

NÍVEA MOREIRA VIEIRA

CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MESÓFILAS E TERMÓFILAS EM  
BIORREATORES A MEMBRANA DURANTE O TRATAMENTO DE EFLUENTES DE FÁBRICA  
DE PAPEL RECICLADO

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para a obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

**NÍVEA MOREIRA VIEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES BACTERIANAS MESÓFILAS E  
TERMÓFILAS EM BIORREATORES A MEMBRANA DURANTE O  
TRATAMENTO DE EFLUENTES DE FÁBRICA DE PAPEL RECICLADO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

**APROVADA:** 31 de agosto de 2009..

---

Prof. Cláudio Mudado Silva  
(Co-orientador)

---

Prof. Maurício Dutra Costa

---

Prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes

---

Dr. Antônio Galvão do Nascimento

---

Prof. Marcos Rogério Tótola  
(Orientador)

*Ao maravilhoso Deus.  
Aos meus pais, Antônio e Elza.*

## AGRADECIMENTOS

Ao maravilhoso Deus, pela proteção em todos os momentos da minha vida.

Aos Meus Pais, Antônio e Elza, pela base e pelo Amor dedicado a cada dia.

Ao meu irmão Ricardo, pelo companheirismo e pelo amor fraterno.

À minha inigualável família: Vovó Teresa, tios, primos e meu sobrinho Iuri. Agradeço a Deus por ter vocês. Obrigada pelo apoio e amor a cada dia. Essa realização em minha vida é nossa vitória.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e aos Laboratórios de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente e de Ecologia Microbiana, pelo suporte dado.

Ao Departamento de Engenharia Florestal e ao Laboratório de Celulose e Papel, pela oportunidade oferecida para execução de meu projeto.

Ao Professor Marcos Rogério Tótola, pela orientação, pelo carinho, pelo exemplo como pesquisador, contribuindo de forma insubstituível em minha vida acadêmica durante esses anos.

Ao Professor Cláudio Mudado Silva, pela grandiosa dedicação em minha vida acadêmica e pelas conversas e conselhos que ultrapassaram a relação profissional. Minha eterna admiração como pessoa e pesquisador.

Ao Professor Maurício Dutra Costa, pela orientação durante meu primeiro ano de mestrado, pela compreensão, pelos ensinamentos durante meu estágio em ensino e pelo apoio em minhas atividades acadêmicas.

Aos componentes da banca de defesa, especialmente ao Professor Antônio Galvão do Nascimento e à Professora Célia Alencar, não só pela participação, mas também pela amizade e pelo conhecimento passado durante esses anos de convivência.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges por todos os aconselhamentos, pela dedicação durante a condução do projeto e pelas conversas estimulantes.

À Vivian, por ser meu braço direito durante o experimento, por aceitar cada desafio passado e por ter se tornado uma amiga tão especial. Espero poder retribuir todo o apoio dado.

Ao José Antônio, pela ajuda sem a qual esse trabalho não seria realizado, pela disposição e pela alegria a cada dia.

Ao meu amigo Mauricinho, pelos ensinamentos, pela ajuda na análise diversidade genética e, principalmente, pela alegria do dia a dia.

À Klabin Papéis e Embalagens, Unidade Ponte Nova, pelo fornecimento dos efluentes e do lodo biológico utilizados neste trabalho.

A todos do LBBMA que, direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho: Bruninha, Ivan, Guilherme, Péricles, Adriano, Aline Leal, Aline Daniela, Patrícia Leal, Cássia e Marcela, pela união criada e pela companhia no dia a dia.

À Adélia, pelas conversas, pela companhia e pela ajuda na condução dos experimentos.

Às secretárias de nosso Departamento, Nilcéa, Laura e Cássia, pela competência e pela paciência.

A todos do Laboratório de Celulose e Papel, principalmente aos colegas Ismarley, Matheus Coura, Rodrigo e Maria Tereza, pela amizade e pelo companheirismo.

À Valéria, pela competência, pelos ensinamentos e pela ajuda durante a execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial Danilo, Toninho, Evandro e Paulo, pela dedicação ao trabalho e pela amizade.

Aos meus amigos Janaína, Leandro, Marcelo, Camilla e Mateus, pela ajuda e carinho durante esses anos. Vocês são pessoas realmente importantes em minha vida.

Às minhas amigas Larissa (Laris), Juliane, Luana (Lu), Cristiane (Cris), Suelen (Sussu) e Natália (Na), pela amizade, pelo apoio e pela torcida.

Aos integrantes da grande família Bioprédio, Janaína (Jana), Camilla (Camis), Juliane (Ju), Natália (Natiqita), Bernardo (Bê), Carlos (Betão), Lucas (Pará), Gabriel (Biel), Diogo (Podrão), Marcos (kico) e Pedrão (Diego), vocês são a família que a UFV me proporcionou e a que eu escolhi. Obrigada pela simples, mas ao mesmo tempo intensa participação em minha vida, tornando-a tão especial.

À minha inesquecível turma da Bio 2003, vocês fazem muita falta.

Aos amigos dos Laboratórios de Genética, Anaeróbios, Alimentos, Fisiologia, Micorriza e Industrial.

A todos que me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

NÍVEA MOREIRA VIEIRA, filha de Antônio Benevenuto Vieira e Elza Teodora Moreira Vieira, nasceu em Viçosa, MG, no dia 21 de junho de 1984.

Em março de 2003 ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, e, em agosto de 2007, graduou-se em Ciências Biológicas. Nesse mesmo ano iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia da mesma Instituição.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT .....	XVIII
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.CAPÍTULO 1: TRATAMENTO AERÓBIO DE EFLUENTES POR BIORREADORES A MEMBRANAS SOB CONDIÇÕES MESÓFILAS E TERMÓFILAS .....	4
1.1.    INTRODUÇÃO .....	4
1.2.    MATERIAL E MÉTODOS .....	7
1.2.1.    APARATO LABORATORIAL.....	7
1.2.2.    ADAPTAÇÃO DA MICROBIOTA.....	8
1.2.3.    LODO BIOLÓGICO .....	9
1.2.4.    AFLUENTES .....	9
1.2.5.    PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS .....	10
1.2.5.1.    DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO .....	10
1.2.5.2.    SÉRIE DE SÓLIDOS (SST E SSV).....	11
1.2.5.3.    TURDIDEZ .....	12
1.2.5.4.    OXIGÊNIO DISSOLVIDO.....	12
1.2.6.    OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS .....	12
1.2.7.    PARÂMETROS OPERACIONAIS.....	12
1.2.7.1.    IDADE DO LODO .....	13
1.2.7.2.    RELAÇÃO ALIMENTO/MICROORGANISMO (A/M).....	13
1.2.7.3.    TEMPO DE RETENÇÃO HIDRÁULICA (TRH) .....	14
1.2.7.4.    CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA.....	14
1.2.8.    INOCULAÇÃO DO COMPOSTO .....	14
1.3.    RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
1.4.    CONCLUSÕES.....	25
1.5.    REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

2.CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE BACTERIANA EM BIORREATORES A MEMBRANA EM CONDIÇÃO MESÓFILA E TERMÓFILA, DURANTE O TRATAMENTO DE EFLUENTE DE FÁBRICA DE PAPEL RECICLADO .....	28
2.1. INTRODUÇÃO.....	28
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
2.2.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS MESÓFILAS .....	33
2.2.2. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE LODOS BIOLÓGICOS	34
2.2.3. PERFIL GENÉTICO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS MESÓFILAS E TERMÓFILAS POR PCR-DGGE .....	34
2.2.3.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA.....	34
2.2.3.2. ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE).	39
2.2.4. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS NAS AMOSTRAS DE LODO BIOLÓGICO .....	40
2.2.4.1. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES 16S rDNA .....	40
2.2.4.2. CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DO GENE 16S rDNA AMPLIFICADOS .....	41
2.2.4.3. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rDNA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS.....	42
2.2.4.4. ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE E REPRESENTATIVIDADE DOS CLONES NA BIBLIOTECA METAGENÔMICA .....	42
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
2.3.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS MESÓFILAS .....	43
2.3.2. PERFIL GENÉTICO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM REATORES DE MEMBRANA MANTIDOS EM CONDIÇÕES MESÓFILA E TERMÓFILA POR PCR-DGGE	43
2.3.2.1. <i>EUBACTERIA</i> .....	43
2.3.2.2. <i>ALPHAPROTEOBACTERIA</i> .....	46
2.3.2.3. <i>BETAPROTEOBACTERIA</i> .....	50
2.3.2.4. <i>GAMMAPROTEOBACTERIA</i> .....	53
2.3.2.5. <i>FIRMICUTES</i> .....	55
2.3.3. BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS NAS AMOSTRAS DE LODO BIOLÓGICO .....	58
2.3.3.1. CURVAS DE RAREFAÇÕES E COBERTURAS OBTIDAS PARA OS CLONES NAS BIBLIOTECAS DE GENES 16S rDNA.....	58
2.3.3.2. BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DE LODO BIOLÓGICO MANTIDO A 35 °C	59

2.3.3.3.	BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DE LODO BIOLÓGICO MANTIDO A 45 °C	65
2.3.3.4.	BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DE LODO BIOLÓGICO MANTIDO A 55 °C	72
2.4.	CONCLUSÕES.....	80
	CONCLUSÃO GERAL.....	81
2.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
	ANEXO.....	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto do dos reatores biológicos. (1) Recipiente do afluente, (2) Bomba peristáltica para bombeamento do afluente, (3) Reator 1 - condição mesófila, (4) Reator 2- condição termófila, (5) Reator 3- condição termófila, (6) Bomba peristáltica para bombeamento do efluente tratado, e (7) coletores dos efluentes tratados.....	8
Figura 2. Módulo de membrana submerso utilizado nos reatores.....	8
Figura 3. Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) nos biorreatores a membranas: reator 1, onde a temperatura foi mantida a 35 °C (Reator mesófilo 1), reatores 2 e 3, onde ocorreu o aumento gradual de temperatura até o 43º dia de tratamento onde a os reatores 2 e 3 atingiram a temperatura de 47 °C.....	17
Figura 4. Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) nos biorreatores a membranas: reator 1, onde a temperatura foi mantida a 35 °C (Reator mesófilo 1), reatores 2 e 3, onde ocorreu o aumento gradual de temperatura até se atingir a temperatura de 55°C (reatores termófilos 2 e 3). O reator 3 recebeu um inóculo de composto de resíduo sólido urbano no 94º dia após o início do tratamento. ....	18
Figura 5. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) nos biorreatores a membranas: reator 1, onde a temperatura foi mantida a 35 °C (Reator mesófilo 1), reatores 2 e 3, onde ocorreu o aumento gradual de temperatura até o 43º dia de tratamento onde a os reatores 2 e 3 atingiram a temperatura de 47 °C. ....	20
Figura 6. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) nos biorreatores a membranas: reator 1, onde a temperatura foi mantida a 35 °C (Reator mesófilo 1), reatores 2 e 3, onde ocorreu o aumento gradual de temperatura até se atingir a temperatura de 55°C (reatores termófilos 2 e 3). O reator 3 recebeu um inóculo de composto de resíduo sólido urbano no 94º dia após o início do tratamento .....	21
Figura 7. Fotomicrografias dos lodos biológicos nos reatores. Na figura estão as fotomicrografias do lodo inicial para os reatores (35 °C), e as fotomicrografias dos lodos biológicos para os reatores 2 e 3 nas temperatura de 40, 45, 50 e 55 °C.....	23
Figura 8. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para <i>Eubacteria</i> . Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com	

gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).....	44
Figura 9. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') de <i>Eubacteria</i> , obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L <sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.....	46
Figura 10. Riqueza de UTO's de <i>Eubacteria</i> obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; , 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L <sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.....	46
Figura 11. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para <i>Alphaproteobacteria</i> . Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).....	47
Figura 12. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') da classe <i>Alphaproteobacteria</i> , obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L <sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.....	49
Figura 13. Riqueza de UTO's da classe <i>Alphaproteobacteria</i> obtidos pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7:	

reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.....49

Figura 14. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para a classe *Betaproteobacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).....50

Figura 15. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') para a classe *Betaproteobacteria*, obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; , 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila. ....52

Figura 16. Riqueza de UTO's da classe *Betaproteobacteria*, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.....52

Figura 17. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para a classe *Gammaproteobacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) .....53

Figura 18. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') da classe *Gammaproteobacteria*, obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa

Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L <sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila. ....	54
Figura 19. Riqueza de UTO's da classe <i>Gammaproteobacteria</i> obtidos pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; , 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L <sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.....	55
Figura 20. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para o filo <i>Firmicutes</i> . Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). ....	56
Figura 21. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') do filo <i>Firmicutes</i> , obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L <sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila. ....	57
Figura 22. Riqueza de UTO's do filo <i>Firmicutes</i> , obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. 1: amostra de lodo mantido na condição mesófila (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L <sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila. ....	57

Figura 23. Curva de rarefação de clones 16S rDNA, obtidos de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 35 °C.....	58
Figura 24. Curva de rarefação de clones 16S rDNA, obtidos de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 45 °C.....	58
Figura 25. Curva de rarefação de clones 16S rDNA, obtidos de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 55 °C.....	59
Figura 26. Proporções relativas dos filos <i>Firmicutes</i> e <i>Proteobacteria</i> (classes <i>Alphaproteobacteria</i> e <i>Betaproteobacteia</i> ) das seqüências obtidas da biblioteca 16S rDNA de lodo biológico mantido a 35 °C.....	60
Figura 27. Proporções relativas dos filos <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> (classes <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Betaproteobacteia</i> ), <i>Deinococcus-Thermus</i> e <i>Chlorobi</i> das seqüências obtidas da biblioteca 16S rDNA de lodo biológico mantido a 45 °C. ....	65
Figura 28. Proporções relativas dos filos <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> (classes <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Betaproteobacteia</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> ), <i>Deinococcus-Thermus</i> e <i>Chlorobi</i> das seqüências obtidas da biblioteca 16S rDNA para a temperatura de 55 °C. ....	72

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Caracterização físico-química dos afluentes. ....	10
Tabela 2. Parâmetros operacionais dos reatores durante o experimento. COV – carga orgânica volumétrica; TDH - tempo de retenção hidráulica, A/M - alimento por microrganismo. ....	15
Tabela 3. Datas e temperaturas por ocasião das coletas de lodo biológico dos reatores mesófilo (reator 1) e termófilos (reatores 2 e 3) para estudo da diversidade de bactérias.....	34
Tabela 4. Isolados mesófilo em reator de membrana, durante tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado. Os isolados foram identificados pelo Sherlock MIS (MIDI Inc., Newark, DE, USA), empregando-se a biblioteca de referência ITSA 1.0 .....	43
Tabela 5. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para <i>Eubacteria</i> . Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). ....	45
Tabela 6. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para <i>Alphaproteobacteria</i> . Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) .....	48
Tabela 7. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para a classe <i>Betaproteobacteria</i> . Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). ....	51
Tabela 8. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para a classe <i>Gammaproteobacteria</i> . Os produtos da amplificação foram analisados	

por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). .....	545
Tabela 9. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos o filo <i>Firmicutes</i> . Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). .....	56
Tabela 10. Espécies identificadas pelas seqüências obtidas em comparação com as disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI), com a utilização do algoritmo BLASTn para a temperatura de 35 °C. Constam: número de acesso, descrição, % de similaridade com a seqüência encontrada no banco de dados, família e referência. ....	61
Tabela 11. Espécies identificadas pelas seqüências obtidas em comparação com as disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI), com a utilização do algoritmo BLASTn para a temperatura de 45 °C. Constam: número de acesso, descrição, % de similaridade com a seqüência encontrada no banco de dados, família e referência. ....	67
Tabela 12. Espécies identificadas pelas sequências obtidas em comparação com as disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI), com a utilização do algoritmo BLASTn para a temperatura de 55 °C. Constam: número de acesso, descrição, % de similaridade com a seqüência encontrada no banco de dados, família e referência. ....	74
Tabela 13. Espécies encontradas ao mesmo tempos nas 3 bibliotecas 16S rDNA construídas (35, 45 e 55 °C) obtidas após a análise das sequências, comparando-se com as disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI), com a utilização do algoritmo BLASTn. Constam: número de acesso, espécie e freqüência nas bibliotecas.....	79
Quadro 1. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes 16S rDNA.....	38

## RESUMO

VIEIRA, Nívea Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2009. Caracterização de comunidades bacterianas mesófilas e termófilas em biorreatores a membrana durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Cláudio Mudado Silva e Arnaldo Chaer Borges.

A fabricação de papel consome elevadas quantidades de água, gerando grandes volumes de efluentes. O tratamento biológico de efluentes industriais de fábricas de papel é a alternativa mais amplamente utilizada para esse processo. Biorreatores a membranas sob condições termófilas constituem uma nova tecnologia de tratamento, ainda pouco utilizada em decorrência da falta de conhecimento técnico e científico para sua implementação. Apesar de sua grande importância, o número de espécies microbianas conhecidas e descritas representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada nos sistemas de tratamento biológico de efluentes industriais. O presente estudo verificou a viabilidade técnica de utilização de biorreatores a membranas para o tratamento termófilo e mesófilo de efluentes de fábrica de papel reciclado, caracterizando as comunidades bacterianas presentes nessas condições. Durante o experimento foram mantidos três reatores, sendo um na condição mesófila a 35 °C e dois em que a temperatura foi aumentada gradualmente até uma máxima de 55 °C. Nessa fase, foi adicionada a um dos reatores uma amostra de composto de resíduo sólido urbano, coletado em sistema de compostagem em fase termófila, com o propósito de se aumentar a diversidade de bactérias termófilas. A utilização de BRM operando em condição termófila e mesófila foi uma alternativa eficiente para o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado. A adição do composto não alterou a eficiência do tratamento termófilo. A avaliação da comunidade bacteriana por meio de PCR-DGGE revelou a ocorrência de alteração significativa do perfil de diversidade genética em resposta ao aumento da temperatura. O aumento gradual da temperatura no interior dos reatores termófilos casou mudanças na composição da comunidade bacteriana de *Eubacteria* e, especificamente, dos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria*, incluindo as classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. A adição do composto a um dos reatores termófilos também provocou alteração na comunidade bacteriana. A clonagem e seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA de *Eubactéria* revelaram a existência de 20 seqüências distintas no lodo biológico mantido na condição mesófila (35 °C). Dentre essas seqüências, foram detectadas representantes das classes *Alphaproteobacteria* (15 %) e *Betaproteobacteria* (15 %) e do filo *Firmicutes* (25 %). 45 % das seqüências dessa biblioteca não puderam ser associadas a

quaisquer dos filos bacterianos reconhecidos. No lodo biológico mantido a 45 °C, foram encontradas 22 seqüências distintas, representando as classes *Alphaproteobacteria* (27,3 %) e *Betaproteobacteria* (13,6 %) e os filos *Firmicutes* (31,8 %), *Deinococcus-Thermus* (4,5 %) e *Chlorobi* (4,5 %). 18,2% das seqüências dessa biblioteca não puderam ser associadas a filos bacterianos reconhecidos. No lodo biológico mantido a 55 °C, foram encontradas 24 seqüências distintas, representando as classes *Alphaproteobacteria* (4 %), *Betaproteobacteria* (20 %) e *Gammmaproteobacteria* (4 %), além dos filos *Firmicutes* (40 %), *Deinococcus-Thermus* (12 %) e *Chlorobi* (4 %). 16 % das seqüências dessa biblioteca não puderam ser associadas a filos bacterianos reconhecidos. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que lodos biológicos mantidos em condição termófila, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, apresentam comunidades bacterianas cuja diversidade é comparável com a de lodos mantidos em condição mesófila. Uma conclusão geral do presente estudo é que BRMs sob condições termófilas são uma alternativa viável para o tratamento de efluentes de fábricas de papel reciclado, capazes de suportar uma diversidade bacteriana compatível com a manutenção de elevada eficiência de remoção da matéria orgânica e eventual plasticidade operacional.

## ABSTRACT

VIEIRA, Nivea Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2009. Characterization of mesophilic and thermophilic bacterial communities in membrane bioreactors during treatment of recycled paper mill effluents. Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Cláudio Mudado Silva and Arnaldo Chaer Borges.

Paper mills consume large quantities of water and thus generate high volume of effluents. Biological treatment of paper mills industrial effluent is widely used for this purpose. The new technology of membrane bioreactors under thermophilic conditions is still underused due to the lack of sufficient technical and scientific knowledge. In spite of their importance, only a fraction of the microbial species found during the biological treatment of industrial effluents have been identified and described. In the present study, the technical feasibility of membrane bioreactors for thermophilic and mesophilic treatments of recycled paper mill effluents was assessed. Bacterial communities present under those conditions were characterized. Three bioreactors were maintained: one at 35 °C, and two under gradually increasing temperatures, beginning at 35 °C up to 55 °C. To one of the latter bioreactors, upon reaching 55 °C, a sample of compost was added as a source of thermophilic bacteria. Membrane bioreactors under thermophilic or mesophilic conditions were efficient for treating the recycled paper mill effluents, however, compost addition did not change the thermophilic treatment efficiency. The diversity among the bacterial population was evaluated by PCR-DGGE performed with metagenomic DNA extracted from biological sludge samples collected from the bioreactors at 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, and 55 °C. Primers specific for *Eubacteria*, *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Gamaproteobacteria* were used. Different DGGE profiles were obtained at the different temperatures, implying bacterial communities composition changes for *Eubacteria*, *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Gamaproteobacteria*. Compost addition to one reactor under thermophilic condition caused changes in the bacterial community. Partial sequencing of 16S rDNA revealed 20 unique DNA sequences belonging to *Eubacteria* present in the biological sludge kept under mesophilic condition (35 °C). Among them, 15 % were *Alphaproteobacteria*, 15 % *Betaproteobacteria*, 25 % *Firmicutes*, and 45 % could not be assigned to any recognized group. Twenty-two unique partial rDNA sequences were found on samples of the biological sludge kept at 45 °C. They represented 27.3 % *Alphaproteobacteria*, 13.6 % *Betaproteobacteria*, 31.8 % *Firmicutes*, 4.5 % *Deinococcus-Thermus*, and 4.5 % *Chlorobi*. Eighteen percent of the sequences were not identified. From the bioreactor kept at 55 °C, 24 unique sequences were found: 4 % were *Alphaproteobacteria*, 20 % *Betaproteobacteria*, 4 %

*Gamaproteobacteria*, 40 % *Firmicutes*, 12 % *Deinococcus-Thermus*, and 4 % *Chlorobi*, and 16 % were not of any recognizable group. The results show that biological sludge, during the thermophilic treatment of recycled paper mill effluents display bacterial communities of similar diversity when compared to those of the mesophilic treatment. It is reasonable to conclude that membrane bioreactors under thermophilic conditions may be a feasible alternative for the treatment of recycled paper mill effluents, capable of maintaining bacterial communities diverse enough to efficiently remove the organic matter.

## INTRODUÇÃO GERAL

O setor de celulose e papel representa um importante segmento industrial no Brasil. A produção e o consumo de papel no mundo e no Brasil vêm crescendo significativamente nos últimos anos. Para a fabricação de papel, são necessários grandes volumes de água durante as diversas etapas do processo. O efluente gerado nesse processo de fabricação é comumente denominado de água branca e caracteriza-se pela presença de elevada carga orgânica e inorgânica, podendo, se lançado nos corpos d'água receptores, causar impactos ambientais negativos, como a depleção de oxigênio dissolvido da água, acarretando a morte dos organismos aeróbios.

Uma das alternativas indicada e amplamente utilizada para o tratamento de efluentes de fábricas de papel é o tratamento biológico, o qual se baseia na utilização da matéria orgânica como fonte de energia e carbono por diversos grupos de microrganismos, reproduzindo, em unidades previamente projetadas, os fenômenos bioquímicos que ocorrem na natureza.

O tratamento biológico de efluentes pode ser realizado por microrganismos aeróbios e anaeróbios. Existem diversas variações nos processos de tratamento biológico destinadas a remover o máximo da matéria orgânica dos efluentes. Dentre os tratamentos aeróbios, o processo de lodos ativados é o mais utilizado no mundo. O processo consiste de um tanque de aeração contendo uma comunidade diversa de microrganismos, onde ocorre a degradação do material orgânico dissolvido, seguido de decantadores secundários, objetivando a separação da biomassa (lodo biológico) do efluente tratado. O lodo biológico é retornado ao reator, de forma a manter uma alta concentração de microrganismos capazes de degradar a matéria orgânica do efluente. Parte do lodo é descartada para manter o sistema em equilíbrio.

Restrições quanto à disponibilidade de água, o elevado custo de implantação das estações de tratamento de água, as limitações na capacidade de tratamento dos efluentes, as crescentes imposições ambientais legais e a necessidade de minimização dos custos de implantação e operação têm forçado diversas empresas a adotarem tecnologias que buscam reduzir e reutilizar a água no processo. Captar, tratar e utilizar água no processo e, em seguida, tratar e descartar os efluentes nos cursos d'água tem sido a forma convencional de se gerenciar os recursos hídricos nas fábricas. Uma alternativa mais atrativa seria tratar os efluentes e reutilizá-los, fechando, assim, os circuitos de água do processo. No entanto, em razão das exigências da qualidade de água nos processos industriais, aliadas às limitações dos tratamentos convencionais de efluentes, o reuso

total da água branca não tem sido amplamente adotado. Um dos fatores que afetam a eficiência de remoção da matéria orgânica é a temperatura. Atualmente, a maioria dos tratamentos biológicos de efluentes ocorre sob condições mesófilas. Na medida em que se reutiliza a água no processo, a temperatura da água branca tende a elevar-se a valores superiores a 40 °C, exigindo resfriamento antes do tratamento biológico. Para o tratamento de efluentes industriais, o tratamento biológico em condições termófilas pode conferir vantagens em relação ao tratamento mesófilo, tais como maior velocidade nas taxas de biodegradação, baixa geração de lodo, produção de lodos estabilizados e redução de custos com o resfriamento de efluentes.

Processos biológicos termófilos, utilizando sistemas de lodos ativados convencionais, têm a sua aplicação limitada, especialmente em razão da deficiência na formação dos flocos biológicos. Essa característica causa dispersão indesejável da massa microbiana, gerando efluentes com alta concentração de sólidos e elevada turbidez. Outro aspecto relevante no uso de sistemas termófilos de tratamento de efluentes é a redução da transferência de oxigênio para a fase aquosa em condições de altas temperaturas, o que pode comprometer a eficiência dos processos biológicos que dependem da atividade respiratória. Logo em sistemas de lodos ativados convencionais, a utilização deste sistema se torna inviável para tratar os efluentes e recirculá-los no processo.

Atualmente, existem processos em escala comercial onde se associam reatores biológicos aos sistemas de filtração por membranas para separação do lodo, sendo denominados Biorreatores a Membranas (BRMs). O funcionamento do sistema baseia-se na separação das fases líquida e sólida através de uma diferença de pressão, aplicada a uma estrutura porosa que possui poros de diâmetro médio da ordem de 0,01 a 1 µm (ultra e microfiltração). Partículas maiores do que os poros são retidas, enquanto o efluente tratado, isento de sólidos suspensos, passa através da membrana.

Os microrganismos termófilos são aqueles que têm crescimento ótimo entre 48 e 50 °C (MADIGAN et al., 2004). Esses microrganismos apresentam características que propiciam a sua sobrevivência em ambientes termófilos, como maior número de insaturações nos lipídeos de membrana e proteínas celulares termorresistentes, que diferem em relação às encontradas nos microrganismos mesófilos. Para o tratamento de efluentes, temperaturas acima de 50 °C são consideradas como tratamento termófilo. Sistemas tradicionais de tratamento biológico mesófilo trabalham nas temperaturas entre 20-40 °C.

Apesar de sua grande importância, o número de espécies microbianas conhecidas e descritas (diversidade de espécies) representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana

encontrada nos sistemas de tratamento biológico de efluentes industriais. Estudos baseados na análise direta da diversidade de bactérias de amostras obtidas de biorreatores, por meio do emprego de métodos moleculares, têm revelado um cenário composto por rica diversidade de organismos ainda não identificados.

A correlação entre a dinâmica das comunidades microbianas presentes em sistemas de tratamento biológico de efluentes industriais e sua eficiência operacional não está ainda bem compreendida, dada a dificuldade de isolamento e cultivo desses microrganismos. Das metodologias mais indicadas e utilizadas em estudos com essa abordagem, podem ser destacadas as que se baseiam na análise do gene 16S rDNA, em que se incluem a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), clonagem e seqüenciamento dos genes 16S rDNA.

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar comunidades microbianas em sistemas mesófilos e termófilos de tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado. O trabalho incluiu etapas específicas, visando: comparar a eficiência de BRMs sob condições mesófilas e termófilas; caracterizar morfológicamente lodos biológicos presentes em BRMs sob condições mesófilas e termófilas; avaliar parâmetros operacionais em BRMs sob condições mesófilas e termófilas; avaliar a diversidade genética das comunidades microbianas presentes em BRMs sob condições mesófilas e termófilas utilizando a técnica de PCR-DGGE; construir bibliotecas de 16S rDNA a partir de DNA extraído de amostras de lodos biológicos mesófilos e termófilos e identificar os principais grupos bacterianos presentes nesses lodos.

Para atender a estes objetivos, essa dissertação consta de dois capítulos. O Capítulo 1 aborda a avaliação dos sistemas de tratamento utilizando BRMs sob condições mesófilas e termófilas, caracterizando parâmetros operacionais e mudanças morfológicas dos lodos biológicos nessas condições. O Capítulo 2 aborda o isolamento de microrganismos presentes em amostras de lodos biológicos provenientes de BRMs sob condições mesófilas e termófilas, análise da diversidade genética de bactérias por PCR-DGGE e identificação das bactérias por seqüenciamento de clones pertencentes a bibliotecas de 16S rDNAs presentes nessas amostras.

# 1. CAPÍTULO 1: TRATAMENTO AERÓBIO DE EFLUENTES POR BIORREATORES A MEMBRANAS SOB CONDIÇÕES MESÓFILAS E TERMÓFILAS

## 1.1. INTRODUÇÃO

Tipicamente, os efluentes gerados nas indústrias de papel são monitorados com respeito aos seguintes parâmetros: demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), concentração de compostos organoclorados (AOX), toxicidade, sólidos sedimentáveis, sólidos suspensos totais (SST), pH e temperatura. Os efluentes industriais são ricos em matéria orgânica biodegradável e o tratamento biológico é geralmente adotado. Tratamentos físico-químicos apresentam custos relativamente altos, além de gerarem uma quantidade muito grande de lodo químico, sendo raramente adotados.

O tratamento biológico aeróbio é muito eficaz para a redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e ecotoxicidade, quando operado em condições ideais. Embora haja alto consumo de energia e maior produção de lodo quando comparado aos processos anaeróbios, os tratamentos biológicos aeróbios são os mais utilizados nas indústrias, sendo as lagoas aeradas e os processos de lodos ativados os mais comuns (JORDÃO e PESSOA, 2005).

Nos processos de tratamento conduzidos em condições aeróbias, uma das principais características é a geração de lodo, que necessita ser tratado e disposto adequadamente, o que eleva consideravelmente os custos operacionais. Outro atributo de sistemas biológicos aeróbios é o grande gasto energético com sistemas de aeração e, quando necessário, sistema de resfriamento de efluentes (JORDÃO e PESSOA, 2005).

Biorreatores a membranas (BRMs) são uma variante do processo de lodos ativados, processo de tratamento aeróbio de efluente mais utilizado mundialmente, onde o decantador secundário é substituído por um processo de separação por membranas de microfiltração e ou ultrafiltração (METCALF e EDDY, 2003). BRMs permitem altas concentrações de sólidos suspensos no reator e baixa produção de lodo, possuindo uma alta eficiência para remoção de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO). Entretanto, a colmatação dessas membranas tem sido o maior obstáculo para a sua implantação. Adicionalmente, o uso em larga escala de BRMs para tratamento de efluentes requer significativa queda no custo de implantação (MENG et al., 2009).

Recentemente, essa tecnologia tem ganhado popularidade como alternativa avançada para o tratamento de efluentes (HONG et al., 2002). A alimentação do sistema ocorre de forma análoga ao sistema de lodos ativados, e a retirada do efluente tratado ocorre por meio da aplicação de uma pressão negativa (vácuo), comumente aplicado nos sistemas onde o módulo de membrana fica submerso no biorreator ou por meio de pressão positiva, em que geralmente o módulo fica externo ao biorreator.

Os processos de filtração por membranas são tipicamente classificados de acordo com os tamanhos dos poros: a) microfiltração, em que o tamanho do poro varia de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$ ; b) ultrafiltração, em que o poro varia de 0,02 a 0,1  $\mu\text{m}$ ; c) nanofiltração, em que o tamanho dos poros varia de 0,001 a 0,01  $\mu\text{m}$  e d) osmose reversa, em que o tamanho dos poros varia de 0,0001 a 0,001  $\mu\text{m}$  (SILVA, 1999; METCALF e EDDY, 2003). A ultrafiltração é uma separação por pressão dirigida, baseada na permeabilidade de uma membrana. Essa permeabilidade é controlada por interações entre a membrana e moléculas de soluto ou solvente, entre a massa molecular e as configurações dos constituintes e, finalmente, por interações de natureza eletrostática. O fluxo através da membrana é controlado por vários fatores, dentre os quais se destacam: a pressão transmembrana; a resistência oferecida pela crescente concentração do material rejeitado na superfície da membrana; a densidade dessa camada, a qual controla a velocidade mantida na superfície da membrana; a viscosidade do fluido a ser filtrado pela membrana; a resistência de acúmulo de material na parte interna dos poros (SILVA, 1999). A colmatação da membrana ocorre quando seus poros são obstruídos e o fluxo inicial somente é restabelecido quando da limpeza das mesmas (RAGONA e HALL, 1998; CHEREMISINOFF, 2002; OLIVEIRA et al., 2007).

Quanto à configuração de funcionamento, os sistemas de BRM apresentam duas configurações básicas: (i) o módulo de membrana é integrado ao próprio reator, onde as membranas ficam submersas diretamente no lodo biológico, (ii) o módulo de membrana fica localizado externamente ao reator; o lodo concentrado volta para o reator enquanto o efluente tratado e filtrado é retirado do sistema.

BRMs são utilizados quando há a necessidade de alta qualidade do efluente a ser lançado no ambiente ou quando se opta pela sua reutilização em sistemas de fluxo fechado (JUDD, 2008; LIAO et al., 2006; YANG et al., 2006; WANG et al., 2008). O fechamento de circuito de águas causa considerável aumento da temperatura do efluente final, elevando a temperatura para valores superiores a 40 °C. Nesse caso, sistemas de resfriamento são uma exigência, para que não haja

comprometimento de eficiência antes do tratamento biológico, em dos sistemas convencionais (mesófilos) de tratamento. No tratamento de efluentes industriais, o tratamento biológico em condições termófilas pode oferecer vantagens em relação ao tratamento mesófilo, como: maiores velocidades das taxas de biodegradação, baixa geração de lodo, produção de lodos estabilizados e redução de custos com o resfriamento de efluentes. Como desvantagens do sistema termófilo, destacam-se a deficiência de formação de flocos biológicos, o que resulta na dispersão da massa microbiana e, conseqüentemente, em efluentes com alta concentração de sólidos suspensos e alta turbidez, aumento da corrosão pelo desgaste com o calor e a depreciação dos equipamentos, ocasionada por maiores temperaturas. Os flocos biológicos são formados, de acordo com JENKINS *et al.* (2003), por dois grupos bacterianos, as bactérias formadoras de flocos biológico e as bactérias filamentosas. O equilíbrio entre esses dois grupos favorece a formação de flocos, os quais sedimentarão no decantador secundário presente nos sistemas convencionais. Em condições termófilas, o crescimento filamentoso não ocorre, sendo observado um crescimento disperso, em que as células estão presentes sem a formação de flocos (SOUZA, 2007). Processos de tratamento aeróbios termófilos quase sempre apresentam características de sedimentabilidade inapropriadas, resultado do crescimento de microrganismos dispersos. Conseqüentemente, a separação de biomassa por decantação torna-se dificultada, o que frequentemente limita a utilização do tratamento de efluentes industriais por sistemas termófilos. Além disso, nessas condições há maior requerimento de oxigênio do que em processos mesófilos análogos, pois em temperaturas maiores, a solubilidade desse gás é menor (LAPARA e ALLEMAN, 1999).

Embora estudos pioneiros sobre o tratamento termófilo de efluentes datem de 1950, atualmente a maioria dos processos biológicos em grande escala opera em temperaturas mesófilas, em torno de 35 °C. RUDOLFS e AMBERG (1953) foram os primeiros autores a publicarem trabalhos relacionados ao tratamento aeróbio termófilo de efluentes de indústria de celulose e papel. Esses pesquisadores obtiveram uma taxa de remoção da DQO um pouco menor em relação ao tratamento convencional mesófilo após 24 horas de operação, embora as melhores taxas iniciais de degradação fossem obtidas em temperaturas acima de 50 °C. A baixa formação dos flocos bacterianos dificultou a decantação do lodo, influenciando diretamente na qualidade final da DQO do efluente. A adição de coagulantes ao sistema termófilo aumentou em 90 % a remoção da DQO. GEHM (1956) realizou, durante três meses sucessivos, um estudo piloto para o tratamento do efluente de uma indústria de

celulose kraft a 48-50 °C. A concentração de oxigênio dissolvido não foi detectada, embora não tenha sido observado qualquer efeito adverso no desempenho do sistema.

Os estudos de RUDOLFS e AMBERG (1953) e GEHM (1956) demonstraram conjuntamente três características em comum nos processos: alta taxa de degradação; baixa concentração de oxigênio dissolvido resultante da baixa solubilidade nessas condições de temperatura e sérios problemas com a decantação do lodo bacteriano. Outro aspecto referente a sistemas termófilos é a baixa diversidade microbiana encontrada (VIEIRA, 2007).

O tratamento da água branca por meio de sistemas biológicos termófilos tem como vantagem a possibilidade de tratar os efluentes nas mesmas temperaturas em que são gerados, sem a necessidade de equipamentos de resfriamentos, sem comprometer a eficiência da remoção de matéria orgânica. Portanto, a viabilidade técnica da utilização de biorreatores a membranas para o tratamento termófilo de efluentes de máquinas de papel é uma alternativa promissora aos sistemas mesófilos convencionais, capaz de viabilizar a adoção de fechamento de circuitos para reaproveitamento da água.

Os objetivos desse trabalho foram comparar a eficiência de BRMs sob condições mesófilas e termófilas na remoção de matéria orgânica; caracterizar morfológicamente os lodos biológicos presentes em BRMs, avaliando a presença de crescimento filamentosos e formação de flocos e avaliar parâmetros operacionais em BRMs sob condições mesófilas e termófilas.

## 1.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1. APARATO LABORATORIAL

Foram utilizados três reatores com volume nominal de 2 litros. Um dos reatores foi operado em condição mesófila. Os outros dois foram utilizados para tratamento sob condição termófila, com um sistema de alimentação constante de mesma carga orgânica para ambos os reatores (Figura 1). A vazão foi de 102 ml h<sup>-1</sup>. O controle da temperatura dos conteúdos dos reatores foi feito por meio de um sistema de termostato digital *Full Gauge*, Modelo *TIC 17*, acoplado a resistências elétricas. Para a separação do efluente tratado do lodo biológico, foram construídos seis módulos de ultrafiltração submersos (Zenon Environmental Inc.) (Figura 2). Enquanto três módulos estavam sendo utilizados para a ultrafiltração, os demais permaneciam imersos em solução de hipoclorito de sódio (*NaClO*) a 0,5 %, para a limpeza das membranas. O tempo de imersão na solução de *NaClO*

era de 24 horas. Após este período, os módulos eram lavados com água corrente de torneira para remoção das incrustações superficiais. A alimentação dos sistemas foi realizada utilizando-se bomba peristáltica *Masterflex*, Modelo *HV 07523-50*, montada com três cabeçotes *Masterflex*, Modelo *7518-00*. A ultrafiltração do lodo foi realizada por uma bomba com um conjunto de cabeçotes idêntico ao do sistema de alimentação.



Figura 1. Sistema de tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado utilizado neste trabalho: (1) Recipiente do afluente, (2) Bomba peristáltica para bombeamento do afluente, (3) Reator 1 - condição mesófila, (4) Reator 2- condição termófila, (5) Reator 3- condição termófila, (6) Bomba peristáltica para bombeamento do efluente tratado, e (7) coletores dos efluentes tratados.



Figura 2. Módulo de membrana submerso utilizado nos reatores.

### 1.2.2. ADAPTAÇÃO DA MICROBIOTA

Previamente ao início dos experimentos, os lodos biológicos foram adaptados durante 10 dias às condições de tratamento utilizadas durante todo o experimento. A temperatura inicial nos 3 reatores foi de 35 °C (reator mesófilo). A temperatura foi aumentada gradualmente nos reatores 2 e

3 (reatores termófilos), até se atingir a temperatura de 55 °C. O aumento gradativo da temperatura foi realizado alterando-se a temperatura para um valor superior, somente após constatada a estabilização da capacidade de remoção da matéria orgânica.

### 1.2.3. LODO BIOLÓGICO

O lodo biológico utilizado para inoculação dos reatores foi coletado de um sistema de tratamento de efluentes por lodos ativados de uma fábrica de papel reciclado. O local de coleta do lodo biológico foi a linha de recirculação de sólidos.

### 1.2.4. AFLUENTES

Os afluentes utilizados foram efluentes industriais coletados na própria fábrica de papel reciclado onde foi adquirido o lodo biológico. Volumes necessários para o abastecimento do experimento durante uma semana eram coletados na canaleta de efluentes, entre o decantador primário e o reator aeróbio de lodos ativados, sendo armazenados em bombonas de plástico de 50 litros e preservados sob refrigeração a 4 °C. O pH do afluente foi ajustado para valores entre 6,5 e 7,5.

Os afluentes dos reatores foram constantemente analisados quanto à demanda bioquímica de oxigênio (DBO<sub>5</sub>) total e solúvel, demanda química de oxigênio (DQO) total e solúvel, cor, sólidos suspensos totais (SST), sólidos dissolvidos totais (SDT), cloretos, dureza, nitrogênio total (N<sub>total</sub>), fósforo total (P<sub>total</sub>), pH e condutividade elétrica (CE). As técnicas empregadas para as análises físico-químicas dos efluentes seguiram os procedimentos descritos no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA 1998) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização físico-química dos afluentes.

Parâmetros	Unidade	Valores
DQO <sub>total</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	5.782± 154
DQO <sub>solúvel</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	5.070 ± 612
DBO <sub>5 total</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	2.206± 183
DBO <sub>5 solúvel</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	1.995± 123
Cor	mg.L <sup>-1</sup>	149,9±16,6
Cloretos	mg.L <sup>-1</sup>	144 ± 19,1
Dureza <sub>total</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	208,6 ± 20,1
N <sub>total</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	0,70 ± 0,05
P <sub>total</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	0,092 ± 0,001
ST	mg.L <sup>-1</sup>	182 ± 70
SST	mg.L <sup>-1</sup>	1.522 ± 324
SDT	mg.L <sup>-1</sup>	64 ± 25
pH	-	5,4 ± 1,7
CE	mS.cm <sup>-1</sup>	2,4 ± 0,26

### 1.2.5. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Os procedimentos analíticos realizados nos efluentes tratados, durante o experimento, foram: Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), Sólidos Suspensos Fixos (SSF), Demanda Química de Oxigênio (DQO), turbidez e oxigênio dissolvido. Essas análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20ª ed. (1998).

#### 1.2.5.1. DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO

O método utilizado para a análise de DQO foi o método colorimétrico, segundo APHA - *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20ª ed. (1998). O método baseia-se no princípio de que grande parte dos compostos orgânicos presentes no efluente podem ser oxidados, quando digeridos na presença de dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e de ácido sulfúrico

concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após a digestão, o K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> remanescente é lido em espectrofotômetro a 420 ou 600 nm. O K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> consumido e o material orgânico oxidado são calculados em termos de equivalente de oxigênio.

Foi utilizada uma cubeta de reação na qual foram colocados 2,5 ml da amostra, 1,5 ml da solução de digestão e 3,5 ml do reagente ácido sulfúrico. As amostras foram digeridas durante 120 minutos à temperatura de 150 °C , em um termorreator da marca Hach DRB 200. Após a digestão das amostras de concentração entre 100 e 1.000 mg.L<sup>-1</sup> , estas foram resfriadas e lidas em um fotômetro com comprimento de onda de 600 nm. Para a determinação da concentração de DQO, foi feita uma curva padronizada de 100 a 1.000 mg.L<sup>-1</sup> de DQO, utilizando-se para isso o biftalato hidrogênio de potássio (HOCC6H4COOK).

A eficiência de remoção de DQO foi determinada utilizando-se os valores de DQO de entrada e de saída dos reatores. Os cálculos para a determinação da eficiência de remoção de DQO foram efetuados de acordo com a equação 1.

$$\%DQO = \frac{DQO_a - DQO_e}{DQO_a} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

%DQO = Remoção de DQO (%)

DQO<sub>a</sub> = DQO afluente (entrada) (kg.m<sup>-3</sup>)

DQO<sub>e</sub> = DQO efluente (saída) (kg.m<sup>-3</sup>)

#### 1.2.5.2. SÉRIE DE SÓLIDOS (SST E SSV)

As concentrações de SST foram determinadas filtrando-se 10 ml das amostras em membranas de fibra de vidro, de porosidade igual a 1,2 µm, previamente lavadas com água desionizada e secas em estufas a 103±2 °C por 2 horas. Após as filtrações, os filtros e as amostras foram levados à estufa e mantidos a 103±2 °C até atingirem peso constante, para determinação da massa seca. A concentração de SST foi efetuada pela diferença de massa do filtro com e sem amostra. As concentrações de SSF foram determinadas a partir das amostras de SST.

Após análise de SST, os filtros e as amostras foram colocados em mufla e calcinados a 550 °C durante 20 minutos, para determinação dos sólidos suspensos fixos (SSF). Por diferença de massa entre o SST e o SSF, calculou-se a concentração de SSV (equação 2):

$$\text{SSV} = \text{SST} - \text{SSF} \quad (2)$$

Onde,

SSV = Sólidos Suspensos voláteis (g.L<sup>-1</sup>)

SST = Sólidos Suspensos totais (g.L<sup>-1</sup>)

SSF = Sólidos Suspensos fixos (g.L<sup>-1</sup>)

#### 1.2.5.3. TURBIDEZ

A análise de turbidez dos efluentes tratados foi feita utilizando-se um turbidímetro DMC 2 (Digimed), segundo recomendações do fabricante.

#### 1.2.5.4. OXIGÊNIO DISSOLVIDO

As concentrações de oxigênio dissolvido dos reatores biológicos foram mensuradas utilizando-se um oxímetro WTW 315i (Precision Labs).

#### 1.2.6. OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS

Foram realizadas observações microscópicas frescas e fixadas do lodo para se acompanhar e verificar as alterações morfológicas dos lodos biológicos. Para a realização das observações microscópicas, foi utilizado microscópio de contraste de fase, da marca LEICA, modelo DMLS, dotado de uma máquina digital marca Nikon, modelo COOLPIX 4500, para obtenção das fotomicrografias.

#### 1.2.7. PARÂMETROS OPERACIONAIS

Os parâmetros operacionais de controle dos reatores durante a condução do experimento foram idade do lodo, relação A/M, tempo de retenção hidráulica (TRH) e carga orgânica volumétrica.

### 1.2.7.1. IDADE DO LODO

A idade do lodo foi determinada com base nos valores de SSV no interior dos reatores e do lodo de descarte. Os cálculos para a determinação da idade do lodo foram efetuados de acordo com a equação 3.

$$\theta_c = \frac{V_r \cdot X_r}{Q_d \cdot X_d} \quad (3)$$

Onde,

$\theta_c$  = Idade do lodo (dias)

$V_r$  = Volume do tanque de aeração ( $m^3$ )

$X_r$  = Concentração de sólidos no reator ( $Kg.m^{-3}$ )

$Q_d$  = Vazão de descarte do lodo ( $m^3.dia^{-1}$ )

$X_d$  = Concentração de sólidos no lodo de descarte ( $Kg.m^{-3}$ )

### 1.2.7.2. RELAÇÃO ALIMENTO/MICROORGANISMO (A/M)

A relação A/M foi determinada com base nos valores de DQO do afluente, das concentrações de SSV no reator e da vazão de entrada do afluente. Os cálculos para a determinação da relação alimento/microrganismos foram efetuados de acordo com a equação 4.

$$A/M = \frac{Q_r \cdot DQO_a}{V_r \cdot X_r} \quad (4)$$

Onde,

A/M = Taxa alimento/microrganismo ( $mg\ DBO \cdot mg\ SSV^{-1} \cdot dia^{-1}$ )

$DQO_a$  = Demanda química de oxigênio do afluente ( $Kg.m^{-3}$ )

$V_r$  = Volume do reator ( $m^3$ )

$Q_a$  = Vazão afluente ( $m^3.dia^{-1}$ )

$X_r$  = Concentração de sólidos no reator ( $Kg.m^{-3}$ )

### 1.2.7.3. TEMPO DE RETENÇÃO HIDRÁULICA (TRH)

O TRH foi determinado com base nos valores das vazões de entrada dos afluentes e dos volumes contidos nos reatores. Os cálculos para a determinação do tempo de retenção hidráulica foram efetuados de acordo com a equação 5:

$$\text{TRH} = \frac{V_r}{Q_a} \quad (5)$$

Onde,

TRH = Tempo de retenção hidráulica (horas)

$V_r$  = Volume das unidades ( $\text{m}^3$ )

$Q_a$  = Vazão afluente ( $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ )

### 1.2.7.4. CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA

Corresponde ao quociente entre a carga orgânica e tempo. Os cálculos para a determinação da COV foram efetuados de acordo com a equação 6.

$$\text{COV} = \frac{Q_a \cdot \text{DQO}_a}{V_r} \quad (6)$$

Onde,

COV = Carga orgânica volumétrica ( $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ )

$Q_a$  = Vazão afluente ( $\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ )

$\text{DQO}_a$  = Demanda química de oxigênio do afluente ( $\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$ )

$V_r$  = Volume do reator ( $\text{m}^3$ )

### 1.2.8. INOCULAÇÃO DO COMPOSTO

Foi realizada a inoculação de uma amostra de composto de resíduo sólido urbano em um dos reatores mantidos em condição termófila (reator 3). O composto foi coletado de um sistema de compostagem de lixo urbano em fase termófila. Foram inoculados 5 gramas do composto para um volume de dois litros do reator. Essa estratégia foi utilizada com o intuito de se aumentar a diversidade microbiana no reator. Para isso, levou-se em consideração que compostos de resíduos

sólidos urbanos apresentam alta diversidade microbiana em sua fase termófila (ADAMS e FROSTICK, 2009) e que reatores de tratamento de efluentes de fábrica de papel, operando em condição termófila, podem apresentar baixa diversidade bacteriana (VIEIRA, 2007).

### 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os reatores operaram durante 102 dias. A coleta de dados foi iniciada após 10 dias de adaptação do lodo biológico nos reatores. Na Tabela 2 estão os parâmetros operacionais dos reatores durante o experimento.

Tabela 2. Parâmetros operacionais dos reatores durante o experimento. COV – carga orgânica volumétrica; TDH - tempo de retenção hidráulica, A/M - alimento por microrganismo.

Parâmetro	Unidades	Reator 1	Reator 2	Reator 3
COV	Kg.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup>	3,6±0,49	3,6±0,49	3,6±0,49
TRH	horas	19,6	19,6	19,6
SST	mg.L <sup>-1</sup>	4.738±1.127	5.469±1.108	4.4954±1.356
SSV	mg.L <sup>-1</sup>	3.813±845	3.805±806	3.114±1.010
A/M	mg DQO.mg <sup>-1</sup> SSV.d <sup>-1</sup>	0,84±0,19	0,84±0,21	1,10±0,40
Idade do lodo	dias	20	20	20

Os parâmetros adotados para idade do lodo, TRH e SSV foram equivalentes a sistemas de lodos ativados sob aeração prolongada (idade do lodo: 18-30 dias, tempo de retenção hidráulica: 16-24 horas, SSV: 2.500-4.000 mg.L<sup>-1</sup>). A diferença deste sistema para o sistema convencional de lodos ativados é que a biomassa permanece por mais tempo no reator, porém continua recebendo a mesma carga orgânica, implicando em reatores de maiores dimensões. Isso permite que o lodo saia estabilizado do tanque de aeração, o que dispensa a adoção de etapa de estabilização complementar do lodo, fator ambientalmente e economicamente relevante (VON SPERLING, 2002). Outra vantagem de sistemas de tratamento que operam em sistemas de aeração prolongada é o aumento da remoção de matéria orgânica, em razão do maior tempo de retenção do lodo no reator (maior idade do lodo). Tanto o reator mesófilo (reator 1) quanto os reatores termófilos (reatores 2 e 3) alcançaram valores altos de remoção de DQO, indicando que condições operacionais

características de lodos ativados sob aeração prolongada podem ser utilizadas para biorreatores a membrana.

Nas Figuras 3 e 4 estão os valores de Sólidos Suspensos Voláteis nos três reatores. Não foram observadas diferenças expressivas desses valores nos dois reatores mantidos em condição termófila, em resposta ao aumento da temperatura no decorrer do experimento. A maior média do valor de SSV foi alcançada no reator mesófilo ( $3.813 \pm 845 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As oscilações ocorridas no decorrer do tratamento foram atribuídas a variações nas características dos afluentes, coletados periodicamente de uma fábrica de papel reciclado, onde mudanças operacionais geram efluentes com diferentes características. Ressalta-se que os parâmetros de cargas do afluente foram os mesmos para todos os reatores, o que resultou na semelhança de dados - quedas e aumentos nos valores de SSV - durante o período de tratamento.

No dia 94, quando o reator 3 já estava com a temperatura de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , foi inoculada uma amostra de 5 g de composto de resíduo sólido urbano, coletado no estádio termófilo da compostagem. Nessa fase, sistemas de compostagem exibem grande diversidade de microrganismos (ADAMS e FROSTICK, 2009). O objetivo da inoculação do composto no reator 3, já em condição termófila, foi o de aumentar a diversidade da comunidade microbiana presente, já que nessas condições de maiores temperaturas, a diversidade bacteriana encontrada tende a ser menor do que em sistemas mesófilos (VIEIRA, 2007). A inoculação resultou em redução momentânea da concentração de SSV no reator, para valor próximo a  $2.000 \text{ mg.L}^{-1}$ . Após 4 dias da inoculação, a concentração de SSV retornou a valores próximos a  $3.000 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 4).

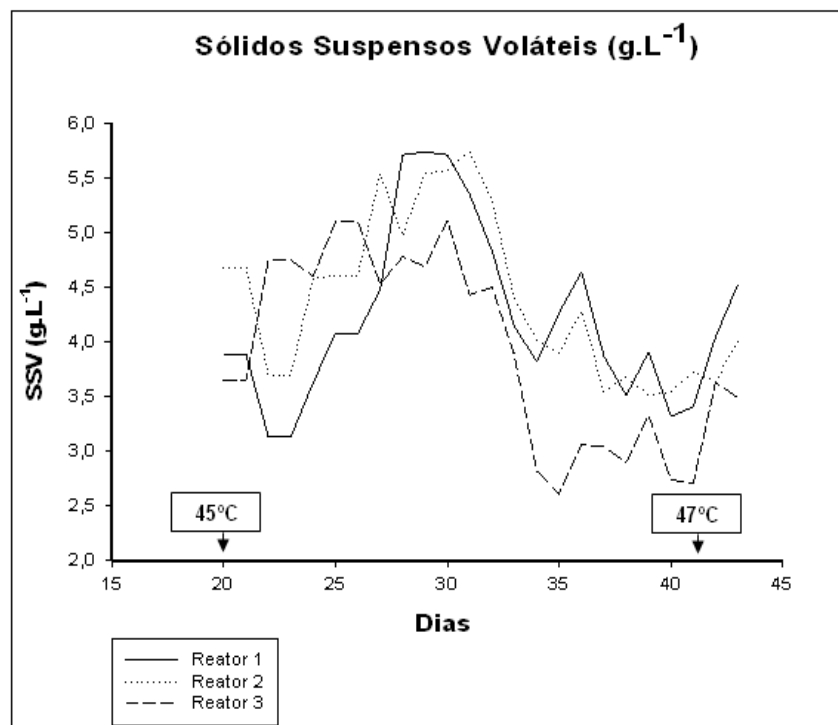
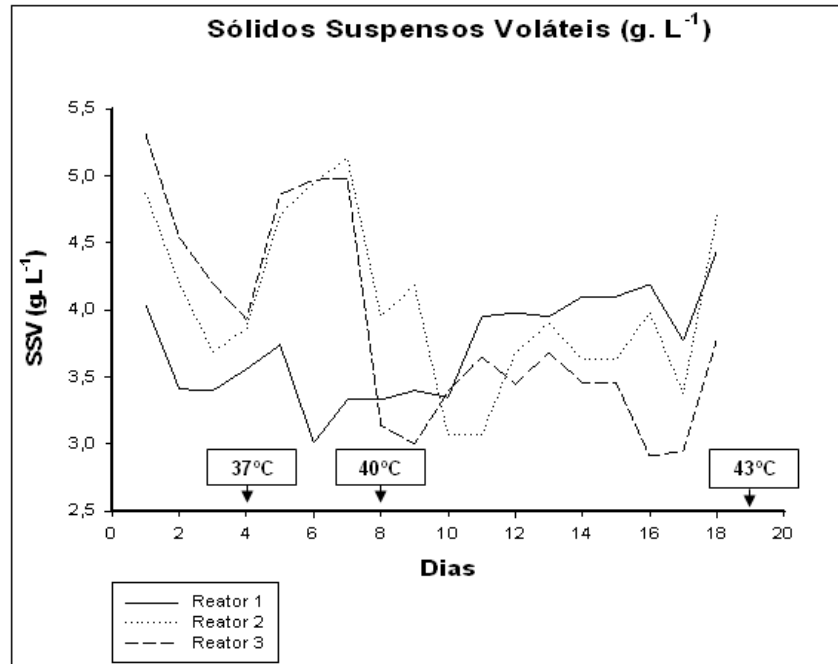


Figura 3. Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) nos biorreatores a membranas: reator 1, onde a temperatura foi mantida a 35 °C (Reator mesófilo 1), reatores 2 e 3, onde ocorreu o aumento gradual de temperatura até o 43º dia de tratamento onde a os reatores 2 e 3 atingiram a temperatura de 47 °C.

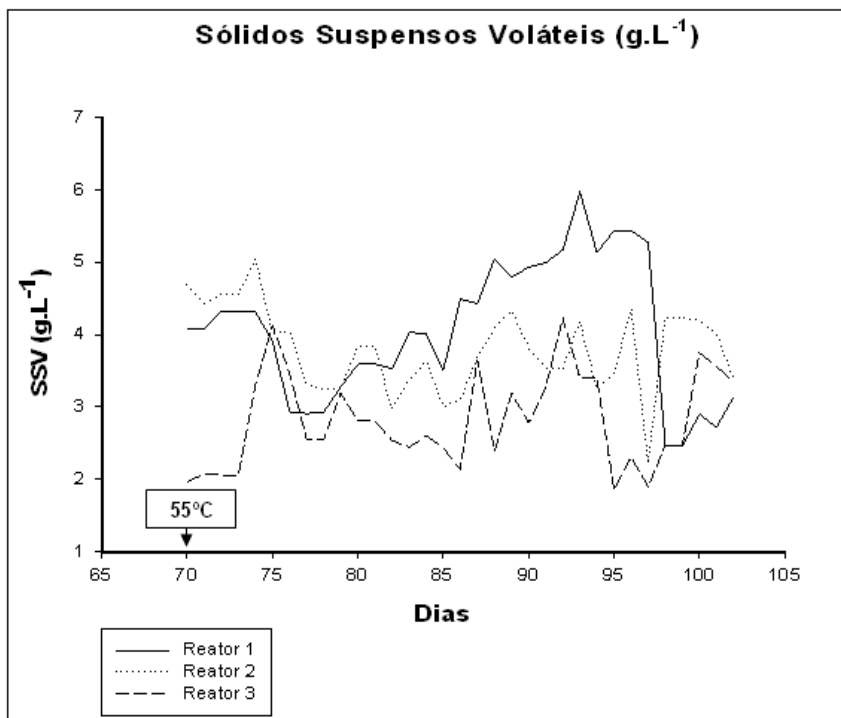
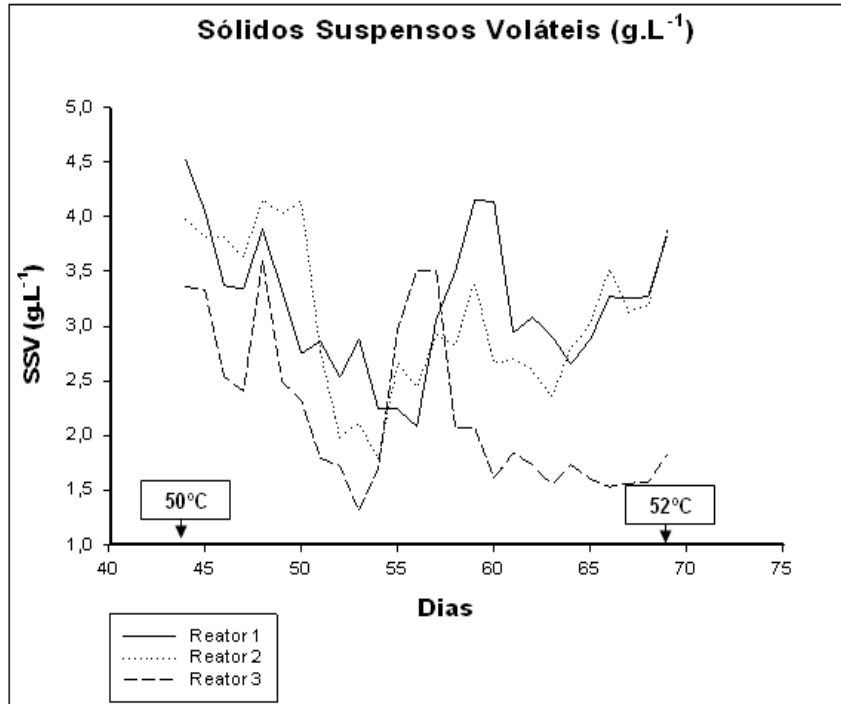


Figura 4. Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) nos biorreatores a membranas: reator 1, onde a temperatura foi mantida a 35 °C (Reator mesófilo 1), reatores 2 e 3, onde ocorreu o aumento gradual de temperatura até se atingir a temperatura de 55°C (reatores termófilos 2 e 3). O reator 3 recebeu um inóculo de composto de resíduo sólido urbano no 94º dia após o início do tratamento.

A eficiência de remoção de DQO foi elevada (acima de 92 %) em todos os reatores (Figura 5 e 6). Não foram verificadas modificações expressivas da eficiência de remoção de DQO em resposta ao aumento gradual da temperatura nos reatores 2 e 3. No entanto, em razão das diferenças na composição do afluente, variações na eficiência dos sistemas de tratamento biológico são inevitáveis. Em algumas amostragens, observou-se que a comunidade bacteriana termófila se mostrou mais sensível às variações da qualidade do afluente (Ex. dias 16, 25 e 57).

Após a adição do composto no 94º dia, ocorreu uma queda acentuada na eficiência de remoção de DQO no reator 3. Esse resultado foi atribuído ao acréscimo de matéria orgânica no reator, juntamente com a adição da amostra do composto, e não à redução da atividade de degradação do lodo biológico. Após 3 dias da inoculação, a eficiência foi novamente estabilizada em valor similar ao obtido no reator 2, também mantido em condição termófila.

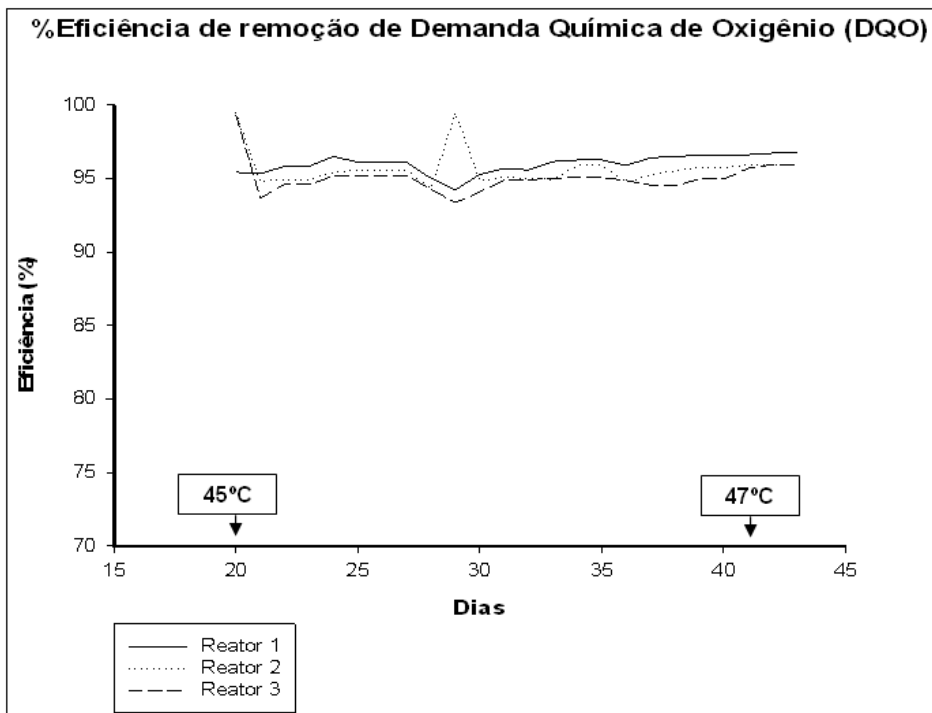
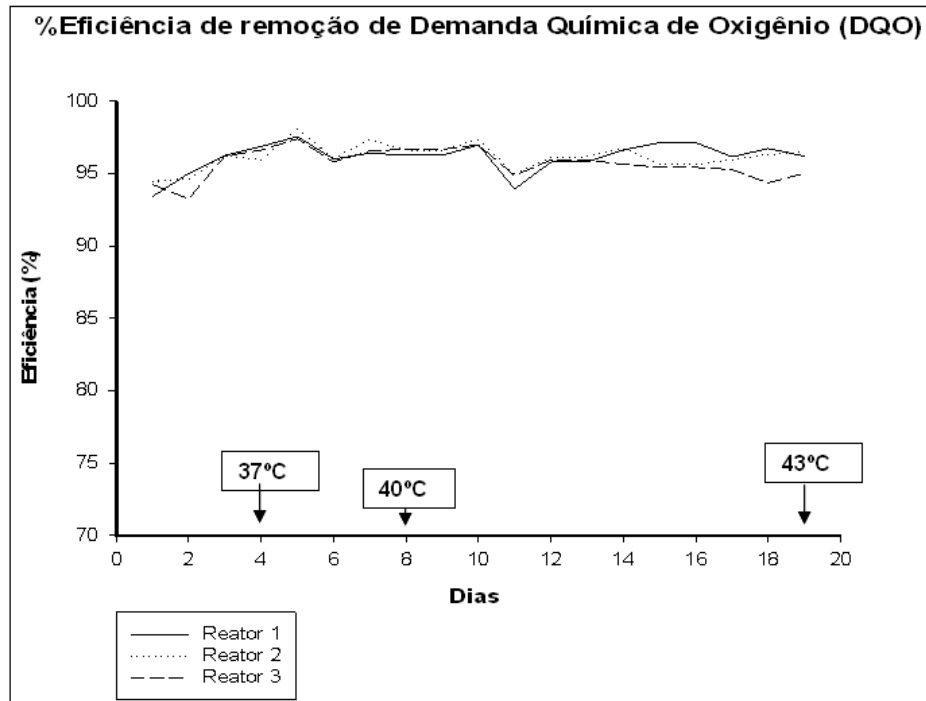


Figura 5. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) nos biorreatores a membranas: reator 1, onde a temperatura foi mantida a 35 °C (Reator mesófilo 1), reatores 2 e 3, onde ocorreu o aumento gradual de temperatura até o 43º dia de tratamento onde a os reatores 2 e 3 atingiram a temperatura de 47 °C.

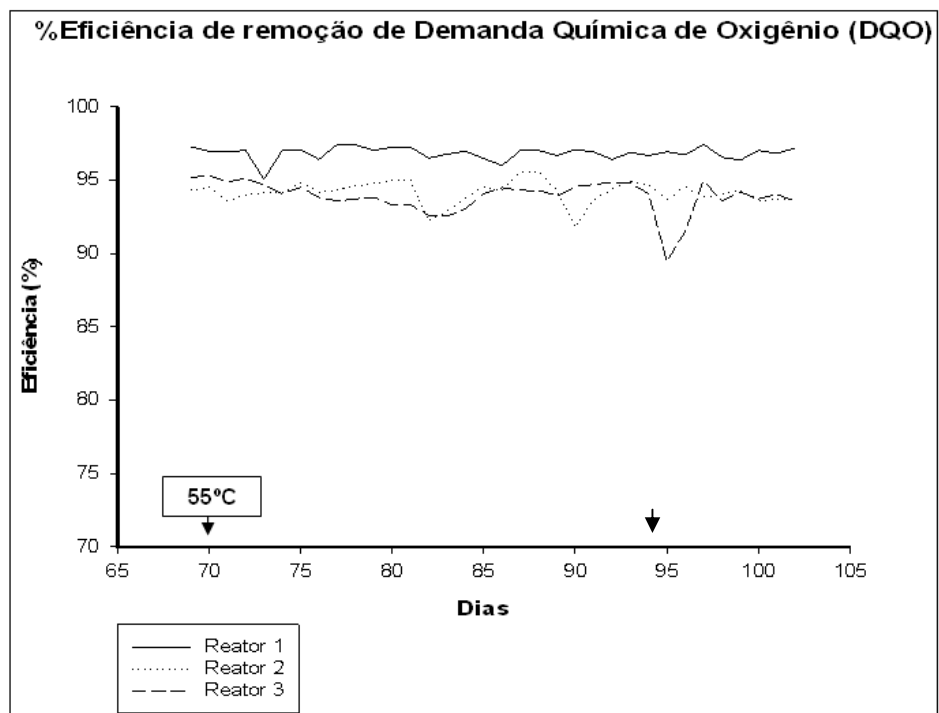
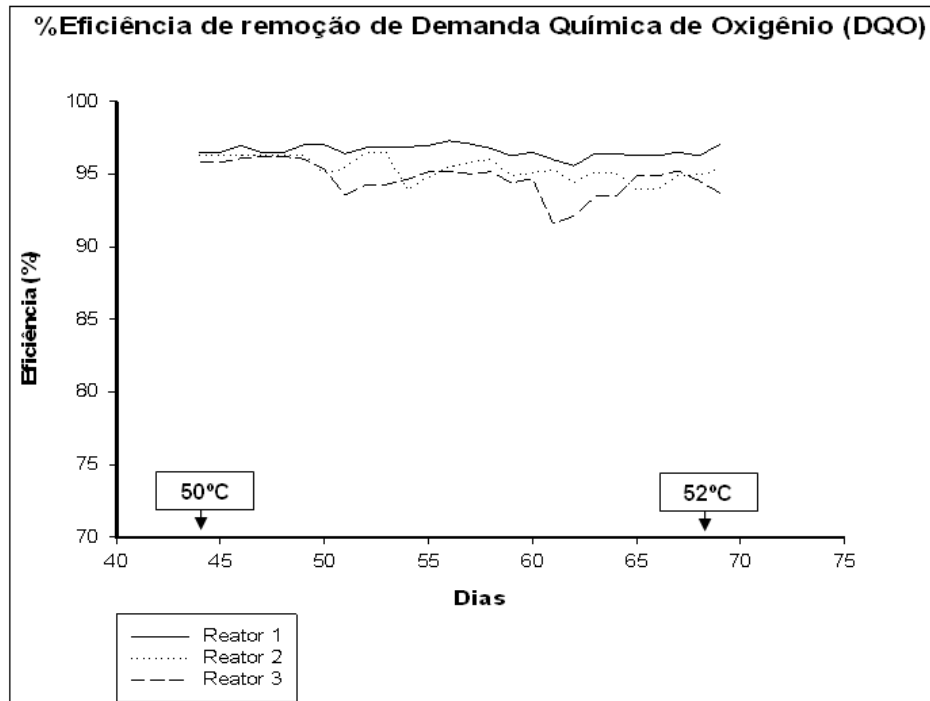


Figura 6. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) nos biorreatores a membranas: reator 1, onde a temperatura foi mantida a 35 °C (Reator mesófilo 1), reatores 2 e 3, onde ocorreu o aumento gradual de temperatura até se atingir a temperatura de 55°C (reatores termófilos 2 e 3). O reator 3 recebeu um inóculo de composto de resíduo sólido urbano no 94º dia após o início do tratamento ( →:adição do composto).

Os lodos biológicos dos reatores 2 e 3, adaptados às temperaturas de 35 e 40 °C, caracterizaram-se pela presença de filamentos bacterianos e flocos biológicos típicos (Figura 7). A partir da temperatura de 45 °C, essas formas de crescimento bacteriano não são observadas, predominando o crescimento disperso. As mudanças morfológicas detectadas são indícios de mudanças na composição das comunidades presentes nos reatores termófilos, em resposta ao aumento gradual da temperatura, comparativamente ao reator mesófilo. A mudança de crescimento na forma de flocos para crescimento disperso, em resposta ao aumento da temperatura em reatores biológicos, é amplamente reportada na literatura, sendo essa mudança o principal limitante da adoção de sistemas termófilos de tratamento de efluentes industriais (ZITA et al., 1997; LAPARA e ALLEMAN, 1999; SOUZA, 2007).

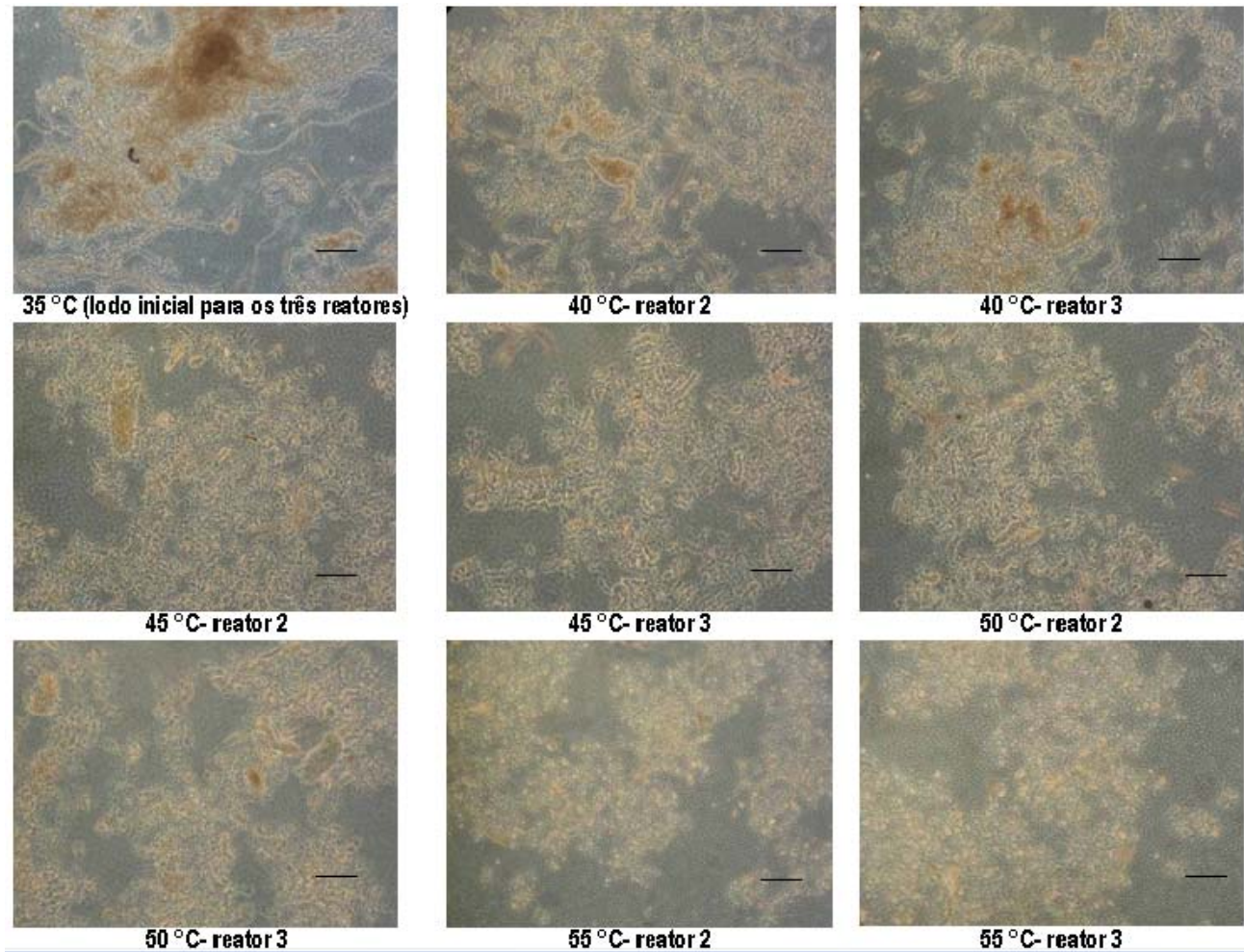


Figura 7. Fotomicrografias dos lodos biológicos nos reatores. Na figura estão as fotomicrografias do lodo inicial para os reatores (35 °C), e as fotomicrografias dos lodos biológicos para os reatores 2 e 3 nas temperatura de 40, 45, 50 e 55 °C (Aumento de 100X) (60 µm — ).

Embora tenha predominado o crescimento disperso nos reatores termófilos, não houve efeito deletério dessa forma de crescimento sobre a qualidade do efluente tratado, em razão da retenção dos sólidos no reator promovida pelo sistema de filtração. O resultado demonstra que o processo de filtração por membranas tem potencial para viabilizar a adoção de sistemas de tratamento de efluentes operando em condições termófilas. Durante a operação dos reatores termófilos, obteve-se efluente tratado livre de sólidos suspensos e de baixa turbidez, com características adequadas para sua reutilização no processo de fechamento de circuito de águas de uma fábrica. O valor máximo de turbidez exigido para a água de processo é de 5 UNT (SANTIAGO, 2002). Nesse trabalho, foram encontrados valores de turbidez abaixo de 0,5 UNT (dados não-apresentados).

Os valores de oxigênio dissolvido nos reatores foram mantidos acima de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> no reator mesófilo (reator 1) e nos reatores 2 e 3 até a temperatura de 48 °C. Acima dessa temperatura, não foi possível a detecção de oxigênio dissolvido. De acordo com o fabricante, o equipamento utilizado para análise de oxigênio dissolvido durante o experimento não é capaz de realizar leituras acima da temperatura de 50 °C. Logo, não foi possível avaliar se a concentração de oxigênio nessa condição de temperatura foi fator limitante para o metabolismo da comunidade bacteriana nos reatores termófilos. Contudo, essa condição de baixa disponibilidade de oxigênio não afetou significativamente a eficiência de remoção de DQO (Figura 4.1 e 4.2), indicando não haver limitação do aceptor de elétrons nos reatores termófilos.

#### 1.4. CONCLUSÕES

- A utilização de BRM operando em condição termófila é uma alternativa eficiente para o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado;
- A eficiência de remoção de matéria orgânica nos reatores operando em condição termófila atingiu valores considerados satisfatórios, não diferindo do valor encontrado no reator operando em condição mesófila;
- A adição de composto de resíduo sólido urbano não alterou a eficiência do tratamento termófilo;
- A utilização de parâmetros semelhantes ao de lodos ativados por aeração prolongada foi adequada para BRM operando sob condições mesófila e termófila;
- Ocorreram mudanças morfológicas nos lodos biológicos com o aumento da temperatura. O crescimento disperso passou a ser predominante em relação ao crescimento filamentoso e à formação de flocos, indicando uma mudança na composição da comunidade microbiana.

## 1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.D.W., FROSTICK, L.E. Analysis of bacterial activity, biomass and diversity during windrow composting. *Waste Management*, v. 29,p. 598–605.2009.
- CHEREMISINOFF, N.P. *Handbook of water and wastewater treatment technologies*.1th ed. Woburn. U.S.A.: Butterworth-Heinemann. 2002.
- GEHM, H.W. Activated sludge at high temperatures and pH values. In: *Biological treatment of sewage and industrial Waster*, v. 1: Aerobic Oxidation. Eds. J. McCabe and W. W. Eckenfelder Junior,Reinhold publishing Corporation, New York, NY, U. S. A. 1956.
- HONG, S.P.; BAE, T.H.; TAK, T.M.; HONG, S. RANDALL A. Fouling control in activated sludge submerged hollow fiber membrane bioreactors. *Desalination*, v.143, p. 219-228.2002.
- JENKINS, D.; RICHARD, M.G.; DAIGGER, G.T. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. 2nd ed. Michigan, U.S.A.:Lewis Publisher. 2003.
- JORDAO, E. P. ; PESSOA, C. A. . *Tratamento de Esgotos Domésticos*. 4. ed. Belo Horizonte: Segrac Editora. v. 1. 906 p. 2005.
- JUDD, S. The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology*, v. 26,n.2, p.109–116.2008.
- LAPARA, T.M.; ALLEMAN, J.E. Thermophilic aerobic biological wastewater treatment – Paper Review. *Water Research*. v. 33, n.4, p. 895–908. 1999.
- LIAO, B.Q.; KRAEMER, J.T.; BAGLEY, D.M. Anaerobic membrane bioreactors: applications and research directions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v.36, n.6, p.489–530. 2006.
- MADIGAN, M. T.; MARTIKON,J. M.; PARKER. *Microbiologia de Brock*. 10<sup>th</sup> ed. Brasil: Pearson Prentice Hall, 608p.2004.
- MENG, F.; CHAEB, S.; DREWSC ,A.; KRAUMEC, M.; SHIND, H.;YANGA, F. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Research*,v.48, p. 1489 – 1512.2009.
- METCALF e EDDY. *Wastewater engineering- Treatment, disposal, reuse*. 4<sup>th</sup> ed. New York : McGraw-Hill, 1819 p. 2003.
- OLIVEIRA, C.R.; SILVA, C.M.; MILANEZ, A.F. Application of ultrafiltration in the pulp and paper industry: metals removal and whitewater reuse. *Water Science and Technology*, v. 55, n.6, p. 177-123. 2007.

- RAGONA, C.S.F.; HALL, E.R. Parallel operation of ultrafiltration and aerobic membrane bioreactor treatment systems for mechanical newsprint mill whitewater at 55 °C. *Water Science and Technology*. v. 38, n. 4-5, p. 307-314. 1998.
- RUDOLFS, W.; AMBERG, H. R. White water treatment. V. Aeration with nonflocculent growths. *Sewage Indust. Waster*, v. 25, p. 70-78.1953.
- SANTIAGO, P.S.S. Melhores Práticas para água em fábricas de papel e celulose. 35° Congresso e Exposição Anual de Celulose e Papel. São Paulo. Brasil. Outubro 2002.
- SILVA, C.M. Flux prediction in high-shear microfiltration. Toronto, CA: University of Toronto, 1999. 190 p. (Thesis of Ph.D. in Chemical Engineering).
- SOUZA, C. A. Tratamento termofílico aeróbio de efluente de máquina de papel utilizando biorreator a membranas. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, MG. 127 p. 2007.
- VIEIRA, N. M. Caracterização da microbiota de tratamentos de efluentes em condições mesofílica e termofílica. Monografia. Universidade Federal de Viçosa, MG. 54 p. 2007.
- TRIPATHI, C. S.; ALLEN, D. G. Comparison of mesophilic and termophilic aerobic biological treatment in sequencing batch reactors treating bleached kraft pulp mill effluent. *Water Research*. v. 33, n. 3, p. 836-846. 1999.
- VON SPERLING, M. . Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol. 4. Lodos ativados. Belo Horizonte, DESA-UFMG. v1. 428 p. 2002.
- YANG, W.; CICEK, N.;ILG, J. State-of-the-art of membrane bioreactors: worldwide research and commercial applications in North America. *Journal of Membrane* , v. 270,n.1-2, p.201-211. 2006.
- WANG, Z.; WU, Z.; MAI, S.; YANG, C.; WANG, X.; AN, Y.; ZHOU, Z. Research and applications of membrane bioreactors in China: progress and prospect. *Separation and Purification Technology*, v.62, n.2, p.249-263. 2008.

## 2. CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE BACTERIANA EM BIORREATORES A MEMBRANA EM CONDIÇÃO MESÓFILA E TERMÓFILA, DURANTE O TRATAMENTO DE EFLUENTE DE FÁBRICA DE PAPEL RECICLADO

### 2.1. INTRODUÇÃO

A excepcional atividade dos microrganismos é baseada na sua capacidade metabólica, na adaptabilidade genética e na capacidade de ocupar e colonizar uma grande diversidade de ambientes, o que os torna importante fonte de recursos genéticos para aplicações biotecnológicas. As bactérias representam um dos grupos de organismos mais abundante e diverso na Terra (WHITMAN, 1998; HORNER-DEVINE et al., 2004). Entretanto, apenas uma pequena fração dessa diversidade bacteriana é conhecida (TORSVIK et al., 2002). O número total de bactérias na Terra é estimado entre  $4$  e  $6 \times 10^{30}$ , com a maior proporção de células bacterianas residindo, possivelmente, nas sub-superfícies oceânica e terrestre ( $3,4 \times 10^{30}$  e  $0,25-2,5 \times 10^{30}$ , respectivamente) (WHITMAN, 1998).

Classicamente, a investigação da diversidade microbiana e dos diversos processos biológicos baseia-se na obtenção de culturas puras. Essa técnica é dependente do cultivo em laboratório. De acordo com TORSVIK et al. (1990), freqüentemente menos de 10 % das bactérias enumeradas pela técnica de contagem microscópica direta, numa determinada amostra, podem ser cultivadas. Como exemplo, tem-se que em amostras de solos apenas uma pequena fração, 1 % ou menos, da diversidade microbiana é acessível, limitando as análises àqueles microrganismos que crescem *in vitro* (TORSVIK et al., 2002).

A diversidade de uma comunidade microbiana é definida por dois componentes, o número total de espécies, ou riqueza, e a distribuição de indivíduos nas espécies presentes, ou equitabilidade (NÜBEL et al., 1999). De modo simplificado, em estudos envolvendo plantas e animais, a riqueza é composta pelo número de espécies ou *taxa* de uma comunidade ou amostra, e a equitabilidade é constituída pelo número de indivíduos em cada população ou pela distribuição da abundância relativa dos diferentes *taxa* (TÓTOLA e CHAER, 2002). Em perfis eletroforéticos de comunidades bacterianas obtidos pela técnica de DGGE, as bandas exibidas podem não corresponder a diferentes espécies, uma vez que várias espécies bacterianas possuem múltiplas cópias do gene 16S rDNA, com seqüências que apresentam microheterogeneidade suficiente para serem discriminadas pela técnica, resultando no aparecimento da várias bandas para uma mesma

espécie (NÜBEL et al., 1996). Desse modo, vários autores referem-se às bandas visualizadas em géis de DGGE como unidades taxonômicas operacionais (UTO's). Para se medir a diversidade microbiana de comunidades, faz-se o uso de índices de diversidade, como o Índice de Shannon-Weaver, que é o índice mais comumente utilizado pelos ecologistas. Nele, os componentes da riqueza são ponderados pelas suas abundâncias relativas, a eqüitabilidade. O Índice de Diversidade de Shannon-Weaver apresenta valores mais altos na medida em que se aumenta o número de espécies e o número de elementos individuais está mais uniformemente distribuído em dada comunidade. Já a eqüitabilidade é considerada baixa em situações em que algumas espécies (ou UTO's, em se tratando de perfis em géis de DGGE) são dominantes, ao passo que é maior quando a abundância relativa de indivíduos nas espécies ou a intensidade das UTO's é mais homogênea (Dilly et al., 2004).

Com o advento das técnicas moleculares de identificação e análise de diversidade microbiana, é possível estudar as espécies microbianas independentemente do seu cultivo (MUYZER e SMALLA, 1998; DeLONG, 2004; MOURA et al., 2007; KÖCHLING, 2007). A aplicação dessas metodologias em estudos sobre a ecologia de microrganismos oferece oportunidade para se estimar com maior precisão a diversidade microbiana existente em um determinado habitat (MUYZER e SMALLA, 1998; TIROLA et al., 2003).

Dentre as técnicas de biologia molecular moderna, o trabalho com seqüências de regiões 16S rDNA tem se destacado, pois pode fornecer dados como riqueza de espécies e abundância relativa das mesmas. Essas informações são úteis para a compreensão da estrutura das comunidades microbianas, a qual reflete os efeitos dos fatores ambientais que determinam a dinâmica de espécies em uma comunidade biológica, permitindo o entendimento de relações funcionais nos ecossistemas (MAGURRAN, 1998; MANEFIELD et al., 2005; PAUL et al., 2006).

Ecossistemas como estações de tratamento de efluentes caracterizam-se pela presença de comunidades microbianas que existem como consórcio. O conceito de consórcio pode ser entendido como um grupo de diferentes espécies de microrganismos que atuam juntas como uma comunidade e estão sujeitas em sistemas de tratamento a mudanças de acordo com as condições operacionais (LIU et al., 2005; KAPLEY et al., 2007). Apesar de sua grande importância, o número de taxa microbianos conhecidos e descritos representa possivelmente apenas uma pequena fração da real diversidade microbiana encontrada nos sistemas de tratamento biológico de efluentes industriais. Além disso, informações sobre a diversidade microbiana em sistemas termófilos são

ainda mais restritas. A utilização de técnicas de biologia molecular pode disponibilizar, não apenas informações sobre a biodiversidade, mas pode também ser explorada para se compreender melhor as relações entre as populações presentes nas comunidades, objetivando melhorias e otimização de condições operacionais.

A amplificação de regiões conservadas do DNA ribossomal, associada a outras técnicas como eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), análises de restrição do DNA ribossomal marcado terminalmente (T-RFLP) e hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH), como também análises de perfil de ácidos graxos por meio da técnica dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), têm possibilitado o estudo da biodiversidade microbiana em comunidades complexas, independentemente do cultivo (NUBEL et al., 1999; TESKE et al., 1996; WERKER et al., 2003; SANS e KÖCHLING, 2007).

A técnica de DGGE é utilizada preferencialmente quando se deseja monitorar as mudanças dinâmicas em uma determinada comunidade microbiana. LAPARA et al. (2000) utilizaram a técnica de DGGE para analisar a diversidade biológica entre dois sistemas de tratamentos de efluentes de uma indústria farmacêutica nas condições mesófila e termófila. SILVEY et al. (2000) analisaram as mudanças nas comunidades bacterianas em um digestor anaeróbio, tratando resíduos sólidos urbanos, utilizando a DGGE. UENO et al. (2001) adotaram a DGGE para estudar mudanças nas comunidades bacterianas em um reator aeróbio de mistura completa em resposta a alterações nas taxas de diluição. PEREIRA et al. (2002), estudando um reator de leito de lodo granular expandido, verificaram as variações nas comunidades microbianas em diferentes paredes do leito de lodo, como também mudanças das comunidades microbianas ao longo do tempo. ROEST et al. (2005) monitoraram populações microbianas em reatores UASB para o tratamento de efluentes de fábricas de papel, durante três anos. Com amostras diversas de lodo biológico, os autores foram capazes de descrever a dinâmica de populações microbianas sob diferentes condições, utilizando a técnica de DGGE.

A construção de bibliotecas genômicas para se acessar a diversidade genética tem sido também largamente utilizada em estudos de comunidades microbianas. Essa técnica consiste no isolamento e clonagem de DNA diretamente a partir de amostras ambientais para a construção dessas bibliotecas (HANDELSMAN et al., 2004). A construção de bibliotecas genômicas utilizando seqüências gênicas ribossomais tem sido largamente empregada para diferentes ecossistemas, como amostras de alimentos (OLSSON et al., 2003), solo (SOARES et al., 2006), diferentes partes

do trato intestinal de humano (WANG et al., 2005), fitoplacton marinho (SCHMIDT et al., 1991), frutos de café (SANTOS, 2008), amostras clínicas (FENOLLAR et al., 2006) e também em sistemas de tratamento de efluentes (LAPPARA et al., 2000). As principais vantagens das seqüências ribossomais para a construção de bibliotecas genômicas incluem: a presença e mesma função em todos os seres vivos; são moléculas ancestrais e altamente conservadas; são componentes significativos da massa celular e facilmente recuperados a partir de todos os tipos de organismos; não são transferidas lateralmente; embora apresentem regiões muito conservadas em suas seqüências, a estrutura primária dos rRNA's possui sítios de evolução independente e, conseqüentemente, contém regiões variáveis suficientes para permitir a avaliação das relações filogenéticas, tanto entre organismos proximamente relacionados quanto entre os filogeneticamente distantes; são moléculas com seqüências relativamente grandes e com informações suficientes para permitir comparações estatísticas (HEAD et al., 1998). Além disso, há um grande número de seqüências disponíveis nos bancos de dados com livre acesso, o que permite a realização de alinhamento de seqüências e a identificação das regiões distintas.

A comunidade bacteriana nos reatores termófilos aeróbios difere daquela dos lodos ativados convencionais, pois bactérias nitrificantes, bactérias formadoras de flocos, protozoários não estão presentes. As razões pelas quais as bactérias termófilas não formam flocos biológicos permanecem pouco elucidadas. Os fatores associados a essa característica podem incluir: a ausência de espécies formadoras de flocos (*Zooglea ramigera*); ausência de condições físico-químicas que conduzem à formação dos flocos; condições físico-químicas que inibam a agregação e condições impróprias à seleção favorável de formadores de floco (especialmente quando protozoários não estão presentes) (LAPARA e ALLEMAN, 1999).

TRIPATHI e ALLEN (1999) mencionaram que a queda na capacidade de sedimentação do lodo termófilo acarreta em sua perda na unidade de sedimentação secundária para o efluente tratado, havendo, conseqüentemente, queda na eficiência de remoção da matéria orgânica. ZITA et al (1997) sugerem que a baixa capacidade de floculação, sob condições termófilas, ocorre porque altas temperaturas causam redução da tensão superficial da fase líquida, o que interfere na hidrofobicidade bacteriana e provoca enfraquecimento da capacidade de formação de flocos biológicos.

Em processos de tratamento de efluentes aeróbios e termófilos, a elevada eficiência de degradação dos compostos orgânicos demonstra que os organismos dominantes são heterotróficos

aeróbios ou anaeróbios facultativos. Dentre os microrganismos termófilos descritos, somente certas espécies de *Bacillus* e *Thermus* parecem proliferar nestes reatores (SHARP et al., 1992). *Bacillus* spp. termófilos constituem um grupo heterogêneo, que tem sido isolado de áreas de nascentes termais e de profundas fendas oceânicas, bem como fontes não-termais como solos, sistemas de compostagem e águas de superfície, naturais ou não. A distribuição de *Thermus* spp. é consideravelmente menos freqüente na natureza. Essas bactérias são quase que exclusivamente encontradas em fontes geotérmicas e em chaminés oceânicas, embora tenham sido também encontradas em aquecedores domésticos de água e em sistemas de compostagem (LAPARA e ALLEMAN, 1999).

Alguns trabalhos com reatores termófilos de tratamento de efluentes têm adotado o isolamento das culturas para posterior descrição das mesmas. Nesses estudos, foram isoladas espécies do gênero *Bacillus* (TISHER et al., 1962; SURUCU, 1975; BEAUDET, 1990) e culturas semelhantes a espécies desse mesmo gênero (*Bacillus*-like) (SURUCU, 1976).

LAPARA et al. (2000), utilizando a técnica de PCR-DGGE para a região V3 do gene 16S, verificaram uma redução na riqueza de espécies em reatores termófilos destinados ao tratamento de efluentes de indústria farmacêutica, comparativamente ao reator mesófilo. A análise de sequências 16S também revelou que a classe mais representativa na condição termófila foi a *Betaproteobacteria*; em condições mesófilas, detectou-se pelo menos seis filos bacterianos, incluindo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, *Synergistes*, *Planctomycetes*, gram-positivas com baixo conteúdo GC, *Holophaga-Acidobacterium* e *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*).

No trabalho de TIROLA et al. (2003), baseado também na técnica de PCR, encontraram-se seqüências pertencentes às classes *Betaproteobacteria*, e aos filos *Cytophaga/Flexibacter/Bacteróides*, *Deltaproteobacteria* e espécies *Bacillus*-like em biofilme termófilo aeróbio em sistema de tratamento de efluente de máquina de papel.

No trabalho de DIAS et al. (2003), trabalhou-se com efluente industrial de celulose kraft branqueada tratado em biorreator a membranas nas temperaturas de 35, 45 e 55 °C. Os autores utilizaram sondas específicas para *Eubacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e para bactérias gram-positivas com baixo conteúdo GC (*Bacillus* spp.). A proporção relativa de *Bacillus* spp. aumentou de 5 a 20 %, enquanto a classe *Alphaproteobacteria* caiu de 16 % para 6 %, quando a temperatura variou de 35 a 55 °C. As proporções relativas de

*Betaproteobacteria* (22-25 %) e *Gammaproteobacteria* (18-20 %) permaneceram relativamente constantes.

A disponibilidade de novas técnicas para diferenciar comunidades bacterianas em sistemas de tratamento de efluentes industriais pode ser explorada para se compreender melhor as relações entre a estrutura das comunidades, as condições operacionais e a eficiência do sistema de tratamento adotado. Além disso, essas informações tornam esses sistemas fonte potencial de recursos genéticos para uso biotecnológico.

Os objetivos desse capítulo foram estudar a estrutura e composição das comunidades de bactérias em diferentes temperaturas durante o tratamento de efluente de papel reciclado em BRMs. Para isso, empregou-se a avaliação da diversidade genética dessas comunidades, utilizando-se as técnicas de PCR-DGGE, além da construção e seqüenciamento de bibliotecas de 16S rDNA obtidas a partir de DNA extraído das amostras dos lodos biológicos mesófilos e termófilos.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) e no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) do Departamento de Microbiologia, localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa - Minas Gerais.

### 2.2.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS MESÓFILAS

As amostras de lodo biológico do reator mesófilo foram homogeneizadas no 90º dia de tratamento e diluídas em série em solução de pirofostato de sódio. Alíquotas de 100 µL das diluições foram espalhadas em meio sólido TSA, seguindo-se a incubação das placas a 35 °C por 18 horas.

Os isolados obtidos foram identificados pela análise de ácidos graxos, extraídos e derivatizados a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) utilizando-se o kit de extração Instant Fame (MIDI Inc., Newark, DE, USA), após cultivo nos meios TSA, R2A ou Agar nutriente a 30 °C por 24 horas. Os FAME's foram analisados por cromatografia gasosa em um equipamento Agilent 7890, empregando-se o método ITSA de reconhecimento de picos do sistema Sherlock (MIDI Inc., Newark, DE, USA). Os perfis obtidos foram então comparados com a biblioteca de referência ITSA 1.0.

## 2.2.2. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE LODOS BIOLÓGICOS

A extração do DNA total das amostras foi realizada utilizando-se o kit PowerSoil DNA Isolation, da MoBio®. Para isso, as amostras foram coletadas, centrifugadas e lavadas três vezes em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 M,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,00), do pelete formado foram utilizadas 0,2 g para a extração, conforme as instruções do fabricante. As datas de amostragem e as temperaturas dos reatores por ocasião das coletas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Datas e temperaturas por ocasião das coletas de lodo biológico dos reatores mesófilo (reator 1) e termófilos (reatores 2 e 3) para estudo da diversidade de bactérias

Dias de tratamento	Temperatura
4	35 °C *
19	40 °C (reator 2 e 3)
41	45 °C (reator 2 e 3)
68	50 °C (reator 2 e 3)
94	55 °C (reator 2 e 3)
102	55 °C **

\* lodo inicial para os 3 reatores; \*\* coleta após a adição de amostra de composto no reator 3

## 2.2.3. PERFIL GENÉTICO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS MESÓFILAS E TERMÓFILAS POR PCR-DGGE

O perfil genético das diferentes populações bacterianas presentes nas amostras de lodo biológico foi avaliado empregando-se a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE (MUYZER et al., 1993).

### 2.2.3.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA

Para se amplificar a região do gene 16S rDNA de *Eubacteria*, correspondente às posições 341 a 534 do 16S rDNA de *Escherichia coli*, foram utilizados os oligonucleotídeos universais de eubactérias p3/p2 (MUYZER et al., 1993) (Quadro 1). A reação de PCR foi realizada em tubos de 200 µL para um volume final de 25 µL. A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq® Green Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) (Promega, Madison, USA), 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2 % (v/v) de

formamida desionizada, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (MUYZER et al., 1993, com modificações): temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos e 72 °C por 2 minutos para a extensão dos oligonucleotídeos. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Para a amplificação de fragmentos dos 16S rDNAs de diferentes grupos específicos de *Eubacteria*, foi utilizada a técnica de Nested-PCR (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001). Essa técnica consiste na realização de duas reações de amplificação. A primeira fornece os fragmentos específicos para cada um dos grupos estudados, que servem como molde para uma segunda etapa de amplificação, a partir de oligonucleotídeos específicos e universais para *Eubacteria*.

A amplificação de fragmentos dos 16S rDNAs para as classes *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* foi realizada com o uso dos oligonucleotídeos específicos F203 $\alpha$ /R1492 e F948 $\beta$ /R1492, respectivamente (Quadro 1) (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001). A mistura de reação foi preparada com 5  $\mu$ L do tampão GoTaq® Green Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200  $\mu$ M de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 5  $\mu$ g de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2 % (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (GELSOMINO e CACCO, 2006): temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 56 °C (*Alphaproteobacteria*)/ 61 °C (*Betaproteobacteria*) por 1 minuto, para anelamento dos oligonucleotídeos, e 72 °C por 2 minutos para a extensão dos oligonucleotídeos. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. DNA de *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 12136 e de *Alcaligenes xylosoxidans* ATCC 13138 foram utilizados como controle positivo para as reações de amplificação de *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*, respectivamente.

A amplificação de fragmentos dos 16S rDNAs para a classe *Gammaproteobacteria* foi realizada com o uso dos oligonucleotídeos específicos fD2/rP1 (Quadro 1) (WEISBURG et al., 1991). A mistura de reação foi preparada com 5  $\mu$ L do tampão GoTaq® Green Reaction Buffer (Promega,

Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) (Promega, Madison, USA), 250  $\mu M$  de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,21  $\mu M$  de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (BUNGE e LECHNER, 2001): temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 15 segundos para a desnaturação, 52°C por 30 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos e 72 °C por 1 minuto para a extensão dos oligonucleotídeos. As últimas 20 etapas de extensão foram realizadas usando incrementos na temperatura de 20 segundos por ciclo. DNA de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizado como controle positivo da reação de amplificação.

A amplificação de fragmentos dos 16S rDNAs para o filo *Firmicutes* foi realizada com o uso dos oligonucleotídeos específicos BLS342F/1392R (Quadro 1) (BLACKWOOD et al., 2005). A mistura de reação foi preparada com 5  $\mu L$  do tampão GoTaq® Green Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) (Promega, Madison, USA), 160  $\mu M$  de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,1  $\mu M$  de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5  $\mu g$  de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 1,5 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (BLACKWOOD et al., 2005): temperatura inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos para a desnaturação, 57 °C por 30 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos e 72 °C por 90 segundos para a extensão dos oligonucleotídeos. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. DNA de *Staphylococcus aureus* ATCC 12692 foi utilizado como controle positivo da reação de amplificação.

Os produtos de PCR obtidos nas reações para os 4 grupos específicos estudados, a partir dos diferentes pares de oligonucleotídeos específicos, foram usados como molde de DNA para uma segunda reação de PCR, Nested-PCR (HEUER et al., 1997 e GOMES et al., 2001). Nesta reação, foram utilizados os oligonucleotídeos universais para bactérias F984GC/R1378 (HEUER et al., 1997). A mistura de reação foi preparada com 5  $\mu L$  do tampão GoTaq® Green Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) (Promega, Madison, USA), 200  $\mu M$  de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,2  $\mu M$  de cada oligonucleotídeo iniciador, 5  $\mu g$  de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2 % (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada esterilizada,

para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (GELSOMINO e CACCO, 2006): temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida de 20 ciclos de 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 53 °C por 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos e 72 °C por 2 minutos para a extensão dos oligonucleotídeos. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf). Os amplicons resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1,2 % em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM) e brometo de etídio (0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (SAMBROOK et al., 1989). Marcador de tamanho 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, USA) foi utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons.

Quadro 1. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes 16S rDNA.

Oligonucleotídeos	16S rDNA alvo (Posição)	Seqüência 5'→3'	Referências
p2	<i>Eubacteria</i> (341-357)	gc- CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993
p3	<i>Eubacteria</i> (518-534)	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer et al., 1993
F203α	<i>Alphaproteobacteria</i> (174-203)	CCGCATACGCCCTACGGGGGAAAG ATTTAT	Gomes et al., 2001
F948β	<i>Betaproteobacteria</i> (931-948)	CGCACAAGCGGTGGATGA	Gomes et al., 2001
R1492	<i>Eubacteria</i> (1492-1512)	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	Heuer et al., 1997
fD2	Bactérias entéricas (8-27)	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Weisburg et al., 1991
rP1	Bactérias entéricas (1492-1512)	ACGGTTACCTTGTTACGACTT	Weisburg et al., 1991
BLS342F	Gram positivas de baixo conteúdo GC (325-342)	CAGCAGTAGGGAATCTTC	Blackwood et al., 2005
1392R	<i>Eubacteria</i> (1392-1406)	ACGGGCGGTGTGTACA	Blackwood et al., 2006
F984GC	<i>Eubacteria</i> (968-984)	gc-AACGCGAAGAACCTTAC	Heuer et al., 1997
R1378	<i>Eubacteria</i> (1378-1401)	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Heuer et al., 1997
GC clamp		CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGG GGCGGGGACGGGGG	Muyzer et al., 1993

### 2.2.3.2. ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando-se o equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad – Califórnia USA).

Foram aplicados 20µL dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (acrilamida:N,N'-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8 % p/v (*Eubactéria*) MUYZER et al., 1993) ou a 6% (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Firmicutes*) (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001, WEISBURG et al., 1991, BLACKWOOD et al., 2005). O gradiente desnaturante variou linearmente de 40 % a 60 %.

O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções-estoque de poliacrilamida a 8 % ou 6 %, dispensadas pelo formador de gradiente (Modelo 475 Gradient Delivery System – BIO-Rad Califórnia, USA), uma com 100 % dos agentes desnaturantes, que corresponde a uréia 7 mol.L<sup>-1</sup> e formamida desionizada 40 % (v/v), e outra sem esses agentes. Além das soluções-estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03 % (p/v) de persulfato de amônio [polimerizador], 0,17 % (v/v) de TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletileno diamino) [catalisador] e 50µL de corante (azul de bromofenol 0,5 %, xileno cianol 0,5 % e TAE 1X) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel, antes da aplicação das amostras, foi de 3 horas.

Uma mistura de fragmentos de 16S rDNA das seguintes espécies bacterianas foi utilizada como marcadores específicos: *Alcaligenes xylosoxydans* ATCC 13138 (*Betaproteobacteria*), *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 12136 (*Alphaproteobacteria*), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (*Firmicutes*), *Bacillus subtilis* ATCC 23858 (*Firmicutes*), *Escherichia coli* ATCC 25922 (*Gammaproteobacteria*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*Gammaproteobacteria*), *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (*Gammaproteobacteria*), *Pseudomonas putida* ATCC 15176 (*Gammaproteobacteria*) e *Staphylococcus aureus* ATCC 12692 (*Firmicutes*).

A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60 °C e voltagem constante de 50V, durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR® Gold (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene).

A comparação estatística dos perfis de bandas dos géis obtidos após a DGGE foi realizada utilizando-se o programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

A estrutura da comunidade microbiana presente nas amostras de lodo biológico, de acordo com o resultado da técnica de DGGE foi avaliada com base nas seguintes variáveis: Riqueza

(R), Índice de Diversidade de Shannon-Weaver (H') e Eqüitabilidade (E) (ATLAS & BARTHA, 1998).

A variável Riqueza foi estimada com base em uma matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1) e ausência como zero (0).

O índice H' foi calculado com base na abundância, expressa como densidade ótica da de cada banda na raia dos géis, pela seguinte fórmula:

$$H' = 2,3/N (N \log N - \sum ni \log ni)$$

Onde:

N = densidade ótica da raia, obtida pelo somatório das densidades óticas das bandas da raia;

ni = densidade ótica de cada banda, na raia.

A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e no método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) para análise dos agrupamentos.

## 2.2.4. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS NAS AMOSTRAS DE LODO BIOLÓGICO

### 2.2.4.1. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES 16S rDNA

O DNA metagenômico das amostras de lodo nas temperaturas de 35 °C (lodo inicial para todos os reatores), 45 °C (reatores 2 e 3) e 55 °C (reatores 2 e 3) foi utilizado como molde para amplificar fragmentos dos 16S rDNAs de diferentes grupos específicos de *Eubacteria* avaliados neste estudo.

A amplificação de fragmentos dos 16S rDNAs de grupos específicos de *Eubacteria* pertencentes ao filo *Firmicutes* e as classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* do filo *Proteobacteria*, foi realizada com o uso dos oligonucleotídeos específicos BLS342f/1392R, F203α/R1492, F948β/R1492 e fd2/rp1 (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001, WEISBURG et al., 1991, BLACKWOOD et al., 2005). Foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 2.2.3.1.

#### 2.2.4.2. CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DO GENE 16S rDNA AMPLIFICADOS

Os amplicons obtidos foram ligados ao vetor pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA), conforme recomendações do fabricante.

Células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foram preparadas segundo o método do cloreto de cálcio (SAMBROOK et al., 1989). Ao tubo contendo as células competentes, adicionou-se 0,06 ng de DNA ligado ao vetor pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA) e o tubo foi mantido em gelo por 30 minutos, antes da suspensão ser submetida a um choque térmico a 42°C por 45 segundos. A este tubo foram adicionados 600 $\mu$ L de SOC (2 % Triptona, 0,5 % extrato de levedura, 0,05 % NaCl, 0,25 mol.L<sup>-1</sup> KCl, 2 mol.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 5 mol.L<sup>-1</sup> NaOH e 1 mol.L<sup>-1</sup> Glicose) pré-aquecido a 37°C e o tubo foi incubado em banho-maria a 37 °C por uma hora, sob agitação.

Foram espalhados 180  $\mu$ l desta cultura com auxílio da alça de Drigalsky, na superfície de placas contendo o ágar Luria Bertani (LB), como o controle positivo de viabilidade, e ágar LB adicionado de ampicilina (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e X-gal [5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo] (80  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).

A confirmação do fenótipo adquirido pela incorporação do vetor foi feita realizando-se estrias múltiplas em placa com meio LB contendo o antimicrobiano na concentração de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e X-gal na concentração anteriormente citada. Os clones considerados visualmente positivos de cada grupo foram repicados e a presença do inserto clonado foi confirmada pelo método de lise rápida e por amplificação a partir dos *primers* para o vetor utilizado, M13F e M13R (Promega, Madison, USA). Todos os clones contendo inserto do tamanho correto foram armazenados a -80 °C em meio LB adicionado de glicerol 20 % (v/v).

A extração de plasmídeos para o seqüenciamento do inserto clonado foi realizada de acordo com as instruções do kit Montage Plasmid Miniprep<sub>HTS</sub> (Millipore®).

Após a extração e quantificação do DNA plasmidial, as amostras foram seqüenciadas em um seqüenciador automático Applied Biosystems modelo 3730xl, na empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul), pelo método de terminação da cadeia por didesoxinucleotídeos (SANGER et al., 1997).

#### 2.2.4.3. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rDNA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS

Todas as seqüências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI). Para cada gene foi feita uma busca de identidade com a utilização do algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL et al., 1990).

Quando a busca identificou similaridade com múltiplas seqüências disponíveis no banco de dados, foi considerado o primeiro hit, ou seja, a seqüência que apresentou uma alta porcentagem de similaridade com a seqüência de entrada (85 %-100 %), associada ao maior *score* de alinhamento e ao menor *e-value* (com estringência de *e-value* máximo de  $e^{-10}$ ). Um alto *score* de alinhamento indica uma alta ocorrência de homologias entre a seqüência de entrada e o hit, e uma baixa ocorrência de falta de homologias e *gaps*. Já o *e-value* é um valor associado à probabilidade de que a similaridade encontrada entre a sua seqüência de entrada e o hit não seja devida ao acaso, e sim que elas sejam similares por ancestralidade comum, implicando uma relação de homologia entre elas. Assim sendo, quanto menor o *e-value*, maior a confiança de que a similaridade encontrada entre duas seqüências indique um parentesco genético e não apenas uma consequência da casualidade. Todas as ferramentas acima descritas encontram-se disponíveis na página do NCBI. Levaram-se em conta também semelhanças entre o ambiente de isolamento das bactérias de referência e os de origem das seqüências analisadas neste estudo (biorreatores tratando efluente de fábrica de papel reciclado).

#### 2.2.4.4. ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE E REPRESENTATIVIDADE DOS CLONES NA BIBLIOTECA METAGENÔMICA

A diversidade de clones na biblioteca foi investigada por análise de rarefação. A curva de rarefação foi calculada usando-se o programa Analytic Rarefaction 1.3 (aRarefactWin). Para se estimar a representatividade dos filotipos, a cobertura (C) dos clones analisados foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$C = 1 - (n_1/N)$$

Em que:

$n_1$  = é o número de clones únicos;

$N$  = é o número total de clones examinados,

sendo que um clone único foi considerado como a seqüência que foi encontrada uma única vez entre todos os clones analisados em cada biblioteca.

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS MESÓFILAS

A presença do isolado *Brevundimonas diminuta*, uma bactéria redutora de sulfato, já foi relatada em sistemas de lodos ativados em um sistema de tratamento de efluente rico em ácidos graxos, sendo essa uma bactéria comum nesses sistemas (YAN et al., 2005). Bactérias do gênero *Bacillus* são também comumente encontradas em sistemas de lodos ativados (YAN et al., 2005). Não foi encontrada na literatura relatos sobre a presença de espécies do gênero *Staphylococcus* nesses sistemas (Tabela 4).

Tabela 4. Isolados mesófilo em reator de membrana, durante tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado. Os isolados foram identificados pelo Sherlock MIS (MIDI Inc., Newark, DE, USA), empregando-se a biblioteca de referência ITSA 1.0

ISOLADO	ÍNDICE DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA (Classe/Filo)
<i>Brevundimonas diminuta</i> subgrupo B	0,592	Caulobacteraceae (Alphaproteobacteria)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> subgrupo C	0,540	Micrococcaceae (Firmicutes)
<i>Bacillus subtilis</i> subgrupo A	0,786	Bacillaceae (Firmicutes)

### 2.3.2. PERFIL GENÉTICO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM REATORES DE MEMBRANA MANTIDOS EM CONDIÇÕES MESÓFILA E TERMÓFILA POR PCR-DGGE

#### 2.3.2.1. EUBACTERIA

A temperatura no interior dos reatores de membrana, durante o tratamento do efluente de fábrica de papel reciclado, afetou a composição das comunidades bacterianas dos lodos biológicos. Essa mudança foi avaliada por meio da técnica eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Verificou-se similaridade entre os perfis genéticos das comunidades microbianas mantidas nas temperaturas de 35 e 40 °C; a partir da temperatura de 45 °C, estabeleceram-se padrões distintos (Figura 8). Estes resultados corroboram os de avaliação

microscópica dos lodos (Capítulo 1), que demonstraram a ocorrência de mudanças morfológicas, como mudança do padrão de crescimento filamentososo com formação de flocos, para um crescimento disperso, com o aumento da temperatura. Conclui-se, portanto, que a alteração morfológica observada não pode ser atribuída somente a uma possível mudança fisiológica das populações que compõem os lodos biológicos, mas também a uma alteração da composição de espécies.

A dinâmica de alteração do perfil genético das comunidades bacterianas nos dois reatores onde a temperatura foi aumentada gradualmente (reatores 2 e 3) foi diferente quando se avalia o padrão de bandas e os índices de similaridade entre elas (Tabela 5). Apesar de se tentar manter condições operacionais idênticas nos dois reatores termófilos, a composição e a dinâmica de uma comunidade microbiana resultam de um equilíbrio e de interações de múltiplos fatores ambientais, bióticos e abióticos (ATLAS e BARTHA, 1997). Características diferentes na superfície dos módulos de membrana submersos utilizados nos reatores termófilos, ou outros fatores não-controlados, podem ter causado essa diferença na dinâmica das comunidades microbianas nos dois reatores.

A adição do composto de resíduo sólido urbano ao reator 3 causou mudança significativa do perfil genético da comunidade bacteriana (Figura 8).

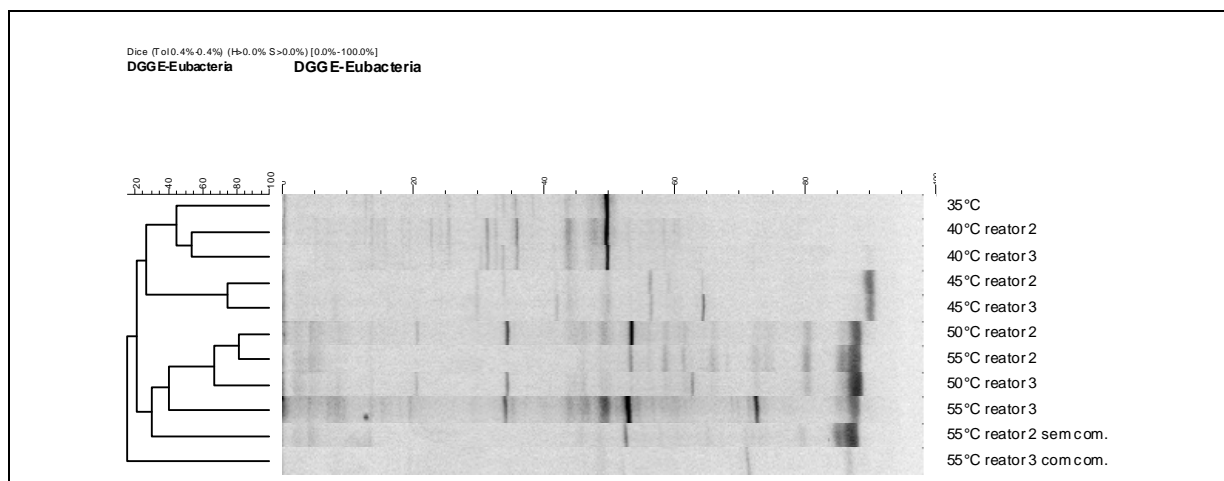


Figura 8. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para *Eubacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Tabela 5. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para *Eubacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)

Amostras	Índices de Similaridade										
35 °C	100										
40 °C reator 2	42,4	100									
40 °C reator 3	45,72	53,33	100								
45 °C reator 2	28,6	20	37,5	100							
45 °C reator 3	22,9	26,6	25	75	100						
50 °C reator 2	15,8	24,2	17,1	17,1	22,8	100					
55 °C reator 2	6,3	14,8	20,6	27,5	27,5	81,25	100				
50 °C reator 3	17,7	13,7	19,3	32,2	38,7	76,47	57,1	100			
55 °C reator 3	16,7	32,3	24,2	30,3	42,4	44,45	26,6	50	100		
55 °C reator 2 sem composto	19,4	30,77	7,1	14,2	7,2	32,26	32	29,6	27,5	100	
55 °C reator 3 com composto	11,8	6,9	6,4	12,	25,8	11,77	14,2	26,6	12,5	29,6	100

O aumento da temperatura não causou alteração pronunciada no índice de diversidade de Shannon-Weaver (Figura 9) e também não interferiu na Riqueza de unidades taxonômicas operacionais – UTO's dos lodos biológicos (Figura 10). A análise do lodo mantido na condição mesófila (35 °C) revelou a existência de 19 UTO's; nos lodos mantidos na maior temperatura (55 °C), foram encontradas 13 UTO's (reator 2) e 17 UTO's (reator 3) (sem a adição do composto).

Ao se estudar a eficiência de remoção de matéria orgânica contida no efluente de fábrica de papel reciclado, não foram encontradas diferenças significativas entre os reatores mantidos nas condições mesófila e termófila (Capítulo 1). Esse resultado pode estar relacionado com a manutenção de uma riqueza de espécies similar nos lodos biológicos mantidos nessas duas condições, mas que não são necessariamente compostos das mesmas espécies microbianas. Esses resultados revelam uma diversidade bacteriana compatível com a eficiência de degradação de matéria orgânica requerida para o sistema de tratamento.

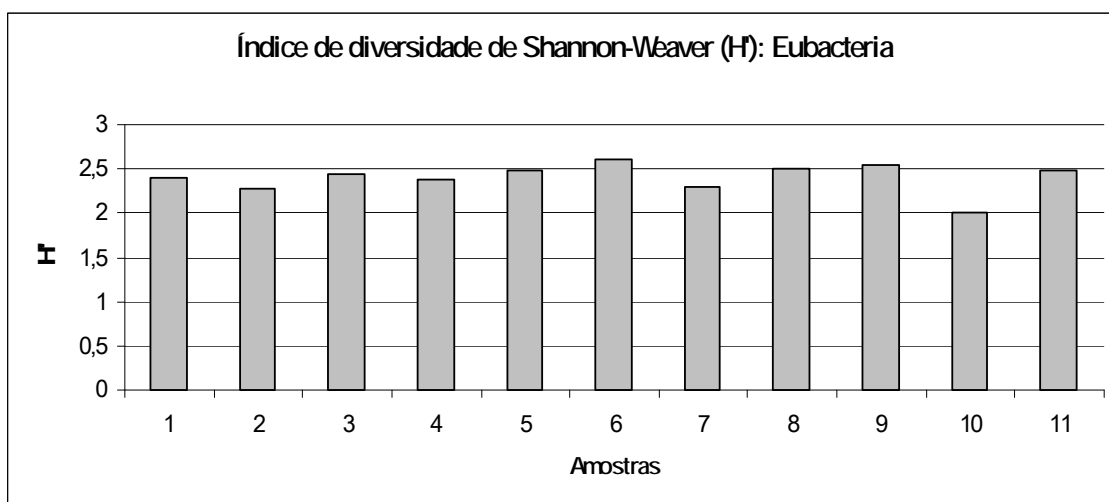


Figura 9. Índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) de *Eubacteria*, obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

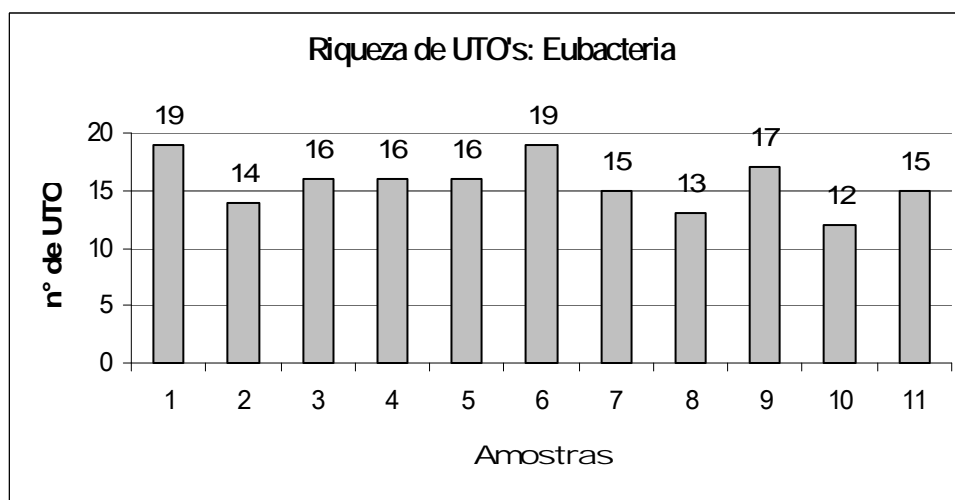


Figura 10. Riqueza de UTO's de *Eubacteria* obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; , 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

### 2.3.2.2. ALPHAPROTEOBACTERIA

O aumento gradual da temperatura afetou de forma significativa a composição da comunidade bacteriana pertencente à classe *Alphaproteobacteria* (Figura 11). Já a partir da

temperatura de 40 °C detectou-se diferenciação das UTO's visualizadas pelo padrão de bandeamento, comparativamente ao perfil de bandas obtidas a partir da amplificação do DNA extraído do lodo mesófilo (35 °C). Assim como relatado para o perfil genético de *Eubacteria*, a análise de agrupamento dos perfis de UTO's obtidos a partir da amplificação de parte do gene 16S rRNA evidenciou a existência de dois grupos distintos. As amostras obtidas dos reatores mantidos nas temperaturas de 35, 40 e 45 °C formaram grupo distinto do segundo, composto das amostras obtidas dos reatores mantidos em temperaturas acima de 50 °C. No entanto, diferentemente do ocorrido quando se avaliou a diversidade genética utilizando-se oligonucleotídeos específicos de *Eubacteria*, não se verificou efeito da adição do composto de resíduo sólido urbano sobre o perfil genético da comunidade de *Alphaproteobacteria*. Na Tabela 6 estão os índices de similaridade dos perfis genéticos dessa classe, obtidos a partir das amostras dos três reatores, mantidos nas diferentes temperaturas.

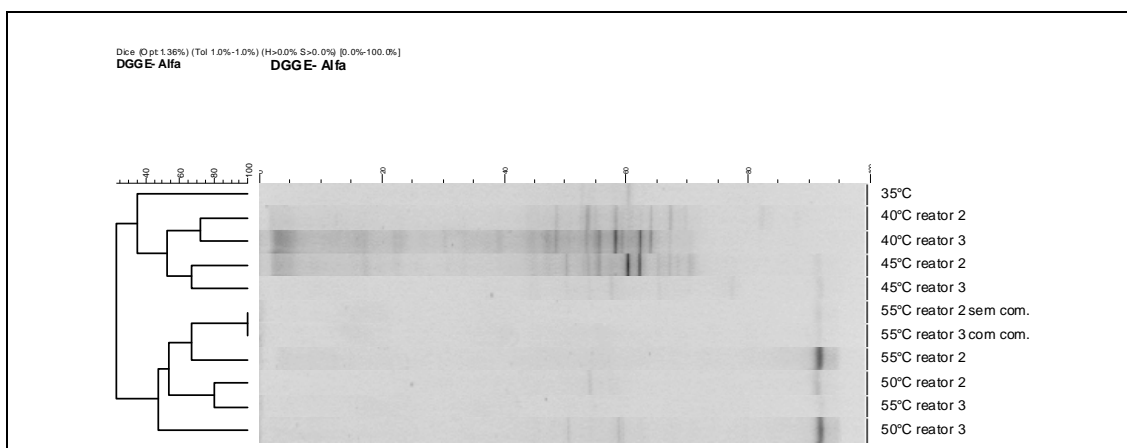


Figura 11. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para *Alphaproteobacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Tabela 6. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para *Alphaproteobacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)

Amostras	Índices de Similaridade										
35 °C	100										
40 °C reator 2	36,3	100									
40 °C reator 3	34,7	72	100								
45 °C reator 2	33,3	60	57,1	100							
45 °C reator 3	35,3	52,6	40	66,7	100						
55 °C reator 2 sem composto	18,1	0	0	22,2	25	100					
55 °C reator 3 com composto	18,1	0	0	22,2	25	100	100				
55 °C reator 2	33,3	0	0	20	22,2	66,6	66,6	100			
50 °C reator 2	46,1	26,6	25	54,5	60	50	50	40	100		
55 °C reator 3	33,3	14,2	13,3	40	44,4	66,6	66,6	50	80	100	
50 °C reator 3	28,5	12,5	11,7	33,3	54,5	40	40	66,6	57,1	33,3	100

O aumento da temperatura casou uma queda da diversidade a partir da temperatura de 40 °C (Figura 12). Nas amostras de lodo mantido a 55 °C, esse índice foi um pouco maior do que o obtido no lodo mantido a 50 °C. Em relação à variável Riqueza, ocorreu uma queda no número de UTO's dessa classe. No lodo inicial a 35 °C e nos lodos dos reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C, foram encontradas 10, 12 e 13 UTO's, respectivamente; nas amostras de lodos mantidos na temperatura de 55 °C (reatores 2 e 3), foram encontradas no máximo 4 UTO's dessa classe (Figura 13). Esses resultados corroboram os estudos de DIAS et al., (2003). Os autores utilizaram a técnica de FISH para estudar populações bacterianas em BRMs durante o tratamento de efluente de celulose kraft, e reportaram uma redução da abundância de membros da classe *Alphaproteobacteria* com o aumento da temperatura.

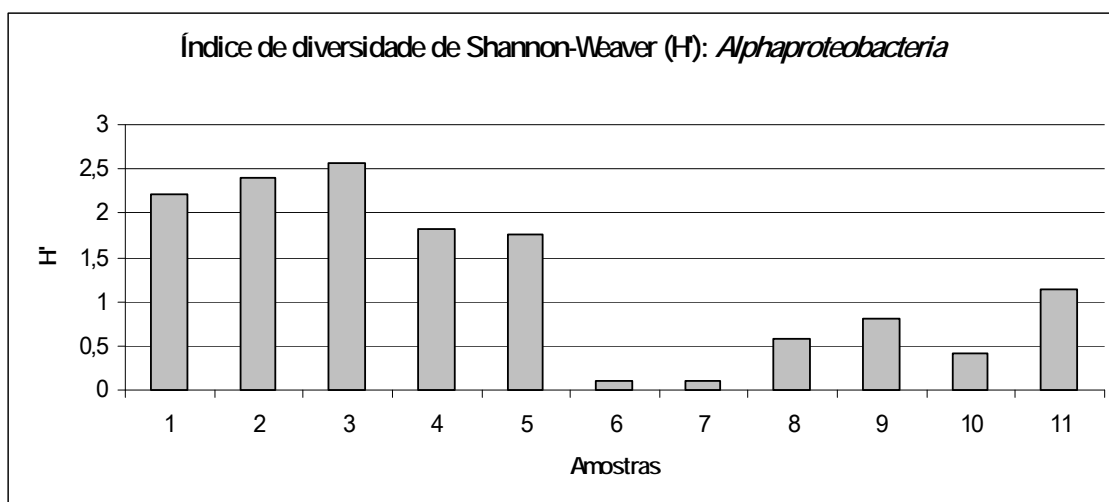


Figura 12. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') da classe *Alphaproteobacteria*, obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

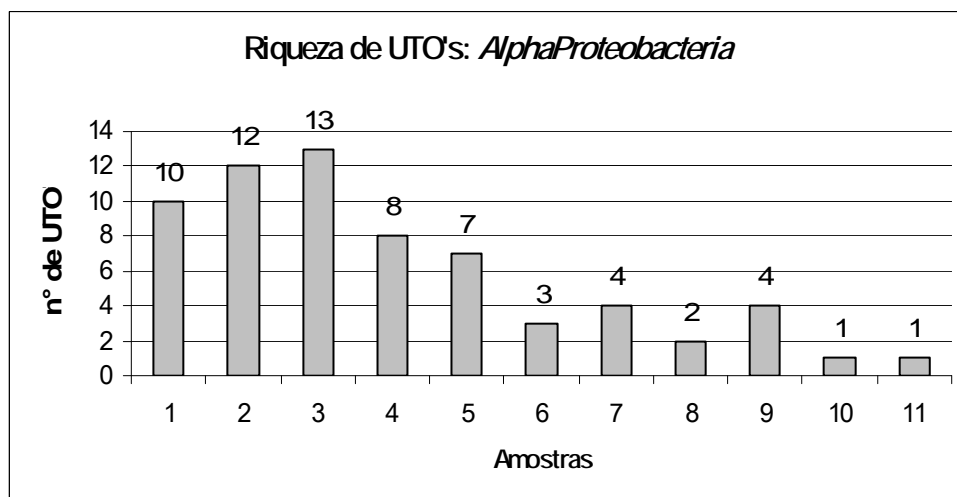


Figura 13. Riqueza de UTO's da classe *Alphaproteobacteria* obtidos pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

### 2.3.2.3. BETAPROTEOBACTERIA

O aumento gradual da temperatura nos reatores afetou a composição da comunidade de *Betaproteobacteria* (Figura 14). A comunidade de bactérias pertencentes a essa classe, no lodo mantido sob temperatura mesófila, distinguiu-se de todas as demais. Nas temperaturas entre 40 °C e 50 °C foram diferenciados dois grupos, um contendo as amostras originadas dos reatores sob temperaturas de 40 °C e 45 °C e outro contendo as amostras originadas dos reatores mantidos a 50 °C. Nesse grupo situou-se também uma amostra do reator 2, mantido a 55 °C. As amostras originadas dos dois reatores mantidos a 55 °C, na fase final do experimento, formaram um outro grupo distinto dos demais (Figura 14 e Tabela 7). Evidencia-se, nesse grupo, que a adição do composto de resíduo sólido urbano ao reator 3, após ter-se atingido a temperatura de 55 °C, causou alteração do perfil genético da comunidade de *Betaproteobacteria*. Contudo, é curioso observar que o perfil genético dessa classe, presente no lodo do reator 3 após a adição do composto, foi muito similar ao da comunidade presente no reator 2, na mesma temperatura, mas que não recebeu adição desse material (Tabela 7).

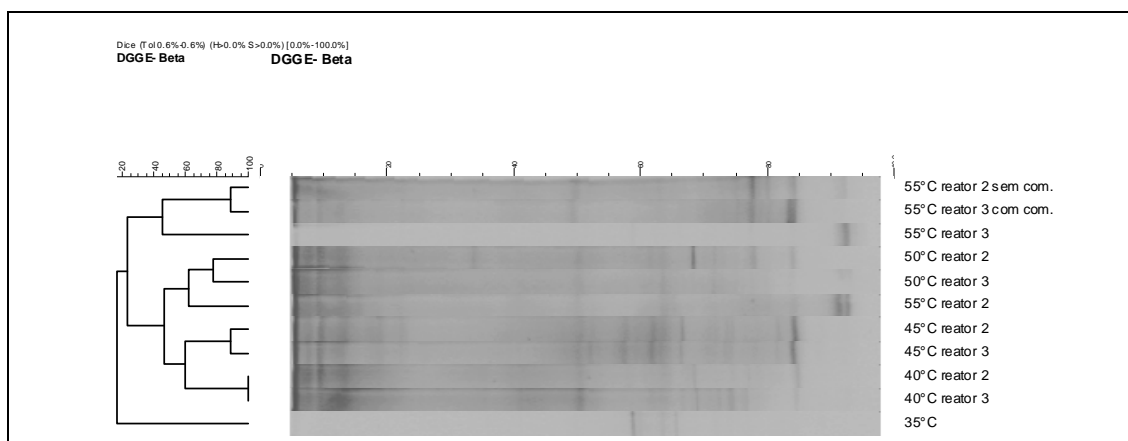


Figura 14. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para a classe *Betaproteobacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Tabela 7. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para a classe *Betaproteobacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)

Amostras	Índices de Similaridade											
55 °C reator 2 sem composto	100											
55 °C reator 3 com composto	88,9	100										
55 °C reator 3	66,6	25	100									
50 °C reator 2	46,1	33,3	33,3	100								
50 °C reator 3	40	0	22,2	76,9	100							
55 °C reator 2	46,1	33,3	50	62,5	61,5	100						
45 °C reator 2	14,2	0	15,3	47	57,1	35,3	100					
45 °C reator 3	28,5	15,3	15,3	47	57,1	23,5	55,8	100				
40 °C reator 2	16,6	18,1	36,3	53,3	66,6	26,6	62,5	50	100			
40 °C reator 3	16,6	0	18,1	53,3	66,6	26,6	62,5	62,5	100	100		
35 °C	0	0	20	28,5	36,3	28,5	13,3	13,3	15,3	15,3	100	

Os valores de índice de diversidade para a classe *Betaproteobacteria* mantiveram-se relativamente constantes até a temperatura de 50 °C (Figura 15). Nas amostras de 55 °C, o índice de diversidade aumentou na amostragem feita antes da adição do composto. Essa adição não interferiu na diversidade. O maior número de UTO's de *Betaproteobacteria* foi encontrado nas amostras de lodo biológico retirado dos reatores mantidos na temperatura de 45 °C (Figura 15). O aumento da temperatura acima desse valor causou uma redução do valor de UTO's dessa classe nos dois reatores. A adição do composto de resíduo sólido urbano ao reator 3, após se atingir a temperatura máxima do experimento (55 °C), não resultou em mudança nesse valor. Esses resultados indicam que temperaturas em torno de 45 °C favorecem as populações de *Betaproteobacteria* presentes em lodos biológicos de reatores durante o tratamento de efluente de papel reciclado.

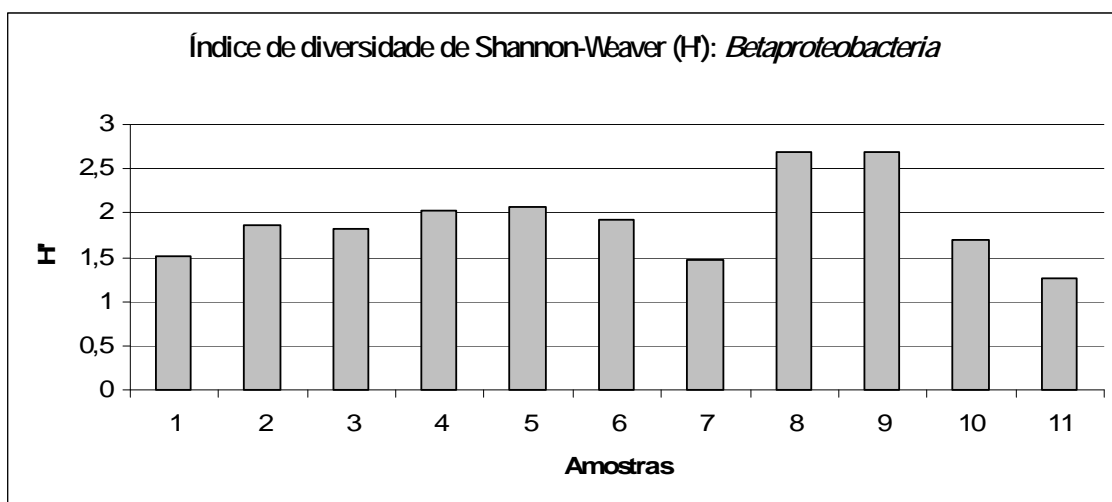


Figura 15. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') para a classe *Betaproteobacteria*, obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; , 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L-1 de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

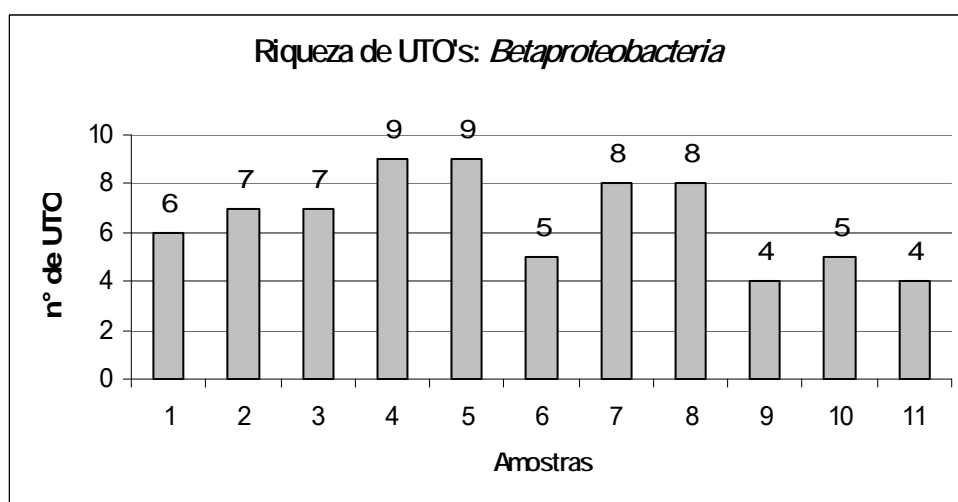


Figura 16. Riqueza de UTO's da classe *Betaproteobacteria*, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L-1 de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

#### 2.3.2.4. GAMMAPROTEOBACTERIA

O aumento gradual da temperatura no interior dos reatores termófilos resultou na formação de 2 grupos distintos de perfis genéticos dessa classe (Figura 17). O primeiro grupo é composto pelas amostras retiradas dos reatores mantidos nas temperaturas mais baixas (35 °C, 40 °C e 45 °C). Nesse grupo, a amostra obtida na condição mesófila (35 °C) distinguiu-se das demais, obtidas dos reatores mantidos a 40 °C e 45 °C (Figura 17). O segundo grupo é formado pelas amostras de lodos retiradas dos reatores com temperaturas de 50 °C e de 55 °C. A adição do composto causou mudança no perfil genético da comunidade de bactérias pertencentes a essa classe, de tal modo que a similaridade entre a comunidade presente no reator 3 antes da adição e após a adição desse material foi de apenas 61,5 (Tabela 8).

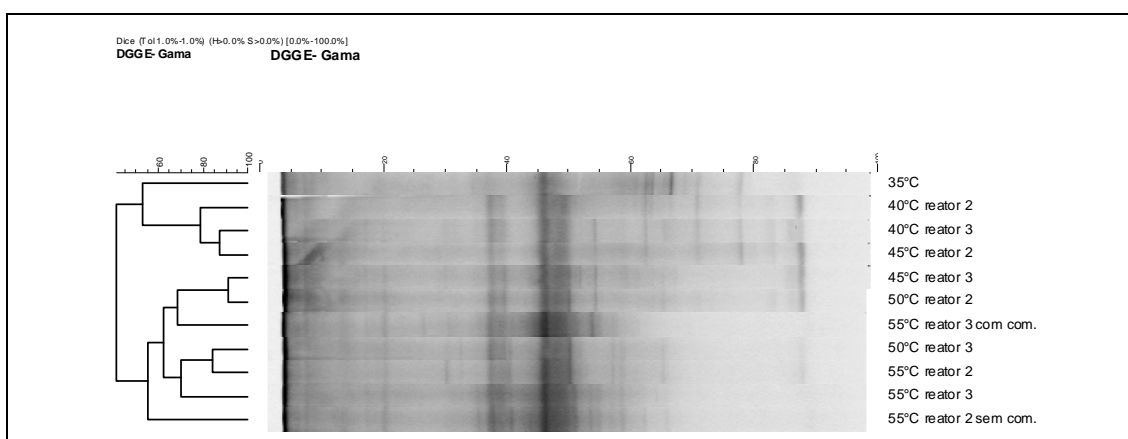


Figura 17. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para a classe *Gammaproteobacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)

Tabela 8. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para a classe *Gammaproteobacteria*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)

Amostras	Índices de Similaridade										
35 °C	100										
40 °C reator 2	55,5	100									
40 °C reator 3	50	81,8	100								
45 °C reator 2	52,6	76,1	86,9	100							
45 °C reator 3	21	66,6	52,1	54,5	100						
50 °C reator 2	21	66,6	60,8	72,7	90,9	100					
55 °C reator 3 com composto	37,5	55,5	60	63,1	63,1	73,6	100				
50 °C reator 3	25	33,3	30	31,5	73,6	63,1	50	100			
55 °C reator 2	21	38,1	34,7	36,3	72,7	63,6	52,6	84,2	100		
55 °C reator 3	30,7	40	35,3	37,5	62,5	62,5	61,5	76,9	62,5	100	
55 °C reator 2 sem composto	22,2	40	36,3	38,1	47,6	47,6	55,5	55,5	57,2	66,7	100

O índice de diversidade de Shannon-Weaver (Figura 18) e a variável Riqueza de UTO's dessa classe (Figura 19) permaneceram praticamente constantes com o aumento da temperatura. Durante a avaliação com sondas específicas para essa classe, DIAS et al., 2003, trabalhando com o tratamento de efluente de celulose kraft, também observaram pouca variação na abundância de representantes dessa classe com o aumento da temperatura.

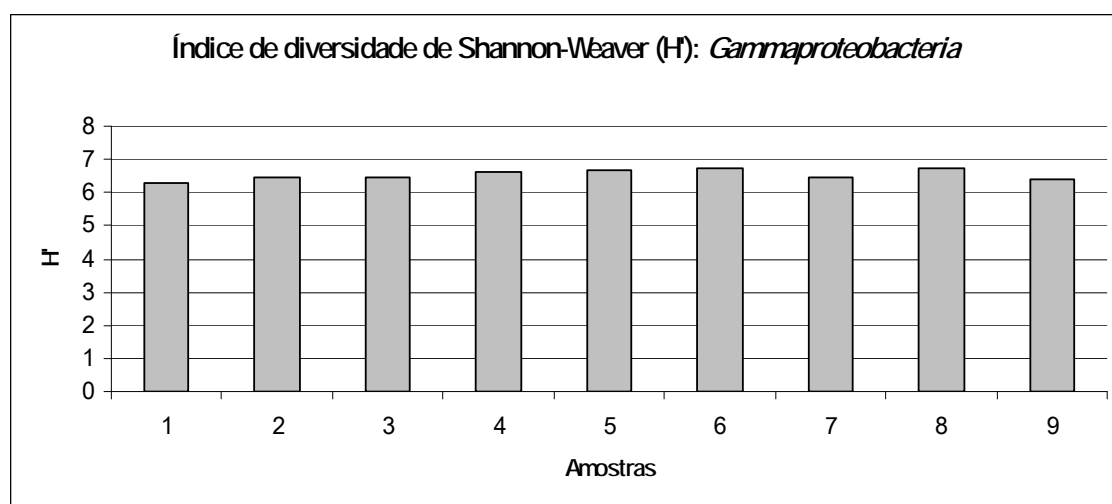


Figura 18. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') da classe *Gammaproteobacteria*, obtido da análise de densidade óptica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

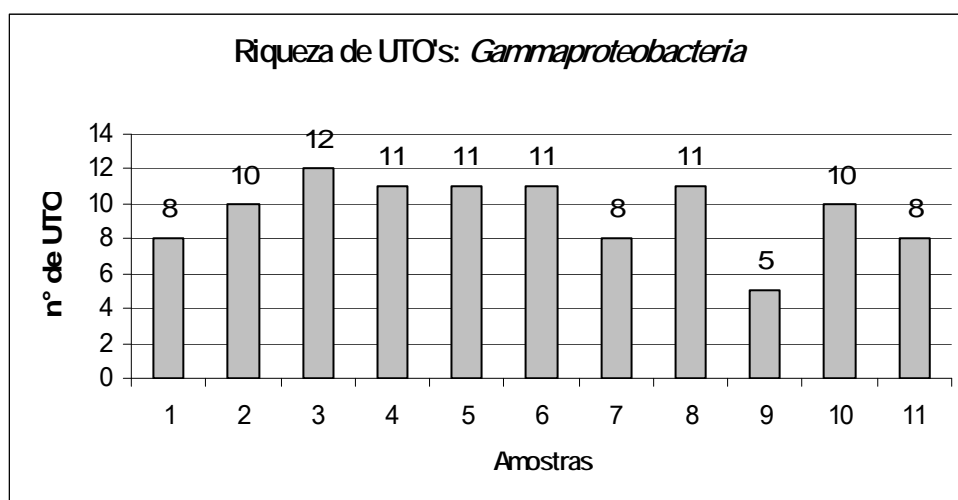


Figura 19. Riqueza de UTO's da classe *Gammaproteobacteria* obtidos pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; , 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L-1 de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

#### 2.3.2.5. *FIRMICUTES*

A análise dos perfis eletroforéticos de bactérias do filo *Firmicutes* agrupou as amostras em quatro grupos distintos (Figura 20, Tabela 9). Amostras obtidas sob as temperaturas mais baixas (35 °C e 40 °C) formaram um desses grupos. Outro grupo foi formado pelas amostras obtidas dos reatores mantidos a 45 °C e 50 °C (exceto reator 3 a 50 °C). Um terceiro grupo foi composto das amostras dos reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C, além da amostra do reator 3 mantido a 50 °C. O quarto grupo foi representado pelas amostras do reator 2, coletada na última fase do experimento, e do reator 3, coletada após a adição do composto de resíduo sólido urbano.

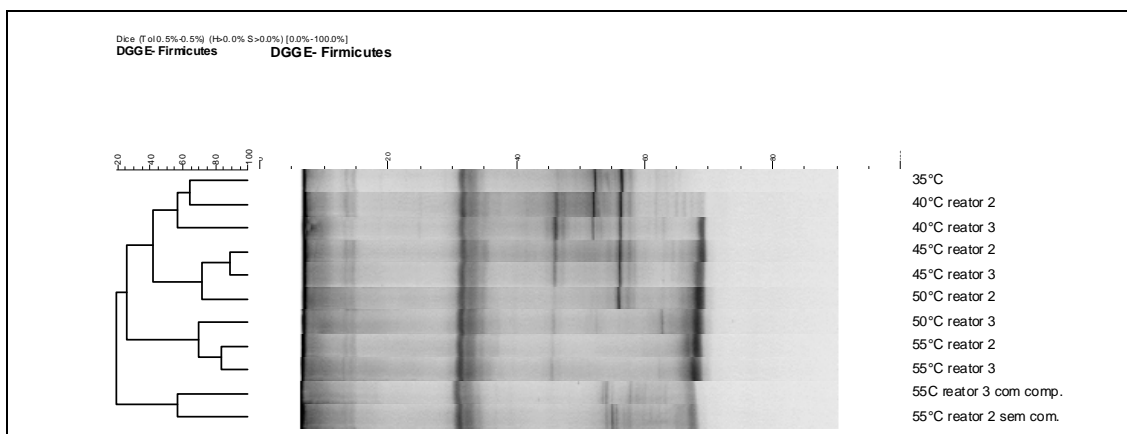


Figura 20. Análise dos perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos para o filo *Firmicutes*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Tabela 9. Índice de similaridade entre os perfis de fragmentos do gene 16S rDNA de populações bacterianas, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. Foram utilizados iniciadores específicos o filo *Firmicutes*. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e os perfis foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Amostras	Índices de Similaridade											
35 °C	100											
40 °C reator 2	64,5	100										
40 °C reator 3	57,1	56	100									
45 °C reator 2	37	50	57,1	100								
45 °C reator 3	32	45,4	52,6	88,8	100							
50 °C reator 2	32	36,3	31,5	55,5	87,5	100						
50 °C reator 3	8,3	38,1	33,3	35,3	40	53,3	100					
55 °C reator 2	8,7	30	11,7	12,5	28,5	14,2	61,5	100				
55 °C reator 3	8,7	18,2	50	23,5	12,5	28,57	76,9	83,3	100			
55 °C reator 3 com composto	20	35,3	28,5	15,3	18,1	0	0	44,4	22,2	100		
55 °C reator 2 sem composto	9,5	22,2	13,3	14,2	16,6	16,6	0	40	40	57,1	100	

O aumento gradual da temperatura causou uma queda no índice de diversidade de Sahnnon-Weaver e na Riqueza de UTO's do filo *Firmicutes* (Figura 21). No lodo mantido a 35 °C, foram encontradas 17 UTO's e nas amostras de lodos dos reatores termófilos (2 e 3) mantidos a 55 °C, foram encontradas no máximo 6 UTO's.

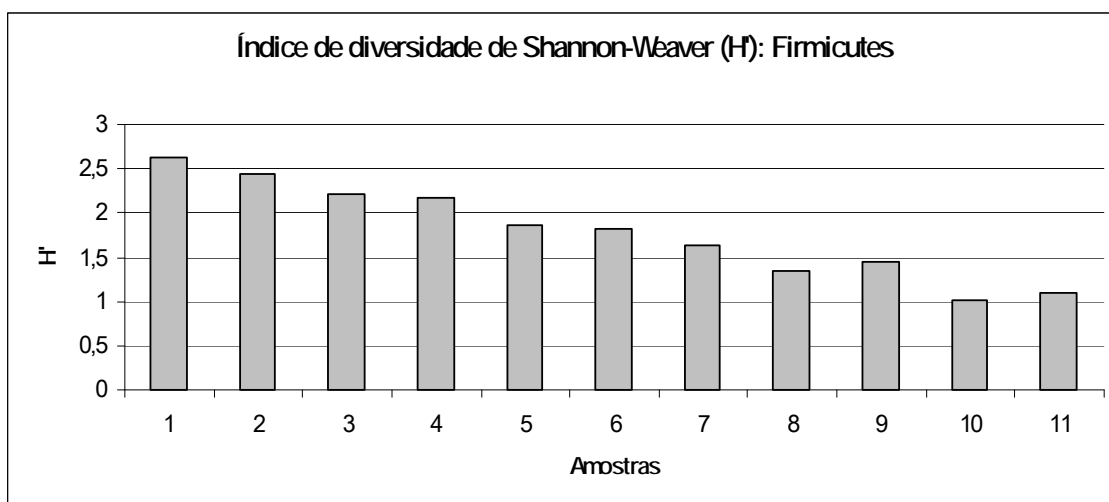


Figura 21. Índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) do filo *Firmicutes*, obtido da análise de densidade ótica das bandas no gel de DGGE, fornecida pelo programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). 1: amostra do lodo inicial mesófilo para todos os reatores (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

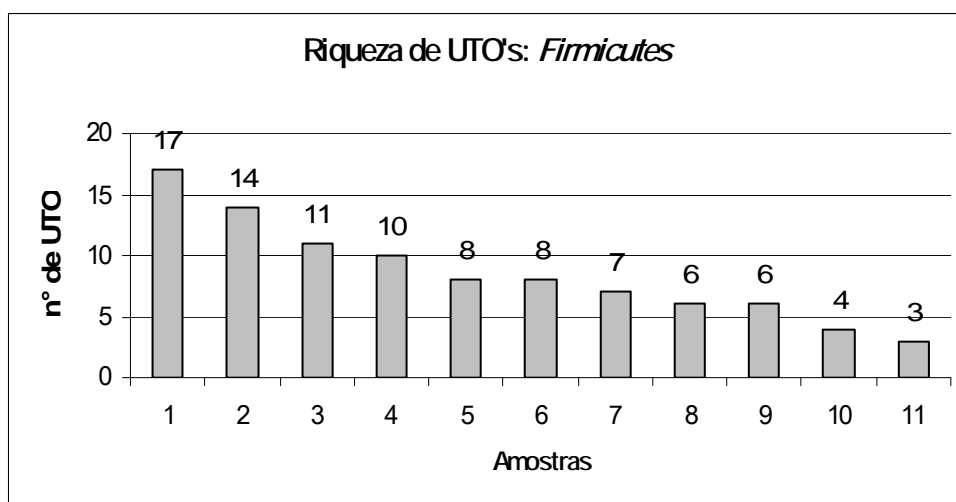


Figura 22. Riqueza de UTO's do filo *Firmicutes*, obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluentes de fábrica de papel reciclado. 1: amostra de lodo mantido na condição mesófila (35 °C); 2 e 3: reatores 2 e 3 mantidos a 40 °C; 4 e 5: reatores 2 e 3 mantidos a 45 °C; 6 e 7: reatores 2 e 3 mantidos a 50 °C; 8 e 9: reatores 2 e 3 mantidos a 55 °C; 10: reator 2, mantido a 55 °C e sem adição de composto de resíduo de sólido urbano; 11: reator 3, mantido a 55 °C. A amostra foi coletada 8 dias após a aplicação de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de composto de resíduo sólido urbano coletado na fase termófila.

### 2.3.3. BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS NAS AMOSTRAS DE LODO BIOLÓGICO

#### 2.3.3.1. CURVAS DE RAREFAÇÕES E COBERTURAS OBTIDAS PARA OS CLONES NAS BIBLIOTECAS DE GENES 16S rDNA

As curvas de rarefação de clones de fragmentos do gene 16S rDNA, obtidos a partir das amostras de lodos nas temperaturas de 35, 45 e 55 °C, são apresentadas nas Figuras 23, 24 e 25, respectivamente. As três curvas de rarefação apresentam uma tendência de início de *plateau*, indicando a necessidade de se analisar um maior número de clones para ampliar a cobertura dessas bibliotecas. A biblioteca de clones obtida a partir do lodo biológico mantido a 35 °C apresentou cobertura de 70 % e as bibliotecas representativas dos lodos biológicos mantidos nas temperaturas de 45 e 55 °C apresentaram cobertura de 84 %.

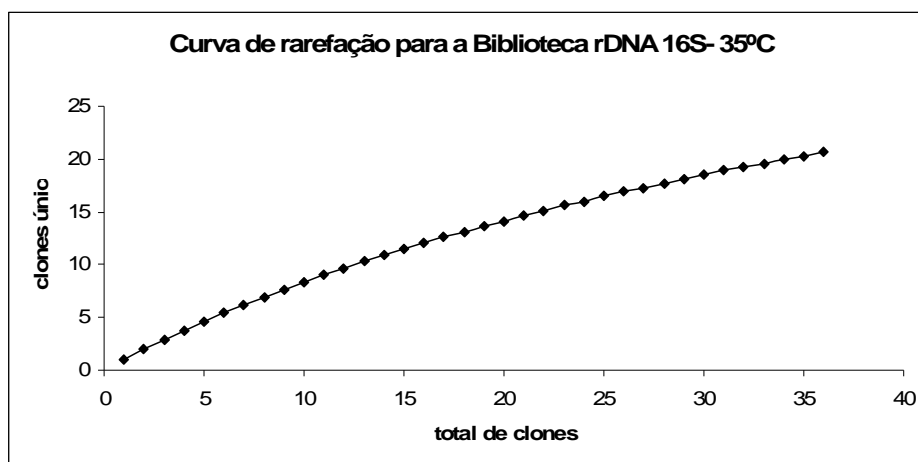


Figura 23. Curva de rarefação de clones 16S rDNA, obtidos de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 35 °C.

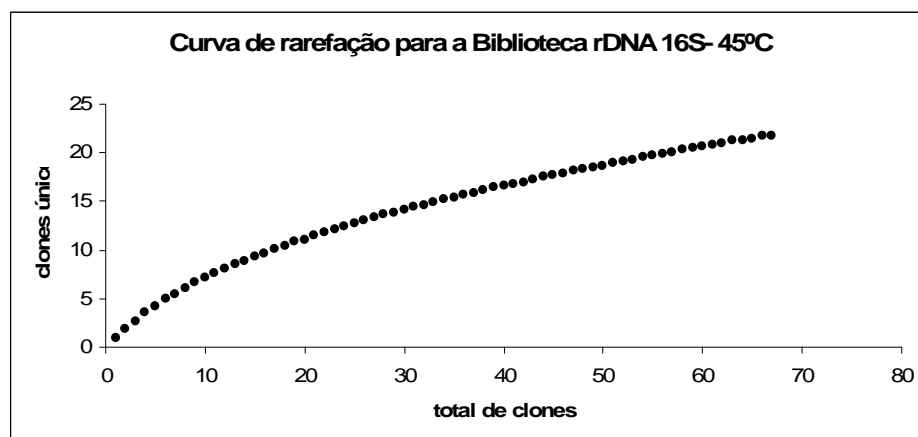


Figura 24. Curva de rarefação de clones 16S rDNA, obtidos de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 45 °C.

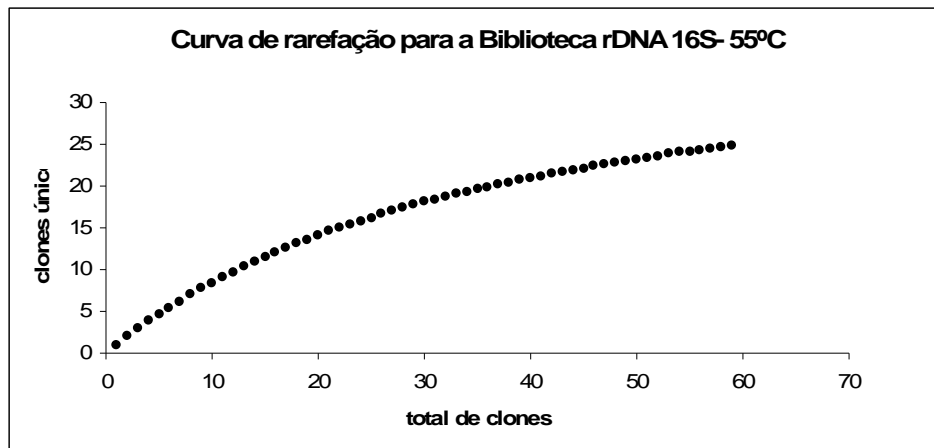


Figura 25. Curva de rarefação de clones 16S rDNA, obtidos de amostras de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 55 °C.

### 2.3.3.2. BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DE LODO BIOLÓGICO MANTIDO A 35 °C

Foram obtidas 37 seqüências de qualidade adequada para análises comparativas, após o seqüenciamento de clones da biblioteca de fragmentos do gene 16S rDNA do lodo biológico mantido a 35 °C. Dessas 37 seqüências, foram obtidas 20 seqüências distintas. Todas as seqüências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI). Para cada seqüência, foi feita uma busca de identidade com a utilização do algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL et al., 1990).

Dentre as 20 seqüências distintas identificadas, 3 pertencem à classe *Alphaproteobacteria*, representando 15% do total de seqüências encontradas, 3 pertencem à classe *Betaproteobacteria*, representando também 15%, e 5 pertencem ao filo *Firmicutes*, representando 25%. Outras 7 seqüências não puderam ser associadas a filos até então reconhecidos (Figura 26). As espécies identificadas pela análise de seqüências dessa biblioteca encontram-se listadas na Tabela 10.

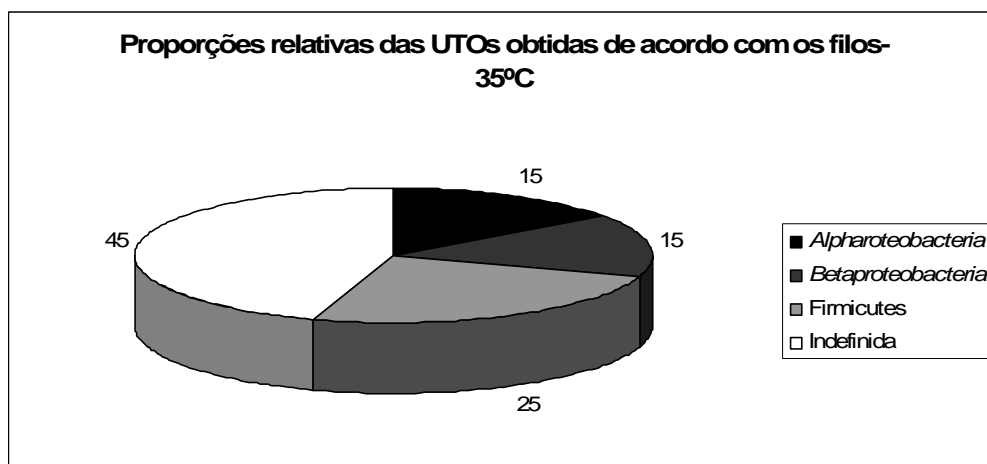


Figura 26. Proporções relativas dos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria* (classes *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*) das seqüências obtidas da biblioteca 16S rDNA de lodo biológico mantido a 35 °C.

Durante as análises dos clones dessa biblioteca, verificou-se que algumas seqüências foram mais freqüentes, como a correspondente à de uma bactéria não-cultivável (clone 053A02 B), obtida de digestor anaeróbio de lodo biológico ([CR933280.1](#)) (5 dentre os 37 clones seqüenciados), e a correspondente à seqüência da bactéria não-cultivável *Methyloversatilis* sp. clone SCP-F6 ([AM990016.1](#)), obtida de amostra de solo, que também foi constatada em outros 5 clones dessa biblioteca.

Foram encontradas com relativa freqüência, seqüências com elevada homologia com seqüências de bactérias caracteristicamente encontradas em solos, como *Shinella yambaruensis*, linhagem MS4 ([AB285481.1](#)), *Alphaproteobacteria* não-cultivável, clone lhap22, *Methyloversatilis* sp. não-cultivável, clone SCP-F6 ([AM990016.1](#)), *Pelomonas* sp. não-cultivável, clone Plot17-F03 ([EU440651.1](#)), *Exiguobacterium indicum*, linhagem PCWCW11 ([GQ284479.1](#)) e a bactéria não-cultivável, clone BD2 ([FJ472352.1](#)).

Nessa biblioteca, destaca-se ainda o clone 3 não-cultivável ([AJ412672.1](#)), obtido de reator desnitrificante integrante de um sistema de tratamento de efluente de aterro sanitário. Menciona-se também a detecção de seqüências correspondentes a de bactérias presentes em digestores anaeróbios de lodo biológico, a exemplo das bactérias não-cultiváveis clone WU28 ([AB494342.1](#)) e clone 053A02 B ([CR933280.1](#)).

Tabela 10. Seqüências parciais do gene 16S rDNA depositadas no banco de dados GenBank (NCBI), com elevada homologia a seqüências de clones obtidos a partir de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 35 °C (este trabalho)

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">AB285481.1</a>	<i>Shinella yambaruensis</i> , linhagem MS4, isolada a partir de amostras de solo, com capacidade de assimilação de sulfolanos	99	Rhizobiaceae ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	MATSUI et al., 2009
<a href="#">EF540511.1</a>	<i>Devosia sp.</i> 4_C16_46, isolada a partir de amostras de resíduo sólido da indústria de petróleo	97	Hyphomicrobiaceae ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	Não Publicado
<a href="#">DQ648961.1</a>	<i>Alphaproteobacteria</i> não-cultivável, clone lhap22, encontrada em amostras de solo contaminados com policlorados, após rizorremediação	97	Família indefinida ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	de CARCER et al., 2007
<a href="#">AM990016.1</a>	<i>Methyloversatilis sp.</i> não-cultivável, clone SCP-F6, encontrada em amostra de solo	92	Rhodocyclaceae ( <i>Betaproteobacteria</i> )	GANGWAR et al., 2009
<a href="#">AB300163.1</a>	<i>Hydrogenophaga sp.</i> AH-24,	99	Comamonadaceae ( $\beta$ - <i>Proteobacteria</i> )	YOON et al., 2008

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">EU440651.1</a>	<i>Pelomonas</i> sp. não-cultivável, clone Plot17-F03, encontrada em amostra de solo	99	Comamonadaceae ( $\beta$ - Proteobacteria)	Não publicado
<a href="#">EU660424.1</a>	<i>Sporosarcina globispora</i> (Bactéria ID4389), presente em amostras de um produto intermediário na produção de suco de beterraba	97	Bacillaceae (Firmicutes)	JUSTE et al., 2008
<a href="#">DQ339608.1</a>	<i>Sporosarcina</i> sp. Enf36, bactéria encontrada como endofítica de plantas alpinas subnivais	91	Planococcaceae (Firmicutes)	Não Publicado
<a href="#">AM237400.1</a>	<i>Sporosarcina globispora</i> syn. <i>Bacillus globisporus</i> , isolado OS-253, obtido de partícula de poeira	99	Planococcaceae (Firmicutes)	Não Publicado
<a href="#">EU689105.1</a>	<i>Lactococcus</i> sp. YM05004, detectado em amostras de Tofu	99	Streptococcaceae (Firmicutes)	Não Publicado

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">GQ284479.1</a>	<i>Exiguobacterium indicum</i> , linhagem PCWCW11, isolada de amostras de solo na Índia	91	Bacillales Família XII (Firmicutes)	Não Publicado
<a href="#">CR933280.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone 053A02 B, encontrada em digestores anaeróbios de lodo biológico	91	-	CHOUARI et al., 2005
<a href="#">AB494342.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone WU28, encontrada em digestor anaeróbio	98	-	Não Publicado
<a href="#">FJ472352.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone BD2, encontrada em solo ácido sulfatado	98	-	Não Publicado
<a href="#">DQ839504.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone Won86(0714), presente em comunidade microbiana envolvida no metabolismo de tricloroetileno	96	-	Não Publicado

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">EU777812.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone PB1_aai28b06, encontrada em comunidades intestinais de mamíferos	99	-	LEY ET AL., 2008
<a href="#">AJ412672.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone 3, encontrada em reatores desnitrificantes no tratamento de efluente de aterro sanitário	96	-	ETCHEBEHERE ET AL., 2002
<a href="#">AB512198.1</a>	<i>Betaproteobacteria</i> não-cultivável, clone UAB1, encontrada em células solares	100	-	NÃO PUBLICADO
<a href="#">DQ860023.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone F1F	98	-	LI ET AL., 2006
<a href="#">AY945907.1</a>	Bactéria não cultivável, clone DR-1, encontrada em biorreator desnitrificante	100	-	LIU ET AL., 2006

### 2.3.3.3. BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DE LODO BIOLÓGICO MANTIDO A 45 °C

Foram obtidas 68 seqüências de qualidade adequada para análises comparativas, após o seqüenciamento de clones da biblioteca de fragmentos do gene 16S rDNA do lodo biológico mantido a 45 °C. Dessas 68 seqüências, foram obtidas 22 seqüências distintas. Dentre as espécies identificadas, as mais abundantes são pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* e ao filo *Firmicutes*. No outro extremo, estão as representantes dos filios *Deinococcus-Thermus* e *Chlorobi*, com apenas um representante (Figura 27). As espécies obtidas pela análise de seqüências dessa biblioteca estão listadas na Tabela 11.

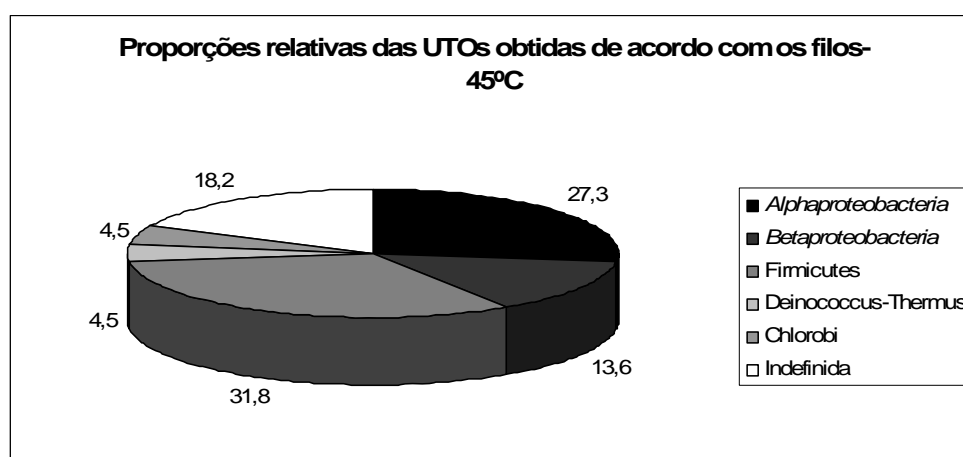


Figura 27. Proporções relativas dos filios *Firmicutes*, *Proteobacteria* (classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*), *Deinococcus-Thermus* e *Chlorobi* das seqüências obtidas da biblioteca 16S rDNA de lodo biológico mantido a 45 °C.

Durante as análises dos clones dessa biblioteca, verificou-se que algumas seqüências foram mais freqüentes, como as correspondentes à de *Sporosarcina globispora* syn. *Bacillus globisporus*, isolado OS-253, encontrada em partícula de poeira ([AM237400.1](#)) (14 dentre os 68 clones seqüenciados), à de uma *Betaproteobacteria* não-cultivável HB123, encontrada em lodo biológico de sistemas de tratamento de água ([EF648105.1](#)) (11 clones), à de *Lactococcus* sp. YM05004, isolada de amostras de Tofu, ([EU689105.1](#)) (8 clones), à de *Paenibacillus* sp. JAM-FM1801, microrganismo aeróbio isolado de sedimento rico em matéria orgânica e metano ([AB362283.10](#)) (5 clones) e *Hyphomicrobium hollandicum*, linhagem IFAM KB-677 ([NR\\_026428.1](#)) (5 clones).

Algumas seqüências corresponderam a seqüências de bactérias encontradas em sistemas de tratamento de efluentes e de lodos biológicos, a exemplo da *Alphaproteobacteria* não-

cultivável, clone QEDN4AE03, detectada em amostras de digestores de lodo anaeróbio ([CU926850.1](#)), de *Mycoplana dimorpha*, linhagem DSM 7138, isolada de lodo biológico de tratamento de efluentes da indústria têxtil ([EU022307.1](#)), da *Betaproteobacteria* não-cultivável HB123, detectada em lodo biológico de sistemas de tratamento de água ([EF648105.1](#)), da bactéria não-cultivável, clone 3, encontrada em reatores desnitrificantes de aterro sanitário ([AJ412672.1](#)) e da bactéria não-cultivável, clone R1B-5, encontrada em amostras de lodo biológico ([FJ167442.1](#)). Reporta-se ainda a ocorrência de uma *Alphaproteobacteria* não-cultivável, clone QEDN4AE03, descrita como membro da comunidade bacteriana presente em amostra de digestor de lodo anaeróbio ([CU926850.1](#)).

Um destaque da biblioteca de genes 16S rDNA do lodo mantido a 45 °C foi a constatação da bactéria *Rubellimicrobium thermophilum*, linhagem E-R2A-8<sup>a</sup>, um termófilo moderado encontrado em máquina de papel ([AJ844283.1](#)).

Foram também encontradas seqüências referentes a bactérias descritas em sistemas de compostagem, como *Bartonella elizabethae*, linhagem Q-3, obtida de amostras de composto envolvido na decomposição de compostos recalcitrantes ([AB246807.1](#)), *Thermobacillus composti*, termófilo moderado ([AB254031.3](#)) e *Meiothermus sp.* B-R2A5-50-3, linhagem B-R2A5-50-3 ([AM229107.1](#)), bem como seqüências correspondentes a bactérias encontradas em solos, como *Methyloversatilis sp.* não-cultivável, clone SCP-F6, e o *Firmicutes* não-cultivável, clone A2B-D8-114, reportadas em solos do deserto do Atacama ([EF016792.1](#)).

Algumas das seqüências obtidas neste trabalho apresentaram elevada homologia com as de bactérias tipicamente termófilas, como *Thermobacillus composti*, termófilo moderado isolado de reatores de compostagem ([AB254031.3](#)), e *Meiothermus sp.* B-R2A5-50-3, linhagem B-R2A5-50-3 ([AM229107.1](#)).

Tabela 11. Seqüências parciais do gene 16S rDNA depositadas no banco de dados GenBank (NCBI), com elevada homologia a seqüências de clones obtidos a partir de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 45 °C (este trabalho)

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">CU926850.1</a>	<i>Alphaproteobacteria</i> não-cultivável clone QEDN4AE03, encontrada em amostras de digestor de lodo anaeróbio	97	Família indefinida ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	RIVIERE et al., 2009
<a href="#">AY499905.1</a>	<i>Hyphomicrobium sp.</i> clone Nubeena47 não-cultivável, encontrada em sedimentos de lagos utilizados para a produção de peixe	97	Hyphomicrobiaceae ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	BOWMAN et al., 2006
<a href="#">EU022307.1</a>	<i>Mycoplana dimorpha</i> , linhagem DSM 7138, isolada de lodo biológico de tratamento de efluentes da indústria têxtil	98	Brucellaceae ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	YOON et al., 2008

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">AB246807.1</a>	<i>Bartonella elizabethae</i> , linhagem Q-3, isolada de sistema de compostagem de compostos recalcitrantes	97	Bartonellaceae ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	Não publicado
<a href="#">NR_026428.1</a>	<i>Hyphomicrobium hollandicum</i> , linhagem IFAM KB-677	96	Hyphomicrobiaceae ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	RAINEY et al., 1998
<a href="#">AJ844283.1</a>	<i>Rubellimicrobium thermophilum</i> , linhagem E-R2A-8 <sup>a</sup> , termófilo moderado isolado de amostras depositadas em máquina de fabricação de papel	99	Rhodobacteraceae ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	SALKINOJA-SALONEN, 2006
<a href="#">EF648105.1</a>	<i>Betaproteobacteria</i> não-cultivável HB123, encontrada em amostras de lodo biológico em sistemas de tratamento de água	99	Família indefinida ( <i>Betaproteobacteria</i> )	Não publicado

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">EF648016.1</a>	<i>Tepidimonas</i> sp. não-cultivável, clone HB2, encontrada em amostras de lodo biológico em sistemas de tratamento de água	99	Família não definida ( <i>Betaproteobacteria</i> )	Não publicado
<a href="#">AM990016.1</a>	<i>Methyloversatilis</i> sp. não-cultivável, clone SCP-F6, encontrada em amostras de solo	92	Rhodocyclaceae ( <i>Betaproteobacteria</i> )	GANGWAR ET AL., 2009
<a href="#">EU660424.1</a>	<i>Sporosarcina globispora</i> ID4389, encontrada em amostras de um produto intermediário na produção de suco de beterraba	99	Bacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	JUSTE et al., 2008
<a href="#">AM237400.1</a>	<i>Sporosarcina globispora</i> syn. <i>Bacillus globisporus</i> OS-253, isolada de partícula de poeira	99	Planococcaceae ( <i>Firmicutes</i> )	Não Publicado

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">AB362283.1</a>	<i>Paenibacillus</i> sp. JAM-FM1801, microrganismo aeróbio isolado de sedimento rico em matéria orgânica e metano	93	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	KOBAYASHI et al., 2008
<a href="#">EU689105.1</a>	<i>Lactococcus</i> sp. YM05004, isolado de amostras de Tofu	97	Streptococcaceae ( <i>Firmicutes</i> )	Não Publicado
<a href="#">EF016792.1</a>	<i>Firmicutes</i> não-cultivável A2B-D8-114, encontrada em amostras de solos do deserto do Atacama	94	Família indefinida ( <i>Firmicutes</i> )	CONNON et al., 2007
<a href="#">AF227827.1</a>	<i>Paenibacillus</i> sp. 61724, isolado de amostras clínicas	94	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	DRANCOURT et al., 2000
<a href="#">AB254031.3</a>	<i>Thermobacillus composti</i> , termófilo moderado isolado de reatores de compostagem	97	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	WATANABE et al., 2007
<a href="#">AM229107.1</a>	<i>Meiothermus</i> sp. B-R2A5-50-3, linhagem B-R2A5-50-3	97	Thermaceae ( <i>Deinococcus-Thermus</i> )	EKMAN et al., 2007

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">AB478415.1</a>	<i>Chlorobi bacterium</i> Mat9-16	98	Chlorobiaceae ( <i>Chlorobi</i> )	Não publicado
<a href="#">GQ015112.1</a>	Bactéria não-cultivável nbw816b06c1, encontrada em superfície de pele humana	94	-	GRICE et al., 2009
<a href="#">AJ412672.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone 3, encontrada em reator desnitrificante no tratamento de aterro sanitário	98	-	ETCHEBEHERE et al., 2002
<a href="#">GQ106653.1</a>	Bactéria não-cultivável clone nbw538g08c1, encontrada em superfície de pele humana	91	-	GRICE et al., 2009
<a href="#">FJ167442.1</a>	Bactéria não-cultivável R1B- 5, encontrada em amostras de lodo biológico	98	-	Não publicado

#### 2.3.3.4. BIBLIOTECA DE GENES 16S rDNA DE LODO BIOLÓGICO MANTIDO A 55 °C

Foram obtidas 60 seqüências de qualidade adequada para análises comparativas, após o seqüenciamento de clones da biblioteca de fragmentos do gene 16S rDNA do lodo biológico mantido a 55 °C. Dessas 60 seqüências, foram obtidas 20 seqüências distintas. Dentre as espécies identificadas, as mais abundantes são pertencentes à classe *Betaproteobacteria* e aos filios *Firmicutes* e *Deinococcus-Thermus*. Esses resultados diferem do encontrado no lodo mantido a 45 °C, em que dominaram a classe *Alphaproteobacteria* e o filo *Firmicutes*. No outro extremo, estão as representantes da classe *Gammaproteobacteria* e do filo *Chlorobi*, com apenas um representante (Figura 278). As espécies obtidas pela análise de seqüências dessa biblioteca estão listadas na Tabela 12.

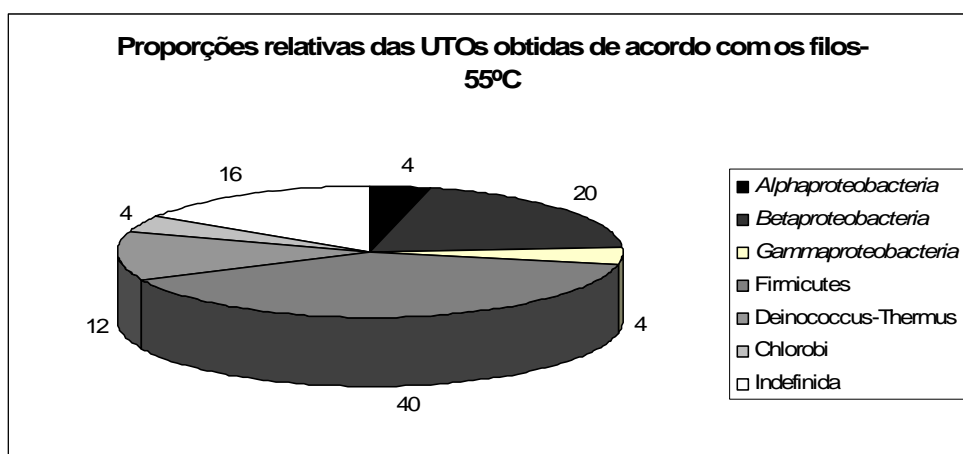


Figura 28. Proporções relativas dos filios *Firmicutes*, *Proteobacteria* (classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*), *Deinococcus-Thermus* e *Chlorobi* das seqüências obtidas da biblioteca 16S rDNA para a temperatura de 55 °C.

As seqüências mais freqüentes correspondem à de *Thermobacillus composti*, termófilo moderado isolado de reatores de compostagem ([AB254031.3](#)) (6 dentre os 60 clones seqüenciados), *Thermus scotoductus* 16S rDNA, linhagem ITI-252T ([Y18410.1](#)) (5 clones), *Cohnella* sp., isolada de solo de aterro sanitário ([DQ333896.1](#)) (4 clones) e a *Betaproteobacteria* não-cultivável HB123, encontrada em amostras de lodo biológico de sistemas de tratamento de água ([EF648105.1](#)) (4 clones).

Algumas seqüências correspondem à de bactérias pertencentes a sistemas de tratamento de efluentes e de lodos biológicos, a exemplo da *Alphaproteobacteria* não-cultivável, clone QEDS3CG05, encontrada em digestor anaeróbio de lodo biológico ([CU921448.1](#)), da bactéria não-cultivável mle1-32, encontrada em comunidades bacterianas de sistema de tratamento de efluente farmacêutico ([AF280860.1](#)), da *Betaproteobacteria* não-cultivável HB123, encontrada em amostras de lodo biológico em sistemas de tratamento de água ([EF648105.1](#)), de *Caldilinea* sp. não-cultivável, clone XJ2, também encontrada em amostras de lodo biológico no tratamento de água ([EF648108.1](#)), da bactéria não-cultivável clone nbw1235e04c1, encontrada em digestor anaeróbio de lodo biológico ([GQ067566.1](#)) e da bactéria não-cultivável, clone 3, encontrada em reator desnitrificante integrante de um sistema de tratamento de aterro sanitário ([AJ412672.1](#)).

Seqüências correspondentes à de bactérias tipicamente termófilas também foram encontradas, incluindo *Tepidimonas ignava*, linhagem SPS-1037, uma bactéria quimiolitoheterotrófica termófila ([NR\\_025041.1](#)), *Geobacillus* sp. não-cultivável F20, bactéria termófila encontrada em solo ([AJ564611.1](#)), *Thermobacillus composti*, uma termófila moderada isolada de reatores de compostagem ([AB254031.3](#)), *Paenibacillaceae* não-cultivável, clone A02-06<sup>a</sup>, encontrada em amostras de vermicompostagem ([FJ542823.1](#)), *Firmicutes* não-cultivável, clone SM2D03, ([AF445720.1](#)) e a bactéria não-cultivável S1-133, ambas encontradas em fonte termal, *Thermus scotoductus* ITI-252T ([Y18410.1](#)), *Thermus* sp. B70-05 ([AF407742.1](#)) e *Thermus* sp. ZHGI A.1 ([L09664.1](#)).

Tabela 12. Sequências parciais do gene 16S rDNA depositadas no banco de dados GenBank (NCBI), com elevada homologia a seqüências de clones obtidos a partir de lodos biológicos, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, na temperatura de 55 °C (este trabalho)

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">CU921448.1</a>	<i>Alphaproteobacteria</i> não-cultivável, clone QEDS3CG05, encontrada em digestor anaeróbio de lodo biológico	96	Família indefinida ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	RIVIERE et al., 2009
<a href="#">AF280860.1</a>	Bactéria não-cultivável mle1- 32, encontrada em lodo biológico de sistemas de tratamento de efluente farmacêutico	99	Família indefinida ( <i>Betaproteobacteria</i> )	LAPARA et al., 2000
<a href="#">NR_025041.1</a>	<i>Tepidimonas ignava</i> , linhagem SPS-1037, isolado quimiolitoheterotrófico, termófilo	88	Família indefinida ( <i>Betaproteobacteria</i> )	MOREIRA et al., 2000
<a href="#">AM990016.1</a>	<i>Methyloversatilis</i> sp. não- cultivável, clone SCP-F6, encontrada em amostras de solo	90	Rhodocyclaceae ( <i>Betaproteobacteria</i> )	GANGWAR et al., 2009
<a href="#">AM283038.1</a>	<i>Caldimonas</i> sp. Han85, linhagem Han85	100	Comamonadaceae ( <i>Betaproteobacteria</i> )	Não publicado

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">EF648105.1</a>	<i>Betaproteobacteria</i> não-cultivável HB123, encontrada em amostras de lodo biológico de sistemas de tratamento de água	97	Família indefinida ( <i>Betaproteobacteria</i> )	Não publicado
<a href="#">FJ222589.1</a>	<i>Rahnella</i> sp. N2-2, linhagem com capacidade de sintetizar biopolímeros	96	Enterobacteriaceae ( <i>Gammaproteobacteria</i> )	Não publicado
<a href="#">DQ333896.1</a>	<i>Cohnella</i> sp., isolada de solo de aterro sanitário	93	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	Não publicado
<a href="#">AJ564611.1</a>	<i>Geobacillus</i> sp. não-cultivável F20, bactéria termófila encontrada em amostras de solo	92	Bacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	RAHMAN et al., 2004
<a href="#">AB254031.3</a>	<i>Thermobacillus composti</i> , termófilo moderado isolado de reatores de compostagem	99	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	WATANABE et al., 2007
<a href="#">FJ542823.1</a>	Paenibacillaceae não-cultivável, clone A02-06 <sup>a</sup> , encontrada em amostras de vermicompostagem	94	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	Não publicado
<a href="#">AM162351.1</a>	<i>Paenibacillus</i> sp. YO4-17	95	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	Não publicado

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">AF445720.1</a>	<i>Firmicutes</i> não-cultivável, clone SM2D03, encontrada em fonte termal	94	Família indefinida ( <i>Firmicutes</i> )	Não publicado
<a href="#">FJ976043.1</a>	<i>Cohnella</i> sp. AR92, isolada de amostras de licor do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar na produção de papel	95	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	Não publicado
<a href="#">AM237400.1</a>	<i>Sporosarcina globispora</i> syn. <i>Bacillus globisporus</i> , isolado OS-253, isolada de partícula de poeira	99	Planococcaceae ( <i>Firmicutes</i> )	Não Publicado
<a href="#">AB362283.1</a>	<i>Paenibacillus</i> sp. JAM-FM1801, microrganismo aeróbio isolado de sedimento rico em matéria orgânica e metano	94	Paenibacillaceae ( <i>Firmicutes</i> )	KOBAYASHI et al., 2008
<a href="#">EU689105.1</a>	<i>Lactococcus</i> sp. YM05004, isolado de amostras de Tofu,	100	Streptococcaceae ( <i>Firmicutes</i> )	Não Publicado

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">EF648108.1</a>	<i>Caldilinea</i> sp. não-cultivável, clone XJ2 16S rDNA, isolada de amostras de lodo biológico no tratamento de água	99	Caldilineaceae (Chloroflexi)	Não publicado
<a href="#">Y18410.1</a>	<i>Thermus scotoductus</i> , linhagem ITI-252T	98	Thermaceae (Deinococcus-Thermus)	CHUNG et al., 2000
	<i>Thermus</i> sp. B70-05, 16S, bactéria termófila	99	Thermaceae (Deinococcus-Thermus)	Não publicado
<a href="#">L09664.1</a>	<i>Thermus</i> sp. ZHGI A.1	99	Thermaceae (Deinococcus-Thermus)	Saul et al., 1993
<a href="#">FM164957.3</a>	Bactéria não-cultivável, S1-133, detectado em fonte termal	98	-	Não publicado
<a href="#">EU134631.1</a>	Bactéria não-cultivável clone FFCH11327, detectada em amostras de solo	95	-	ELSHAHED et al., 2008
<a href="#">GQ067566.1</a>	Bactéria não-cultivável clone nbw1235e04c1 16S, detectada em digestor anaeróbio de lodo biológico	99	-	RIVIERE et al., 2009

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	% DE SIMILARIDADE	FAMÍLIA	REFERÊNCIA
<a href="#">AJ412672.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone 3, encontrada em reatores desnitrificantes em aterro sanitário	97	-	ETCHEBEHERE et al., 2002

Algumas seqüências foram compartilhadas por mais de uma biblioteca (Tabela 13), indicando uma relativa plasticidade do microrganismo em relação à sua manutenção em comunidades microbianas distintas, moldadas pela temperatura. Uma única seqüência, referente à da bactéria *Sporosarcina globispora*, foi encontrada nas bibliotecas obtidas a partir de lodos biológicos mantidos a 35 e 45 °C. As seqüências referentes a *Lactococcus* sp. YM05004, às espécies não-cultiváveis *Methyloversatilis* sp. SCP-F6 e clone 3 (espécie não-definida), foram encontradas nas três bibliotecas. Já as seqüências referentes à *Betaproteobacteria* não-cultivável HB123 e às espécies *Paenibacillus* sp. JAM-FM1801 e *Thermobacillus composti* foram encontradas somente nos lodos biológicos termófilos (45 e 55 °C).

Tabela 13. Seqüências parciais do gene 16S rDNA depositadas no banco de dados GenBank (NCBI) e encontradas simultaneamente nas bibliotecas 16S rDNA de lodos biológicos mantidos a 35, 45 e 55 °C, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado (este trabalho)

NÚMERO DE ACESSO	DESCRIÇÃO	NÚMERO DE SEQUÊNCIAS ENCONTRADAS NAS BIBLIOTECAS		
		35 °C	45 °C	55 °C
<a href="#">EU660424.1</a>	<i>Sporosarcina globispora</i> (Bactéria ID4389)	2	1	0
<a href="#">EU689105.1</a>	<i>Lactococcus</i> sp. YM05004,	2	8	3
<a href="#">AM990016.1</a>	<i>Methyloversatilis</i> sp. não-cultivável, clone SCP-F6,	5	4	3
<a href="#">AJ412672.1</a>	Bactéria não-cultivável, clone 3	2	2	1
<a href="#">EF648105.1</a>	<i>Betaproteobacteria</i> não-cultivável HB123 16S	0	11	5
<a href="#">AB362283.1</a>	<i>Paenibacillus</i> sp. JAM-FM1801	0	5	2
<a href="#">AB254031.3</a>	<i>Thermobacillus composti</i>	0	2	6
<a href="#">AM237400.1</a>	<i>Sporosarcina globispora</i> syn. <i>Bacillus globisporus</i>	0	14	2

## 2.4. CONCLUSÕES

- O aumento gradual da temperatura em reatores de membrana, durante o tratamento de efluente de fábrica de papel reciclado, causou mudança da comunidade de *Eubactéria* do lodo biológico.
- Maior distinção entre as comunidades de *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* presentes no reator mesófilo e nos reatores termófilos foi obtida somente a partir da temperatura de 50 °C.
- A adição de composto de resíduo sólido urbano ao reator termófilo causou mudança significativa do perfil genético da comunidade bacteriana, mas não interferiu na eficiência de remoção da matéria orgânica do efluente.
- O aumento da temperatura causou redução no índice de diversidade e na Riqueza de UTO's das classes *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*, assim como do filo *Firmicutes*, mas não alterou essas características para a classe *Gammaproteobacteria* ou *Eubactéria*;
- No lodo mantido em condição mesófila (35 °C), foram detectadas 20 seqüências distintas, representadas principalmente pelas classes *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* e pelo filo *Firmicutes*. A presença de bactérias relacionadas a ambientes como solo e sistemas de tratamento de efluente foi demonstrada por meio do seqüenciamento de fragmentos do gene 16S rDNA;
- No lodo mantido a 45 °C foram detectadas 22 seqüências distintas, representadas pelas classes *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* (Filo *Proteobacteria*) e pelos filos *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus* e *Chlorobi*, além de seqüências que não puderam ser associadas a filos reconhecidos. Nessa condição, foram encontradas seqüências com elevada homologia à de bactérias de solo, de sistemas de tratamento de efluentes e de bactérias tipicamente termófilas;
- No lodo mantido a 55 °C foram encontradas 24 seqüências distintas, representadas pelas mesmas classes e filos detectados a 55 °C, além da classe *Gammaproteobacteria*, que não foi detectada naquela condição. Também nesse lodo foram encontradas seqüências que não puderam ser associadas a filos reconhecidos.
- O aumento da temperatura de 35 °C para 55 °C provocou o aumento da proporção de seqüências do gene 16S rDNA associadas ao filo *Firmicutes*.

## CONCLUSÃO GERAL

Uma conclusão geral do presente estudo é que biorreatores a membranas, operando sob condições termófilas, são uma alternativa viável para o tratamento de efluentes de fábricas de papel reciclado, capazes de suportar uma diversidade bacteriana compatível com a manutenção de elevada eficiência de remoção da matéria orgânica e eventual plasticidade operacional.

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. *Microbial ecology, fundamentals e applications*. 4<sup>th</sup> ed. USA: Benjamim Cummings, 694p. 1998
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403-410. 1990.
- BEAUDET, R.; GAGNON, J. G.; ISHAQUE, M. Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste. *Applied and Environmental Microbiology*. v.56, p.971-976. 1990.
- BISSETT, A.; BOWMAN, J.; BURKE, C. Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. *Journal FEMS Microbiology Ecology*. v.55, p. 48-56. 2006.
- BLACKWOOD, C.B.; OAKS, A.; BUYER, J.S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, p.6193-6198. 2005.
- CHUNG, A.P.; RAINEY, F.A.; VALENTE, M.; NOBRE, M.F.; DA COSTA, M.S. *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. v.50, p.209-217. 2000.
- CHOUARI, R.; LE PASLIER, D.; DAEGELEN, P.; INESTET, P.; ISSENBACH, J.; SGHIR, A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology*. v.8, p.04-1115. 2005.
- CONNON, S.A.; LESTER, E.D.; SHAFAT, H.S.; OBENHUBER, D.C.; PONCE, A. Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. *Journal of Geophys. Resource*, v. 112. 2007.
- DE CARCER, D.A.; MARTIN, M.; KARLSON, U.; RIVILLA, R. Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of willow trees for rhizoremediation. *Applied and Environmental Microbiology* v. 73, p.24-6232. 2007.
- DeLONG, E. F. Microbial population genomics and ecology: the road ahead. *Environmental Microbiology*, v. 6, p.875-878. 2004.
- DENNER, E.B.; KOLARI, M.; HOORNSTRA, D.; TSITKO, I.; KAMPFER, P.; BUSSE, H.J.; SALKINOJA-SALONEN, M. *Rubellimicrobium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a red-pigmented, moderately thermophilic bacterium isolated from coloured slime deposits in paper machines. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*. v.56, p.1355-1362. 2006.
- DIAS, J. C. T. ; SILVA, C. M. ; LINARDI, V. R. ; PASSOS, F. M. L. ; MOUNTEER, A. H. Molecular diversity of mesophilic and thermophilic bacteria in a membrane bioreactor determined by fluorescen in situ hybridization with mxaf and rRNA-targeted probes. *Journal of Basic Microbiology, Alemanha*, v. 43, n. 3. 2003.

- DRANCOURT,M.; BOLLET,C.; CARLIOZ,A.; MARTELIN,R.; GAYRAL,J.P. ; RAOULT,D.16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. v.38, p. 3623-3630 .2000.
- EKMAN,J.; KOSONEN,M.; JOKELA,S.; KOLARI,M.; KORHONEN,P.; SALKINOJA-SALONEN,M. Detection and quantitation of colored deposit-forming *Meiothermus* spp. in paper industry processes and end products. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. v.34, p. 203-211 .2007.
- ETCHEBEHERE,C.; ERRAZQUIN,M.I.; DABERT,P.; MUXI,L. Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. *Journal FEMS Microbiology Ecology*. v. 40, p. 97-106. 2002.
- ELSHAHED,M.S.; YOUSSEF, N.H.; SPAIN, A.M.; SHEIK,C.; NAJAR, F.Z.; SUKHARNIKOV,L.O.; ROE,B.A.; DAVIS,J.P.; SCHLOSS,P.D.;BAILEY,V.L.; KRUMHOLZ,L.R. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Applied Environmental Microbiology*. v. 74, p.5422-5428 .2008.
- FENOLLAR, F.; ROUX, V.; STEIN, A.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Analysis of 525 Samples To Determine the Usefulness of PCR Amplification and Sequencing of the 16S rRNA Gene for Diagnosis of Bone and Joint Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 4, p. 1018-1028. 2006.
- GANGWAR,P.;ALAM,S.I.; BANSOD,S.; SINGH,L. Bacterial diversity of soil samples from the western Himalayas,Índia. *Canadian Journal of Microbiology* v.55, p.564-577.2009.
- GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology & Biochemistry*, v.38, p.91-102. 2006.
- GOMES, N.C.; HEUR, H.; SCHOLFED, J.; COSTA, R.; MENDOÇA-HANGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, v.232, p.167-180. 2001.
- GRICE,E.A.;KONG,H.H.;CONLAN,S.; DEMING,C.B.; DAVIS,J.; YOUNG,A.C.; BOUFFARD,G.G.; BLAKESLEY,R.W.; MURRAY,P.R., GREEN,E.D.; TURNER,M.L.; SEGRE,J.A. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. v. 324, p.1190-1192.2009.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbial and Molecular Biology Reviews*, v.68, p.669-685. 2004.
- HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microbiological Ecology*. v. 35, p.1–21. 1998.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-

- electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p. 3233-3241.1997.
- HORNER-DEVINE, M.C.; CARNEY, K.M.; BOHANNAN, B.J.M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B*, v.271, p.113-122. 2004.
- JUSTE,A.; LIEVENS,B.; FRANS,I., LINGEBERG,M.;MICHIELS,C.W.WILLEMS,K.A. Present knowledge of the bacterial microflora in the extreme environment of sugar thick juice.*Food Microbiology*. v.25 , p.831-836.2008.
- KAPLEY, A., DE BAERE, T., PUROHIT, H.J. Eubacterial diversity of activated biomass from a common effluent treatment plant. *Reserach Microbiology*. v. 158, p.494–500. 2007.
- KOBAYASHI,T.; KOIDE,O.; MORI,K.; SHIMAMURA,S.; MATSUURA,T.; MIURA,T.; TAKAKI,Y.; MORONO,Y; NUNOURA,T.; IMACHI,H.; INAGAKI,F.; TAKAI,K.; HORIKOSHI,K.Phylogenetic and enzymatic diversity of deep subseafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula.*Extremophiles*.v.12 , p. 519-527.2008.
- LAPARA, T.M.; ALLEMAN, J.E. Thermophilic aerobic biological wastewater treatment – Paper Review. *Water Research*. v. 33, n.4, p. 895–908. 1999.
- LAPARA, T.M.; NAKATSU, C.H.N.; PANTEA, L.M; ALLEMAN, J.E. Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, p. 3951–3959. 2000.
- LIU, Y., ZHANG, T., FANG, H.H.P. Microbial community analysis and performance of phosphate removing activated sludge. *Bioresource Technology*. v.96, p.1205–1214.2005.
- LIU,B.; ZHANG,F.; FENG,X.; LIU,Y.; YAN,X.; ZHANG,X.; WANG,L.; ZHAO,L.Thaueria and Azoarcus as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 55, p. 274-286. 2006.
- MANEFIELD, M., GRIFFITHS, R.I., LEIGH, M.B., FISHER, R., ANDREW, S.W. Functional and compositional comparison of two activated sludge communities remediating coking effluent. *Environmental Microbiology*. v 7, p.715–722. 2005.
- MATSUI,T.; SHINZATO,N.; TAMAKI,H.; MURAMATSU,M.; HANADA,S. *Shinella yambaruensis* sp. nov., a 3-methyl-sulfolane-assimilating bacterium isolated from soil. *International Journal of Systemtatic Evolution Microbiology* v.59, p.536-539.2009.
- MOREIRA,C.; RAINEY,F.A.; NOBRE,M.F.; DA SILVA,M.T.;DA COSTA,M.S. *Tepidimonas ignava* gen. nov., sp. nov., a new chemolithoheterotrophic and slightly thermophilic member of the beta-Proteobacteria. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*. v. 50, p. 735-742 .2000.
- MOURA, A.; TACÃO, M.; HENRIQUES, I.; DIAS,B. FERREIRA,J P.; B, CORREIA.;A. Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR–DGGE analysis. *Microbiological Research*.2007.

- MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. v. 2, p. 317-322. 1999.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.73, p.127-141. 1998.
- NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKA, A.; SNAIDR, J.; WIESENHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs. In: *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. v. 178, p. 5636–5643. 1996.
- OLSSON, C.; AHRNE, S.; PETTERSSON, B.; MOLIN, G. The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *International Journal of Food Microbiology*. v.83, p.245- 252. 2003.
- PEREIRA, M. A.; ROEST, K.; STAMS, A. J. M.; MOTA, M.; ALVES, M.; AKKERMANS, A. D. L. Molecular monitoring of microbial diversity in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors treating oleic acid. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 41, p. 95–103. 2002.
- RAHMAN, T.J.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. *Biochemical Society Transactions*. v. 32 , p.209-213 .2004.
- RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.; GLIESCHE, C.G.; STACKEBRANDT, E. Phylogenetic analysis and intrageneric structure of the genus *Hyphomicrobium* and the related genus *Filomicrobium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.48 , p.635-639 .1998.
- RIVIERE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBACH, J.; LI, T.; CAMACHO, P.; SGHIR, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *Journal ISME J*. v. 3, p.700-714. 2009.
- ROEST, K.; HEILIG, H. G.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; STAMS, A. J. M.; AKKERMANS, A. D. L. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor. *Journal of Systematic Applied Microbiology*. v. 28, n. 2, p. 175-185. 2005.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. Paginação irregular.
- SANZ, J.L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in waster treatment: an overview. *Process Biochemistry*. v. 42, p. 119-133. 2007.
- SAUL, D.J.; RODRIGO, A.G.; REEVES, R.A.; WILLIAMS, L.C.; BORGES, K.M.; MORGAN, H.W.; BERGQUIST, P.L. sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 43, p.754-760 .1993.

- SHARP, R. J.; RILEY, P. W.; WHITE, D. Heterotrophic thermophilic Bacilli. In: KRISTJANSSON, J. K. (Ed.) *Thermophilic Bacteria*, MI, U.S.A.: CRC Press, Inc., Ann Arbor., 1992.
- SILVEY, P.; PULLAMMANAPPALLIL, P.C.; BLACKALL, L.; NICHOLS, P. Microbial ecology of the leach bed anaerobic digestion of unsorted municipal solid waste. *Water Science and Technology*. v. 41, n° 3, p. 9–16.2000.
- SOARES, R. A.; ROESCH, L. F. W.; ZANATTA, G.; CAMARGO, F.A. DE O.; PASSAGLIA, L.M. P. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology*. v. 33, p. 221–234.2006
- SURUCU, G.A.; CHIAN, E.S.K.; ENGELBRECHT, R.S. Aerobic thermophilic treatment of high strength wastewaters. *Journal of the Water pollution Control Federation*. v.48 ,p. 669–679. 1976.
- SURUCU, G.A.; ENGELBRECHT; R.S.; CHIAN, E.S.K.. Thermophilic microbiological treatment of high strength wastewaters with simultaneous protein. *Biotechnology and Bioengineering*. v.17, p. 1639–1662. 1975.
- TESKE, A. P.; SIGALEVICH. Y.; COHEN; MUYZER. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, p. 4210-4215. 1996.
- TIIROLA, M. A.; SUVILAMPI, J. E.; KULOMAA, M.S.; RINTALA, J. A. Microbial diversity in a thermophilic aerobic biofilm process: analysis by length heterogeneity PCR (LH-PCR). *Water Research*. v. 37, p. 2259–2268. 2003.
- TISCHER R. G.; BROWN, L. R.; COOK, D. W. Decomposition of wastewater by thermophilic microorganisms. *Journal of Water Pollution Control Federal*. v. 34, p. 1244-1255.1962.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; LISE, F. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.782-787. 1990.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v.5, p.240-245. 2002.
- TRIPATHI, C. S.; ALLEN, D. G. Comparison of mesophilic and termophilic aerobic biological treatment in sequencing batch reactors treating bleached kraft pulp mill effluent. *Water Research*. v. 33, n. 3, p. 836-846. 1999.
- UENO, Y.; HARUTA, S.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 57, p. 65–73, 2001.
- WANG, M.; AHRNE, S.; JEPSSON, B.; MOLIN, G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. v.54, p.219–231.2005).

- WATANABE,K.; NAGAO,N.; YAMAMOTO,S.; TODA,T.; KUROSAWA,N. *Thermobacillus composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting reactor. *Journal of Systematic Evolution Microbiology*. v.57, p.1473-1477 .2007.
- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J.. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v.173, p.697-703. 1991.
- WERKER, A. G.; BECKER, J.; HUITEMA, C. Assessment of activated sludge microbial community analysis in full-scale biological wastewater treatment plants using patterns of fatty acid isopropyl esters (FAPEs). *Water Research*. v. 37, p.2162–2172. 2003.
- WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.95, p.6578-6583. 1998.
- YOON,K.S.; TSUKADA,N.; SAKAI,Y.; ISHII,M.; IGARASHI,Y.; NISHIHARA,H. Isolation and characterization of a new facultatively autotrophic hydrogen-oxidizing Betaproteobacterium, *Hydrogenophaga* sp. AH-24. *FEMS Microbiology Letters*. v.278, p. 94-100. 2008.
- YOON,J.H.; KANG,S.J.; PARK,S.;OH,T.K. *Daeguia caeni* gen. nov., sp. nov., isolated from sludge of a textile dye works. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*. v.58,p. 168-172 .2008.
- ZITA, A., HERMANSSON, A., Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Applied Microbiology Biotechnology*.v .63, p.1168–1170. 1997.

ANEXO: Valores de SST, SSV,SSF, DQO do afluente, DQO do efluente de saída para cada reator.

DIAS	REATORES	SST (g.L <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	SSF (g.L <sup>-1</sup> )	DQO AFLUENTE (mg.L <sup>-1</sup> )	DQO EFLUENTES (mg.L <sup>-1</sup> )	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO
1	1	4,570	4,040	0,530	3033	118,25	97,6
	2	5,470	4,870	0,600		93,25	98,1
	3	6,290	5,310	0,980		125,75	97,4
2	1	5,540	3,410	2,130	2683	193,25	96,0
	2	4,820	4,200	0,620		190,75	96,1
	3	5,420	4,540	0,880		203,25	95,8
3	1	4,820	3,400	1,420	2433	173	96,4
	2	4,290	3,690	0,600		128,25	97,3
	3	4,950	4,200	0,750		165,75	96,6
4	1	4,540	3,560	0,980	2458	180,75	96,3
	2	4,360	3,860	0,500		163,25	96,6
	3	4,770	3,930	0,840		160,75	96,7
5	1	5,060	3,740	1,320	2433	180,75	96,3
	2	5,420	4,710	0,710		163,25	96,6
	3	6,040	4,860	1,180		160,75	96,7
6	1	4,040	3,010	1,030	2808	145,75	97,0
	2	5,740	4,950	0,790		128,25	97,3
	3	5,130	4,970	0,160		145,75	97,0
7	1	4,060	3,330	0,730	3133	293,25	93,9
	2	6,070	5,130	0,940		243,25	95,0
	3	5,920	4,980	0,940		248,25	94,9
8	1	4,060	3,330	0,730	2683	203,25	95,8
	2	4,370	3,950	0,420		185,75	96,2
	3	3,680	3,140	0,540		195,75	95,9
9	1	3,780	3,400	0,380	3033	203,25	95,8
	2	4,760	4,180	0,580		185,75	96,2
	3	3,630	3,000	0,630		195,75	95,9
10	1	3,760	3,350	0,410	2808	163,25	96,6
	2	3,560	3,070	0,490		158,25	96,7
	3	4,600	3,390	1,210		210,75	95,6
11	1	4,490	3,950	0,540	3058	138,25	97,1
	2	1,150	3,030	-1,880		210,75	95,6
	3	4,830	3,650	1,180		220,75	95,4
12	1	5,160	3,980	1,180	2883	138,25	97,1
	2	4,530	3,680	0,850		210,75	95,6
	3	4,440	3,450	0,990		220,75	95,4
13	1	4,510	3,950	0,560	2883	185,75	96,2
	2	4,710	3,900	0,810		195,75	95,9
	3	4,710	3,680	1,030		228,25	95,3
14	1	6,360	4,100	2,260	2758	158,25	96,7
	2	5,460	3,630	1,830		178,25	96,3
	3	5,720	3,460	2,260		273,25	94,3
15	1	6,360	4,100	2,260	3008	183,25	96,2

DIAS	REATORES	SST (g.L <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	SSF (g.L <sup>-1</sup> )	DOO AFLUENTE (mg.L <sup>-1</sup> )	DOO EFLUENTES (mg.L <sup>-1</sup> )	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO
	2	5,460	3,630	1,830		170,75	96,5
	3	5,720	3,460	2,260		240,75	95,0
16	1	5,860	4,190	1,670	3058	220,75	95,4
	2	5,850	3,980	1,870		27,25	99,4
	3	4,760	2,910	1,850		33,25	99,3
17	1	5,770	3,770	2,000	2958	225,75	95,3
	2	5,010	3,380	1,630		250,75	94,8
	3	4,810	2,950	1,860		305,75	93,7
18	1	5,800	4,440	1,360	2808	200,75	95,8
	2	6,260	4,700	1,560		245,75	94,9
	3	5,050	3,780	1,270		260,75	94,6
19	1	3,940	3,680	0,260	2882,5	200,75	95,8
	2	5,190	4,390	0,800		245,75	94,9
	3	4,350	3,720	0,630		260,75	94,6
20	1	4,320	3,890	0,430	3082,5	168,25	96,5
	2	5,200	4,680	0,520		220,75	95,4
	3	4,390	3,650	0,740		233,25	95,2
21	1	4,320	3,890	0,430	2907,5	188,25	96,1
	2	5,200	4,680	0,520		213,25	95,6
	3	4,390	3,650	0,740		230,75	95,2
22	1	3,940	3,130	0,810	2982,5	188,25	96,1
	2	4,400	3,700	0,700		213,25	95,6
	3	5,770	4,750	1,020		230,75	95,2
23	1	3,940	3,130	0,810	3082,5	188,25	96,1
	2	4,400	3,700	0,700		213,25	95,6
	3	5,770	4,750	1,020		230,75	95,2
24	1	4,380	3,630	0,750	3007,5	240,75	95,0
	2	5,620	4,580	1,040		275,75	94,3
	3	5,750	4,600	1,150		277,5	94,3
25	1	4,680	4,080	0,600	3007,5	278,25	94,2
	2	5,120	4,610	0,510		25,75	99,5
	3	6,050	5,100	0,950		320,75	93,4
26	1	4,680	4,080	0,600	2782,5	228,25	95,3
	2	5,120	4,610	0,510		248,25	94,9
	3	6,050	5,100	0,950		285,75	94,1
27	1	4,800	4,480	0,320	2782,5	208,25	95,7
	2	6,130	5,540	0,590		238,25	95,1
	3	5,430	4,530	0,900		27498,25	273,3
28	1	6,000	5,710	0,290	3332,5	213,25	95,6
	2	5,630	4,970	0,660		240,75	95,0
	3	5,860	4,780	1,080		245,75	94,9
29	1	6,440	5,740	0,700	3207,5	185,75	96,2
	2	6,350	5,540	0,810		245,75	94,9
	3	5,440	4,690	0,750		240,75	95,0
30	1	6,050	5,710	0,340	3357,5	180,75	96,3
	2	6,420	5,570	0,850		198,25	95,9

DIAS	REATORES	SST (g.L <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	SSF (g.L <sup>-1</sup> )	DOO AFLUENTE (mg.L <sup>-1</sup> )	DOO EFLUENTES (mg.L <sup>-1</sup> )	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO	
	3	6,230		5,110	1,120	238,25	95,1	
31	1	5,440		5,350	0,090	3632,5	180,75	96,3
	2	6,540		5,740	0,800		198,25	95,9
	3	5,130		4,430	0,700		238,25	95,1
32	1	5,930		4,830	1,100	3607,5	198,25	95,9
	2	6,970		5,290	1,680		253,25	94,8
	3	5,400		4,500	0,900		248,25	94,9
33	1	5,390		4,140	1,250	2.658	173	96,4
	2	5,980		4,400	1,580		231	95,2
	3	4,330		3,880	0,450		263	94,6
34	1	4,870		3,820	1,050	3	168	96,5
	2	5,520		4,020	1,500		216	95,5
	3	4,310		2,820	1,490		266	94,5
35	1	4,300		4,270	0,030	3.283	166	96,6
	2	5,470		3,900	1,570		206	95,7
	3	3,700		2,610	1,090		243	95,0
36	1	5,690		4,640	1,050	3.286	166	96,6
	2	5,660		4,280	1,380		206	95,7
	3	4,520		3,060	1,460		244	95,0
37	1	4,180		3,870	0,310	3.058	163	96,6
	2	5,040		3,550	1,490		196	95,9
	3	4,010		3,040	0,970		208	95,7
38	1	4,310		3,510	0,800	2.758	158,25	96,7
	2	5,690		3,680	2,010		198,25	95,9
	3	4,660		2,900	1,760		195,75	95,9
39	1	5,110		3,910	1,200	3.408	158,25	96,7
	2	5,400		3,510	1,890		198,25	95,9
	3	5,530		3,330	2,200		195,75	95,9
40	1	4,480		3,320	1,160	3.408	168,25	96,5
	2	5,660		3,550	2,110		180,75	96,3
	3	4,160		2,740	1,420		203,25	95,8
41	1	4,360		3,410	0,950	3.008	168,25	96,5
	2	5,590		3,720	1,870		180,75	96,3
	3	4,120		2,710	1,410		203,25	95,8
42	1	6,740		4,050	2,690	2982,5	145,75	97,0
	2	6,510		3,640	2,870		178,25	96,3
	3	6,600		3,630	2,970		188,25	96,1
43	1	5,370		4,530	0,840	3607,5	170,75	96,5
	2	6,060		4,010	2,050		178,25	96,3
	3	5,010		3,490	1,520		183,25	96,2
44	1	5,810		4,520	1,290	3607,5	170,75	96,5
	2	6,320		3,980	2,340		178,25	96,3
	3	4,890		3,360	1,530		183,25	96,2
45	1	5,130		4,050	1,080	2982,5	143,25	97,0
	2	5,880		3,810	2,070		178,25	96,3

DIAS	REATORES	SST (g.L <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	SSF (g.L <sup>-1</sup> )	DOO AFLUENTE (mg.L <sup>-1</sup> )	DOO EFLUENTES (mg.L <sup>-1</sup> )	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO	
	3	4,940		3,330	1,610		190,75	96,1
46	1	4,570		3,370	1,200	2982,5	143,25	97,0
	2	5,790		3,820	1,970		238,25	95,1
	3	4,000		2,540	1,460		225,75	95,3
47	1	4,680		3,340	1,340	2732,5	173,25	96,4
	2	5,360		3,630	1,730		220,75	95,4
	3	3,840		2,400	1,440		310,75	93,6
48	1	4,850		3,890	0,960	3332,5	153,25	96,8
	2	6,030		4,150	1,880		170,75	96,5
	3	6,260		3,600	2,660		275,75	94,3
49	1	4,240		3,320	0,920	3107,5	153,25	96,8
	2	6,370		4,030	2,340		170,75	96,5
	3	4,340		2,490	1,850		275,75	94,3
50	1	3,650		2,750	0,900	3107,5	150,75	96,9
	2	6,680		4,140	2,540		295,75	93,9
	3	3,200		2,320	0,880		258,25	94,7
51	1	3,880		2,860	1,020	2582,5	145,75	97,0
	2	4,440		2,760	1,680		250,75	94,8
	3	2,930		1,790	1,140		233,25	95,2
52	1	3,410		2,530	0,880	3057,5	130,75	97,3
	2	3,620		1,980	1,640		218,25	95,5
	3	2,360		1,720	0,640		233,25	95,2
53	1	3,790		2,880	0,910	3157,5	140,75	97,1
	2	3,530		2,120	1,410		200,75	95,8
	3	2,330		1,310	1,020		240,75	95,0
54	1	2,850		2,240	0,610	2882,5	155,75	96,8
	2	3,340		1,780	1,560		193,25	96,0
	3	2,780		1,700	1,080		233,25	95,2
55	1	1,630		1,380	0,250	2682,5	180,75	96,3
	2	3,860		2,660	1,200		245,75	94,9
	3	3,260		2,970	0,290		270,75	94,4
56	1	2,690		2,080	0,610	2532,5	168,25	96,5
	2	3,540		2,440	1,100		238,25	95,1
	3	4,030		3,510	0,520		255,75	94,7
57	1	3,400		3,060	0,340	2882,5	193,25	96,0
	2	4,420		2,920	1,500		225,75	95,3
	3	0,720		0,610	0,110		405,75	91,6
58	1	3,860		3,500	0,360	2907,5	213,25	95,6
	2	4,410		2,830	1,580		268,25	94,4
	3	2,450		1,800	0,650		380,75	92,1
59	1	4,950		4,150	0,800	2732,5	173,25	96,4
	2	5,590		3,400	2,190		235,75	95,1
	3	3,390		2,070	1,320		315,75	93,5
60	1	5,400		4,140	1,260	3082,5	173,25	96,4
	2	4,910		2,660	2,250		235,75	95,1

DIAS	REACTORES	SST (g.L <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	SSF (g.L <sup>-1</sup> )	DOO AFLUENTE (mg.L <sup>-1</sup> )	DOO EFLUENTES (mg.L <sup>-1</sup> )	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO
	3	3,140	1,610	1,530		315,75	93,5
61	1	3,630	2,940	0,690	3257,5	180,75	96,3
	2	4,470	2,700	1,770		293,25	93,9
	3	3,450	1,840	1,610		248,25	94,9
62	1	4,010	3,080	0,930	2882,5	180,75	96,3
	2	4,520	2,600	1,920		293,25	93,9
	3	3,330	1,730	1,600		248,25	94,9
63	1	3,600	2,910	0,690	3082,5	168,25	96,5
	2	4,650	2,350	2,300		248,25	94,9
	3	3,160	1,550	1,610		230,75	95,2
64	1	2,490	2,650	-0,160	2607,5	180,75	96,3
	2	4,160	2,800	1,360		243,25	95,0
	3	2,530	1,730	0,800		263,25	94,6
65	1	2,830	2,880	-0,050	3032,5	143,25	97,0
	2	4,130	3,020	1,110		225,75	95,3
	3	2,200	1,600	0,600		303,25	93,7
66	1	3,870	3,270	0,600	3257,5	145,75	97,0
	2	5,460	3,530	1,930		240,75	95,0
	3	1,850	1,530	0,320		278,25	94,2
67	1	3,640	3,250	0,390	3257,5	145,75	97,0
	2	4,750	3,130	1,620		240,75	95,0
	3	2,340	1,560	0,780		278,25	94,2
68	1	3,610	3,270	0,340	3207,5	140,75	97,1
	2	4,570	3,190	1,380		308,25	93,6
	3	2,500	1,570	0,930		263,25	94,6
69	1	4,410	3,830	0,580	2857,5	130,75	97,3
	2	5,750	3,870	1,880		275,75	94,3
	3	2,650	1,830	0,820		233,25	95,2
70	1	4,650	4,070	0,580	3182,5	145,75	97,0
	2	7,100	4,700	2,400		263,25	94,6
	3	3,100	1,970	1,130		225,75	95,3
71	1	7,880	6,960	0,920	3182,5	148,25	96,9
	2	6,670	4,420	2,250		310,75	93,6
	3	3,320	2,070	1,250		248,25	94,9
72	1	4,900	4,320	0,580	3057,5	143,25	97,0
	2	7,260	4,550	2,710		290,75	94,0
	3	3,540	2,060	1,480		235,75	95,1
73	1	125,710	4,320	121,390	3407,5	238,25	95,1
	2	7,260	4,550	2,710		283,25	94,1
	3	3,540	2,060	1,480		258,25	94,7
74	1	5,510	4,310	1,200	3282,5	143,25	97,0
	2	8,440	5,040	3,400		283,25	94,1
	3	6,270	3,300	2,970		285,75	94,1
75	1	4,700	3,910	0,790	2757,5	140,75	97,1
	2	7,080	4,020	3,060		250,75	94,8

DIAS	REATORES	SST (g.L <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	SSF (g.L <sup>-1</sup> )	DOO AFLUENTE (mg.L <sup>-1</sup> )	DOO EFLUENTES (mg.L <sup>-1</sup> )	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO	
	3	7,190		4,130	3,060	265,75	94,5	
76	1	3,770		2,930	0,840	2707,5	173,25	96,4
	2	7,170		4,040	3,130		280,75	94,2
	3	5,770		3,470	2,300		298,25	93,8
77	1	3,830		2,910	0,920	2732,5	123,25	97,4
	2	5,630		3,310	2,320		273,25	94,3
	3	4,380		2,550	1,830		310,75	93,6
78	1	3,800		2,930	0,870	3107,5	125,75	97,4
	2	5,570		3,240	2,330		260,75	94,6
	3	4,380		2,550	1,830		303,25	93,7
79	1	5,230		3,280	1,950	3107,5	143,25	97,0
	2	5,630		3,260	2,370		253,25	94,8
	3	7,370		3,190	4,180		298,25	93,8
80	1	4,590		3,590	1,000	2932,5	133,25	97,2
	2	6,470		3,830	2,640		243,25	95,0
	3	4,300		2,810	1,490		323,25	93,3
81	1	4,590		3,590	1,000	2932,5	133,25	97,2
	2	6,470		3,830	2,640		243,25	95,0
	3	4,300		2,810	1,490		323,25	93,3
82	1	5,030		3,530	1,500	2982,5	168,25	96,5
	2	5,180		2,970	2,210		375,75	92,2
	3	4,210		2,540	1,670		358,25	92,6
83	1	4,940		4,030	0,910	3107,5	155,75	96,8
	2	4,940		3,370	1,570		343,25	92,9
	3	3,990		2,440	1,550		360,75	92,5
84	1	4,910		4,010	0,900	2482,5	145,75	97,0
	2	5,500		3,640	1,860		303,25	93,7
	3	4,210		2,600	1,610		335,75	93,1
85	1	4,080		3,510	0,570	3132,5	170,75	96,5
	2	4,670		3,000	1,670		263,25	94,6
	3	3,680		2,430	1,250		285,75	94,1
86	1	5,570		4,490	1,080	3232,5	193,25	96,0
	2	4,830		3,100	1,730		275,75	94,3
	3	3,180		2,140	1,040		265,75	94,5
87	1	5,840		4,430	1,410	3282,5	143,25	97,0
	2	8,490		5,110	3,380		213,25	95,6
	3	6,000		3,660	2,340		275,75	94,3
88	1	6,220		5,050	1,170	2732,5	143,25	97,0
	2	-3,860		-6,210	2,350		213,25	95,6
	3	3,500		2,390	1,110		275,75	94,3
89	1	5,600		4,930	0,670	2907,5	160,75	96,7
	2	6,750		4,330	2,420		275,75	94,3
	3	4,790		3,190	1,600		293,25	93,9
90	1	5,480		4,790	0,690	3057,5	140,75	97,1
	2	5,980		3,820	2,160		395,75	91,8

DIAS	REATORES	SST (g.L <sup>-1</sup> )	SSV (g.L <sup>-1</sup> )	SSF (g.L <sup>-1</sup> )	DOO AFLUENTE (mg.L <sup>-1</sup> )	DOO EFLUENTES (mg.L <sup>-1</sup> )	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO	
	3	4,020		2,780	1,240		263,25	94,6
91	1	6,040		4,990	1,050	2482,5	148,25	96,9
	2	5,440		3,540	1,900		305,75	93,7
	3	5,050		3,270	1,780		255,75	94,7
92	1	6,160		5,170	0,990	2232,5	173,25	96,4
	2	5,440		3,530	1,910		270,75	94,4
	3	7,530		4,230	3,300		248,25	94,9
93	1	6,880		5,970	0,910	2482,5	150,75	96,9
	2	5,950		4,180	1,770		245,75	94,9
	3	4,850		3,400	1,450		253,25	94,8
94	1	5,670		5,130	0,540	2932,5	160,75	96,7
	2	6,560		3,240	3,320		255,75	94,7
	3	-95,910		-97,540	1,630		285,75	94,1
95	1	6,380		5,440	0,940	2957,5	148,25	96,9
	2	5,810		3,460	2,350		305,75	93,7
	3	3,260		1,860	1,400		508,25	89,5
96	1	6,750		5,440	1,310	2557,5	158,25	96,7
	2	7,820		4,360	3,460		263,25	94,6
	3	4,080		2,310	1,770		410,75	91,5
97	1	6,160		5,270	0,890	2732,5	123,25	97,4
	2	3,690		2,220	1,470		298,25	93,8
	3	3,050		1,900	1,150		243,25	95,0
98	1	2,860		2,460	0,400	2957,5	165,75	96,6
	2	6,690		4,230	2,460		288,25	94,0
	3	3,130		2,470	0,660		310,75	93,6
99	1	2,860		2,460	0,400	2957,5	175,75	96,4
	2	6,690		4,230	2,460		275,75	94,3
	3	3,130		2,470	0,660		280,75	94,2
100	1	3,650		2,900	0,750	3182,5	143,25	97,0
	2	6,840		4,190	2,650		310,75	93,6
	3	5,880		3,750	2,130		303,25	93,7
101	1	3,150		2,720	0,430	3107,5	153,25	96,8
	2	6,270		4,010	2,260		303,25	93,7
	3	5,940		3,560	2,380		288,25	94,0
102	1	3,480		3,140	0,340	3282,5	135,75	97,2
	2	5,370		3,390	1,980		303,25	93,7
	3	5,600		3,350	2,250		310,75	93,6