

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Karina Rojas

Estudo da diversidade microbiana no
tratamento de efluentes gordurosos em reator
anaeróbio compartimentado

Poços de Caldas/MG

2016

Karina Rojas

Estudo da diversidade microbiana no
tratamento de efluentes gordurosos em reator
anaeróbio compartimentado

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do título de
Mestre em Ciência e
Engenharia Ambiental pela
Universidade Federal de
Alfenas. Área de
concentração: Tratamento de
águas residuais.
Orientador: Prof. Dr.
Gunther Brucha
Coorientadora: Profa. Dra.
Giovana Tommaso

Poços de Caldas/MG

2016

R741e Rojas, Karina.

Estudo da diversidade microbiana no tratamento de efluentes gordurosos em reator anaeróbio compartimentado / Karina Rojas. – Poços de Caldas, 2016.

82 f. –

Orientador: Gunther Brucha.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2016.

Bibliografia.

1. Águas residuais. 2. Digestão anaeróbia. 3. Ácidos graxos. I. Brucha, Gunther. II. Título.

CDD: 628

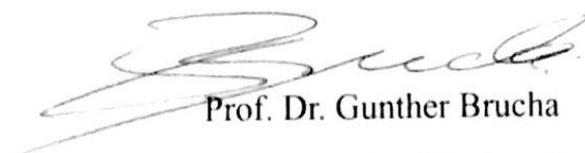
KARINA BIASETTO ROJAS

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA NO TRATAMENTO DE
EFLUENTES GORDUROSOS EM REATOR ANAERÓBIO
COMPARTIMENTADO**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia Ambiental.

Aprovada em: 11 de janeiro de 2016.



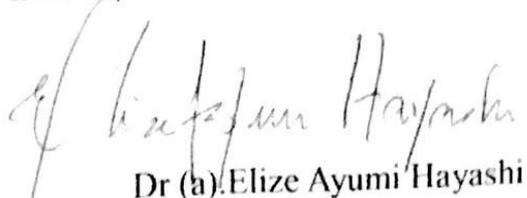
Prof. Dr. Gunther Brucha

Instituição: Instituto de Ciência e Tecnologia



Prof (a) Dr (a). Renata Piacentini Rodriguez

Instituição: Instituto de Ciência e Tecnologia



Dr (a). Elize Ayumi Hayashi

Instituição: Instituto de Ciência e Tecnologia

Dedico ao Divino
Criador, à Madre
Terra e aos meus
pais João Felix e
Solange Maria com
todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Divino Criador, sem seu amor e sua luz nada existiria e eu nada seria. Ao Universo que conspira a nosso favor e é fonte inesgotável de coragem, força, sabedoria e amor, de onde tudo vem e pra onde tudo vai.

Aos meus pais, espelhos de minha vida, meus sinceros agradecimentos, sem o apoio e a compreensão de vocês eu jamais teria forças para chegar até aqui. Aos meus irmãos, Marília e Diogo, e cunhados, Juliana e Rodrigo, sou grata sempre pelo companheirismo e incentivo.

Gratidão a todos os colegas de turma do mestrado, pela convivência em sala, pelas conversas, pelos desesperos compartilhados, trabalhos entregues. Em especial à Elis Watanabe, sou muito grata pela companhia diária no laboratório, risadas, e muito trabalho.

À querida Elize Hayashi, pós-doutoranda e colega de laboratório, que sempre com muita paciência e compreensão me ensinou e me deixou apta a usar qualquer equipamento do laboratório.

Sou grata ao meu orientador Gunther Brucha, bem como minha co-orientadora Giovana Tommaso por confiarem esse trabalho a mim e por todos ensinamentos durante esse período.

Agradeço também todos os professores envolvidos no PPGCEA, pelas aulas maravilhosas vivenciadas no programa. Em especial à nossa coordenadora Renata Rodriguez por toda dedicação e por sempre estar à disposição para nos salvar.

Aos técnicos do laboratório da UNIFAL-MG, campus Poços de Caldas, sempre dispostos a contribuir para elaboração da pesquisa. À técnica Tati, do laboratório de Biotecnologia Ambiental da FZEA-USP por me dar suporte nos ensaios realizados em Pirassununga-SP.

Aos familiares, Biasetto e Rojas, que sempre me incentivaram na pesquisa, sempre preocupados com a realização do trabalho.

Aos amigos Poços Caldenses que me acolheram e fizeram dos meus dias mais estressantes os mais deliciosos. E aos amigos de todos os cantos desse Brasil que a vida acadêmica me proporcionou encontrar no caminho.

Agradeço à família Ometto por fazer parte da minha vida, e estar sempre disposta a me ajudar, em especial ao Artur que me apoiou e me deu suporte para fechar mais um ciclo.

A todos os professores que tive nessa vida, que fizeram parte da minha formação intelectual, minha eterna gratidão.

Gratidão também aos que de alguma forma estiveram no meu caminho e me ajudaram a chegar até aqui. Afinal SOMOS TODOS UM! Minha gratidão eterna.

RESUMO

Um reator anaeróbio compartimentado, com cinco compartimentos, alimentado com efluente sintético simulando água residuária de laticínios, com eficiência de aproximadamente 90% de remoção de matéria orgânica, foi utilizado no presente estudo para acompanhar mudanças na comunidade microbiana, sua adaptação e produção metanogênica na mineralização de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). O reator foi operado por 270 dias com três fases distintas e essas com diferentes temperaturas (25°C e 37°C) e TDHs (72h e 24h). Três diferentes amostras foram retiradas, uma no 50º dia com TDH de 72 horas a 25°C, uma segunda no 150º dia ainda com TDH de 72 horas agora com temperatura controlada por termostato de 37°C e uma no 270º dia com TDH de 24 horas a 37°C. Ao final da operação do reator amostras dos dois primeiros compartimentos foram retiradas a fim de calcular suas atividades metanogênicas específica (AME). Abordagem do gene RNAr 16S foi realizada pelas técnicas PCR-DGGE, com primers específicos para os Domínios *Archaea* e *Bacteria* o que possibilitou o acompanhamento da diversidade microbiana encontrada ao longo dos compartimentos nas diferentes fases e relacioná-la com a medida de atividade metanogênica específica (AME). A comunidade microbiana presente no ABR alimentado com concentrações crescentes de matéria orgânica sofreu modificações importantes, sendo as mais verificadas no Domínio *Bacteria*. Análises de AME evidenciaram que o lodo advindo do primeiro compartimento do reator, a despeito de ter sido exposto à maior carga de AGCL, teve sua capacidade de produção de metanogênica acetoclástica aumentada. O estudo permitiu constatar a capacidade de adaptação do lodo às diferentes condições operacionais, e ainda permitiu inferir que tais modificações foram importantes na elevada taxa de remoção de matéria orgânica observada no sistema.

Palavras-chave: Reator anaeróbio compartimentado. PCR-DGGE. AME.

ABSTRACT

An Anaerobic Baffled reactor, with five chambers, with high organic matter removal efficiencies (around 90%), fed with synthetic substrate simulating dairy wastewaters, was used in the present study in order to follow the microbial community changes along its operational period. The modifications were followed in order to access the sludge capability of mineralization of long chain fat acids (LCFA). The reactor was operated for 270 days during which, was subjected to rising organic loading rates, due to hydraulic detention time diminution (from 24 to 72 hours). Three different samples were dropped, one on the 50th day, with HDT of 72 hours over 25°C, a second sample in the 150th day with HDT of 72 hours but now with temperature controlled with thermostate at 37°C and the last sample in day 27 with HDT of 24 hours at 37°C. Three periods were elected for sludge collection, when the samples were subjected to PCR/DGGE with specific primers for *Archaea* and *Bacteria* Domains, allowing the microbial community diversity access. The study was complemented with specific methanogenic activity assays, conducted in the inoculum samples and in the samples from the reactor after 270 days of operation. The microbial community presented important modifications along the reactor operation, being the more evident, the presented by de Bacteria Domain. The sludge from the first chamber, despite have been subjected to the higher LCFA loadings, showed the higher SMA values. The study allowed the verification of the adaptation capability of the anaerobic sludge, inferring that the observed modifications were important maintain the high organic matter efficiencies observed in the system.

Keywords: Anaerobic Baffled Reactor. PCR-DGGE. SMA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mecanismos de acumulação de ácidos graxos de cadeia longa na biomassa anaeróbia24
- Figura 2** – Foto reator compartimentado no Laboratório de Engenharia de Alimentos FZEA-USP27
- Figura 3** – Mecanismos da β -oxidação de ácidos graxos, com formação de fragmentos com $2 + n$ carbonos e acetyl-CoA28
- Figura 4** – Desenho ilustrativo da corrida eletroforética com gradiente em gel acrilamida34
- Figura 5** – Fluxograma representativo das análises laboratoriais realizadas para o trabalho38
- Figura 6** – Figura esquemática do reator compartimentado (ABR)40
- Figura 7** – Curva de calibração do transdutor de pressão. Volume relativo (mL) versus Pressão (psi)48
- Figura 8** – Imagem negativa da eletroforese dos produtos da extração de DNA, em gel agarose 1,5%. Corados com brometo de etídio ($150\mu/200\text{ml}$)50
- Figura 9** – Imagem do gel de agarose 1,5% contendo fragmentos de DNA Ribossomal 16S amplificados com os primers 968f-GC e 1401r do Domínio *Bateria*52
- Figura 10** – Imagem negativa do gel de agarose 1,5% contendo fragmentos de DNA Ribossomal 16S amplificados com os primers ARC1100f-GC e ARC1400r do Domínio *Archaea*53
- Figura 11** – Imagem negativa de gel de DGGE em gradiente desnaturante de 40-60%, corado com SybrGold, com fragmentos de DNAr 16S com os primers 968f-GCe 1401r das bandas do Domínio *Bacteria*.....54
- Figura 12** – Quadro de apresentação da matriz de presença e ausência de bandas obtidas após a corrida DGGE para o domínio *Bacteria*55
- Figura 13** – Recorte da imagem do gel DGGE com gradiente 40-60%, contendo fragmentos do DNA ribossomal 16S, amplificados com os

primers específicos 968f e 1401r de bandas de <i>Bacteria</i>	57
Figura 14 – Dendrograma de similaridade obtido através do programa <i>Bionumerics</i> ®, Versão 7.1 Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, para o gel DGGE no Domínio <i>Bacteria</i>	60
Figura 15 – Imagem negativa de gel de DGGE em gradiente desnaturante de 50-65%, corado com SybrGold, com fragmentos de DNAr 16S com os primers Arc 1100f e Arc 1400r	63
Figura 16 – Quadro de apresentação da matriz de presença e ausência de bandas obtidas após a corrida DGGE para o domínio <i>Archaea</i>	64
Figura 17 – Imagem de gel de DGGE em gradiente desnaturante de 50-65%, corado com SybrGold, com fragmentos de DNAr 16S com os primers Arc1100f e Arc1400r	66
Figura 18 – Dendrograma de similaridade obtido através do programa <i>Bionumerics</i> ®, Versão 7.1 Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, para o gel DGGE no Domínio <i>Archaea</i>	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	EFLUENTES DE UMA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS: CARACTERÍSTICAS E TRATAMENTO	17
3.2	PROCESSOS ANAERÓBIOS	18
3.2.1	Problemática dos ácidos graxos de cadeia longa na degradação de lipídios.....	20
3.3	ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA (AME)	28
4	METODOLOGIA	35
4.1	FLUXOGRAMA ESPERIMENTAL	35
4.2	REATOR ANAERÓBIO COMPARTIMENTADO (ABR).....	36
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS.....	38
4.4	ACOMPANHAMENTO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS.....	39
4.4.1	Extração de DNA.....	40
4.4.2	Amplificação do gene do RNA ribossômico 16S obtido pela técnica de Reação em cadeia Polimerase.....	40
4.4.3	Estudo do consórcio microbiano obtido pela técnica de DGGE.....	43
4.4.3	Análise dos perfis nos géis de DGGE	43
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA.....	44
4.5.1	Quantificação de metano por cromatografia gasosa.....	45
4.5.2	Cálculo da atividade metanogênica específica	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1	EXTRAÇÃO DO DNA RIBOSSÔMICO 16S.....	48
5.2	AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO RNAr 16S	49
5.2.1	Acompanhamento da diversidade microbiana pertencentes ao Domínio <i>Bacteria</i> , durante a operação do reator.....	51
5.1.1.1	Estudo do agrupamento e similaridade para o Domínio <i>Bacteria</i>	57
5.1.1.2	Estudo do agrupamento e similaridade para o Domínio <i>Archaea</i>	65
5.2	ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA (AME)	67
5.2.1	Ensaios com formiato e acetato.....	67
	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potencial de produção de biogás nos diferentes substratos.....	30
Tabela 2 - Sequência do grampo GC acoplada a extremidade 5' dos primers 968f e 1100f.....	33
Tabela 3 - Composição do efluente sintético	39
Tabela 4 - Condições das amostras nas condições 1 e 2. Cx corresponde aos compartimentos, onde x representa o número do compartimento; (n.d.) não detectado.....	41
Tabela 5 - Apresentação dos primers utilizados na amplificação.. ..	43
Tabela 6 - Volume final dos reagentes para obtenção do mix para execução da PCR aos Domínios Bacteria e Archaea.....	44
Tabela 7 - Condições de operação e performance do reator	56
Tabela 8 - Condições operacionais e desempenho do reator	58
Tabela 9 - Atividade metanogênica específica	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABR	– <i>Anaerobic Baffled Reactor</i>
AGCL	– Ácidos graxos de cadeia longa
AME	– Atividade Metanogênica Específica
ATP	– Adenosina trifosfato
DQO	– Demanda Química de Oxigênio
DGGE	– Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
FISH	– <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
PCR	– Reação em cadeia polimerase
PME	– produção metanogênica específica
PROSAB	– Programas de pesquisas em Saneamento Básico
RNAr 16S	– RNA ribossomal 16S
SV	– Sólidos voláteis
STV	– Sólidos Totais Voláteis
TDH	– Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	– <i>Upflow anaerobic sludge blanked</i>

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos, no Brasil, representa uma tradicional estrutura produtiva, desempenhando um importante papel na economia do país. O setor de laticínios está entre os quatro principais setores da indústria alimentícia, tendo participação de aproximadamente 10% no faturamento total da indústria de alimentos (EMBRAPA, 2010).

A contribuição material no setor lácteo, em termos de poluição de corpos receptores, é muito expressiva, sendo necessário e obrigatório o tratamento prévio de seus efluentes líquidos antes da disposição final em águas receptoras. O grau de poluição das indústrias de laticínios em corpos receptores varia muito, dependendo do volume do leite processado, dos processos envolvidos, tipo de produto, escala de produção, e da quantidade de descarga de efluente (NIRENBERG, 2005 ;SILVA, 2011).

Nesses processos de produção, uma grande quantidade de efluentes líquidos é gerada. Tais efluentes possuem altos teores de matéria orgânica, sólidos suspensos, nutrientes, e uma grande quantidade de gordura, apontada como a principal fonte de poluição. Um dos fatores preponderantes no tratamento de tais efluentes é a concentração e a degradação das gorduras (ANDRADE, 2011).

Para um tratamento conveniente desse tipo de efluente, é necessária a aplicação de processos biológicos, que atuem na estabilização da matéria orgânica a partir de um consórcio de microrganismos. Uma vez que a concentração de matéria orgânica seja elevada, os processos anaeróbios são indicados.

A conversão de ácidos graxos de cadeia longa para metano, em biorreatores anaeróbios, envolve o metabolismo das bactérias acetogênicas, que oxidam os lipídios em hidrogênio e acetato, e as archaeas metanogênicas, que produzem metano e dióxido de carbono a partir do consumo de hidrogênio e de acetato. Todavia, tem sido sugerido que óleos e gorduras exerçam efeitos inibitórios principalmente nas archaeas metanogênicas, dificultando a transferência de massa e interferindo nas funções de transporte das comunidades microbianas (SALVADOR et al. 2013). A busca por novas

tecnologias e sistemas de tratamento que superem esses problemas e gerem efluentes tratados com boa qualidade é de importância crucial. Para essas novas tecnologias, o reator anaeróbio compartimentado (ABR) foi selecionado na otimização do processo de depuração, onde sua diversidade microbiana foi estudada no presente trabalho.

Estudos da compreensão da ecologia microbiana envolvida no tratamento e remoção da matéria orgânica tem propiciado avanços nos projetos de biodigestores e conseqüente melhora no desempenho destes. Normalmente, em operação de escala plena, dá-se pouca atenção à composição e atividades da comunidade microbiana em relação aos parâmetros convencionais durante o funcionamento dos reatores anaeróbios. Porém, a interdependência das populações microbianas nesses reatores reage sensivelmente a qualquer mudança das condições ambientais presentes. Qualquer tipo de estresse imposto pode acarretar em mudanças nos níveis populacionais relativos da comunidade microbiana e sua atividade, refletindo fundamentalmente no desempenho do reator. Principalmente em relação aos reatores anaeróbios, onde existe essa dependência de interações microbianas complexas para estabilidade e desempenho, este trabalho oferece uma oportunidade de acoplar o estudo da comunidade microbiana e as características operacionais do sistema.

O estudo da comunidade microbiana envolvida nos processos de tratamento anaeróbio de efluentes de laticínios relacionados com a operação dos reatores, é também muito importante para o aperfeiçoamento desses processos, visando à otimização da estabilização da matéria orgânica rica em ácidos graxos de cadeia longa.

Considerando que a diversidade microbiana é influenciada por condições operacionais distintas, como a natureza do substrato, a carga da matéria orgânica disponível, o tempo de detenção hidráulica (TDH) e celular, pH e a temperatura de operação, técnicas de biologia molecular vêm favorecendo a avaliação da diversidade microbiana em amostras ambientais, sendo fundamentais no auxílio da definição de parâmetros operacionais ideais, visando o melhoramento, operação e aplicação desses sistemas em larga escala (SOUSA, 2007; SOUSA, 2009).

O presente estudo teve como objetivo acompanhar modificações da diversidade microbiana durante mudanças nas condições operacionais de um reator compartimentado (ASBR) utilizado para o tratamento de efluentes gordurosos, alimentado com efluente sintético de laticínios, a partir de abordagens biomoleculares com gene alvo 16S rRNA, através das técnicas PCR, DGGE, utilizadas a fim de compreender a adaptação da microbiota na mineralização de AGCL.

2 OBJETIVOS

O item 2 compõe os objetivos gerais e específicos do presente estudo.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo geral estudar a comunidade microbiana presente em um reator anaeróbio compartimentado (ABR) tratando efluente sintético com características de um efluente proveniente de indústrias de laticínios.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar ensaios de Atividade Metanogênica Específica (AME) com amostras do inóculo e do reator utilizado no tratamento de efluentes sintéticos de indústria de laticínios;

Caracterizar o padrão de diversidade microbiana dos domínios Bacteria e Archaea nos diferentes compartimentos do reator ABR, comparando-os em tempos de detenção hidráulica de 72h para 24h durante o tratamento de efluentes gordurosos, pelas técnicas PCR-DGGE;

Estabelecer índices de similaridade microbiana presente no reator.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EFLUENTES DE UMA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS: CARACTERÍSTICAS E TRATAMENTO

O processo de fabricação de alimentos gera grandes quantidades de efluentes líquidos provenientes das diferentes etapas de processamento, e se faz necessário o tratamento desse efluente antes de seu lançamento nos corpos receptores. A contribuição das indústrias de laticínios na poluição dos corpos receptores é extremamente significativa já que a fabricação de produtos lácteos gera uma carga poluidora muito rica em matéria orgânica.

O leite tem em sua composição grandes quantidades de ácidos graxos, que são estabilizados por substâncias orgânicas albuminoides num soro composto por lactose (açúcar), materiais proteicos, sais orgânicos e minerais e quantidades de produtos como lecitina, ureia, aminoácidos, ácido láctico, acético, álcool, vitaminas e enzimas. Estes compostos formam os efluentes de laticínios, compostos por quantidades variáveis de leite, e são geralmente águas residuárias com características neutras ou alcalinas, e tendem a ficar mais ácidas se houver fermentação da lactose (KONIG, 2000).

No tratamento desses efluentes de produtos lácteos, visto que há um alto teor de compostos orgânicos, a biodigestão é largamente utilizada. Um tratamento biológico tem a função de remover a matéria orgânica da água residuária industrial, através do metabolismo de oxidação e de síntese de células, transformando essa matéria orgânica em subprodutos que podem ser removidos do sistema de tratamento. Este tipo de tratamento é geralmente utilizado em virtude da presença de grandes quantidades de matéria orgânica biodegradável.

Em tratamentos biológicos, os processos se caracterizam de acordo com o modo como acontece o contato da matéria orgânica e a comunidade microbiana. Em tratamentos anaeróbios, apesar de apresentarem menores eficiências de remoção de matéria orgânica, quando comparados com processos aeróbios, os reatores são mais compactos, produzem menos lodo e biogás, tornando-se assim atrativos e, portanto, muito estudados, para

obtenção do aumento de sua eficiência. Para isso, compreender a microbiologia envolvida no tratamento é essencial, para que ocorra assim a otimização de projeto e operação em sistemas de tratamento biológico (Von SPERLING, 1996).

3.2 PROCESSOS ANAERÓBIOS

Antigamente pouco se usava dos processos anaeróbios para o tratamento de efluentes líquidos, em virtude da reduzida taxa de crescimento das arqueias metanogênicas, e do pouco conhecimento da microbiologia envolvida na degradação da matéria orgânica.

Com novas pesquisas e o surgimento de sistemas de alta taxa, onde há uma maior capacidade de retenção da biomassa, esse processo vem sendo cada vez mais utilizado. Esse processo é tido como a melhor solução quando se analisa a relação custo/benefício no tratamento sustentável de poluentes orgânicos oriundos de indústrias (LETTINGA et al., 1999).

A implementação desses sistemas sustentáveis traz diversos benefícios. O tratamento anaeróbio de efluentes além de ter um menor custo de implementação comparado com o tratamento aeróbio, tem gasto de energia também menor, e ainda produz energia útil em forma de biogás. Os reatores anaeróbios podem ser aplicados com altas taxas de carga, diminuindo o espaço necessário para a implementação do sistema. Além disso, a produção de lodo é geralmente inferior aos processos aeróbios, tendo tal material uma alta capacidade de desague.

Outro benefício é que os microrganismos anaeróbios podem permanecer preservados sem alimentação por longos períodos de tempo, sem qualquer dano grave da sua atividade, mantendo geralmente as características do lodo inalteradas (LETTINGA et al., 1999).

A digestão anaeróbia é um processo que acontece na ausência de oxigênio molecular, onde a microbiota interage com o ambiente e realiza processos metabólicos de fermentação e respiração. Nesses processos, reações químicas, enzimáticas e microbiológicas ocorrem, fazendo a conversão dos substratos a partículas menores, tornando-as solúveis (VEIGA et al., 2003).

A fermentação se dá pela oxidação da matéria orgânica na ausência de um aceptor final de elétrons e na respiração, a microbiota utiliza aceptores de elétrons inorgânicos, como os íons nitrato na nitrificação, íons sulfato na sulfetogênese ou gás carbônico na formação do metano. Os poluentes orgânicos são convertidos em gases, na forma de gás carbônico (25-45%) e metano (50-70%), mistura esta conhecida como biogás, uma fonte de energia renovável com potencial de substituição dos combustíveis fósseis.

A digestão anaeróbia pode ser dividida em quatro fases distintas de oxidação da matéria orgânica: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (LETTINGA et al., 1995). Essas diversas reações envolvidas na estabilização da matéria orgânica, são realizadas por diferentes comunidades microbianas em etapas sequenciais e são muito dependentes entre si. Por isso ocorre uma associação sintrófica entre bactérias e arqueias, onde se uma dessas reações metabólicas for interrompida ou não se processar em taxas adequadas, todo o processo é comprometido (ZANELLA, 1999).

Portanto, a biodigestão anaeróbia é representada por um sistema ecológico intrinsecamente balanceado. No mínimo, três grupos microbianos estão envolvidos nessas etapas: i) bactérias acidogênicas (ou fermentativas); ii) bactérias acetogênicas; e iii) archaeas metanogênicas. No processo, sucessivas reações bioquímicas realizam a lise, por hidrólise e fermentação, de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas, lipídios) a partir da ação das acidogênicas, formando compostos mais simples como os ácidos orgânicos, além de hidrogênio e gás carbônico. As bactérias acetogênicas convertem esses intermediários em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Finalmente, as metanogênicas desenvolvem a remoção do carbono orgânico contido na fase líquida a partir da produção do metano, biogás insolúvel, portanto, mais facilmente removido do sistema. Além disso, as archaeas são responsáveis pelo controle da pressão parcial de hidrogênio do meio, mantendo-a em níveis suficientemente baixos, permitindo que as acetogênicas produzam ácidos mais oxidados, como o acetato, substrato direto das archaeas (CHERNICHARO, 2000).

Na degradação de lipídios, os triglicerídeos são hidrolisados a ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e ocorre a β -oxidação, produzindo propionato ou acetato (MIRON et al., 2000).

Em alguns casos, conversão de ácido graxo de cadeia longa em metano é feita pelas bactérias acetogênicas que oxidam o AGCL em hidrogênio e acetato, e archaeas metanogênicas são as responsáveis em consumir o hidrogênio e o acetato, produzindo metano e dióxido de carbono. Como é de extrema importância que o máximo de acetato seja convertido em metano, de acordo com Salvador et al. (2013), a atividade metanogênica hidrogenotrófica e acetoclástica devem ser otimizadas, alcançando assim rendimentos máximos de metano nos biorreatores anaeróbios.

3.2.1 Problemática dos ácidos graxos de cadeia longa na degradação de lipídios

Desde a década de 1980 há estudos e relatos de problemas no tratamento de efluentes ricos em lipídios. E nas décadas seguintes muitos estudos surgiram com o objetivo de aperfeiçoar o tratamento de efluentes ricos em gorduras, uma vez que este é o substrato ideal para a produção de metano, já que sua degradação produz mais biogás com maior teor de metano (ALVES et al., 2001).

A adsorção da gordura à biomassa e a flotação do lodo são dois problemas comuns relatados por pesquisas iniciais, podendo levar à lavagem da biomassa (Figura 1). Altos teores de lipídios presentes no efluente são adsorvidos na superfície do lodo ativo, isso reduz significativamente a eficiência no tratamento devido às limitações no transporte de substrato solúvel para a biomassa e por fim reduz a taxa de mineralização do substrato (RINZEMA, 1993).

Rinzema (1993) testou reatores tipo UASB e um reator de leito expandido (EGSB), e sobrecarregaram os reatores com matéria orgânica rica em lipídios (>50%). Após esse feito, uma lavagem severa do lodo no sistema pôde ser observada, devido sua flotação. Em 1997, Petruy e Lettinga,

utilizando um reator de manta de lodo granular (EGSB), onde a velocidade do fluxo ascendente se mantém mais alta permitindo a expansão do lodo e portanto, um maior contato entre biomassa e efluente, trataram um efluente rico em gordura do leite a fim de avaliar sua biodegradabilidade. Resultados apresentados mostraram que 70% dos lipídios foram adsorvidos pela biomassa, e que essa DQO adsorvida era lavada do sistema sem biodegradação alguma.

Outro problema observado na degradação de compostos gordurosos é a desintegração de grânulos. Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) são caracterizados por uma estrutura anfifílica, isto é, possuem uma parte de sua molécula hidrofílica (ácido carboxílico) e outra lipofílica (cadeia de hidrocarbonetos alifáticos). A partir dessa molécula, pode-se esperar a desintegração de grânulos, já que em um pH neutro, os AGCL atuam como surfactantes, reduzindo a tensão superficial (ALVES et al., 2009).

Perle e colaboradores, em 1995, investigaram compostos presentes no efluente de laticínios, e consideraram a gordura do leite uma das principais causas para a inibição da atividade metanogênica, e efeitos inibitórios na produção de metano.

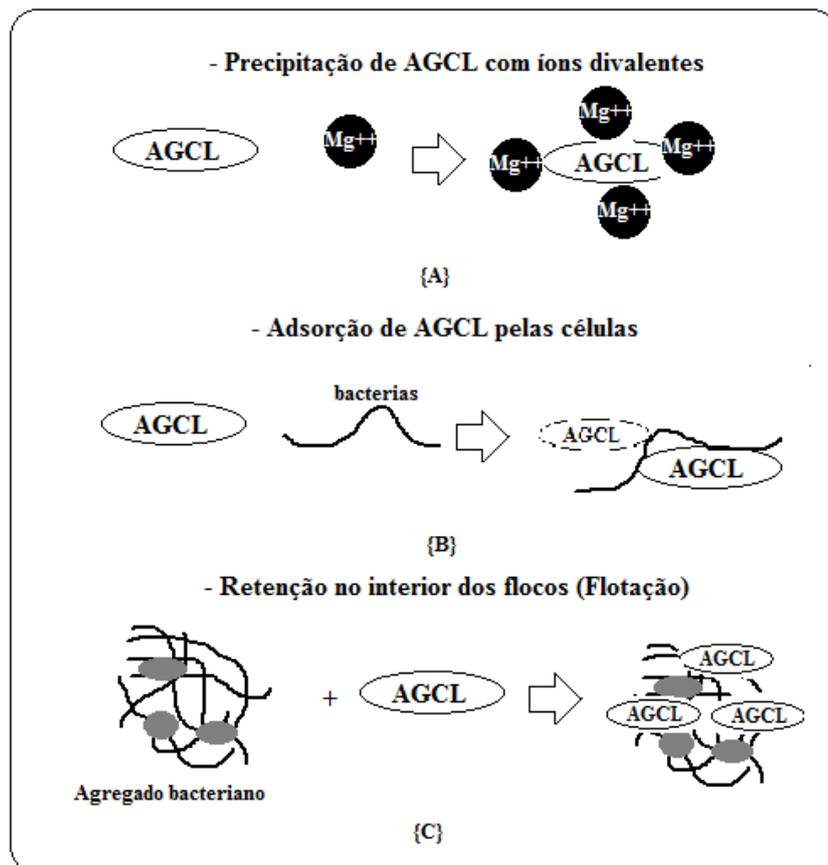


Figura 1 - Mecanismos de acumulação de ácidos graxos de cadeia longa na biomassa anaeróbia.

A alimentação do reator com efluente rico em AGCL inicia com a acumulação substancial de AGCL no lodo, essa acumulação é progressiva até conversão à metano, e o lodo, em seguida fechado em uma espuma esbranquiçada, flutua e é lavado para fora do sistema.

A) precipitação;

B) adsorção;

C) retenção no interior dos flocos.

Fonte: Adaptado de Sousa et al., 2007.

Conquanto, estudos mais recentes demonstram que apesar da inibição, flotação e adsorção, esses efeitos no lodo não são irreversíveis. Se a biomassa for mantida no sistema, sua recuperação é possível.

Um fenômeno reversível desses efeitos inibitórios foi observado por Pereira e colaboradores (2004), obtendo resultados que provariam que os AGCL, apesar de diminuírem a atividade metanogênica específica, não produzem efeito bactericida ou tóxico permanente. Para isso, a biomassa associada a AGCL foi inoculada em frascos reatores e sua capacidade de

produção de metano foi testada. Foi observado que a mineralização destes AGCL acumulados na biomassa floculenta era inibida pelo substrato que alimentava o reator, pois quando a alimentação do reator era interrompida verificava-se produção de metano, mas se a alimentação era mantida esta produção era suprimida. Além disso, observou-se que essa biomassa associada à AGCL após degradar os ácidos associados, recuperava valores elevados de atividade metanogênica, ficando apta a receber nova carga de AGCL, e de degradá-la eficientemente.

Através desse equilíbrio entre a acumulação e a degradação de AGCL, Cavaleiro e colaboradores (2009) obtiveram eficiência de até 99% na remoção de carga orgânica no sistema. Esse equilíbrio se deu por meio de uma estratégia combinando fases de alimentação e fases de degradação (intermitente), o que resultou na adaptação da biomassa nesse tipo de tratamento. Não ficou claro todavia como se deu o mecanismo bioquímico na degradação de lipídios, o que sugere a necessidade de estudos posteriores da diversidade microbiana presente no lodo adaptado.

Alves e colaboradores (2001) acompanharam durante longo período de tempo de operação dois reatores de leito fixo similares. Resultados utilizando um período de pré-exposição da biomassa à lipídios no reator I, apresentaram maior tolerância à toxicidade ao ácido oleico que o biorreator onde não havia alimentação prévia com AGCL. Com isso, concluíram que a alta taxa de degradação da matéria orgânica adsorvida sugere a utilização de ciclos sequenciais de adsorção e degradação no tratamento de efluentes ricos em AGCL.

3.2.2 Reatores anaeróbios compartimentados (ABR) para o tratamento de efluentes de laticínios

Na década de 80, McCarty (1988) e colaboradores desenvolveram o reator anaeróbio compartimentado (ABR, do inglês “Anaerobic Baffled Reactor”), que é conhecido desde então como um biodigestor eficiente no tratamento de águas residuárias. Fernandes et al. (2006), Silva (2001) e Zanella (1999) obtiveram êxito com o reator compartimentado, mostrando que

o sistema é promissor no tratamento de esgotos, tanto pela eficiência na degradação da matéria orgânica e sólidos em suspensão, quanto pelo baixo custo e simplicidade na implantação e operação.

O reator anaeróbio compartimentado (Figura 2) constitui-se de um tanque com diversas câmaras dispostas em série, separadas por paredes verticais, que não necessita de granulação para sua operação (WANG et al., 2004). Nas câmaras, o fluxo comporta-se como o do reator do tipo UASB, com fluxo ascendente, e cada câmara é alimentada pelo efluente da câmara anterior. Essa configuração permite que a água residuária passe por elevadas concentrações de biomassa ativa, pois as chicanas obrigam a água residuária a se movimentar ascendente e descendente (ABREU, 2007).

Portanto, a partir dessa configuração, as bactérias elevam-se suavemente e se estabelecem, devido ao fluxo de produção de gás em cada compartimento mas também se movimentam para baixo a uma taxa parcialmente lenta, dando origem a tempos de retenção celular de 100 dias em tempos de detenção hidráulica da ordem de 20h (GROBICKI; STUCKEY, 1991).

Segundo Boopathy (1998), a construção do ABR evita os riscos de entupimento e de elevadas perdas de biomassa microbiana, sendo interessante para tratamento de altas cargas orgânicas. O ABR combina as vantagens do filtro anaeróbio, que é estável e seguro, com o UASB, facilitando a retenção da biomassa dentro do reator. Boopathy ainda obteve eficiência igual ou maior do que outros modelos de reatores relatados em literatura.

Essa eficiência foi atribuída à capacidade do reator compartimentado em aprisionar as partículas de pequeno diâmetro contendo metano e com isso manter um elevado tempo de retenção celular. Comparando o sistema ABR, Boopathy (1998) testou diferentes números de compartimentos e obteve a melhor eficiência no tratamento de dejetos suínos com ABR de quatro ou cinco compartimentos.



Figura 2 - Foto reator compartimentado no Laboratório de Engenharia de Alimentos FZEA-USP.

Fonte: Da autora.

Através de um ABR com 5 compartimentos, Wang e colaboradores (2004) trataram água residuária sintética composta por glicose, metais vestigiais e nutrientes. Analisando a concentração de AGV (ácidos graxos voláteis) em cada compartimento, foi observado que o acetato foi o intermediário mais importante na degradação acidogênica. Foi verificado ainda que na composição do biogás formado ocorreu aumento da produção de metano e diminuição do hidrogênio ao longo dos compartimentos do reator.

O ABR tem vantagens na retenção de biomassa, já que o lodo arrastado para fora de uma câmara é retido no próximo compartimento (SASSE, 1998). Com isso, o *design* do ABR é utilizado para separar a retenção de biomassa do tempo de detenção hidráulico (TDH), tornando possível tratar efluente anaerobicamente em TDHs curtos de apenas algumas horas (U.S., 2006).

A partir do exposto, é possível inferir que esta configuração seria interessante para o tratamento de efluentes gordurosos, pois, mesmo com a ocorrência de arraste do lodo ativo, em função da presença de lipídeos ou

AGCL, essa biomassa poderia ser retida nos compartimentos finais do reator antes de ser expulsa do sistema.

Langenhoff e colaboradores (2000) utilizaram um ABR em tratamento de diferentes tipos de efluentes solúveis e coloidais (leite, arroz coloidal e ração de cachorro), testando diferentes TDHs, reduzidos de 80h à 6h. Todos os tempos de detenção hidráulico testados obtiveram mais de 80% de remoção de DQO. Os pesquisadores ainda testaram um tempo diminuto de 1,3h que apresentou remoção de 40% de DQO.

3.2.3. Bioquímica da biodigestão anaeróbia de AGCL

As águas residuárias apresentam uma grande variedade de compostos orgânicos, resultando em muitas rotas metabólicas envolvidas no processo de digestão anaeróbia, com a colaboração de diferentes grupos microbianos, responsáveis pela degradação desses diferentes compostos, tendo cada grupo um comportamento fisiológico diferente (CHERNICHARO, 2000). A digestão anaeróbia trata-se, portanto, de um processo bioquímico complexo, composto por reações sequenciais que contém em cada reação determinadas comunidades microbianas.

A degradação de lipídios e gorduras é efetuada por comunidades sintróficas de bactérias e archaeas metanogênicas, e quanto mais agrupados esses agregados sintróficos maior o desempenho dessas comunidades. É porém, muitas vezes difícil de conseguir esses grânulos bem agrupados quando tratando efluentes ricos em ácidos graxos de cadeia longa (ALVES et al., 2009).

Efluentes ricos em gorduras tem um tratamento normalmente limitado pela sua característica de baixa solubilidade em água, se tornando um problema na digestão de lodos, onde a matéria rica em gordura tende a flotar, separando-se do sistema através de escumas (SAWYER et al., 1994).

Mecanismos bioquímicos na mineralização anaeróbia de AGCL não estão sendo estudados amplamente. Alguns estudos com AGCL (ALVES et al., 2009; Sousa et al., 2007; Sousa et al., 2008) indicam a ocorrência da β -

oxidação, apresentada na Figura 3, que consiste na quebra por oxidação do ácido graxo sempre em seu carbono β .

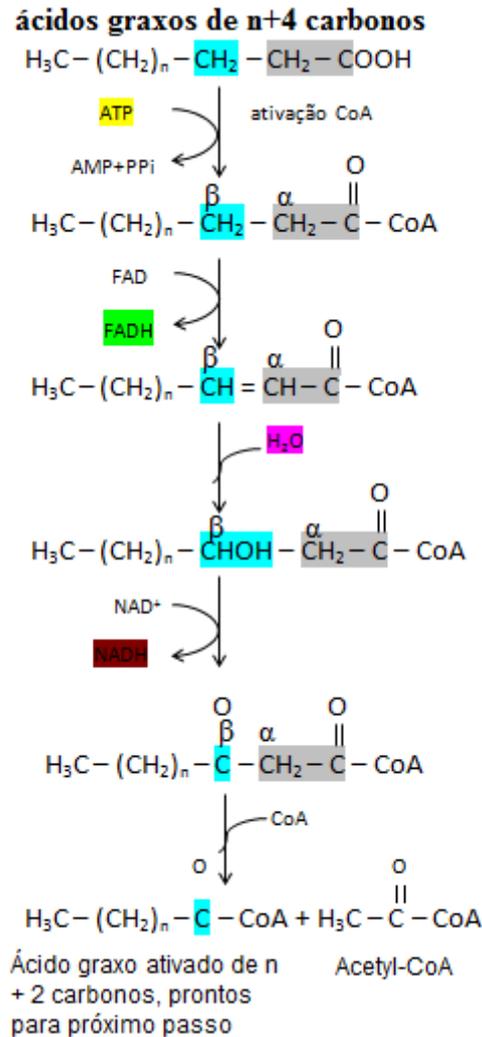


FIGURA 3 - Mecanismos da β -oxidação de ácidos graxos, com formação de fragmentos com 2 + n carbonos e acetyl-CoA.

Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., 1997.

Ainda segundo Alves e colaboradores (2009), a tecnologia anaeróbia pode ser melhorada quanto maior for o alcance no tratamento de diferentes substratos. Através de análises das tecnologias existentes fica claro que, até os dias de hoje, o tratamento anaeróbio com resíduos líquidos ricos em ácidos graxos de cadeia longa não são tão eficientes.

Apesar disso, o potencial de produção de biogás no tratamento de lipídios e gorduras é grande, podendo produzir mais metano quando

comparados com a degradação de proteínas e carboidratos como mostra a Tabela 1(ALVES et al., 2009).

Tabela 1 – Potencial de produção de biogás nos diferentes substratos.

Componentes	Reação metanogênica	Biogás (l.g-1)	Metano (%)
Lipídios	$C_{50}H_{90}O_6 + 24.5 H_2O \rightarrow 34.75CH_4 + 15.25CO_2$	1425	69,5
Carboidratos	$C_6H_{10}O_5 + H_2O \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2$	0,830	50,0
Proteínas	$C_{16}H_{24}O_5N_4 + 14.5 H_2O \rightarrow 8.25CH_4 + 3.75CO_2 + 4NH_4^+ + 4HCO_3^-$	0,921	68,8

Fonte: ALVES et al., (2009, p. 539)

3.3 ATIVIDADE METANOGENICA ESPECÍFICA (AME)

A atividade metanogênica específica (AME) pode ser utilizada com o objetivo de avaliar a digestão anaeróbia metanogênica, em termos de produção de metano, sendo importante como parâmetro de monitoramento da eficiência da comunidade microbiana metanogênica presente no biodigestor. Estabelecendo, portanto, um controle operacional dos reatores anaeróbios (CHERNICHARO, 2000).

Este teste é utilizado então em escala laboratorial, com o intuito de medir a conversão máxima de conhecidos compostos orgânicos a metano por unidade de massa de lodo. Isso possibilita a determinação da capacidade de mineralização de compostos do lodo estudado.

Apesar de não existir um protocolo específico para esse ensaio, e da dificuldade de comparação dos resultados existem alguns métodos mais utilizados.

A discordância de alguns autores se dá ora pelo método de medida da produção de metano, ora pelo substrato utilizado, ou ainda a temperatura do ensaio e a relação substrato/microrganismo (S/M). Desse modo, tem-se que

a relação S/M e o tipo de substrato têm importância relevante para se obter resultados confiáveis. Há estudos que visam estabelecer protocolos, a fim de unificar os métodos utilizados nos ensaios de atividade metanogênica específica.

O resultado de um ensaio AME realizado com lodo retirado de um reator contínuo alimentado com ácido oleico surpreendeu devido a sua alta produção de metano (ALVES, 2001). Sem qualquer substrato externo adicionado, a produção de metano observada é resultado da degradação do substrato acumulado no lodo durante a operação do reator.

Estudos envolvendo a biomassa associada a ácidos graxos de cadeia longa foi realizado por Pereira e colaboradores (2003, 2004), onde a biomassa foi testada com quantidades específicas entre 2,838 e 4,571 gDQO/gSV(AGCL). Testes utilizando transdutor de pressão e cromatógrafo gasoso foram realizados com o lodo associado à AGCL. Para isso, incubou-se o lodo do reator alimentado com AGCL, sem adição de outra fonte de carbono. A atividade metanogênica específica foi determinada com amostras presentes no reator, antes e depois da conversão à metano. A AME do lodo só pôde ser alcançada nas amostras que haviam mineralizado os AGCL associados à biomassa dentro do reator.

Esses resultados de Alves e colaboradores (2001) e Pereira e colaboradores (2004) demonstram que o lodo alimentado com AGCL é na verdade capaz de converter esses lipídios a quantidades significantes de metano. Isso foi crucial para demonstrar que a inibição por AGCL não é permanente na taxa entre 1000 e 5000 mgDQO/gSV-AGCL, contradizendo efeitos tóxicos e bactericidas irreversíveis relatados anteriormente (KOSTER; CRAMER, 1987; RINZEMA, 1993).

Cavaleiro e colaboradores (2009) em um trabalho experimental utilizaram um sistema fechado em série dividido em três ciclos de adição/degradação de AGCL, com intuito de avaliar a aplicabilidade de um sistema sequencial à degradação de um efluente de uma indústria de laticínios, enriquecido com gordura. Ao final do experimento a produção cumulativa de produção de metano aumentou significativamente do primeiro para o terceiro ciclo, sendo que no primeiro ciclo a DQO parece ter se

acumulado na biomassa através de mecanismos físicos, afetando a eficiência do lodo, já nos seguintes ciclos (2 e 3), a produção máxima de metano foi mais consistente com o valor inicial de DQO, o que sugeriu uma degradação eficiente do substrato.

3.4 MICROBIOLOGIA E TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA COMPREENSÃO DE PROCESSOS ANAERÓBIOS

A identificação da microbiota envolvida nos sistemas anaeróbios no tratamento de compostos gordurosos é fundamental para o entendimento do processo como um todo. As técnicas de biologia molecular complementam as técnicas de microscopia e colaboram efetivamente na compreensão dos processos biológicos de tratamento de resíduos.

Dentre as técnicas mais utilizadas de biologia molecular, estão a clonagem e criação de uma biblioteca gênica, técnicas de reação de cadeia polimerase (PCR) e de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

A técnica de PCR-DGGE é baseada na diferença de mobilidade em gel que apresentam fragmentos desnaturados de DNA, todos do mesmo tamanho, mas com diferentes sequências de bases nitrogenadas. Esses fragmentos são separados em gel de acrilamida, com gradiente de desnaturante, gerando padrões de bandas diferentes, refletindo a diversidade genética das amostras.

A diversidade microbiana nas últimas décadas vem sendo estudada a partir de métodos que são baseados na investigação de fragmentos de DNA, em bactérias, o gene 16S rRNA é largamente utilizado. Utilizar o gene 16S rRNA possibilita a investigação e determinação de posições filogenéticas de comunidades microbianas do meio ambiente (HENTSCHEL et al., 2002; SILVEIRA, 2004). Carl Woese (1993) iniciou estudos com o gene e argumentou que essas moléculas são as mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos.

Esses genes, partindo de um ancestral comum, são bem conservados podendo ter suas sequências utilizadas para medição de distâncias filogenéticas, inclusive com organismos distantemente relacionados.

O gene que codifica o 16S rRNA é amplificado por reação em cadeia polimerase (PCR) e posteriormente é caracterizado pela clonagem e sequenciamento e também analisado por eletroforese, por meio das técnicas DGGE, para a obtenção de um perfil da microbiota presente nas amostras (KOZDRÓJ; VAN ELSAS, 2001; RANJARD et al., 2000).

Tabela 2 - Sequência do grampo GC acoplada a extremidade 5' dos primers 968f e 1100f.

Sequência do grampo GC CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG
GGG GCA CGG GGG G

Fonte: BELI, (2014, p. 33)

A técnica de DGGE é muito utilizada em estudos que visam comparar modificações na estrutura de comunidades envolvidas em sistemas anaeróbios, em resposta a perturbações, como por exemplo, troca de substrato (SOUSA et al., 2007), ambientes com diferentes valores de pH (BELI, 2014), entre outros, como aumento de carga orgânica ou variações de tempo de retenção. Essa técnica é utilizada quando não existe a finalidade de comparação filogenética exaustiva como na clonagem, mas relativamente precisa para determinar os organismos que dominam uma certa comunidade (ALMEIDA et al., 2009).

Junto a um dos primers utilizado na amplificação, há um grampo rico em guanina e citosina (GC) apresentado na Tabela 2, com cerca de 40 pb (pares de base) acoplado ao final da extremidade 5' (MYERS et al., 1985). À medida que os produtos de PCR, com fragmentos de DNA do mesmo tamanho, são separados na corrida eletroforética, o aumento gradual do gradiente denaturante faz com que a fita dupla se abra e fique presa no gel. O grampo GC impede a desnaturação completa da fita dupla (Figura 4).

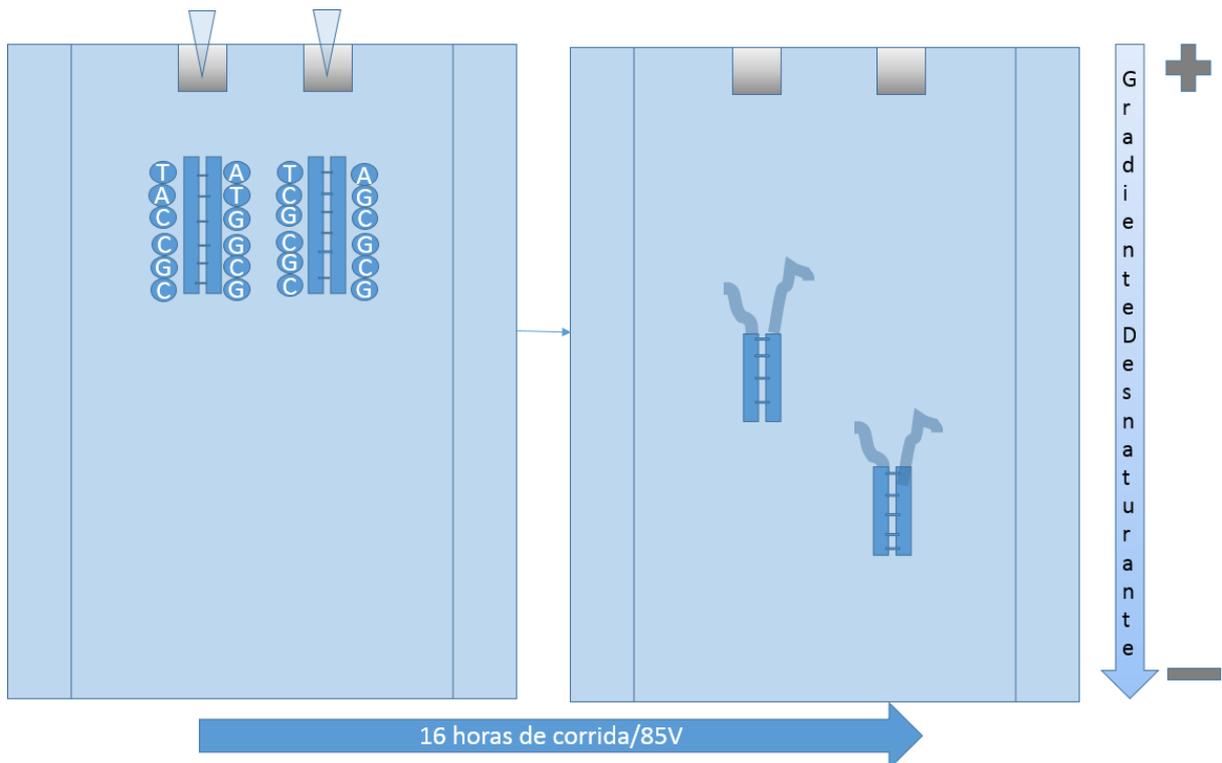


Figura 4 - Desenho ilustrativo da corrida eletroforética com gradiente em gel acrilamida. As regiões rica em Timina e Adenina ocorrem mais facilmente a desnaturação das sequências de DNA, por terem uma ligação mais fraca (duas pontes de hidrogênio) que Citonina e Guanina (três pontes de hidrogênio). Por isso o grampo GC (pb CGC) é utilizado, evitando a desnaturação total do fragmento.

Fonte: BELI, (2014, p. 27)

Junto às análises de sequenciamento e filogenéticas, esse método fornece uma visão geral de determinada população microbiana, e é também muito útil em análises de dinâmicas populacionais, comparando diferentes condições operacionais nos reatores (TOMMASO et al., 2013).

Salvador e colaboradores (2013) fizeram uma abordagem no gene 16S rRNA da comunidade arquea para observar diferentes grupos metanogênicos envolvidos no processo de degradação de ácidos graxos de cadeia longa à metano, em diferentes fases do reator utilizando técnicas PCR-DGGE.

O estudo evidenciou nos resultados mudanças na comunidade archaeal, com maior mudança durante a partida do reator. Obteve-se similaridade de 84% nas estruturas da comunidade metanogênicas mantidas até o fim da operação contínua.

Roest e colaboradores (2004), através do estudo do gene rRNA 16S por PCR-DGGE, no tratamento anaeróbio, revelaram uma maior abundância das arqueas (63%) que das bactérias (37%).

Sousa et al. (2007) a partir de análises de diversidade mostraram mudanças em comunidades do domínio *Bacterias* e *Archaea* durante a acumulação e degradação de ácidos graxos de cadeia longa. Filotipos que predominaram foram monitorados utilizando eletroforese em gel desnaturante (DGGE) de fragmentos dos genes de rRNA 16S que foram amplificados por PCR. Os resultados de análises de DGGE identificaram a maioria dos clones bacterianos (80%) agrupado no *Clostridiaceae* e foram identificados dois grandes grupos de metanogênicas hidrogenotróficas relacionadas com *Methanobacterium* e organismos acetoclásticos estreitamente relacionadas com *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. O estudo mostrou também por FISH e PCR em tempo real um aumento na comunidade archaea durante a degradação da biomassa acumulada, mostrando a importância e o dinamismo das comunidades bacterianas e metanogênicas em ciclos de acumulação e degradação de ácidos graxos de cadeia longa.

Souza e colaboradores (2009) utilizaram técnicas de enriquecimento e biologia molecular, combinadas, para identificar bactérias degradadoras de AGCL. A partir de resultados de DGGE e sequenciamento do DNA extraído das bandas predominantes no perfil DGGE, sugeriu-se a ocorrência de mudanças nas comunidades microbianas na degradação de ácidos graxos saturados e insaturados.

Sousa e colaboradores (2007) realizaram estudo da diversidade microbiana do lodo anaeróbio após longo contato com AGCL. Esse lodo, sob condições apropriadas, foi capaz de mineralizar eficientemente essas moléculas de ácidos graxos de cadeia longa. Ainda nesse estudo, os pesquisadores obtiveram 10 espécies e subespécies bacterianas crescendo, em associação sintrófica com arqueias metanogênicas, em ácidos graxos com 4 a 18 ou mais moléculas de carbono.

Salvador e colaboradores (2013), através de um estudo da resistência das arqueias metanogênicas em reator tratando resíduos ricos em oleato, obtiveram mudanças na comunidade archaeal pela técnica PCR-DGGE, que

após a partida, o sistema apresentou uma comunidade archaeal estável que se manteve ao longo da operação contínua.

Portanto nota-se que as técnicas de biologia molecular ajudam na caracterização e monitoramento da diversidade microbiana presente em diferentes sistemas de tratamento, o presente estudo visou então a utilização das técnicas PCR-DGGE afim de observar as modificações apresentadas em diferentes condições de tratamento no reator compartimentado, com tempo de detenção hidráulica que variou de 72 horas para 24 horas.

4 METODOLOGIA

4.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

O presente projeto de pesquisa foi realizado utilizando-se amostras provenientes de um ABR de 25 litros e cinco compartimentos operado por 270 dias no laboratório de Biotecnologia Ambiental, na FZEA-USP. O reator foi operado e teve sua eficiência analisada em um projeto parceiro por um aluno do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos- FZEA-USP, o estudo de Santos ainda não publicado. Ao longo deste tempo, perfis espaciais de amostragem de efluente e biomassa foram realizados no 50º, 150º e 270º dia de operação.

Houve mudanças nas condições operacionais no quinquagésimo dia, no tocante à temperatura de processo, de aproximadamente 25°C para 37°C e no 150º dia, no tocante ao tempo de detenção hidráulica adotado que passou de 3 dias para 1 dia. Como a concentração do efluente foi mantida, a diminuição do tempo de detenção hidráulica significou aumento da carga orgânica que subiu de 1,0 para 3,0 g DQO/L.d.

O reator foi mantido a temperatura ambiente até o quinquagésimo dia de operação, e em câmara termostatzada com temperatura de 37 °C ± 2 a partir de então, até o final de experimento. As eficiências médias de remoção de matéria orgânica (expressa em Demanda química de oxigênio – DQO) ao longo do período foram de 90 ± 7 %. A partir do 150º dia de operação observou-se arraste da biomassa nos dois primeiros compartimentos do sistema, com colmatação periódica do terceiro compartimento. Em função disso, a recirculação de biomassa do terceiro compartimento para o primeiro foi realizada a cada duas semanas. Tal periodicidade foi adotada no início da condição experimental, e foi diminuída com o passar do tempo, quando o fenômeno da flotação tornou-se menos problemático. A Figura 1 do Anexo V apresenta o comportamento do sistema em relação a eficiência do sistema nas condições experimentais ensaiadas.

O esquema a seguir (Figura 5) sintetiza as principais etapas da metodologia, descritas abaixo.

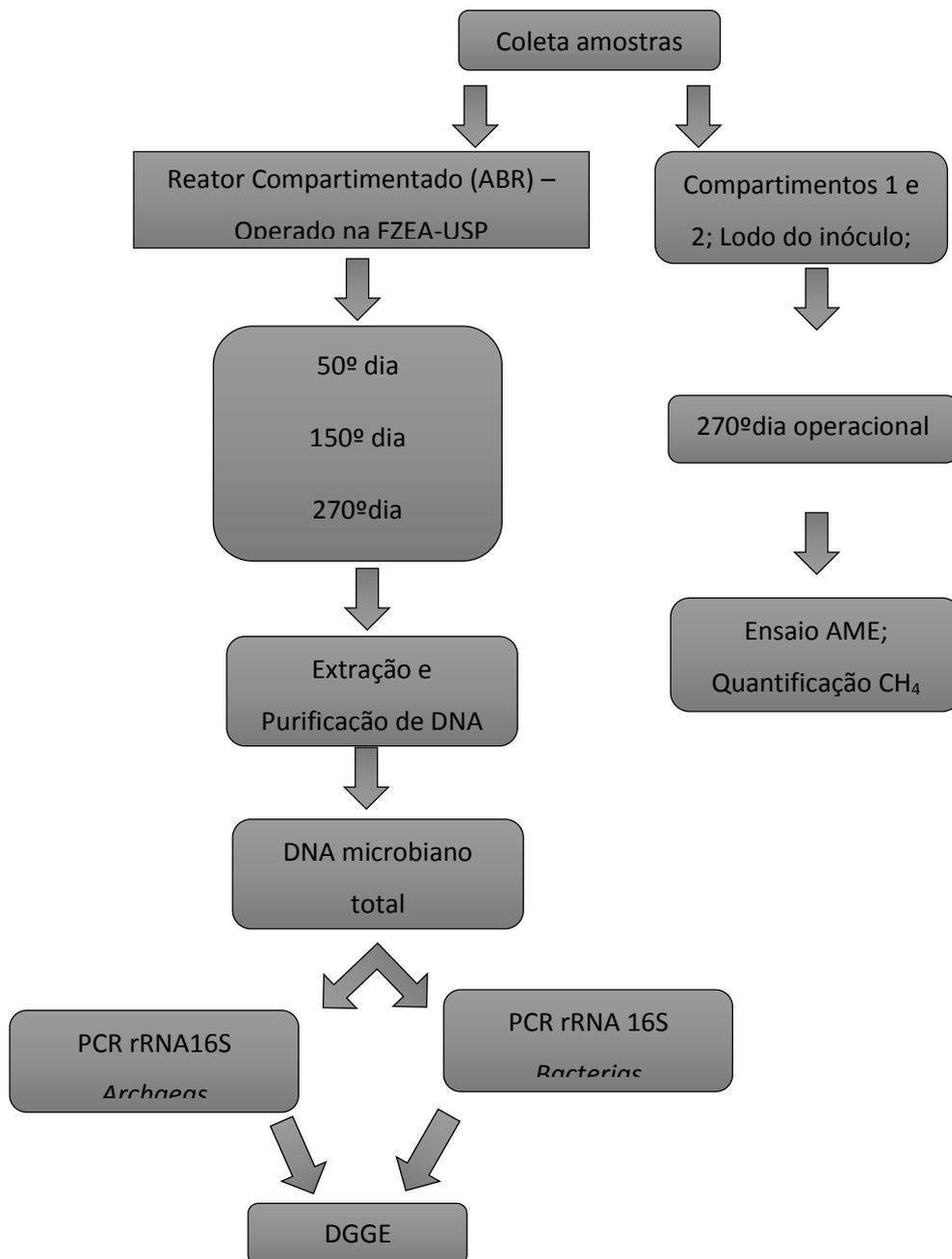


Figura 5 - Fluxograma representativo das análises laboratoriais realizadas para o trabalho.

Fonte: Da autora.

4.2 REATOR ANAERÓBIO COMPARTIMENTADO (ABR)

A presente pesquisa estuda amostras de um reator do tipo “Anaerobic Bafled Reactor” localizado no Laboratório de Biotecnologia da Engenharia de Alimentos - FZEAUSP.

O ABR é constituído de cinco compartimentos (Figura 6), construídos em acrílico, em escala de bancada com volume de aproximadamente 25L. Nos dois primeiros compartimentos a biomassa presente está suspensa e no terceiro e quarto reatores a biomassa é fixa, com espuma de poliuretano, e o quinto compartimento é destinado à saída do efluente contém também biomassa fixa, mas não foi inoculado.

O reator ainda conta com recirculação da biomassa flotada e arrastada do terceiro compartimento para o primeiro compartimento, tendo também aparatos para coleta de gases na parte superior e amostradores ao longo de seu comprimento.

O reator foi alimentado com substrato sintético simulando efluentes de laticínios, preparado em laboratório (FZEA-USP), sua composição está apresentada na Tabela 3. Após o preparo do substrato, o pH é neutralizado para alimentar o reator. A DQO total de alimentação do reator foi de 3 g DQO/L.

Tabela 3 - Composição do efluente sintético

Efluente sintético	
-Leite em pó;	2g DQO-leite/L
-Creme de leite;	1g DQO-creme/L
-Ácido paracético;	0,0181
-Ácido nítrico	0,028 ml/L
-Água oxigenada;	0,39 ml/L
-NaOH	0,27 g/L
-Macronutrientes	1 ml/L
-Micronutrientes	1,8ml/L
-NaCl	0,4g/L
-Bicarbonato de sódio	1g/L

Fonte: Tommaso, (2012, p. 22)

As amostras estudadas foram retiradas dos quatro primeiros compartimentos a fim de identificar as mudanças na diversidade microbiana em cada compartimento e em diferentes condições de operação.

As fases de operação foram divididas em duas condições diferentes em relação ao tempo de detenção hidráulica, de 3 dias (72h) na primeira condição e de 1 dia (24h) na segunda. Na primeira condição o reator foi operado a temperatura ambiente até o 50º dia e a partir de então, a 37º C.

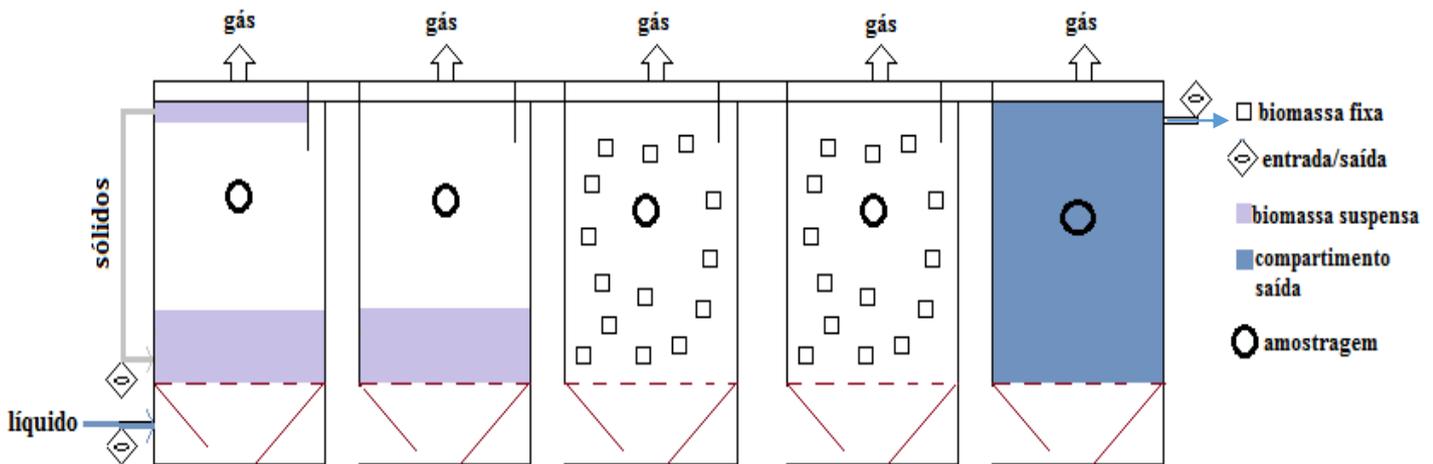


Figura 6 - Figura esquemática do reator compartimentado (ABR).

Fonte: Da autora.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Após as três condições experimentais estabelecidas, amostras de aproximadamente 5 ml foram retiradas de cada compartimento do reator e congeladas a -20°C até a extração de DNA.

No 150º, uma amostra da biomassa flotada também foi retirada a fim de comparar a fase de alimentação com as fases de reação dentro dos compartimentos, o tempo de operação do reator nas amostragens foi de 50 e 150 dias aproximadamente.

Já na terceira condição (TDH 24h) a biomassa do primeiro e segundo compartimento foi carregada para o terceiro compartimento, o que ocasionou a presença de biomassa suspensa e fixa dentro do compartimento 3, essas duas biomassas diferentes foram coletadas como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Condições das amostras nas condições 1 e 2.

AMOSTRAS	CONDIÇÃO	TDH	TEMPERATURA	TEMPO DE OPERAÇÃO DO REATOR
BF (Biomassa flotada)	I	3 dias	30°C	50 dias
C1				
C2				
C3				
C4				
BF (Biomassa flotada)	II	3 dias	37±2°C	150 dias
C1				
C2				
C3				
C4				
C1	III	1 dia	37±2°C	270 dias
C2				
C3				
C3ep				
C4				
Inóculo	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.

*(n.d.) não detectado. Cx corresponde aos compartimentos, onde x representa o número do compartimento; C3ep corresponde à biomassa no compartimento 3 contida na espuma de poliuretano, enquanto em C3 II a biomassa que foi arrastada do C1.

Fonte: Da autora.

4.4 ACOMPANHAMENTO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

As amostras de lodo retiradas de diferentes compartimentos do biorreator foram submetidas a análises de biologia molecular a fim de caracterizar as mudanças na diversidade microbiana em cada compartimento. Para isso, extração do DNA genômico, técnicas de reação de cadeia polimerase (PCR) e ensaios de DGGE foram executados.

4.4.1 Extração de DNA

Para a extração e purificação de DNA dos microrganismos presentes nas amostras dos biorreatores, testou-se a utilização de dois Kits de extração de DNA, o Kit Wizard DNA Cleanup (Promega®) e o Kit PowerSoil® DNA Isolation (MoBio®) seguindo as orientações dos fabricantes (ANEXOS 1 e 2 respectivamente).

A extração do DNA foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose 1,0%, preparados com TEB 0,5X em uma cuba eletroforética DIGEL®, por uma hora a 100V. Após a eletroforese os géis foram corados em brometo de etídio 0,5µg/ml por 20 minutos e lavados em água destilada por 10 minutos. Após a incubação com o corante, o gel foi submetido ao transluminador UV e fotodocumentado através do sistema de fotodocumentação L-Pix STi (Loccus®).

4.4.2 Amplificação do gene do RNA ribossômico 16S obtido pela técnica de reação em cadeia polimerase

Após a extração de DNA, o DNA total resultante foi submetido à amplificação de uma região variável do gene RNAr 16S pela técnica de reação da cadeia polimerase (PCR), com a utilização de primers (Invitrogen®) específicos, Primer 968f com grampo GC e o 1401r para o Domínio Bacteria, segundo Heuer et al. 1997, e Primers ARC-1100f GC e Arc1400r para o Domínio Archaea, segundo Kudo et al. 1997 (Tabela 5).

Tabela 5 – Apresentação dos primers utilizados na amplificação.

Gene-alvo	PRIMERS	Sequência 5'->3'
16S rDNA Bacteria	968f	AAC GCG AAG AAC CTT AC
	1401R	CGG TGT GTA CAA GAC CC
16S rDNA Archaea	1100f	AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA G
	1400R	CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC
Sequência do grampo GC		CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

Fonte: Adaptado de Heuer et al., (1997); Kudo et al., (1997)

Para a confirmação do PCR, utilizou-se o gel de agarose 1,5% com marcador de peso molecular 100pb (Easy Gen). Os resultados então foram visualizados em um fotodocumentador e transiluminador de UltraVioleta (UV). O grampo GC é utilizado acoplado à extremidade 5' dos primers (968F e 1100F), e tem a finalidade de evitar a completa desnaturação do fragmento de DNA durante a separação em gel de DGGE para o estudo do consórcio microbiano.

Para cada amostra amplificada, foi utilizado uma mistura (mix) de 50µl contendo: Tampão PCR 1X (PROMEGA®), 0,5 µl de cada primer (Invitrogen®), 0,4µl de dNTP Mix (PROMEGA®), 0,4 µl U de Taq DNA polimerase (PROMEGA®) e 1µl de amostra (TABELA 6).

Para cada primer específico foram ajustadas as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão pelo programa do Termociclador MaxyGene Gradient (Axigen®).

Para o Domínio *Bacteria*, foram feitas três etapas de ciclos. Sendo a primeira a 94°C por cinco minutos para a desnaturação; a segunda com 25 ciclos divididos em três temperaturas, 94°C por um minuto, 58°C por um minuto e 72°C por trinta segundos, os últimos 10 ciclos foram divididos em 30 segundos a 58°C e um minuto a 72°C.

No Domínio *Archaea* também se iniciou com a temperatura de desnaturação à 94°C, seguida de dez ciclos à 94°C, 61°C ambos por 30 segundos e 72°C por um minuto e meio, nesses 10 primeiros ciclos foi utilizado uma rampa de -0,5°C na temperatura de anelamento (61°C), os próximos trinta ciclos foram divididos em 94°C e 56°C por trinta segundos cada e à 72°C por um minuto e meio, e por último um ciclo de três minutos à 72°C.

A amplificação foi submetida à corrida eletroforética em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídio por 40 minutos e lavados em água destilada (20 minutos), para a confirmação da amplificação dos genes.

Tabela 6 – Volume final dos reagentes para obtenção do mix para execução da PCR aos Domínios *Bacteria* e *Archaea*.

Reagentes	Volume para <i>mix</i> de 50µl	[] final
Tampão PCR	5 µl	1 x
MgCl	1,5 µl	1,5 mM
Primers <i>Bacteria</i> 968F/1401R	0,5 µl	0,2 µM
Primers <i>Archaea</i> 1100F/1400R	0,5 µl	0,2 µM
DNTPs	0,4 µl	200 µM
Taq polimerase®	0,4 µl	0,04 U/50 µl
H2O destilada	q.s.p. para 50µl	

Fonte: Da autora.

4.4.3 Estudo do consórcio microbiano obtido pela técnica de DGGE

Na separação de diferentes sequências dos segmentos de gene do rRNA 16S amplificados, a técnica de DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) foi utilizada segundo o manual da Loccus Biotecnologia, do equipamento de sistema para eletroforese em géis com gradiente de desnaturação que foi padronizado diferentemente para os domínios *Bactéria* e *Archaea* sendo 40/55% e 30/55% respectivamente. A montagem do sistema consta em Anexo 3.

Um volume de 18µL foi padronizado dos produtos de PCR do gene rRNA 16S para ser aplicado com mais 6µL de corante para eletroforese dos DNAs no gel de poliacrilamida em tampão TAE 1x, contendo gradiente linear de desnaturantes de 40 a 65%, formado pela mistura das soluções estoque de poliacrilamida 7,5%, um dos agentes desnaturantes 100% corresponde a 7M de uréia e 40% de formamida. A eletroforese ocorreu a 100V/60°C/overnight. O gel foi corado no dia seguinte com SYBR GOLD I (Molecular Probes) e documentado em fotodocumentador.

4.4.4 Análise dos perfis nos géis de DGGE

Para verificação de agrupamentos, é necessária a separação das amostras em grupos que compartilhem algumas características comuns (perfis de conjuntos de bandas), partindo de uma matriz que apresente presença e ausência de bandas obtidas através dos dados nos géis DGGE. A partir dessa matriz, pode-se calcular similaridades entre os perfis através de diferentes métodos. Para facilitar a visualização geral podem ser geradas formas gráficas, denominadas dendrogramas, que relaciona o nível de similaridade na vertical com as amostras por ordem de agrupamento na horizontal (SOUSA et al., 2007).

O programa *Bionumerics*® (Bionumerics 7.1, Applied Maths, Bélgica) foi utilizado para analisar o perfil de diversidade das amostras e também para o cálculo do coeficiente de similaridade (coeficiente Dice, tolerância de 1% e método UPGMA).

Para analisar o perfil de diversidade microbiana das amostras e o cálculo do coeficiente de similaridade a equação: $C_s = [(2 \times J) / (a + b)] \times 100$ foi utilizada. Onde, J é o número de bandas comuns entre as duas amostras, a é o número de bandas de uma amostra e b é o número de bandas da segunda amostra.

O coeficiente de similaridade entre duas amostras considera o número total de bandas presentes no gel DGGE e o número de bandas comuns presentes nas amostras em questão.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA

A atividade das arqueas metanogênicas específica foi avaliada no laboratório de Biotecnologia Ambiental da faculdade de Engenharia de Alimentos na Universidade de São Paulo – FZEA.

Utilizou-se o protocolo da PROSAB (ABREU, 2010), onde há a padronização de um procedimento operacional para a realização de ensaio de atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. O inóculo do biorreator e amostras dos compartimentos 1 e 2 foram coletados a fim de calcular e comparar a atividade metanogênica específica de cada amostra. Após a coleta as amostras, essas foram armazenadas à temperatura de 4°C até os procedimentos serem iniciados. As amostras foram caracterizadas pelos parâmetros de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV).

O protocolo utiliza os substratos acetato e formiato para testar as atividades acetoclásticas e hidrogenotróficas respectivamente. A proporção de lodo em relação ao substrato foi de 0,5 gDQO/gSTV. A técnica utilizada para a leitura dos resultados de produção de metano foi a cromatografia gasosa.

Realizou-se primeiramente o cálculo da concentração (g/L) de STV dos lodos analisados para determinação da quantidade de lodo a ser adicionado em cada frasco. O volume útil final dos frascos-reatores foi de 30 ml com uma atmosfera interna de 70 ml. A solução de nutrientes (ANEXO 2) foi adicionada junto aos substratos acetato e formiato em ensaios distintos.

Com todos os reagentes adicionados, a purga do oxigênio presente nos frascos foi realizada através de borbulhamento com nitrogênio gasoso (10

minutos). Os frascos foram então vedados e incubados em incubadora com agitação orbitam, Marconi MA420/E, com agitação e temperatura controlada, 110 rpm e 30°C.

4.5.1 Quantificação de metano por cromatografia gasosa.

A quantificação de metano nas amostras foi realizada em cromatógrafo gasoso da marca Shimazu, modelo GC-2014, equipado com coluna microempacotada, com comprimento de 1,0 m e diâmetro interno de 1mm. O gás de arraste foi Hélio, com fluxo de 10 mL.min⁻¹. A coluna foi mantida a temperatura de 40 °C por 3 minutos, e aquecida com rampa de 60 °C.min⁻¹ até 150 °C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto. O injetor foi mantido a 100 °C. Análise de padrão contendo 50% de CH₄ e 50% de CO₂ (mol/mol) era injetada periodicamente para obtenção do fator de conversão entre área e massa de metano presente nas amostras. As injeções eram feitas sob pressão ambiente e o valor da massa, corrigido utilizando-se a pressão atmosférica da cidade de Pirassununga (0,985 atm).

4.5.2 Cálculo da atividade metanogênica específica

Para realizar a medição de biogás foi utilizado um transdutor de pressão previamente calibrado. Portanto, inicialmente para o cálculo da atividade metanogênica específica foi necessário construir uma curva de calibração para o transdutor de pressão. A Figura 7 apresenta a curva de calibração do transdutor de pressão, cuja equação da reta propiciou a conversão dos valores de pressão em volume de biogás produzido.

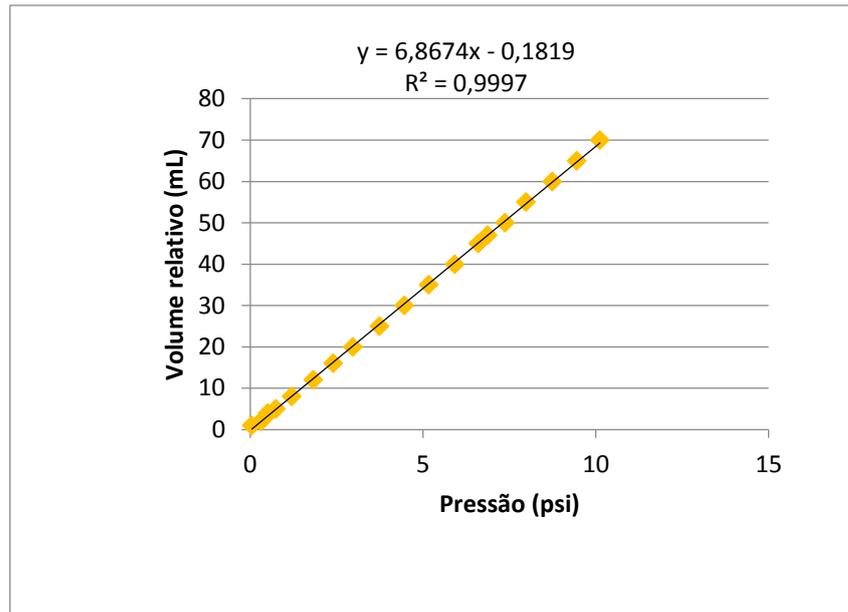


Figura 7 - Curva de calibração do transdutor de pressão. Volume relativo (mL) versus Pressão (psi)

Fonte: Da autora.

A partir da injeção de alíquotas de ar com volume definido, em frasco com volume de 100 mL e atmosfera interna (*headspace* - HS) de 70 mL, a curva foi construída. As alíquotas tiveram volume variando de 1 a 70 mL e foram injetadas em triplicata. Foi determinado o volume relativo (V_R) de cada injeção, para a construção da curva, de acordo com a equação 1, onde V_i é o volume de gás injetado e V_{HS} é o volume do *headspace*.

$$V_R = \frac{V_i}{V_{HS}} \quad (1)$$

A curva padrão obtida ($R^2 = 0,9982$) está demonstrada na equação 2, onde P é a pressão registrada no transdutor de pressão em psi.

$$V_R = 6,8674 \cdot P - 0,1819 \quad (2)$$

As pressões obtidas ao longo do ensaio eram convertidas em volume relativo, e este era utilizado para o cálculo do volume de biogás produzido (V_P) através da equação 1, na qual o volume de HS foi de 70 mL, volume utilizado no ensaio.

Ao fim do ensaio, quando o máximo de gás foi produzido e a produção foi estabilizada, amostras com volume de 0,5 mL (V_i) eram injetadas no cromatógrafo, a pressão ambiente. A área obtida através da análise cromatográfica era convertida em massa (μmol). Através de volumes de amostras padrões, com 50% metano e 50% acetato, as áreas obtidas por esses padrões eram utilizadas para a correlação de volume de gás injetado em μmol de gás injetado.

O volume de metano mensurado foi utilizado para o cálculo da produção metanogênica. E a produção metanogênica específica foi calculada através da produção metanogênica relacionada com a massa de sólidos totais voláteis presente no sistema por hora.

A produção metanogênica específica acumulada foi calculada através da somatória das massas mensuradas e plotada contra o tempo. A atividade metanogênica específica (AME) da amostra foi calculada a partir do ajuste de equação da reta realizado na primeira fração linear da curva de produção metanogênica específica acumulada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. EXTRAÇÃO DO DNA RIBOSSÔMICO 16S

Após a extração do DNA pelo kit PowerSoil DNA Isolation (MoBio®) e pelo kit PROMEGA®, a eficiência de extração dos kits foi testada em gel agarose 1,5%. A presença de DNA genômico nas amostras foi confirmada pela imagem negativa como mostra a Figura 8.

O kit MoBio® se mostrou mais eficiente em termos de purificação e quantidade de DNA presente nas amostras.

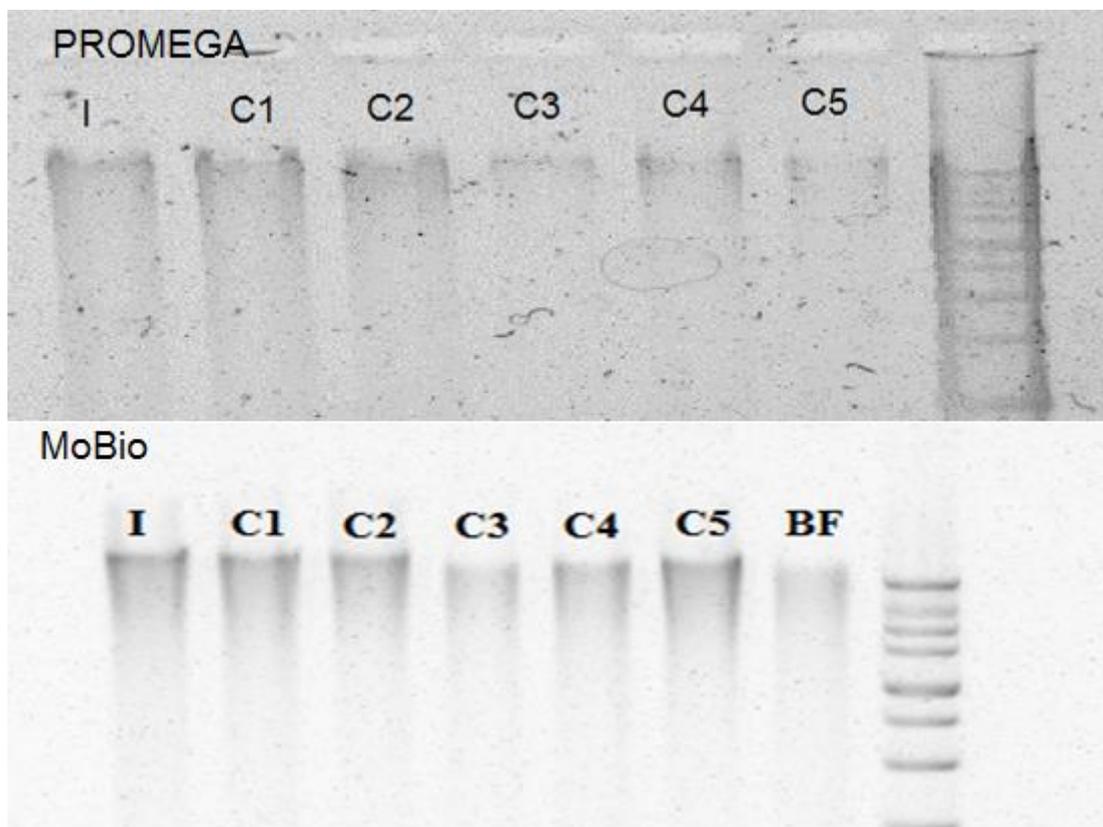


Figura 8 - Imagem negativa da eletroforese dos produtos da extração de DNA com os kits PROMEGA® e MoBio®, em gel agarose 1,0%. Corados com brometo de etídio (0,50 µg/ml).

Amostras da 1ª condição: I (inóculo); C-x: compartimentos do reator ABR, onde x representa o número do compartimento e BF a biomassa flotada no início do tratamento do efluente rico em AGCL.

Fonte: Da autora.

Com o kit Mobio®, uma grande quantidade de DNA foi recuperada na maioria das amostras, observadas a partir da intensidade da cor nas bandas em cada canaleta, mas nas amostras C3 e BF a concentração de DNA mostrou-se menor. Como a extração é feita padronizada pela quantidade de amostra, é provável que a perda de DNA seja decorrente da lavagem com tampão, que é necessária para biomassa flotada, já que ela está com moléculas de AGCL adsorvidas na biomassa, e no compartimento 3, já que a biomassa se encontra aderida à espuma de poliuretano.

Já no kit PROMEGA®, apesar da utilização do kit de purificação as extrações não foram tão eficientes, apresentando pouco DNA genômico representado pela corrida eletroforética.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO RNAr 16S

As amostras provenientes da extração do DNA foram amplificadas utilizando primers do Domínio Bacteria e Archaea, conforme descrito no item 4.4.2 de material e métodos.

Os resultados da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% a fim de confirmar a integridade e especificidade da amplificação do gene rRNA 16S (Figura 9). Para amostras que apresentaram pouco DNA genômico (BF, C3, C4), na visualização de extração foram testadas algumas diluições, e com a diluição de 50 vezes foi observada a melhor amplificação.

Foi possível observar no gel que o tamanho do fragmento amplificado correspondeu ao esperado de 433 pb, referente aos primers, mais os pares de base do grampo GC. Não foi observado o surgimento de bandas contaminantes que indiquem amplificação inespecífica.

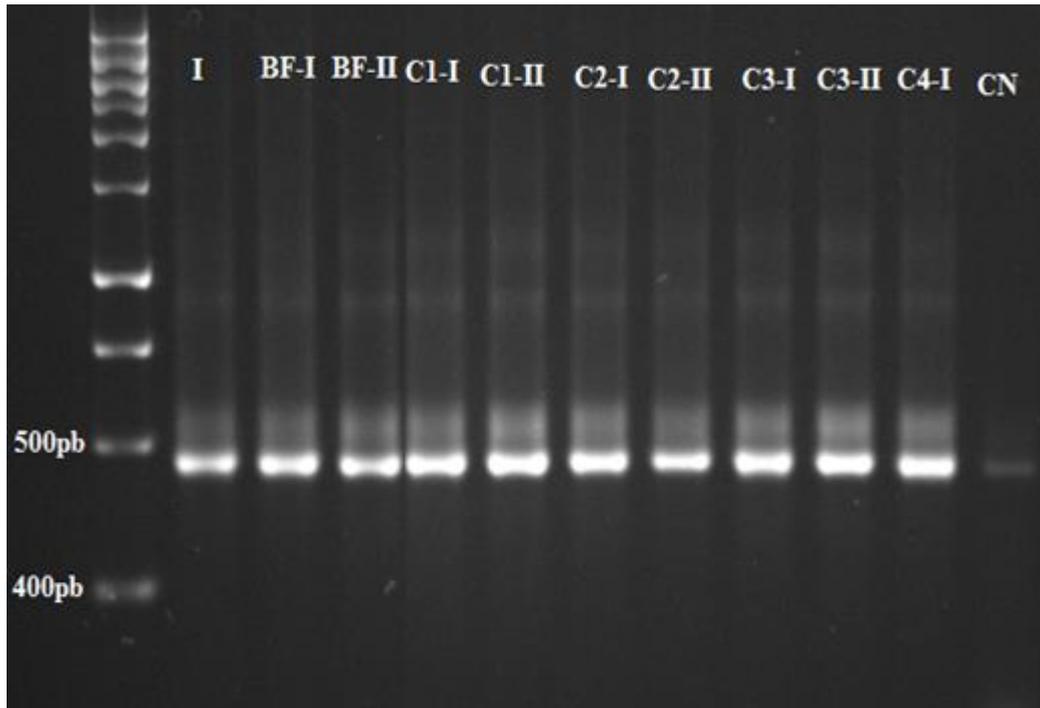


Figura 9 - Imagem do gel de agarose 1,5% contendo fragmentos de DNA Ribossomal 16S amplificados com os primers 968f-GC e 1401r do Domínio *Bateria*.

Amostras: I- inóculo; C1 – primeiro compartimento; C2- segundo compartimento; C3- terceiro compartimento; C4- quarto compartimento; BF- Biomassa flotada no primeiro compartimento e CN: controle negativo (Branco). I e II: primeira e segunda condição.

Fonte: Da autora.

O tamanho esperado (300 pb + GC) dos produtos de PCR utilizando os primers Arc 1100f-GC/ARC1400rGC para o Domínio *Archaea* foi também confirmado através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, e a imagem negativa encontra-se apresentada na Figura 10.

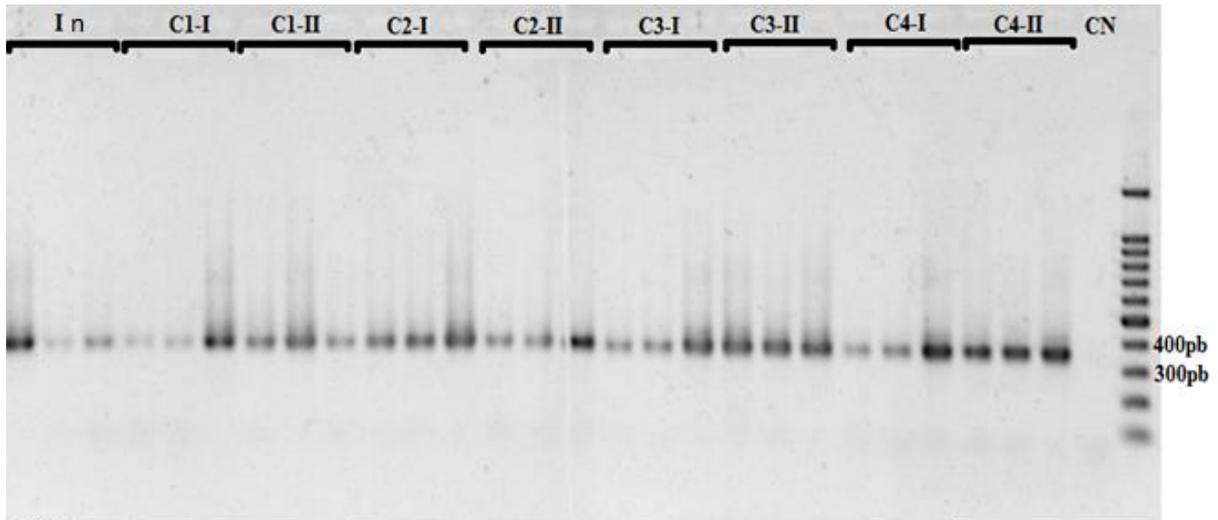


Figura 10 - Imagem negativa do gel de agarose 1,5% contendo fragmentos de DNA Ribossomal 16S amplificados com os primers ARC1100f-GC e ARC1400r do Domínio *Archaea*. Amostras retiradas no dia 50: In- inóculo; C1 - primeiro compartimento; C2- segundo compartimento; C3- terceiro compartimento; C4- quarto compartimento.

Fonte: Da autora.

5.2.1 Acompanhamento da diversidade microbiana pertencentes ao Domínio *Bacteria*, durante a operação do reator.

Amostras de biomassa dos compartimentos do reator foram coletadas no 50°, 150° (TDH de 3 dias) e 270° (120 dias de operação com TDH 1 dia) dias operacionais para acompanhamento da diversidade microbiana pertencentes aos domínios *Bacteria*, através da metodologia do DGGE, conforme descrito no item 4.4.4 de material e métodos.

No 50° dia operacional, primeira condição, o reator recebia uma DQO em torno de 3000 mg DQO/L com TDH de 3 dias.

A partir do perfil das bandas obtidas e visualizadas no gel foi possível comparar a dinâmica da população microbiana presente na biomassa flutada e nos diferentes compartimentos do ABR pelos quais o efluente passava ao longo do reator (C1, C2, C3 e C4) (Figura 11).

A partir desses perfis de bandas também foi possível apontar o comportamento adaptativo das *Bacterias* nos diferentes compartimentos.

Um quadro da matriz das bandas foi elaborado a fim de facilitar a visualização, distribuídos em canaletas que representam presença ou ausência das bandas (Figura 12).

Ao considerar o perfil das bandas obtidas nas amostras estudadas nota-se que tal perfil foi constituído por um total de 16 bandas diferentes distribuídas entre as amostras dos diferentes reatores e compartimentos (BF, C1, C2, C3, C4).

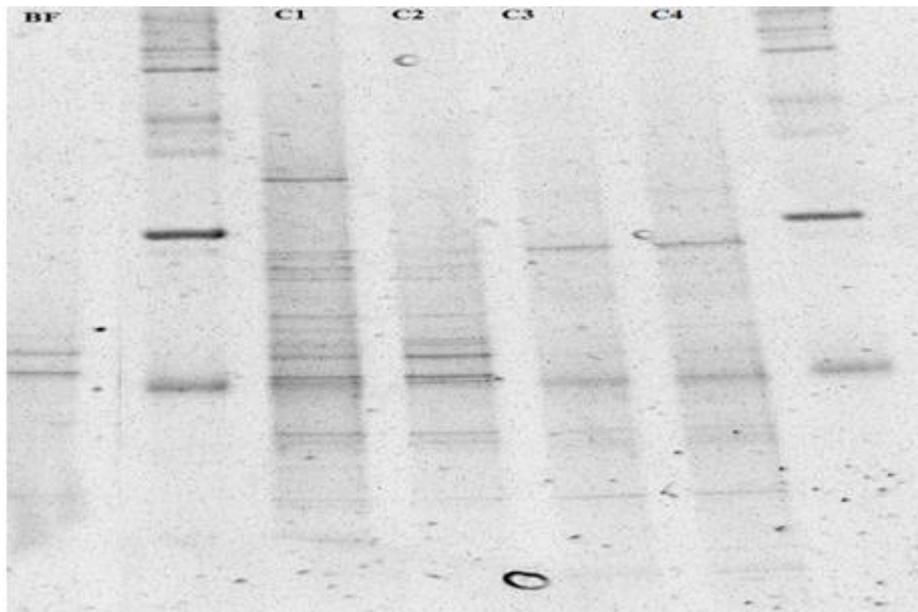


Figura 11 - Imagem negativa de gel de DGGE em gradiente desnaturante de 40-60%, corado com SybrGold, com fragmentos de DNAr 16S com os primers 968f-GC e 1401r das bandas do Domínio Bacteria. BF- Biomassa Flotada; C1- Compartimento 1; C2- Compartimento 2; C3- Compartimento 3; C4- Compartimento 4

Fonte: Da autora.

Bandas	BF	C1	C2	C3	C4	
A		■				
B		■				
C		■	■	■	■	
D		■				
E		■	■			
F		■				
G		■				
H		■				
I	■	■	■	■	■	
J	■	■	■	■	■	
K		■		■		
L	■	■	■	■	■	
M		■				
N		■		■		
O	■	■	■	■	■	
P		■				
Q		■				
		4	16	11	6	6
Presença						
Ausência						

Figura 12 - Quadro de apresentação da matriz de presença e ausência de bandas obtidas após a corrida DGGE para o domínio *Bacteria*.
Fonte: Da autora.

Foram identificadas 16 bandas no total, sendo que o primeiro compartimento do ABR apresentou a maior diversidade (16 bandas).

Ao comparar o C1 com os outros compartimentos obteve-se uma similaridade grande entre C1 e C2 de 81,48%, e ao comparar C1 com C3 e C4 encontrou-se uma similaridade menor de 54,54%. Interessante notar que das 16 bandas presentes em C1, somente 4 foram identificadas na biomassa flotada nesse compartimento. Tal resultado indica que a flotação da biomassa pode não somente diminuir a quantidade de microrganismos ativos no compartimento, como também afetar seu equilíbrio trófico, o que a depender das espécies flotadas, pode ser fatal para a eficiência de remoção de matéria orgânica.

Ao observar o desempenho em cada compartimento no 50º dia, observa-se uma maior remoção de substrato no primeiro compartimento (TABELA 7), chegando uma DQO muito menor nos compartimentos seguintes. Isso

demonstra que as condições diferentes de alimentação nos compartimentos afetam a microbiota envolvida na mineralização de AGCL.

Tabela 7 – Performance do reator ABR nos primeiros 50 dias de operação.

	DQOtotal (gDQO/l)	Eficiência relativa de remoção DQO (%)
Entrada	3224,69	0
C1	299,81	93,05
C2	224,05	25
C3	284,14	n.d.
C4	195	32
C5	131	32,8

Fonte: SANTOS, (não publicado)

Nos dois primeiros compartimentos pode-se observar que uma maior diversidade inicia a mineralização da matéria orgânica, e por consequência, tal compartimento apresentou maior produção de biogás, confirmada por estudos da eficiência do reator por SANTOS, 2016 (não publicado) onde C1 e C2 produziram 4,25 e 4,47 ml/min de biogás nesse período, enquanto C3 e C4 produziram 1,54 e 0,56 ml/min respectivamente, em função da carga orgânica volumétrica fornecida aos primeiros compartimentos.

Novas amostras foram retiradas no 150º dia operacional com um TDH de 72 horas e no 270º dia operacional com TDH de 24 horas. A partir dos perfis DGGE, essas amostras foram analisadas e o acompanhamento da mudança na diversidade microbiana foi realizado (Figura 13).

Utilizou-se então 9 amostras para construção dos padrões DGGE: Lodo do inóculo que foi utilizado em ambas condições, amostra I; Amostras Cx, onde x corresponde ao número do compartimento do ABR.

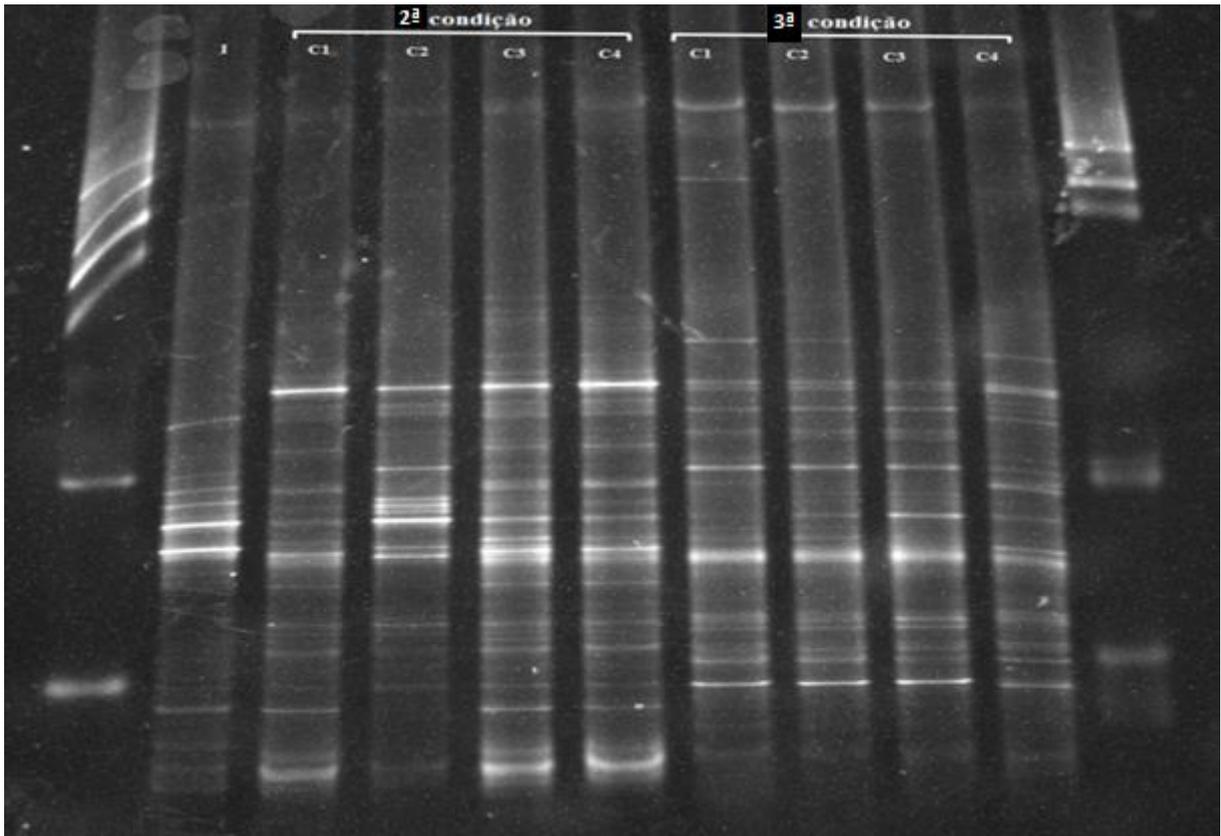


Figura 13 - Recorte da imagem do gel DGGE com gradiente 40-60%, contendo fragmentos do DNA ribossomal 16S, amplificados com os primers específicos 968f e 1401r de bandas de *Bacteria*. Amostras estão divididas nas duas condições nos diferentes compartimentos Cx (x correspondendo ao número de compartimento) e I o inóculo.

Fonte: Da autora.

O perfil apresentado nas diferentes condições de operação apresentou no total de 43 bandas diferentes, distribuídas entre inóculo e os compartimentos.

Com base nesses padrões DGGE foi estimada a diversidade bacteriana e conseqüentemente as mudanças nas comunidades. Um total de 9 amostras foram comparadas: amostra do inóculo do reator ABR, amostras retiradas dos diferentes compartimentos nas diferentes condições de TDH. Assim, a partir do perfil de bandas observou-se aparente modificação na comunidade bacteriana de uma condição para outra.

A Tabela 8 apresenta a performance do reator ABR nos diferentes dias operacionais (150 e 270 dias). E nota-se que já no primeiro compartimento boa parte da DQO é removida do sistema, esse compartimento ainda recebia a biomassa flotada e arrastada retida no compartimento 3, para assim

aumentar sua eficiência, enquanto a biomassa dos outros compartimentos (2, 3 e 4) utilizam os ácidos intermediários na degradação.

Tabela 8 – Condições de operação e desempenho do reator.

Fase	Compartimento	TDH (d)	Tempo Operação	DQO (g/l)	Ef. Remoção Relativa DQO
II	0			2936,7	0
	1			287,1	90,2
	2			245,1	14,6
	3	3	150 dias	239,8	2,1
	4			229,3	4,4
	5			218,1	4,9
III	0			3010,8	0
	1			728,8	75,2
	2	1	270 dias	710,5	2,5
	3			350,6	49,3
	4			326,9	6,7
	5			*n.d.	n.d.

Fonte: SANTOS, (não publicado)

*n.d. – não detectado

Ainda comparando o desempenho do reator com o perfil da comunidade bacteriana, foi observado nos compartimentos 3 e 4, que apesar da menor quantidade de DQO recebida, esses compartimentos apresentam um perfil de bandas mais diverso. Tal fato pode ser em função de tais compartimentos reterem biomassa arrastada advinda dos compartimentos com biomassa suspensa, e apresentarem ainda microrganismos advindos do inóculo, conservados no sistema em função da configuração da biomassa em tais compartimentos (fixa em espuma de poliuretano).

Quase que a totalidade da carga orgânica recebida pelo reator foi mineralizada nos compartimento 1 e 2; o que pode ter ocasionado a seleção de microrganismos capazes de degradar AGCL. Como já comentado

anteriormente, a maior diversidade foi encontrada no terceiro compartimento da segunda condição, que apresentou 24 bandas no total, diversidade essa que foi recuperada ao longo da operação do reator nesses 150 dias.

Pereira e colaboradores (2004) sugerem que o efeito inibitório do consórcio anaeróbio está na acumulação de AGCL e que esse efeito cessa e as comunidades microbianas retomam suas atividades e passam a mineralizar melhor o efluente rico em lipídios ao serem retiradas da acumulação de AGCL. No presente sistema, o contato dos microrganismos era cessado quando a biomassa era arrastada para o terceiro compartimento, e reiniciava somente quando a recirculação era realizada, a cada quinze dias, aproximadamente. Esse procedimento, ainda que distinto do realizado por Pereira e colaboradores (2004), provavelmente teve o mesmo efeito, ocasionando a adaptação da biomassa, contribuindo para o bom funcionamento do sistema.

É importante comentar que a menor diversidade bacteriana acontece no compartimento 1, compartimento em que ocorre a alimentação de substrato rico em gordura, o que sugere que no primeiro compartimento organismos específicos para ácidos graxos de cadeia longa estejam presentes.

5.1.1.1 Estudo do agrupamento e similaridade para o Domínio *Bacteria*

O programa *Bionumerics*® foi utilizado para realização do estudo de agrupamento e similaridades das bandas detectadas e visualizadas no gel DGGE. Esse software permite a análise combinada de todas as bandas do perfil eletroforético, a partir da construção de um dendrograma de similaridade, através do qual pode-se fazer observações em torno das diferentes condições operadas no reator ABR, bem como verificar as similaridades entre compartimentos (Figura 14).

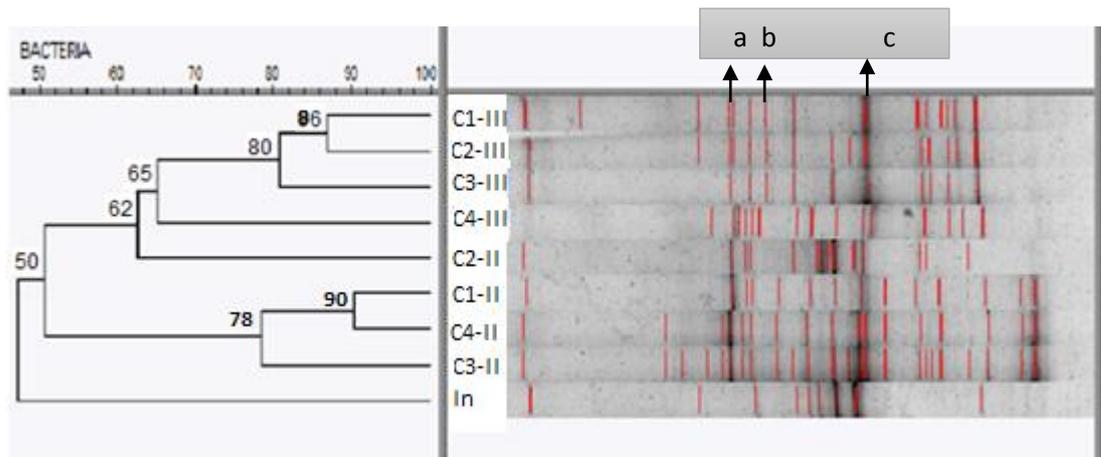


Figura 14 - Dendrograma de similaridade obtido através do programa *Bionumerics*®, Versão 7.1 Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, para o gel DGGE no Domínio *Bacteria*. Os perfis foram analisados pelo coeficiente de DICE utilizando o algoritmo UPGMA.

Fonte: Da autora.

No cluster principal apresentado pelo dendrograma, o coeficiente de similaridade entre as amostras foi de 50%. Pôde-se observar a partir dele, uma clara alteração da comunidade microbiana presente no inóculo com as estabelecidas nos compartimentos.

Sousa e colaboradores (2007), no tratamento de ácidos graxos de cadeia longa em reator UASB de alimentação contínua, também obtiveram uma mudança aparente nas comunidades, e através do mesmo coeficiente, suas amostras apresentaram em torno de 30% de similaridade com o inóculo.

A comunidade microbiana presente no inóculo (In) apresentou a similaridade de aproximadamente 63% com a biomassa presente no compartimento 1 no 150° dia operacional (C1-II). Essa mesma amostra (C1-II) quando comparada com o compartimento seguinte (C2-II) tem uma similaridade um pouco maior de 66%, e comparando C2-II, C3-II e C4-II com o inóculo do reator a similaridade é de 56%, 46% e 47% respectivamente.

Já a última condição de operação imposta ao reator demonstrou similaridade com o inóculo para os compartimentos C1-III, C2-III, C3-III e C4-III uma similaridade de 45%, 50%, 51% e 56% respectivamente.

Como a acumulação de AGCL se deu nos dois primeiros compartimentos, é possível supor que a maior carga orgânica destinada ao

C1-III e C2-III tenha resultado na menor diversidade microbiana observada. O dendrograma obtido também indica que, a maior carga de AGCL pode haver exercido pressão seletiva sobre esses dois compartimentos, com a seleção de microrganismos aptos a desintegração de AGCL.

Uma hipótese existente também é que o carregamento da biomassa ocorrido na terceira condição tenha influenciado na população microbiana. A comunidade microbiana apresentando uma baixa similaridade entre C1-II e C1-III, de 45%. Essa lavagem da biomassa para fora do reator foi mencionada por Pereira e colaboradores 2002. O grupo de pesquisadores indicou que a perda da biomassa associada à AGCL por lavagem acarreta numa diferença significativa na estrutura microbiana. Portanto, essa diferença na comunidade bacteriana pode ter ocorrido pelo fato de a terceira condição imposta ter um TDH menor (maior carga orgânica) e indicar uma lavagem maior da biomassa adsorvida com AGCL, que era, todavia, na medida do possível, recirculada. Tal recirculação era feita por descarga de fundo, todavia, a biomassa oriunda de desagregação de grânulos, provavelmente era retida nos interstícios do leito de poliuretano e não retornava ao compartimento 1.

Assim, pode-se inferir que um dos efeitos da acumulação de AGCL é a menor diversidade encontrada no primeiro compartimento. Nesse caso, a atividade das bactérias não foi inibida, apenas alguns microrganismos não estavam presentes no compartimento, portanto esses que permanecem no sistema podem estar relacionados a microrganismos selecionados a partir da alimentação com substrato gorduroso, aptos a degradá-lo.

Ao verificar os compartimentos seguintes, após longo contato com o substrato gorduroso, a diversidade microbiana é aumentada, isso indica que os microrganismos não foram inibidos permanentemente pela matéria orgânica rica em AGCL, e desenvolveram-se nos compartimentos subsequentes.

A partir deste fato, as teorias de efeito bactericida e de toxicidade permanente dos AGCL são novamente contrariadas. Acredita-se que o efeito inibitório, reversível, esteja ligado às funções de transporte de substrato afetando o contato entre líquido e a superfície das células (PEREIRA et al., 2004; PEREIRA et al., 2007).

O desempenho do reator, apresentado na Tabela 8, demonstra como a microbiota envolvida na degradação de ácidos graxos de cadeia longa não é inibida. O reator em ambas as fases apresentou uma alta eficiência na remoção de DQO em torno de 90% não apresentando uma diferença significativa, considerando-se os desvios padrões obtidos para a média de remoção de matéria orgânica nessas duas condições (Figura 1 do Anexo IV).

Ainda comparando as duas condições impostas ao reator, mesmo com similaridades em torno de 50% (C1-II e C1-III) é observado o surgimento de 3 bandas comuns (a, b e c) nesses compartimentos que se mantem até o fim do tratamento, em ambas condições. Tais bandas podem estar associadas à microrganismos específicos para esse tipo de substrato.

5.1.2. Acompanhamento da diversidade microbiana pertencentes ao Domínio *Archaea*, durante a operação do reator.

As amostras retiradas no 50º dia operacional apresentaram um perfil DGGE elaborado para o Domínio *Archaea* apresentado na Figura 15. Durante a operação, foi possível observar que nos últimos compartimentos C3 e C4 houve o desaparecimento de uma banda (a última visualizada nos outros compartimentos). É possível relacionar essa perda de diversidade com a menor carga orgânica recebida nesses compartimentos (C3 e C4), já que os compartimentos 1 e 2 realizaram a remoção de carga orgânica em torno de 90%.

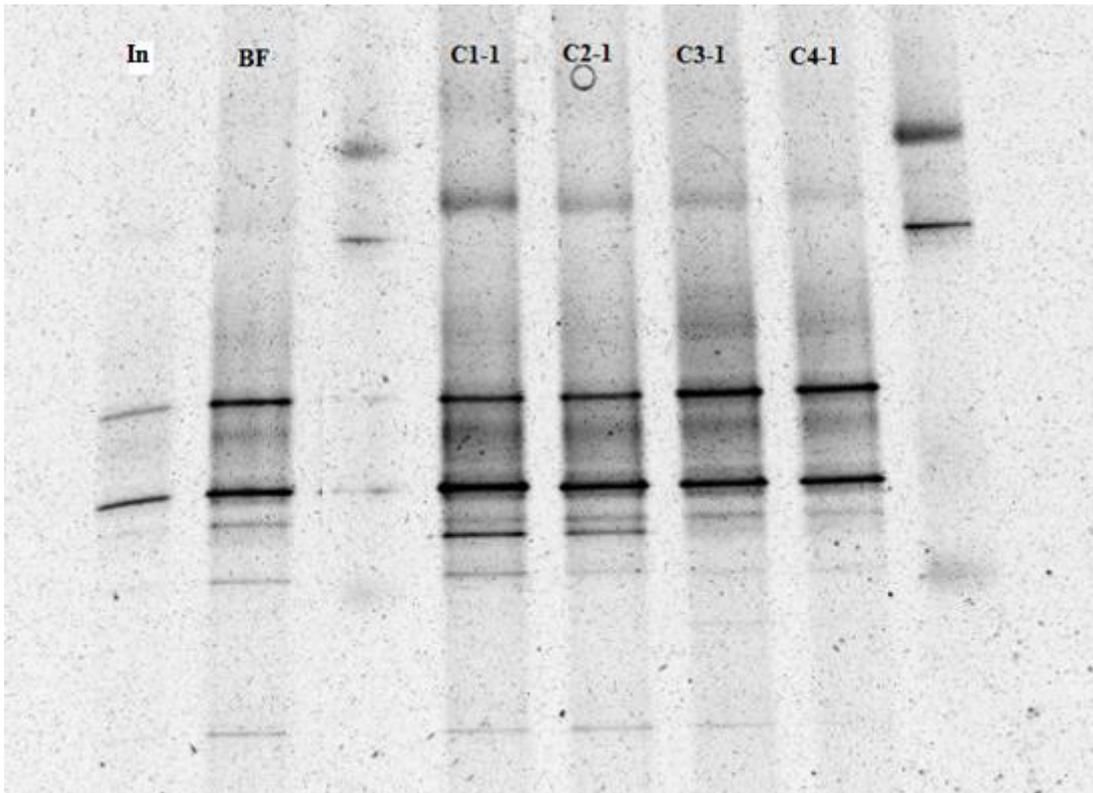


Figura 15 - Imagem negativa de gel de DGGE em gradiente desnaturante de 50-65%, corado com SybrGold, com fragmentos de DNAr 16S com os primers Arc 1100f e Arc 1400r. Em evidência as bandas que desapareceram nos dois últimos compartimentos do ABR.

I- inóculo; C1 - primeiro compartimento; C2- segundo compartimento; C3- terceiro compartimento; C4- quarto compartimento; BF- Biomassa flotada no primeiro compartimento e B: controle negativo (Branco).

(Os perfis não marcados são padrões utilizados na corrida)

Fonte: Da autora.

Para melhor visualização das bandas o quadro da Figura 16 foi construído, onde cada canaleta representa ausência ou presença de bandas conforme visualizado no gel.

Bandas	In	BF	C1	C2	C3	C4
A						
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						
I						
Total=9		2	6	8	8	7
Presença						
Ausência						

Figura 16 - Quadro de apresentação da matriz de presença e ausência de bandas obtidas após a corrida DGGE para o domínio Archaea. In- inóculo; BF- Biomassa flotada e Cx onde x corresponde ao número de compartimentos.

Fonte: Da autora.

Considerando o perfil das bandas obtidas nas amostras é possível observar que essas amostras eram constituídas por uma diversidade de *Archaea* representada por 9 bandas diferentes distribuídas pelas amostras (In, BF, C1, C2, C3 e C4) conforme apresentado na tabela.

Dentre as bandas, nota-se que duas (C e E) se mantiveram desde o inóculo até o fim do tratamento nos diferentes reatores e compartimentos, e que quatro delas (D, F, H, I) se mantiveram desde a partida dos reatores, sendo esses microrganismos representados, resistentes no tratamento de compostos gordurosos, possivelmente importantes para o tratamento eficiente de AGCL.

Pode-se observar o surgimento de bandas apenas nos compartimentos C1 e C2, o que provavelmente ocorreu em função de maiores concentrações de matéria orgânica, e por consequência, de maiores concentrações dos substratos da metanogênese.

O presente estudo possibilita a visualização de modificações na comunidade archaeal, onde o índice de similaridade entre inóculo e compartimento 1 foi de 40%, e após esse período de adaptação de biomassa, a similaridade aumentou entre os compartimentos, onde C1 tem 100% de similaridade com C2, 87,5% com C3 e 85,7% com C4.

Sousa e colaboradores (2007) trabalharam com UASB com alimentação contínua de AGCL, e observaram modificações na estrutura da comunidade microbiana archaeal envolvida no processo. Quando compararam amostras do inóculo do UASB e amostras envolvidas na degradação de AGCL, observaram que a segunda apresentava microbiota adaptada à substrato rico em gordura.

Fazendo um comparativo da microbiota do Domínio *Archaea* entre as diferentes condições abordadas no estudo, ainda utilizando as técnicas PCR-DGGE obteve-se, portanto, os perfis DGGE que foram analisados entre a 2ª condição com TDH de 3 dias e a 3ª condição com TDH de 1 dia (Figura 17).

Para essa comparação amostras do final da operação do período com tempo de detenção de 3 dias (150 dias) e na segunda condição (270 dias) foram retiradas. Utilizaram-se então 10 amostras para construção dos padrões DGGE: Lodo do inóculo para as duas condições, amostra In; Amostras Cx, onde x corresponde ao número do compartimento do ABR.

A diversidade microbiana e mudanças na comunidade archaeal presente no reator compartimentado durante duas condições distintas foi estimada por fragmentos do gene 16S rRNA (Figura 17).

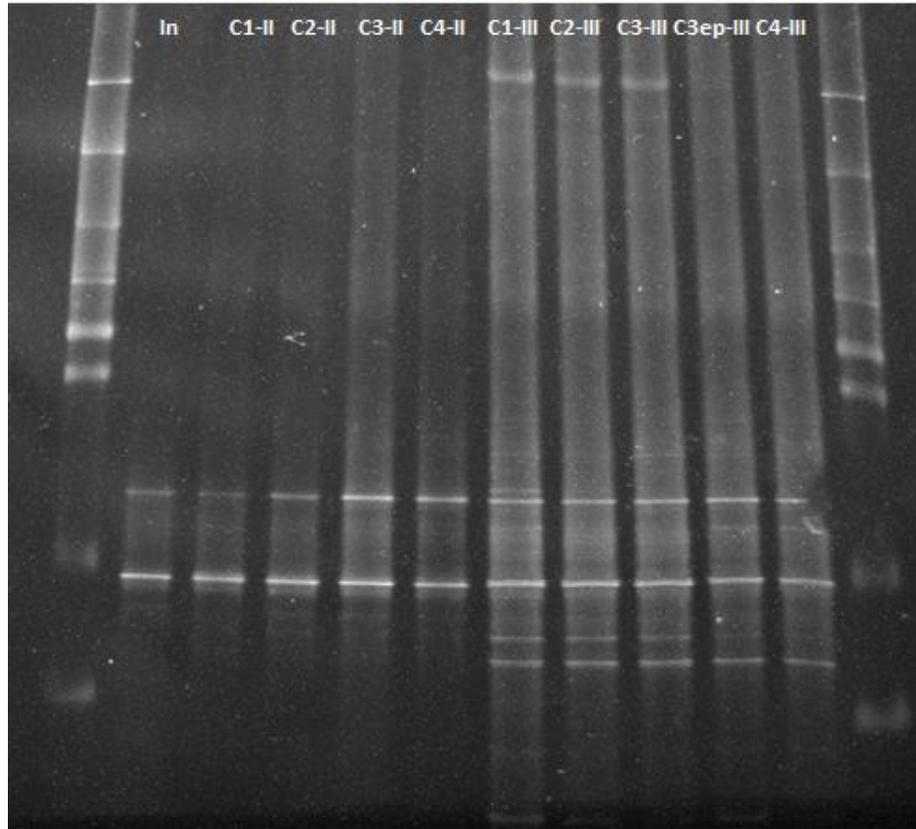


Figura 17 - Imagem de gel de DGGE em gradiente desnaturante de 50-65%, corado com SybrGold, com fragmentos de DNAr 16S com os primers Arc 1100f e Arc 1400r.

Amostras: In- inóculo; C1 – primeiro compartimento; C2- segundo compartimento; C3- terceiro compartimento; C4- quarto compartimento; II e III correspondendo a 2^a e 3^a condição respectivamente. C3 ep é a amostra que está presente na espuma de poliuretano e II-C3 é a biomassa que foi lavada de II-C2 para II-C3.

Fonte: Da autora.

A imagem do gel revela uma diferença na comunidade archaeal de uma condição para outra. Havendo mais bandas correspondentes e aparentes na terceira condição (TDH de 1 dia), quando a carga orgânica volumétrica era três vezes superior à aplicada na condição anterior.

5.1.1.2 Estudo do agrupamento e similaridade para o Domínio *Archaea*

O programa *Bionumerics*® foi utilizado para realização do estudo de agrupamento e similaridades das bandas detectadas e visualizadas no gel DGGE (Figura 18).



Figura 18 - Dendrograma de similaridade obtido através do programa *Bionumerics*®, Versão 7.1 Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, para o gel DGGE no Domínio *Archaea*.

Os perfis foram analisados pelo coeficiente de DICE utilizando o algoritmo UPGMA.

Cx, corresponde aos compartimentos, onde x é o número de compartimentos; II e III corresponde às condições 2 e 3 respectivamente; In- Inóculo; C3ep-III corresponde à biomassa no terceiro compartimento e C3-III a biomassa arrastada dos C1 e C2-III para C3-III.

Fonte: Da autora.

O cluster principal apresentado no dendrograma apresentou uma similaridade em torno de 40% entre as amostras nas diferentes condições. De um modo geral as amostras de cada condição não tiveram muita mudança na comunidade archaeal, em contrapartida comparando as duas condições a mudança já é mais aparente.

Na segunda condição quase não houve alteração a partir do inóculo, tendo um índice de similaridade entre o primeiro compartimento e o inóculo de 100%.

Já na terceira condição bandas que surgem na partida do reator se mantem até o final do tratamento. Essa mudança na comunidade archaeal e sua estabilidade até o final da operação foi observada em Salvador et al. 2012,

onde a resistência das archaeas metanogênicas foi testada aplicando-se uma estratégia de etapas sequenciais de alimentação intermitente.

No presente estudo a imagem DGGE apresenta bandas que se mantiveram resistentes do início ao fim do tratamento e algumas bandas que surgiram sendo de relevância para o tratamento de AGCL.

Na segunda condição é possível observar uma maior estabilização da comunidade archaeal. Organismos presentes no inóculo se mantiveram no compartimento 1, que tem 100% de similaridade com amostra do inóculo. Essa similaridade caiu para 80% comparando com o segundo compartimento e para 62% com os compartimentos C3-II e C4-II. Esse resultado demonstra a adaptação das archaeas onde C3-II e C4-II recebem efluentes tratados por C1-II e C2-II.

Ao comparar as amostras da terceira condição, os compartimentos apresentaram um número maior de bandas ao longo da operação, as amostras dos dois primeiros compartimentos C1-III e C2-III tem 95% de similaridade, e retratam pelo perfil das bandas o surgimento de bandas importantes na degradação de AGCL ao longo dos dias operacionais.

Em função do aumento da carga orgânica volumétrica aplicada, observou-se, como comentado anteriormente, arraste de biomassa dos dois primeiros compartimentos para o terceiro. Essa biomassa carregada foi amostrada como C3-III e tem alta similaridade com C2-III (90%). Uma diferença maior ocorre entre os compartimentos C1-III e C2-III quando comparados com C3-III e C4-III, a partir desse fato é possível dizer que os últimos compartimentos ao 270° dia de operação tem uma comunidade archaeal adaptada, com microrganismos diferentes, em função de menores concentrações de substrato. Já em C1-III e C2-III onde ocorre praticamente toda a degradação de AGCL, observaram-se desaparecimento de algumas bandas, o que provavelmente ocorreu em função de maiores concentrações de AGCL. Santana e colaboradores (2014), verificaram situação semelhante em reatores operados em batelada sequencial alimentados com efluentes de laticínios. Através de exames microscópicos, os autores verificaram que microrganismos fluorescentes presentes no inóculo do sistema não puderam mais ser observados após 570 dias de operação do reator.

Através da eficiência dos reatores calculados por SANTOS, 2016 (não publicado) (TABELA 8), observa-se que a remoção em ambas condições é muito similar, não podendo dizer que uma condição foi mais eficiente que a outra. Todavia, é notável o aumento de matéria orgânica ao longo dos compartimentos. Portanto, o aparecimento de bandas específicas na terceira condição provavelmente está relacionado ao aumento de concentração de matéria orgânica, o que contribuiu para a manutenção da eficiência global do sistema. É possível que bandas relacionadas a microrganismos que surgiram tenham iniciado uma competição por substrato ou uma simbiose com os organismos antes presentes. Foi possível então observar que ao longo da operação ocorreu a adaptação da comunidade microbiana.

A partir dos resultados apresentados no perfil pode-se concluir que as metanogênicas não sofrem grandes alterações como no Domínio *Bacteria*, o que é comum em outros estudos (Santana et al. 2014). E que as bandas persistentes no tratamento são importantes para a efetiva mineralização de carga orgânica rica em lipídios.

5.2 ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA (AME)

A partir da metodologia citada o resultado da AME das amostras foi calculado. A determinação da produção de metano com os substratos, acetato e formiato, foi feita por cromatografia gasosa e plotada em gráficos (ANEXO IV). Com a realização dessa análise foi possível verificar se a capacidade de produção metanogênica original da biomassa (mensurada no inóculo) foi afetada ao longo da operação do sistema.

5.2.1 Ensaio com formiato e acetato

O ensaio foi realizado somente com amostras oriundas dos compartimentos 1 e 2, onde a maior parte da matéria orgânica era removida. Os compartimentos 3 e 4 recebiam uma carga orgânica muito menor, com

ausência de AGCL, já que a maior parte da DQO era removida pelos C1 e C2, por isso não foram utilizados no ensaio.

A relação alimento/microrganismos nos frascos-reatores foi de 0,5 g DQO/g STV e o tempo dos ensaios foi de 77 horas com formiato e 71 horas com acetato.

Com um gráfico de produção de metano *versus* tempo selecionou-se a maior inclinação, e a partir dela relacionou-se à maior atividade metanogênica, pelo coeficiente angular da reta.

A atividade metanogênica hidrogenotrófica foi testada com a adição de formiato nos ensaios. A amostra de lodo do compartimento 2 do ABR teve sua atividade afetada pelo contato com AGCL. Isso ficou demonstrado a partir da comparação da atividade metonogênica específica apresentada pelo inóculo que foi de 0,2388 mmolCH₄/gSTV.h e 0,1977 mmolCH₄/gSTV no compartimento 2, valores apresentados na Tabela 9.

O compartimento 1 parece não ter tido sua atividade metanogênica hidrogenotrófica afetada, tendo uma produção metanogênica de 0,2491 mmolCH₄/gSTV.h.

Tabela 9 – Atividade metanogênica específica exibidas pelas diferentes amostras de lodo.

Amostras	Atividade metanogênica específica (mmolCH₄/gSTV.h)	
	Formiato	Acetato
Inóculo	0,2256	0,2388
Compartimento 1	0,2491	0,3949
Compartimento 2	0,1977	0,4719

Fonte: Da autora.

As amostras retiradas do reator compartimentado após longo período de contato com AGCL mostraram um aumento significativo na atividade metanogênica acetoclástica, onde no inóculo o valor de 0,2388 mmolCH₄/gSTV.h passou para 0,3949 e 0,4719 nos compartimentos 1 e 2 respectivamente.

Esses resultados sugerem que a biomassa, após longo contato com AGCL, tem uma produção de metano maior. Cavaleiro e colaboradores (2009) através de um tratamento intermitente de AGCL obtiveram uma crescente produção metanogênica das amostras inoculadas em ensaio AME entre as fases de alimentação e degradação de lipídios, demonstrando uma crescente habilidade do consórcio microbiano em degradar substratos após contato com AGCL.

Esse resultado pôde ser observado entre os compartimentos e o inóculo, onde a atividade metanogênica do consórcio microbiano presente nas amostras foi gradativamente aumentando (I, C1 e C2).

Os compartimentos 1 e 2, alimentados continuamente por AGCL apresentaram uma fase de latência já observadas em estudos anteriores (ALVES, 2001; CAVALEIRO et al., 2009; PEREIRA et al, 2004 e 2007).

Essa fase lag é relacionada com a acumulação de lipídios por adsorção na biomassa, e posterior adaptação. A biomassa nessas condições apresentou maior atividade metanogênica específica quando comparadas com o inóculo, onde a capacidade de produzir metano do lodo presente nos compartimentos foi muito maior que a capacidade do inóculo na produção metanogênica.

Uma inibição metabólica ou de limitações físicas foi sugerida por Pereira e colaboradores (2004), sugerindo também, a partir de dados experimentais, um decréscimo na capacidade de mineralizar substratos quando a biomassa entra em contato com AGCL em quantidades maiores que 1000 mg DQO/g SSV. Tal inibição não se confirmou no presente ensaio pois, o reator não foi exposto a tal condição.

Os resultados apresentados no presente estudo evidenciam que após modificações importantes, a comunidade microbiana anaeróbia apresentou uma alta capacidade de degradar os compostos fornecidos pela alimentação. Este trabalho representa então um importante passo na degradação anaeróbia de efluente rico em lipídios, pois analisa pela primeira vez a comunidade microbiana em ABR alimentado com efluente concentrado de laticínios.

CONCLUSÕES

A comunidade microbiana presente no ABR alimentado com concentrações crescentes de matéria orgânica sofreu modificações importantes.

As modificações mais intensas foram verificadas na comunidade do Domínio *Bacteria*, e se deram em função das diferenças entre o substrato fornecido ao inóculo do reator e ao reator ao longo de sua operação.

Análises de AME evidenciaram que o lodo advindo do primeiro compartimento do reator, a despeito de ter sido exposto à maior carga de AGCL, teve sua capacidade de produção metanogênica acetoclástica aumentada.

A partir destes resultados pode-se inferir também que a rota de degradação de lipídios é uma rota acetoclástica e sabe-se que a β -oxidação tem uma rota via acetato, ajudando nas conclusões entorno do metabolismo bioquímico das *Archaeas*.

O estudo evidenciou a capacidade de adaptação do lodo anaeróbio, o que resultou nas elevadas eficiências de remoção de matéria orgânica em reator ABR. O estudo evidencia ainda que tais adaptações são preponderantes para a promoção da mineralização de efluentes gordurosos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E., ARAÚJO, J. **Procedimento operacional padrão para realização do ensaio de atividade metanogênica específica (AME) de lodos anaeróbios.** Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/UFMG, Procedimento Operacional Padrão (POP) de rede PROSAB Microbiologia para o Saneamento básico. Área: Bacteriologia. BH: 2010. 23 p.
- ABREU, E. **Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário.** 2007. 170 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – UFMG, Belo Horizonte, 2007.
- ABREU, M. N., **Tratamento de águas residuárias de suinocultura em reator anaeróbio compartimentado seguido de reator UASB.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) - UNESP, Jaboticabal, 2007.
- ALMEIDA, R. e SHNEIDER, R. **Desenvolvimento, validação e aplicação de método molecular baseado na análise do rRNA para a identificação das bactérias formadoras de biofilme metabolicamente ativas na superfície de membranas de osmose reversa.** 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Inst. Butantan, USP/IPT, SP, 2009.
- ALVES, M. M., et al. Effects of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors Part II: oleic acid toxicity and biodegradability. **Water Res**, v. 35, p. 264-270, 2001.
- ALVES, M. M., et al. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA), **Microb. Biotechnol.**, v. 2, p. 538-550, 2009.
- ANDRADE, L. H. **Tratamento de efluente de indústria de laticínios por duas configurações de biorreator com membranas e nanofiltração visando reuso.** 2011. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – UFMG, Belo Horizonte, 2011.
- BELI, E., **Estudo da diversidade microbiana em reator ASBR no tratamento da drenagem ácida de minas sintética sob diferentes condições operacionais.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – UNIFAL, Poços de Caldas, 2014.
- BOOPATHY, R. Biological treatment of swine waste using anaerobic baffled reactors. **Bioresource Technology**. v. 64, p. 1-6, 1998.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J., **Brock Biology of Microorganisms**, New York: Prentice-Hall International Editions, 1997.

CAVALEIRO, A., et al. Continuous high rate anaerobic treatment of oleic acid based wastewater is possible after a step feeding start-up. **American Chemical Society**, v. 43, p. 2931-2936, 2009.

CHERNICHARO, C. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2. ed. BH: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 2000. 377 p. v. 5.

CARVALHO, G.R. A indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. Juiz de Fora-MG. Circular Técnica, EMBRAPA, 2010.

FERNANDES, G. F. R., OLIVEIRA, R. A., Desempenho de processo anaeróbico em dois estágios (reator compartimentado seguido de reator UASB) para tratamento de águas residuárias de suinocultura, **SciELO Brasil**, v. 26, n: 1, 2006.

GROBICKI, A., STUCKEY, D., Performance of the anaerobic baffled reactor under steady state and shock loading conditions, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 37, p. 344-355, 1991.

HENTSCHEL, U. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.09, p. 4431-40, 2002.

HEUER, H; et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation. **Applied Environ. Microbiol.** v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HILL, T. C. J., WALSH, K. A., HARRIS J. A., MOFFET, B. F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **Microbiology Ecology**, v. 43, p. 1-11, 2003.

HWU, C. S., et al. Thermophilic high-rate anaerobic treatment of wastewater containing long-chain fatty acids: effect of washed out biomass recirculation. **Biootechnology Letters**. v. 19, p. 453-456, 1997.

JEGANATHAN, J., NAKHLA, G., BASSI, A. Long-term performance of high-rate anaerobic reactors for the treatment of oily wastewater. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 6466- 6472, 2006.

KONIG, A., LIMA, L. M., CEBALLOS, B. S. **Comportamento das águas residuárias brutas e tratadas provenientes de uma indústria de laticínios durante um dia de funcionamento**. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27. 2000. Porto Alegre-RS, 2000.

KOSTER, I. W., CRAMER, A., Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 403-409, 1987.

KOZDRÓJ, J., ELSAS, J. D. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE

fingerprinting and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**, v. 17, p. 31–42, 2001.

KUDO, Y., et al. Methanogen flora of paddy soils in Japan. **FEMS Microbiol. Ecology**, v. 22, p. 39-48, 1997.

LANGENHOFF, A., INTRACHANDRA, N., STUCKEY, C., Treatment of dilute soluble and colloidal wastewater using an anaerobic baffled reactor: Effect of low temperature, **Wat. Res.**, v. 34, p. 1307-1317, 2000.

LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67: p. 3-28, 1995.

MATOS, R. M. B., SILVA, E. M. R., BERBARAA, R. L. L. **Biodiversidade e índices**. Seropédica-RJ. EMBRAPA, 1999.

MIRON, Y., et al. The role of sludge retention time in the hydrolyses and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems, **Water Research**, v. 34, p. 1705-1713, 2000.

MYERS, R., et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel-electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 3131-3145, 1985.

NIRENBERG, L. P. **Tratamento de águas residuárias de indústria de laticínios: eficiência e análise de modelos matemáticos do projeto da Nestlé**. Goiânia, 18 p. Trabalho não publicado. Disponível em: <<http://www.ucg.br/ucg/prope/cpgss/ArquivosUpload/36/file/TRATAMENTO%20DE%20%C3%81GUAS%20RESIDU%C3%81RIAS%20DE%20IND%C3%9ASTRIA%20DE%20LATIC%C3%8DNIOS%E2%80%A6.pdf>> Acesso em: 22 abr. 2015

NUBEL, U., et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

PEREIRA, M.A., et al. Anaerobic degradation of oleic acid by suspended and granular sludge: identification of palmitate as a key intermediate. **Water Science & Technology**, v. 45, p. 139-144, 2002.

PEREIRA, M., et al. Mineralization of LCFA associated with anaerobic sludge: Kinetics, enhancement of methanogenic activity and effect of VFA. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 502-511, 2004.

PERLE, M., KIMCHIE, S., SHELEF, G. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. **Water Research**, v. 29, p. 1549-1554, 1995.

PETRUY, R., LETTINGA, G. Digestion of a milk-fat emulsion. **Bioresource Technology**, v.61, p. 141-149, 1997.

RAJARD, L., POLY, F., NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 167–177, 2000.

RINZEMA, A. Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular sludge bed reactors. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 527-537, 1993.

ROEST, K., et al. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. **Science Direct**, 2004.

SANTANA, R. S., et al. Long-term operation of na ASBBR used to treat dairy effluent: Effect of the recirculation rate on system monitoring, and key microorganisms. **Water, air and soil pollution**, v. 25, p. 1-13, 2014.

SANTOS, L. K., **Tratamento de efluentes gordurosos em reatores anaeróbios compartimentados: metanogênese, metabólitos e possibilidades de reuso.** Dissertação (Mestrado em andamento em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Eng. De Alimentos. USP, Pirassununga/SP. Não publicado.

SALVADOR, A. F., et al. Endurance of methanogenic archaea in anaerobic bioreactors treating oleate-based wastewater. **Environmental Biotechnology**, v. 97, p. 2211-2218, 2013.

SASSE, L., **Decentralised wastewater treatment in developing countries.** Bremen-AL. Bremen Overseas Research and Development Association (BORDA), 1998.

SAWYER, C.N., Mc CARTY, P. L., PARKIN, G. F. **Chemistry for Environmental Engineering**, 4. ed. Nova York: Mc Graw-Hill Book Company. 1994.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in degradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n.2, p. 262-280, 1997.

SILVA G. H. R. **Reator compartimentado anaeróbio/aeróbio tratando esgoto sanitário: Desempenho e operação.** 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – UNICAMP, Campinas, 2001.

SILVA, A. J., et al. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v.12, p. 93-98, 2006.

SILVA, D. J. P. **Resíduos na indústria de laticínios.** Viçosa: UFV, 2011.

SILVEIRA, E. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA.** 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP, 2004.

- SOUSA, D. Z., et al. Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. **FEMS Microbial Ecol**, v. 60, p. 252-265, 2007.
- SOUSA, D. Z., et al. Anaerobic microbial LCFA degradation in bioreactors, **Water Science & Technology**, v.57.3, p. 439-444, 2009.
- TOMMASO, G. **Tratamento de efluentes gordurosos em reatores anaeróbios compartimentados e de manta de lodo invertidos: metabólitos, microbiota e possibilidades de reuso.** Projeto de pesquisa, FZEA-USP, Pirassunanga-SP, 2013.
- U.S., **Emerging Technologies for biosolids management**, U.S.: Enviromental Protection Agency (EPA), 2006.
- VEIGA, A. A. **Biodegradação de gordura em efluente através da adição controlada de enzimas e microorganismos em reatores aeróbios em série.** 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da UERJ, Rio de Janeiro (RJ), 2003.
- VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgoto.** Belo Horizonte – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG. 1996. 211 p. v. 2.
- WANG, J., HWANG, Y., ZHAO, X., Performance and characteristics of an anaerobic baffled reactor. **Biosource Technology**, v. 93, p. 205-208, 2004.
- WOESE, C., et al. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids, **Microbiological Reviews**, v. 47, p. 621-669, 1993.
- ZANELLA, L. **Partida de um reator compartimentado híbrido anaeróbio/aeróbio tratando esgoto sanitário.** 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo de Extração de DNA – Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®)

Adicionar 1 mL de cultura overnight em um tubo de microcentrifuga ependorf de 1,5 µL;

Centrifugue a 13.000-16.000×g por 2 minutos para separar as células. Remover o supernadante; Adicionar 600 µL de Nuclei Lysis Solution, pipetando gentilmente até que as células sejam resuspendidas;

Incubar a 80°C por 5 minutos para lisar as células. Resfriar em temperatura ambiente;

Adicionar 3 µL de RNase solution para o lisado. Inverter o tubo 2-5 vezes para misturar;

Incubar a 37°C por 15-60 minutos. Resfrie a amostra em temperatura ambiente;

Adicione 200 µL de Protein Precipitation Solution para o tubo contendo o lisado. Coloque no vórtex a alta velocidade por 20 segundos para misturar a solução de Protein Precipitation Solution com o lisado;

Incubar em gelo por 5 minutos;

Centrifugar a 13.000-16.000×g por 3 minutos;

Transferir o supernadante contendo o DNA para um tubo ependorf limpo contendo 600µL de isopropanol;

Misturar gentilmente por inversão até que se forme uma massa visível de filamentos filiformes de DNA;

Centrifugar a 13.000-16.000×g por 2 minutos;

Cuidadosamente descartar o supernadante e drene o tubo em papel absorvente. Adicionar 600µL de etanol 70% e gentilmente inverter o tubo várias vezes para lavar o DNA;

Centrifugar 13.000-16.000×g por 2 minutos. Cuidadosamente aspirar o etanol;

Drenar o tubo em papel absorvente limpo e permitir que seque ao ar por 10-15 minutos; Adicionar 100µL de DNA Rehydration Solution e reidratar o DNA incubando a 65°C por uma hora. Periodicamente misture a solução por leves toques no tubo. De forma alternativa, reidratar o DNA pela incubação da solução overnight a temperatura ambiente ou a 4°C.

ANEXO B – Protocolo de Extração de DNA - Power Soil DNA Isolation Kit
(MoBio®)

Adicionar 0,25g de amostra de solo no PowerBead Tubes fornecido;
Misturar gentilmente com vortex;

Verificar a Solução C1, se conter precipitado, aquecer a solução em 60°C até dissolver antes do uso; Adicionar 60µl de Solução C1 e inverte várias vezes ou vortex brevemente;

Segurar o PowerBead Tubes horizontalmente usando tubo Adapter Vortex para o vórtice; ou tubos colocados horizontalmente em uma almofada vortex flat-bed com fita adesiva; Vortex à velocidade máxima por 10 minutos;

Colocar os tubos PowerBead em centrifuga, 10.000x g durante 30 segundos à temperatura ambiente; Transferir o sobrenadante para um tubo limpo 2 ml Collection Tube (fornecido). Nota: Espera-se entre 400 a 500µl de sobrenadante. O sobrenadante ainda pode conter algumas partículas do solo;

Adicionar 250µl de Solução C2 e vortexar por 5 segundos. Incubar a 4°C durante 5 minutos; Centrifugar os tubos à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g. Transferir o sobrenadante para um 2 ml Collection Tube limpo, e evitar o pellet, no máximo 600µl de sobrenadante;

Adicionar 200µl de Solução C3 e vortexar brevemente. Incubar a 4°C por 5 minutos; Centrifugar os tubos à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g. Transferir o sobrenadante para o tubo Collection Tube limpo de 2 ml, evitando o pellet, não mais do que 750µl de sobrenadante;

Agitar a Solução C4 para misturar antes do uso. Adicionar 1200µl de Solução C4 sobre o sobrenadante e vortex durante 5 segundos; Centrifugar a 10000 xg durante 1 minuto;

Descartar o líquido e adicionar 675µl de Solução C4 sobre o Spin Filter e centrifugar a 10000 xg durante 1 minuto à temperatura ambiente. Repetir este procedimento três vezes;

Adicionar 500µl da Solução C5 e centrifugar à temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. Eliminar o líquido; Centrifugar à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g. Com cuidado, coloque o Spin Filter em um 2 ml Collection Tube limpo;

Adicionar 100µl de Solução C6 no centro da membrana do filtro. Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. Descartar o Spin Filter. O DNA no tubo está pronto para qualquer aplicação. Armazenar o DNA no congelador.

ANEXO C – Procedimento para a técnica de DGGE - Loccus Biotecnologia

Montar as placas de vidros juntamente com o espaçador e o pente. Apertar com grampos; conectar a mangueira da bomba peristáltica ao sistema de placas de vidro; Preparar 2 mL de cada solução gradiente para formação do gradiente;

Adicionar 150 μ L APS 10% em cada 25 mL das soluções;

Adicionar 12 μ L TEMED em cada 25 mL das soluções. Agite;

Carregar o misturador com as respectivas soluções (A e B). Colocar o misturador sobre o agitador magnético com imã no tubo A. Abrir o misturador e ligar a bomba peristáltica para permitir a mistura das soluções;

Depois de passar toda solução colocar o pente e esperar solidificar por uma hora;

Carregar a cuba com 16 L de TAE 0,5X.

Aquecer a cuba até que atinja 60°C;

Colocar o cassete no aparato com o tampão já aquecido. Empurrar o espaçador do gel para baixo. Retirar as bolhas de ar que se formarem na parte inferior do cassete;

Conectar a mangueira de fluxo do tampão no cassete;

Conectar os plugs elétricos;

Abrir a mangueirinha para lavar os pocinhos do gel e preenchê-los com tampão;

Antes de carregar as amostras, desligar o fluxo de tampão;

Carregar as amostras;

Ligar a fonte e programara voltagem e o tempo. Deixar a corrida seguir por 5 minutos;

Ligar a mangueira do fluxo de tampão. Checar a amperagem;

Finalizada a corrida, desligar a cuba e a fonte. Retirar o cassete da cuba. Soltar os parafusos e retirar as placas do cassete;

Remover o gel e corar.

ANEXO D – Gráficos elaborados durante o estudo

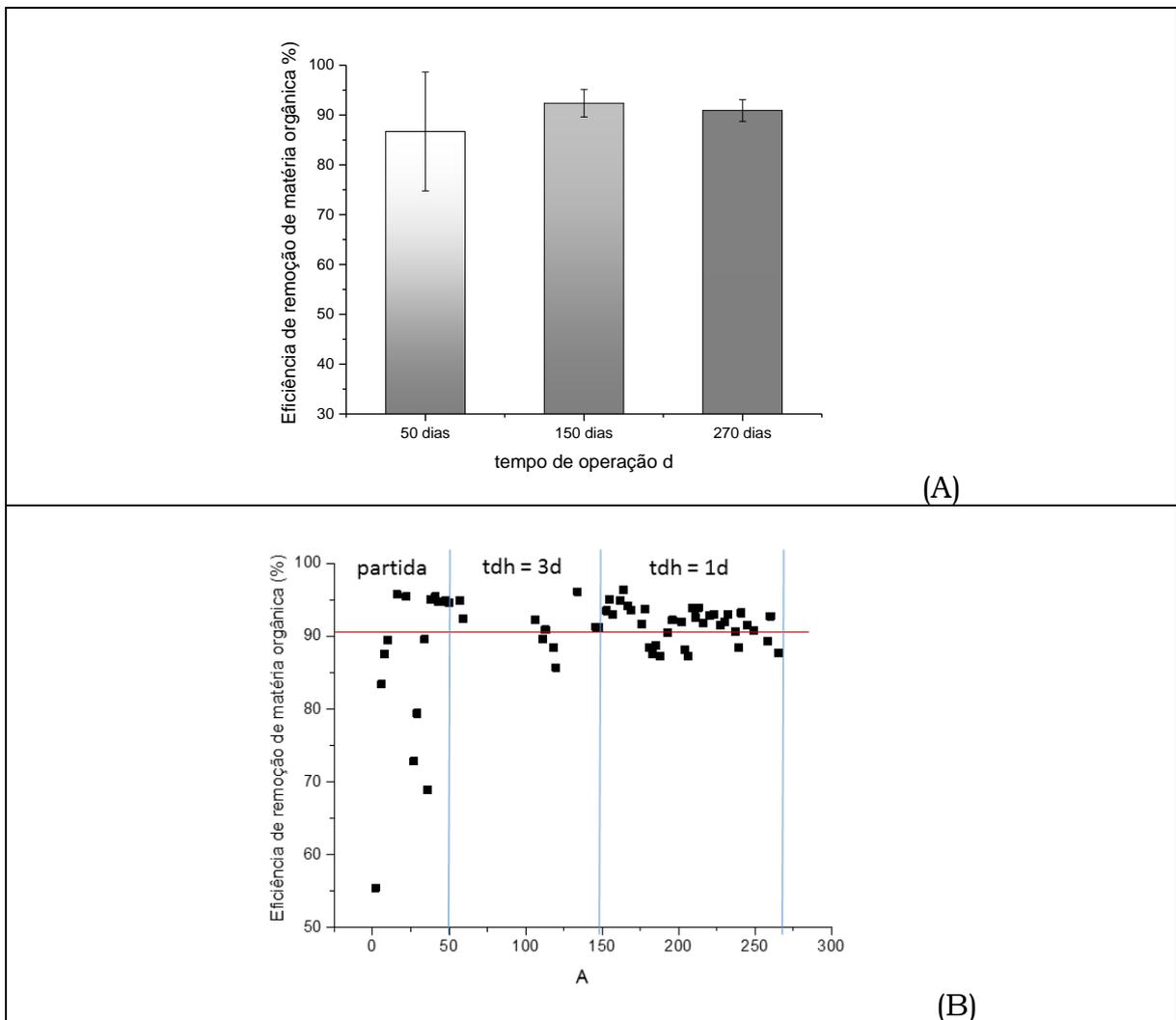


Figura 1 - Eficiências de remoção de matéria orgânica observadas no ABR:
(A) média nas diferentes condições operacionais;
(B) ao longo do tempo de operação.

Fonte: SANTOS, (não publicado)

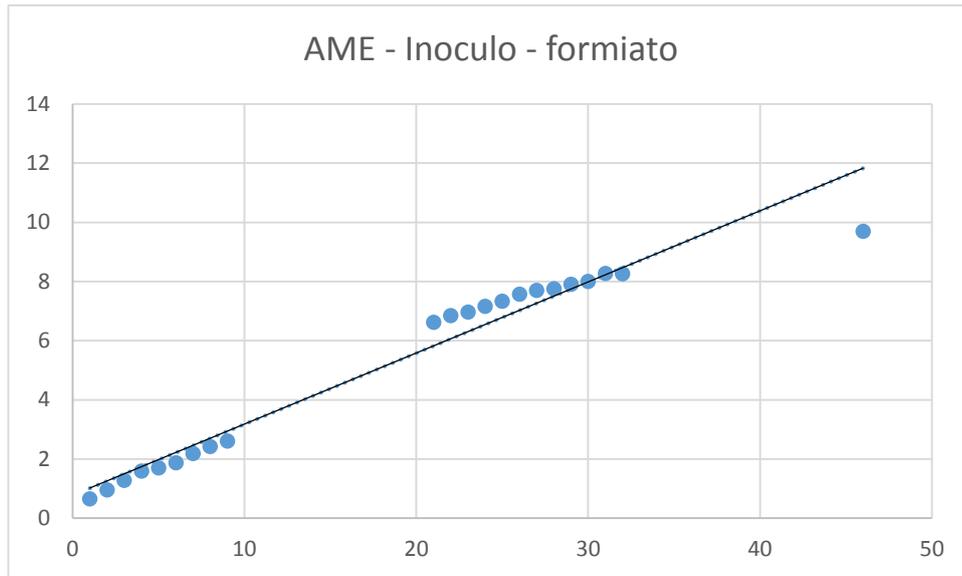


Figura 2 - Produção de metano versus Tempo – Inóculo – Gráfico utilizado para cálculo de AME; maior inclinação obtida no ensaio AME para formiato.

Fonte: Da autora.

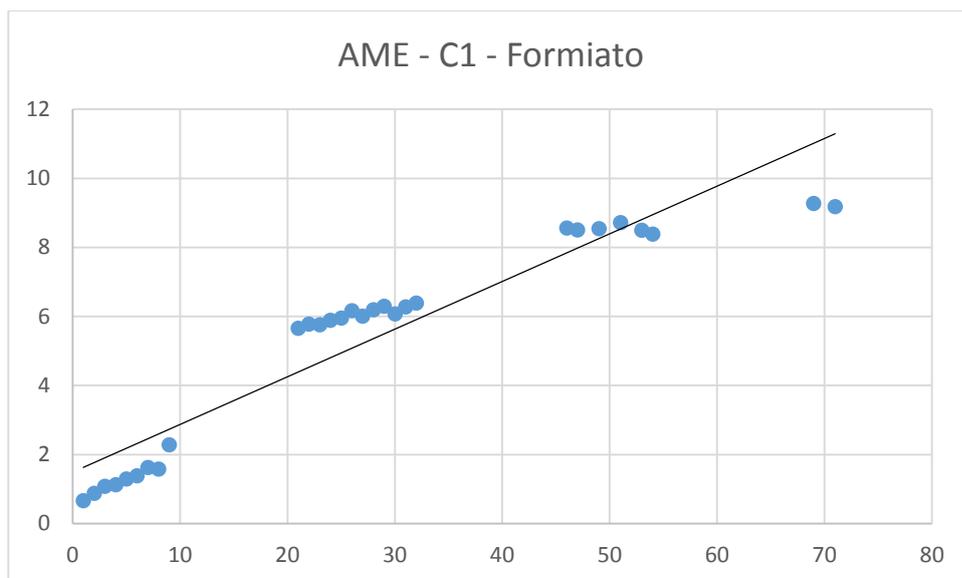


Figura 3 - Produção de metano versus Tempo – Compartimento 1 – Gráfico utilizado para cálculo de AME; maior inclinação obtida no ensaio AME para formiato.

Fonte: Da autora.

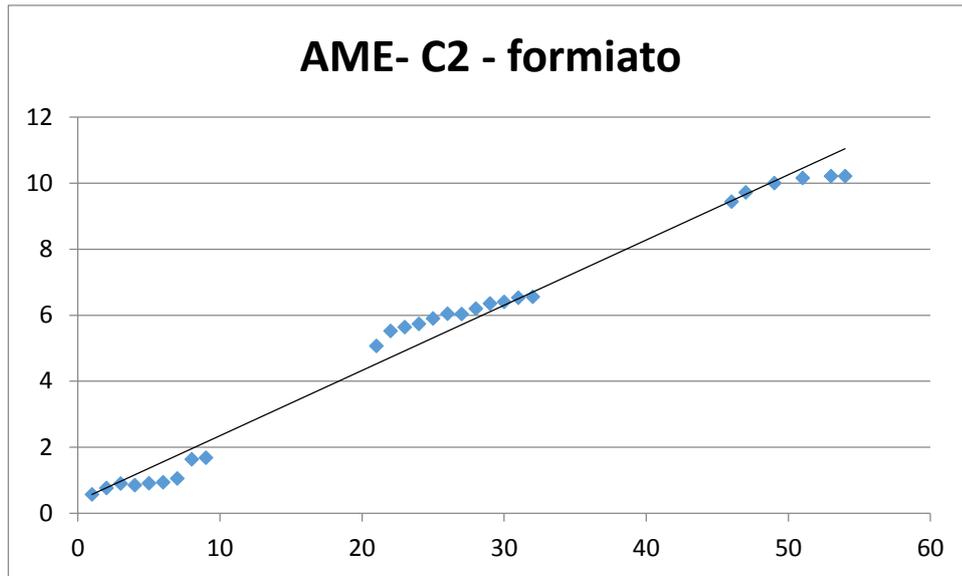


Figura 4 - Produção de metano versus Tempo – Compartimento 2 – Gráfico utilizado para cálculo de AME; maior inclinação obtida no ensaio AME para formiato.

Fonte: Da autora.

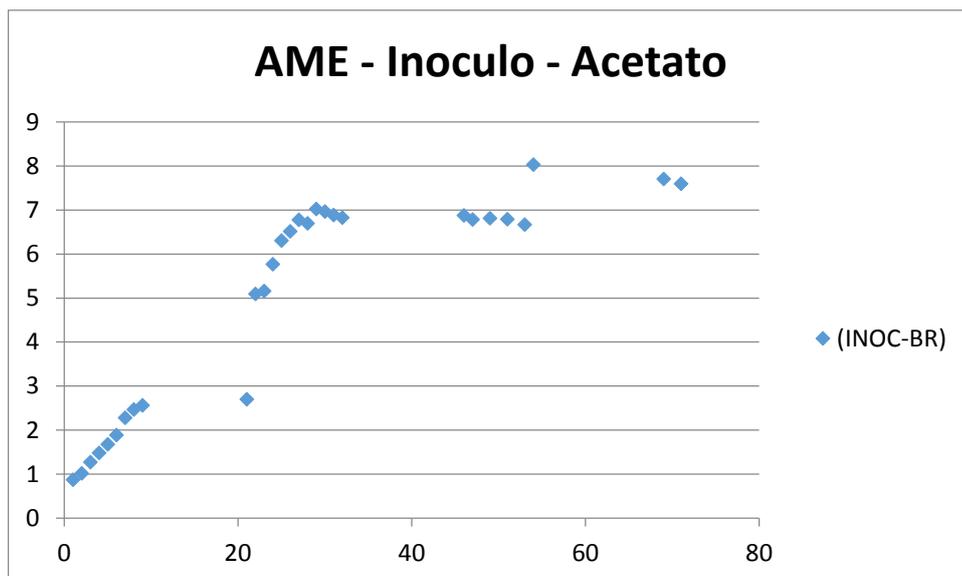


Figura 5 - Produção de metano versus Tempo – Inóculo – Gráfico utilizado para cálculo de AME; maior inclinação obtida no ensaio AME para acetato.

Fonte: Da autora.

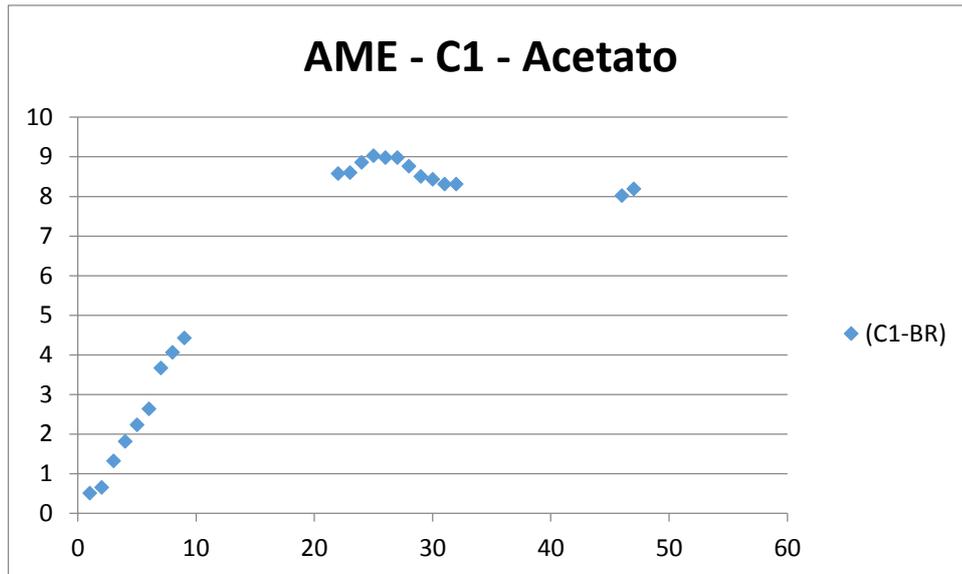


Figura 6 - Produção de metano versus Tempo – Compartimento 1 – Gráfico utilizado para cálculo de AME; maior inclinação obtida no ensaio AME para acetato.

Fonte: Da autora.

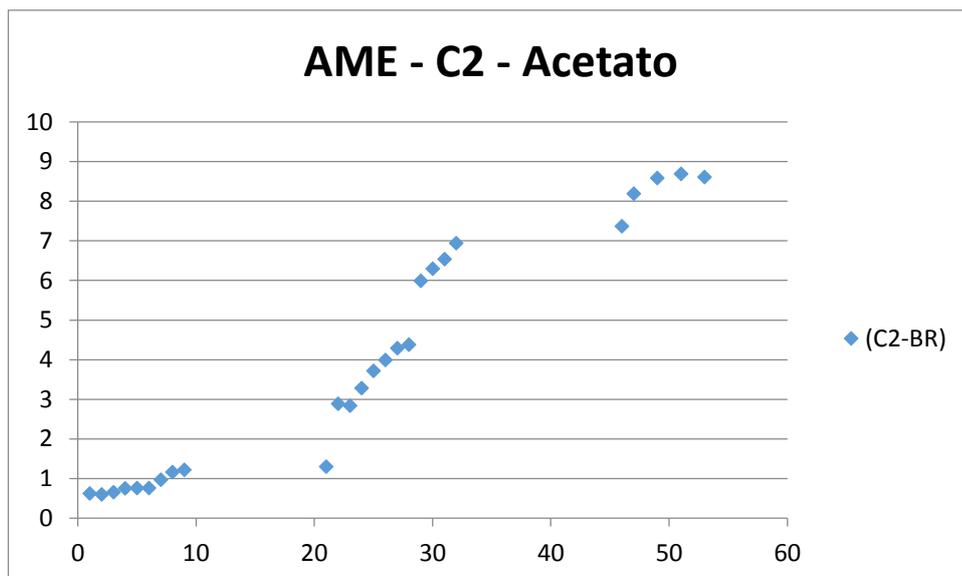


FIGURA 7: Produção de metano versus Tempo – Compartimento 2 – Gráfico utilizado para cálculo de AME; maior inclinação obtida no ensaio AME para acetato.

Fonte: Da autora.