,22	43,36	11,81
55	7,55	15,54	9,03	10,86	8,98	38,33	10,71
56	10,27	14,82	9,42	9,17	10,91	46,75	8,57
60	11,19	15,18	9,31	13,05	12,37	53,85	12,63
62	11,13	13,46	9,6	15,2	11,82	54,6	14,64
70	37,63	36,35	9	15,03	36,07	54,16	27,65
74	43,71	49,46	9	14,89	48,8	67,9	46,21
76	46,28	54,13	10,94	14,92	50,01	68,87	45,88
78	48,92	59,95	9,97	15,4	58,14	70,61	52,01
79	47,49	58,70	9,24	14,76	54,96	70,24	52,59
83	52,8	62,81	9,68	14,72	56,48	69,94	61,78
85	51,61	61,84	11,05	14,27	56,03	69,91	64,27
87	50,82	62,22	10,26	34,64	57,25	69,25	64,23
91	51,74	66,32	9,86	14,19	55,99	68	64,89

A Tabela 17 apresenta as concentrações médias (duplicata) dos ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico e butírico) determinadas respectivamente no reatores T₈ e T₉, contendo TCE 4785 ppb (4,78 mg/L), meio de cultura basal e fontes de carbono na ausência do lodo termofílico, no período de incubação de 35 dias. As concentrações desses ácidos nesse período deveriam se manter constante, uma vez que tratam-se dos reatores de controle químico. Convém enfatizar que as concentrações dos ácidos acético, propiônico e butírico adicionadas inicialmente nesses reatores foram 1200 mg/L, 1480 mg/L e 1760 mg/L, respectivamente. Essa diferença das concentrações desses ácidos poderá estar relacionada com os erros experimentais envolvidos no processo de coleta, preparo e armazenamento das amostras para análise ou mesmo de natureza instrumental.

Tabela 17.Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) (reatores T₈ T₉)

Ácidos	1	7	14	21	28	34
Acético	1421	1485	1287	-	1454	1302
Propiônico	1870	-	1831	1448	-	1840
Butírico	2439	1851	2514	1851	2959	2312

As Tabelas de 18 a 22 apresentam as concentrações de ácidos orgânicos voláteis dos reatores de T₁ a T₅, contendo TCE e lodo termófilo, sob as condições operacionais dos reatores descritos anteriormente, no mesmo período. Uma observação importante é que esses reatores foram inoculados com lodo termófilo já reativado anteriormente, como descrito no Item 4.5.1. Sendo assim, a concentração desses ácidos carboxílicos são maiores que aquelas concentrações desses ácidos nos reatores químicos (T₈ e T₉).

Tabela 18.Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T₁.

Ácidos	1	14	28	34
Acético	3.316	2.871	3.870	3.222
Propiônico	2.167	1.645	2.157	1.814
Butírico	3.436	2.687	3.308	2.868

Tabela 19.Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T₂

Ácidos	1	14	28	34
Acético	3.591	3.268	3.342	3.282
Propiônico	2.148	1.679	1.823	1.699
Butírico	3.782	2.900	3.135	2.866

Tabela 20.Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T₃.

Ácidos	1	14	28
Acético	2.968	3.314	3.182
Propiônico	1.914	1.966	1.872
Butírico	3.032	3.062	2.899

Tabela 21. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T₄.

Ácidos	7	21	28	34
Acético	2.862	2.679	2.675	2.730
Propiônico	1.917	1.620	1.699	1.795
Butírico	3.207	2.704	2.772	3.039

Tabela 22. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T₅.

Ácidos	7	21	28	34
Acético	3463	3229	5218	4082
Propiônico	2043	1771	3066	2281
Butírico	3174	2763	4604	3522

Observando-se as concentrações dos ácidos acético, propiônico e butírico obtidos nos reatores de T₁ a T₅ apresentadas nas Tabelas de 18 a 22, pode-se inferir que em média houve um decréscimo das concentrações desses ácidos no período de decaimento de TCE nesses reatores, dentro do erro experimental da metodologia adotada nesse trabalho de dissertação. A concentração média de ácido acético decresceu de 3292 a 2954 mg/L no período de 21 dias, enquanto a do ácido propiônico de 2076 a 1695 e do ácido butírico de 3416 a 2733 mg/L nesse mesmo período. Esse decréscimo médio das concentrações desses ácidos carboxílicos pode estar relacionado com a degradação de TCE nesse período, onde em média houve um decréscimo de 75%. Ademais, nos dias 28^o e 34^o as concentrações média de ácido acético foram 2954 e 3267 mg/L, de ácido propiônico 1887 e 1897 mg/L e para o ácido butírico 3028 e 3073 mg/L.

As Tabelas 23 e 24 apresentam os teores dos ácidos orgânicos nos reatores T₆ e T₇, na ausência de TCE (reatores controle biótico), para o mesmo período estudado. Observando-se os teores desses ácidos nos reatores com (T₁-T₅) e sem TCE (T₆ e T₇), bem como a produção de metano (Figuras 41-47) pode-se dizer que esses tiveram o mesmo comportamento.

Tabela 23. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T₆

Ácidos	1	14	28
Acético	3068	2221	1989
Propiônico	2026	1987	3062
Butírico	3303	3267	4762

Tabela 24. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator T₇

Ácidos	6	21	35
Acético	3162	3087	3790
Propiônico	2221	2076	2624
Butírico	3535	3214	4130

O segundo ensaio sobre a biodegradação de TCE utilizando-se o lodo termófilo foi feito, em duplicata, empregando-se o mesmo protocolo adotado anteriormente. Assim, concomitantemente a determinação da concentração de TCE remanescente, determinaram-se os valores de metano e também o pH do meio reacional em cada reator. Não determinou-se nesse estudo a concentração dos ácidos orgânicos voláteis, pois procurou-se apenas verificar a ocorrência da biodegradação do TCE sob condições termofílicas.

Os valores iniciais de pH determinados nas amostras retiradas dos reatores T₁₂ a T₈₂ foram aproximadamente 7. Esses valores de pH foram semelhantes àqueles encontrados no estudo anterior.

A Figura 40 (p. 124) apresenta as curvas de decaimento de TCE nos reatores T₈₂, T₁₂, T₂₂, T₃₂, T₄₂ e T₅₂, respectivamente. Como pode ser observado, enquanto no reator de controle químico T₈₂, o decréscimo de TCE foi da ordem de 14%, nos demais reatores contendo o lodo termófilo, a degradação foi em média 83%, no período de 34 dias. Comparando-se tanto o perfil das curvas de decaimento do TCE no meio nos dois ensaios realizados, observa-se uma boa semelhança das curvas de degradação de TCE, no mesmo período de incubação.

A variação dos valores estimados de metano nos reatores T_{62} e T_{72} (Figuras 48 e 49) no período de 33 dias de incubação foram os mesmos observados para os reatores controle químico (sem o TCE). Enquanto os valores dos reatores contendo TCE e o lodo termófilo, reatores T_{12} a T_{52} , estão apresentados nas Figuras 50 a 54.

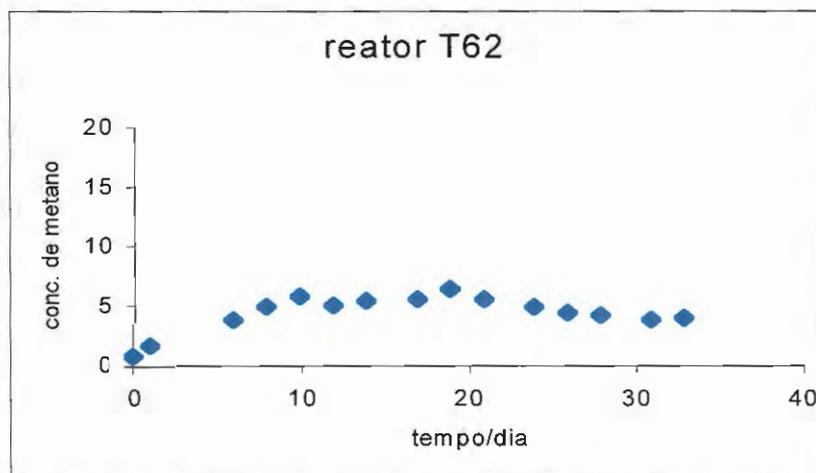


Figura 48. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_{62} .

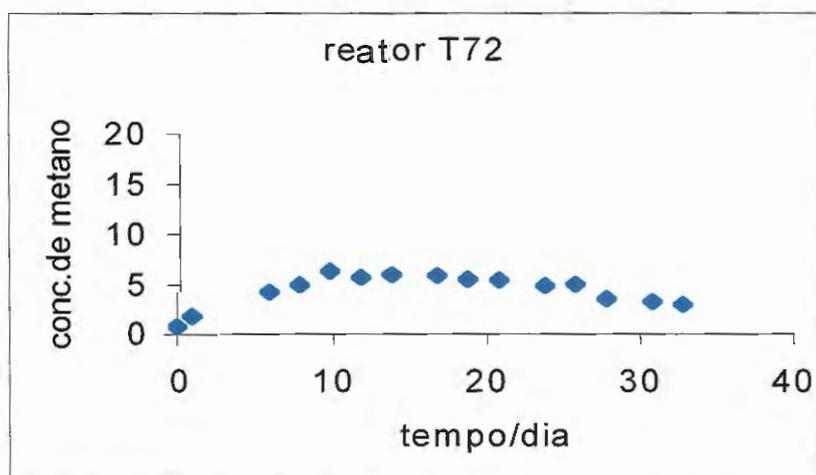


Figura 49. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_{72} .

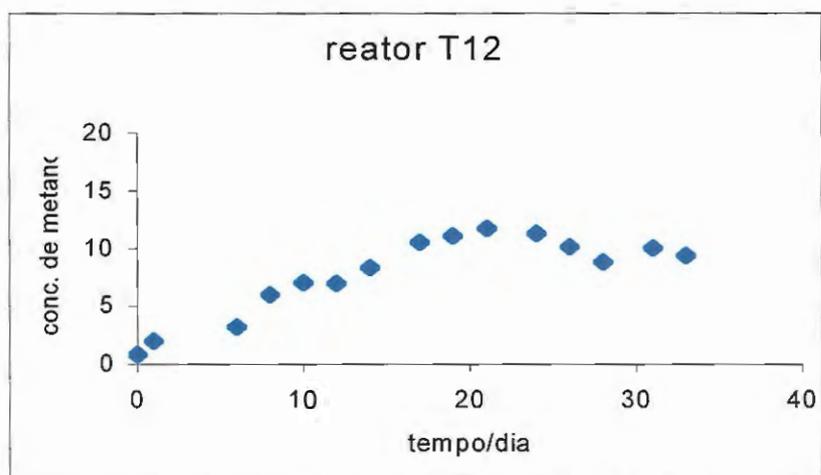


Figura 50. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_{12}

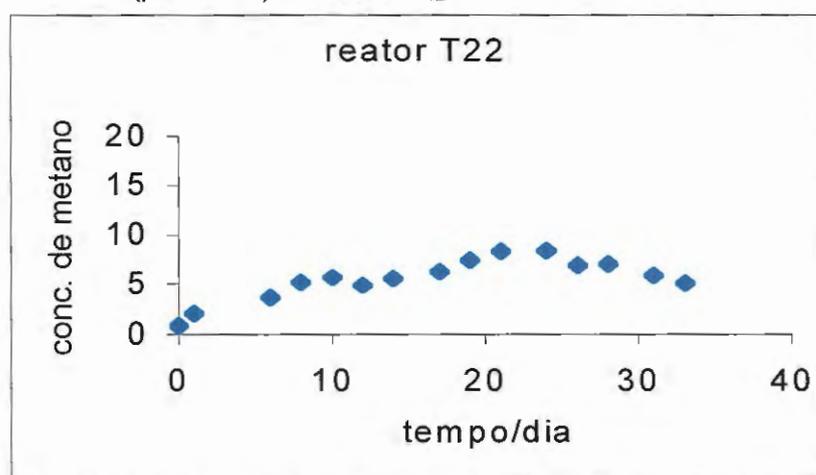


Figura 51. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_{22}

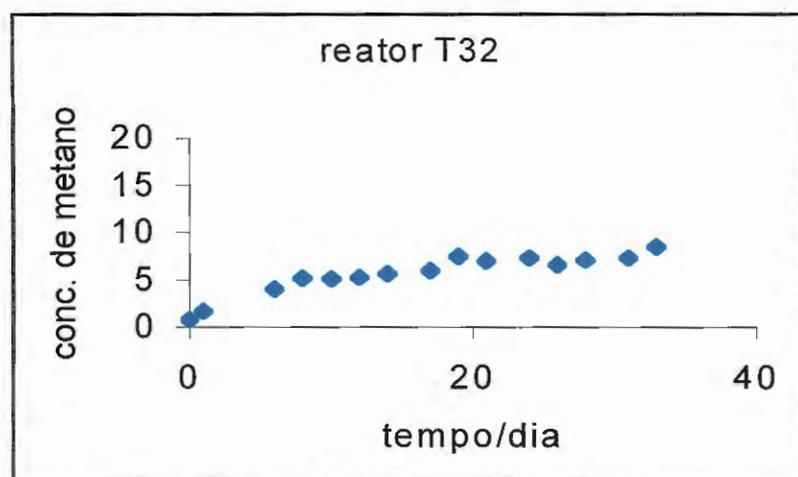


Figura 52. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_{32}

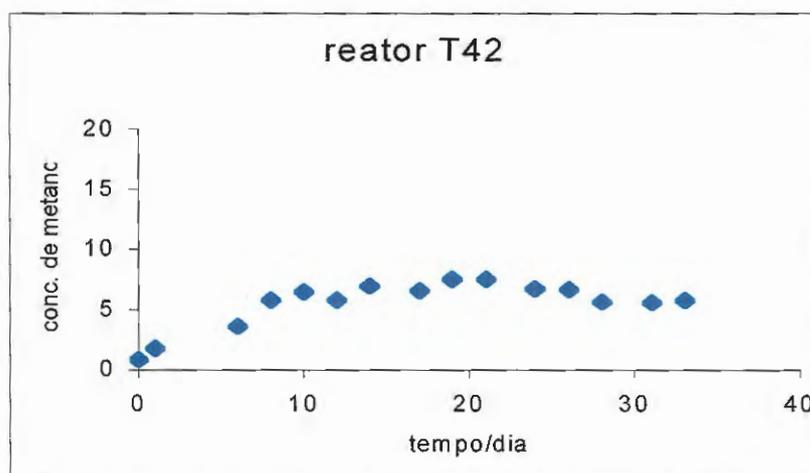


Figura 53. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_{42}

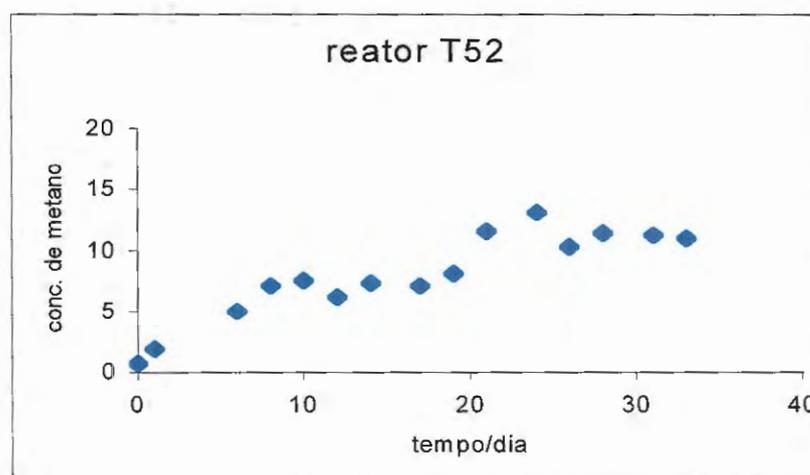


Figura 54. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator T_{52} .

Como discutido, as amostras de metano foram coletadas após despressurização dos frascos-reatores, sendo assim os valores das áreas cromatográficas desse gás (%) fornece valores estimados da concentração de metano. A Tabela 25 apresenta as áreas cromatográficas de metano (%) para os reatores bióticos (T_{12} , T_{22} , T_{32} , T_{42} e T_{52}) e abióticos (T_{62} e T_{72}). Observando-se as áreas de metano obtidas, pode-se inferir que em média houve um maior aumento de área nos reatores de T_{12} a T_{52} , que aqueles obtidos nos reatores T_{62} e T_{72} , nos primeiros 14-17 dias de operação dos reatores. Esse período foi aquele onde registrou-se a maior biodegradação de TCE, indicando desta maneira alta atividade metanogênica na

supramencionado, o gradiente de aumento de área de metano nesses reatores foi praticamente o mesmo, com exceção dos valores de áreas obtidos para os reatores T₆₂ e T₇₂ que foram em média superiores aquelas áreas obtidas de metano para os reatores de T₁₂ a T₅₂, entre os dias 28 e 33. Esses valores obtidos são concordantes com aqueles obtidos no primeiro estudo (Tabela 16, p. 129). As áreas cromatográficas, os valores calculados ($\mu\text{moles/L}$) e a porcentagem de metano nos reatores T₁₂ a T₇₂ estão apresentadas nas tabelas no Anexo 9.

Tabela 25. Valores das porcentagens das áreas de metano nos reatores utilizados na biodegradação do TCE.

tempo (dias)	T12	T22	T32	T42	T52	T62	T72
0	2,91	2,73	2,6	3,04	2,46	1,41	1,65
1	8,34	8,80	7,64	8,53	8,89	3,51	4,33
6	14,85	17,48	17,69	18,23	19,01	8,34	7,13
8	27,42	24,39	23,55	23,88	32,26	11,08	9,69
10	33,6	25,75	26,64	30,24	35,61	13,66	12,34
12	39,17	26,40	29,33	33,22	37,57	18,98	19,94
14	43,15	29,10	28,87	33,01	36,79	22,70	24,55
17	45,25	33,11	27,13	29,72	47,28	23,00	44,33
19	45,9	37,37	26,24	33,59	53,99	31,97	50,36
21	42,03	44,19	27,43	34,99	44,46	36,41	57,72
24	49,35	42,98	32,44	42,68	38,32	42,74	56,98
26	44,58	36,47	35,58	45,87	35,27	43,87	56,55
28	39,25	42,93	34,99	38,49	34,46	44,03	55,82
31	38,01	42,65	33,89	42,89	37,32	57,42	49,25
33	37,89	45,14	32,31	43,87	36,85	52,17	52,89

5.4.2. Decaimento do TCE utilizando o lodo mesofílico

As determinações das concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) da amostra mesófila ou lodo mesófilo foram feitas em triplicata no início do estudo da biodegradação do TCE, com a intenção de poder calcular a quantidade de TCE a ser adicionada, de modo a manter a relação de 5mgTCE/gSTV. A determinação foi feita após a fase de enriquecimento ou ativação metanogênica da amostra original. Além disso,

ao final dos experimentos sobre a biodegradação do TCE foram realizadas as mesmas determinações. Lembrando que os valores iniciais apresentados na para ST e STV, respectivamente de 11,5 e 4,3 g/L não são correspondentes aos inoculados, pois sofreram diluição no meio. Aqui a diluição foi de 10 vezes, uma vez que foram empregados 100 mL do lodo mesófilo e esse foi reativado em um reator contendo um volume final de 1000mL. Os valores finais foram os retirados do meio de reação, do reator T2, e corresponderam para ST e STV 1,0 e 0,2 g/L. O protocolo da biodegradação de TCE utilizando-se o lodo mesofílico foi descrito no item 4.7.2. As composições e concentrações das soluções contidas nos reatores foram apresentadas na Tabela 11.

As quintuplicatas dos reatores foram denominadas: M₁; M₂; M₃; M₄ e M₅ e todas foram montadas seguindo o mesmo protocolo, já descrito. Os frascos reatores de controle (controle biológico) não contendo TCE, foram denominados M₆ e M₇ e a degradação química de TCE na ausência de inóculo, foi acompanhada nos reatores M₈ e M₉ (controle abiótico).

Em cada reator foi colocado inicialmente um volume útil de solução de 100 mL, sendo então estipulado um volume máximo de retirada das alíquotas de 10 mL (10 % do volume inicial). Nesses estudos, foram retiradas 4 alíquotas de 2 mL de cada um dos reatores, para a determinação da concentração de TCE remanescente, por cromatografia gasosa, e 4 alíquotas de 0,5 mL cada uma, para as determinações de AOV e pH do meio.

Assim os seguintes parâmetros, a saber: pH, composição e estimativa da concentração de metano, ácidos orgânicos voláteis (AOV) e concentração de TCE remanescente foram monitorados rotineiramente, até o término desse estudo de biodegradação de TCE (período de 48 dias). Os reatores continuaram armazenados na estufa com agitação de 200 rpm e temperatura de 25 °C por mais 43 dias (total de 91 dias), sendo então montado o experimento do NMP. Ademais, também nesse período a concentração de metano no "headspace" continuou sendo monitorado por cromatografia gasosa.

O valor de pH determinado nas amostras retiradas dos reatores de M₁ a M₇ nos dias: 2, 7, 14, 21, 28, 34, 40 e 46 foi de aproximadamente 8,0 e, nos reatores M₈ e M₉, no mesmo período, foi em torno de 7,0 (medição feita com papel indicador).

O reator M₄ foi selecionado para a montagem do NMP. Sendo assim, os valores de pH foram determinados em triplicata com um potenciômetro, sendo encontrado um valor aproximadamente igual a 8,0 (medidas: 8,1; 8,0; 8,1), antes da montagem do NMP.

O monitoramento da concentração de TCE remanescente nos reatores contendo o lodo mesofílico foi feita utilizando-se cromatografia gasosa, após extração desse organoclorado com hexano, como descrita no Item 4.8. A Figura 55 e Anexo 15 apresentam a degradação anaeróbica química e biológica de TCE sob condições mesófilas no período de 48 dias.

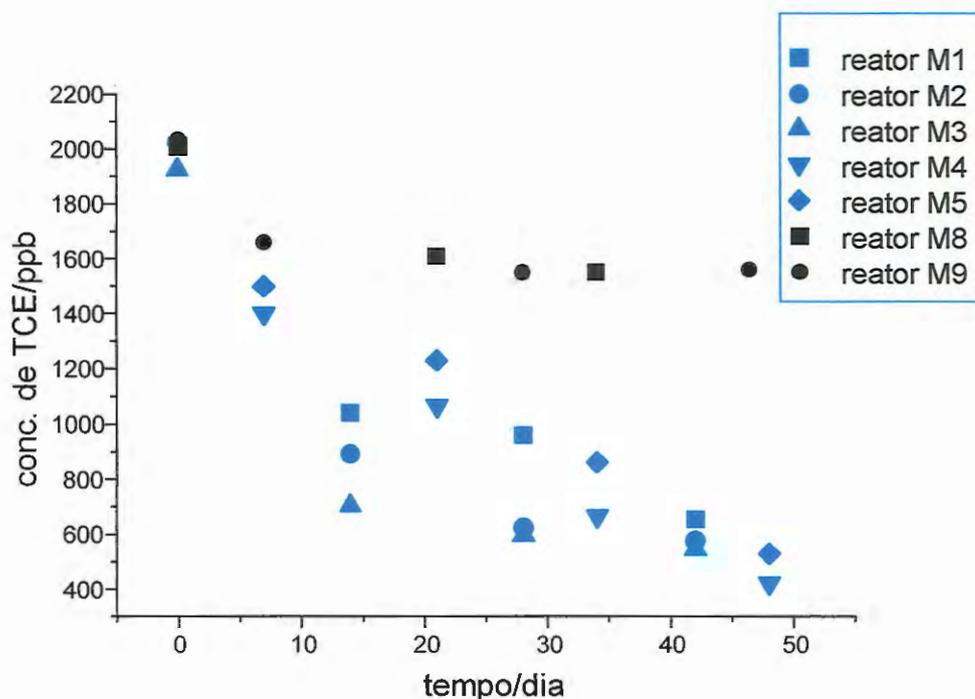


Figura 55. Remoção abiótica (M₈ e M₉) e biótica (M₁; M₂; M₃; M₄ e M₅) de TCE durante 48 dias, sob condições mesófilas (T=25 °C)

Como comentado previamente, nos reatores M_8 e M_9 não foram colocados os lodos mesófilos, servindo assim como reatores de controle (branco) para se avaliar a eficácia da biodegradação dos demais reatores contendo o inóculo (M_1 ; M_2 ; M_3 ; M_4 e M_5). Como pode ser observado, o decaimento do TCE foi de aproximadamente 23% no período mencionado.

Como pode ser observado nessa mesma figura, nos reatores de M_1 e M_3 contendo o lodo mesófilo, a biodegradação do TCE foi de pelo menos 50% durante os primeiros 14 dias e nos reatores M_4 e M_5 , pelo menos 57% da concentração inicial de metano decaiu em 34 dias, sendo que o reator M_4 apresentou uma diminuição de TCE de 79 % em um período de 48 dias

DE BRUIN et al. (1992) estudaram a desalogenação redutiva de PCE, via TCE, DCE, CV e eteno, a 20 °C em reator de bancada contendo uma mistura de 3:1 v/v de sedimento anaeróbio de rio e lodo granular anaeróbio de reator anaeróbio. Na presença de lactato de sódio 1 mmol/L como elétron doador, 95% de PCE foi convertido em eteno, após período de 105 dias de enriquecimento do lodo e mais 16 dias para a degradação.

SKEEN et al. (1995) investigaram a degradação de PCE a TCE e outros intermediários (DCE, CV e eteno) em condições metanogênicas empregando um consórcio de organismos anaeróbios provenientes de sedimentos de rio, cultivados anaeróbicamente em metanol a 30 °C. Em um estudo empregando um reator anaeróbio de bancada, apenas 14% da concentração de TCE inicial foi convertida em DCE nas condições supramencionadas. Uma comparação desses resultados com aqueles obtidos no presente trabalho de mestrado, mostra que o rendimento da degradação de TCE foi muito maior nesse último.

WU et al. (1995) enfatizaram a importância da temperatura sobre a degradação anaeróbia de TCE em condições mesófilas. Assim, em um estudo da degradação de TCE nas temperaturas de 4, 15, 20 e 27 °C, esses autores determinaram degradações de 8, 21, 55 e 92%, respectivamente. No presente trabalho, degradou-se TCE em 25 °C, indicando assim que maiores rendimentos poderiam ser obtidos em temperaturas superiores aquela empregada.

As Figuras de 56 a 62 apresentam os valores estimados de metano ($\mu\text{moles/L}$) dos frascos reatores M_1 a M_7 . Utilizou-se nessas determinações a curva analítica (calibração) do metano apresentada no Anexo 6. As áreas cromatográficas, os valores calculados ($\mu\text{moles/L}$) e a porcentagem de metano nos reatores M_1 a M_7 estão apresentadas nas tabelas no Anexo 10.

Analisando-se as curvas de metano dos reatores M_6 e M_7 sem TCE operados em condições mesófilas obtidas em função do tempo em dias (Figuras 56 e 57), observa-se pequeno aumento gradual da concentração de metano no primeiro mês. Após esse período o aumento da concentração de metano foi significativo até o dia 62, quando esses reatores foram re-alimentados com as mesmas fontes nutricionais usadas inicialmente. Após re-alimentação desses reatores, a concentração de metano ficou praticamente constante em magnitudes de concentrações consideradas boas, indicando dessa forma alta atividade metanogênica.

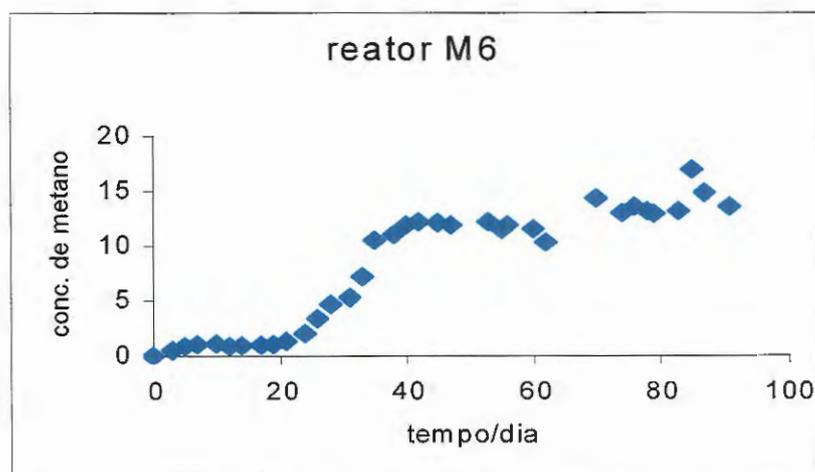


Figura 56. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator M_6 .

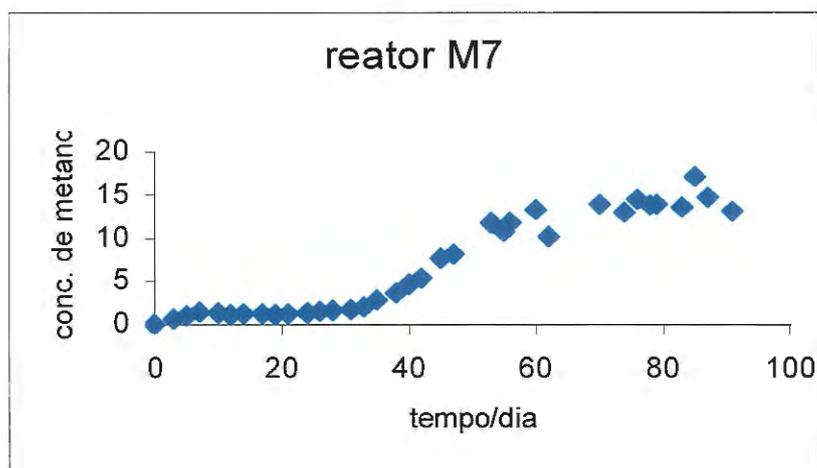


Figura 57. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator M₇

As Figuras de 58 a 62 apresentam as concentrações de metano encontradas no headspace dos reatores de M₁ a M₅ contendo TCE. Houve um aumento expressivo da concentração de metano nesses reatores nos 8-10 dias, aumentando lentamente a concentração de metano no headspace desses reatores após esse período até o dia 62. Os reatores M₂; M₃; e M₄ foram então re-alimentados levando a um ligeiro aumento da concentração de metano no headspace dos mesmos, mantendo assim alta atividade metanogênica. No caso dos reatores M₁ e M₅ (Figuras 58 e 62), a atividade metanogênica permaneceu praticamente constante, mesmo sem a re-alimentação desses reatores com as fontes de carbono.

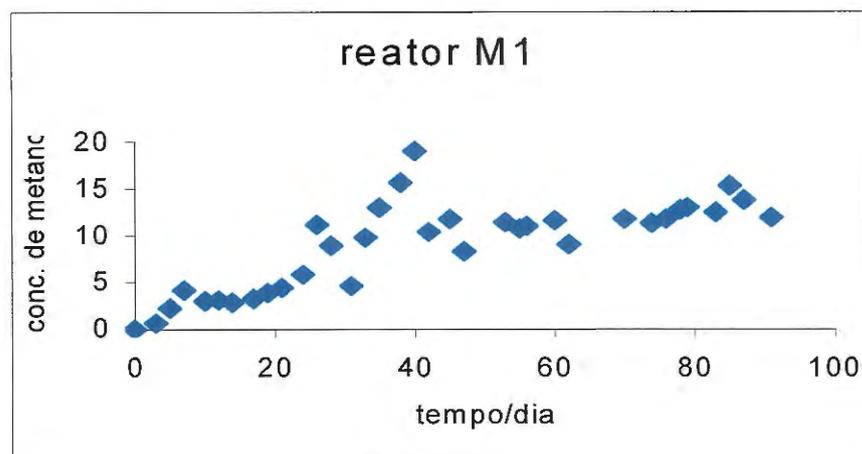


Figura 58. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator M₁

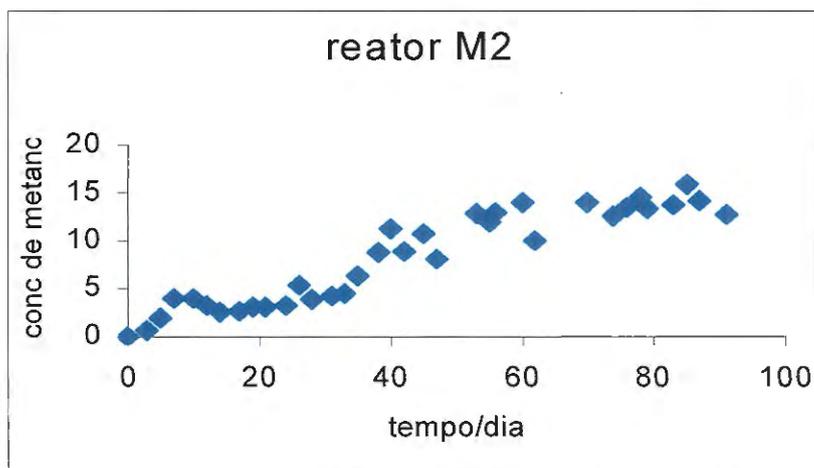


Figura 59. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator M_2

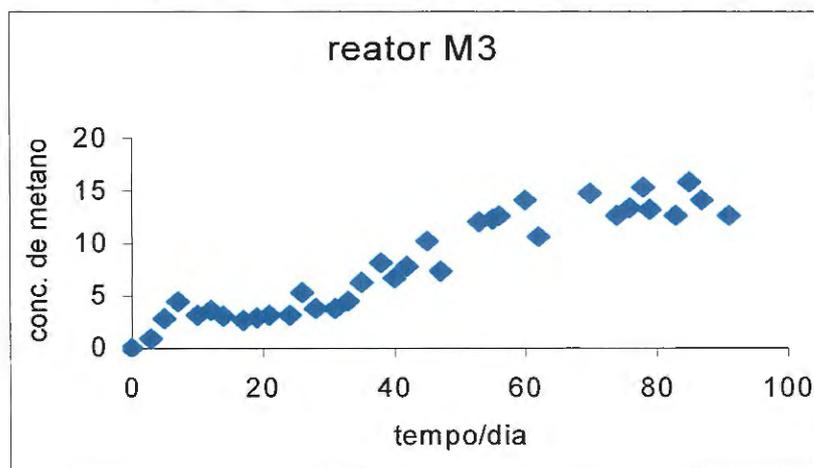


Figura 60. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator M_3

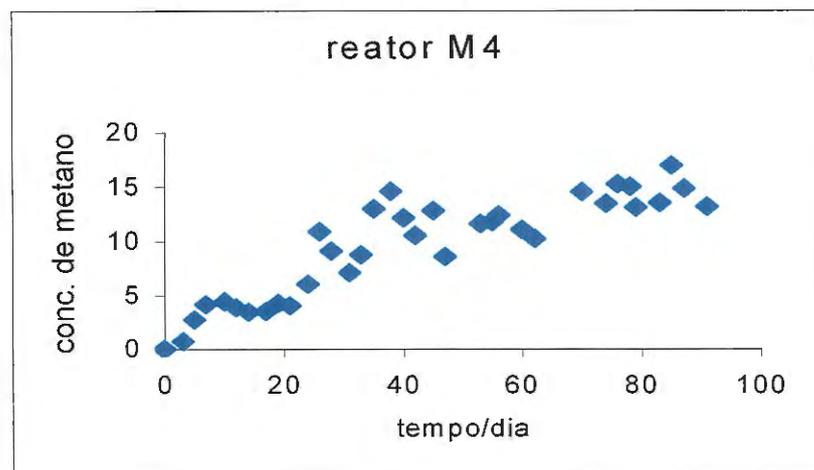


Figura 61. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator M_4

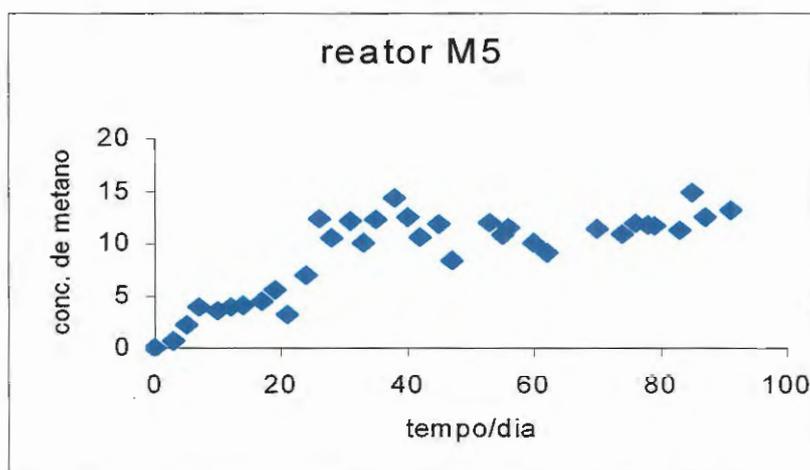


Figura 62. Valores estimados da concentração de metano ($\mu\text{moles/L}$) no reator M_5

A Tabela 26 apresenta as percentagens de área de metano obtidas nos cromatogramas correspondentes aos reatores de M_1 a M_7 durante os 91 dias de operação desses reatores em condições mesófilas. Comparando-se os valores de área de metano obtidas para os reatores M_6 e M_7 (sem TCE) e aquelas obtidas para os reatores de M_1 a M_5 (com TCE), pode-se concluir que aquelas áreas para os reatores sem TCE foram significativamente menores que aquelas obtidas para os reatores com TCE, no primeiro mês de operação desses reatores. Esse período foi o mesmo que aquele período onde observou-se a maior degradação de TCE. Os reatores M_6 e M_7 tiveram um aumento de área de metano bastante lento nos primeiros 40 dias. Após esse período, as áreas cromatográficas (%) de metano desses dois reatores apresentaram a mesma magnitude que aquelas obtidas para os reatores com TCE (de M_1 a M_5). Nessa mesma tabela há destacado em **negrito (bold)** os valores de área de metano obtidos no dia 62, quando os reatores M_2 ; M_3 ; M_4 ; M_6 e M_7 foram re-alimentados, como descrito anteriormente. Convém lembrar que os reatores M_1 e M_5 não foram realimentados.

O reator M_4 apresentou as maiores áreas cromatográficas, sendo assim escolhido para a segunda contagem do NMP.

Tabela 26. Apresenta a porcentagem das áreas de metano nos reatores utilizados na biodegradação do TCE.

tempo/dia	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
t o	0	0	0	0	0	0	0
3	1,51	1,74	2,73	2,10	1,64	1,02	1,48
5	7,3	8,58	10,99	10,61	7,87	2,77	1,62
7	12,48	14,64	15,23	15,23	12,39	3,27	5,05
10	12,69	14,25	15,28	15,71	15,34	3,42	4,87
12	12,86	13,72	14,57	16,39	16,64	3,51	5,06
14	14,79	13,26	14,76	16,64	19,42	3,59	4,9
17	16,59	14,80	14,58	18,88	22,83	3,79	4,92
19	17,53	14,05	14,57	19,91	23,80	4,4	5,1
21	21,13	14,60	14,65	21,19	24,90	5,45	5,08
24	26,09	15,80	15,36	26,94	31,84	9,15	5,55
26	31,14	16,45	16,4	31,16	36,15	13,22	6,05
28	36,37	17,22	16,89	37,01	42,50	15,25	6,52
31	45,74	22,25	20,00	48,78	52,16	16,55	8,01
33	49,25	27,55	23,73	50,13	55,72	18,29	9,85
35	53,08	32,88	28,08	51,01	57,25	17,5	10,4
38	58,52	39,97	35,15	53,95	62,77	22,53	17,35
40	60,94	45,69	42,12	60,41	63,48	44,25	21,62
42	59,01	48,65	44,6	61,07	62,74	52,71	28,17
45	58,38	53,15	51,02	63,10	63,10	59,48	35,37
47	59,25	57,91	55,57	65,29	64,49	59,46	39,68
53	59,58	65,71	63,57	60,45	62,08	59,24	57,47
55	58,49	64,80	66,14	65,33	61,28	60,15	57,99
56	57,98	66,03	66,26	64,95	61,69	61,02	59,9
60	57,74	67,31	67,65	62,00	59,93	61,77	64,67
62	57,88	64,26	64,90	65,65	61,19	63,54	62,3
70	59,35	69,38	72,71	71,89	59,63	70,53	67,72
74	58,55	67,63	67,94	67,94	59,32	67,25	68,24
76	59,38	66,78	67,48	72,08	59,18	65,6	68,35
78	66,55	66,33	69,64	75,23	62,95	66,51	69,39
79	67,73	72,10	70,72	68,08	62,24	66,12	70,89
83	65,23	71,82	69,68	71,61	59,62	67,59	70,73
85	63,94	64,87	65,61	69,31	59,69	67,81	69,77
87	63,69	66,60	67,64	70,54	57,25	69,25	64,23
91	62,35	66,50	67,59	69,92	61,2	69,17	67,85

Como discutido na literatura (VAZOLLER 1995b, LARIZATTI 1997, OLIVEIRA 1998), a taxa de aumento da área cromatográfica de metano do headspace (velocidade de crescimento dos microorganismos) para reatores contendo lodo mesófilo é mais lento que aquela para reatores com lodos termófilos. Comparando-se as áreas cromatográficas de metano obtidas nesse trabalho com reatores empregando lodos termófilos (Tabela 16) e mesófilos (Tabela 26), pode-se observar o mesmo comportamento descritos por aqueles pesquisadores.

Os estudos da degradação de TCE com lodos mesófilo e termófilo foram conduzidos durante 34 e 48 dias, respectivamente. Como discutido, nos estudos com o lodo termófilo, de 74-79% de TCE sofreu decaimento em 14 dias e 86% em 34 dias. A remoção abiótica em condições termófilas foi de apenas 27% no período de 34 dias, mostrando assim que 61% desse composto organoclorado foi biodegradado nestas condições.

No segundo ensaio de degradação com o lodo termófilo (reator T2) uma biodegradação de mesma magnitude foi encontrada, indicando uma boa reprodutibilidade desses ensaios de degradação.

Nos estudos de degradação de TCE com o lodo termófilo, uma remoção abiótica de 23% desse composto foi obtida no período de 48 dias, enquanto que um decaimento de 56% foi obtida num período de 28 dias de operação dos reatores contendo o lodo mesófilo. Ademais, um decaimento de 79% foi observada após 48 dias de operação desses reatores, sendo então 56% atribuído a degradação biológica.

Como era esperado (VAZOLLER 1995b, LARIZATTI 1997, OLIVEIRA 1998) o metabolismo das metanogênicas em condições termófilas foi superior ao metabolismo verificado nos reatores operados sob condições mesófilas. Entretanto, o lodo mesófilo apresentou provavelmente maior adaptação ao meio reacional contendo TCE, pois a atividade metanogênica permaneceu alta e praticamente constante nos últimos dias da degradação desse solvente recalcitrante.

5.4.2.1. Produção de ácidos orgânicos e gás metano durante o decaimento do TCE

As Tabelas 27 e 28 apresentam as concentrações de ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico e butírico) ao longo do tempo de ensaio para os reatores contendo TCE 2,06 mg/L, na ausência do lodo mesófilo, ou seja controles químicos (reatores M₈ e M₉). As determinações das concentrações dos ácidos acético, propiônico e butírico foram feitas em dias distintos e alternativamente. Como pode ser observado nessas tabelas, as concentrações dos ácidos acético e butírico permaneceram praticamente constantes, durante o tempo total desse estudo, sendo que o aparecimento de ácido propiônico em concentrações variando de 18 a 33 mg/mL podem estar relacionadas com pequena degradação química do ácido butírico e/ou impurezas contendo esse ácido nos produtos "p.a" empregados.

Tabela 27. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₈, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos (mg/L)	1	28
Acético	1671	1366
Propiônico	24	
Butírico	2488	2385

Tabela 28. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₉, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos (mg/L)	14	48
Acético	1941	2111
Propiônico	33	18
Butírico	2915	3408

As Tabelas 29 e 30 apresentam os teores dos ácidos orgânicos nos reatores M₆ e M₇, respectivamente, para o mesmo período estudado, contendo o lodo mesófilo no mesmo meio de cultura, mas na ausência de TCE (controle biológico).

Tabela 29. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₆, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos (mg/L)	1	21	34
acético	2954	2848	1252
propiónico	1657	1629	1592
butírico	2274	2204	30
Isovalérico			149
Valérico	48	66	86
Capróico	133	143	ND

ND= não determinado

Tabela 30. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₇, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos (mg/L)	14	28	48
Acético	2511	2614	1910
Propiónico	1133	940	959
Butírico	2108	1585	859
Valérico	264	192	217
Capróico	685	545	568

Os teores de ácidos acético, propiónico e butírico decresceram como esperado, devido ao metabolismo do consórcio de microrganismos presentes nesses reatores. Ademais, o aparecimento dos ácidos valérico e isovalérico confirmam esse metabolismo, uma vez que fazem parte desse metabolismo e o ácido capróico foi empregado como padrão interno nas determinações cromatográficas.

As Tabelas de 31 a 35 apresentam as concentrações de ácidos orgânicos voláteis determinados para os reatores contendo TCE e lodo mesofílico no mesmo meio de cultura e nas condições experimentais dos reatores descritos anteriormente.

Tabela 31. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₁, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos (mg/L)	1	28	42
Acético	2709	1526	399
Propiônico	1431	1419	1263
Butírico	2050	1839	1
Isovalérico			142
Valérico	98	116	90
Capróico	266	267	

Tabela 32. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₂, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos (mg/L)	1	14	28	42
Acético	2395	2529	2219	1663
Propiônico	1066	991	888	1014
Butírico	1975	1725	1523	998
Valérico	169	182	148	195
Capróico	555	546	450	(4)

Tabela 33. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₃, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos (mg/L)	1	14	28	42
Acético	2587	2573	2907	1145
Propiônico	1115	990	1122	888
Butírico	2006	1755	1839	53
Valérico	177	175	202	179
Capróico	562	519	580	495

Tabela 34. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₄, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos (mg/L)	7	21	34	48
Acético	2881	2386	719	374
Propiônico	1340	1326	1373	1616
Butírico	2059	2072	1042	5
Valérico	150	164	180	
Capróico	410	377	416	

Tabela 35. Concentração dos ácidos orgânicos voláteis (mg/L) no reator M₅, durante o tempo de operação desse reator

Ácidos	7	21	34	48
Acético	3092	2131	560	370
Propiônico	1584	1445	1473	1570
Butírico	2227	1967	861	
Isovalérico			32	
Valérico		15	47	
Capróico	50	54	73	

Analisando-se os teores dos ácidos acético, propiônico e butírico, pode-se observar que houve em média, dentro do erro experimental do procedimento adotado nesse trabalho, um aumento da concentração de ácido acético até o dia 14, período onde houve aumento acentuado dos teores de metano no "headspace" desses reatores. Por outro lado, a detecção dos ácidos valéricos e isovaléricos nesses reatores, confirma o metabolismo envolvido nessas degradações. Com algumas exceções, devidos a problemas analíticos de determinação do ácido capróico, as concentrações obtidas desse ácido empregado como padrão interno manteve-se em patamares esperados e dentro do erro estimado.



5.5. Análise das características morfológicas dos organismos presentes durante a biodegradação do TCE

5.5.1. Lodo granulado termófilo

A análise microscópica dos lodos dos reatores de T₁ a T₅ são apresentadas na Figuras 63 (a)-(h). Foi observado uma diminuição do número e do tamanho de sarcinas, durante a degradação de TCE nos biorreatores (T₁-T₅). Ademais, cabe observar que a fluorescência desses organismos passou de verde escuro, ao início do ensaio, à amarelo claro, após o 14^o dia (Figura 63 (f)), ainda pode-se observar fluorescência de alguns organismos após o 21^o dia, a alteração na intensidade e cor da fluorescência pode estar relacionado à redução da atividade metanogênica dos organismos presentes nesse lodo. Foi observado um aumento de células com aparência de cistos, e também uma diminuição da diversidade de cocos e de bacilos, fatores que podem estar relacionados a uma estratégia de sobrevivência. No entanto, houve uma predominância morfológica de bacilos médios.

5.5.2. Sedimentos da Represa do Lobo

A análise microscópica dos reatores M₁ a M₅ são apresentadas na Figura 64 (a)-(h). Foi observada uma diminuição do número e do tamanho de sarcinas, no período de 40 dias, nos biorreatores (M₁-M₅). Ademais, cabe observar que a fluorescência desses organismos passou de verde escuro à amarelo claro, no mesmo período da degradação. No decorrer da degradação de TCE houve uma diminuição acentuada da diversidade de bacilos com diminuição de tamanho (tamanhos médios) e um predomínio de cocos, após período de 28 dias. Após o 55^o dia da montagem dos frascos reatores, as sarcinas aumentaram de tamanho e sua fluorescência refletiu um verde azulado de alta intensidade.

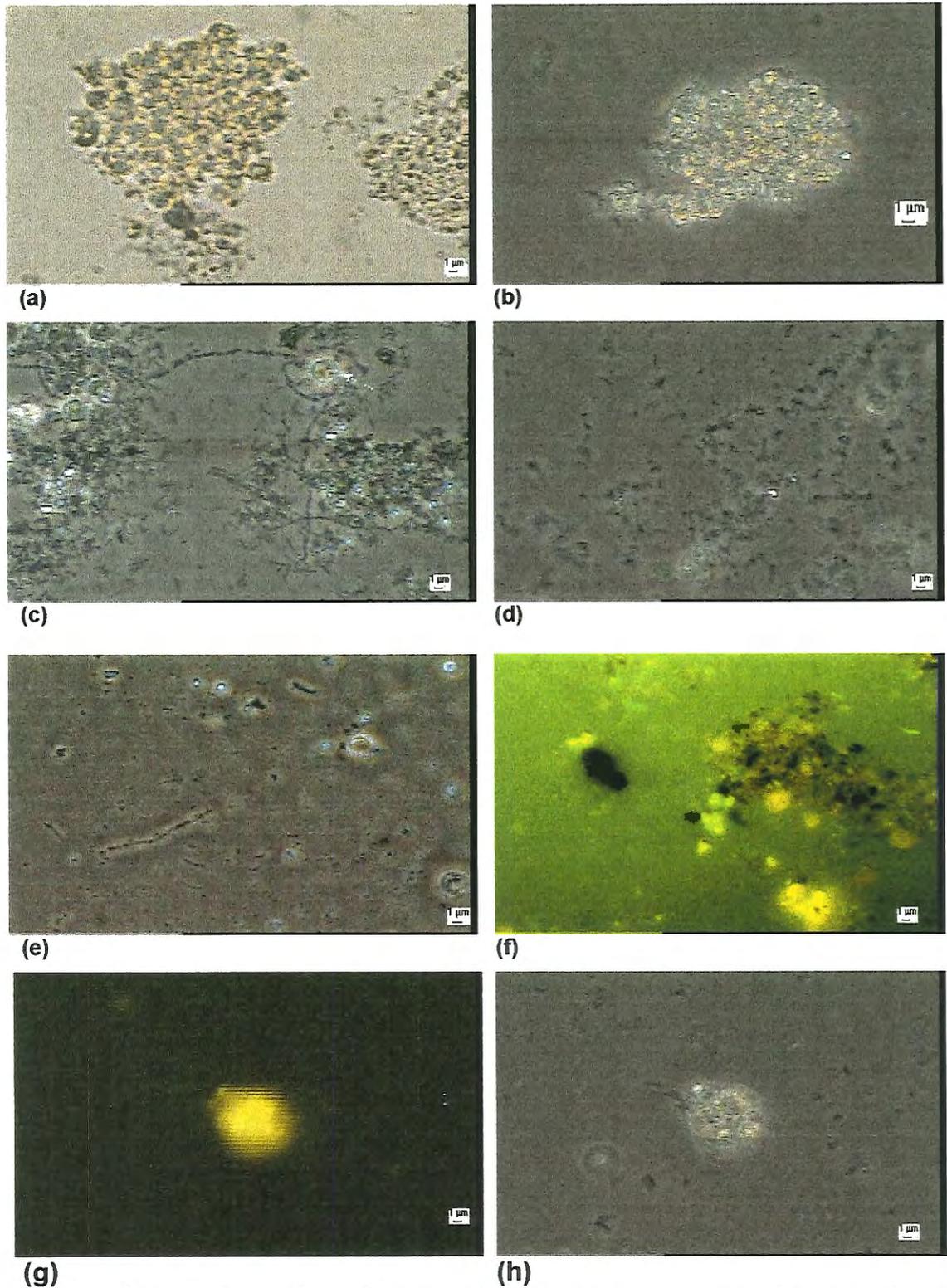


Figura 63. Fotomicrográfias das amostra do reator T₂ presentes durante a degradação termofílica do TCE: (a) 6 dias, (b) 21 dias, (c) e (d) 14 dias, (e)-(h) 28 dias (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25)

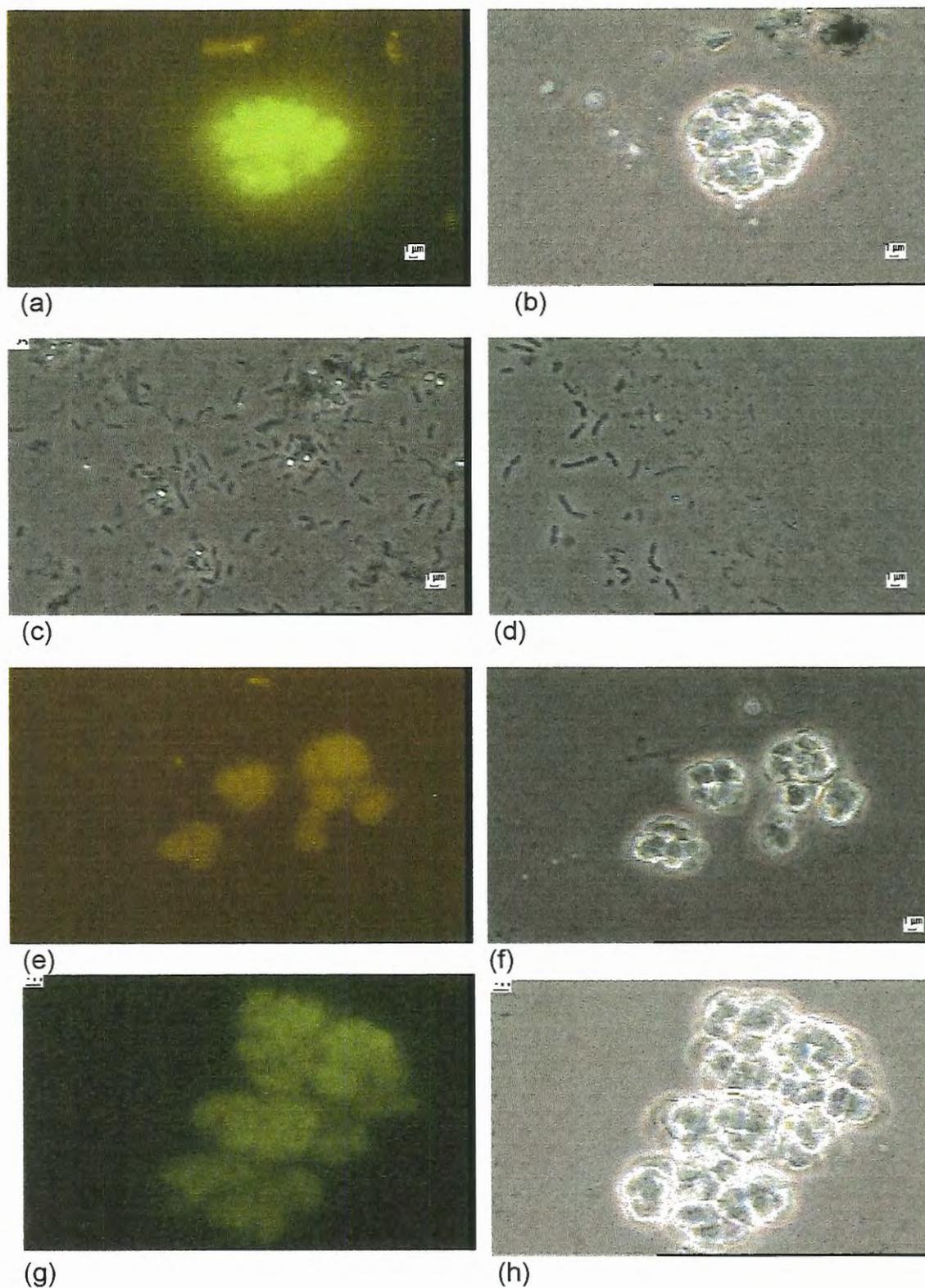


Figura 64. Fotomicrografias das amostras do reator M_4 presentes durante a degradação mesofílica do TCE: (a),(b) e (c) 7 dias, (d) 15 dias, (e) e (f) 28 dias, (g)-(h) 50 dias (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25)

5.6. Avaliação quantitativa dos grupos anaeróbios termófilos e mesófilos em diferentes substratos orgânicos, após os ensaios de degradação do TCE.

Neste ensaio foram identificadas as morfologias presentes no lodo anaeróbio termófilo e mesófilo, após a degradação do TCE, tendo como meio basal o meio Zinder, acrescido separadamente de substratos orgânicos. Na avaliação utilizando o método NMP do lodo termofílico, foram acrescidos os seguintes substratos orgânicos, a saber: glicose, formiato de sódio, metanol, acetato de sódio/sulfato de sódio e mistura gasosa de H_2/CO_2 (80:20% v/v). Também foram utilizados frascos de controle sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v) na ausência daqueles substratos orgânicos.

Na avaliação do NMP do lodo mesofílico foram acrescido os seguintes substratos orgânicos: lactato de sódio, metanol e formiato de sódio. Nesse estudo foram também empregados frascos de controle sob atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v) sem a adição dos substratos orgânicos.

O Número Mais Provável (NMP) de células procarióticas anaeróbias termofílicas e mesofílicas após a degradação do TCE foi feito pela leitura de cinco frascos inoculados em cada série da diluição, como descrito no Item 4.6.1. Utilizando-se do conceito de frascos positivos ou negativos, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram turbidez (meio turvo). As leituras do crescimento celular nos frascos foram confirmados pela produção de metano nas diferentes diluições. O protocolo foi o mesmo descrito no item 5.5. O lodo utilizado na inoculação do NMP foi o do reator T_2 , uma vez que esse apresentou-se mais eficiente no decaimento do TCE com uma maior produção de metano. A Tabela 36 apresenta os valores de NMP/mL para cada fonte de carbono utilizada nos ensaios com o lodo termófilo. A microscopia e determinação do metano foram feitas após um tempo de incubação de 20 dias. O Anexo 11 apresenta as tabelas de leitura da turbidez e da presença de metano para cada fonte utilizada no segundo ensaio de NMP para avaliação do lodo termofílico enriquecido.

Tabela 36. NMP/mL do lodo termófilo enriquecido em diferentes substratos.

Substratos (mmoles/L ou 1 atm da mistura gasosa)	NMP/mL	NMP/mL (produção de metano)
Glicose (10)	$2,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^3$
H ₂ /CO ₂ (80:20% v/v).	$6,8 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$
Formiato de sódio (20)	$7,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$
Metanol (20)	$1,2 \times 10^2$	ND
Acetato de sódio (20)/Sulfato de sódio (10)	$1,6 \times 10^5$	ND
Controle – apenas N ₂ /CO ₂ (70:30% v/v).	$2,4 \times 10^4$	ND

ND- não houve registro de metano

Para a fonte nutricional glicose 10 mmoles/L obteve-se a maior concentração de células $2,6 \times 10^7$, com predomínio de bacilos médios e retos. Nesse ensaio pode-se observar intensa fluorescência em bacilos pequenos e médios e retos. Ademais, foi possível observar na diluição de 10^{-2} vários aglomerados de cocos-bacilos. Observou-se ainda bacilos filamentosos e poucas sarcinas de tamanho reduzido (poucas células). A Figura 65 apresenta as principais morfologias encontradas no meio alimentado com glicose 10 mmol/L.

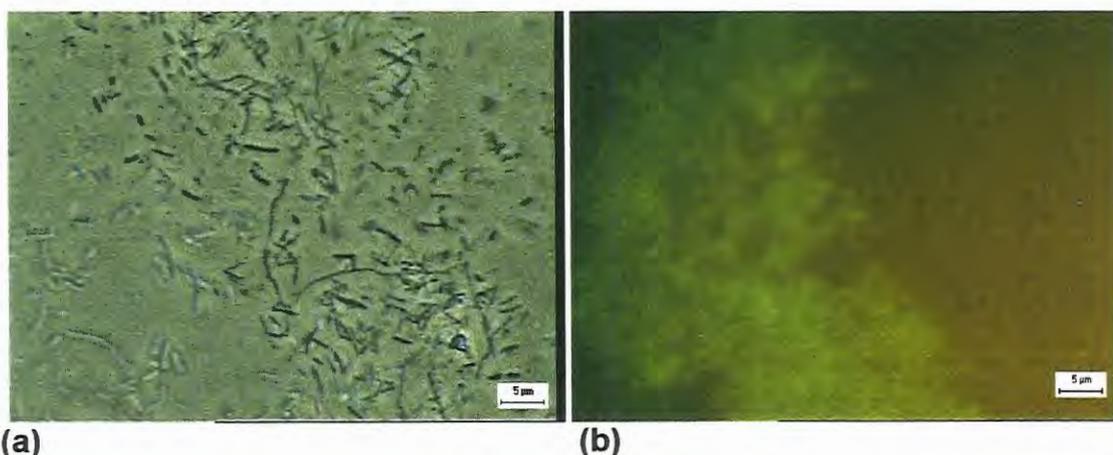


Figura 65. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de glicose 10 mmoles/L, segundo NMP: (a) diluição 10^{-6} e (b) diluição 10^{-8} , sob fluorescência (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Uma breve comparação feita entre as morfologias encontradas no primeiro ensaio de NMP e o segundo ensaio do NMP revela uma diminuição da concentração de células no segundo ensaio e menores teores de metano, na fonte orgânica glicose 10 mmoles/L. Quanto as morfologias encontradas

em ambos os ensaios, houve um predomínio de bacilos médios retos, bacilos com fluorescência e poucas sarcinas.

Na fonte hidrogênio e dióxido de carbono (H_2/CO_2 80:20% v/v), encontrou-se a mesma concentração de células/mL e células produtoras de metano ($6,8 \times 10^6$). Nessa fonte de carbono, constatou-se um predomínio de bacilos fluorescentes hidrogenotróficos, que segundo a classificação de BERGEY (1989) devem pertencer ao gênero *Methanobacterium* sp. Observou-se ainda agrupamentos de bacilos filamentosos, identificados como pertencentes ao gênero *Methanosaeta* sp. Nas diluições de 10^{-1} e 10^{-4} , outras morfologias observadas foram cocos móveis fluorescentes com um diâmetro de 1-2 μm . No entanto, sarcinas não foram observadas (Figura 66).

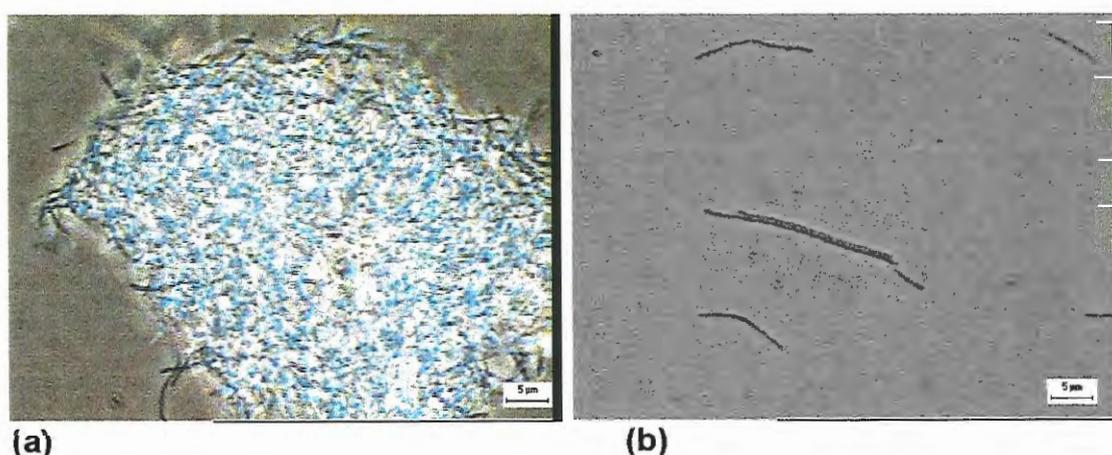
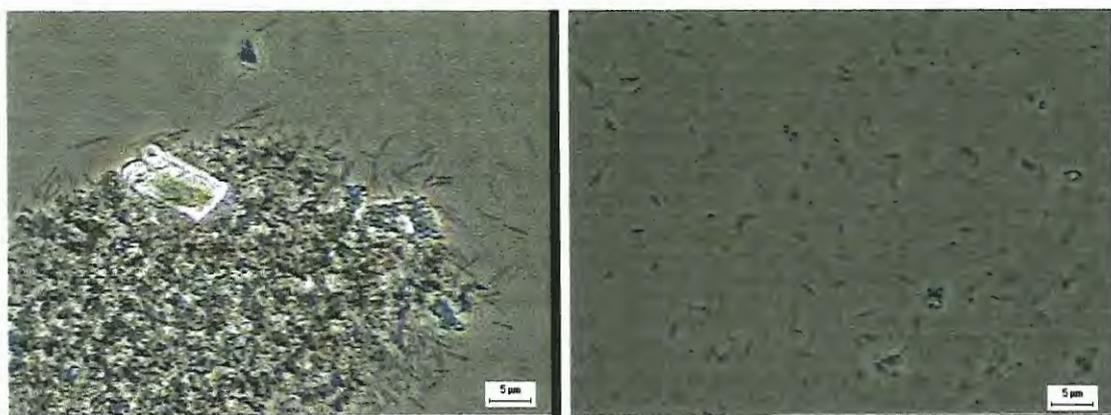


Figura 66. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de H_2/CO_2 (80:20% v/v),: (a) diluição 10^{-7} e (b) diluição 10^{-9} , (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Comparando-se os resultados obtidos no primeiro e segundo ensaios de NMP, no substrato de H_2/CO_2 (80:20% v/v), observou-se um predomínio de bacilos fluorescentes hidrogenotróficos em ambos os ensaios. Algumas modificações na comunidade do segundo ensaio do NMP foram observadas como um aumento de células do tipo cocos e também o aparecimento de células esféricas fluorescentes, similar aquelas observadas no lodo termofílico *in natura*. Essas células esféricas puderam ser observadas com maior intensidade na ausência e/ou escassez de sarcinas, geralmente

presentes em ambiente desfavorável (e.g. temperaturas baixas ao redor de 4-5 °C e/ou baixa concentração de fontes de carbono).

Em formiato de sódio 20 mmoles/L, houve o predomínio de agrupamentos de bacilos hidrogenotróficos fluorescentes. Cada um desses bacilos possuía um comprimento médio de 5µm e puderam ser identificados como pertencentes ao gênero *Methanobacterium* BERGEY (1989). O gênero *Methanobacterium* pode ser isolado de ambientes metanogênicos e pode utilizar o formiato como substrato orgânico. Descreve-se ainda como sendo *Methanobacterium thermoformicicum* (descrita inicialmente por ZHILINA e ILARIONOV, 1984 e depois por ZINDER e KOCH, 1984) crescendo em um meio cuja única fonte de carbono foi o formiato o pH 7.0 e 7.8, e a temperatura ótima 50-60°C, condições semelhantes àquelas do reator T₂ que originou o lodo para a montagem desse NMP. Nessas condições experimentais houve um favorecimento para o crescimento de bacilos como descrito. Outras morfologias observadas foram cocos e estruturas esféricas. (Figura 67)



(a)

(b)

Figura 67. Morfologias das células em meio Zinder no substrato de formiato de sódio 20 mmol/L: (a) diluição 10^{-3} e (b) diluição 10^{-6} , (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Comparando-se os ensaios de NMP pode-se afirmar que no primeiro ensaio de NMP com a fonte formiato de sódio 20 mmoles/L a diversidade de bacilos encontrada foi superior que a encontrada no segundo ensaio, o que

supõe-se que a redução da diversidade morfológica pode estar ligada a uma seleção causada pelo "stress" ambiental quando esta cultura foi colocada em contato com o organoclorado no caso o TCE. Fator esse que pode também determinar o aparecimento das estruturas esféricas e o desaparecimento de sarcinas.

Para o substrato orgânico metanol 20 mmoles/L foi possível a observação de grumos amarelo-escuro que quando agitados manualmente se desfaziam e se observados ao microscópio mostravam grande agrupamento de células provavelmente pertencentes ao gênero das *Methanosarcina*. Segundo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989) o gênero *Methanosarcina* é formado pelos agregados de cocos que podem estar presentes durante algumas fases do crescimento, como observado anteriormente, e o metanol pode ser usado como substrato, bem como as células são típicas de ambientes tanto mesofílico como termofílico. Pertencem ao grupo dos anaeróbios estritos e tem como produto do seu metabolismo CH_4 e CO_2 . Outras morfologias foram observadas como cocos, cocos fluorescentes bacilos médios, pequenos, bacilos fluorescentes e muitas estruturas arredondadas que também puderam ser observadas na fluorescência. A fluorescência foi difícil de ser observada devido a sua baixa intensidade, e rapidamente se extinguiu na maioria das células, e a cor era amarelada. Figura 68

Comparando os NMP, no primeiro ensaio foram observados bacilos longos e delgados que pareciam *Methanosaeta* (anteriormente *Methanotrix*), que não foram observados no segundo ensaio. Verificou-se um aumento das estruturas arredondas fluorescentes, cistos, bem como de cocos e uma redução significativa do número de células e diversidade de bacilos no segundo ensaio de NMP.

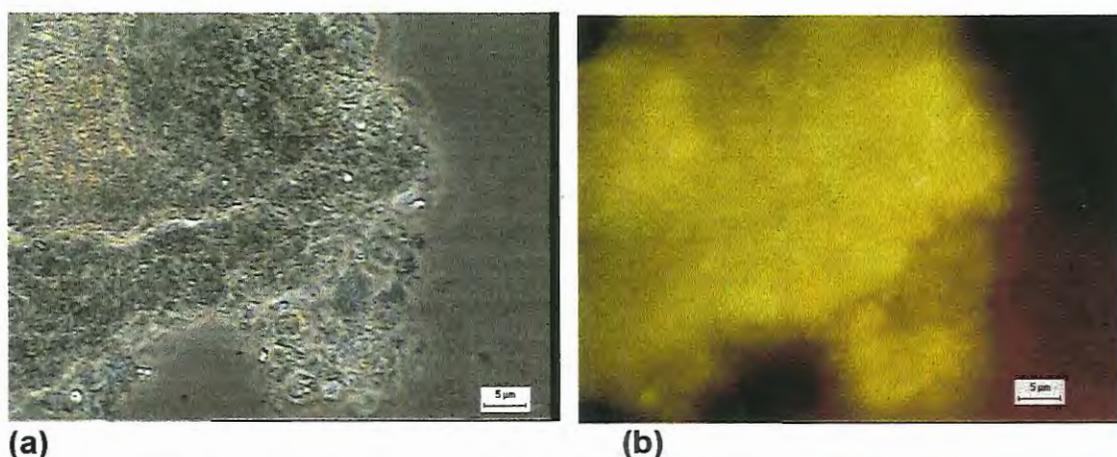


Figura 68. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de metanol 20 mmol/L: (a) diluição 10^{-3} e (b) diluição 10^{-3} , sob fluorescência (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Nas contagens realizadas utilizando a fonte acetato de sódio 20 mmoles/L e sulfato de sódio 10 mmoles/L obteve-se uma pequena diversidade morfológica bem como um baixo número de células, apenas poucas sarcinas e bacilos pequenos e retos fluorescentes. As sarcinas apresentaram fluorescência amarelo-pálido e cocos muito pequenos. A Figura 69 mostra a diversidade morfológica encontrada nessa fonte.

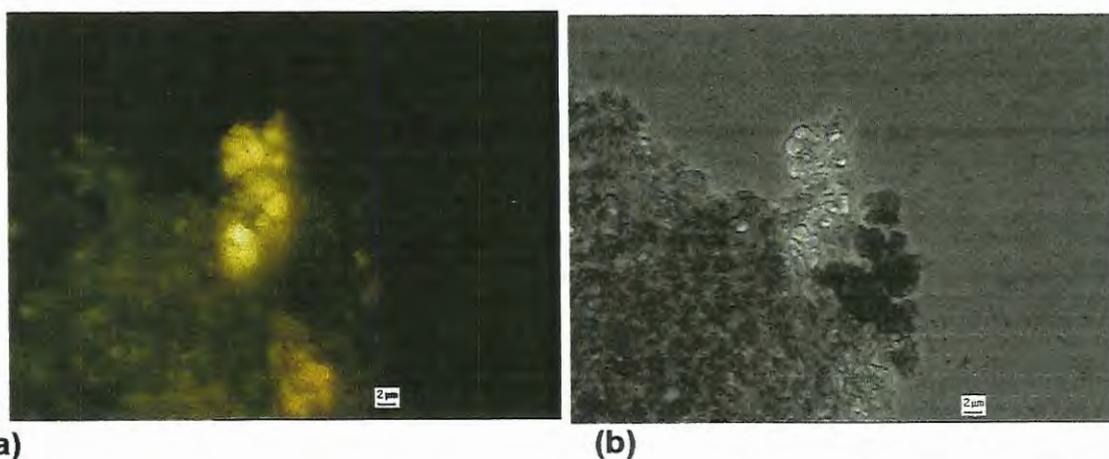


Figura 69. Morfologias das células em meio Zinder no substrato de acetato de sódio 20 mmol/L e sulfato de sódio 10 mmol/L: (a) e (b) diluição 10^{-2} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Comparando-se os ensaios do NMP observou-se o empobrecimento das morfologias com relação à segunda contagem, as sarcinas se apresentaram muito menores, e suas poucas células pareciam bastante irregulares. Pareceu que a segunda contagem de NMP, a diversidade de

bacilos e cocos foi muito menor, os poucos observados pareciam pertencer a um único gênero.

As contagens controle foram feitas na ausência de substrato orgânico, sob a atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v), e apresentou uma baixa diversidade morfológica, ou seja, poucos bacilos retos e ondulados e cocos muito pequenos. Os pouco bacilos fluorescentes perdiam a fluorescência rapidamente. Pode-se dizer que nesta fonte as estruturas esféricas predominaram (Figura 70).

Comparando-se os estudos do NMP pode-se afirmar que as observações quanto as diferentes morfologias foram as mesmas descritas no substrato N_2/CO_2 (70:30% v/v). Concluindo-se que na ausência de substrato orgânico houve um empobrecimento do lodo anaeróbio termofílico com relação à exposição ao TCE. As observações microscópicas mostraram que houve uma redução das morfologias mesmo com relação ao lodo logo após a coleta, antes da reativação.

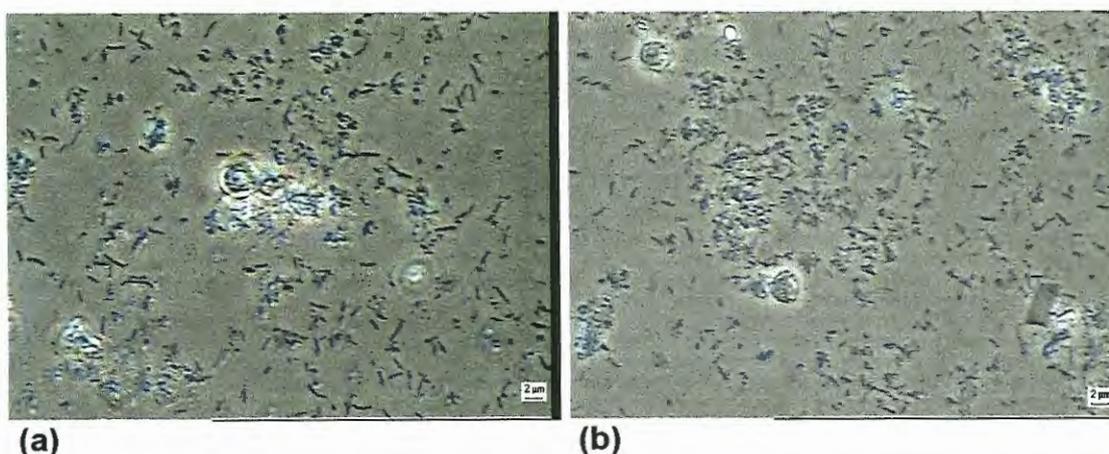


Figura 70. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de N_2/CO_2 (70:30% v/v): (a) diluição 10^{-2} e (b) diluição 10^{-4} , (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Nas fontes metanol 20 mmoles/L, acetato de sódio 20 mmoles/L/sulfato de sódio 10 mmoles/L, N_2/CO_2 (70:30% v/v), houve inibição da metanogênese que poderia estar ligada a alguns fatores como redução na diversidade morfológica, ou ainda redução do número de células, talvez

insuficiente para produzir uma concentração de metano que pudesse ser detectado pelo cromatógrafo, ainda as poucas células fluorescência nessas fontes quase sempre apareceram amareladas e rapidamente perdiam sua visibilidade o que também pode indicar uma baixa atividade metanogênica. Segundo WIDDEL (1988) na presença de sulfato, as BRS (bactérias redutora de sulfato) passam a utilizar compostos intermediários como acetato, propionato, butirato no processo da digestão anaeróbia, competindo assim com as bactérias fermentativas acetogênicas e metanogênicas.

A carência nutricional do lodo ou "stress" ambiental provocado pela exposição do lodo ao TCE (embora a biodegradação tenha sido ótima) pode estar ligado à inibição de metano ou diminuição da biodiversidade morfológica e do número de organismos, resultando desta maneira em uma baixa produção de metano, não sendo assim possível ser detectado no cromatógrafo gasoso.

A Tabela 37 apresenta os resultados do ensaio de NMP com o lodo mesofílico. Esse ensaio foi montado utilizando o lodo do frasco reator M₄ da degradação de TCE, visto que esse reator apresentou rendimento na degradação de TCE, com superior geração de metano. O Anexo 12 apresenta tabelas da segunda contagem de NMP do lodo mesófilo.

Tabela 37. Valores de células/mL do lodo mesofílico enriquecido, em diferentes substratos orgânicos

Substratos (mmoles/L ou 1 atmda mistura gasosa)	NMP/mL	NMP/mL (produção de metano)
Lactato de sódio (20)	$3,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$
Controle - apenas N ₂ /CO ₂ (70:30% v/v)	$3,1 \times 10^7$	8,0
Metanol (20)	$2,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$
Formiato de sódio (20)	$4,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$

A microscopia e leitura da concentração de metano foram realizadas após um tempo de incubação das amostras de 20 dias para o lodo termofílico e de 30 dias para o lodo mesofílico.

Na contagem realizada utilizando como fonte o lactato de sódio 20 mmoles/L, encontrou-se a maior concentração de células, $3,0 \times 10^7$ NMP/mL.

Houve um predomínio de bacilos e sarcinas, essas últimas com intensa fluorescência puderam ser observadas ocupando muitos campos no microscópio, também foram observados bacilos médios e filamentosos fluorescentes e cocos fluorescentes. Uma grande diversidade de bacilos pode ser registrada, como bacilos delgados, longos, filamentosos, médios, curvos, espiralados, ondulados, aos pares, em cadeia, ou agrupados, bacilos arredondados. Ainda foram observados muitos cocos com diferentes diâmetros. A Figura 71 mostra algumas das morfologias mais comuns.

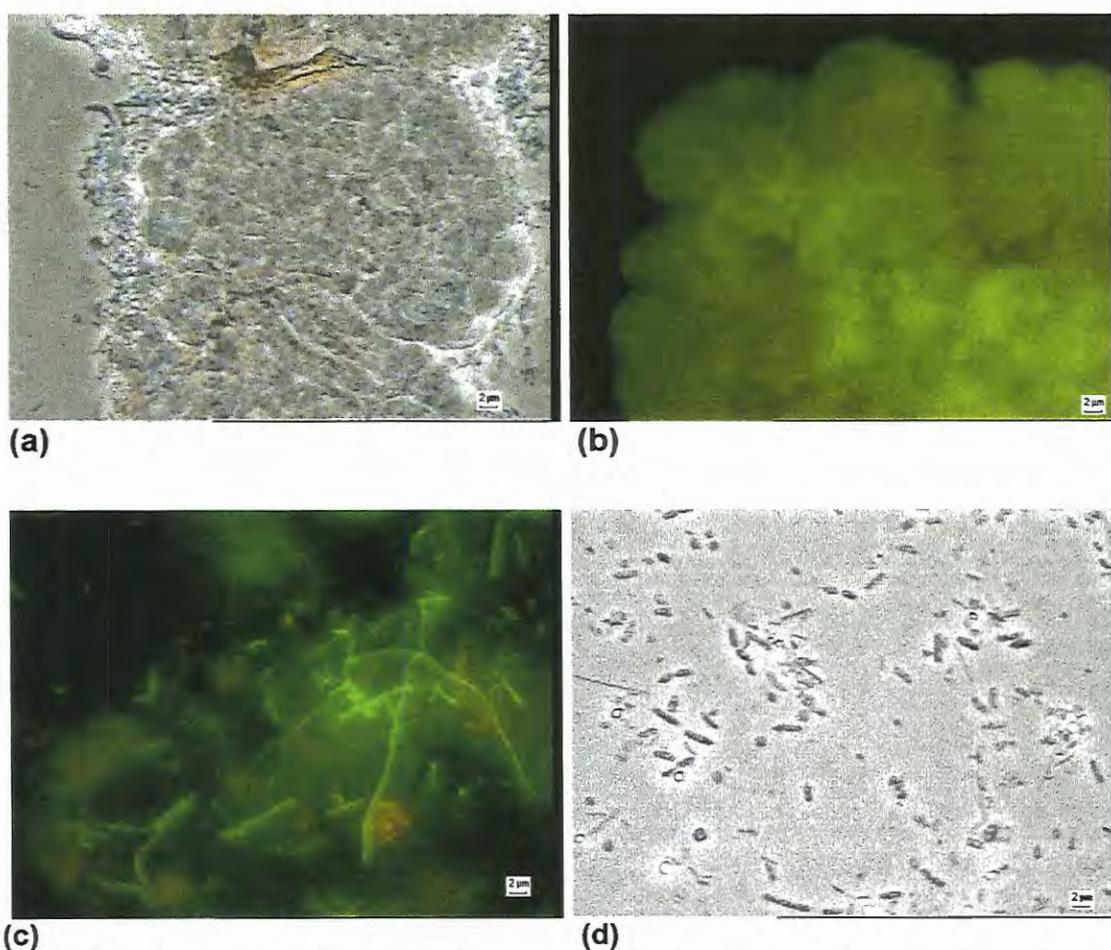


Figura 71. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de lactato de sódio 20 mmol/L : (a) e (b) diluição 10^{-4} , (c) e (d) diluição 10^{-3} , (a) e (c) sob fluorescência, (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Comparando-se os resultados obtidos durante os estudos do NMP feitos o primeiro logo após a reativação do lodo mesofílico e o segundo após o estudo da biodegradação do TCE pudemos registrar os seguintes resultados na segunda contagem houve um sensível aumento da diversidade

de morfologias principalmente bacilos, também foi possível observar um aumento no número de células contadas em cada campo das lamínas na microscopia. As sarcinas pareciam agrupamentos (pacotes) maiores e os cocos mediam 1-2 μm , sendo possível a observação desses pacotes de células a olho nu. Na fluorescência também na segunda contagem, foi mais fácil a sua visualização e a intensidade do verde se mostrou mais brilhante, as células pareciam mais ativas com relação à metanogênese, fato comprovado quando da determinação do metano.

O ensaio de controle feito na ausência de substrato orgânico, sob a atmosfera de N_2/CO_2 (70:30% v/v), apresentou um predomínio de bacilos e cocos. Na fluorescência foi possível observar um predomínio de bacilos, provavelmente do gênero *Methanobacterium* e a presença de muitos cocos pequenos e móveis. Observou-se bacilos pequenos, médios, curvos, aos pares, em cadeia, filamentos, espiralados, muitos desses apresentavam grande mobilidade. Não foi possível observar sarcinas, nem as células esféricas. Nas diluições 10^{-9} e 10^{-8} observaram-se muitas células na forma de filamentos flexíveis e muitas vezes pareciam um fardo, contendo muito resíduo entre os longos filamentos. Ainda nessas diluições, o meio se mostrou turvo (leitoso), com muitos grumos brancos e que mesmo sob agitação se mostraram resistentes (Figura 72)

A comparação entre os resultados obtidos no NMP as maiores diferenças estavam no desaparecimento da morfologia de sarcinas e o não registro das células esféricas no NMP feito após o estudo sobre a degradação do TCE. Quanto aos bacilos presentes, não foi possível observar e registrar diferenças entre as duas contagens do NMP. Quanto à fluorescência, essa se mostrou mais nítida na segunda contagem, mesmo assim o registro do metano nos frascos da segunda contagem foi menor, fato que pode ser explicado pelo desaparecimento das sarcinas na segunda contagem e talvez a redução do número de bacilos metanogênicos na segunda contagem ou talvez esses organismos predominantes pudessem ser descritos como pertencentes ao gênero *Methanobacterium* sp que segundo a descrição do BERGEY (1989), o ótimo de temperatura esta entre

37 - 70°C e como a incubação do lodo mesofílico foi a 25°C o crescimento desses organismos não tenha sido o melhor, essa seria uma explicação para a baixa diversidade de morfologias encontradas.

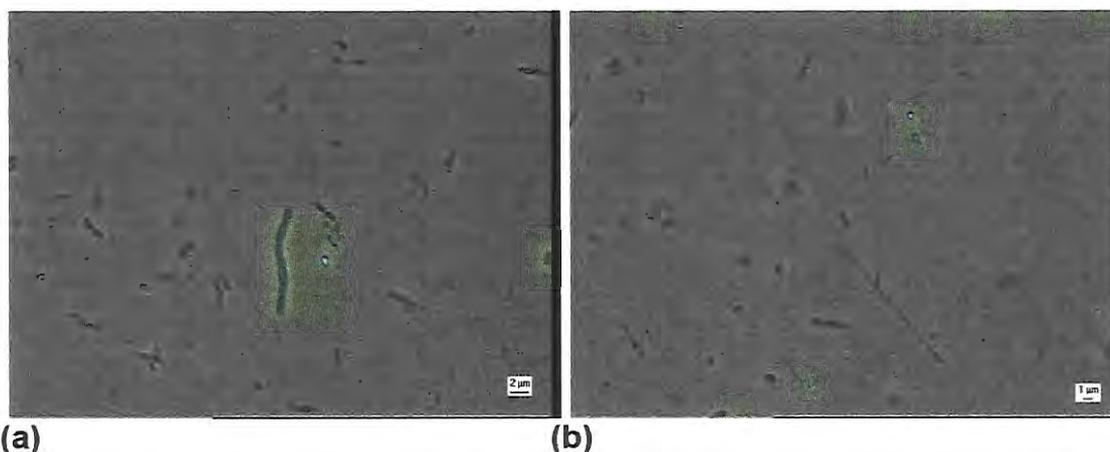


Figura 72. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de N_2/CO_2 70/30 % v/v : (a) e (b) diluição 10^{-6} , (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Na presença de metanol 20 mmol/L, foi possível a observação a olho nu de grumos amarelos que sob agitação manual ou quando colocados entre lâmina e a lamínula, podiam ser desfeitos e que quando observados ao microscópio pareceram um aglomerado de células do gênero *Methanosarcinas* sp. Essas células apresentaram uma ótima fluorescência. Observou-se bacilos com a mais diferentes morfologias como: curtos, pequenos, médios, curvos, espiralados, filamentos flexíveis, aos pares, em cadeia, ou ainda formando grandes aglomerados com a mais diversa morfologias. Também muitos cocos foram observados, que pareciam os mesmos que formavam as sarcinas. Na fluorescência foi possível observar bacilos médios, bacilos em cadeia e cocos pequenos, que se moviam rapidamente. A Figura 73 mostra as morfologia mais significativas encontradas nesse ensaio.

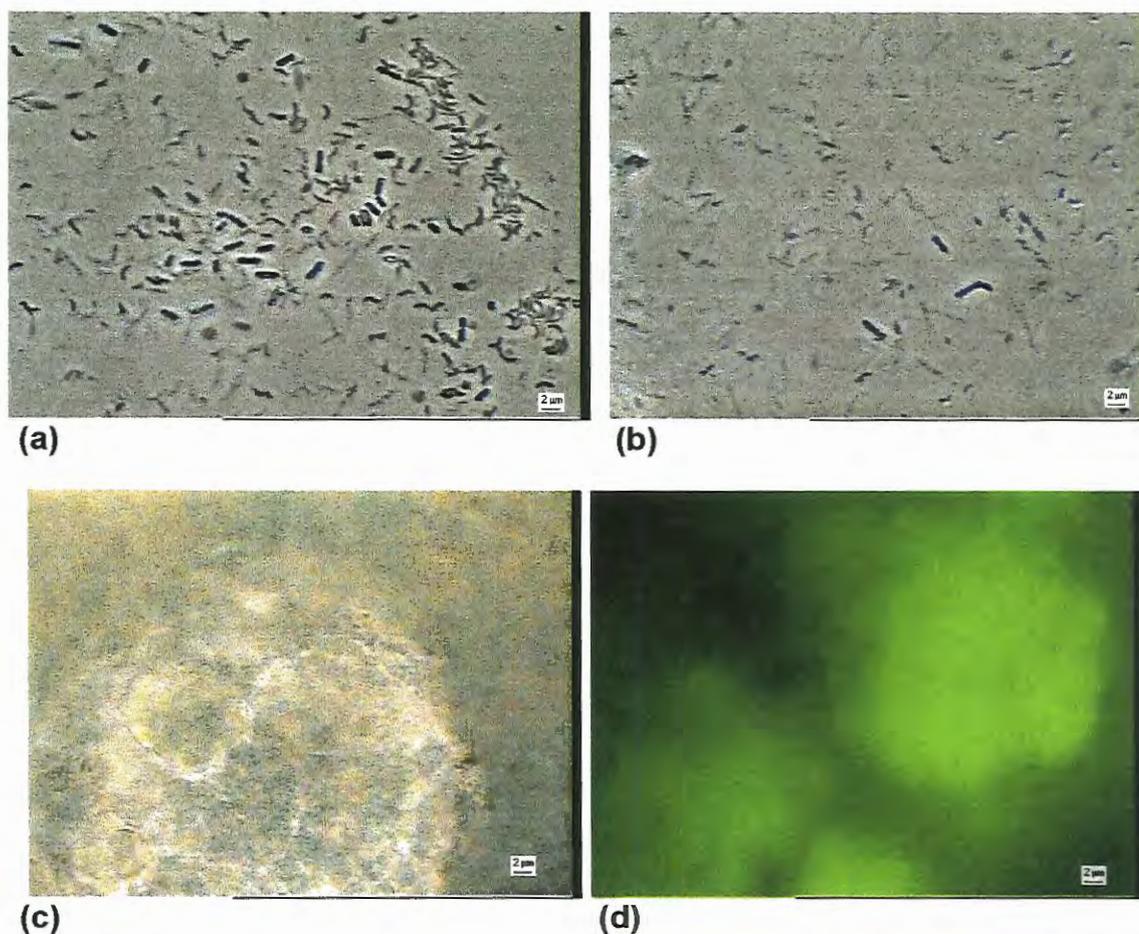


Figura 73. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de metanol 20 mmoles/L: (a) e (b) diluição 10^{-4} , (c) e (d) diluição 10^{-3} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

Comparando-se as morfologias mais freqüentes encontradas nos estudos de NMP na fonte orgânica metanol 20 mmoles/L, encontrou-se o predomínio de sarcinas no primeiro NMP, após a reativação do lodo mesófilo e no segundo feito após a degradação do TCE. As sarcinas visualizadas no primeiro ensaio eram muitas, mas bem menores (com pouco cocos) que as sarcinas visualizadas no segundo ensaio feito após a biodegradação do TCE, essas sarcinas quando observadas ao microscópio podiam ser vistas ocupando vários campos consecutivos, a fluorescência dessas sarcinas possibilitou uma observação detalhada e prolongada isto porque mostrou-se mais intensa e mais estável. Quanto aos bacilos no segundo ensaio feito após a biodegradação do TCE houve um aumento da diversidade e do número de células. Quanto as metanogênicas quase só foi possível observar

sarcinas, pois poucos bacilos e cocos apresentaram fluorescência em ambos ensaios do NMP. O aumento da concentração de metano registrada no ensaio após a biodegradação do TCE, pode estar ligada ao tamanho das sarcinas.

Na presença de formiato de sódio 20 mmoles/L, observou-se o predomínio de bacilos agrupados, estes eram longos e filamentosos, com um diâmetro constante de aproximadamente 0.4-0.8 μm e comprimento variando de 2-15 μm , que quando comparados à descrição do BERGEY (1989), pode-se descrever como sendo semelhantes ao gênero *Methanobacterium* sp. Observou-se também a presença de bacilos curvos e alguns bacilos espiralados e muitos bacilos longos e espiralados. Em meio à “rede” desse grupo de células foi possível observar alguns cistos escuros com diversos diâmetros, e os maiores pareciam constituir-se de diversas células como pode ser visto na Figura 74a. Pode-se considerar como cistos de sarcinas, embora não tenha sido possível confirmar a sua fluorescência segundo descrição de BERGEY (1989). Cocos não foram observados. A Figura 74 mostra as diferentes morfologias observadas nesta fonte.

O Anexo 16 apresenta uma comparação das morfologias predominantes presentes na primeira contagem do NMP realizada após a reativação dos lodos e a segunda contagem do NMP feita após a degradação do TCE.

As principais diferenças encontradas entre as observações feitas na primeira contagem do NMP realizada após a reativação do lodo mesofílico e a segunda contagem do NMP feita após a degradação do TCE foram: sarcinas e cocos não foram observadas na segunda contagem enquanto que na primeira contagem verificou-se sua presença. Com relação aos bacilos durante o primeiro NMP foi possível a observação de uma diversidade morfológica maior, embora a quantidade tenha sido menor com poucos agrupamento de bacilos do gênero *Methanobacterium* sp, esse talvez tenha sido um fator determinante para que o valor da concentração de metano tenha tido um acréscimo dos $5,6 \times 10^3$ para $5,4 \times 10^5$ NMP/mL na segunda contagem.

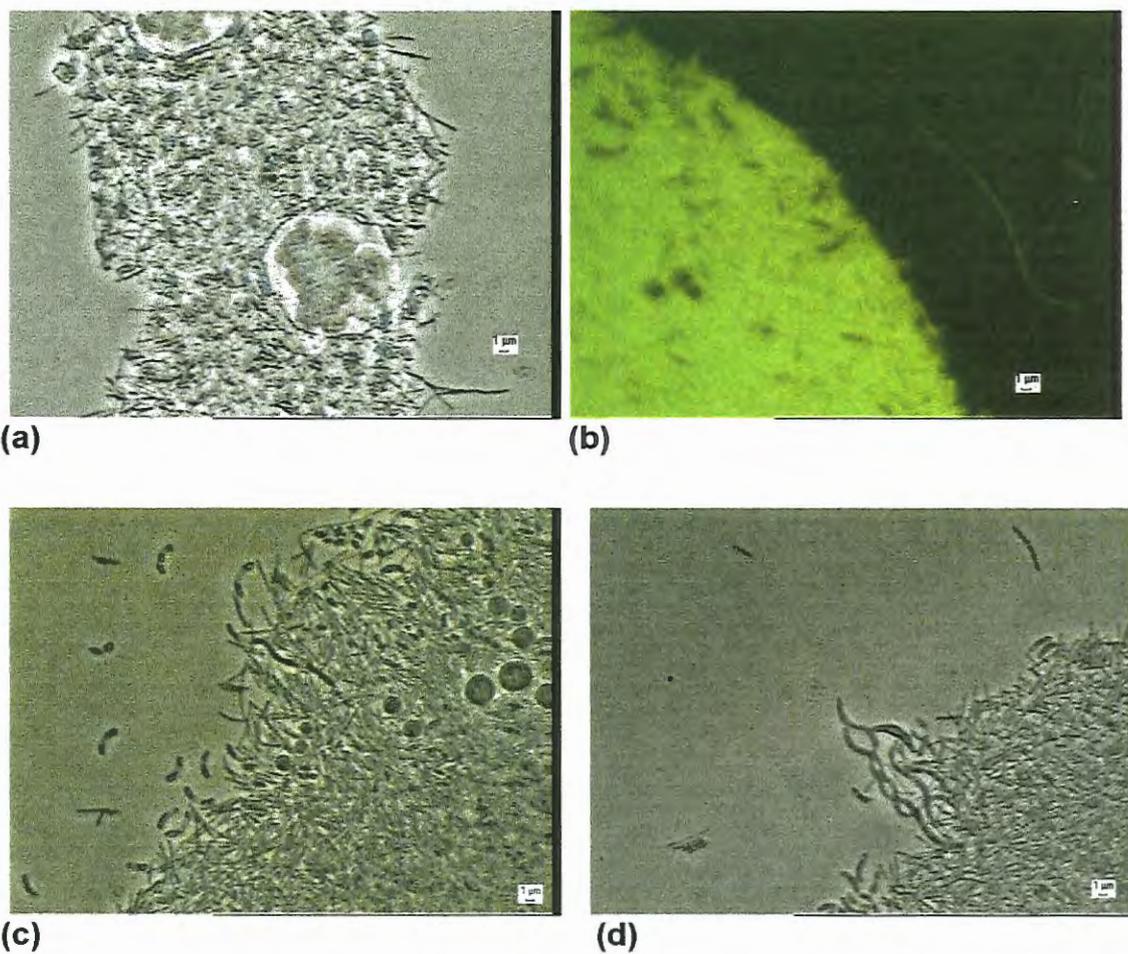


Figura 74. Fotomicrografias das células em meio Zinder no substrato de formiato de sódio 20 mmol/L: (a) e (b) diluição 10^{-6} , (c) e (d) diluição 10^{-7} (ocular 10, objetiva 100 e zoom 1,25).

6. CONCLUSÕES

O lodo anaeróbio termófilo granulado foi considerado uma amostra não natural, proveniente de um reator UASB, operado sob condições termofílicas a 55 ± 2 °C, para tratar água residuária originada da produção de álcool (vinhaça). Quando cultivado em laboratório utilizando fontes de carbono (e.g.: acetato de sódio, propionato de sódio, glicose, butirato de sódio, lactato de sódio, sulfato de sódio, metanol e extrato de levedura) favoreceu o aparecimento de uma comunidade metanogênica, devido a presença de metano e células fluorescentes. Destacou-se o predomínio de dois tipos morfológicos de organismos fluorescentes pertencentes aos gêneros *Methanosarcina* sp e *Methanobacterium* sp.

Na quantificação celular por NMP, feita após a reativação metanogênica do lodo termofílico, pode-se afirmar que na presença da fonte de carbono glicose 10 mmoles/L, encontrou-se a maior concentração celular, $1,6 \times 10^9$ NMP/mL e com relação a presença de metano, encontrou-se a maior concentração de células: $3,9 \times 10^7$ NMP/mL, na fonte hidrogênio e dióxido de carbono (80:20 % v/v e 1 atm). Os exames microscópicos evidenciaram células fluorescentes com o predomínio de bacilos, provavelmente do gênero *Methanobacterium* sp e do gênero *Methanosarcina* sp.

No estudo sobre a degradação de TCE, em cinco reatores contendo o inóculo termofílico e TCE (5mg TCE/g STV), obteve-se uma degradação média do composto de 86%, que foi relacionada a atividade biótica.

Na determinação quantitativa após os ensaios de decaimento do TCE sob condições termofílicas, pelo método do NMP, pode-se afirmar que na presença da fonte de carbono glicose 10 mmoles/L, encontrou-se a maior

concentração celular: $2,6 \times 10^7$ NMP/mL e com relação aos frascos com teores de metano, encontrou-se a maior concentração de células $6,8 \times 10^6$ NMP/mL na presença de hidrogênio e dióxido de carbono (80:20 % v/v e 1 atm). A mistura gasosa, ou seja a presença de hidrogênio, também na segunda contagem revelou o aparecimento de bacilos fluorescentes que foram relacionados a bacilos hidrogenotróficos, provavelmente do gênero *Methanobacterium* sp. O gênero *Methanosarcina* sp também esteve presente.

A amostra de sedimento coletada na Represa do Lobo (Broa), quando cultivada em laboratório utilizando fontes de carbono (e.g.: acetato de sódio, formiato de sódio, butirato de sódio, lactato de sódio, metanol e etanol), revelou o aparecimento de uma comunidade metanogênica, devido a presença de metano e células fluorescentes. Destacou-se o predomínio de tipos morfológicos de organismos fluorescentes pertencentes aos gêneros *Methanosarcina* sp, *Methanobacterium* sp e *Methanococcus* sp.

Na quantificação celular por NMP, feita após a reativação metanogênica do lodo mesófilo, pode-se afirmar que na presença da fonte de carbono lactato de sódio 20 mmoles/L encontrou-se a maior concentração celular: $4,5 \times 10^7$ NMP/mL, e com relação a presença de metano encontrou-se a maior concentração de células: $5,6 \times 10^3$ NMP/mL na fonte formiato de sódio 20 mmoles/L. Os exames microscópicos evidenciaram células fluorescentes com o predomínio de bacilos, provavelmente do gênero *Methanobacterium* sp.

No estudo sobre a degradação de TCE em cinco reatores contendo o inóculo mesófilo e TCE (5mg TCE/g STV), obteve-se uma redução média do composto de 79%, que foi relacionada a atividade biótica.

Na determinação quantitativa após os ensaios de degradação do TCE sob condições mesofílicas, pelo método do NMP, pode-se afirmar que na presença da fonte de carbono lactato de sódio 20 mmoles/L encontrou-se a maior concentração celular $3,0 \times 10^7$ NMP/mL, e com relação ao metano encontrou-se a maior concentração de células $2,4 \times 10^5$ NMP na fonte formiato de sódio 20 mmoles/L. Os exames microscópicos confirmaram a

presença de células fluorescentes com o predomínio de bacilos hidrogenotróficos provavelmente do gênero *Methanobacterium* sp e também do gênero *Methanosarcina* sp.

Os estudos conduziram a conclusão de que ambos os lodos, termófilo e mesófilo, desenvolveram um consórcio metanogênico capaz de degradar o TCE em laboratório, e que não foram afetados pela presença do composto. Embora o lodo termófilo tenha apresentado uma atividade metanogênica maior, bem como sua adaptação tenha ocorrido em um tempo menor, o consórcio metanogênico mesófilo apresentou uma maior diversidade de morfologias com um maior número de células na presença de TCE.

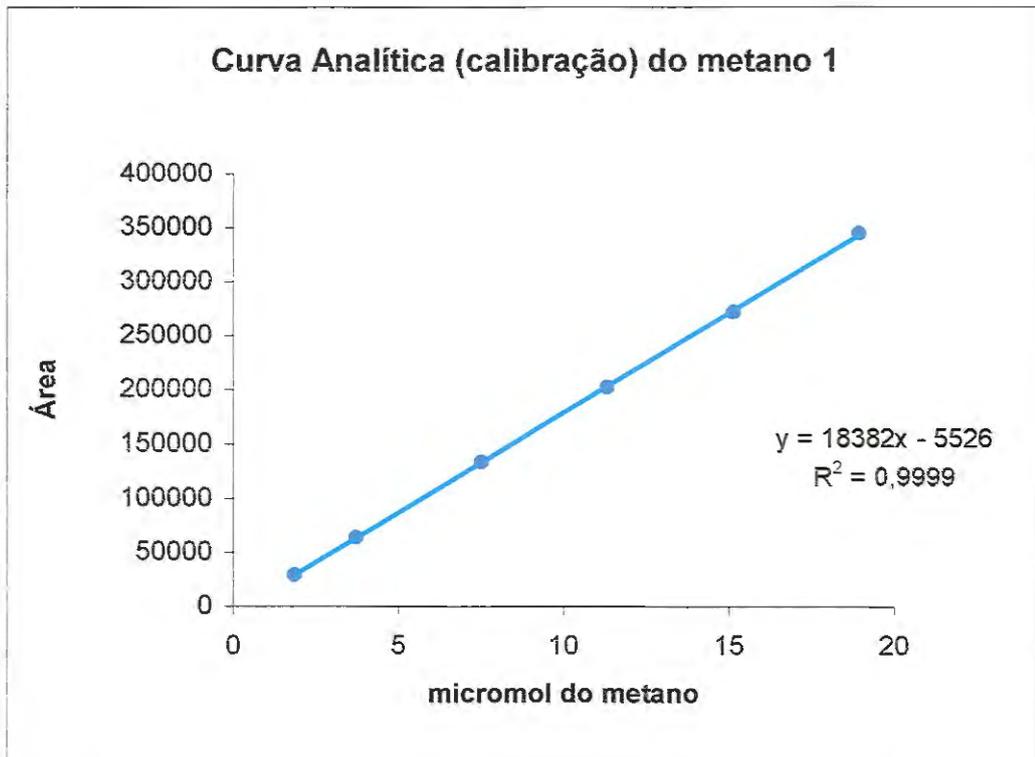
ANEXO 1

CURVA ANALÍTICA (CALIBRAÇÃO) DO METANO 1
 DATA - 13 DE JULHO DE 1999

Temperatura ambiente = 23°C

Pressão atmosférica de São Carlos = 699,8 mm de Hg

Vol.metano (mL)	Metano (μmol)CNTP	Área medida (3 cromatografias)
0,05	1,89	29192
0,1	3,75	64128
0,2	7,54	133468
0,3	11,33	201488
0,4	15,13	271160
0,5	18,92	343870



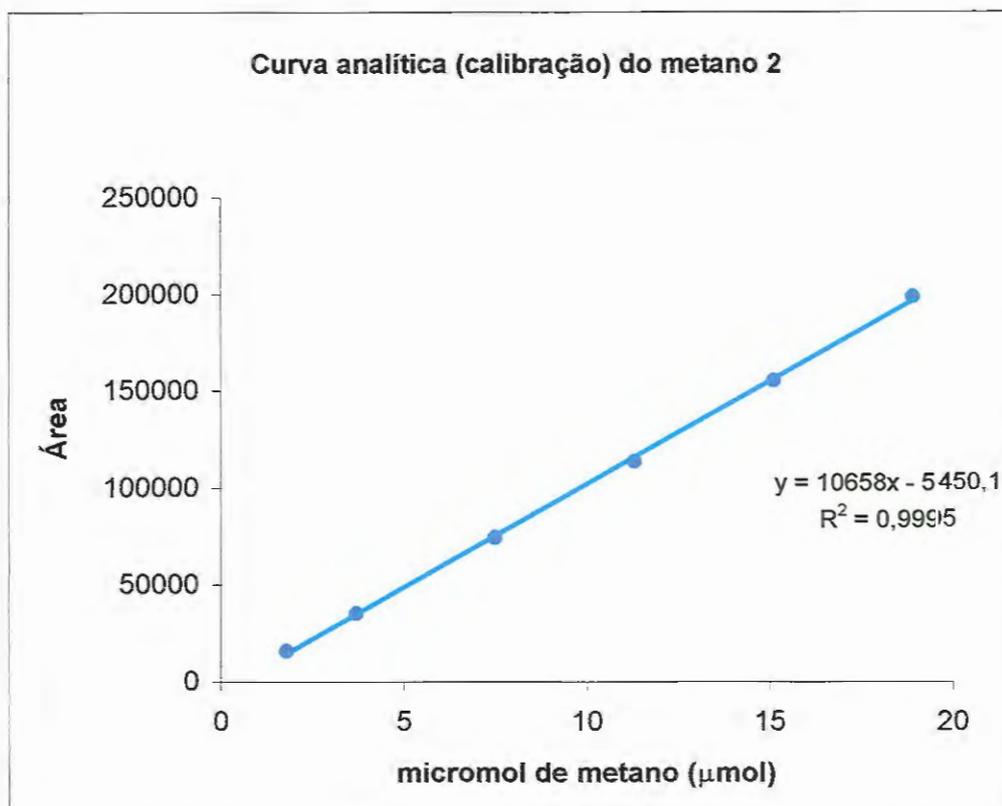
ANEXO 2

CURVA ANALÍTICA (CALIBRAÇÃO) DO METANO 2
DATA - 10 DE SETEMBRO DE 1999

Temperatura ambiente = 22°C

Pressão atmosférica de São Carlos = 696,8 mm de Hg

Vol.metano (mL)	Metano (μmol)CNTP	Área medida (3 cromatografias)
0,05	1,9	16159
0,1	3,8	35576
0,2	7,6	74623
0,3	11,4	113718
0,4	15,2	155790
0,5	19	199195



ANEXO 3

Lodo Termófilo, primeira contagem do NMP

Fonte de Carbono: Glicose (10 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10 ⁻⁷	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10 ⁻⁸	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10 ⁻⁹	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: H₂/CO₂ (80:20% v/v)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁷	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
10 ⁻⁸	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
10 ⁻⁹	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: formiato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: lactato de sódio (20 mmoles/L)/sulfato de sódio (10 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: metanol (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: acetato de sódio (20 mmoles/L)/sulfato de sódio (10 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: propionato de sódio (20 mmoles/L)/sulfato de sódio (10mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: butirato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: N_2/CO_2 (70:30% v/v)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10^{-5}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: glicerol (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: propionato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
10^{-4}	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: acetato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

ANEXO 4

Lodo Mesófilo, primeira contagem do NMP

Fonte de Carbono: lactato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: acetato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: N_2/CO_2 (70:30% v/v)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10^{-2}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-3}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: metanol (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-3}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: formiato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: etanol (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10^{-2}	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
10^{-3}	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

ANEXO 5

CURVA ANALÍTICA (CALIBRAÇÃO) DO TCE

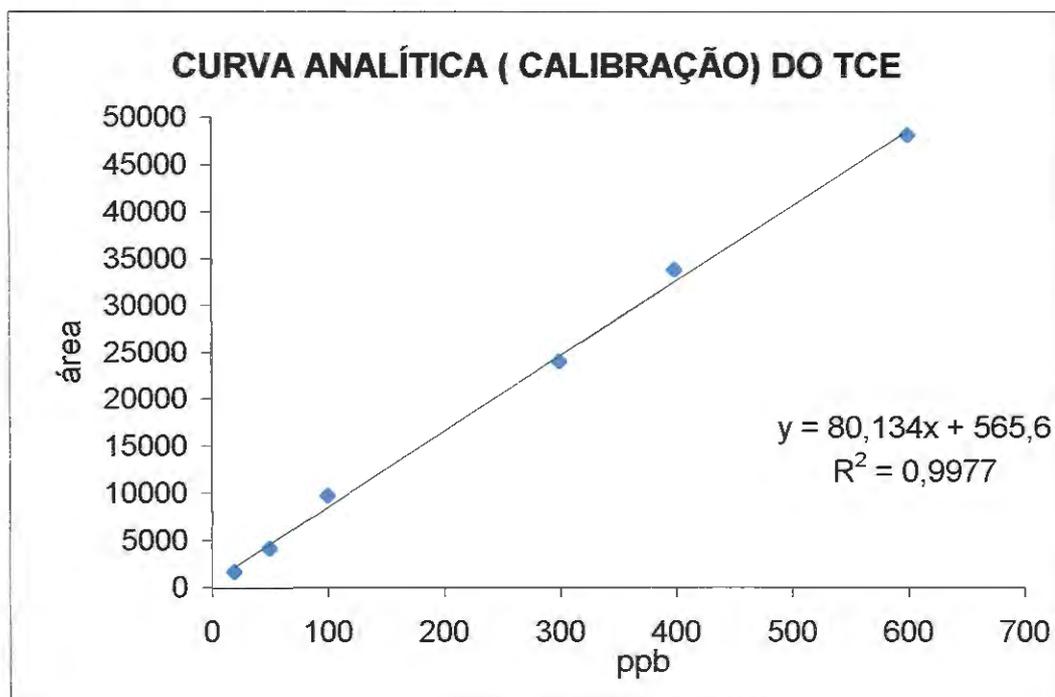
DATA - 12 de março de 2000

Média das área medidas (3 medidas)

5 ppb	20 ppb	50 ppb	100 ppb	300 ppb	400 ppb	600 ppb
nd	1525	4596	9664	24195	32422	46818
nd	1472	3592	9381	23651	33966	48849
nd	1833	4003	10139	24018	34834	48612
	1610	4064	9728	23955	33741	48093

Vol.TCE (ppb) | Area medida (média)

20	1610
50	4064
100	9728
300	23955
400	33741
600	48093

Curva analítica de calibração do TCE $y = 80,134x + 565,6$

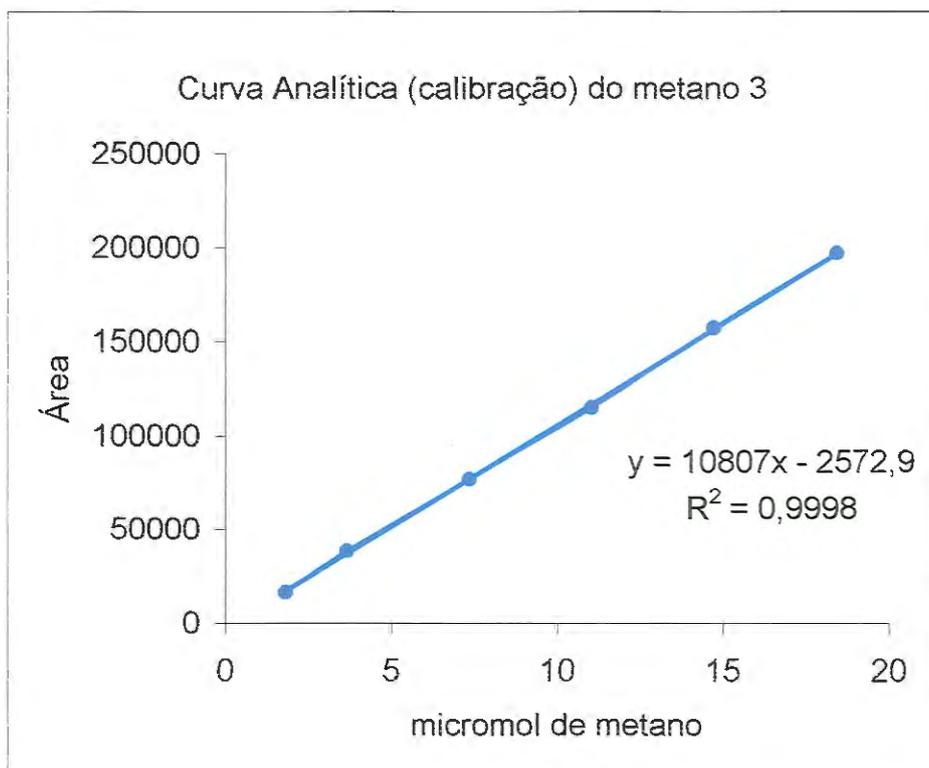
ANEXO 6

CURVA ANALÍTICA (CALIBRAÇÃO) DO METANO 3
DATA - 11 de DEZEMBRO de 1999

Temperatura ambiente = 28° C

Pressão atmosférica de São Carlos = 694 mm de Hg

Vol.metano (mL)	Metano (μ mol)CNTP	Área medida (3 cromatografias)
0,05	1,83	16572
0,1	3,68	38566
0,2	7,36	76878
0,3	11,05	115320
0,4	14,73	157325
0,5	18,42	196677



ANEXO 7

reator T1

tempo/dia	A	B	%
0	1138	0,34	0,37
3	37265	3,69	8,99
5	43994	4,31	10,06
7	58916	5,69	13,09
10	32803	3,27	14,35
12	30445	3,06	12,39
14	24193	2,48	12,27
17	29164	2,94	11,94
19	28436	2,87	12
21	38433	3,79	11,56
24	24936	2,55	11,44
26	26018	2,65	11,13
28	26494	2,69	10,41
31	12545	1,40	9,94
33	18067	1,91	9,62
35	22118	2,28	10,29
38	21292	2,21	9,58
40	22068	2,28	9,33
42	19891	2,08	10,19
45	20505	2,14	9,99
47	19895	2,08	9,31
53	18218	1,92	8,86
55	18386	1,94	7,55
56	12277	1,37	10,27
60	23576	2,42	11,19
62	22932	2,36	11,13
70	18790	1,98	37,63
74	87288	8,32	43,71
76	93187	8,86	46,28
78	101222	9,60	48,92
79	121937	11,52	47,49
83	94171	8,95	52,8
85	105921	10,04	51,61
87	144455	13,60	50,82
91	112687	10,67	51,74

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$ C= % da área de metano, obtida no cromatograma
negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator T2

tempo (dias)	A	B	%
0	1066	0,34	0,44
3	29209	2,94	12,73
5	42435	4,16	16,53
7	66278	6,37	21,03
10	54077	5,24	23,36
12	54235	5,26	23,2
14	41453	4,07	25,12
17	52015	5,05	23,17
19	46458	4,54	22,26
21	45133	4,41	20,04
24	40752	4,01	19,89
26	44602	4,37	19,68
28	45671	4,46	18,7
31	22223	2,29	18,1
33	31783	3,18	18,05
35	38162	3,77	17,47
38	35962	3,57	17,63
40	34932	3,47	17,89
42	31402	3,14	17,07
45	35850	3,56	17,53
47	24583	2,51	16,57
53	31945	3,19	15,54
55	28951	2,92	15,54
56	28360	2,86	14,82
60	29568	2,97	15,18
62	28004	2,83	13,46
70	22296	2,30	36,35
74	105133	9,97	49,46
76	134426	12,68	54,13
78	153363	14,43	59,95
79	64114	6,17	58,70
83	123530	11,67	62,81
85	148971	14,02	61,84
87	133840	12,62	62,22
91	112266	10,63	56,32

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$ C= % da área de metano, obtida no cromatograma
negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator T3

tempo (dias)	A	B	%
0	954	0,33	0,31
3	33469	3,34	8,12
5	43114	4,23	9,69
7	54858	5,31	12,66
10	33922	3,38	14,07
12	28247	2,85	11,86
14	22221	2,29	23,73
17	27425	2,78	12,12
19	28488	2,87	12,12
21	28326	2,86	11,81
24	24500	2,51	11,88
26	26967	2,73	11,57
28	28330	2,86	10,52
31	12652	1,41	10,1
33	19282	2,02	10,28
35	23961	2,46	10,17
38	21632	2,24	10,81
40	20847	2,17	10,32
42	18629	1,96	10,31
45	20798	2,16	10,03
47	16081	1,73	10,38
53	20180	2,11	9,9
55	18576	1,96	9,03
56	17845	1,89	9,42
60	19568	2,05	9,31
62	17495	1,86	9,6
70	15364	1,66	9
74	18109	1,91	9
76	19511	2,04	10,94
78	24761	2,53	9,97
79	23858	2,45	9,24
83	11255	1,28	9,68
85	19845	2,07	11,05
87	28518	2,88	10,26
91	23773	2,44	9,86

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C= % da área de metano, obtida no cromatograma
negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator T4

tempo (dias)	A	B	%
0	1016	0,33	0,31
3	27235	2,76	8,36
5	37156	3,68	9,97
7	54858	5,31	13,25
10	71762	6,88	15,75
12	35690	3,54	15,24
14	30463	3,06	13,42
17	32563	3,25	12,72
19	31349	3,14	13,41
21	30108	3,02	12,46
24	26602	2,70	12,13
26	29618	2,98	12,10
28	29923	3,01	11,72
31	14357	1,57	11,66
33	21337	2,21	11,52
35	25008	2,55	11,78
38	24235	2,48	11,28
40	24592	2,51	10,61
42	21214	2,20	10,76
45	22548	2,32	10,68
47	20713	2,15	9,98
53	21864	2,26	10,57
55	21955	2,27	10,86
56	16438	1,76	9,17
60	20054	2,09	13,05
62	27356	2,77	15,2
70	29765	2,99	15,03
74	30125	3,03	14,89
76	31424	3,15	14,92
78	35809	3,55	15,4
79	17068	1,82	14,76
83	28564	2,88	14,72
85	37155	3,68	14,27
87	33059	3,30	34,64
91	28299	2,86	14,19

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em mmol/L

C= % da área de metano, obtida no cromatograma
negrito- após a re-alimentação dos reatores

reator T5

tempo (dias)	A	B	%
0	882	0,32	0,37
3	32195	3,22	9,4
5	39770	3,92	11,21
7	51072	4,96	13,67
10	69871	6,70	16,75
12	39434	3,89	15,7
14	33826	3,37	15,87
17	39779	3,92	15,22
19	34973	3,47	15,4
21	34145	3,40	13,93
24	30237	3,04	14,3
26	32836	3,28	13,71
28	39704	3,91	13,52
31	15970	1,72	14,34
33	22994	2,37	12,47
35	26209	2,66	12,11
38	24631	2,52	12,22
40	22149	2,29	12,01
42	18068	1,91	11,83
45	24017	2,46	11,67
47	15305	1,65	12,1
53	22053	2,28	11,22
55	21086	2,19	8,98
56	13794	1,51	10,91
60	21796	2,25	12,37
62	22277	2,30	11,82
70	19500	2,04	36,07
74	78156	7,47	48,8
76	101915	9,67	50,01
78	109398	10,36	58,14
79	125344	11,84	54,96
83	64005	6,16	56,48
85	105516	10,00	56,03
87	130402	12,30	57,25
91	125706	11,87	55,99

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C= % da área de metano, obtida no cromatograma

negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator T6

tempo (dias)	A	B	%
0	1093	0,34	0,24
3	37767	3,73	3,57
5	46583	4,55	8,52
7	61134	5,89	7,47
10	68920	6,62	9,68
12	36026	3,57	10,2
14	31235	3,13	12,2
17	36298	3,60	12,76
19	34790	3,46	13,98
21	33156	3,31	14,19
24	32241	3,22	15,33
26	35472	3,52	15,84
28	41054	4,04	16,78
31	22894	2,36	20,39
33	39665	3,91	22,07
35	59009	5,70	23,8
38	56920	5,51	26,49
40	66531	6,39	30,49
42	62907	6,06	30,66
45	73826	7,07	34,14
47	76092	7,28	36,13
53	90303	8,59	43,36
55	84238	8,03	38,33
56	81387	7,77	46,75
60	109232	10,35	53,85
62	125286	11,83	54,6
70	86211	8,22	54,16
74	151837	14,29	67,9
76	140384	13,23	68,87
78	146297	13,78	70,61
79	163601	15,38	70,24
83	129602	12,23	69,94
85	139357	13,13	69,91
87	166638	15,66	69,25
91	148539	13,98	68

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em mmoles/L

C= % da área de metano, obtida no cromatograma

negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator T7

tempo (dias)	A	B	%
0	1048	0,34	0,26
3	41101	4,04	3,47
5	44755	4,38	6,21
7	55393	5,36	8,31
10	29650	2,98	9,04
12	28792	2,90	10,68
14	26390	2,68	11,87
17	29278	2,95	12,35
19	30368	3,05	13,48
21	30532	3,06	13,34
24	26332	2,67	12,8
26	30366	3,05	12,79
28	41054	4,04	12,23
31	14928	1,62	12,02
33	23584	2,42	12,47
35	28093	2,84	11,76
38	25304	2,58	11,81
40	23602	2,42	10,21
42	17523	1,86	11,65
45	25430	2,59	11,75
47	23692	2,43	11,1
53	24684	2,52	11,81
55	21519	2,23	10,71
56	15071	1,63	8,57
60	18913	1,99	12,63
62	26888	2,73	14,64
70	23463	2,41	27,65
74	84583	8,06	46,21
76	138012	13,01	45,88
78	100823	9,57	52,01
79	123721	11,69	52,59
83	94611	8,99	61,78
85	121602	11,49	64,27
87	164768	15,48	64,23
91	138497	13,05	64,89

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em mmoles/L

C= % da área de metano, obtida no cromatograma

negrito - após a re-alimentação dos reatores

ANEXO 8



Instituto de Química
Universidade Estadual de Campinas
Wilson F. Jardim
Laboratório de Química Ambiental - LQA
wfjardim@iqm.unicamp.br

Resultado de Análise¹

Interessada: Sílvia Helena S.ª Fatibello, São Carlos, SP.

Análise: Quantificação de Tricloroetileno (TCE) por Cromatografia Gasosa usando o detector de captura de elétrons (ECD).

- Histórico da amostra:** O LQA não assume nenhuma responsabilidade pelo histórico destas amostras, tendo em vista que as mesmas foram coletadas, transportadas, denominadas e entregue pela interessada em 25/02/2000.
- Método Analítico:** Cromatografia Gasosa utilizando-se um Cromatógrafo Shimadzu GC 14B equipado com Detector de Captura de Elétrons. A injeção da amostra é feita utilizando-se uma microseringa de 5 μ L. As substâncias presentes na amostra, após interação com a fase estacionária (coluna cromatográfica) são separadas, sob alta pressão, e arrastadas pela fase móvel (He) para fora da coluna. O gás de arraste, ao passar pelo detector, é ionizado por partículas beta emitidas por fonte de ⁶³Ni. Os elétrons produzidos neste processo são coletados em um anodo, gerando uma corrente que é amplificada por um eletrômetro, resultando a linha base. Moléculas eluindo da coluna, capazes de capturar elétrons, diminuem esta corrente, gerando um sinal proporcional a sua concentração.
- Condições de Análise:** Coluna INOWAX-HP; Injeção modo SPLIT com purga de 30 mL/min; Pressão dos gases: Hélio 80 kPa (gás de arraste) e Nitrogênio 120 kPa (gás make-up); Temperatura do Injetor: 160°C; Temperatura do Detector: 260°C; Corrente utilizada: 0,2 nA;

¹ Este documento contém 3 páginas.

Rampa de Aquecimento: Temperatura Inicial: 40°C por 2 min, aquecimento de 5°C/min até 70°C e, em seguida, resfriamento da coluna até a temperatura inicial; Volume de amostra injetado: 1µL.

4. **Padrões:** Padrões preparados (5, 20, 50, 100, 300, 400 e 600 ppb), transportados, denominados e entregues ao laboratório, pelo interessado. Condições de análise idênticas às utilizadas para as amostras.

Padrões (ppb)	Área 1	Área 2	Área 3
5	n.d.	n.d.	n.d.
20	1525	1472	1833
50	4596	3592	4003
100	9664	9381	10139
300	24195	23651	24018
400	32422	33966	34834
600	46818	48849	486120

5. **Limite de Detecção:** 10 ppb (partes por bilhão)

Resultados:

Amostra	Área obtida	Amostra	Área Obtida
001	16696	037	7083
002	16794	038	27130
003	15999	039	5884
004	16667	040	7476
005	16875	041	12993
006	36783	042	8729
007	34768	043	8620
008	39253	044	27926
009	38041	045	36771
010	38668	046	31033
011	11780	047	39644
012	12577	048	32813
013	n.d.	049	28991
014	13875	050	38383
015	15380	051	25483
016	16748	052	24258
017	n.d.	053	29422

018	28876	054	36441
019	9735	055	n.d.
020	7453	056	5787
021	12287	057	5192
022	8894	058	4925
023	7703	059	3947
024	6177	060	4803
025	9848	061	12964
026	9849	062	7600
027	27807	063	7878
028	9104	064	6724
029	10422	065	7511
030	13450	066	4732
031	8267	067	5655
032	5561	068	6147
033	5334	069	6588
034	12984	070	5037
035	8142	071	4724
036	5214	072	24052

Campinas, 10 de junho de 20000



Wilson de Figueiredo Jardim

Professor Titular do Depto. de Química Analítica

ANEXO 9

reator T12

tempo (dias)	A	B	C
0	6862	0,87	2,91
1	18684	1,97	8,34
6	32149	3,21	14,85
8	61775	5,95	27,42
10	72865	6,98	33,6
12	72353	6,93	39,17
14	87333	8,32	43,15
17	111351	10,54	45,25
19	116922	11,06	45,09
21	123990	11,71	49,35
24	119847	11,33	44,58
26	107044	10,14	39,25
28	92780	8,82	39,45
31	105619	10,01	38,01
33	98641	9,37	37,89

reator T22

tempo (dias)	A	B	C
0	6494	0,84	2,73
1	19845	2,07	8,8
6	36757	3,64	17,48
8	54106	5,24	24,39
10	59099	5,71	25,75
12	50682	4,93	26,4
14	57997	5,60	29,1
17	65784	6,33	33,11
19	77745	7,43	37,37
21	88353	8,41	44,19
24	88972	8,47	42,98
26	72784	6,97	36,47
28	74357	7,12	42,93
31	61437	5,92	42,65
33	53131	5,15	45,14

A = Área do metano obtida por cromatografia

B = Número de mols de metano em mmol

C = % da área de metano, obtida no cromatograma

reator T32			
tempo (dias)	A	B	C
0	6169	0,81	2,60
1	15870	1,71	7,64
6	40743	4,01	17,69
8	53349	5,17	23,55
10	52613	5,11	26,64
12	54074	5,24	29,33
14	58192	5,62	28,87
17	61984	5,97	27,13
19	77502	7,41	26,24
21	72923	6,99	27,43
24	75917	7,26	32,44
26	68421	6,57	35,58
28	73587	7,05	34,99
31	76524	7,32	33,89
33	88583	8,43	32,31

reator T42			
tempo (dias)	A	B	C
0	6874	0,87	3,04
1	16758	1,79	8,53
6	36254	3,59	18,23
8	59623	5,76	23,88
10	66990	6,44	30,24
12	60063	5,80	33,22
14	72890	6,98	33,01
17	68563	6,58	29,72
19	78691	7,52	33,59
21	78823	7,53	34,99
24	70288	6,74	42,68
26	69855	6,70	45,87
28	58288	5,63	38,49
31	58246	5,63	42,89
33	59678	5,76	43,87

A = Área do metano obtida por cromatografia

B = Número de mols de metano em mmol

C = % de área de metano, obtida no cromatograma

reator T52

tempo (dias)	A	B	C
0	5175	0,72	2,46
1	18593	1,96	8,89
6	52006	5,05	19,01
8	74676	7,15	32,26
10	79848	7,63	35,61
12	65269	6,28	37,57
14	77260	7,39	36,79
17	75004	7,18	47,28
19	85860	8,18	53,99
21	122780	11,60	44,46
24	139325	13,13	38,32
26	109375	10,36	35,27
28	120680	11,40	34,46
31	119226	11,27	37,32
33	116573	11,02	36,85

reator T62

tempo (dias)	A	B	C
0	6329	0,82	1,41
1	16419	1,76	3,51
6	40301	3,97	8,34
8	52433	5,09	11,08
10	61328	5,91	13,66
12	53304	5,17	18,89
14	57263	5,54	22,70
17	59292	5,72	23,00
19	68304	6,56	31,97
21	59374	5,73	36,41
24	52180	5,07	42,74
26	46872	4,58	43,87
28	44398	4,35	44,03
31	40897	4,02	57,42
33	41783	4,10	52,42

A = Área do metano obtida por cromatografia
 B = Número de moles de metano em mmoles/L
 C = % de área de metano, obtida no cromatograma

reator T72			
tempo (dias)	A	B	C
0	6633	0,85	1,65
1	17230	1,83	4,33
6	44255	4,33	7,13
8	52328	5,08	9,69
10	67313	6,47	12,34
12	60988	5,88	19,94
14	63925	6,15	34,55
17	63246	6,09	44,33
19	59289	5,72	50,36
21	58548	5,66	57,72
24	52472	5,09	56,98
26	53993	5,23	56,55
28	38276	3,78	55,82
31	35698	3,54	49,25
33	32786	3,27	52,89

A = Área do metano obtida por cromatografia

B = Número de moles de metano em mmoles/L

C = % de área de metano, obtida no cromatograma

ANEXO 10

reator M1

tempo (dias)	A	B	%
0	0	0	0
3	3994	0,61	1,51
5	21590	2,24	7,3
7	41911	4,12	12,48
10	29231	2,94	12,69
12	30314	3,04	12,86
14	27871	2,82	14,79
17	32629	3,26	16,59
19	39299	3,87	17,53
21	44450	4,35	21,13
24	60108	5,80	26,09
26	117957	11,15	31,14
28	93396	8,88	36,37
31	46318	4,52	45,74
33	102980	9,77	49,25
35	138003	13,01	53,08
38	166140	15,61	58,52
40	202549	18,98	60,94
42	109758	10,39	59,01
45	124344	11,74	58,38
47	86197	8,21	59,25
53	120831	11,42	59,58
55	112958	10,69	58,49
56	115605	10,94	57,98
60	122827	11,60	57,74
62	94784	9,01	57,88
70	125434	11,84	59,35
74	120394	11,38	58,55
76	125580	11,86	59,38
78	135724	12,80	66,55
79	138269	13,03	67,73
83	133251	12,57	65,23
85	163654	15,38	63,94
87	147505	13,89	63,69
91	127377	12,02	62,35

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em mmoles/L

C= % da área de metano, obtida no cromatograma

negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator M2

tempo (dias)	A	B	%
0	0	0	0
3	4102	0,62	1,74
5	18639	1,96	8,58
7	40487	3,98	14,64
10	39693	3,91	14,25
12	32619	3,26	13,72
14	25180	2,57	13,26
17	26069	2,65	14,80
19	30500	3,06	14,05
21	30290	3,04	14,60
24	32621	3,26	15,80
26	55614	5,38	16,45
28	39370	3,88	17,22
31	43099	4,23	22,25
33	45605	4,46	27,55
35	65328	6,28	32,88
38	92199	8,77	39,97
40	118628	11,22	45,69
42	93271	8,87	48,65
45	112905	10,69	53,15
47	84816	8,09	57,91
53	136212	12,84	65,71
55	126343	11,93	64,80
56	136530	12,87	66,03
60	148320	13,96	67,31
62	105442	9,99	64,26
70	147876	13,92	69,38
74	132758	12,52	67,63
76	142822	13,45	66,78
78	154059	14,49	66,33
79	141130	13,30	72,10
83	145654	13,72	71,82
85	167721	15,76	64,87
87	150141	14,13	66,60
91	134938	12,72	66,50

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C= % da área de metano, obtida no cromatograma

negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator M3

tempo (dias)	A	B	%
0	0	0	0
3	6723	0,86	2.73
5	27380	2,77	10.99
7	45096	4,41	15.23
10	31067	3,11	15.28
12	36070	3,58	14.57
14	30817	3,09	14.76
17	25723	2,62	14.58
19	28948	2,92	14.57
21	30902	3,10	14.65
24	31441	3,15	15.36
26	54421	5,27	16.4
28	38384	3,79	16.89
31	38591	3,81	20,00
33	45605	4,46	23.73
35	65328	6,28	28.08
38	84909	8,09	35.15
40	69211	6,64	42.12
42	81978	7,82	44.6
45	108037	10,24	51.02
47	76776	7,34	55.57
53	127983	12,08	63.57
55	130087	12,28	66.14
56	133834	12,62	66,26
60	150339	14,15	67,65
62	111883	10,59	64,90
70	156855	14,75	72,71
74	134930	12,72	67,94
76	141970	13,37	67,48
78	163449	15,36	69,64
79	140729	13,26	70,72
83	134973	12,73	69,68
85	168350	15,82	65,61
87	150449	14,16	67,64
91	134676	12,70	67,59

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C= % da área de metano, obtida no cromatograma

negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator M4

tempo (dias)	A	B	%
0	0	0	0
3	5301	0,73	2,10
5	26639	2,70	10,61
7	41754	4,10	15,23
10	45042	4,41	15,71
12	38445	3,80	16,39
14	34202	3,40	16,64
17	35347	3,51	18,88
19	43767	4,29	19,91
21	40864	4,02	21,19
24	62422	6,01	26,94
26	114797	10,86	31,16
28	95579	9,08	37,01
31	74174	7,10	48,78
33	92027	8,75	50,13
35	137206	12,93	51,01
38	154848	14,57	53,95
40	128847	12,16	60,41
42	111132	10,52	61,07
45	135133	12,74	63,10
47	90497	8,61	65,29
53	122729	11,59	60,45
55	124914	11,80	65,33
56	130550	12,32	64,95
60	117172	11,08	62,00
62	108107	10,24	65,65
70	153635	14,45	71,89
74	141921	13,37	67,94
76	161283	15,16	72,08
78	159527	15,00	75,23
79	138618	13,06	68,08
83	142876	13,46	71,61
85	179628	16,86	69,31
87	156783	14,75	70,54
91	139541	13,15	69,92

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C= % da área de metano, obtida no cromatograma

negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator M5

tempo (dias)	A	B	%
0	0	0	0
3	4487	0,65	1,64
5	21434	2,22	7,87
7	39712	3,91	12,39
10	35848	3,56	15,34
12	39965	3,94	16,64
14	41777	4,10	19,42
17	45746	4,47	22,83
19	57397	5,55	23,80
21	31604	3,16	24,90
24	72632	6,96	31,84
26	130860	12,35	36,15
28	111174	10,53	42,50
31	128803	12,16	52,16
33	106652	10,11	55,72
35	130144	12,28	57,25
38	152449	14,34	62,77
40	132345	12,48	63,48
42	111827	10,59	62,74
45	125455	11,85	63,10
47	87767	8,36	64,49
53	127372	12,02	62,08
55	113993	10,79	61,28
56	121875	11,52	61,69
60	106324	10,08	59,93
62	95538	9,08	61,19
70	120925	11,43	59,63
74	114955	10,88	59,32
76	126411	11,94	59,18
79	123593	11,67	62,24
83	119392	11,29	59,62
85	158313	14,89	59,69
87	132788	12,53	57,25
91	139541	13,15	61,2

A= área do metano obtida por cromatografia
 B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$
 C= % da área de metano, obtida no cromatograma
 negrito - após a re-alimentação dos reatores



reatorM6

tempo (dias)	A	B	%
0	0	0	0
3	2877	0,50	1,02
5	6785	0,87	2,77
7	8791	1,05	3,27
10	9286	1,10	3,42
12	6369	0,83	3,51
14	7450	0,93	3,59
17	7933	0,97	3,79
19	8549	1,03	4,4
21	11970	1,35	5,45
24	19825	2,07	9,15
26	34044	3,39	13,22
28	47492	4,63	15,25
31	54875	5,32	16,55
33	74926	7,17	18,29
35	111018	10,51	17,5
38	117115	11,08	22,53
40	126350	11,93	44,25
42	128917	12,17	52,71
45	128700	12,15	59,48
47	125910	11,89	59,46
53	128908	12,17	59,24
55	121188	11,45	60,15
56	126147	11,91	61,02
60	122135	11,54	61,77
62	109372	10,36	63,54
70	153008	14,40	70,53
74	138572	13,06	67,25
76	144502	13,61	65,6
79	137443	12,96	66,12
83	139652	13,16	67,59
85	180686	16,96	67,81
87	158048	14,86	69,25
91	144447	13,60	69,17

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C= % da área de metano, obtida no cromatograma
negrito - após a re-alimentação dos reatores

reator M7

tempo (dias)	A	B	%
t ₀	0	0	0
3	3954	0,6	1,48
5	8483	1,02	1,62
7	13120	1,45	5,05
10	11419	1,29	4,87
12	9888	1,15	5,06
14	10182	1,18	4,9
17	10116	1,17	4,92
19	9006	1,07	5,1
21	10949	1,25	5,08
24	11031	1,26	5,55
26	14148	1,55	6,05
28	14672	1,6	6,52
31	15414	1,66	8,01
33	18890	1,99	9,85
35	27342	2,77	10,4
38	36273	3,59	17,35
40	47178	4,60	21,62
42	54776	5,31	28,17
45	79662	7,61	35,37
47	85658	8,16	39,68
53	124416	11,75	57,47
55	113493	10,74	57,99
56	124736	11,78	59,9
60	140907	13,28	64,67
62	106730	10,11	62,3
70	147364	13,87	67,72
74	138012	13,01	68,24
76	153750	14,46	68,35
78	146410	13,79	69,39
79	147037	13,84	70,89
83	143538	13,52	70,73
85	181798	17,06	69,77
87	155710	14,65	64,23
91	138786	13,08	67,85

A= área do metano obtida por cromatografia

B= número de moles de metano em $\mu\text{moles/L}$

C= % da área de metano, obtida no cromatograma

negrito - após a re-alimentação dos reatores

ANEXO 11

Lodo termofílico, segunda contagem do NMP

Fonte de Carbono: Glicose (10 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: H₂/CO₂ (80:20% v/v)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-7}	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: formiato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-5}	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10^{-7}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: metanol (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-2}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-3}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: acetato de sódio (20 mmoles/L)/sulfato de sódio (10 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-2}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-3}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: N_2/CO_2 (70:30% v/v)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-2}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-3}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

ANEXO 12

Lodo mesofílico, segunda contagem do NMP.

Fonte de Carbono: lactato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-5}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-9}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: N_2/CO_2 (70:30% v/v)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-2}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-3}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	+	+				-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: metanol (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

Fonte de Carbono: formiato de sódio (20 mmoles/L)

Diluições	Leituras dos frascos					Produção de metano, nos frascos				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
10^{-7}	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
10^{-8}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação; - ausência de turvação

ANEXO 13

Cromatogramas obtidos durante a contagem do NMP (não houve registro de metano) e ativação metanogênica do lodo.

metano - termofílico

* RUN # 2922 APR 18, 2000 10:17:26
START

- 4

STOP

0.359
1.058

Closing signal file M:SIGNAL .BNC
Storing processed peaks to M:009195B7.PKU
DIRECTORY FULL

RUN# 2922 APR 18, 2000 10:17:26

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC

AREAX

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREAX
.359	165201	PB	.027	72.92579
1.058	61332	PB	.087	27.07420

- N₂
- CO₂

TOTAL AREA= 226533
MUL FACTOR=1.00000E+00

* RUN # 392 SEP 29, 1999 16:00:05
START

B₁

STOP

0.359
0.500
0.659

RUN# 392 SEP 29, 1999 16:00:05

AREAX

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREAX
.359	60241	PB	.028	32.43933
.500	106015	PB	.042	50.77603
.659	35309	PB	.071	16.78464

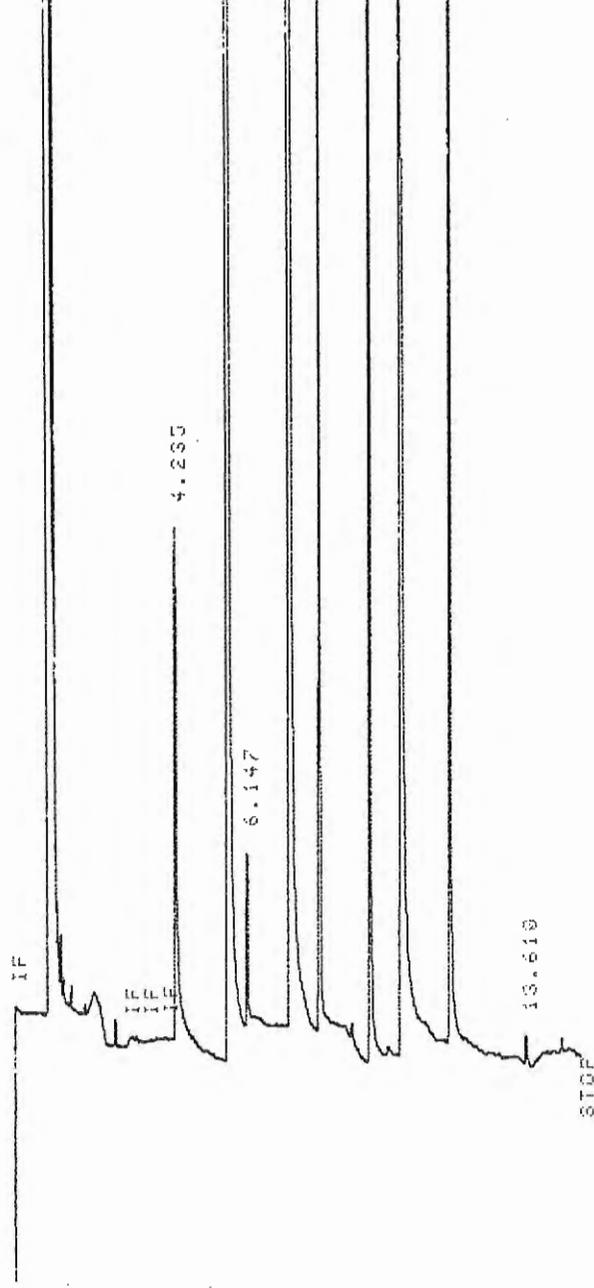
- N₂
- CH₄ (metano)
- CO₂

TOTAL AREA= 210365
MUL FACTOR=1.00000E+00

Cromatograma obtido nas determinações dos ácidos orgânicos voláteis

M5 - 13/10/01

* RUN # 3180 JAN 26, 2000 01:19:18
 START



5.618
 7.269
 8.078
 9.429
 10.289
 11.048

Closing signal file M:SIGNAL .BNC
 Storing processed peaks to M:00023MB17.PRO
 DIRECTORY FULL

RUN# 3180 JAN 26, 2000 01:19:18

SAMPLE NAME: LOT 110
 METHOD NAME: M:JANJAG.MET
 PERFIL 06/07/98 - --BETH BARALOI

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC
 PEAK FILE : M:00023MB17.PRO

Análise de Ácidos Voláteis

AREAK	RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREAK	
	4.255	22624	FB	.853	2.06531	- ácido acético
	5.618	584158	FB	.833	35.40875	- ácido propiónico
	6.147	5598	FB	.833	.51598	- ácido isobutírico
	7.269	406732	FB	.838	37.46946	- ácido butírico
	8.078	42096	FB	.838	3.88809	- ácido isovalérico
	9.429	44734	FB	.841	4.12324	- ácido valérico
	10.289	120867	FB	.853	11.86686	- ácido octanoico (padrão interno)
	11.048	57676	FB	.842	5.31613	- ácido caproico
	13.610	1239	BF	.843	.11420	

TOTAL AREA=1664924
 MUL FACTOR=1.0000E+00

ANEXO 14

Concentrações de TCE (ppb) encontradas no estudo de decaimento desse composto para os reatores de T₁ a T₅ (biótico) e T₈ e T₉ (abiótico) em função do tempo (dia) (ver Figura 39 na p. 122).

Tempo/dias	T1	T2	T3	T4	T5	T8	T9
0	4520	4268	4828			4677	4755
7				1849	2019		3533
14	1143	859	1463				
21				1158	1158	3399	
28	945	580	813				3315
34				1019	1005	3414	

Concentrações de TCE (ppb) encontradas no estudo de decaimento desse composto para os reatores de T₁₂ a T₅₂ (biótico) e T₈₂ (abiótico) em função do tempo (dia) (ver Figura 40 na p. 124).

tempo	T12	T22	T32	T42	T52	T82
0	4518	3802	4877	4024	3547	4719
2	3109	2957	3601			4477
14	878	913	769	867	522	4184
34	635	697	752	558	519	4179

ANEXO 15

Concentrações de TCE (ppb) encontradas no estudo de decaimento desse composto para os reatores de M₁ a M₅ (biótico) e M₈ e M₉ (abiótico) em função do tempo (dia) (ver Figura 55 na p. 139).

tempo/dia	M1	M2	M3	M4	M5	M8	M9
0	2013	2025	1926			2009	2035
7				1399	1499		1661
14	1039	891	700				
21				1066	1230	1608	
28	961	623	595				1550
34				664	862	1551	
42	652	577	544				
48				422	529		1547

ANEXO 16

Uma comparação entre as morfologias predominantes no lodo termófico, registradas ao final do primeiro ensaio do NMP, após ativação metanogênica do lodo e do segundo ensaio do NMP, após a degradação do TCE.

Substratos (mmoles/L ou 1 atm da mistura gasosa)	Morfologia predominante
Glicose (10)	<p>primeira contagem: bacilos retos fluorescentes: sarcinas, bacilos e cocos.</p> <p>segunda contagem: bacilos retos.</p> <p>comparação: diminuição da concentração de células no segundo ensaio</p>
H ₂ /CO ₂ (80:20% v/v)	<p>primeira contagem: bacilos hidrogenotróficos <i>Methanobacterium</i> sp</p> <p>segunda contagem: bacilos hidrogenotróficos <i>Methanobacterium</i> sp e bacilos filamentosos</p> <p>comparação: no segundo ensaio aumento de cocos e aparecimento de cistos</p>
Formiato de sódio (20)	<p>primeira contagem: bacilos hidrogenotróficos <i>Methanobacterium</i> sp</p> <p>segunda contagem: bacilos hidrogenotróficos <i>Methanobacterium</i> sp</p> <p>comparação: primeiro ensaio maior diversidade de bacilo</p>
Metanol (20)	<p>primeira contagem: sarcinas fluorescentes <i>Methanosarcina</i> sp e bacilos <i>Methanosaeta</i> SP</p> <p>segunda contagem: sarcinas fluorescentes <i>Methanosarcina</i> sp, sarcinas com fluorescência amarelada.</p> <p>comparação: no segundo ensaio aumento de cocos e aparecimento de cistos e uma redução significativa de células e na diversidade de bacilos.</p>
Acetato de sódio (20) e Sulfato de sódio (10)	<p>primeira contagem: sarcinas fluorescentes (<i>Methanosarcina</i> sp) BRS: <i>Desulfotomaculum</i> sp</p> <p>segunda contagem: sarcinas pequenas com fluorescência pálida, poucos cocos e bacilos muito pequenos.</p> <p>comparação: no segundo ensaio, foi registrado um empobrecimento da cultura.</p>
Controle – apenas N ₂ /CO ₂ (70:30% v/v)	<p>primeira contagem: bacilos longos, curvos, delgados, pequenos e em cadeia.</p> <p>segunda contagem: bacilos retos pequenos e muitos cistos.</p> <p>comparação: no segundo ensaio, foi registrado um empobrecimento da cultura.</p>

Comparação entre as morfologias predominantes no lodo mesófilo, registradas ao final do primeiro ensaio do NMP, após ativação metanogênica do lodo e do segundo ensaio do NMP, após a degradação do TCE.

Substratos (mmoles/L ou 1 atm da mistura gasosa)	Morfologia predominante
Lactato de sódio (20)	<p>primeira contagem: sarcinas, bacilos e cocos e brs: <i>desulfovibrio</i> sp</p> <p>segunda contagem: bacilos e sarcinas com fluorescência intensa</p> <p>comparação: no segundo ensaio aumento da diversidade</p>
Controle – apenas N ₂ /CO ₂ (70:30% v/v)	<p>primeira contagem: sarcinas, bacilos e cocos (pequenos)</p> <p>segunda contagem: bacilos agrupados e muitos cocos pequenos fluorescentes e móveis.</p> <p>comparação: no segundo ensaio houve o desaparecimento de sarcinas e baixa diversidade de bacilos.</p>
Metanol (20)	<p>primeira contagem: sarcinas fluorescentes <i>Methanosarcina</i> sp</p> <p>segunda contagem: sarcinas fluorescentes <i>Methanosarcina</i> sp e bacilos.</p> <p>comparação: na segunda contagem aumento da diversidade de bacilos, sarcinas com ótima fluorescência.</p>
Formiato de sódio (20)	<p>primeira contagem: bacilos hidrogenotróficos <i>Methanobacterium</i> sp, sarcinas e cocos</p> <p>segunda contagem: bacilos hidrogenotróficos <i>Methanobacterium</i> sp e cistos</p> <p>comparação: no segundo ensaio aumento de bacilos hidrogenotróficos <i>Methanobacterium</i> sp</p>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIERO, D.; VANELLI, T.; LOGAN, M.; HOOPER, A.B.** (1989). Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Comum.* **159**: 640-643.
- ARCANGELI, J. P. & ARVIN, E.** (1997) Modeling of the cometabolic biodegradation of trichloroethylene by toluene-oxidizing bacteria in a biofilm system. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 3044-3052.
- ATLAS, R.M. & BARTHA, R.** (1981). Determination of Microbial, Biomass and activities. In: *Microbial ecology - Fundamental and Applications*, p. 81-132.
- APHA-AWWA.** (1992) Standard Methods for the Examination of Water And Waste Water. eds. A. E. Greenberg, L. S. Clerceri and A. D. Eaton. 18^oed. Washington D.C., American Public Health Association. p: 9-49 – 9-51.
- 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*, **43**: 260-296.
- BELAY, N. & DANIELS. L.** (1987). Production of ethane, ethylene and acetylene from halogenated hydrocarbons by methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbio*, **53**: 1604-1610.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY** (1989) Archaeobacteria. 1^a ed. Eds. J. T. Stanley, M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holf, Baltimore, Williams & Wilkins, v.3. p. 2171-2214.
- BITTON, G.** (1994). Wastewater microbiology, ed. Willey-Liss, New York.
- BOUCQUEY, J.B.; RENARD, P.; AMERLYNCK, P.; MODESTO FILHO, S.N.; AGATHOS, H.; NAVEAU, H.; NYNS. E.J.** (1995). High-rate continuous biodegradation of concentration chlorinated aliphatics by a durable enrichment of methanogenic origin under carrier-dependent conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, **47**: 298-307.
- BRADLEY, P.M. & CHAPELLE, F.H.** (1999). Methane as a product of chloroethene biodegradation under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **33(4)**: 653-656.
- BRUSSEAU, G.A.; TSIEN, H.C.; HANSON, R.S.; WACKETT, L.P.** (1990). Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and the use of a colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity. *Biodegradation*, **1**: 19-29.

- CALLADO, N.H.** (1992). Estudo da toxicidade do sulfato em reator anaeróbio de manta de lodo (UASB). São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p. 153.
- CANHOS, V.P. & VAZOLLER, R.F.** (1999). In: **JOLY, C.A. & BICUDO, C.E.M.** *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX: 1: Microrganismos e vírus*. São Paulo, FAPESP, apresentação do volume.
- CARMO, D.F.** (2000). Avaliação da presença de clorofenóis no Reservatório de Salto Grande, situado na região de Americana, Estado de São Paulo. São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p. .
- COHEN, L.A. & McCARTY, PL.** (1991). Effects of Toxicity, Aeration, and Reductant Supply on Trichloroethylene Transformation by a Mixed Methanotrophic Culture. *Appl. Environ. Microbiol*, **57(1)**: 228-235.
- CORSON, W.H.** (1996) Manual global de ecologia: o que você pode fazer a respeito da crise do meio-ambiente. Trad. A.G. Camaru, Ed. Augustus, São Paulo, SP, p. 246-261.
- DAMIANOVIC, M.H.R.Z.** (1997). Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF).). São Carlos, SP, Tese de doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p. 174.
- DEBRUIN, W.P.; KOTTERMAN, M.J.J.; POSTHUMUS, M.A.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J.B.** (1992). Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethene. *Appl. Environ. Microbiol*, **58(6)**: 1996-2000.
- D_iSPIRITO, A.A.; GULLEDGE, J.; SHIEMKE, A.K.; MURRELL, J.C.; LINDSTROM, M.E.; KREMA, C.L.** (1992). Trichloroethylene oxidation by the membrane-associated methane monooxygenase in type I, type II and type X methanotrophs. *Biodegradation*, **2**: 151-164.
- D_iSTEFANO, T.D.; GOSSET, J.M.; ZINDER, S.H.** (1991) Redutive dechlorination of high concentration of tetrachloroethene by an anaerobic enrichment culture in the absence methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol* **57(8)**: 2287-2292.
- D_iSTEFANO, T.D.; GOSSET, J.M.; ZINDER, S.H.** (1992) Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed Culture. *Appl. Environ. Microbiol*, **58(11)**: 3622-3629.
- DOLFING, I.; GRIFFOEN, A.; van NEERVEN, A.R.W.; ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.** (1985). Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can. J. Microbiol.* , **31**:744-750.

- DODDEMA, H.J. & VOGELS, G.** (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 752-754.
- DREISBACH, R.H.** (1977). Handbook of poisoning. 9thed Lange Medical Publications. Los Altos California.
- DUBOURGUIER, H.C.** (1987). Curso de ecologia da digestão anaeróbia. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, São Paulo.
- EGLI, C.; SCHOLTZ, R.; COOK, A.M.; LEISINGER, T.** (1987). Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp and *Methanobacterium* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**: 257-261.
- EGLI, C.; TSCHAN, T.; SCHOLTZ, R. COOK, A. M.; LEISINGER, T.** (1988). Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2819-2824.
- ELLIS, D.E.; LUTZ, E.J.; ODOM, J.M.; BUCHANAN, R.J.; BARTLETT, C.L.; LEE, M.D.; HARKNESS, M.R.; DEWEERD, K.A.** (2000). Bioaugmentation for accelerated *in situ* anaerobic bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 2254-2260.
- EISENBEIS, M.; BAUER-KREISEL, P.; SCHOLZ-MURAMATSU, H.** (1997). Studies on the dechlorination of tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene by *Dehalospirillum Multivorans* in biofilms. *Water. Scien. Technol.*, **36(1)**: 191-198.
- ENSLEY, B.D. & KURISKO, P.R.** (1994). A gas lift bioreactor for removal of contaminants from the vapor phase. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 285-290.
- EMBLEY, T.M. & STACKEBRANDT, E.** (1996). *The use of 16S ribosomal RNA sequences in microbial ecology.* (capítulo 3) MOLECULAR approaches to Environmental Microbiology. Eds. R.W. Pickup & J.R. Saunders. Ellis Horwood Limited. 262p.
- ENVIRONMENTAL HEALTH CENTER.** (1997). Environmental Writer. Trichloroethylene (C₂HCl₃) chemical backgrounder. <http://www.nsc.org/ehc/ew/chems/trichlor.htm>.
- FATHEPURE, B.Z.; NENGU, J.P.; BOYD, S.A.** (1987). Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2976-2980.

- FATHEPURE, B.Z. & BOYD, S.A.** (1988a). Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**: 149-156.
- FATHEPURE, B.Z. & BOYD, S.A.** (1988b). Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp strain DCM. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2976-2980.
- FATHEPURE, B.Z. & VOGUEL, T.M.** (1991). Complete Degradation of Polychlorinated Hydrocarbons by a Two-Stage Biofilm Reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57(12)**: 3418-3422.
- FERGUSON, J.F. & PIETARI, J.M.H.** (2000). Anaerobic transformations and bioremediation of chlorinated solvents. *Environ. Pollution*, **107**: 209-215.
- FITCH, M.W.; SPEITEL JR., G.E.; GEORGIU, G.** (1996). Degradation of trichloroethylene by methanol-grown cultures of *Methylosinus trichosporium* OB3b PP358. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62(3)**: 1124-1128.
- FLIERMANS, C.B.; PHELPS, T.J.; RINGELBERG, D.; MIKELL, A.T.; WHITE, D.C.** (1988). Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic enrichments culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54(7)**: 1709-1714.
- FLORENCIO, L.** (1994). The fate of methanol in anaerobic bioreactors. PhD Thesis University of Wageningen, The Netherlands. p.137.
- FOGEL, M.M.; TADDEO, A.R.; FOGEL, S.** (1986). Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:720-724.
- FOGEL, S.; LEWIS, R.; GROHER, D.; FINDLAY, M.** (1995). PCE treatment in saturated soil columns: methanogens in sequence with methanotrophs. In: *BIOREMEDIATION of chlorinated solvents*. p.153-160.
- FOLSOM, B.R.; CHAPMAN, P.J.; PRITCHARD, P.H.** (1990). Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56(5)**: 1279-1285.
- FOX, B.G.; BORNEMAN, J.G.; WACKETT, L.P.; LIPSCOMB, J.D.** (1990). Haloalkane oxidation by the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: mechanistic and environmental implications. *Biochemistry*, **29**: 6419-6427.
- FREEDMAN, D.L. & GOSSET, J.M.** (1989). Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* **55(9)**: 2144-2151.

- FREITAS, E.A.C.** (1989). Bactérias do sedimento da Lagoa do Infernã (Luiz Antonio-SP): distribuição temporal e composição por grupos produtores de exoenzimas. São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Departamento de Ciências Biológicas da UFSCar, p. 100.
- GAO, J.; SKENN, R.S.; HOOKER, B.S.** (1995). Effect of temperature on perchloroethylene dechlorination by a methanogenic consortium. *In: BIOREMEDIATION of chlorinated solvents*. p.53-59.
- GODINHO, M.J.L.** (1976). Ciclo sazonal, "standing-stock" e distribuição do bacterioplâncton em ecossistemas lacustres artificiais (Represa do Lobo, São Carlos). São Paulo Dissertação de Mestrado do Instituto de Biociênciada USP, p. 77.
- GREEN, J. & DALTON, H.** (1989). Substrate specificity of soluble methane monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **264**: 17698-17703.
- HARKNESS, M.R.; BRACCO, A.A.; BRENNAN, JR., M.J.; DEWEERD, K.A.; SPIVACK, J.L.** (1999). Use of bioaugmentation to stimulate complete reductive dechlorination of trichloroethylene in Dove soil columns. *Environ. Sci. Technol.*, **33**: 1100-1109.
- HÖRBER, C.; CHRISTIANSEN, N.; ARVIN, E.; AHRING, B.K.** (1998). Improved dechlorinating performance of Upflow Anerobic Sludge Blanket Reactors by incorporation of *Dehalospirillum Multivorans* into granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol*, **64**(5): 1860-1863.
- HENRY, S. M. & GRBIC-GALIC, D.** (1991). Influence of endogenous and exogenous electron donors and trichloroethylene oxidation toxicity on trichloroethylene oxidation by methanotrophic cultures from a groundwater aquifer. *Appl. Environ. Microbiol*, **57**(1): 236-244.
- HOLLIGER, C.; SCHRAA, G.; STAMS, A.J.M.; ZEHNDER, A.J.B.** (1990). A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl. Environ. Microbiol*, **59**: 2991-2997.
- HOLLIGER, C. & SCHUMACHER, W.** (1994). Reductive dechlorination as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek*, **66**: 239-246.
- HOPKINS, G.D.; MUNAKATA, J.; SEMPRINI, L.; McCARTY, P.L.** (1993). Trichloroethylene concentration effects on pilot field-scale *in-situ* groundwater bioremediation by phenol-oxidizing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.*, **27**: 2542-2547.
- HOUWEN, F.P.** (1990). Physiology of syntrophic propionate oxidizing bacteria. PhD Thesis University of Wageningen, The Netherlands, p.135.

- ISALOU, M.; SLEEP, B.E.; LISS, S.N.** (1998). Biodegradation of high concentrations of tetrachloroethene in a continuous flow column system. *Environ. Sci. Technol.*, **32**: 3579-3585.
- JAAHNG, D. & WOOD, T.K.** (1994). Trichloroethylene and chloroform degradation by a recombinant pseudomonad expressing soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60(7)**: 2473-2482.
- KAO, C.M. & LEI, S.E.** (2000). Using a peat biobarrier to remediate PCE/TCE contaminated aquifers. *Water. Scien. Technol.*, **34(3)**: 835-845.
- KÄSTNER, M.** (1991). Reductive dechlorination of tri- and tetrachloroethylene depends on transition from aerobic to anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57(7)**: 2039-2046.
- KOH, S.C.; BOWMAN, J.P.; SAYLER, G.S.** (1993). Soluble methane monooxygenase production and trichloroethylene degradation by a type I methanotroph, *Methylomonas methanica* 68-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59(4)**: 960-967.
- KRUMME, M.L.; TIMMIS, K.N.; DWYER, D.F.** (1993). Degradation trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4 5223 PR1 in aquifer microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59(8)**: 2746-2749.
- LANDA, A.S.; SIPKEMA, E.M.; WEIJMA, J.; BEENACKERS, A.A.C.M.; DOLFING, J.; JASSEN, D.B.** (1994). Cometabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 in a chemostat with toluene as the primary substrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60(2)**: 3368-3374.
- LARIZZATTI, S. F.** (1997). Avaliação da degradação anaeróbia de pentaclorofenol pôr consórcios metanogênicos enriquecidos. São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p. 136.
- LEAHY, J.G.; BYRNE, A.M.; OLSEN, R.H.** (1996). Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62(3)**: 825-833.
- LITTLE, C.D.; PALUMBO, A.V.; HERBES, S.E.; LIDSTROM, M.E.; TYNDALL, R.L.; GILMER, P.J.** (1988). Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54(4)**: 951-956.
- LONTOH, S. & SEMRAU, J.D.** (1998). Methane and trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64(3)**: 1106-1114.

- LORAH, M.M. & OLSEN, L.D. (1999). Degradation of 1,1,2,2-tetrachloroethane in a freshwater tidal wetland: field and laboratory evidence. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 227-234.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (1997). Brock biology of microorganisms. 8th ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- MAGNUSON, J.K.; STERN, R.V.; GOSSET, J.; ZINDER, S.; BURRIS, D. (1998). Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(4)**: 1270-1275.
- MALACHOWSKY, K.J.; PHELPS, J.T.; TEBOLI, A.B.; MINNIKIN, D.E.; WHITE, D.C. (1994). Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by rhodococcus species. *Appl. Environ. Microbiol.* **60(2)**: 542-548.
- MARINS, M.A. (1975). Ecologia de alga *Melosira italica* (Ehr.) Kutz: Represa do Lobo, Estado de São Paulo- Brasil. Tese de Doutorado. USP *apud* CALIJURI, M.C. (1985). Curvas de luz-fotossíntese e fatores ecológicos em ecossistemas artificiais e não estratificado – Represa do Broa (Lobo). São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Departamento de Ciências Biológicas da UFSCar, p. 280.
- MARS, A.E.; HOUWING, J.; DOLFING, J.; JANSSEN, D.B. (1996). Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(3)**: 886-891.
- MARS, A.E.; PRINS, G.T.; WIETZES, P.; DE KONING, W.; JANSSEN, D.B. (1998). Effect of trichloroethylene on the competitive behavior of toluene-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(1)**: 208-215.
- MAYMÓ-GATELL, X.; CHIEN Y.T.; GOSSET J.; ZINDER, S. (1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*, **276**: 1568-1571.
- MAYMÓ-GATELL, X.; ANGUISH, T.; ZINDER, S. (1999). Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(7)**: 3108-3131.
- McCARTY, P.L.; GOLTZ, M.N.; HOPKINS, G.D.; DOLAN, M.E.; ALLAN, J.P.; KAWAKAMI, B.T.; CARROTHERS, T.J. (1998). Full-scale evaluation of *in-situ* cometabolic degradation of trichloroethylene in groundwater through toluene injection. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 88-100.

- McCLAY, K.; STREGER, S.H.; STEFFAN, R.J.** (1995). Introduction of toluene oxidation activity in *Pseudomonas mendocina* KR1 and *Pseudomonas* sp strain ENVPC5 by chlorinated solvents and alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(9)**: 3479-3481.
- McCULLOCH, A. & MIDGLEY, P.M.** (1996). The production and global distribution of emissions of trichloroethene, tetrachloroethene and dichloroethene over the period 1988-1992. *Atmospheric Environ.* **30(4)**: 601-608.
- MESSINA, R.E.** (1998). Elaboração e implantação de um modelo de recomposição ciliar às margens da Represa do Lobo, Itirapina. Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p. 151..
- MONTENEGRO, M.A.P.** (1999) Estudo da Dinâmica de Populações de Microrganismos Envolvidos na Degradação de PCP em Reator Anaeróbio Híbrido. Exame de Qualificação. Departamento de Hidráulica e Saneamento. EESC-USP.
- NAVARRETE, M.; RODRIGUEZ, N.; AMILS, R.; SANZ, J.L.** (1999). Effect of 1,1,2,2-tetrachloroethane on the performance of upflow an anaerobic sludge bed (UASB) reactors. *Water. Scien. Technol.*, **40(8)**: 153-159.
- NELSON, M.J.K.; MONTGOMERY, S.O.; O'NEILL, E.J.; PRITCHARD, P.H.** (1986) Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **52(2)**: 383-384.
- NELSON, M.J.K.; MONTGOMERY, S.O.; MAHAFFEY, W.R.; PRITCHARD, P.H.** (1987). Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **53(5)**: 949-954.
- NELSON, M.J.K.; MONTGOMERY, S.O.; PRITCHARD, P.H.** (1988). Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **54(2)**: 604-606.
- NOGUEIRA, R.F.P. & JARDIM, W.F.A.** (1998). Fotocatálise Heterogênea e sua Aplicação Ambiental. *Química Nova*, **21(1)**: 69-72
- ODUM, E.P.** (1988). Ecologia, Trad. C.J. Tribe, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
- OLIVEIRA, S.S.** (1998). Avaliação do potencial de um lodo anaeróbio termofílico na biodegradação do composts pentaclorofenol (PCP). São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p. 138.

- OREMLAND, R.S.** (1988). Biogeochemistry of methanogenic bacteria. *In: ZENDHER, A.J.B.* Biology of anaerobic microorganisms. New York, USA, John Wiley & Sons. Cap. 10, p. 469-585.
- OREN, A.,** (1991) Anaerobic Degradation of Organic Compounds in Hypersaline: Possibilities and Limitations, *In: D. L. Wise* , Bioprocessing and Biotreatment of Coal, Marcell Dekker, New York, , p.155-173.
- PAVLOSTATHIS, S.G. & ZHUANG, P.** (1991). Transformation of trichloroethylene by sulfate-reducing cultures enriched from a contaminated subsurface soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 416-420.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.** (1993) Microbiology- Concepts and applications, McGraw-Hill, New York.
- PEREIRA, E.C.** (1993). Aplicações da cromatografia gasosa de alta resolução em estudos preliminares sobre a degradação de poluentes orgânicos clorados por microrganismos anaeróbios de sedimentos lacustres brasileiros. Dissertação de Mestrado do Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Física e Química de São Carlos -USP, p. 145.
- PERRIN, D.D; ARMAREGO, W.L.T.; PERRIN, D.R.** (1980). Purification of Laboratory Chemicals. 2^a ed. Pergamon Press Ltda, A. Wheaton & Co. Ltda, livro 2. P. 557-559.
- PHELPS, T.J.; NIEDZIELSKI, J.J.; SCHARAM, S.M.; HERBES, S.E.; WHITE, D.C.** (1990). Biodegradation of trichloroethylene in continuous-recycle expanded-bed bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **56(6)**: 1702-1709.
- PHELPS, J.T.; MALACHOWSKY, K.J.; SCHRAM, R.M.; WHITE, D.C.** (1991). Aerobic mineralization of vinyl chloride by a bacterium of the order *Actinomycetales*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1252-1254.
- PRAKASH, S.M. & GUPTA, S.K.** (2000) Biodegradation of tetrachloroethylene in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology.* **72**: 47-54.
- ROSNER, B.M.; McCARTY, P.L.; SPORMANN, A.M.** (1997) *In vitro* studies on reductive vinyl chloride dehalogenation by anaerobic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(11)**: 4139-4144.
- SAKAMOTO, I.K.** (1996). Comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo anaeróbio granuloso metanogênico, submetido a adições crescentes de sulfato. São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p. 150.

- SCHOLZ-MURAMATSU, H.; SZEWZYK, R.; SZEWZYK, U.; GAISER, S.** (1990). Tetrachloroethylenes as electron acceptor for the anaerobic degradation of benzoate. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 81-86.
- SELEGHIM, M.H.R.** (1992). Flutuações nas comunidades planctônicas e bentônicas de um ecossistema artificial raso (Represa do Monjolinho-São Carlos-SP) com ênfase nas populações de protozoários e bactérias. São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Departamento de Ciências Biológicas da UFSCar, p. 78.
- SHIELDS, M.S. & REAGIN, M.J.** (1992). Selection of a *Pseudomonas cepacia* strain constitutive for the degradation of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58(12)**:3977-2983.
- SILVERIO, P.F.** (1999) Partição, biodisponibilidade e toxicidade de metais pesados a organismos bentônicos em sedimentos. São Carlos, SP, Dissertação de Mestrado do Departamento de Química da UFSCar, p. 78.
- SKEEN, R.S.; GAO, J.; HOOKER, B.S.** (1995) Kinetics of Chlorinated Ethylene Dehalogenation under Methanogenic Conditions. *Biotechnology and Bioengineering.*, **48**: 659-666.
- SMITH, K.S.; COSTELLO, A.A.; LIDSTROM, M.E.** (1997). Methane and trichloroethylene oxidation by a estuarine methanotroph, *Methylobacter* sp linhagem BB5.1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4617-4620.
- STRANDBERG, G.W.; DONALDSON, T.; FARR, L.L.** (1989). Degradation of trichloroethylene and trans-1,2-dichloroethylene by a methanotrophic consortium in a fixed-film, packed-bed bioreactor. *Environ. Sci. Technol.*, **23**: 1422-1425.
- TRAVIS, B.J. & ROSENBERG, N.D.** (1997) Modeling *in situ* bioremediation of TCE at Savannah River: effects of product toxicity and microbial interactions on TCE degradation. *Environ. Sci. Technol.*, **31**: 3093-3102.
- TOUZEL, J.P. & ALBAGNAC, G.** (1983). Isolation and caractezation of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*, **16**: 241-245 apud **VAZOLLER, R. F.** (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, SP, Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p.259.
- TOUZEL, J.P.; PETROFF, D.; MAESTROJUAN, G.M.; MACARIO, E.C.; LETTIGAN, G.** (1988). Isolation and characterization of thermophilic *Methanobacterium* able to use formate, the stain FTF. *Archives of microbiology*, **149**: 291-296.

- TSIEN, H.C.; BRUSSEAU, G.A.; HANSON, R.S.; WACKETT, L.P.** (1989). Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol*, **55(12)**: 3155-3161.
- UCMP PHYLOGENY WING: THE PHYLOGENY OF LIFE.** (1999). The biosphere: Life on Earth. <http://www.ucmp.berkeley.edu>.
- VANDENBERGH, P.A. & KUNKA, B.S.** (1988). Metabolism of volatile chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol*, **54**: 2578-2579.
- VAN DER MEER, J.R.; DE VOS, W.N.; HARAYAMA, S.; ZEHNDER, A.J.B.** (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological Review*. **56**: 677-694.
- VAN DER MEER, J.R.; LEVEAU, J.; WERLEN, C.** (1994). Genetic adaptation of microorganisms to environmental pollutants. *EAWAG news*. **35**: 8-15.
- VANELLI, T., M. LOGAN, D. M. ACIERO, AND A. B. HOOPER.** (1989). Degradation of Halogenated Aliphatic Compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56(4)**: 1169-1171.
- VAZOLLER, R.F.** (1995a). Microbiologia e Saneamento Ambiental-Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável. In: PADCT-FTPT "André Tosello": Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas". www.bdt.org.br/bdt/paper/padctbio
- VAZOLLER, R.F.** (1995b). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, SP, Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p.259.
- VOGEL, T.M. & McCARTY, P.L.** (1985). Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol*, **49(5)**: 1080-1083
- VOGELS, G.D.; KELTJENS, J.T.; VAN DER DRIFT, G.** (1988). Biochemistry of methane production. In: **ZENDHER, A.J.B.** Biology of anaerobic microorganisms. New York, USA, John Wiley & Sons. Cap. 13, p. 707-770.
- WACKETT, L.P. & HOUSEHOLDER, S.R.** (1989). Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase *Appl. Environ. Microbiol*, **55**: 2723-2725.
- WACKETT, L.P.; BRUSSEAU, G.A.; HOUSEHOLDER, S.R.; HANSON, R.S.** (1989). Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, **55(11)**: 2960-964

- WIEGANT, W.N.** (1986). Thermophilic anerobic digestions for wastewater treatment PhD Thesis University of Wageningen, The Netherlands, p.153. apud **VAZOLLER, R. F.** (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, SP, Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p.259.
- WIDDEL, F.** (1988). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *In: ZENDHER, A.J.B.* Biology of anaerobic microorganisms. New York, USA, John Wiley & Sons. Cap. 10, p. 469-585.
- WILSON, J.T. & WILSON, B.H.** (1985) Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl Environ Microbiol.*, **49(1)**: 242-243.
- WILSON, B.H.; SMITH, G.B.; REES, J.F.** (1986). Biotransformations of Selected Alkylbenzenes and Halogenated Aliphatic Hydrocarbons in Methanogenic Aquifer Material: A Microcosm Study. *Environ. Sci. Technol.* **20(10)**: 997-1002
- WINTER, R.B.** (1990). Thermophilic anaerobic degradation of carbohydrates – metabolic properties of microorganisms from different phases. *FEMS Microbiological Reviews*, **75**: 139-154 apud **VAZOLLER, R. F.** (1995). Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos, SP, Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, p.259.
- WU, W.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, G.** (1993). Performance of anaerobic granules degradation of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 389-397.
- YANG, Y. & McCARTY, P.L.** (1998). Competition for Hydrogen within a Chlorinated Solvent Dehalogenating Anaerobic Mixed Culture. *Environ. Sci. Technol.* **32(22)**: 3591-3597
- YAGER, R.M.; BILOTTA, S.E.; MANN, C.L.; MADSEN, E.L.** (1997). Metabolic adaptation and *in situ* attenuation of chlorinated ethenes by naturally occurring microorganisms in a fractured dolomite aquifer near Niagara Falls, New York. *Environ. Sci. Technol.*, **31**: 3138-3147.
- YEE, D.C.; MAYNARD, J.A.; WOOD, T.K.** (1998). Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene *ortho*-monooxygenase constitutively. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64(1)**: 112-118.
- ZEHNDER, A.J.B. & STUMM.** (1988). Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. *In: ZENDHER, A.J.B.* Biology of anaerobic microorganisms. New York, USA, John Wiley & Sons. Cap. 1, p. 1-38.

- ZINDER, S.H. & KOCH, M.** (1984). No-acetoclastic methanogenesis from acetate: oxidation by a thermophilic coculture. *Archives. Microbiology*, **138**: 263-272.
- ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M.** (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotherix* sp. as na important acetoclastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol*, **47**:796-807.
- ZINDER, S.H.** (1991). Curso Digestão Anaeróbia Termofílica. Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP
- ZINDER, S.H.; DiSTEFANO, T.D.; GOSSET, J.M.; JUANG,Y.L.; VAZOLLER, R.F.; ANGUISH, T.** (1991). Preliminary microbiological characterization of an anaerobic enrichment culture wich converts tetrachloroethylene to ethylene. MAS Meeting, America Society Microbiology – Dalas, USA.
- ZYLSTRA, G.J.; WACKETT, L.P; GIBSON, D.T.** (1989). Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli*.containing the cloned *Pseudomonas putida* F1 toluene dioxygenase genes. *Appl. Environ. Microbiol* **55**: 3162-3166.