



II-197 – QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS TOTAIS E DE ARQUEÍAS EM TESTES DE ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA UTILIZANDO HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE

Érika Ferreira de Abreu⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Escola de Engenharia da UFMG (EEUFMG). Bolsista DTI (CNPq) no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da Escola de Engenharia da UFMG.

Silvana de Queiroz Silva

Bióloga (UFSCar). Mestre em Hidráulica e Saneamento (EESC-USP). Doutora em Microbiologia Ambiental (University of Essex). Pós-doutoranda do Departamento de Ciências Biológicas da UFOP.

Juliana Calábria de Araújo

Bióloga pela UFRJ. Doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC/USP. Pesquisadora do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG e professora do CEFET/MG.

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Engenheiro Civil e Sanitarista. Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade de Newcastle upon Tyne – UK. Professor Associado do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

Jackson de Oliveira Pereira

Engenheiro Civil pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestre e Doutorando em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Endereço⁽¹⁾: Rua Arraial Novo, Nº 24 – Bairro Dom Bosco – Belo Horizonte – MG – Brasil – CEP 30850-310– Tel: (31) 3416-7562 / (31) 8713-7593 – e-mail: erikafabreu@yahoo.com.br

RESUMO

A digestão anaeróbia é um processo biológico que também ocorre nos reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo - reatores UASB, que vêm sendo utilizados no tratamento de vários efluentes líquidos. A atividade metanogênica específica (AME) é um ensaio que avalia a capacidade bioquímica máxima do lodo em converter substratos orgânicos a metano (CH_4). Tradicionalmente, a AME é calculada usando como estimativa da biomassa a concentração de sólidos totais voláteis (STV), mesmo sabendo que tal parâmetro não inclui apenas microrganismos, mas também matéria orgânica particulada, o que subestima os valores reais de AME. A utilização da contagem direta de células é uma forma mais representativa de quantificação da biomassa, que permitiria uma análise real e confiável do potencial e do desempenho de um lodo anaeróbio na degradação de resíduos. Os objetivos do presente trabalho foram: (i) quantificar os microrganismos totais e arqueias presentes em lodos de reatores UASB (R1 e R2), antes e após testes de AME, e (ii) comparar os valores de AME obtidos pelos métodos de quantificação de biomassa. Os resultados mostraram que os lodos de ambos os reatores apresentaram maior taxa de AME oriunda da atividade acetoclástica. Para cálculo da AME, recomenda-se a utilização de valores iniciais de biomassa (STV, contagem total de microrganismos ou de arqueias), uma vez que pico de produção de CH_4 ocorre logo no início do teste e a comunidade microbiana sofre alterações populacionais. O reator R2 apresentou maiores taxas de AME que o R1 em termos de STV e contagem total de células, enquanto que, pelo método de contagem de arqueias, o resultado foi o contrário. As maiores diferenças percentuais de atividade entre reatores foram observadas nas taxas de AME expressas em termos de contagem de arqueias metanogênicas. Sugere-se que outros testes de AME, comparando os diferentes métodos de quantificação, sejam realizados e avaliados estatisticamente para confirmação dos resultados. O conhecimento de parâmetros de desempenho dos reatores, tal como a atividade metanogênica de campo, é importante para verificar se as diferenças observadas nos testes de AME representam diferenças reais na atividade e produção de metano dos reatores em campo.

PALAVRAS-CHAVE: atividade metanogênica específica, reatores UASB, lodo anaeróbio, arqueias metanogênicas, FISH.



INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os sistemas anaeróbios vêm sendo amplamente pesquisados no mundo. Particularmente no Brasil, reatores UASB se tornaram uma opção atrativa no tratamento de esgotos, tanto como unidades únicas ou seguidos de alguma forma de pós-tratamento. Tais reatores apresentam vantagens em relação a processos aeróbios convencionais, por serem sistemas mais simplificados, com menores custos de implantação e de operação, além de possuírem uma produção de lodo excedente bem menor (CHERNICHARO, 2007). Apesar do grande número de pesquisas no país, existem poucas informações sobre a diversidade, a composição e a dinâmica dos ecossistemas microbianos presentes nestes sistemas, o que poderia contribuir para compreensão do funcionamento, bem como no monitoramento e na otimização de condições de operação dos reatores.

No que diz respeito à digestão anaeróbia, trata-se de um processo essencialmente biológico, complexo, que envolve várias etapas, podendo-se distinguir duas principais: primeiramente, substâncias orgânicas complexas são hidrolisadas e fermentadas pela ação de diversos microrganismos e rotas metabólicas e convertidas a gás carbônico (CO_2), hidrogênio (H_2) e ácidos graxos de cadeia curta (acetato, formiato, butirato, etc.); em sequência, CH_4 é gerado a partir da redução de CO_2 e H_2 ou a partir da degradação de outros produtos (acetato, formiato). Esta segunda etapa é denominada metanogênese e é realizada por arqueias metanogênicas.

A estabilidade do sistema anaeróbio depende dos grupos microbianos viáveis envolvidos no processo. Tais microrganismos encontram-se agregados, constituindo o lodo anaeróbio. Uma das formas de se avaliar a atividade de um lodo anaeróbio é pela análise da atividade metanogênica específica - AME. Tal técnica consiste em avaliar capacidade bioquímica máxima de lodos anaeróbios em converter substratos orgânicos a metano (CH_4) sob condições controladas de laboratório (AQUINO *et al.*, 2007). Apesar de existirem diversas metodologias na literatura para se avaliar a AME, em todas elas a estimativa da biomassa do lodo tem sido feita por meio de análise de sólidos voláteis (totais ou suspensos). Contudo, a falta de métodos para se determinar a concentração e viabilidade da ampla diversidade de grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia é uma limitação significativa nos estudos de cinética do processo, desenvolvimento, operação e monitoramento de reatores, uma vez que a medida da biomassa por sólidos voláteis não fornece este tipo de informação. Processos de contagem direta fornecem as maiores estimativas de microrganismos e são ocasionalmente utilizadas para cálculo indireto da biomassa (SOLERA *et al.*, 2001). Por outro lado, são técnicas dispendiosas e trabalhosas, que requer recursos mais sofisticados. Há de se ter em mente que não há um método universal que possa ser aplicado, uma vez que microrganismos e reatores anaeróbios são extremamente diversos e todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens.

No presente trabalho, empregou-se três formas diferentes de quantificação da biomassa: a primeira foi por meio da determinação da concentração de sólidos totais voláteis (STV); a segunda, por meio da contagem do número total de células microbianas coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol); e a terceira foi a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para contagem das arqueias metanogênicas presentes nas amostras de lodo, utilizando-se a sonda ARC 915, específica para microrganismos do Domínio *Archaea*. A contagem total de células coradas com DAPI (que é um corante de DNA) apresenta a desvantagem de não ser possível a diferenciação de células microbianas viáveis das não-viáveis, além daquelas que estão em estado de dormência (SOLERA *et al.*, 2001). Quanto à hibridação *in situ*, é possível se ter uma noção da atividade metabólica dos microrganismos, pois a intensidade do sinal emitido pela célula hibridada é proporcional ao conteúdo de ribossomos presente na mesma, que, por sua vez, está diretamente relacionado com a atividade metabólica.

Os principais objetivos deste trabalho foram, portanto, quantificar o número de microrganismos e o conteúdo de biomassa de lodos de dois reatores UASB antes e após testes de AME e fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos pelos diferentes métodos de contagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Primeira etapa: testes de atividade metanogênica específica

Caracterização dos reatores

Amostras de lodo foram coletadas de dois reatores UASB, em escala piloto, ambos com volume total de 343 L e 4 m de altura. Um deles tratava-se de uma versão modificada de reator UASB, desenvolvido por Pereira *et al.* (2007), denominado reator com duplo estágio de coleta de biogás - UASB/DECB. O segundo era um reator



UASB convencional. Os reatores, doravante denominados R1 e R2, respectivamente, foram instalados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG/COPASA, situado na ETE – Arrudas, (Belo Horizonte/ MG). Os reatores encontravam-se em operação há 3 anos, ambos alimentados com esgotos brutos tipicamente domésticos da cidade de Belo Horizonte, após passarem pela etapa de tratamento preliminar. Embora seja contraditória a ocorrência da granulação de lodo anaeróbio tratando esgotos domésticos (AIYUK *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.* 2009), ambos os reatores-piloto apresentaram o fenômeno de biogranulação do lodo ao longo dos anos de operação, de modo que, para o presente estudo, eles possuíam biomassa granular bem estabelecida.

Os reatores operaram com carga orgânica volumétrica de 2,0 kg de DQO /m³.d. A eficiência média de conversão biológica da matéria orgânica (considerando a DQO filtrada do efluente) para o período de amostragem foi de 77% em ambos os reatores.

Determinação da concentração de sólidos totais voláteis (STV)

Esta análise foi feita de acordo com o *Standard Methods* (AWWA,APHA/WEF, 2005), a partir de 40 ou 50 mL de lodo e em triplicata.

Teste de atividade metanogênica específica (AME)

Os testes foram realizados em triplicata e nas condições recomendadas por Souto (2007): relação alimento/microrganismo de 0,5 gDQO_{acetato}/gSTV, concentração de acetato 2,0 g/L e de formiato 3,05 g/L. Antes do teste, foi feita a análise de STV das amostras de lodo para se estimar o volume de inóculo a ser adicionado em cada frasco-reator, a fim de se obter uma concentração de 4,34 gSTV/L. Após adição do inóculo, colocou-se 2,0 mL de solução concentrada de acetato de sódio (139,3 g/L) ou 4 mL de solução concentrada de formiato de sódio (230,48 g/L), completando-se o volume para 100 mL com solução de macro e micronutrientes (adaptado de CHERNICHARO, 2007; SOUTO, 2007). Foram adicionados à solução de nutrientes 0,2 g/L de extrato de leveduras, como fonte adicional de vitaminas, e 0,01 g/L de resazurina, como indicador do potencial redox do meio. Cerca de 10% volume dos frascos foi reservado para atmosfera interna (*headspace*). Os frascos foram fechados com rolhas de borracha e lacres de alumínio e o *headspace* foi lavado com fluxo de N₂ por 2 minutos. Os frascos foram incubados em estufa a 30°C com agitação orbital e contínua (200 rpm). O biogás foi coletado e analisado em cromatógrafo gasoso duas vezes por dia no início do teste e uma vez por dia no final, até verificar diminuição na produção de biogás. Gráficos com curvas de produção acumulada de metano em função do tempo foram construídos e as taxas de AME foram calculadas com base no trecho de maior inclinação, referindo-se ao período de maior produção de CH₄. O volume produzido no período foi convertido em g de DQO_{CH4} utilizando-se fator de conversão estequiométrica ($F = 394 \text{ mL CH}_4/\text{gDQO}$, para temperatura de 30°C e pressão de 1 atm (AQUINO *et al.*, 2007)).

Segunda etapa: contagem de microrganismos totais e de arqueias

Tratamento e fixação das amostras (adaptado de AMANN *et al.*, 1990)

Antes e após os testes de AME, 1,0 mL de amostra de lodo foi lavada duas vezes com tampão PBS (NaCl 0,13M; Na₂HPO₄ 0,7 mM; NaH₂PO₄ 0,3 mM; pH 7,2) e centrifugada a 8.600 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante após cada lavagem. Completou-se o volume para 1,0 mL com solução de pirofosfato de sódio 0,2% em tampão PBS. A amostra foi submetida a agitação em microdesmembrador com 0,2 g de micropérolas de vidro a 4.200 rpm por 2 minutos (1minuto em banho de gelo após cada minuto na agitação) para desagregação dos grânulos microbianos. Transferiu-se 500µL de amostra para um microtubo de 2,0 mL e adicionou-se 1,5 mL de tampão de fixação (tampão PBS com 4% de paraformaldeído). Armazenou-se a mistura por 4 a 16 horas a 4°C. Após a fixação, as amostras foram centrifugadas (8.600 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O lodo sedimentado foi lavado duas vezes em 500 µL de PBS e centrifugado (8.600 rpm por 5 minutos), sendo o sobrenadante descartado após cada lavagem. O lodo foi ressuspensionado e diluído em solução de PBS e etanol 100% (diluição final: 2X). As amostras foram mantidas a -20°C.

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e contagens de microrganismos

Aproximadamente 1,0 µL de cada amostra de lodo diluída (40X para lodo dos reatores e 2X para lodo de testes de AME) foi adicionado a lâminas de teflon, seguindo-se desidratação em banho de etanol (AMANN *et al.* 1990). Após a secagem das lâminas, foram aplicados, em cada amostra, 9,0 µL de tampão de hibridização (25% de formamida) e 1,0 µL da sonda ARC 915 (5' GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3') (RASKIN *et al.*, 1994), específica para microrganismos do Domínio *Archaea*, na concentração de 25-50 ng/µL marcada

com Cy3. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 45°C durante 2 horas. Após a secagem das lâminas, foram aplicados 9,0 µL de água destilada e 1,0 µL de solução de DAPI (0,001%) em cada amostra, mantendo-as no escuro durante 5 a 10 minutos. As amostras foram observadas em microscópio Olympus BX-50 (aumento de 1.000 vezes), sob epifluorescência, com filtros específicos para captação da fluorescência emitida pela cromóforo Cy3 (510 a 550 nm) e pelo corante DAPI (330 a 385 nm). Cerca de 15 imagens digitais de cada amostra foram registradas para contagem do número de microrganismos totais e de arqueias. Os testes foram feitos em duplicata.

RESULTADOS

Primeira etapa: testes de atividade metanogênica específica

O teste de AME durou cerca de 8 dias e, após a construção dos gráficos de produção de metano em função do tempo, verificou-se que o pico de produção ocorreu entre os 3 primeiros dias (resultados não mostrados). O pico de produção nos cultivos com acetato ocorreu entre o 2º e 3º dia (R1) e 1º e 2º (R2); nos cultivos com formiato e nos frascos-controle (sem substrato), o pico ocorreu logo no 1º dia (resultados não mostrados).

Na literatura nacional, tem sido comum o cálculo da AME utilizando concentração média de STV (ARAÚJO, 1995; STEIL, 2001), descontando-se o valor de AME de frascos-controle (lodo cultivado sem substrato) daqueles com o lodo cultivado com substratos específicos, sendo o valor resultante a AME real do lodo. No presente trabalho, ao serem comparados os valores de STV_{inicial} e STV_{final} das amostras, verificou-se alta variabilidade no início e no final do teste (Figura 1). Isto tem um significado importante, pois os valores de AME são diretamente influenciados pela concentração de STV presente no lodo. Em todas as amostras, houve diminuição na concentração de STV, sendo essa redução mais drástica nos cultivos com acetato: de 4,34 g/L para 2,80 g/L (R1) e 2,59 g/L (R2). Nos cultivos com formiato, entretanto, a concentração de STV diminuiu muito pouco: de 4,34 g/L para 4,23 g/L (R1) e 3,96 g/L (R2). Estes resultados provavelmente indicam que parte dos sólidos orgânicos voláteis presentes nas amostras de lodo foi consumida pelos microrganismos e esse consumo foi maior nos cultivos com acetato e nos frascos-controle, sendo menor nos cultivos com formiato.

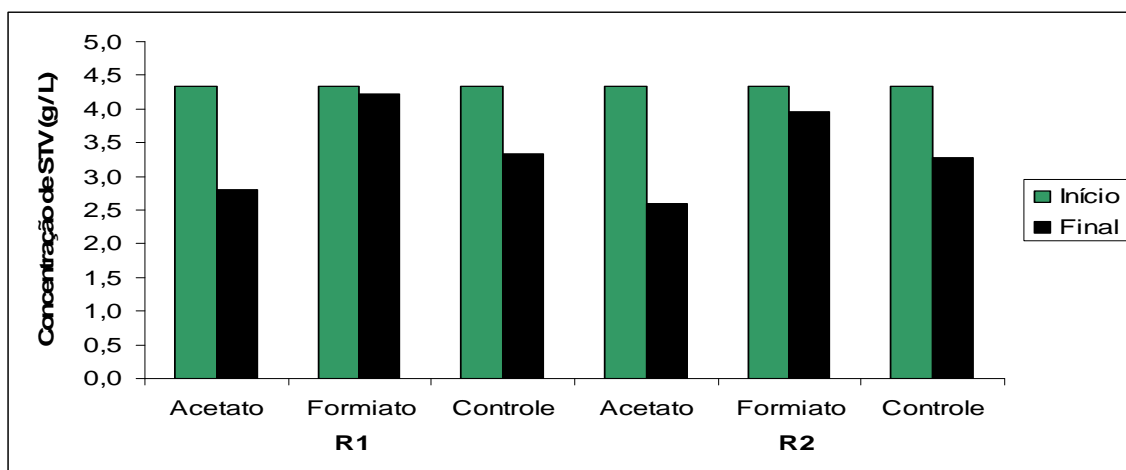


Figura 2: Concentrações iniciais e finais de STV nos diferentes cultivos do teste de AME com lodo de reatores UASB

De acordo com a Tabela 1, observa-se comportamento similar das amostras de lodo dos dois reatores, nos diferentes cultivos, no que se refere à produção acumulada de metano e nos valores de pH antes e após o teste. Ambos os tipos de amostra apresentaram maior produção acumulada de metano nos cultivos com acetato, com pouca variação de pH, sugerindo intensa atividade de arqueias acetoclásticas e, provavelmente, de outros microrganismos não-metanogênicos consumidores de acetato, tais como bactérias redutoras de sulfato. Grande variação do pH foi observada nos cultivos com formiato (de 6,7 a 9,4) em ambos os tipos de amostra, apresentando produção de CH₄ acumulada ligeiramente maior que nos frascos-controle, o que sugere atividade de arqueias hidrogenotróficas e/ou de bactérias acetogênicas consumidoras de formiato. Estas últimas são microrganismos sintróficos que produzem acetato, que pode ser utilizado por arqueias acetoclásticas.

**Tabela 1: Características e desempenho de lodos de reatores anaeróbios em testes de AME.**

Substrato	Reator	STV _{inicial} (g/L)	Produção acumulada de CH ₄ (mL)	pH		AME (gDQO _{CH4} /gSTV.d)
				Inicial	Final	
Acetato	R1	4,34	67,3 ± 4,0	6,9	7,3	0,127
	R2	4,34	85,8 ± 1,9	7,0	7,3	0,146
Formiato	R1	4,34	41,1 ± 7,0	6,7	9,4	0,053
	R2	4,34	46,7 ± 0,8	6,8	9,4	0,056
Controle	R1	4,34	23,5 ± 0,1	6,9	6,5	0,042
	R2	4,34	15,6 ± 0,5	6,9	6,5	0,025

Ainda conforme a Tabela 1, no que se refere à atividade metanogênica específica, os primeiros resultados foram baseados na concentração inicial de STV e mostram que o reator R2 apresentou maior AME em ambos os tipos de cultivo (acetato e formiato). Entretanto, nos frascos-controle, a atividade metanogênica foi maior nas amostras do reator R1.

Nos trabalhos na literatura, citados anteriormente, os testes de AME foram conduzidos de forma semelhante ao do presente trabalho: o biogás foi caracterizado em cromatógrafo gasoso e a concentração de metano foi avaliada em termos de mmol. Os valores de AME do presente trabalho foram também calculados com base na concentração média de STV (R1 e R2, respectivamente: acetato: 0,168 e 0,185; formiato: 0,054 e 0,059; controle: 0,049 e 0,028 DQO_{CH4}/g de STV.d) para comparação com dados da literatura. Entretanto, o valor da AME de frascos-controle não foi descontado daqueles testados com substrato. Araújo (1995) avaliou a atividade metanogênica de lodo oriundo de reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sintético em escala de bancada. A autora também encontrou menores valores de AME nos cultivos com formiato. Os lodos apresentaram maior atividade acetoclástica em relação à hidrogenotrófica. Steil (2001) avaliou a atividade metanogênica de lodos obtidos de biodigestor que tratava resíduos de aves de postura e de frangos de corte. A autora testou uma mistura de vários substratos em diferentes relações A/M (gDQO/gSTV), encontrando os melhores resultados nas relações 0,25 e 0,50. No presente trabalho, a relação utilizada foi de 0,50 gDQO/gSTV e os valores de AME encontrados nos cultivos com acetato e nos frascos-controle foram maiores que aqueles observados por Steil (2001) (0,010 a 0,052; controle: 0,004 e 0,006 DQO_{CH4}/g de STV.d). Isto provavelmente ocorreu porque no cultivo com acetato, a maior parte da DQO seria convertida a metano diretamente pelas metanogênicas acetoclásticas, enquanto que a mesma quantidade de DQO, oriunda de diversos substratos, seria degradada por microrganismos acidogênicos, acetogênicos, além das arqueias metanogênicas. Outra explicação pode estar relacionada a características biológicas intrínsecas do lodo: o fato dos cultivos sem substrato com lodo de reatores UASB apresentarem uma atividade metanogênica maior poderia indicar que o lodo de tais reatores é mais ativo que o lodo de biodigestores de resíduos.

Segunda etapa: contagem de microrganismos totais e de arqueias

Após a contagem do número de células microbianas totais (coradas com DAPI) e de arqueias metanogênicas, hibridadas com a sonda ARC 915, foi feita uma estimativa da concentração de microrganismos por grama de STV antes e após o teste de AME, cujos resultados são apresentados nas Figuras 3 e 4. Pode-se verificar uma redução no número de células totais (3 a 9 vezes) e de arqueias (3 a 38 vezes) no final do teste. A redução foi maior nos frascos cultivados com formiato nos dois tipos de amostra. O consumo de H₂ e CO₂ dissolvidos no meio por arqueias hidrogenotróficas ou por bactérias acetogênicas pode ter sido o responsável pelo aumento do pH dos cultivos (de 6,7 para 9,4), o que por sua vez, pode ter inibido o crescimento dos microrganismos em geral no final do experimento.

Comparando-se esses resultados com aqueles apresentados na Figura 2, verifica-se que nem sempre há uma correspondência entre o número de microrganismos e o valor de STV nas amostras de lodo. Nos frascos de AME com formiato (tanto com o lodo do reator R1 quanto com o do reator R2), não houve diminuição na concentração de STV ao longo do ensaio de AME (Figura 2). Não obstante, para os valores de células totais e de células de arqueias por grama de STV (Figuras 3 e 4, respectivamente), houve uma diminuição drástica desses valores ao longo do ensaio de AME, indicando que as células foram morrendo ao longo do experimento (apesar deste ser bem curto de até 8 dias).

Solera *et al.* (2001) também verificaram que, dependendo do tipo de lodo analisado, não há correlação entre contagem de microrganismos e análise de sólidos voláteis. Neste estudo, os autores compararam alguns métodos de quantificação de biomassa microbiana utilizando lodo de reatores anaeróbios termofílicos (55 °C), em escala de bancada e sob condições estáveis. Dois reatores eram de um estágio, no qual as fases acidogênica e metanogênica se processavam em um mesmo compartimento, enquanto que outros dois reatores eram de dois estágios, caracterizados pela separação das fases acidogênica e metanogênica. A biomassa do lodo foi quantificada por análise de SSV, pela contagem de células totais coradas com DAPI e por microscopia de fluorescência para contagem de metanogênicos autofluorescentes que contêm o fator F420. Os autores concluíram que houve uma alta correlação entre contagem direta de microrganismos corados com DAPI e biomassa expressa na forma de SSV nos reatores de fase única e que, apesar do aumento no tempo de detenção hidráulica (TDH), a porcentagem de microrganismos metanogênicos autofluorescentes permaneceu constante (17% da comunidade total). Consequentemente, ambas as técnicas poderiam ser utilizadas como formas de quantificação de biomassa. Entretanto, no caso dos reatores de duas fases, não houve correlação positiva entre os dois parâmetros, uma vez que mudanças na concentração de sólidos não implicaram em mudanças no número de microrganismos, especialmente de metanogênicos. Neste caso, a biomassa não deveria ser estimada por análise de SSV, mas sim por contagem direta de microrganismos.

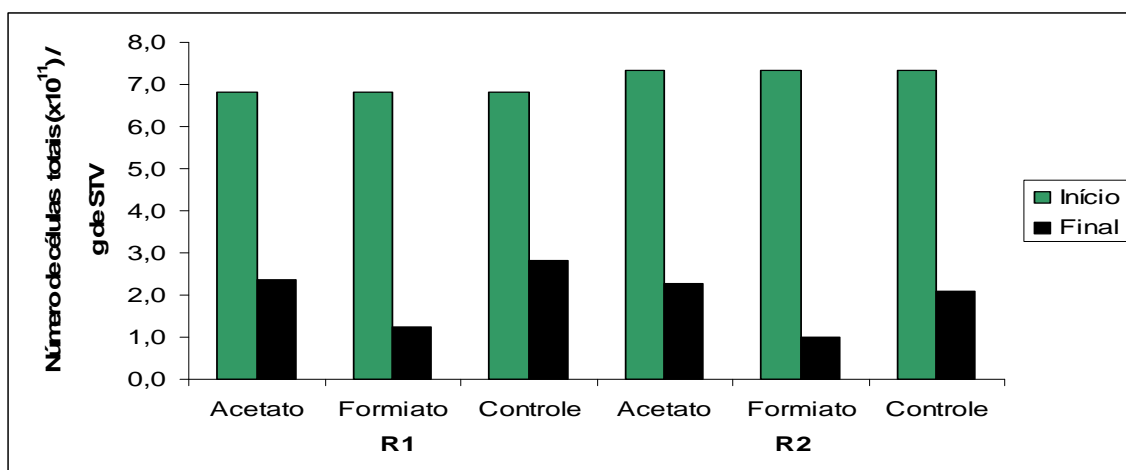


Figura 3: Estimativas inicial e final do número de microrganismos totais por grama de STV nos diferentes cultivos de teste de AME com lodo de reatores UASB.

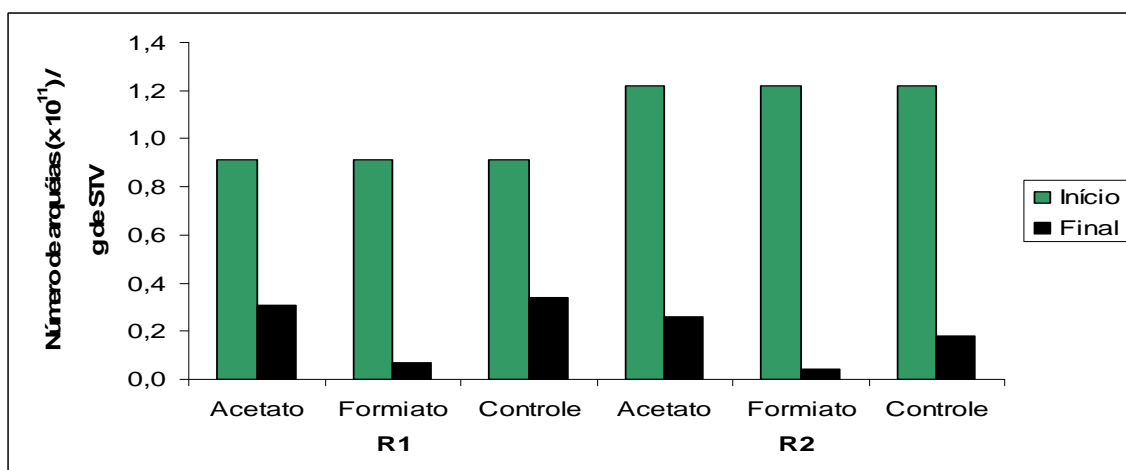


Figura 4: Estimativas inicial e final do número de arqueias metanogênicas por grama de STV nos diferentes cultivos de teste de AME com lodo de reatores UASB.

Diante destes resultados, optou-se em avaliar a atividade metanogênica com os valores iniciais de contagens de células totais e de arqueias, uma vez que o pico de produção de metano, importante para o cálculo da AME, ocorreu no início do experimento. A Tabela 2 apresenta as concentrações iniciais e porcentagens de microrganismos totais e de arqueias, bem como o número de microrganismos por grama de STV.



Solera *et al.* (2001) encontraram de $0,49$ a $2,35 \times 10^{12}$ células totais por grama de biomassa (SSV), enquanto que no presente trabalho os valores encontrados foram $0,9$ e $1,2 \times 10^{11}$ células totais por grama de STV (Tabela 2). Um dos fatores que poderia explicar os maiores valores encontrados pelos autores citados seria a técnica utilizada de quantificação de biomassa, por SSV, uma vez que esta análise resulta em valores ligeiramente menores de biomassa que a análise de STV, utilizada no presente estudo.

Tabela 2: Estimativa da biomassa por contagem direta de microrganismos totais e arqueias (FISH), por análise de STV e do número de microrganismos por grama de biomassa em lodos de reatores UASB

Reator	STV _{inicial} (g/L)	Nº células totais ($\times 10^{12}$)/L	Nº arqueias ($\times 10^{12}$)/L	Nº células totais ($\times 10^{11}$)/gSTV	Nº arqueias ($\times 10^{11}$)/gSTV	Bactérias (%)	Arqueias (%)
R1	4,34	$2,97 \pm 0,78$	$0,34 \pm 0,13$	6,8	0,9	86,7	13,3
R2	4,34	$3,18 \pm 0,70$	$0,53 \pm 0,19$	7,3	1,2	83,4	16,6

Tanto a comunidade microbiana total quanto a de arqueias eram maiores no reator R2. As arqueias constituíam 16,6% da comunidade total, enquanto que no reator R1 era em torno de 13,3%. Estes resultados corroboram com os primeiros resultados de AME, os quais mostraram atividade maior nos frascos-reatores com lodo do reator R2, os quais apresentaram maior número e porcentagem de arqueias. O número de microrganismos totais por grama de STV foi de $7,3 \times 10^{11}$ e o de arqueias de $1,2 \times 10^{11}$. Resultados semelhantes foram encontrados por Solera *et al.* (2001) nos reatores termofílicos de um único estágio, nos quais a porcentagem de microrganismos não-metanogênicos era em torno de 83% e a de arqueias, representadas pelos metanogênicos autofluorescentes era de 17%.

Na Tabela 3 apresenta-se a comparação dos valores de AME pelos três métodos de quantificação de biomassa e diferenças percentuais de atividade entre os reatores. Observa-se que as taxas de AME, expressas em termos de contagem de células totais e de arqueias, também apontaram maiores valores nos cultivos com acetato para ambos os tipos de lodo. Comparando-se os resultados entre reatores, quando a AME é expressa em termos de grama de STV, a atividade metanogênica do R1 é inferior a do R2 em 13%, para o substrato acetato, e em 5,4%, para o formiato. Quando a AME é expressa em termos de número de microrganismos totais, essa diferença diminui (AME do R1 é 5% menor que a do R2 para acetato) ou não é observada, quando o substrato é o formiato. Entretanto, quando os valores são expressos em termos de número de arqueias, verifica-se o contrário: a AME do reator R1 é maior 14,3%, para o acetato, e 20,7% para o formiato. Quanto aos frascos-controle, sem substrato, o lodo do reator R1 apresentou as maiores taxas de AME pelos três métodos de quantificação de biomassa, com atividade metanogênica muito maior (40,5 a 56,5%) que o lodo do reator R2.

Tabela 3: Comparação de valores de AME obtidos pelos três métodos de quantificação de biomassa e diferença percentual de AME entre os reatores

Substrato	Reator	Atividade Metanogênica Específica			Diferença percentual entre R1 e R2 (%)		
		g DQO _{CH4} /gSTV.d	gDQO _{CH4} / 10^{11} células totais.d	g DQO _{CH4} / 10^{11} arqueias.d	AME em termos de STV	AME em termos de células totais	AME em termos de arqueias
Acetato	R1	0,127	0,019	0,140	13,0	5,0	14,3
	R2	0,146	0,020	0,120			
Formiato	R1	0,053	0,008	0,058	5,4	0,0	20,7
	R2	0,056	0,008	0,046			
Controle	R1	0,042	0,006	0,046	40,5	50	56,5
	R2	0,025	0,003	0,020			

Os resultados mostram que os valores de AME expressos em termos de contagem de arqueias metanogênicas foram os que apresentaram maiores diferenças percentuais entre os reatores. Entretanto, outros testes de AME, comparando-se os métodos de quantificação de biomassa, assim como análises estatísticas são recomendados para confirmação dos resultados. Além disso, informações sobre a atividade metanogênica de campo dos reatores, calculada com base na produção diária de metano e na quantidade de biomassa (STV) presente no lodo, são importantes para avaliação dos resultados obtidos nos testes de AME, pois é possível que as diferenças observadas nos testes laboratoriais entre reatores sejam pouco significativas e não representem diferenças reais na atividade biológica e na produção de metano dos mesmos em campo.



CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

- Ambos os reatores comprovaram, como descrito na literatura, maior taxa de produção de metano oriunda da atividade acetoclástica pelos três métodos de quantificação de biomassa. A atividade hidrogenotrófica praticamente não foi detectada, pelo menos quanto ao substrato utilizado (formiato), sendo bem menor que a atividade metanogênica detectada nos frascos-controle;
- Quanto à análise de sólidos, ocorreram variações também entre início e fim do teste, com redução de biomassa no final, provavelmente devido a consumo de matéria orgânica residual e endogenia (morte de microrganismos). Os cultivos com acetato apresentaram maior redução no valor de STV_{finais} . Os cultivos com formiato, entretanto, apresentaram as menores variações nos valores de STV;
- A redução mais drástica de microrganismos ocorreu nos cultivos com formiato, nos quais o pH alterou de 6,7 a 9,4. Essa alteração pode ter sido causada pelo rápido consumo de formiato e H_2 e CO_2 dissolvidos no meio por arqueias hidrogenotróficas e/ou bactérias homoacetogênicas;
- Para cálculo da AME, recomenda-se a utilização de valores de STV, contagem total de células com DAPI ou de arqueias por FISH antes do teste (e não o valor médio obtido entre o início e o fim do teste), uma vez que o pico de produção de CH_4 ocorre logo no início do teste (entre os 3 primeiros dias) e a comunidade microbiana sofre alterações populacionais (conforme apresentado neste trabalho), que podem descaracterizar a comunidade inicial do teste.
- Em dois métodos de quantificação de biomassa (análise de STV e contagem total de células), foi observado que o reator R2 apresentou maiores taxas de AME que o reator R1 nos cultivos com acetato e formiato; resultado contrário foi visto quando se utilizou o método de contagem de arqueias;
- O reator R1 também apresentou maiores taxas de AME nos frascos-controle pelos três métodos de quantificação, o que poderia indicar que o lodo inicial destes frascos tinha uma concentração maior de matéria orgânica residual dissolvida que o lodo dos frascos-reatores do R2;
- Os valores de AME expressos em termos de contagem de arqueias metanogênicas foram os que apresentaram maiores diferenças percentuais entre os reatores. Entretanto, outros testes de AME, comparando-se os métodos de quantificação de biomassa devem ser feitos e avaliados estatisticamente para confirmação dos resultados. O conhecimento de parâmetros de desempenho dos reatores, tal como a atividade metanogênica de campo, é importante para verificar se as diferenças observadas nos testes laboratoriais entre reatores representam diferenças reais na atividade e produção de metano dos reatores em campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AWWA/APHA/WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21.ed. Washington, 2005.
2. AIYUK, S.; FORREZ I.; LIEVEN, DE K.; VAN HAANDEL, A.; VERSTRAETE W. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates—A review. *Bioresource Technology*. V. 97, 2225–224, 2006.
3. AMANN, RI; KRUMHOLZ L., STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* v. 172, 762-770, 1990.
4. AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 2, p. 380-389, 2007.
5. ARAÚJO, J. C. Caracterização e evolução de biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético. Dissertação de Mestrado da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.
6. CHERNICHARO, C. A. L. Princípio do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios, v. 5, 2ª edição, Belo Horizonte: Ed. UFMG, 380 p., 2007.
7. PEREIRA, J. O. Controle da formação de espuma e remoção de matéria orgânica em reator UASB com duplo estágio de coleta de biogás. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Escola de Engenharia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
8. PEREIRA, J. O.; CELANI, J. S. S.; CHERNICHARO, C. A. L. Control of scum accumulation in a double stage biogas collection (R1) UASB reactor treating domestic wastewater. *Water Science and Technology*, 59/6, 1077-1083, 2009.



9. RASKIN, L.; POULSEN, L. K.; NOGUERA, D. R.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 1241-1248, 1994.
10. SOLERA, R.; ROMERO, L. I.; SALES, D. Determination of the microbial population in thermophilic anaerobic reactor: comparative analysis by different counting methods. *Anaerobe*, v. 07, p. 79-86, 2001.
11. SOUTO, T. F. F. Influência das condições de incubação no teste de atividade metanogênica específica (AME) de lodos anaeróbios. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Escola de Engenharia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
12. STEIL, L. Avaliação do uso de inóculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos. Dissertação de Mestrado do Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.