

LÚCIA MARIA GONÇALVES FERREIRA DAS NEVES

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOMASSA ANAERÓBIA  
GRANULAR: ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA  
DE IMAGEM, HIBRIDIZAÇÃO COM SONDAS GENÉTICAS  
(FISH) E TÉCNICAS HISTOLÓGICAS**



MESTRADO EM TECNOLOGIA DO AMBIENTE

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

ESCOLA DE ENGENHARIA

**UNIVERSIDADE DO MINHO**

2002

Tese submetida para obtenção do grau de mestre em Tecnologia do Ambiente

realizada sob a orientação de

**Maria Madalena dos Santos Alves**

Professora Auxiliar

Com co-orientação de

**Eugénio Manuel de Faria Campos Ferreira**

Professor Associado

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

ESCOLA DE ENGENHARIA

**UNIVERSIDADE DO MINHO**

2002

*Ao Paulo*

*Aos meus pais: Damião e Mi, e à minha avó Ilídia,*

*com quem tudo começou.*



# Agradecimentos

No decorrer deste trabalho, senti-me acompanhada por muitas pessoas, a quem desde já quero expressar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar aos meus orientadores. Prof. Madalena Alves, a quem agradeço a partilha dos seus conhecimentos e o seu maior empenho na discussão de resultados desta tese e Prof. Eugénio Ferreira, que sempre se mostrou disponível para qualquer assunto que necessitasse.

À Prof. Rosário oliveira por me proporcionar todo o tempo necessário para a escrita deste trabalho.

À D. Helena Moreira, técnica do laboratório de histologia da Faculdade de Ciências do Porto, por toda a disponibilidade, simpatia e apoio na utilização do micrótomo.

Aos meus colegas de laboratório, à Alcina, por todo o apoio, ao Pablo, à Olga e ao Luís Amaral pela sua grande contribuição no trabalho de análise de imagem. Ao Fernando Dourado pelas sugestões iniciais no capítulo de coloração dos lípidos.

Ao meu marido Paulo Sarabanda, pelo seu apoio incondicional, e pelas suas palavras nas alturas de mais desalento. A todos os meus amigos que partilharam este ano comigo.

# Sumário

O objectivo desta tese foi a caracterização de biomassa anaeróbia granular utilizando técnicas de análise quantitativa de imagem, de visualização em microscópio electrónico de varrimento, de identificação microbiana com sondas genéticas e de visualização usando técnicas histológicas.

A análise quantitativa de imagem foi aplicada a biomassa granular proveniente de dois reactores do tipo manto de lamas. Num dos reactores tentava-se seguir um protocolo experimental que conduzisse à formação de grânulos e noutra reactor, devido ao tipo de substrato alimentado (ácido oleico), os grânulos previamente inoculados sofreram um processo de desgranulação. Os objectivos específicos do presente trabalho foram: (i) definir o protocolo de amostragem da biomassa no reactor de granulação, de modo a preservar a estrutura dos agregados formados em todas as etapas do processo. (ii) definir o melhor método de aquisição da imagem, de modo a obter a melhor e maior informação durante as etapas dos processos, (iii) quantificar e minimizar erros devido a processos de diluição das amostras. (iv) demonstrar a utilidade e mais valia de técnicas de análise quantitativa de imagem para monitorização dum processo de granulação e dum processo de desgranulação de consórcios microbianos anaeróbios, nomeadamente na medição da área projectada dos agregados, dos filamentos livres e do número relativo de partículas de pequenas, intermédias e grandes dimensões.

A amostragem da biomassa do reactor foi otimizada, tendo-se construído uma sonda que se introduzia pelo topo do reactor e que permitia aspirar uma amostra preservando a integridade dos agregados. O estudo do efeito da diluição na quantificação dos parâmetros morfológicos e de tamanho atrás definidos permitiu concluir que para diluições elevadas há sistematicamente uma sobrestimação de todos os parâmetros e que a diluição óptima depende não só da concentração inicial de biomassa, mas também do seu estado de agregação e provavelmente da sua estrutura. Na definição da diluição óptima em cada um dos estudos realizados, recorreu-se a um parâmetro definido como percentagem de reconhecimento que mede a razão entre os objectos integralmente visualizados numa imagem e todos os objectos, incluindo os que se encontram na fronteira da mesma.

A aplicação da análise de imagem a um processo de desgranulação permitiu quantificar as alterações de tamanho ao longo do processo e obter uma boa correlação linear entre parâmetros de análise de imagem tal como área de finos/área total (sendo os finos definidos como partículas com diâmetro inferior a 1 mm) e parâmetros baseados numa selecção física de tamanho e na análise dos sólidos. A aplicação da análise de imagem a um processo de granulação permitiu também quantificar as alterações de tamanho e morfológicas ocorridas nos agregados microbianos durante o processo. Mediu-se a área média dos agregados e a área média de três fracções de tamanho de agregados definidas do seguinte modo: pequenos, entre 100 e 1000  $\mu\text{m}^2$  de área, correspondendo a um diâmetro equivalente entre 11.3 e 35.8  $\mu\text{m}$ , intermédios, entre 1000 e 20000  $\mu\text{m}^2$  de área, correspondendo a um diâmetro equivalente entre 35.8 e 159.6  $\mu\text{m}$  e grandes, superiores a 20000  $\mu\text{m}^2$  de área, correspondendo a um diâmetro equivalente superior a 159.6  $\mu\text{m}$ . O número e o comprimento médio de filamentos livres também foram determinados para cada amostra analisada.

A microscopia electrónica de varrimento permitiu avaliar a morfologia bacteriana do exterior dos agregados que se formaram durante o processo de granulação, verificando as principais alterações ao longo do mesmo. Observaram-se bactérias filamentosas semelhantes ao género *Methanosaeta* e agregados de cocos. Observaram-se também os agregados que se encontravam em fase de desgranulação.

A aplicação de técnicas de hibridização com sondas genéticas à identificação de grupos de organismos nos grânulos em formação, permitiu dar uma informação meramente qualitativa. Os resultados obtidos são muito preliminares e utilizaram-se apenas duas sondas específicas de grandes grupos (ARC915 – para aqueobactérias e EUB338 para bactérias).

Por fim, tentou-se uma abordagem de técnicas histológicas para localizar a presença de ácidos gordos de cadeia longa adsorvidos em agregados de biomassa anaeróbia. Utilizaram-se dois corantes, negro de Sudão e óleo vermelho e pelos resultados obtidos que são também preliminares pareceu que o óleo vermelho permitia obter melhores imagens.

# Abstract

The aim of this work was to characterize anaerobic granular sludge by using quantitative image analysis techniques, scanning electron microscope observations, fluorescent *in-situ* hybridization (FISH) and histological techniques.

Quantitative image analysis was applied to granular sludge from two sludge blanket reactors (an Upflow Anaerobic Sludge Blanket – UASB and an Expanded Granular Sludge Bed – EGSB). The UASB reactor was set to produce granular sludge from a completely dispersed inoculum. In the other reactor and due to the substrate fed (oleic acid) the previously inoculated granular sludge suffered a process of disintegration. The specific aim of this part of the work was: (i) to define the best protocol to withdraw the biomass from the granulation reactor preserving its structure during all the process. (ii) to define the best way of image acquisition, in order to get the highest quality and quantity of information. (iii) to quantify and to minimize the errors due to the dilution processes. (iv) to demonstrate the usefulness of quantitative image analysis for monitoring processes of granulation and granules disaggregation, namely by measuring the projected area, the free filaments and the relative number of small, medium and big particles.

Biomass sampling was optimized. A special device was constructed that allowed a sample to be taken from the reactor, preserving the integrity of the aggregates. The effect of the dilution on size and morphological parameters quantification led to the conclusion that for high dilutions, there is an overestimation of all parameters. Furthermore, the optimal dilution depends not only on the initial biomass concentration, but also on the size of the aggregates and possibly on their structure. Optimal dilution was defined by using a parameter denominated percentage of recognition that measures the ratio between the objects that are completely inside the image and all the objects, including those that are in the frontiers.

The application of image analysis to a process of granules disintegration allowed the quantification of size changes along the process. A good linear correlation was obtained between image analysis parameters such as fine area/total area (fines were defined as particles with a diameter smaller than 1 mm) and parameters based on a physical separation and solids determination. The application of image analysis to a process of granulation allowed the quantification of size and morphology along the process. The average area of the aggregates was measured as well as the average area of three ranges of size, defined as: small aggregates between 100 e 1000  $\mu\text{m}^2$  of area, corresponding to equivalent diameters between 11.3 e 35.8  $\mu\text{m}$ , medium aggregates, between 1000 e 20000  $\mu\text{m}^2$  of area, corresponding to equivalent diameters between 35.8 and 159.6  $\mu\text{m}$  and big aggregates larger than 20000  $\mu\text{m}^2$  of area, corresponding to equivalent diameters higher than 159.6  $\mu\text{m}$ . The number and the average length of the free filaments were also measured for each sample.

Scanning Electron Microscopy (SEM) allowed the observation of the bacterial morphology during the process of granulation. Organisms similar to the genera *Methanosaeta* and *Methanococcus* were observed. The disaggregated granules were also observed by SEM.

The application of FISH techniques for the identification of groups of microorganisms in the granular sludge allowed only a qualitative information. Preliminary results were obtained by using only two genetic probes (ARC915 for archaeobacteria and EUB338 for bacteria).

The last technique used was based on histological techniques and the aim was to localize long chain fatty acids adsorbed onto anaerobic granular sludge. Two dyes were used: sudan black and red oil and by the preliminary obtained results, the oil red was better for that purpose.

# Índice

Agradecimentos .....	i
Sumário.....	ii
Abstract.....	iii
Índice.....	iv
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras .....	vii
Lista de Símbolos .....	xi
1. Introdução.....	1
1.1 ENQUADRAMENTO GERAL.....	2
1.2 O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA.....	3
1.2.1 <i>Hidrólise</i> .....	4
1.2.2 <i>Acidogénese ou Fermentação</i> .....	5
1.2.3 <i>Acetogénese</i> .....	5
1.2.4 <i>Metanogénese</i> .....	5
1.3 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DO PROCESSO ANAERÓBIO AO TRATAMENTO DE EFLUENTES.....	6
1.4 GRANULAÇÃO E DESGRANULAÇÃO DE BIOMASSA ANAERÓBIA.....	8
2. Aplicação de análise de imagem e de microscopia electrónica de varrimento durante processos de granulação e de desgranulação .....	12
2.1 INTRODUÇÃO.....	13
2.1.1 <i>Análise quantitativa de Imagem</i> .....	13
2.1.2 <i>Microscopia</i> .....	14
2.1.3 <i>Epi-fluorescência</i> .....	15
2.2 OBJECTIVO.....	16
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
2.3.1 <i>Proveniência das amostras</i> .....	17
2.3.2 <i>Recolha das amostras</i> .....	19
2.3.3 <i>Aquisição das imagens</i> .....	20
2.3.4 <i>Sólidos suspensos voláteis</i> .....	27
2.3.5 <i>Microscopia electrónica</i> .....	27
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
2.4.1 <i>Análise quantitativa de imagem</i> .....	29

2.4.2	<i>Resultados da microscopia electrónica</i> .....	45
2.5	CONCLUSÃO.....	60
3.	Hibridização com Sondas Genéticas.....	61
3.1	INTRODUÇÃO.....	62
3.1.1	<i>Tecnologia FISH</i> .....	62
3.1.2	<i>Fish aplicado à estrutura biológica granular</i> .....	66
3.2	OBJECTIVO.....	68
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
3.3.1	<i>Proveniência das amostras</i> .....	69
3.3.2	<i>Preparação de soluções e material</i> .....	69
3.3.3	<i>Sondas utilizadas</i> .....	70
3.3.4	<i>Ensaio</i> .....	70
3.3.5	<i>Observação microscópica</i> .....	73
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
3.4.1	<i>Ensaio I e II</i> .....	74
3.4.2	<i>Ensaio III</i> .....	74
3.4.3	<i>Ensaio V</i> .....	76
3.5	CONCLUSÃO.....	78
4.	Coloração de lípidos.....	79
4.1	INTRODUÇÃO.....	80
4.2	OBJECTIVOS.....	83
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
4.3.1	<i>Proveniência das amostras analisadas</i> .....	84
4.3.2	<i>Preparação de amostras para a coloração I</i> .....	85
4.3.3	<i>Preparação de amostras para a coloração II:</i> .....	87
4.3.4	<i>Preparação de amostras para a coloração III</i> .....	87
4.3.5	<i>Observação microscópica</i> .....	88
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
4.4.1	<i>Coloração I</i> .....	89
4.4.2	<i>Coloração II</i> .....	90
4.4.3	<i>Coloração III:</i> .....	92
4.5	CONCLUSÃO.....	94
5.	Conclusões.....	95
6.	Referências Bibliográficas.....	97

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 2-1 Resultados dos SSV (g/L) com as diluições do reactor para o estudo I.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 2-2 Resultados dos SSV (g/L) com as diluições do reactor para o estudo II.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 2-3 Resultados dos SSV (g/L) com as diluições do reactor para o estudo III.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 2-4 Resultados dos SSV (g/L) para o ensaio I e as respectivas diluições utilizadas.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 2-5 Resultados dos SSV (g/L) para o ensaio II e as respectivas diluições utilizadas.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 2-6 Resultados dos SSV (g/L) para o ensaio III e as respectivas diluições utilizadas.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 2-7 Resumo dos resultados obtidos, para os três ensaios em área média das diferentes fracções .....</i>	<i>44</i>

# Lista de Figuras

<i>Figura 1.1 Esquema do processo de digestão anaeróbia (adaptado de GUJER E ZEHNDER, 1983). Os valores expressos em %, indicam fluxo de substrato na forma de CQO ou equivalente em metano. ....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 1.2 Aplicação da tecnologia anaeróbia ao tratamento de efluentes industriais. Distribuição por tipo de digestor. (adaptado de HULSHOFF POL et al., 1997). ....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 1.3 Esquema simplificado do reactor UASB .....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2.1 Aspecto geral do reactor EGSB utilizado no estudo de desgranulação .....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2.2 Aspecto geral do reactor UASB utilizado no estudo de granulação .....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2.3 Esquema representativo de como se podem apresentar os filamentos livres .....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2.4 Sistema de aquisição de imagem dos filamentos .....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2.5 Imagens resultantes do programa Matlab 6.1 para os filamentos: (a) aquisição da imagem, (b) eliminação da iluminação, (c) aplicação do filtro “Bottom-Hat”,(d) binarização, (e) identificação dos filamentos. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2.6 Organigrama do programa MATLAB 6.1 para os filamentos .....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 2.7 Sistema de aquisição de imagem dos flocos e macroflocos.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2.8 Imagens resultantes do programa Matlab 6.1 para os flocos: (a) aquisição da imagem, (b) eliminação da iluminação, (c) aplicação do filtro “Wiener”,(d) binarização, (e) imagem final após preenchimento .....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2.9 Organigrama do programa MATLAB 6.1 para os flocos residuais e pequenos .....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 2.10 Imagens resultantes do programa Matlab 6.1 para os macroflocos: (a) aquisição da imagem, (b) eliminação da iluminação, (c) aplicação do filtro “Wiener”,(d) binarização, (e) imagem final após preenchimento .....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.11 Organigrama do Matlab 6.1 para os flocos médios e grandes .....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2.12 Imagem do suporte no qual a amostra é revestida a ouro.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 2.13 Resultados da percentagem de reconhecimento para os flocos para o estudo I.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2.14 Resultados obtidos com as diluições para a área total e para a área média dos flocos (a) e com o número de flocos (b) para o estudo I.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2.15 Resultado obtidos na diluição para filamentos contabilizando o comprimento total e o comprimento médio (a) e em número de filamentos (b) para o estudo I.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 2.16 Efeito de desagregação na contabilização dos filamentos e flocos.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 2.17 Resultados da percentagem de reconhecimento para os flocos para o estudo II.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 2.18 Resultados obtidos com as diluições para a área total e para a área média dos flocos (a) e com o número de flocos (b) para o estudo II.....</i>	<i>32</i>

Figura 2.19 Resultado obtidos na diluição para filamentos contabilizando o comprimento total e o comprimento médio (a) e em número de filamentos (b) para o estudo II.....	33
Figura 2.20 Resultados da percentagem de reconhecimento para os flocos para o estudo III.....	34
Figura 2.21 Resultados obtidos com as diluições para a área total e para a área média dos flocos (a) e com o número de flocos (b) para o estudo III. ....	34
Figura 2.22 Resultado obtidos na diluição para filamentos contabilizando o comprimento total e o comprimento médio (a) e em número de filamentos (b) para o estudo III.....	35
Figura 2.23 Variação ao longo do processo da % de partículas finas em termos de área, em termos de sólidos e em termos de número (a). Correlação obtida entre a % de finos determinados por análise de imagem em termos de área e a percentagem de finos obtida pela razão de sólidos voláteis (b).....	36
Figura 2.24 Evolução da área média dos flocos pequenos (a), dos flocos intermédios (b), dos flocos grandes (c) e da área média de todos (d) ao longo do tempo para o ensaio I .....	38
Figura 2.25 Evolução das percentagens das diferentes fracções de flocos no reactor (a) e na purga (b) para o ensaio I .....	38
Figura 2.26 Evolução do comprimento médio (a) e do número total (b) para os filamentos no ensaio I .....	39
Figura 2.27 Evolução da área média dos flocos pequenos (a) dos flocos intermédios (b), dos flocos grandes (c) e da área média de todos (d) ao longo do tempo para o ensaio II ....	40
Figura 2.28 Evolução das percentagens das diferentes fracções de flocos no reactor (a) e no T de amostragem (b) para o ensaio II .....	41
Figura 2.29 Evolução do comprimento médio (a) e do número total (b) para os filamentos no ensaio II .....	41
Figura 2.30 Evolução da área média dos flocos pequenos (a) dos flocos intermédios (b), dos flocos grandes (c) e da área média de todos (d) ao longo do tempo para o ensaio III ...	42
Figura 2.31 Evolução das percentagens das diferentes fracções de flocos no reactor (a) e no T de amostragem (b) para o ensaio III .....	43
Figura 2.32 Evolução do comprimento médio (a) e do número total (b) para os filamentos no ensaio II .....	43
Figura 2.33 Evolução do comprimento total de filamentos/área total de flocos ao longo dos 3 ensaios de granulação .....	44
Figura 2.34 Resultados obtidos no microscópio electrónico, para o RI. inoculo (a, b,) biomassa do fundo do reactor (c, d, e) do topo do reactor (f, g, h, i, j).....	46
Figura 2.35 Análise qualitativa do agregado presente na Figura 2.34 (c) .....	47
Figura 2.36 Resultados obtidos no microscópio electrónico para o Reactor UASB (1.º ensaio). inoculo (a, b, c) biomassa final do reactor (d,e,f.) .....	48
Figura 2.37 Análise qualitativa do objecto de natureza não biológica presente na Figura 2.36 (c). 48	
Figura 2.38 Resultados obtidos no microscópio electrónico para o inoculo do Reactor UASB (2.º ensaio). biomassa final do 1.º ensaio (a, b, c,d,e) biomassa final do reactor (g,h) .....	50
Figura 2.39 Análise qualitativa do objecto de natureza não biológica presente na Figura 2.38 (h). 51	

<i>Figura 2.40 Resultados obtidos no microscópio electrónico para a amostra ao fim de 2 meses, aspecto geral (a,b,c,d,f,g), (e) aspecto pormenorizado do (d), (h) aspecto pormenorizado do (g) .....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 2.41 Resultados obtidos no microscópio electrónico para a amostra ao fim de 4 meses definida como grande aglomerado. (a) aspecto geral, (b,e,g) aspecto pormenorizado do grande aglomerado, (c,d) aspecto pormenorizado do (b), (f) aspecto pormenorizado do (e), (h) aspecto pormenorizado do (g) .....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 2.42 Análise qualitativa do objecto da Figura 2.41 (d).....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 2.43 Resultados obtidos no microscópio electrónico para a amostra ao fim de 4 meses definida como não finos (a),(b, c) aspecto pormenorizado do (a), e(d, f,) definidos como finos, (e) aspecto pormenorizado do (d), (g) aspecto pormenorizado do (f) .....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 2.44 Imagem de autofluorescência a 420 nm (a, b) e a mesma imagem em campo normal (c, d) pertencentes a amostra do reactor UASB ao fim de 4 meses.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 2.45 Resultados obtidos no microscópio electrónico para o T de amostragem, ao fim de 4 meses, (a,b) aspecto geral da amostra,(c ) aspecto pormenorizado do (b), (d) aspecto pormenorizado de uma bactéria filamentosa.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 2.46 Resultados obtidos no microscópio electrónico para a amostra retirada do reactor ao fim de 6 meses, (a,d) aspecto geral da biomassa, (b,e) aspecto pormenorizado de (a,d), (c,f) aspecto pormenorizado de (b,e) .....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 2.47 Resultados obtidos por microscopia electrónica para os grânulos flutuantes do 6.º mês, (a,e) aspecto geral dos grânulos flutuantes, (b,f) aspecto pormenorizado do (a,e), (c,d,g,h) aspecto pormenorizado (b,f) .....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 3.1 Modelo esquemático da molécula 16S rRNA (SSU).....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 3.2 Esquema sintetizado do processo de hibridização “in situ” de uma célula.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 3.3 Árvore filogenética universal baseada na análise da molecular 16S rRNA.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 3.4 Resultados obtidos no ensaio III, do DAPI( a- reactor , d- grânulos flutuantes), da sonda Eub338 (b- reactor e- grânulos flutuantes) e da sonda Arc915 (c- reactor f- grânulos flutuantes).....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 3.5 Resultados obtidos para o ensaio IV, do DAPI( a- reactor , d- grânulos flutuantes), da sonda Eub338 (b- reactor e- grânulos flutuantes) e da sonda Arc915 (c- reactor f- grânulos flutuantes).....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 3.6 Resultados obtidos para o ensaio V, do DAPI( a- reactor , d- grânulos flutuantes), da sonda Eub318 (b- reactor e- grânulos flutuantes) e da sonda Arc915 (c- reactor f- grânulos flutuantes).....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 4.1 – Resultados obtidos nos testes em reactor fechado para as amostras recolhidas no fundo ( ▲ ) e no topo do reactor ( ● ) (a) dia 162. (b) dia 219. ....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 4.2 Cesto utilizado para a transferência da biomassa entre as soluções de trabalho.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 4.3 Imagem do molde (a) e das cassetes (b) utilizadas neste ensaio.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4.4 Microtomo (a), Solução alcoólica (b) e banho termostaticado (c).....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4.5 – Resultados obtidos nos ensaios de coloração I. Amostras (a, b, c, d) e controlos (e, f).</i>	

.....	90
<i>Figura 4.6 Resultados obtidos nos ensaios de coloração II. Coradas com negro de Sudão (a – amostra, b e c – controlo). Coradas com óleo vermelho (d, e – amostras e f – controlo).</i>	
.....	91
<i>Figura 4.7 Resultados obtidos nos ensaios de coloração III. Coradas com negro de Sudão (a – amostra dia 162, b – amostra 219 e c– controlo). Coradas com óleo vermelho (d, e – amostra dia 162, f – amostra dia 219 e g – controlo).....</i>	93

## Lista de Símbolos

% Rec- Percentagem de reconhecimento  
 $\Delta G$ - Variação de energia livre  
AGCL- Ácidos gordos de cadeia longa  
Área M- Área média  
Área T- Área total  
Comp M- Comprimento médio  
CQO- Carência química de oxigénio  
DNA- Ácidos desoxirribonucleicos  
EDS- Energy Dispersion Spectrography  
EGSB- Digestor anaeróbio de manto de lamas de leite expandido  
EPS- Polímeros extracelulares  
ETAR- Estação de tratamento de águas residuais  
F420- Coenzima presente nas baterias metanogénicas  
Fish- Hibridização “in situ” de fluorescência  
Hb- Reactores híbridos  
IC- Reactores de circulação interna  
Ks- Constante cinética  
L fixo- Reactores leite fixo  
L fluid- Reactores leite fluidizado  
LSU- Large subunit of the ribosome  
NADH- Nicotinamida–Adenina-Dinucleotídeo  
Num T- Número total  
OHPA- Obligate hydrogen producing acetogens  
PC- Processo de contacto  
PTN- Pressão e temperatura normais  
RNA- Ácidos ribonucleicos  
rRNA -RNA ribossomal  
S- Unidade de Svedberg  
SEM- Scanning Electron Microscopy  
SSU- Small subunit of the ribosome  
SSV- Sólidos suspensos voláteis  
TRH- Tempo de retenção hidráulico  
UASB- Digestor anaeróbio de manto de lamas de fluxo ascendente



# 1. Introdução

---

## Sumário

Após o enquadramento geral do tema da tese, é descrito sumariamente o processo de degradação anaeróbia, identificando as 4 etapas principais de degradação: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese. São apresentadas aplicações tecnológicas do processo ao tratamento de efluentes líquidos, realçando as vantagens dos reactores de manto de lamas. São revistos os principais trabalhos relativos a estudos de granulação de biomassa anaeróbia.

1.1 Enquadramento geral	2
1.2 O processo de degradação anaeróbia	3
1.3 Aplicações tecnológicas do processo anaeróbio ao tratamento de efluentes	6
1.4 Granulação e desgranulação de biomassa anaeróbia	8

## 1.1 Enquadramento geral

Os processos de tratamento de efluentes por via anaeróbia apresentam vantagens significativas relativamente aos processos convencionais aeróbios. Entre estas vantagens salientam-se a menor produção de biomassa devido aos menores rendimentos biomassa/substrato da biomassa anaeróbia, a menor necessidade em nutrientes, a capacidade de adaptação a compostos tóxicos, a capacidade da biomassa preservar a sua actividade após longos períodos sem alimentação e a obtenção de um produto com conteúdo energético (metano). Nos processos aeróbios além de não se obter nenhum produto com valor, há um consumo energético para fornecimento do oxigénio necessário ao processo. Por cada 100 kg de matéria orgânica (em termos de Carência Química de Oxigénio – CQO) degradados consomem-se 100 kWh por via aeróbia e produzem-se 285 kWh por via anaeróbia.

Os processos anaeróbios também têm desvantagens, sendo a mais importante relacionada com a afinidade dos microrganismos para o substrato que é, em geral inferior à dos microrganismos aeróbios. Isto pode limitar a aplicação do processo como único passo, devido à menor qualidade do efluente final atingida, quando comparada com a do processo aeróbio. Actualmente é reconhecida a importância da combinação entre processos anaeróbios e processos aeróbios como meio mais eficaz e sustentável de tratamento de efluentes industriais e mesmo domésticos.

No final da década 70 foram descritos pela primeira vez os agregados granulares de biomassa anaeróbia que conduziram, nos anos subsequentes, a enormes desenvolvimentos da tecnologia anaeróbia de tratamento de efluentes. Foram desenhados novos reactores em que a imobilização da biomassa é conseguida apenas pelas características de densidade e tamanho dos agregados (LETTINGA ET AL., 1980) e continuam a aperfeiçoar-se os desenhos de reactores (HABETS ET AL., 1997).

Este potencial de desenvolvimento tecnológico tornou imperativo o estudo dos fundamentos da microbiologia, ecologia e fisiologia dos microrganismos envolvidos, bem como dos fenómenos em que se baseia o processo de granulação. A organização do consórcio microbiano anaeróbio em agregados com uma estrutura interna bem definida confere potencialidades à biomassa anaeróbia que não foram nunca evidenciadas em biomassa dispersa. Por exemplo, o facto das bactérias metanogénicas acetoclásticas, as mais sensíveis do processo, se localizarem essencialmente no centro dos grânulos, protege-as de efeitos tóxicos, da acção de possíveis predadores, e permite criar um microambiente óptimo ao seu desenvolvimento. Por outro lado, a organização granular também favorece as trocas de metabolitos (por exemplo hidrogénio) entre parceiros de associações sintróficas, estimulando a sua actividade quando comparada com a actividade de células em suspensão (ALVES ET AL., 1999). O estudo da comunidade microbiana em consórcios anaeróbios desenvolvidos em reactores de tratamento de efluentes deve ser feito em condições ambientais relevantes ou seja sem destruir a organização ou estrutura do consórcio.

A aplicação do processo de degradação anaeróbia a efluentes industriais pouco concentrados em matéria orgânica e com compostos recalcitrantes ou potencialmente inibitórios para os grupos bacterianos envolvidos no processo, durante muitos anos considerada não exequível, é actualmente um dos centros de interesse da investigação em digestão anaeróbia (COLLERAN ET AL., 1995, VERSTRAETE E VANDEVIVERE, 1997). A possibilidade de “construir” consórcios específicos para degradar determinados compostos tóxicos de modo a acelerar o natural processo de adaptação tem sido considerada como um dos desafios para um futuro próximo da investigação neste campo (VERSTRAETE E VANDEVIVERE, 1997). A co-inoculação de culturas puras capazes de degradar determinados compostos pode ser eficientemente utilizada para esse efeito (AHRING ET AL., 1992). Nesses estudos o uso de técnicas moleculares de hibridização com sondas genéticas permite localizar e quantificar as culturas alvo. Além disso, todos os aspectos relacionados com a formação e deterioração granulares são, actualmente alvo de interesse científico (ALPHENAAR, 1994, FANG, 1997).

### 1.2 O processo de degradação anaeróbia

A degradação anaeróbia da matéria orgânica a metano e dióxido de carbono, envolve uma cadeia sequencial de percursos metabólicos e requer a acção combinada e coordenada de diferentes grupos tróficos de bactérias anaeróbias, onde se podem identificar os seguintes processos principais:

1. Hidrólise de biopolímeros (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) a aminoácidos, açúcares e ácidos gordos de cadeia longa, respectivamente;
2. Fermentação de aminoácidos e açúcares;
3. Oxidação anaeróbia dos ácidos gordos de cadeia longa;
4. Oxidação anaeróbia dos produtos intermediários (ácidos voláteis, com excepção do acetato) a acetato e Hidrogénio;
5. Homoacetogénese
6. Conversão de acetato a metano pelas bactérias acetoclásticas;
7. Conversão do hidrogénio a metano pelas bactérias hidrogenotróficas.

De um modo simplificado estas etapas podem agrupar-se em 4 sequências de degradação principais, assinaladas na Figura 1.1 (hidrólise, acidogénese/fermentação, acetogénese e metanogénese), e que se descrevem seguidamente.

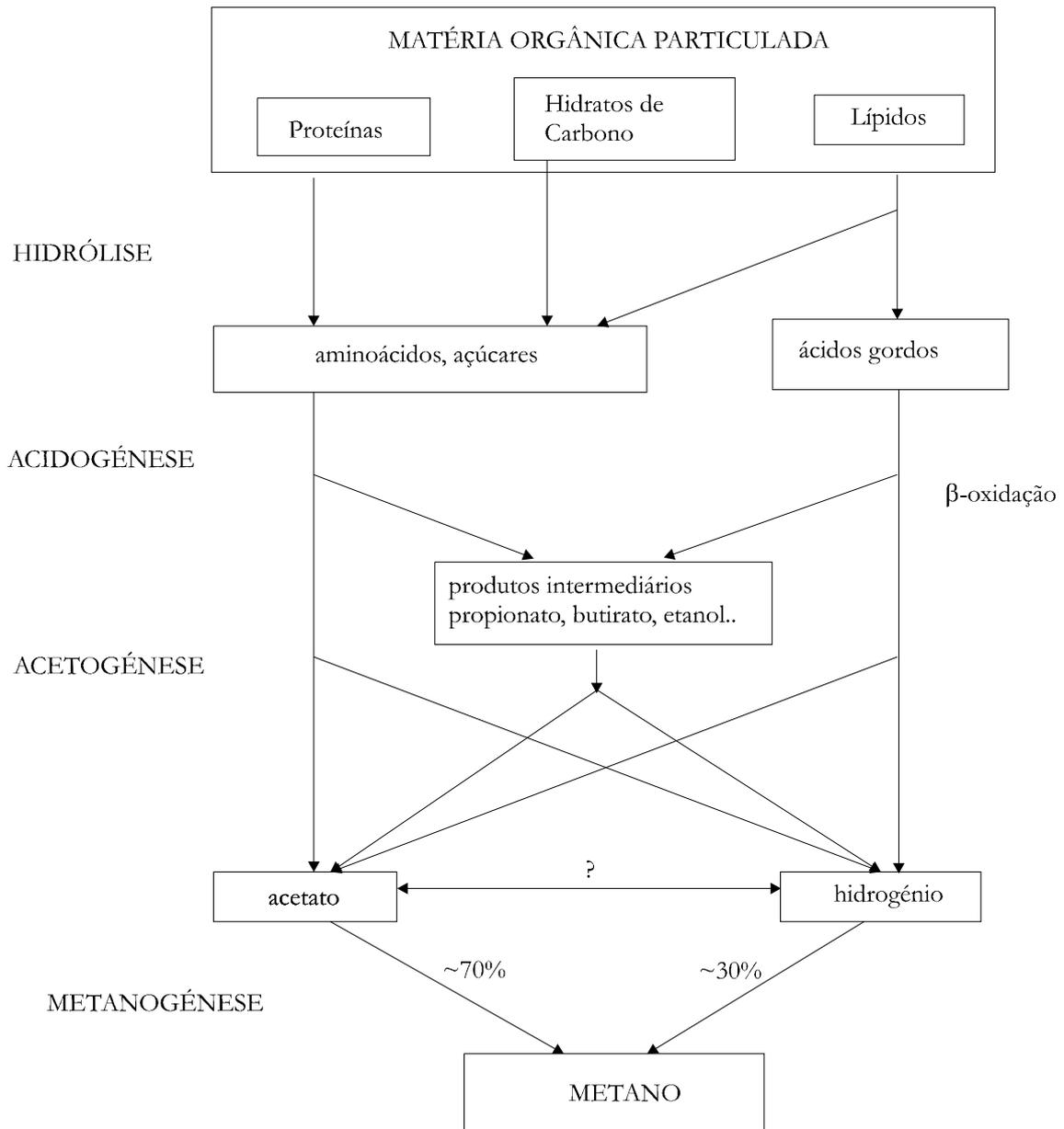


Figura 1.1 Esquema do processo de digestão anaeróbia (adaptado de GUJER E ZEHNDER, 1983). Os valores expressos em %, indicam fluxo de substrato na forma de CQO ou equivalente em metano.

### 1.2.1 Hidrólise

O primeiro passo da degradação anaeróbia consiste na hidrólise ou liquefação dos biopolímeros por meio de enzimas extracelulares. É normalmente um processo lento, sendo a velocidade da hidrólise afectada por um grande número de factores, entre os quais a superfície específica e o tipo de substrato (EASTMAN E FERGUSON, 1981). No caso de substratos complexos (por exemplo na digestão anaeróbia de resíduos sólidos), esta etapa pode limitar a velocidade global do processo de degradação (PARKIN E OWEN, 1986).

### 1.2.2 Acidogénese ou Fermentação

Tal como indicado no esquema da Figura 1.1, os substratos utilizados no processo fermentativo, são os monómeros resultantes da hidrólise que, após serem transportados através da membrana celular para o interior da célula, são transformados numa variedade de produtos entre os quais acetato, propionato e butirato.

No geral, a população fermentativa representa cerca de 90% da população bacteriana total dos digestores anaeróbios (ZEIKUS, 1980). O número e a diversidade das espécies bacterianas fermentativas envolvidas no processo dependem largamente da composição do substrato. As bactérias fermentativas têm tempos de duplicação curtos, e a fermentação nunca é limitante no processo global da degradação anaeróbia (GUJER E ZEHNDER, 1983).

### 1.2.3 Acetogénese

A etapa da acetogénese consiste na transformação dos produtos da fermentação em acetato, dióxido de carbono e hidrogénio por acção das chamadas bactérias sintróficas ou produtoras obrigatórias de hidrogénio (OHPA - *obligate hydrogen producing acetogens*). Em condições normais estas transformações são termodinamicamente desfavoráveis. Por exemplo, a degradação do propionato a acetato e H<sub>2</sub> é a reacção da acetogénese mais desfavorável pois apresenta um valor de  $\Delta G^\circ$  de 74 kJ (DOLFING, 1988). Neste caso, verifica-se que só se a pressão parcial de hidrogénio for 10<sup>-4</sup> atm ou menor, a oxidação do propionato se torna exergónica. Normalmente tal é assegurado pelas bactérias metanogénicas hidrogenotróficas ou, no caso de existir sulfato no meio, pelas bactérias sulfato-redutoras, por meio de um processo vulgarmente designado de “transferência de hidrogénio inter-espécies” (DOLFING, 1988).

Pensa-se que as associações sintróficas requerem também uma associação física dos dois tipos de bactérias envolvidas. GUJER E ZEHNDER (1983), determinaram a distância máxima possível entre os dois tipos de bactérias para que a transferência do hidrogénio entre as duas espécies possa ocorrer e SCHINK E THAUER (1988) referiram que, de facto, a cooperação entre os dois grupos tróficos é óptima quando a distância entre eles for mínima o que, segundo estes autores, pode justificar em parte o fenómeno da granulação.

### 1.2.4 Metanogénese

A metanogénese é a etapa final do processo, responsável directa pela produção de metano e constitui, em muitos casos, o passo controlante do processo. As bactérias metanogénicas pertencem ao domínio das arqueobactérias, são anaeróbias estritas e requerem para o seu desenvolvimento um potencial redox entre -250 e -300 mv. Possuem coenzimas e cofactores específicos (coenzima F<sub>420</sub>, F<sub>430</sub>, coenzima M, Metanopterina e Metanofurano (WOLFE, 1992)). E degradam apenas um número limitado de substratos com baixo número de carbonos: acetato, metanol, metilaminas, formato, e hidrogénio e dióxido de carbono. A maior parte do metano (70%) provém do acetato (JERIS E MCCARTY, 1965), sendo esta conversão particularmente importante. Além disso, as bactérias metanogénicas que degradam o acetato a metano representam o elo

mais fraco de toda a cadeia de degradação anaeróbia no que respeita à sua susceptibilidade a condições adversas tais como choques orgânicos, hidráulicos e presença de substâncias tóxicas.

Até à data apenas foram identificados dois géneros como sendo acetoclásticos: *Methanosaeta* (ex. *Methanothrix*) e *Methanosarcina*. Estes dois géneros de bactérias possuem morfologias muito distintas. *Methanosaeta* surge em filamentos podendo estes ser curtos e dispersos ou longos e agregados em feixes (KAMAGATA E MIKAMI, 1990) e a *Methanosarcina* cresce em agregados de cocos. Em termos cinéticos *Methanosaeta* apresenta maior afinidade para o acetato ( $K_s=0.46$  mM) do que *Methanosarcina* ( $K_s=3-5$  mM), mas cresce mais lentamente que *Methanosarcina* para elevadas concentrações de substrato (GUJER E ZENHDER, 1983). Por exemplo *Methanosarcina barkeri* e *Methanosarcina mazei* têm tempos de duplicação de aproximadamente 24 horas enquanto que a filamentosa *Methanosaeta* tem tempos de duplicação de 3.5 a 9 dias (HUSER ET AL., 1982).

De entre os géneros de bactérias metanogénicas conhecidos, *Methanosarcina* é o mais versátil metabolicamente podendo utilizar  $H_2/CO_2$ , metanol, metilaminas, e acetato, enquanto que o género *Methanosaeta* é exclusivamente acetotrófico (HUSER ET AL., 1982).

### 1.3 Aplicações tecnológicas do processo anaeróbio ao tratamento de efluentes

Os grânulos anaeróbios foram observados pela primeira vez, na década de 70, em reactores UASB, a temperaturas mesófilicas, alimentados com efluentes provenientes de uma fábrica de açúcares. Embora já houvesse referências anteriores ao aparecimento de agregados de biomassa anaeróbia em reactores do tipo filtro anaeróbio (YOUNG E MCCARTY, 1967), foi só nessa altura que o grupo liderado por Gatzke Lettinga da Universidade de Wageningen verificou que essas estruturas eram potencialmente interessantes do ponto de vista tecnológico e desde então esse grupo foi muito eficiente no desenvolvimento e implantação da tecnologia dos reactores de manto de lamas (UASB – acrónimo de “upflow anaerobic sludge blanket”) ao tratamento de efluentes líquidos. Uma das maiores vantagens dos reactores UASB é a ausência de material de suporte. A imobilização da biomassa é conseguida apenas devido às excelentes qualidades de sedimentação dos agregados. No entanto, a manutenção da estrutura granular é um factor importante e sabe-se que em determinadas condições pode haver deterioração dos agregados, pondo em causa a estabilidade do reactor e podendo mesmo conduzir à lavagem das células (“washout”). De qualquer modo, o reactor UASB é o mais popular de todos os reactores anaeróbios para tratamento de efluentes industriais, existindo mais de 1200 unidades em todo o mundo. Na Figura 1.2 está representada uma distribuição das aplicações de diferentes tecnologias ao tratamento de efluentes industriais, onde se evidencia a dominância dos reactores de manto de lamas UASB.

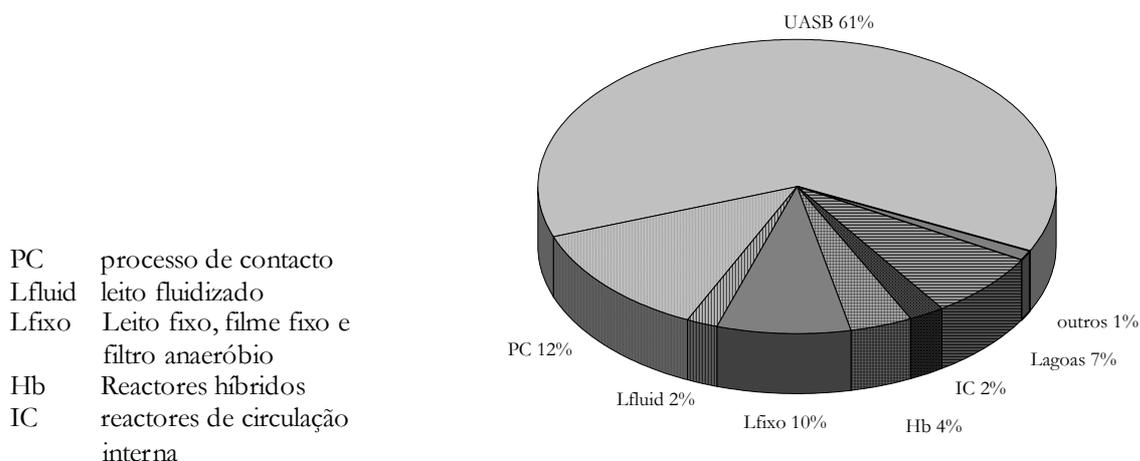


Figura 1.2 Aplicação da tecnologia anaeróbia ao tratamento de efluentes industriais. Distribuição por tipo de digestor. (adaptado de HULSHOFF POL ET AL., 1997)

No reactor UASB existem duas zonas distintas: uma zona inferior designada por leito de lamas, que tem uma concentração elevada de biomassa constituída em grânulos com elevada velocidade de sedimentação e a zona superior onde predominam flocos de pequeno tamanho e em que a concentração de biomassa é muito menor. O gás produzido e alguma biomassa flutuante que existe na secção superior são separados da corrente líquida de saída por meio de um separador gás-sólido-líquido colocado no topo do digestor (Figura 1.3).

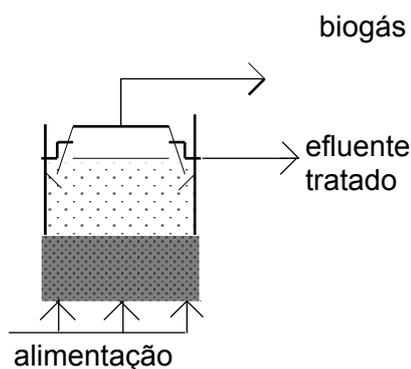


Figura 1.3 Esquema simplificado do reactor UASB

Têm sido desenvolvidos alguns desenhos de reactores baseados no UASB: o reactor de manto de lamas de leito expandido (EGSB - "expanded granular sludge bed"), que consiste num UASB com leito expandido por meio da recirculação do efluente, o reactor de recirculação interna (IC - "Internal Circulation"), que consiste em dois ou mais compartimentos do tipo UASB uns sobre os outros e em que o líquido e a biomassa recirculam internamente (HABETS ET AL., 1997), o reactor com vários andares (VAN LIER ET AL., 1994, GUIOT ET AL., 1995) e o reactor horizontal segmentado com anteparos (GROBICKI E STUCKEY, 1991). Em todos estes sistemas, embora não estritamente

necessária, é suposta a utilização de biomassa estruturada em grânulos.

## 1.4 Granulação e desgranulação de biomassa anaeróbia

A granulação, por definição, é o processo pelo qual a biomassa dispersa se aglutina para formar grânulos bem definidos. É um processo complexo que envolve diferentes grupos tróficos de bactérias assim como as suas interações físico-químicas e microbianas. Alguns autores, afirmam que os diferentes grupos tróficos estão distribuídos aleatoriamente nos grânulos (SCHMIDT E AHRING, 1996), e outros autores, mencionam uma estrutura mais organizada (GUIOT ET AL 1992). Estas opiniões diversas terão certamente a ver com os diferentes tipos de substratos em que grânulos foram formados.

Em substratos mais complexos a estrutura por camadas é mais consensual. A superfície é essencialmente composta por bactérias fermentativas e por bactérias metanogénicas hidrogenotróficas. As metanogénicas acetoclasticas e as bactérias acetogénicas produtoras de H<sub>2</sub> ocupam as camadas interiores (SCHMIDT E AHRING, 1996).

A fase de arranque dos reactores do tipo UASB pode tornar-se um passo crítico, uma vez que não estão bem estudados os processos básicos da granulação, conhecendo-se apenas alguns factores que a estimulam (WEILAND E ROZZI, 1991, LETTINGA, 1995). Para iniciar a operação, pode-se inocular biomassa granular desde que disponível. No entanto, esta opção pode diminuir a estabilidade dos grânulos, resultando por vezes na sua desintegração ou flutuação, devido a alteração das condições ambientais (KOSARIC E BLASZCSYK, 1990). Pensa-se que, quando se acrescenta uma pequena quantidade de grânulos a um inoculo disperso, é possível acelerar o processo de granulação (HICKEY ET AL, 1991). Em regiões em que não há facilidade de dispor de inoculo granular (como por exemplo em Portugal), a instalação de uma unidade deste tipo requer um investimento inicial que comporta a compra e transporte desse inoculo, o que pode ser significativo. Torna-se assim importante continuar a investigar o fenómeno da granulação.

Por outro lado, a ocorrência de deterioração granular nem sempre é previsível nem controlável, sendo um aspecto que tem merecido alguma atenção por parte dos investigadores nos últimos anos (FANG ET AL., 1994, ALPHENAAR, 1994). A biomassa granular pode ser obtida a partir de biomassa dispersa com uma variedade de efluentes industriais. No entanto, HULSHOFF POL ET AL. (1983) referem que, para altas concentrações de ião amónio (> 1000 mg/L), não ocorreu granulação. HICKEY ET AL. (1991) citando COHEN (comunicação pessoal, 1989) referem que, para um efluente constituído por soro de queijo não ocorreu granulação, mas, uma vez inoculados, os grânulos podiam ser mantidos nesse tipo de substrato. Os efluentes contendo lípidos são particularmente problemáticos para a biomassa granular. Além dos problemas de toxicidade aguda dos ácidos gordos de cadeia longa (AGCL), resultantes da hidrólise dos lípidos, são referidos na literatura problemas de adsorção dos ácidos gordos na superfície dos grânulos, tornando-os leves, flutuantes e conduzindo ao "washout" (RINZEMA, 1988, HWU, 1997). De acordo

com HWU (1997) a concentração de ácidos gordos de cadeia longa que origina problemas de flutuação da biomassa é inferior aos limites de toxicidade destes compostos. Além do problema da flutuação, os AGCL actuam como detergentes, baixando a tensão superficial. Consequentemente, a agregação de bactérias hidrofóbicas, como são a maior parte das acetogénicas (consumidoras de AGCL) é desfavorável, aumentando a probabilidade de “washout” destas bactérias (DAFFONCHIO ET AL., 1995, HWU ET AL., 1997).

O conhecimento da estrutura granular e a sua evolução ao longo do tempo, é essencial para aprofundar o conhecimento do processo de granulação e entender a dinâmica das populações e a ecologia das bactérias constituintes dos grânulos. Embora, a natureza e comportamento dos microrganismos ainda não seja clara, têm sido publicadas algumas teorias sobre os factores que governam a formação de grânulos estáveis e com boas propriedades de sedimentação.

Segundo alguns autores a granulação inicia-se com a formação dum núcleo constituído essencialmente por *Methanosarcina* e por *Methanosaeta* (WU ET AL., 1996, HUSHOFF POL ET AL., 1983).

A *Methanosarcina* pode crescer em agregados, devido à excreção de polímeros extracelulares. Com o aumento do tamanho destes agregados, a excreção de polímeros extracelulares aumenta, construindo “cachos” maiores, até estes terem um diâmetro que impeça o arrastamento, para fora do reactor. A *Methanosaeta* tem como característica a capacidade de aderir a superfícies inertes, e, em condições de baixa concentração de acetato, pode competir com a *Methanosarcina*, e passar a predominar no núcleo (SCHMIDT E AHRING, 1996).

Segundo KOSARICK E BLASZCSYK (1990), é conhecido que a *Methanosarcina* pode formar agregados naturais, mas não se liga facilmente a superfícies estranhas. No entanto, a *Methanosaeta* parece ser a responsável pela ligação das bactérias a espécies inertes. Quando a carga orgânica aplicada ao reactor é aumentada progressivamente a *Methanosaeta* evolui para uma forma de bastonete, garantindo a formação dos agregados mais compactos.

Segundo de Zeeuw (1987), os agregados de *Methanosarcina* com o aumento da concentração de acetato são colonizados pela *Methanosaeta* nas cavidades centrais, ficando os agregados com a *Methanosaeta* no interior, e com a *Methanosarcina* no exterior. Subsequentemente quanto mais denso for o agregado desenvolvido pela *Methanosaeta*, a camada exterior da *Methanosarcina* tende a desaparecer. Através de um lento e gradual processo de selecção, os organismos que crescem dispersos são lavados para fora do reactor, enquanto os agregados de biomassa, que consistem, nesta fase, em organismos ligados uns aos outros ou ligados a partículas inertes que funcionam como suporte, são retidos no reactor.

HULSHOFF POL ET AL. (1987) referem que há uma selecção por pequenas diferenças de densidade entre as fracções dispersa e agregada da biomassa. Estes autores identificam nos reactores uma pressão de selecção que resulta da combinação entre a velocidade de carga hidráulica (ou taxa de diluição) e a carga superficial de gás. Referem igualmente o fenómeno de maturação (renovação de gerações de células) dos grânulos como factor importante durante o

processo e consideram que durante o crescimento dos grânulos se desprendem pequenos agregados que servem de núcleo para a formação de grânulos de 2ª e de 3ª geração. Segundo estes autores, a maturação é a única razão para o desaparecimento dos grânulos filamentosos que vão sendo substituídos por outras gerações de grânulos com características superiores de granulação. HULSHOFF POL ET AL. (1987), sugere que nas fases iniciais da formação dos agregados, se deve seleccionar a bactéria filamentosa *Methanosaeta* em vez da *Methanosarcina*, utilizando baixas concentrações de substrato. Deste modo conseguem-se obter grânulos maiores e mais densos, diminuindo a probabilidade de washout.

Segundo JIANG E SHI (1993), a chave para a granulação é conseguir manter condições adequadas para a *Methanosarcina* possa excretar polímeros extracelulares para que a *Methanosaeta* se possa agarrar ou inserir nos “cachos” da *Methanosarcina*.

WIEGANT em 1987, apresentou uma teoria para a granulação que intitulou “teoria esparguete”. Segundo este autor, as bactérias filamentosas do género *Methanosaeta*, devido às suas propriedades e morfologia, têm o poder de se entrelaçar nos aglomerados que podem ou não conter partículas inertes, formando os aglomerados iniciais. A *Methanosaeta* evolui para bastonetes, assegurando a formação de grânulos compactos e densos.

Segundo DOLFING (1987), no decorrer do processo de granulação é possível distinguir três tipos de aglomerados: O primeiro denominado por flocos, são aglomerados, com uma estrutura pouco definida. Depois de sedimentarem formam macroscopicamente uma única camada. O segundo tipo denominado por “pellets”, são aglomerados com uma estrutura mais densa do que os flocos e depois de sedimentarem estes aglomerados são visíveis como entidades separadas. A biomassa deste tipo, é composta por aglomerados que consistem na sua maioria em microrganismos filamentosos que estão fortemente ligados, formando estruturas tipo esparguete, são sensivelmente esféricos podem ter até 1 mm de diâmetro. O último tipo denominado por grânulos são “pellets” mais densos, tem uma aparência granular, as suas formas não se alteram na presença da água, podendo suportar alguma pressão sem alterar a sua integridade. Os grânulos metanogénicos, deste tipo, consistem maioritariamente de bactérias tipo cocos ou bastonete, compostos por uma só célula ou em cadeias pequenas. Estes agregados são esféricos e podem ter até 5 mm de diâmetro.

Os polímeros extracelulares, vulgarmente designados por EPS, são constituídos por polímeros de sacarídeos, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, que podem ter funções diferentes, dependendo dos microrganismos. Alguns autores, usando observações microscópicas, verificaram que as bactérias presentes nos grânulos estão recobertas por EPS. É geralmente aceite que estes polímeros têm um papel significativo no processo de granulação, porque a produção destas substâncias pode mudar a carga das bactérias que normalmente se repelem por terem carga negativa, podendo resultar na atracção entre bactérias, favorecendo o processo de agregação (SCHMIDT E AHRING, 1996). GROTENHUIS ET AL. (1991A) localizaram e analisaram quantitativamente os polímeros extracelulares presentes em biomassa granular dum reactor do tipo UASB e discutiram o seu papel na estabilidade dos agregados.

Já foi demonstrado que alguns iões metálicos como o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Fe}^{2+}$ , melhoram o processo de granulação e a estabilidade dos grânulos (KOSARIC E BLASZCSYK, 1990, SCHMIDT E AHRING, 1996). Os precipitados de cálcio podem servir como material de suporte para a adesão bacteriana. YU ET AL. (2000) após terem realizado um estudo sobre a adição de ferro em seis reactores em paralelo, concluíram que quando se adiciona entre 300-400 mg/L de ião  $\text{Fe}^{2+}$ , o processo de granulação é acelerado. No entanto, a actividade específica destes grânulos diminui com o aumento da adição de  $\text{Fe}^{2+}$ , o que pode ser explicado pela precipitação do  $\text{Fe}^{2+}$  nas superfícies dos grânulos. Segundo estes autores (YU ET AL., 2001), a adição de uma baixa concentração de cálcio provavelmente melhora três passos da granulação, como a adsorção, adesão e multiplicação, mas não influencia a biodiversidade microbiana presente.

QUARMBY E FORSTER (1995) estudaram um factor ao qual denominaram factor do reactor. Para estes autores as características do reactor, assim como as condições de operação são tão importantes como as características biológicas dos próprios grânulos.

## 2. Aplicação de análise de imagem e de microscopia electrónica de varrimento durante processos de granulação e de desgranulação

---

### Sumário

É aplicada a análise quantitativa e qualitativa de imagem a agregados de biomassa anaeróbia durante um processo de desgranulação e durante um processo de granulação. A análise quantitativa de imagem foi realizada após captura das imagens obtidas em microscópio óptico ou lupa binocular, dependendo das fases do processo. A análise qualitativa da imagem foi realizada por observação de fotografias obtidas em microscópio electrónico de varrimento. Foram avaliados e estabelecidos procedimentos de aquisição de imagem, estudando-se o efeito da diluição das amostras na sua morfologia e tamanho. São analisadas as vantagens e as desvantagens da técnica no sentido da quantificação dos processos de granulação e desgranulação. Por observação das amostras em microscópio electrónico de varrimento, pôde identificar-se a presença de alguns géneros de bactérias morfológicamente bem descritos na literatura.

2.1 Introdução	13
2.2 Objectivo	16
2.3 Materiais e Métodos	17
2.4 Resultados e discussão	29
2.5 Conclusão	60

## 2.1 Introdução

A análise quantitativa e qualitativa de imagem permite obter informação importante durante as várias etapas dos processos de granulação e de desgranulação. Embora estes fenómenos estejam descritos na literatura sob diversos pontos de vista, os resultados baseiam-se essencialmente em observações qualitativas sendo poucos os estudos em que se quantificam os tamanhos e os aspectos relacionados com a morfologia dos agregados.

As amostras de biomassa estudadas, provenientes de processos de granulação e de desgranulação foram processadas num sistema de análise quantitativa de imagem, complementando-se a informação obtida com a visualização em microscópio de epifluorescência e em microscópio electrónico de varrimento. Estas duas técnicas encontram-se detalhadas seguidamente, apresentando-se exemplos de aplicação das mesmas.

### 2.1.1 Análise quantitativa de Imagem

Durante anos, os microbiologistas contavam ou mediam os seus espécimes visualmente. Recentemente a análise de imagem, tornou-se um acessório indispensável, tanto para quantificação, pois reduz a subjectividade do operador e permite uma automação, como para a identificação e diferenciação de diversas espécies presentes em amostras microbianas (AMARAL, 1998).

O decréscimo do custo do material informático tornou a análise de imagem um processo acessível, sendo neste momento uma ferramenta quase rotineira em muitos campos da ciência. O sistema de análise de imagem mais vulgar e mais económico é composto por um microscópio acoplado a uma câmara de vídeo, onde a imagem é adquirida por uma placa de aquisição de um computador. As imagens adquiridas são posteriormente implementadas num programa elaborado para o efeito. Desde os anos 70, têm sido comercializados instrumentos para análise de imagem, para a contagem automática de colónias de bactérias, sendo também possível analisar a estrutura e actividade dessas colónias. A maioria das imagens é adquirida em formato monocromático onde a diferença de tonalidades é explorada. No entanto, já estão disponíveis no mercado sistemas a cor, embora ainda bastante dispendiosos e tecnicamente mais exigentes.

O termo análise de imagem engloba, em geral, cinco passos (AMARAL ET AL., 1999): a aquisição das imagens, a aplicação dos filtros, a segmentação, a aplicação do programa e a obtenção dos parâmetros requeridos. Se as imagens forem mal adquiridas (desfocadas, não representativas, etc) todo o processo é posto em causa (DOUGHERTY, 1994, GLASBEY ET AL., 1994, JÄHNE, 1995 E RUSS, 1995). Através da placa de aquisição, a informação analógica das imagens é transformada em informação digital, onde cada pixel corresponde a um espaço da imagem. De seguida é realizada uma binarização, a imagem passa de 256 tons para 2 tons, preto e branco, sendo necessário estabelecer um limite de detecção de cor que distinga os objectos do fundo. O fundo

está agora a preto com um valor matemático de 0 e os objectos a branco com o valor matemático de 1. As imagens adquiridas podem conter pequenas partículas sem interesse para o estudo em causa que são retiradas com o auxílio de filtros desenhados para o efeito. Após a binarização de imagem e aplicação dos filtros, as imagens tratadas são analisadas num programa elaborado para o efeito e são calculados os parâmetros requeridos.

Para esta técnica ser fiável há que analisar uma grande quantidade de imagens, mas o uso da análise de imagem tem a vantagem de requerer pouca quantidade de amostra, não sendo por isso uma técnica que provoque perturbações no funcionamento do reactor (DUDLEY ET AL., 1993). A principal desvantagem é que a aquisição das imagens é um processo demasiado demorado. (AMARAL ET AL., 2001, PACKER E THOMAS, 1990).

A análise de imagem tem sido largamente utilizada para caracterizar morfológicamente fungos filamentosos. Com a microscopia convencional só era possível obter uma análise qualitativa, mas este problema foi ultrapassado com a utilização da análise de imagem sendo possível quantificar estes microrganismos (COX ET AL., 1998). Embora esta ferramenta seja largamente utilizada em vários campos, a sua aplicação à caracterização de agregados de biomassa anaeróbia não tem sido muito explorada.

Tal como referido anteriormente, as formas filamentosas têm um importante papel no processo de granulação. Por análise de imagem é potencialmente possível seguir a evolução das formas filamentosas livres (não completamente inseridas em agregados de biomassa), da fracção dispersa da biomassa, qualquer que seja a sua morfologia, e quantificar a sua predominância em relação às formas agregadas de biomassa. ALVES ET AL. (2000) obtiveram correlações lineares entre a actividade metanogénica acetoclástica e o número de bactérias filamentosas livres durante uma experiência de aplicação de um choque hidráulico a um reactor alimentado com ácido oleico.

### **2.1.2 Microscopia**

O microscópio electrónico permite o estudo minucioso e pormenorizado da estrutura da célula, devido ao seu enorme poder de resolução, bastante superior ao microscópio óptico. Este facto deve-se sobretudo à utilização de feixes de electrões que tem um comprimento de onda de 0.005 nm, em vez da utilização de feixes de luz visível, pois esta ronda os 550 nm. O baixo comprimento de onda da radiação electrónica permite limites de resolução muito baixos e consequentemente, ampliações muito superiores. No microscópio electrónico de varrimento, obtém-se uma imagem tridimensional das superfícies que se pretendem observar, permitindo a visualização da organização espacial da morfologia bacteriana.

As imagens são obtidas a partir de electrões, que são produzidos por aquecimento em vácuo, de um filamento, sendo acelerados devido a uma diferença de potencial. Os electrões, ao chocar na superfície da estrutura são reflectidos, e posteriormente são captados por um tubo foto multiplicador, gerando um sinal eléctrico dando origem à imagem num ecrã (<http://business.fortunecity.com>).

A microscopia electrónica de varrimento, conhecida vulgarmente por SEM, do inglês, Scanning Electron Microscopy, é largamente utilizada no estudo de biofilmes e de biomassa granular, permitindo obter informação sobre a morfologia microbiana das superfícies destes ecossistemas. No entanto, a maior desvantagem desta técnica, reside no facto de se basear na identificação visual, não sendo por isso, por si só, uma técnica de identificação microbiana.

HEPPNER ET AL. (1992) usou a microscopia SEM, para estudar o crescimento de uma cultura de degradação de propionato num reactor anaeróbio de leite fluidizado. WU ET AL. (1996) usaram as observações obtidas por SEM, para postular o mecanismo da formação de camadas em grânulos anaeróbios, enquanto FANG ET AL. (1994) também explorou as estruturas por camadas de grânulos de vários reactores, com a mesma tecnologia. MACLEOD ET AL. (1990) examinaram grânulos provenientes de reactores alimentados com sacarose por microscopia de SEM. Estes são só alguns exemplos dos vários estudos, possíveis de enumerar que utilizaram esta tecnologia.

### **2.1.3 Epi-fluorescência**

A propriedade das bactérias metanogénicas serem autofluorescentes devido à presença do coenzima  $F_{420}$  torna-as facilmente visíveis em microscopia de epi-fluorescência, desde que se utilizem os filtros adequados. A coenzima  $F_{420}$  é uma deazaflavina que participa em duas reacções de transferência de electrões. Na metanogénese funciona de uma maneira análoga ao NADH e tem uma absorção máxima a 420 nm, daí a sua referência como  $F_{420}$ . Esta propriedade permite visualizar as bactérias metanogénicas, mas não permite uma diferenciação entre as diferentes espécies deste grupo, nem permite quantificar a actividade metanogénica. Tentativas de correlacionar a actividade metanogénica com a intensidade de fluorescência em amostras de microrganismos anaeróbios têm falhado uma vez que os níveis de  $F_{420}$  são muito variáveis de espécie para espécie e por exemplo a *Methanosaeta* que está maioritariamente presente na biomassa granular, possui níveis muito reduzidos e dificilmente detectáveis desta coenzima (SHCMIDT E AHRING, 1996).

## **2.2 Objectivo**

O objectivo do presente capítulo foi o desenvolvimento e aplicação de metodologias de amostragem, de aquisição de imagem para análise quantitativa e de microscopia ao estudo da granulação durante a etapa de arranque dum reactor UASB e ao estudo dum fenómeno de desgranulação ocorrido durante a operação dum reactor EGSB alimentado com ácido oleico. Não foi objectivo deste estudo o desenvolvimento do software de análise de imagem (trabalho de doutoramento de António Luís Amaral) nem o estudo de operação e de desempenho dos reactores (trabalho de doutoramento de Pablo Araya Kroff e de Alcina Pereira). Tratou-se portanto dum trabalho de interface entre a operação de reactores e a análise de imagem.

A nível da aquisição de imagem para análise quantitativa deu-se especial importância ao estudo do efeito da diluição das amostras na quantificação dos parâmetros morfológicos, no número e no tamanho dos agregados e no comprimento médio e total dos filamentos livres.

Durante o processo de granulação do reactor UASB, foi utilizada a microscopia electrónica para observar, o inóculo e a evolução da biomassa de dois em dois meses. Também foram observados em microscópio electrónico agregados no início e no fim do processo de desgranulação.

Como complemento também foi utilizado um microscópio de epi-fluorescência para detectar a presença de bactérias metanógenicas que são autofluorescentes a 420 nm.

## 2.3 Materiais e Métodos

### 2.3.1 Proveniência das amostras

#### 2.3.1.1 Estudo do efeito da diluição

Os reactores anaeróbios do tipo UASB operam com uma elevada concentração de sólidos que tende a aumentar com o tempo, o que obriga a utilização de diluições para aquisição das imagens. Todas as aquisições do reactor do ensaio de granulação foram realizadas com diluições. Para estudar qual o efeito da diluição na quantificação dos parâmetros determinados, foram realizados 3 estudos de aquisição de imagem numa mesma amostra com diferentes diluições. Os dois primeiros estudos foram realizados com amostras provenientes do primeiro ensaio de granulação em que se procedeu a diluições de 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20. O 3º estudo foi realizado com uma amostra do 3º ensaio de granulação procedendo-se a diluições de 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50.

#### 2.3.1.2 Ensaio de desgranulação

As amostras utilizadas neste estudo foram recolhidas de um reactor anaeróbio de manto de lamelas de fluxo ascendente de leito expandido (EGSB – acrónimo de “Expanded Granular Sludge Bed”) de 10 litros (Figura 2.1), alimentado com concentrações crescentes de oleato, entre 2 e 8 g CQO/L. A operação deste reactor é parte do trabalho de doutoramento de Alcina Pereira, estando detalhadamente descrita em PEREIRA ET AL. (2001A). No Capítulo 4 também será referida a operação deste reactor. Nos primeiros 70 dias a alimentação foi constituída por leite magro (50% de CQO) e ácido oleico (50% de CQO). A partir do dia 70 e até ao final (dia 219), a fonte de carbono alimentada foi somente o ácido oleico. O inoculo foi biomassa granular, proveniente de um reactor UASB de uma indústria cervejeira. Para cada concentração de ácido oleico, foram recolhidas amostras de biomassa que posteriormente foram processadas por análise de imagem.

As amostras para análise de imagem foram obtidas nos dias 70, 92, 119, 141, 162, 191, e 219 e para todas elas foram determinados os sólidos suspensos voláteis. Como ao longo da operação se detectou visualmente que a biomassa ia perdendo as suas características granulares tentou quantificar-se este fenómeno por análise de imagem, e validá-lo com outro método. O método escolhido para a validação baseou-se na seguinte metodologia: a 10 ml de cada uma das amostras adicionaram-se, num goblé, 20 ml de água destilada. Mantendo o conteúdo em agitação lenta removeu-se, com uma seringa equipada com uma agulha de 20 Gx1” (diâmetro interno da agulha =0.9 mm), a fracção de sólidos que nessas condições entrava na seringa. Essa fracção foi quantificada para cada amostra em termos de sólidos suspensos voláteis em relação aos sólidos suspensos voláteis da amostra original. Determinou-se assim uma fracção de sólidos finos.



Reactor  
em estudo

Figura 2.1 Aspecto geral do reactor EGSB utilizado no estudo de desgranulação

Por análise de imagem aplicada a esta fracção de sólidos finos concluiu-se que o maior diâmetro de Feret encontrado nas partículas desta fracção era de 1mm, ou seja um pouco superior ao diâmetro da agulha de recolha. Esta diferença é facilmente explicada pelo carácter deformável da biomassa. Este procedimento permitiu também dividir as amostras de biomassa em duas categorias de tamanho, por análise de imagem: diâmetro de Feret menor do que 1 mm e diâmetro de Feret superior a 1mm.

### 2.3.1.3 Ensaio de Granulação

#### Ensaio I

O inoculo do reactor proveio dum digestor de lamas da ETAR municipal de Parada, na cidade da Maia. Antes da inoculação a biomassa passou por um crivo de 2 mm para retirar sólidos grosseiros e as lamas resultantes foram depositadas num matraz onde se deixou sedimentar procedendo posteriormente a uma remoção do excesso do líquido sobrenadante, para aumentar a concentração das mesmas. Inoculou-se um volume de 5 L de lamas, com uma concentração de sólidos voláteis de 13 g/L.

Passados 7 dias da inoculação foram retiradas duas amostras, uma da purga do sedimentador externo e outra do fundo do reactor (Figura 2.2) para aquisição de imagem e posterior tratamento de análise de imagem (como definido em 2.3.2). Este procedimento foi repetido toda as semanas. Este ensaio teve uma duração de 83 dias, após os quais houve um dano irreparável no reactor, com perda de parte da biomassa.

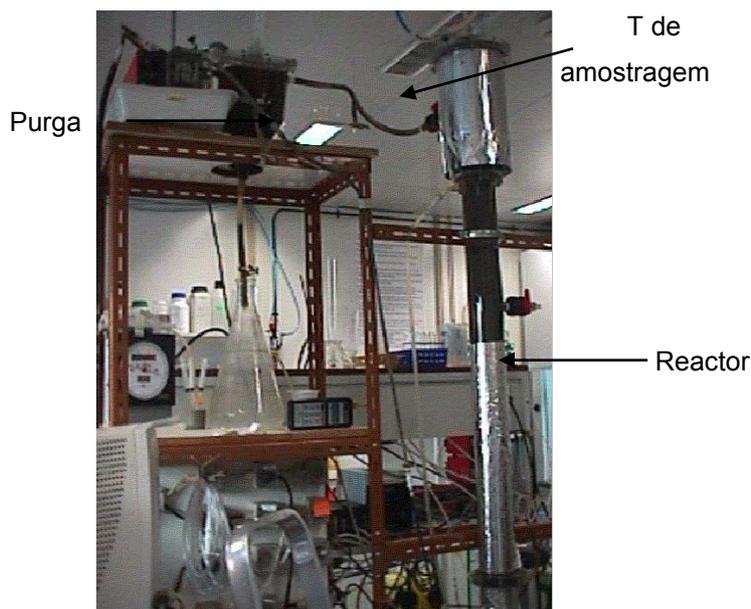


Figura 2.2 Aspecto geral do reactor UASB utilizado no estudo de granulação

### Ensaio II

Este ensaio foi bastante similar ao ensaio I. O inculo deste segundo ensaio, foi composto por parte da biomassa final do ensaio I (3 l) e com biomassa proveniente dum digester de lamas duma ETAR municipal de Viana do Castelo (2 l). Passados cerca de 15 dias da inoculação foram retiradas as primeiras amostras do reactor e do T (como definido em 2.3.2) para análise de imagem e este procedimento repetiu-se todos os 15 dias. Este ensaio teve uma duração de 82 dias.

### Ensaio III

O ensaio III surgiu na continuidade do ensaio II, após uma paragem no funcionamento do reactor durante um mês, a 4.º C. Neste ensaio, a recolha e periodicidade das amostras, foi realizada de maneira análoga ao ensaio II. Os dados deste ensaio correspondem a 56 dias de funcionamento contínuo.

#### 2.3.2 Recolha das amostras

No início do primeiro ensaio a biomassa do reactor era amostrada a partir de uma válvula existente no fundo do mesmo, mas, verificou-se que a grande pressão de saída provocava uma desintegração da biomassa. Este método foi abandonado de imediato, sendo substituído pelo seguinte método: introduziu-se pelo topo do reactor um tubo de plástico em que numa das extremidades foi colocado um peso para alcançar o fundo. Na outra extremidade aspirava-se por meio duma seringa de 100 ml uma amostra do conteúdo do reactor, de modo a que esta ficasse apenas no tubo e não entrasse na seringa. Este processo de recolha foi adoptado para os três ensaios.

Relativamente à amostragem da biomassa da saída do reactor, no ensaio I, a amostra foi recolhida directamente do sedimentador externo. No entanto como a biomassa se acumulava um tempo considerável nas paredes do mesmo, onde a concentração de substrato era limitante, considerou-se que esse tempo poderia ser responsável por alterações morfológicas dos agregados. Para tentar resolver este problema, foi introduzido um novo ponto de amostragem para os ensaios II e III. Este novo ponto de amostragem, a que se denominou de “T”, ficou localizado entre o topo do reactor e a entrada do sedimentador externo (Figura 2.2). Embora sendo amostrada de forma diferente nos 3 ensaios, a biomassa que sai do reactor será designada como purga.

Após a recolha das amostras foi necessário retirar uma quantidade de biomassa para a análise de imagem e para tal utilizaram-se micropipetas de volumes variáveis (5-50  $\mu$ l para filamentos e flocos e 0.5-5 ml para macroflocos) com a ponta cortada para evitar uma selecção de tamanho neste procedimento.

### 2.3.3 Aquisição das imagens

As imagens do ensaio de desgranulação foram adquiridas só para os macroflocos como referido em 2.3.3.3. As imagens do ensaio de granulação foram adquiridas em três etapas: primeiro foram adquiridas as imagens relativas aos filamentos, de seguida as imagens relativas aos flocos e por último as imagens relativas a flocos visivelmente maiores, a que se chamou macroflocos. Tal com já referido anteriormente, o software de análise de imagem foi desenvolvido em Matlab 6.1 por Luís Amaral, sendo parte central do seu trabalho de doutoramento.

#### 2.3.3.1 Filamentos

São reconhecidos como filamentos, todos os filamentos livres presentes na amostra. São considerados filamentos livres, todos os que possuam pelo menos uma extremidade livre para uma possível ligação (Figura 2.3).

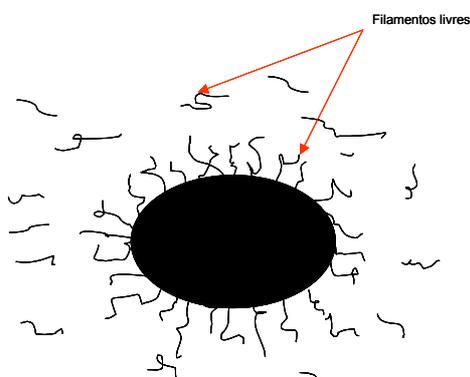


Figura 2.3 Esquema representativo de como se podem apresentar os filamentos livres

As imagens para medida dos filamentos foram adquiridas com um microscópio da DIAPHOT 300 Nikon (Nikon Corp., Tokio) com contraste de fase, com uma ampliação de 100x. Em cada amostragem foram colocados 35 $\mu$ L de amostra numa lâmina sem qualquer tipo de tratamento, colocando por cima uma lamela de 20 x 20 mm. De cada amostra foram retiradas 60 imagens. O sistema de aquisição foi constituído por uma câmara de vídeo CCD AVC D5CE (Sony, Tokio) acoplada ao microscópio e ligada a um computador com uma placa de aquisição DT 3155 (Data Translation, Marlboro) (Figura 2.4).



Figura 2.4 Sistema de aquisição de imagem dos filamentos

Para uma melhor focagem e aquisição das imagens dos filamentos, deve-se deixar secar a gota cerca de 15 minutos. Nas imagens com muitos filamentos, a focagem simultânea dos mesmos pode ser um passo crítico. A focagem deve ser de modo a que os filamentos tenham 2-3 pixels de largura, de modo a que o filamento se veja contínuo. Embora possa não parecer focado, o importante é ver todo o filamento. Na Figura 2.5 estão representadas imagens das principais etapas do processamento da imagem para determinação dos parâmetros relativos aos filamentos.

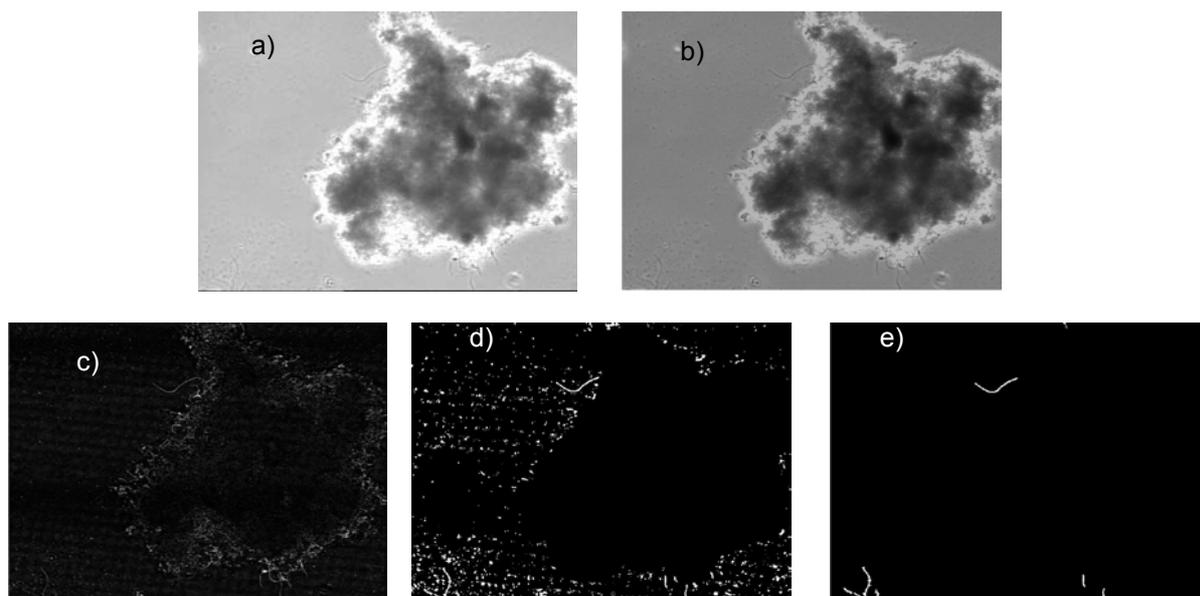


Figura 2.5 Imagens resultantes do programa Matlab 6.1 para os filamentos: (a) aquisição da imagem, (b) eliminação da iluminação, (c) aplicação do filtro "Bottom-Hat", (d) binarização, (e) identificação dos filamentos.

Os parâmetros calculados pelo software para os ensaios relativos aos filamentos foram o número total e o seu comprimento médio. Na Figura 2.6 está representado um organigrama do software.

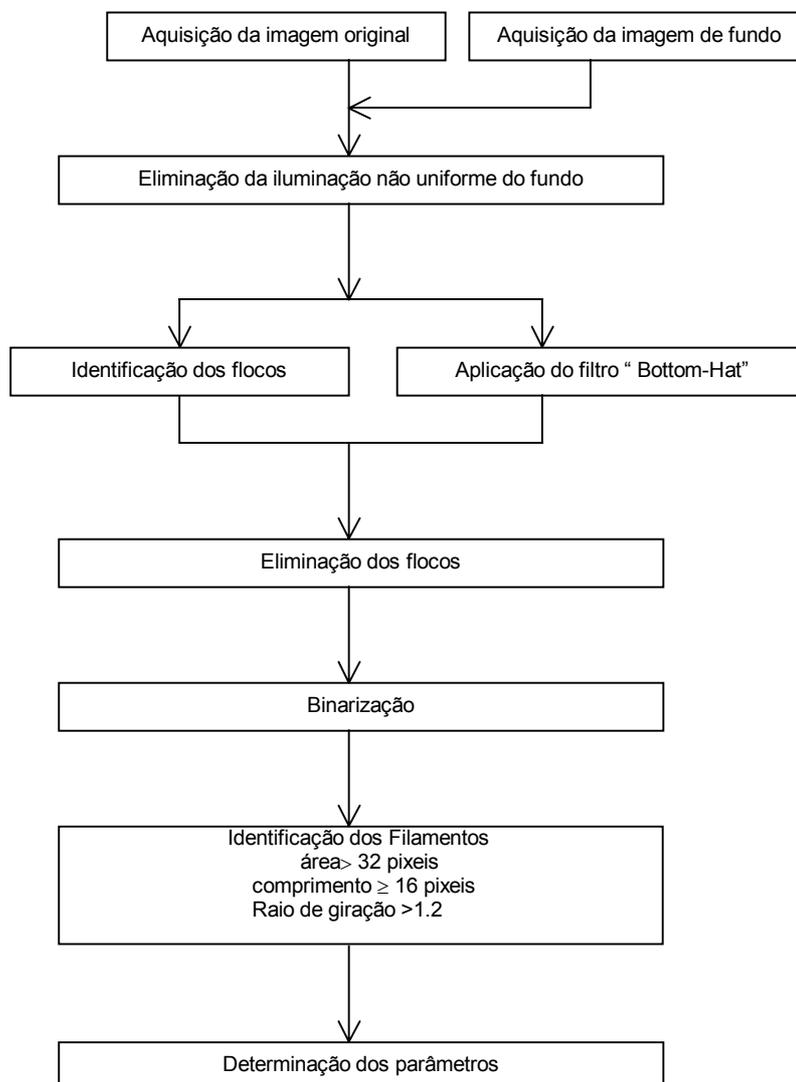


Figura 2.6 Organigrama do programa MATLAB 6.1 para os filamentos

### 2.3.3.2 Flocos

São denominados por flocos todos os agregados microbianos com uma área superior a  $10\mu\text{m}^2$ . Para melhor entendimento do que se passa com a evolução dos flocos, estes foram subdivididos em 4 fracções: os flocos residuais com uma área entre  $10\text{-}100\mu\text{m}^2$  (diâmetro equivalente entre  $3.5$  e  $11.3\mu\text{m}$ ), os flocos denominados por pequenos com uma área entre  $100$  e  $1000\mu\text{m}^2$  (diâmetro equivalente entre  $11.3$  e  $35.7\mu\text{m}$ ), os denominados de médios, com uma área entre  $1000\text{-}20000\mu\text{m}^2$  (diâmetro equivalente entre  $35.7$  e  $159.6\mu\text{m}$ ), e por último os grandes flocos com uma área superior a  $20000\mu\text{m}^2$  (diâmetro equivalente superior a  $159.6\mu\text{m}$ ). As imagens dos flocos (excepto dos macroflocos) foram adquiridas com um microscópio Axioscop (Zeiss Oberkochen), com uma

ampliação de 100x. Em cada amostragem foram colocados 35 $\mu$ L de amostra numa lâmina sem qualquer tipo de tratamento, colocando por cima uma lamela de 20 x 20 mm. De cada amostra foram retiradas 60 imagens. O sistema de aquisição de imagem foi constituído por uma câmara de vídeo CCD AVC D5CE (Sony, Tokio) acoplada ao microscópio e ligada a um computador com uma placa de aquisição DT 3155 (Data Translation, Marlboro) (Figura 2.7).

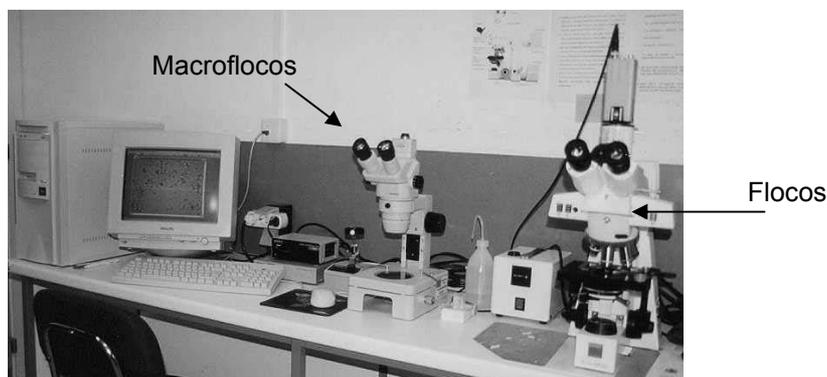


Figura 2.7 Sistema de aquisição de imagem dos flocos e macroflocos

Para os ensaios relativos aos flocos determinou-se a área média de flocos da amostra total, a área média de cada fracção de tamanho e o número total de flocos de cada fracção de tamanho. Calculou-se a % em número de flocos de cada fracção de tamanho. Não foram contabilizados no cálculo de área, os flocos que se encontravam na fronteira. Na Figura 2.8 estão exemplificadas as principais etapas do processamento das imagens e na Figura 2.9 está representado o organigrama com as etapas do software.

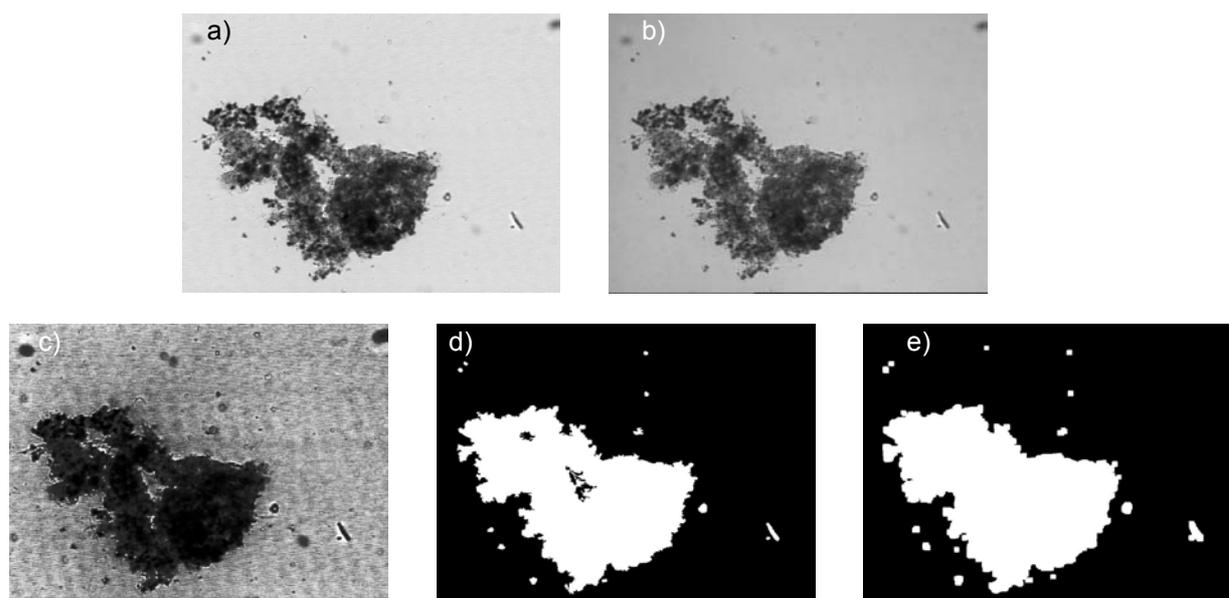


Figura 2.8 Imagens resultantes do programa Matlab 6.1 para os flocos: (a) aquisição da imagem, (b) eliminação da iluminação, (c) aplicação do filtro "Wiener", (d) binarização, (e) imagem final após preenchimento

## 2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

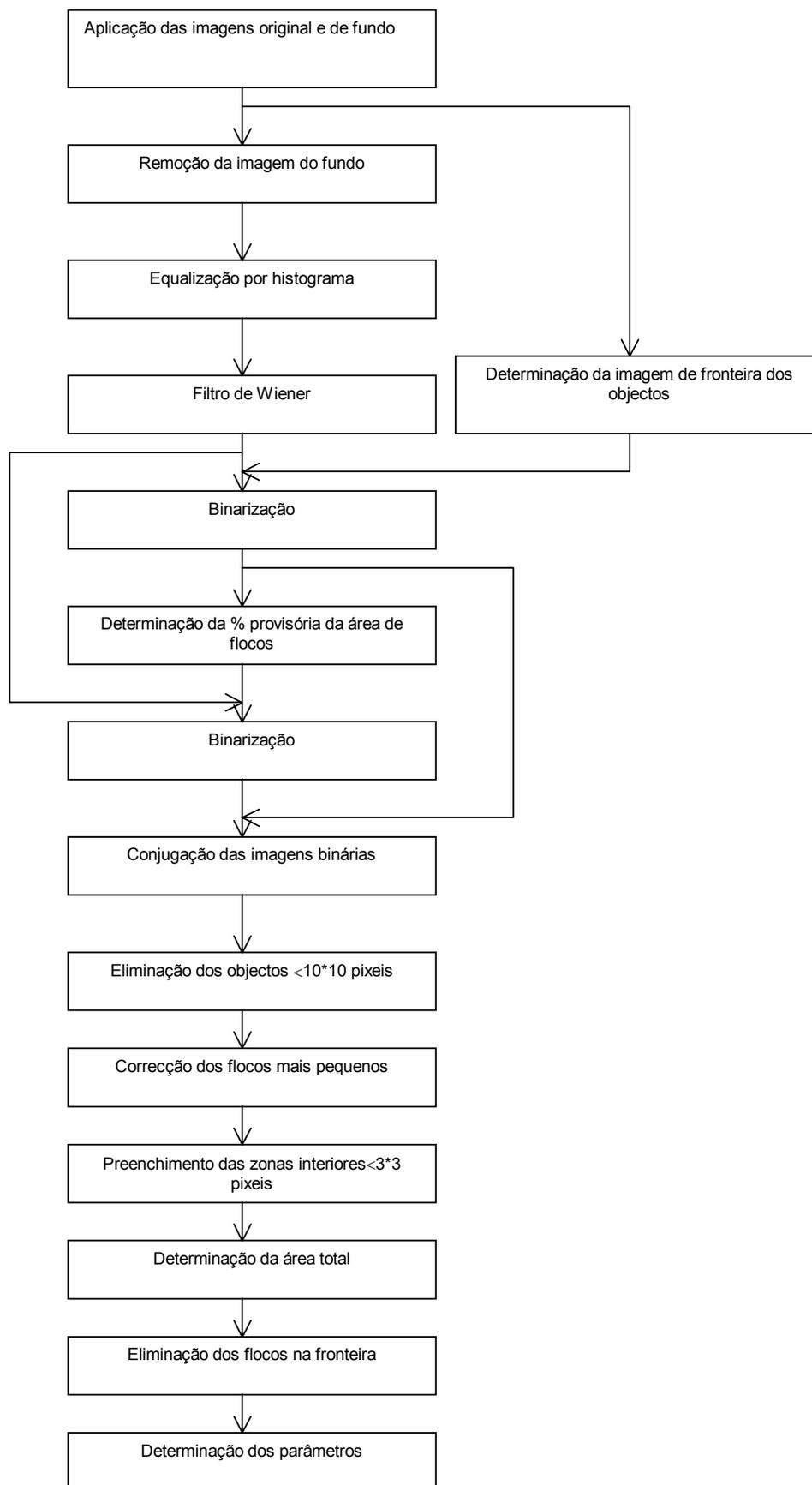


Figura 2.9 Organigrama do programa MATLAB 6.1 para os flocos residuais e pequenos

De referir que este software tal como está apresentado só foi aplicado às imagens das fracções de flocos residuais e pequenos. Para o tratamento das imagens dos flocos médios, foi aplicado o software também aplicado às imagens dos macroflocos e que está descrito em 2.3.3.3.

### 2.3.3.3 *Macroflocos*

As imagens dos flocos maiores, denominados por macroflocos foram adquiridas com uma lupa binocular Olympus, com uma ampliação de 40x. Em cada amostragem foram colocados 2.8 mL de amostra numa caixa de petri sem qualquer tipo de tratamento. De cada amostra foram obtidas 50 imagens. O sistema de aquisição foi constituído por uma câmara de vídeo CCD AVC D5CE (Sony, Tokio) acoplada ao microscópio e ligada a um computador com uma placa de aquisição DT 3155 (Data Translation, Marlboro) (Figura 2.7). Calcularam-se os mesmos parâmetros que para os flocos. Na Figura 2.10 estão exemplificadas as principais etapas do processamento das imagens e na Figura 2.11 está representado o organigrama com as etapas do software.

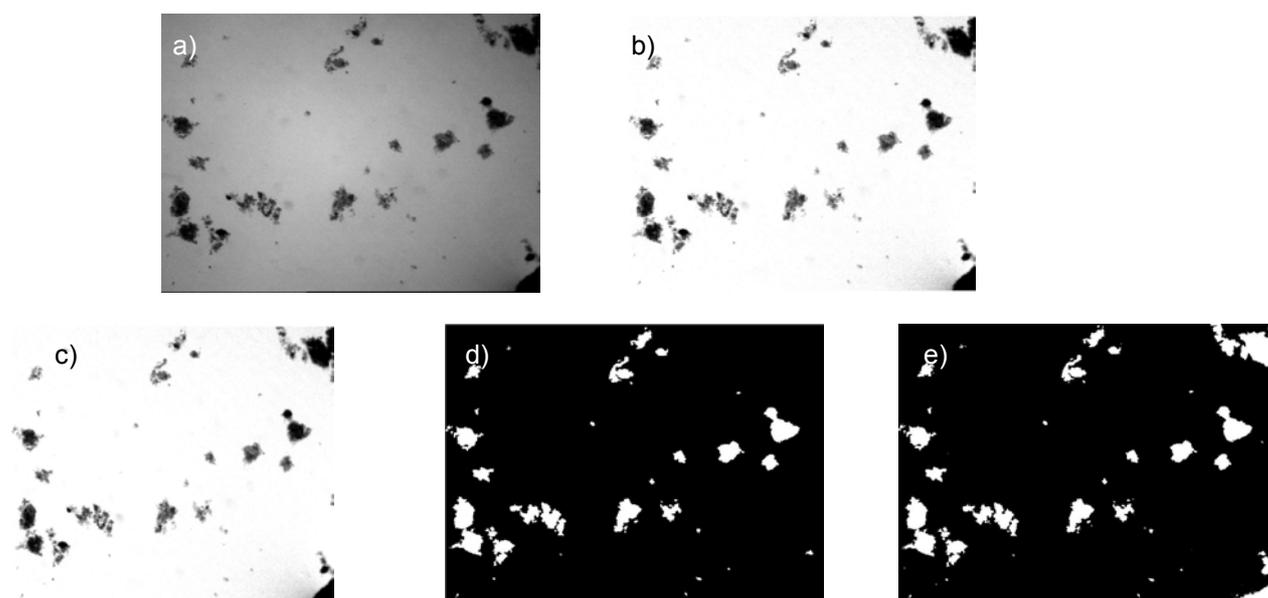


Figura 2.10 Imagens resultantes do programa Matlab 6.1 para os macroflocos: (a) aquisição da imagem, (b) eliminação da iluminação, (c) aplicação do filtro “Wiener”, (d) binarização, (e) imagem final após preenchimento

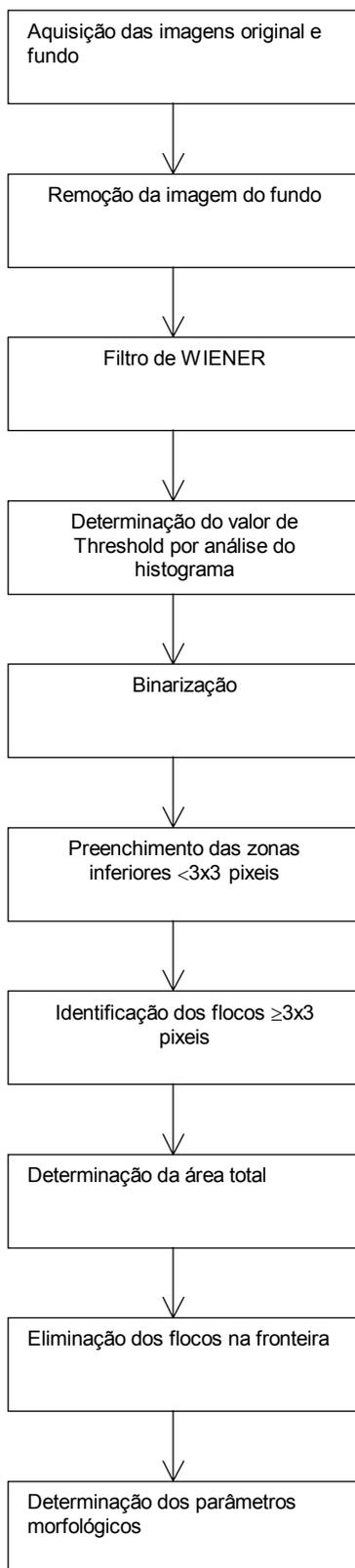


Figura 2.11 Organograma do Matlab 6.1 para os focos médios e grandes

### **2.3.4 Sólidos suspensos voláteis**

Para cada amostra utilizada para análise de imagem foram calculados os sólidos suspensos voláteis. Entende-se por sólidos toda a matéria suspensa ou dissolvida numa amostra. O termo sólido total aplica-se ao resíduo seco obtidos após secagem a 105 °C. Os sólidos voláteis são peso perdido por ignição a 550 °C. Todas as determinações foram realizadas em duplicado.

Encheu-se o cadinho com 10 mL (b) de amostra, colocando-o de seguida na estufa a 105 °C até se obter um peso constante, este processo demora 24 horas. Pesou-se o cadinho com o resíduo seco depois deste arrefecer no excicador (c gramas). Efectuou-se a ignição do resíduo na mufla a 550 °C durante meia hora. Pesou-se o cadinho após arrefecimento no excicador (d gramas).

$$\text{Sólidos voláteis (g SV/L)} = (c-d)*1000/b$$

### **2.3.5 Microscopia electrónica**

#### **2.3.5.1 Proveniência das amostras**

Do reactor EGSB (Figura 2.1), utilizado no estudo da desgranulação foram analisadas amostras do inoculo constituído por biomassa granular, proveniente de um reactor anaeróbio de tratamento do efluente de uma indústria cervejeira, assim como da biomassa final localizada no topo e no fundo do reactor.

Do reactor utilizado no estudo da granulação as amostras analisadas foram provenientes dos três ensaios. Do primeiro ensaio foi analisado o inoculo constituído por biomassa dispersa e a biomassa final após 83 dias de operação. Do segundo ensaio foi analisado o inoculo já descrito. Durante este ensaio e o ensaio III foram observadas amostras retiradas de dois em dois meses do reactor.

#### **2.3.5.2 Preparação das amostras (adaptado de HARPER E POHLAND, 1997).**

Todas as amostras foram submetidas ao mesmo tratamento para serem analisadas no microscópio electrónico de varrimento. Foi necessário preparar as seguintes soluções, para tratamento das amostras:

##### **2.3.5.2.1 Tampão cacodilato pH 7.2**

Pesaram-se 1.07 g de cacodilato de sódio ( $\text{Na}(\text{CH}_3)_2 \text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), diluíram-se em 50 mL de água destilada, adicionaram-se 4.15 mL de HCl 0.1 N, e perpez-se um volume de 100 mL com água destilada.

##### **2.3.5.2.2 Glutaraldeído 3% em tampão cacodilato pH 7.2**

Diluíram-se 12 mL de solução de glutaraldeído 25% em 88 mL da solução de tampão de cacodilato pH 7.2 descrita anteriormente.

A biomassa foi colocada em cestos semelhantes aos representados na Figura 4.2, em contacto com a solução de glutaraldeído durante 12 horas. De seguida a amostra foi desidratada com a passagem de uma solução de etanol 10% durante cerca de 15 minutos. Esta etapa foi repetida para soluções de etanol de concentração crescente de 25, 50, 90 e 100%. A amostra foi seca num exsiccador. Depois de seca a amostra foi colocada num suporte (Figura 2.12) onde foi previamente revestida a ouro, para não ser permeável ao feixe de electrões produzidos pelo microscópio electrónico de varrimento.



Figura 2.12 Imagem do suporte no qual a amostra é revestida a ouro

### **2.3.5.3 Observação Microscópica**

O microscópio utilizado foi o microscópio electrónico de varrimento LEICA Cambridge S360, com detectores de electrões, pertencente à Universidade do Minho, laboratório de microscopia electrónica no campus de Gualtar. As imagens da epi-fluorescência foram obtidas com um microscópio de Zeiss Axioscop (Oberkochen) com lâmpada de halogéneo, acoplado a uma câmara fotográfica Zeiss MC 100.

## 2.4 Resultados e discussão

### 2.4.1 Análise quantitativa de imagem

#### 2.4.1.1 Estudo das diluições

Como os reactores anaeróbios operam com grande concentrações de sólidos é necessário proceder a diluições para realizar as aquisições das imagens. Ao longo da realização dos ensaios foram efectuadas várias diluições particularmente para a amostra recolhida do reactor, tendo-se considerado necessário proceder a um estudo para averiguar se as diluições alteravam os resultados finais. Foram realizados três estudos da diluição, dois deles durante o primeiro ensaio com duas amostras diferentes de biomassa (recolhida em diferentes tempos de operação) e o terceiro realizado com a biomassa do reactor do terceiro ensaio de granulação.

#### Estudo I

A biomassa utilizada neste estudo tinha uma concentração inicial de 12.25 g SSV/L, e pertence ao dia 58 de operação do ensaio I de granulação. Foram realizadas diluições de 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20 (Tabela 2-1). Foi definido um parâmetro que permite quantificar a % de reconhecimento (%Rec) dos objectos numa imagem (só aplicado aos flocos) e que é calculado a partir da área de todos os flocos menos dos que se encontram na fronteira, a dividir pela área total, incluindo os flocos da fronteira. O valor ideal para a diluição será a menor diluição que tenha um valor de % reconhecimento mais elevado.

Tabela 2-1 Resultados dos SSV (g/L) com as diluições do reactor para o estudo I

Diluição	1:1	1:2	1:5	1:10	1:20
SSV (g/l)	12.25	4.9	2.45	1.23	0.61

Na Figura 2.13 está representado o efeito da diluição na % de reconhecimento. Nestes estudos de diluição os flocos foram quantificados em função da área total e da área média (Figura 2.14(a)) assim como em função do número (Figura 2.14 (b)). Foram quantificados para a área total e para o número total todos os agregados de todas as fracções anteriormente referidas e para a área média foram excluídos os flocos residuais (entre 10 e 100  $\mu\text{m}^2$  de área). Os filamentos foram quantificados pelo seu comprimento total e comprimento médio assim como em número (Figura 2.15).

Da análise da Figura 2.13, e devido à definição da % Rec, conclui-se que a diluição ideal para a biomassa com estas características é de 1:5, pois é a menor diluição com maior % de reconhecimento.

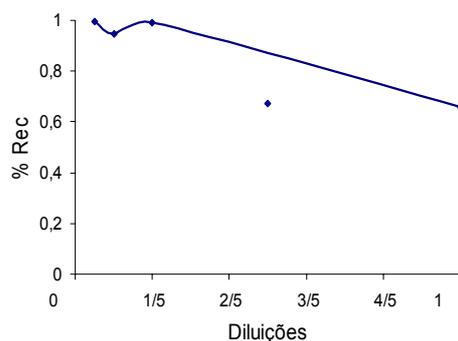


Figura 2.13 Resultados da percentagem de reconhecimento para os flocos para o estudo I

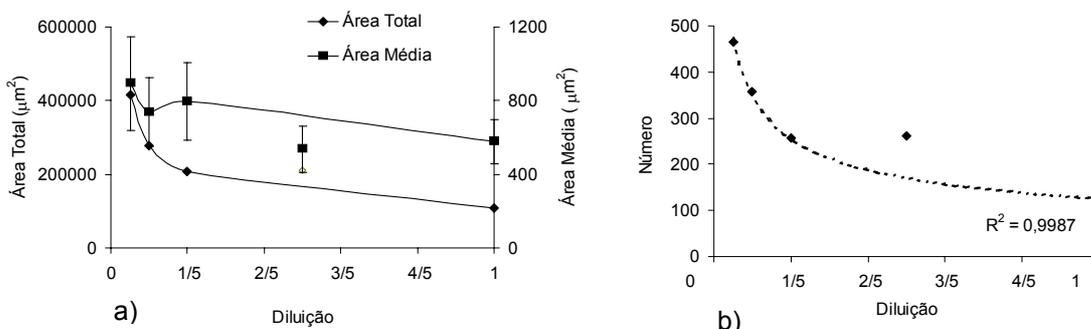


Figura 2.14 Resultados obtidos com as diluições para a área total e para a área média dos flocos (a) e com o número de flocos (b) para o estudo I.

Ao observar a Figura 2.14, conclui-se que a variação da área média, área total e número total de flocos com a diluição apresentam o mesmo tipo de comportamento, aumentando significativamente para diluições superiores a 1:5. O processo de diluição, dependendo do modo de homogenização da amostra pode provocar uma alteração de tamanho nos agregados uma alteração de número de agregados devido a desintegração, e um aumento de filamentos que se podem soltar dos flocos e tornar-se livres, de acordo com o conceito apresentado anteriormente. Caso haja desagregação de flocos a área média deverá diminuir, a menos que se forme uma fracção muito significativa de flocos residuais que não são contabilizados na área média. Por outro lado, quando se faz a aquisição da imagem é conveniente obter as imagens de modo sequencial, percorrendo cada lamela de forma sistemática, sem introduzir o factor procura de objectos. No entanto quando um objecto está na fronteira convém tentar observá-lo integralmente para minimizar os erros introduzidos pelos objectos da fronteira e aumentar a % reconhecimento.

No presente ensaio, para diluições superiores a 1:5 as grandezas representadas para os flocos (área total, área média e número total) aumentaram significativamente. Na análise dos filamentos é possível observar que o número de filamentos permanece quase inalterável até à diluição de

1:10, o mesmo acontecendo para o comprimento total e comprimento médio dos mesmos (Figura 2.15). Conjugando a informação fornecida pela análise dos flocos e dos filamentos a concentração ideal para a biomassa com estas características é uma diluição de 1:5. Para biomassa com estas características a concentração ideal para aquisição de imagem é de 2.45 g SSV/L.

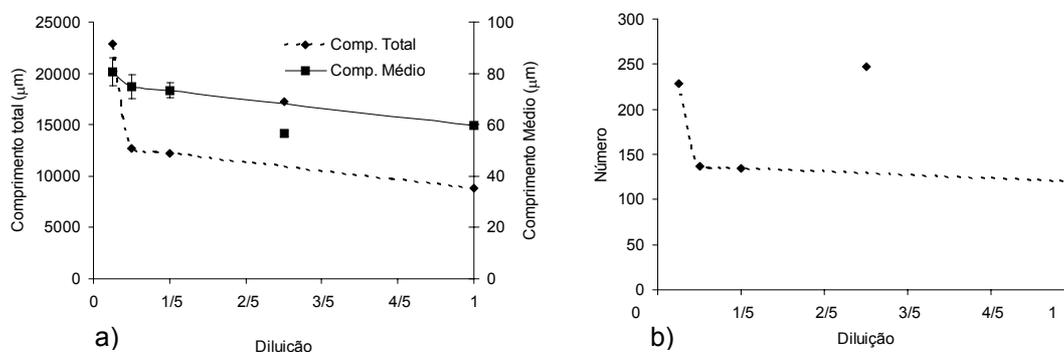


Figura 2.15 Resultado obtidos na diluição para filamentos contabilizando o comprimento total e o comprimento médio (a) e em número de filamentos (b) para o estudo I

O facto do número de filamentos e de flocos aumentar indica que pode ter havido de facto um efeito de desagregação o que até se compreende pela fraca resistência mecânica dos agregados nesta fase mais inicial do processo de granulação. Em relação aos filamentos, pode explicar-se o aumento do seu comprimento total e médio também pelo mesmo fenómeno de desintegração. Na Figura 2.16 está representado um esquema do possível efeito de desagregação devido à diluição nos filamentos e nos flocos, onde se nota o aumento do número de flocos, o aumento possível do número de filamentos e do seu comprimento médio. Este parâmetro só contabiliza a parte do filamento que está livre pelo que se um filamento se soltar integralmente dum floco, será detectado um comprimento maior de filamento. Relativamente à área média não se verificou uma diminuição, mas sim um aumento. Este aumento só pode ser justificado se aumentar significativamente o número de flocos residuais, número que não foi contabilizado no cálculo da área média.

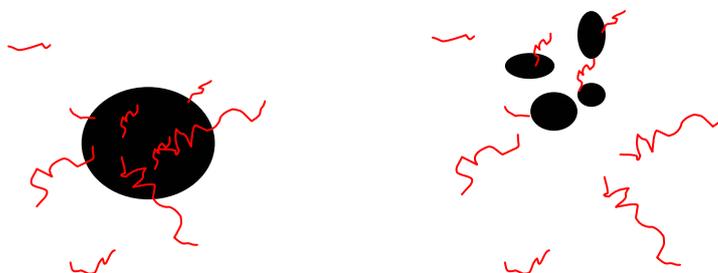


Figura 2.16 Efeito de desagregação na contabilização dos filamentos e flocos

Em todos os gráficos apresentados o ponto correspondente a diluição de 1:2 não obedece à tendência dos demais, indicando que durante as diluições algo de incorrecto se passou.

**Estudo II**

A biomassa utilizada neste ensaio de diluição corresponde a biomassa retirada do reactor ao fim de 78 dias de operação com uma concentração de SSV (g/L) de 6.33 g/L. As diluições executadas foram similares ao estudo I (Tabela 2-2).

Tabela 2-2 Resultados dos SSV (g/L) com as diluições do reactor para o estudo II

Diluição	1:1	1:2	1:5	1:10	1:20
SSV (g/l)	6.33	3.17	1.27	0.63	0.32

Está representado na Figura 2.17, a % de reconhecimento dos flocos em função da diluição realizada. Na Figura 2.18 (a), pode-se observar os resultados obtidos para a área média e para a área total e na Figura 2.18 (b), o número de flocos em função das diluições.

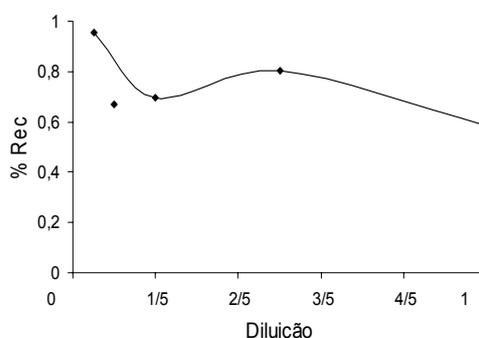


Figura 2.17 Resultados da percentagem de reconhecimento para os flocos para o estudo II

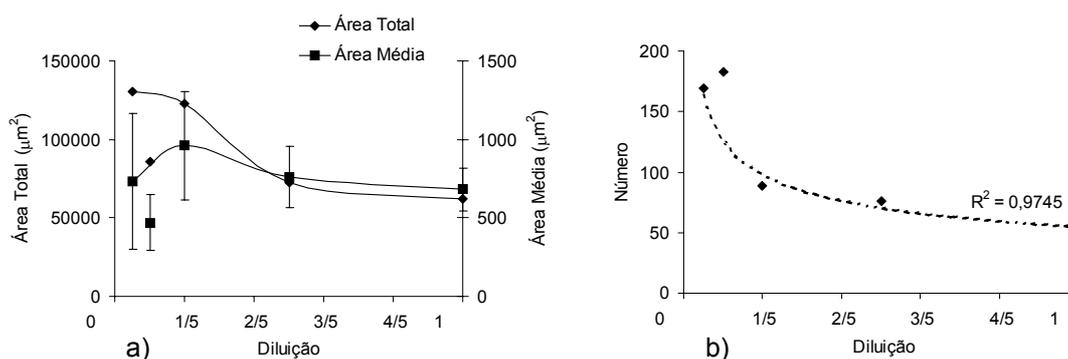


Figura 2.18 Resultados obtidos com as diluições para a área total e para a área média dos flocos (a) e com o número de flocos (b) para o estudo II

Ao analisar a Figura 2.17, estima-se como diluição ideal a de 1:2. Para esta diluição obtém-se um valor de reconhecimento, de 80% correspondendo, à diluição mais baixa com um valor de reconhecimento mais alto. Na Figura 2.18 à semelhança do que se passou com o ensaio anterior, a partir do valor da diluição ideal a área total e o número aumentam. A área média tem um decréscimo na última diluição (Figura 2.18 (a)).

Foi igualmente analisada neste ensaio a alteração do comprimento total, do comprimento médio e do número de filamentos (Figura 2.19 (a) e (b)). Na análise de filamentos, o número e comprimento total, aumentam a partir da diluição ideal (Figura 2.19), tal como se passou no ensaio anterior (Figura 2.15). No entanto, o mesmo não se observou para o comprimento médio, nos dois ensaios.

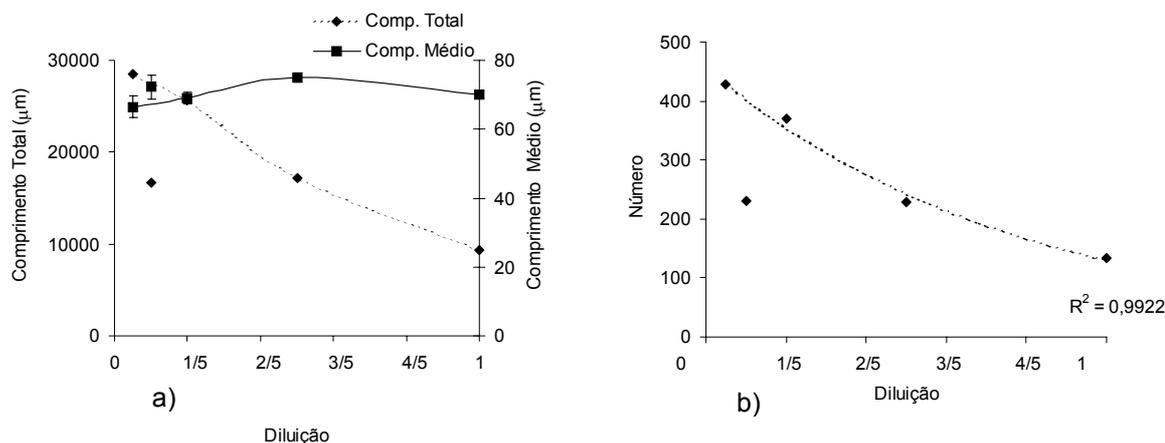


Figura 2.19 Resultado obtidos na diluição para filamentos contabilizando o comprimento total e o comprimento médio (a) e em número de filamentos (b) para o estudo II

Tendo em conta os resultados obtidos para os flocos e para os filamentos, a diluição mais indicada seria a de 1:2. Esta diluição corresponde a um valor de concentração de SSV óptimo para análise de imagem, de uma biomassa com estas características, de 3.17 g/L, que é semelhante ao valor obtido para o estudo I da diluição.

Em todos os gráficos apresentados, o ponto correspondente a diluição de 1:10, não obedece à tendência dos demais, pelo que se desprezaram no traçados das linhas de tendência representadas.

### Estudo III

Este ensaio de diluições, foi executado de maneira análoga aos ensaios anteriores, mas com o intuito de perceber qual a alteração provocada, por esta, quando a biomassa está mais próxima de um estado de granulação. Esta diluição corresponde ao dia 155 de operação do reactor com uma concentração de 24.45 g/L de SSV (ensaio III). Nesta etapa o aspecto granular da biomassa já era visível. As diluições executadas foram de uma ordem de grandeza diferente, como se pode observar na Tabela 2-3. Ao contrário dos ensaios anteriores não se realizou aquisição de imagens para a diluição 1:1, devido à elevada concentração de biomassa, tornava-se impraticável a aquisição da amostra e o seu posterior tratamento.

Tabela 2-3 Resultados dos SSV (g/L) com as diluições do reactor para o estudo III

## 2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

Diluição	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100
SSV (g/l)	4.85	2.45	1.23	0.50	0.24

Na Figura 2.20 está representada a variação da % de reconhecimento para os flocos com as diluições efectuadas. Na Figura 2.1 (a) é possível observar, o efeito provocado pelas diluições, na área média e na área total e na Figura 2.21 (b) pode-se observar o efeito provocado pela diluição no número de flocos. Por último estão representados os dados referentes aos filamentos. Na Figura 2.22 (a), está representado o efeito das diluições, no comprimento médio e total e na Figura 2.22 (b), está representado o número de filamentos.

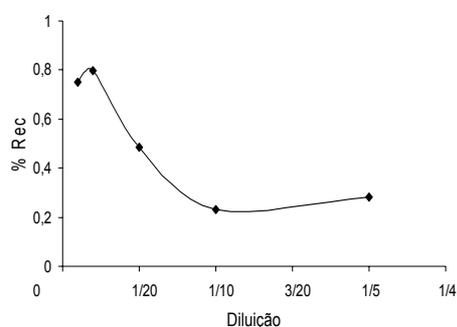


Figura 2.20 Resultados da percentagem de reconhecimento para os flocos para o estudo III

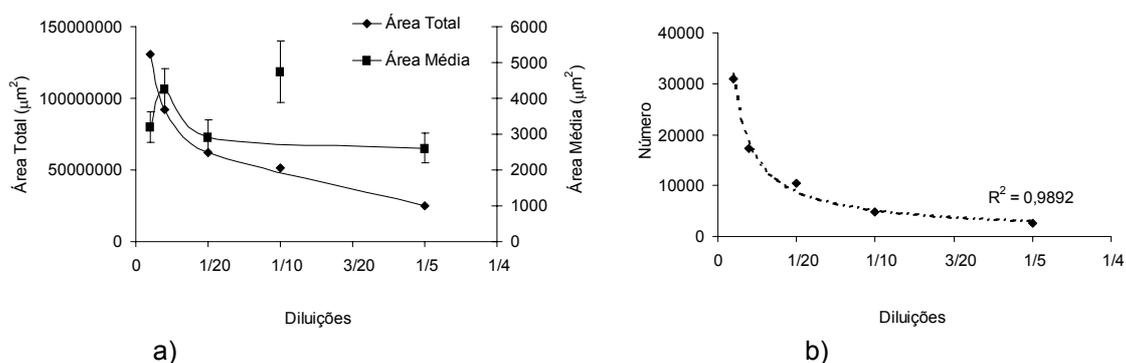


Figura 2.21 Resultados obtidos com as diluições para a área total e para a área média dos flocos (a) e com o número de flocos (b) para o estudo III.

Ao analisar os dados da % reconhecimento, em função da diluição, para os flocos, encontra-se como diluição ideal o valor de 1:50 (Figura 2.20). Este valor é bastante mais elevado do que as diluições ideais para os estudos anteriores. À semelhança do que se passou com os ensaios anteriores, a área total assim como o número, sofrem um aumento a partir da diluição 1:50 (Figura 2.21(a) e (b)). A área média, à semelhança do ensaio II, sofre um decréscimo na última diluição.

Conforme já foi mencionado, a % Rec é altamente influenciada pelo tamanho dos grânulos

encontrados na fronteira e como se pode comparar, a área média e o número de flocos, é neste ensaio muito maior do que nos ensaios anteriores (Figura 2.14, Figura 2.18 e Figura 2.21). Se os flocos forem demasiado grandes, tocarão mais vezes na fronteira, não sendo, por isso reconhecidos. Foi igualmente referido que a percentagem de reconhecimento é largamente afectada pela diluição, porque quanto maior a diluição, menor é a quantidade de flocos analisada no mesmo número de imagens.

Neste ensaio de diluição, devido à evolução do tamanho dos agregados, foram utilizados para a aquisição de imagens dos flocos, o microscópio e a lupa anteriormente referidos. Certos agregados possuíam uma área média demasiado elevada para serem só adquiridos no microscópio.

Relativamente aos filamentos (Figura 2.22 (a) e (b)), o comprimento total e número, aumentam drasticamente a partir da diluição ideal obtida pela Figura 2.20, à semelhança dos ensaios anteriores. O comprimento médio, não teve um aumento acentuado, o que está em conformidade com os ensaios anteriores.

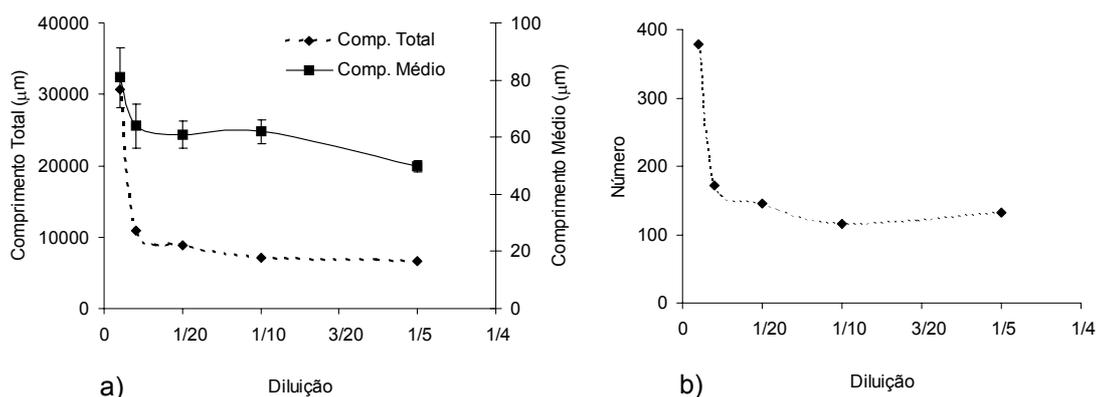


Figura 2.22 Resultado obtidos na diluição para filamentos contabilizando o comprimento total e o comprimento médio (a) e em número de filamentos (b) para o estudo III

Após a análise dos dados do estudo em questão, conclui-se que a concentração ideal para a biomassa com estas características, é de 0.50 g/L de SSV (Tabela 2-4). Este valor é bastante inferior ao encontrado no ensaio anterior, o que têm a ver com as próprias características da biomassa. No ensaio anterior, a biomassa ainda apresentava um aspecto floculento, e neste ensaio a biomassa tem uma estrutura mais granular e um tamanho maior implicando a necessidade de se proceder a diluições maiores. Assim, a diluição parece não depender só da quantidade de sólidos presentes mas também das características da biomassa.

PACKER ET AL. (1990) efectuaram um estudo de diluição a um fermentador com fungos filamentosos do género penicilina, chegando à conclusão que, embora as diluições efectuadas não alterassem significativamente os resultados finais, essencialmente para diluições baixas, alguns resultados alteravam-se. Este autor pressupôs que este fenómeno se devesse à quebra das ligações dos agregados.

DA MOTTA ET AL. (2001) efectuaram uma experiência similar com diluições de amostras de digestores anaeróbios e de lamas activadas, chegando à conclusão que o ideal, é utilizar sempre a mesma diluição ao longo da recolha de imagens, mas para conseguir isso, é necessário conhecer profundamente o processo, estes autores pressupuseram que as características e estados de agregação, não variavam significativamente dentro do mesmo processo.

#### 2.4.1.2 Estudo de desgranulação no reactor EGSB alimentado com ácido oleico

Neste ensaio tentou-se quantificar por análise de imagem um fenómeno de desgranulação ocorrido durante a operação dum reactor EGSB, inoculado com biomassa granular e alimentado com ácido oleico. Tal como já mencionado nos materiais e métodos este fenómeno foi aparentemente evidente pela inspecção visual das amostras recolhidas ao longo do tempo de operação do reactor. Tendo definido um diâmetro de Feret de 1 mm, como sendo o valor fronteira entre partículas finas e não finas, determinou-se a fracção de finos em número e em área total ao longo do tempo de operação (Figura 2.23(a)). Na Figura 2.23 (b) está representada uma correlação obtida entre a % de finos determinada por análise de imagem em termos área e a % de finos obtida pela razão de sólidos voláteis.

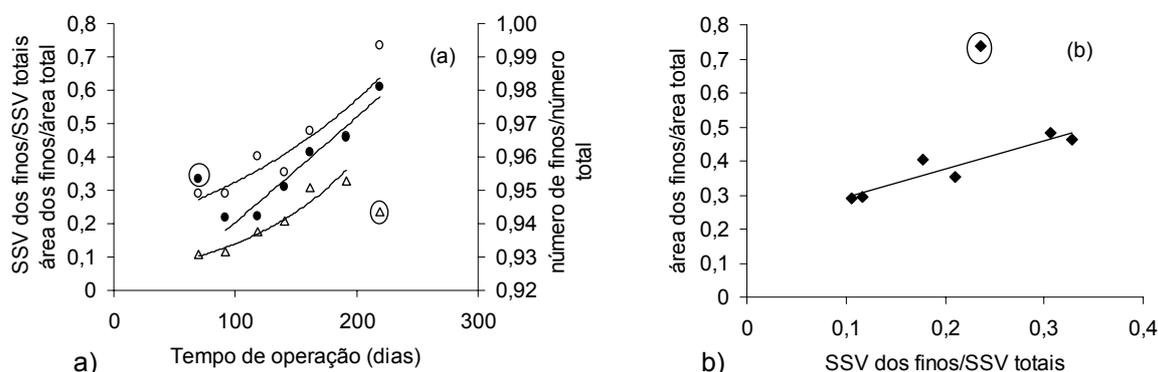


Figura 2.23 Variação ao longo do processo da % de partículas finas em termos de área, em termos de sólidos e em termos de número (a). Correlação obtida entre a % de finos determinados por análise de imagem em termos de área e a percentagem de finos obtida pela razão de sólidos voláteis (b).

Verificou-se que estas fracções de finos aumentavam, bem como a fracção de finos baseada na determinação da fracção dos sólidos finos tal como descrito anteriormente nos materiais e métodos (2.3.1.2). De salientar a elevada fracção de finos em número, que variou entre 93 e 99%. No entanto, a fracção de finos em termos de área foi significativamente inferior (entre 0.2 e 0.6).

#### 2.4.1.3 Estudo de granulação do reactor UASB

De seguida apresentam-se os resultados dos ensaios I, II e III, sobre a evolução dos flocos e dos filamentos, assim como a evolução das diferentes fracções de flocos. Como já foi referido, são denominados por flocos, todos os agregados microbianos com uma área superior a  $10 \mu\text{m}^2$ . Para

melhor entendimento do que se passa com a evolução dos flocos, estes foram subdivididos em 4 fracções: os flocos residuais com uma área entre 10-100  $\mu\text{m}^2$ , os flocos denominados por pequenos, com uma área entre 100 e 1000  $\mu\text{m}^2$ , os denominados de médios, com uma área entre 1000-20000  $\mu\text{m}^2$  e por último os grandes flocos (macroflocos), com uma área superior a 20000  $\mu\text{m}^2$ . Na área total são contabilizadas todas as fracções e na área média são contabilizados todas as fracções, menos os flocos residuais.

No decorrer dos três ensaios foram realizadas diluições, durante o processo de aquisição que por vezes não foram as mesmas que as calculadas em 2.4.1.1 como ideais. No entanto os resultados anteriormente obtidos nos estudos de diluição permitiram corrigir os valores obtidos.

### Ensaio I

Na Tabela 2-4 estão representados os valores dos SSV das amostras recolhidas neste ensaio.

Tabela 2-4 Resultados dos SSV (g/L) para o ensaio I e as respectivas diluições utilizadas

Dias de operação	Reactor		Purga	
	SSV(g/L)	Diluições	SSV(g/L)	Diluições
1	13.5	1:20		
8	17.83	1:20	19.42	1:20
16	16.64	1:20	18.86	1:20
24	10.90	1:20	4.10	1:20
30	12.05	1:20	2.95	1:10
38	14.80	1:20	4.30	1:10
51	10.90	1:20	7.40	1:10
58	14.60	1:20	4.60	1:10
71	12.62	1:20	1.92	1:1
78	6.33	1:20	1.15	1:1

Os resultados obtidos por análise de imagem para os flocos, revelam que a área média calculada para todas as fracções, sem os residuais (Figura 2.24 (d)), aumenta ligeiramente tanto no reactor como na purga. A Figura 2.24 revela que os flocos pequenos (Figura 2.24 (a)) mantêm um tamanho estável ao longo de todo o ensaio, que os flocos médios vão aumentando ligeiramente (Figura 2.24 (b)) e por último que a fracção de grandes flocos tem uma tendência oscilatória ao longo do tempo (Figura 2.24 (c)).

## 2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

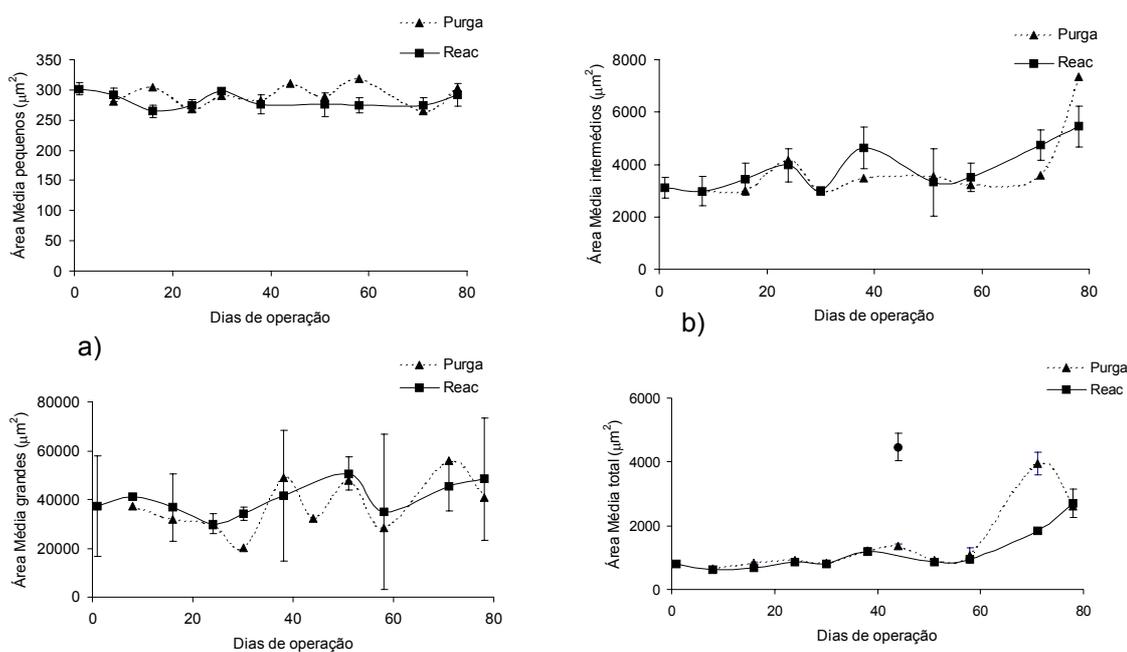


Figura 2.24 Evolução da área média dos flocos pequenos (a), dos flocos intermédios (b), dos flocos grandes (c) e da área média de todos (d) ao longo do tempo para o ensaio I

Ao observar a Figura 2.25 (a), percebe-se que a fracção mais representativa em número da amostra do reactor, com um valor a rondar os 80%, são os flocos pequenos, seguida da fracção de flocos intermédios. Não foram detectados praticamente flocos grandes. Este fenómeno repetese para a purga (Figura 2.25 (b)).

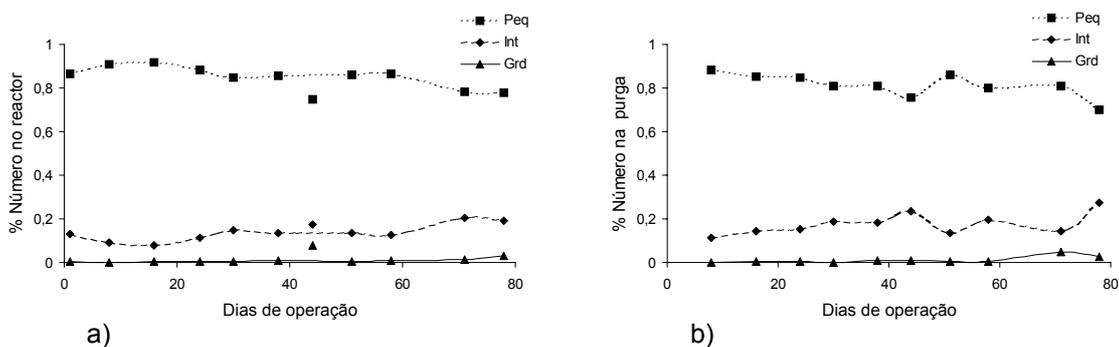


Figura 2.25 Evolução das percentagens das diferentes fracções de flocos no reactor (a) e na purga (b) para o ensaio I

Relativamente aos filamentos, o seu comprimento médio aumenta ao longo do tempo de operação, não havendo diferenças significativas entre o comprimento médio dos filamentos dentro do reactor e os que eram lavados do reactor (purga) (Figura 2.26 (a)). Relativamente ao número total de filamentos por unidade de concentração de sólidos verifica-se que, em geral, os sólidos voláteis do reactor apresentavam um maior número de formas filamentosas do que os que eram purgados do mesmo. Embora as diferenças não sejam muito persistentes ao longo do tempo do

## 2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

ensaio pode ter acontecido algum grau de selecção de formas filamentosas que se sabe terem um papel crucial no processo de granulação (Figura 2.26 (b)). O aumento do número de filamentos por unidade de sólidos voláteis pode estar relacionado com o enriquecimento em formas filamentosas que era um dos objectivos do protocolo experimental seguido na operação do reactor.

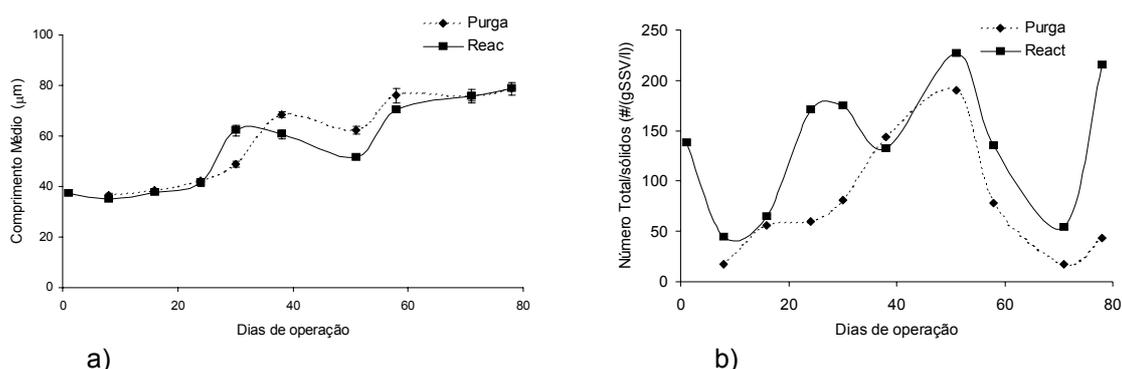


Figura 2.26 Evolução do comprimento médio (a) e do número total (b) para os filamentos no ensaio I

### Ensaio II

Na Tabela 2-5 estão representados os valores dos SSV das amostras recolhidas neste ensaio, e as respectivas diluições utilizadas na aquisição de imagem.

Tabela 2-5 Resultados dos SSV (g/L) para o ensaio II e as respectivas diluições utilizadas

Dias de operação	Reactor		T de amostragem	
	SSV(g/L)	Diluições	SSV(g/L)	Diluições
4	12.44	1:20	-	
16	9.86	1:20	1.89	1:10
30	9.74	1:10	0.57	1:1
45	19.12	1:15	0.68	1:1
58	16.64	1:15	1.04	1:1
71	25.78	1:15	1.23	1:1
85	13.71	1:20	0.51	1:1

Neste ensaio, a área média dos flocos tem uma tendência oscilante ao longo do tempo (Figura 2.27 (d)). Este comportamento é similar ao ensaio I, tanto no reactor como no “T” ou purga. No entanto, neste ensaio, e apesar de haver oscilações, é mais nítido um aumento de área média total dos agregados. Como já foi referido, este ensaio foi bastante similar ao anterior, mas o inóculo continha biomassa pertencente ao ensaio anterior. Por isso seria de esperar que neste

ensaio se conseguisse um aumento de área superior.

Observando o comportamento das várias fracções, ao longo do ensaio, verifica-se que a fracção correspondente aos flocos pequenos (Figura 2.27 (a)), sofre uma ligeira diminuição, comparando com o ensaio anterior. Esta fracção de flocos tem a mesma área, no reactor e no T, nos últimos pontos de amostragem. A fracção dos flocos médios (Figura 2.27 (b)) aumentou, em comparação com o ensaio anterior. Na fracção correspondente aos flocos grandes (Figura 2.27 (c)) este aumento é mais notório. Estes flocos têm um aumento considerável para o reactor e para o T, e, com excepção dum ponto, o tamanho médio dos flocos grandes do reactor é superior ao dos da purga, embora as diferenças não sejam significativas.

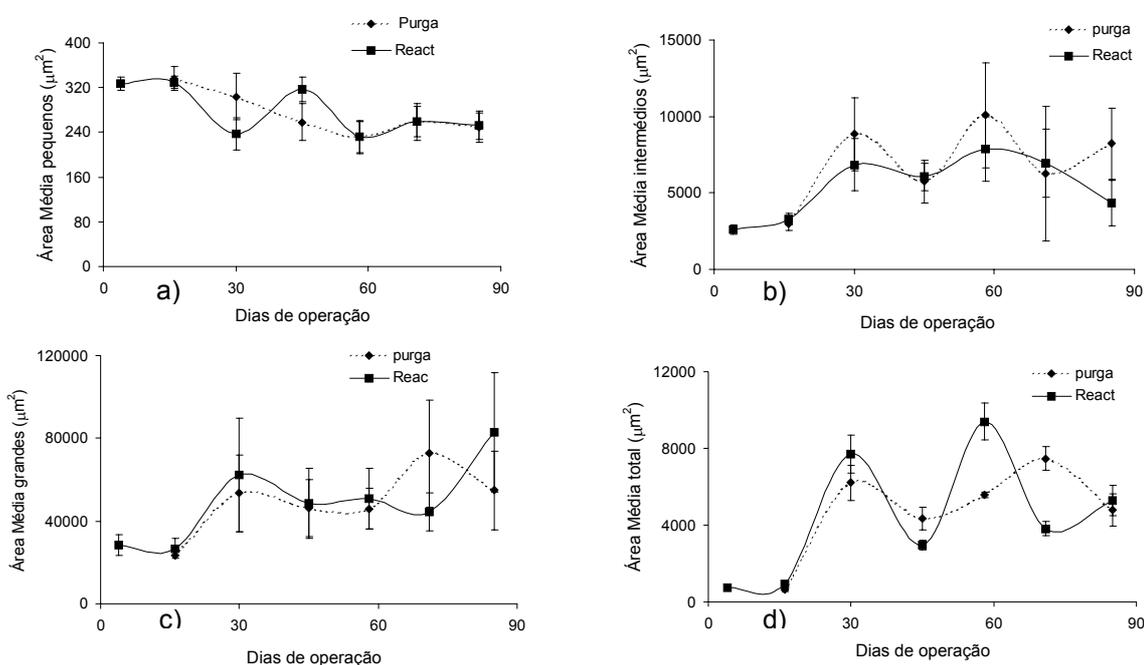


Figura 2.27 Evolução da área média dos flocos pequenos (a) dos flocos intermédios (b), dos flocos grandes (c) e da área média de todos (d) ao longo do tempo para o ensaio II

A percentagem de flocos pequenos (Figura 2.28 (a) e (b)), continua neste ensaio a ser a fracção dominante mas a fracção de flocos grandes é ligeiramente superior sendo quase similar aos flocos intermédios, nos últimos dias de amostragem, tanto no reactor como no T de amostragem.

O comprimento médio de filamentos manteve-se aproximadamente constante ao longo do ensaio e relativamente inferior ao verificado no ensaio I (Figura 2.29 (a)).

## 2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

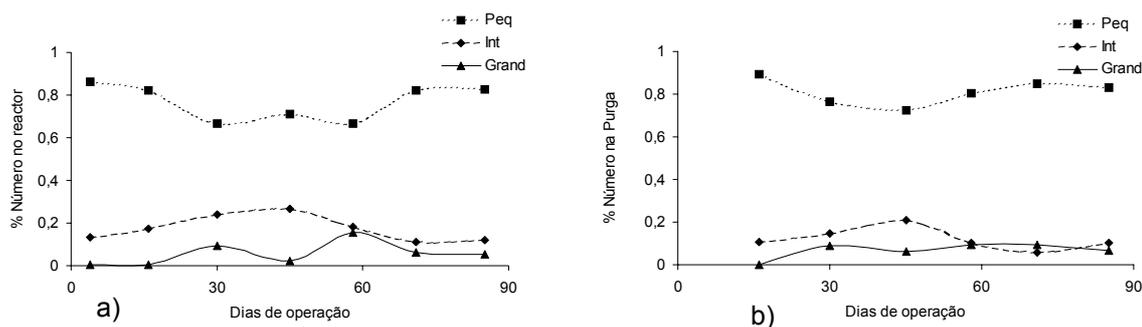


Figura 2.28 Evolução das percentagens das diferentes fracções de flocos no reactor (a) e no T de amostragem (b) para o ensaio II

O número de filamentos neste ensaio (Figura 2.29(b)) tem um comportamento nitidamente decrescente, tanto no reactor como na purga, que contrasta com a tendência do ensaio I. Em ambos os pontos de amostragem o número de filamentos presentes é inferior ao ensaio I.

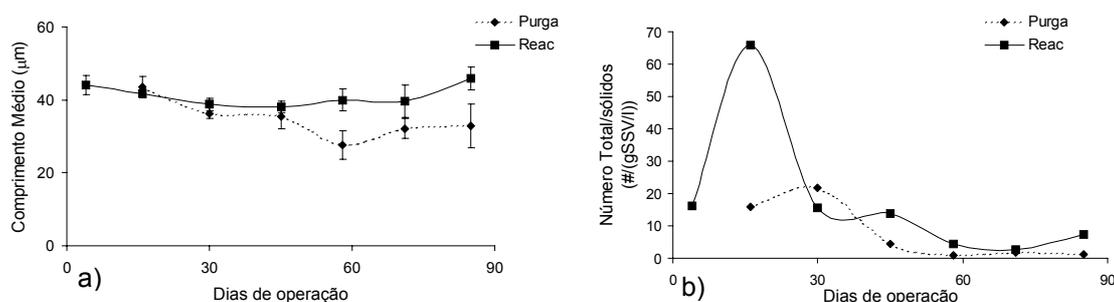


Figura 2.29 Evolução do comprimento médio (a) e do número total (b) para os filamentos no ensaio II

### Ensaio III

Este ensaio é um prosseguimento do ensaio II, pelo que o tempo de operação não recomeça do zero na Tabela 2-6. Nesta tabela estão representados, os valores dos SSV e as respectivas diluições realizadas nos diversos dias de amostragem.

Tabela 2-6 Resultados dos SSV (g/L) para o ensaio III e as respectivas diluições utilizadas

Dias de operação	Reactor		T de amostragem	
	SSV(g/L)	Diluições	SSV(g/L)	Diluições
114	27.26	1:25	1.13	1:1
127	26.92	1:100	0.76	1:1
141	26.3	1:50	0.65	1:1
155	24.5	1:90	0.65	1:1
169	31.52	1:60	1.43	1:1

A área média neste ensaio, em contraste com os dois anteriores decresce ao longo do tempo, tanto no reactor como na purga (Figura 2.30 (d)). A área média dos pequenos flocos (Figura 2.30 (a)) mantém-se aproximadamente constante, com uma tendência a estabilizar perto dos 250  $\mu\text{m}^2$ , sendo este valor ligeiramente inferior ao valor obtido no ensaio anterior. A área dos flocos intermédios (Figura 2.30 (b)) também diminui neste ensaio comparativamente ao anterior. No entanto, os grandes flocos, aumentam cerca de 10 vezes em área, notando-se uma diferença muito significativa entre o tamanho médio dos grandes flocos que permanecem no reactor e o dos que são lavados do mesmo (Figura 2.30 (c)).

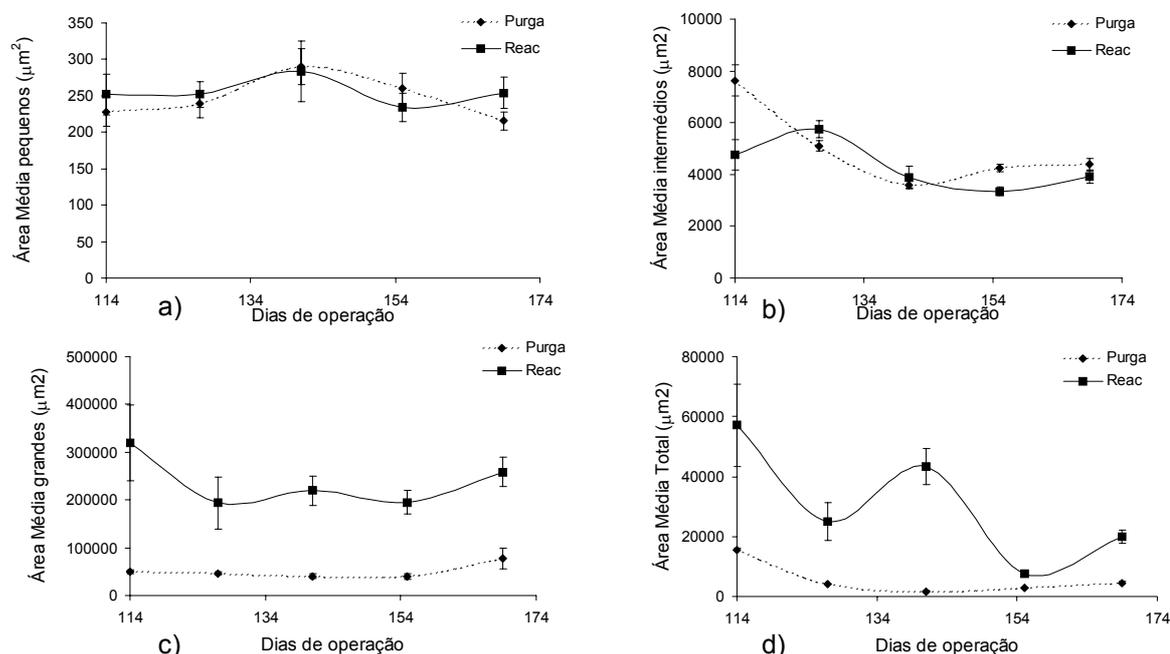


Figura 2.30 Evolução da área média dos flocos pequenos (a) dos flocos intermédios (b), dos flocos grandes (c) e da área média de todos (d) ao longo do tempo para o ensaio III

A maior fracção de flocos, presente nos dois pontos de amostragem, continua a ser os pequenos, mas numa percentagem menor, cerca de 60% (Figura 2.31 (a) e (b)). Em contrapartida a percentagem de intermédios e grandes aumentou no reactor. Só a percentagem de intermédios é que aumentou no T, os grandes flocos continuam quase inexistentes, neste ponto de amostragem.

## 2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

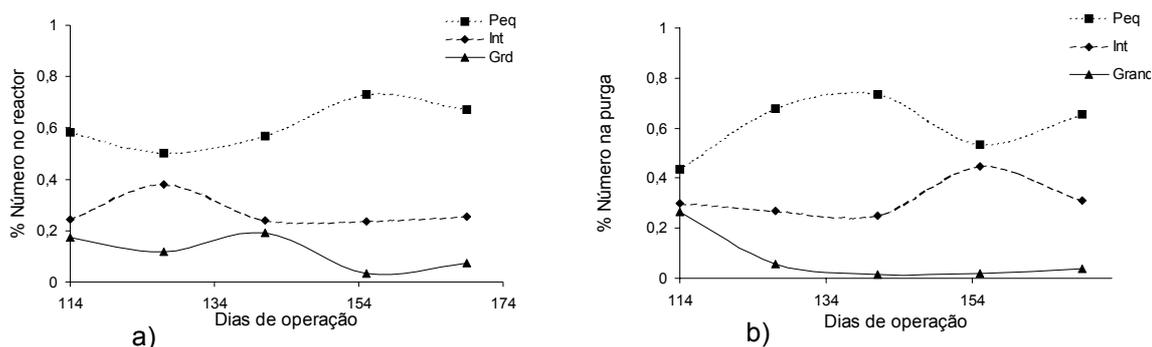


Figura 2.31 Evolução das percentagens das diferentes fracções de flocos no reactor (a) e no T de amostragem (b) para o ensaio III

O número de filamentos (Figura 2.32 (b)), no reactor, tem um comportamento oscilatório não definido, mas no T têm uma tendência crescente e estão presentes em muito maior número do que no ensaio anterior. Esta tendência de aumento do número de filamentos é contrária ao que se observou no ensaio II e pode significar que houve algum efeito de desagregação ou de crescimento de filamentos na forma livre que foram lavados do reactor.

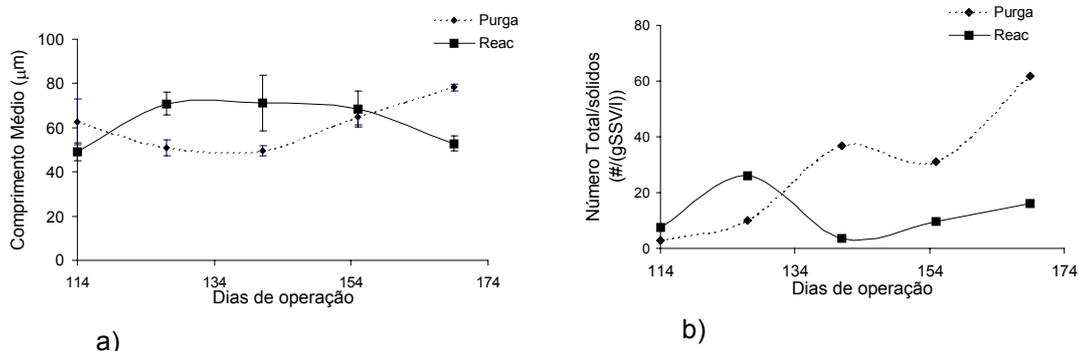


Figura 2.32 Evolução do comprimento médio (a) e do número total (b) para os filamentos no ensaio III

Os filamentos neste ensaio têm um comprimento médio ligeiramente superior ao ensaio anterior, tanto no reactor como na purga, (Figura 2.32 (a)).

Na Tabela 2-7 estão representados os valores da área média de cada fracção de tamanho de flocos nos vários ensaios. Verifica-se que tanto no reactor como no T de amostragem, a área média dos pequenos flocos quase não sofre alteração. A área média dos flocos intermediários, tem igualmente o mesmo comportamento nos dois pontos de amostragem, havendo um ligeiro aumento no segundo ensaio, mas decrescendo no terceiro ensaio. A área média dos flocos grandes cresce significativamente ao longo dos ensaios. Esse aumento não é tão acentuado na purga como no reactor, indicando uma selecção de agregados grandes dentro do reactor.

Tabela 2-7 Resumo dos resultados obtidos, para os três ensaios em área média das diferentes fracções

Ensaio	Reactor			Purga		
	Área média pequenos ( $\mu\text{m}^2$ )	Área média intermédios ( $\mu\text{m}^2$ )	Área média grandes ( $\mu\text{m}^2$ )	Área média pequenos ( $\mu\text{m}^2$ )	Área média intermédios ( $\mu\text{m}^2$ )	Área média grandes ( $\mu\text{m}^2$ )
1.º Ensaio	280	4151	39841	291	3912	37254
2.º Ensaio	280	5420	49198	273	7024	49439
3.º Ensaio	255	4335	237368	247	4495	50321

Na Figura 2.33 está representado um parâmetro que permite avaliar o estado de agregação da biomassa ao longo de todo o tempo dos ensaios de granulação. Este parâmetro representa o comprimento total de filamentos detectado por imagem dividido pela área total de flocos detectados por imagem. Verifica-se que nos estágios iniciais da granulação houve um aumento dos filamentos sem que se tivessem formado grandes agregados. Esse aumento era esperado já que se alimentava o reactor com um substrato que favorecia a selecção de microrganismos filamentosos acidogénicos e metanogénicos. A partir do dia 50 de operação (durante o primeiro ensaio) o comprimento total de filamentos livres/área de flocos diminuiu segundo uma exponencial decrescente significando que os filamentos deixaram de ser livres e que a área dos flocos aumentou.

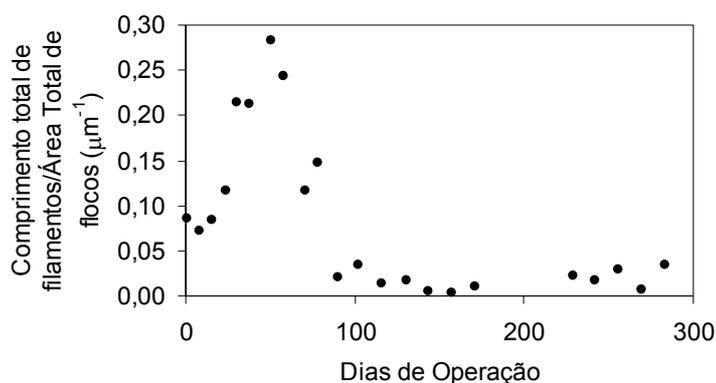


Figura 2.33 Evolução do comprimento total de filamentos/área total de flocos ao longo dos 3 ensaios de granulação

## 2.4.2 Resultados da microscopia electrónica

Todas as imagens que estão representadas são representativas, do conjunto de amostras analisadas.

### 2.4.2.1 Ensaio de desgranulação

As amostras de seguida representadas são provenientes do ensaio de desgranulação, referido em 2.3.1.2, com o reactor representado, na Figura 2.1.

O inoculo deste reactor é granular e é composto por uma camada muito compacta de diversos microrganismos como se pode observar pela Figura 2.34 (a e b). Segundo FANG ET AL., 1997, a camada exterior deste tipo de grânulos é composta por cocos, bastonetes de *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, sendo a maior parte destas bactérias acidogénicas e algumas metanogénicas. Outros autores observaram estas estruturas granulares, visualizando igualmente, microcolónias sintróficas de acetogénicas e metanogénicas como componentes estruturais dos grânulos provenientes do tratamento anaeróbio da indústria cervejeira (WU ET AL., 1996).

Ao fim de 129 dias de operação em contínuo, com uma alimentação crescente de oleato, obteve-se a biomassa apresentada na Figura 2.34 (c). Nas amostras analisadas não parece ter existido uma alteração significativa no tamanho. No entanto, a superfície dos grânulos, é bastante diferente, como é possível observar nas Figura 2.34 (d, e). Estas figuras representam o aspecto pormenorizado da Figura 2.34 (c).

A análise qualitativa de EDS (Energy Dispersion Spectrography) realizada com uma amostra do fundo do reactor indicou a presença de vestígios de sódio e cálcio assim como de oxigénio (Figura 2.35). O facto do reactor ser alimentado com oleato de sódio pode justificar a presença deste elemento no meio. Por outro lado, como o oleato de cálcio é bastante insolúvel tem tendência a precipitar no reactor e daí se detectar a presença de cálcio na biomassa.

A amostra retirada do topo do Reactor levou algum tempo a revestir, dado a sua superfície ser bastante porosa como se pode verificar pelas Figura 2.34 (g, h, i, j). Esta biomassa apresenta algumas semelhanças, com a amostra do fundo do reactor, no entanto a sua superfície é diferente. A estrutura da superfície parece ser a mesma, mas mais porosa, não tão compacta. Esta biomassa provavelmente tornou-se flutuante por ser mais leve.

As imagens obtidas sugerem que a biomassa no topo do reactor é constituída por grânulos partidos (Figura 2.34 (f)). O facto de o aumento da concentração de oleato, implicar uma desintegração dos aglomerados já foi reportada por PALMS ET AL. (1991). Este autor referiu que a biomassa continuava presente mas com um aspecto de superfície diferente. Este fenómeno de desintegração dos grânulos alimentados com ácido oleico foi analisado por análise de imagem por AMARAL ET AL. (2001) como já foi referido.

2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

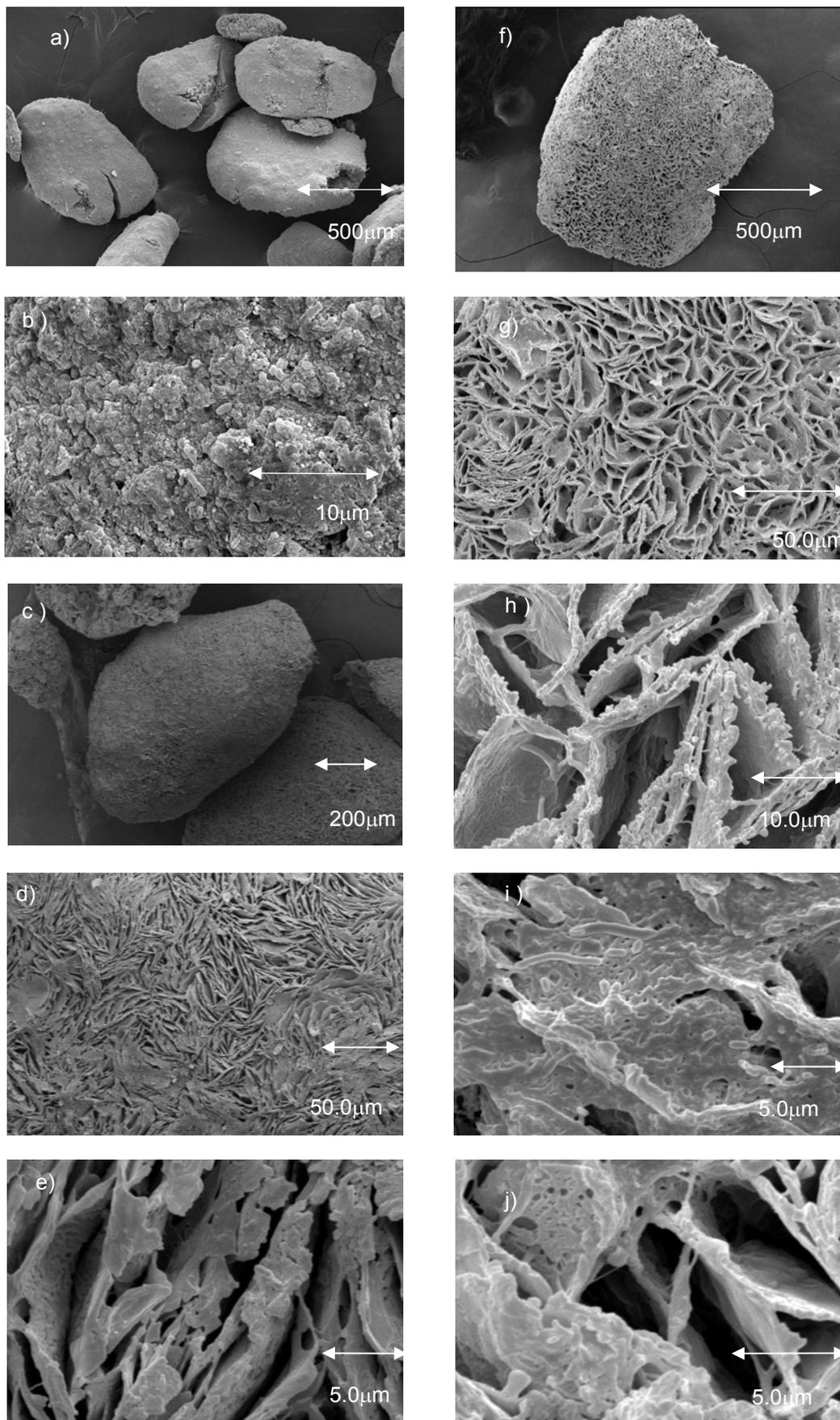


Figura 2.34 Resultados obtidos no microscópio electrónico, para o R EGSB. inoculo (a, b,) biomassa do fundo do reactor (c, d, e) do topo do reactor (f, g, h, i, j)

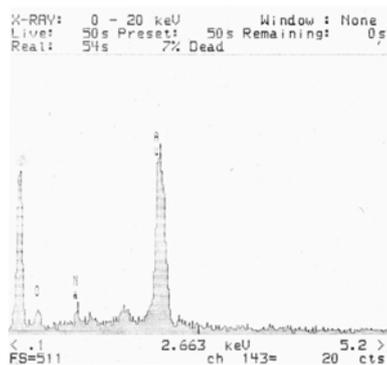


Figura 2.35 Análise qualitativa do agregado presente na Figura 2.34 (c)

Um dos mecanismos de remoção de ácidos gordos de cadeia longa em reactores anaeróbios é por bioadsorção (HWU ET AL.,1998). Segundo PEREIRA ET AL. (2001), foi visualmente detectado à volta dos grânulos, uma camada branca gelatinosa que se supõe ser de matéria adsorvida.

#### 2.4.2.2 Ensaio de granulação

##### Ensaio I

As imagens que se seguem correspondem às amostras retiradas do primeiro ensaio do reactor UASB, que teve como tempo de operação 83 dias, referido em anteriormente nos materiais e métodos.

A biomassa de natureza dispersa usada como inóculo, como se pode verificar pela Figura 2.36 (a, b), é composta por um conjunto de agregados microbianos.

Quando o ensaio terminou ao fim de 83 dias, obtiveram-se as imagens representadas na Figura 2.36 (d, c, f). Estas imagens são bastantes distintas do inóculo. Como se pode observar na Figura 2.36 (d) a maioria das bactérias presentes são filamentosas semelhantes ao género *Methanosaeta*. Na Figura 2.36 (c) é possível observar canais preferenciais, para a saída do biogás. Estes canais já foram observados por diversos autores (KOSARIC E BLASZCZYK, 1990, WU ET AL.,1996, HUSHOFF POL ET AL.,1989). Na Figura 2.36 (f) pode-se observar que as bactérias filamentosas presentes, estão unidas em cadeias compridas com a forma de bastonetes.

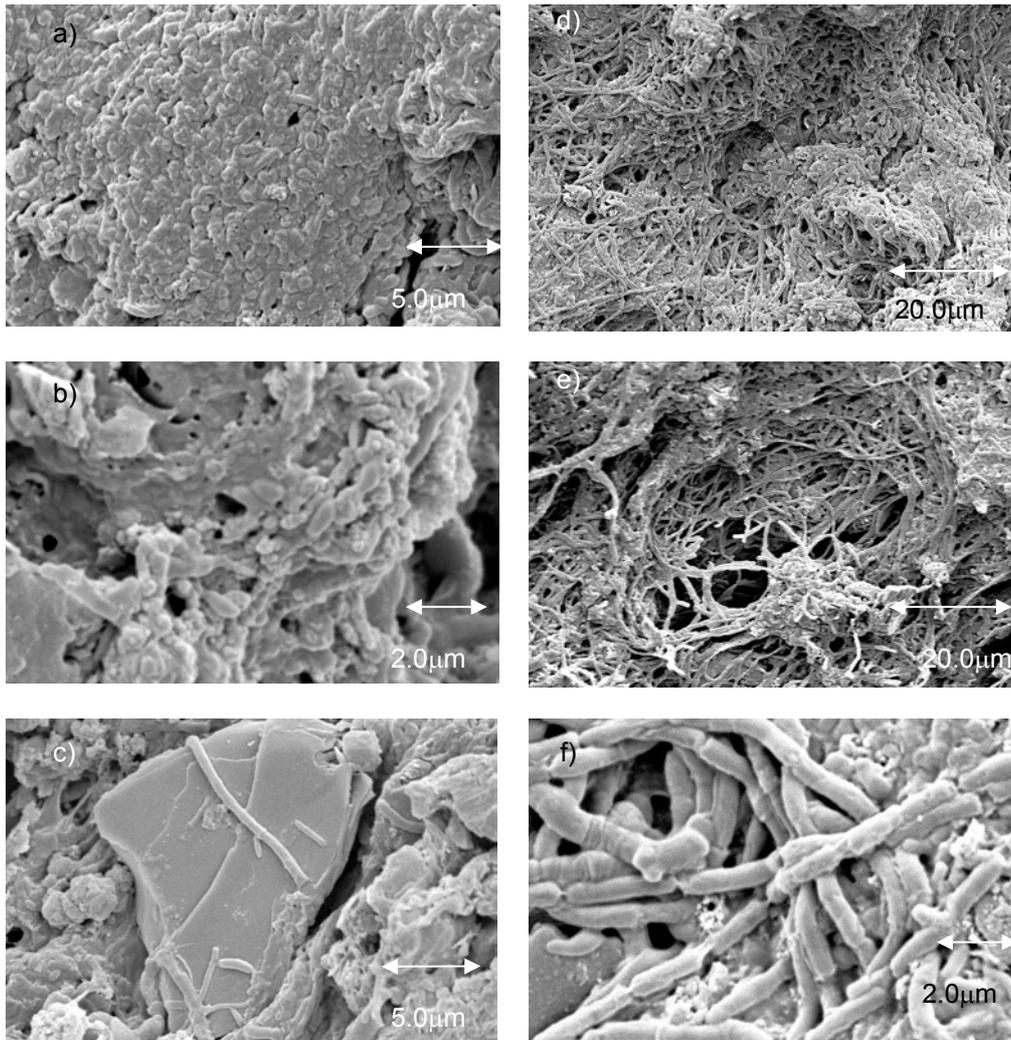


Figura 2.36 Resultados obtidos no microscópio electrónico para o Reactor UASB (1.º ensaio). inoculo (a, b, c) biomassa final do reactor (d,e,f,)

No decorrer da análise microscópica ao inoculo foram detectadas partículas de natureza não biológica tal como a que é representada na Figura 2.36 (c). Na Figura 2.37 está representada a análise por EDS desta partícula.

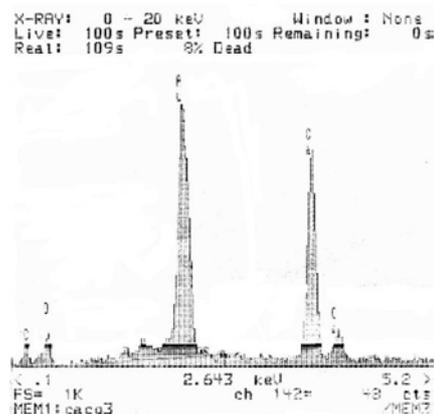


Figura 2.37 Analise qualitativa do objecto de natureza não biológica presente na Figura 2.36 (c).

Verifica-se que contém cálcio, sendo provavelmente carbonato de cálcio. Estes objectos de natureza não biológica encontrados no inóculo, possivelmente serviram de suporte para iniciar o processo de agregação das bactérias.

### Ensaio II e III

As imagens que se seguem correspondem a amostras retiradas, do segundo e terceiro ensaio, do reactor utilizado no processo de granulação. De seguida estão representadas as amostras correspondentes ao inóculo do 2º ensaio (Figura 2.38).

Como já foi referido, o inoculo deste ensaio, foi constituído por biomassa proveniente do ensaio anterior (Ensaio I) após lavagem com tampão anaeróbio, em conjunto com biomassa dispersa proveniente de um reactor UASB, à escala real de uma ETAR de tratamento de água municipais da cidade de Viana de Castelo.

Ao observar a Figura 2.38 (a, b, c, d, e, f), verifica-se que o aspecto geral é bastante semelhante ao da biomassa presente no reactor no final do ensaio I, o que seria de esperar.

As bactérias filamentosas semelhantes a *Methanosaeta* continuam presentes, com o mesmo aspecto e com a mesma organização. Muitas das cavidades observadas na superfície dos grânulos, podem ser canais para transporte para o gás ou para o substrato.

Na Figura 2.38 (g, h) está representada a biomassa proveniente da ETAR de Viana do Castelo, que não tem uma estrutura organizada à semelhança do inoculo do Ensaio I, mas os agregados de bactérias, como a *Methanosaeta*, já estão presentes. Estas bactérias têm uma forma distinta da biomassa final do ensaio I. Enquanto que na biomassa final do ensaio I são filamentos mais longos (Figura 2.38 (e)), na biomassa proveniente da ETAR têm uma forma de bastonete (Figura 2.38 (h)). Segundo FANG ET AL. (1997), a estrutura microbiana dos grânulos é diferente segundo a natureza do substrato, embora as mesmas bactérias estejam presentes.

Nas figuras obtidas da biomassa proveniente da ETAR da cidade de Viana de Castelo, estão presentes objectos minerais como o cálcio (Figura 2.39), neste aspecto existe igualmente, uma semelhança com a biomassa proveniente da ETAR da cidade da Maia.

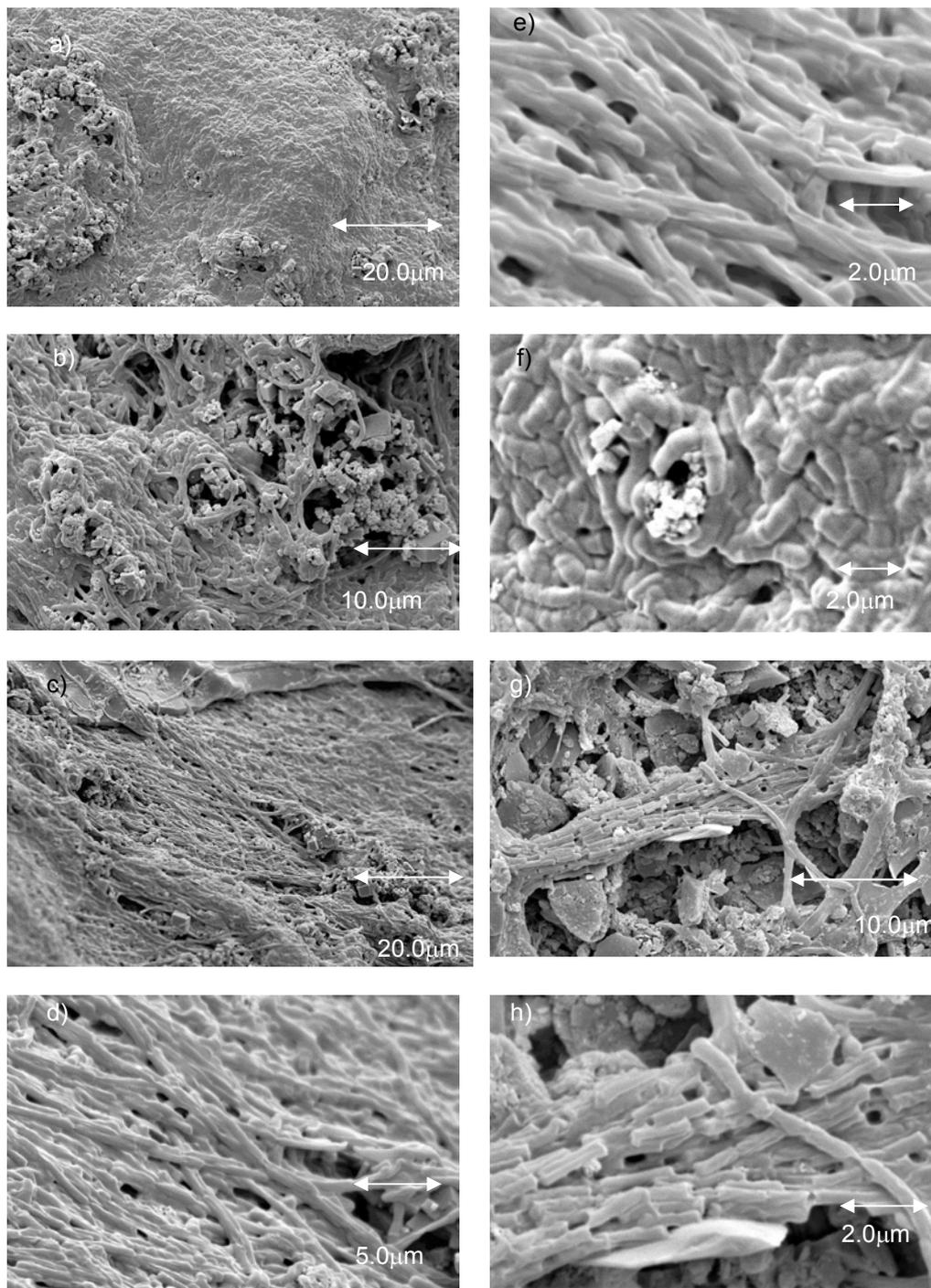


Figura 2.38 Resultados obtidos no microscópio electrónico para o inoculo do Reactor UASB (2.º ensaio). biomassa final do 1.º ensaio (a, b, c,d,e) biomassa final do reactor (g,h)

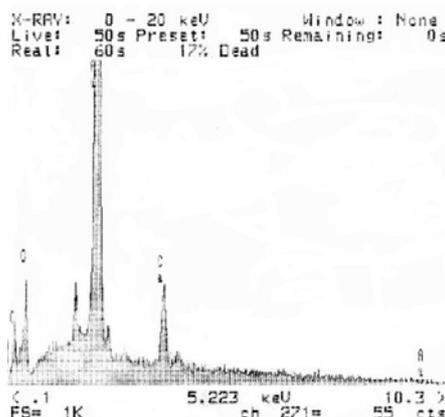


Figura 2.39 Análise qualitativa do objecto de natureza não biológica presente na Figura 2.38 (h).

As imagens seguintes correspondem à amostra retirada do fundo do reactor ao fim de dois meses de operação em contínuo (Figura 2.40). Desde o arranque do reactor, até esta data, o reactor sofreu uma diminuição do tempo de retenção hidráulico (TRH) de 60% (TRH inicial de 105 h, para TRH ao fim de 2 meses de 42 h), mantendo a mesma velocidade de carga orgânica teórica ( $0.7 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{dia}$ ).

A superfície da amostra apresenta algumas modificações significativas (Figura 2.40 (a)) embora não apresente ainda uma estrutura granular. O agregado microbiano correspondente a esta amostra, é constituído por uma matriz bastante diversa, sendo possível observar bactérias filamentosas, com um comprimento superior ao apresentado no inoculo (Figura 2.40 (b,c)). A Figura 2.40 (c) é bastante representativa da teoria “esparguete”, apresentada por, WIEGANT em 1987, e já descrita na introdução deste trabalho.

Observam-se bactérias com forma de cocos, bastante agregadas, como no caso da Figura 2.40 (d). Quando observada com mais pormenor, a Figura 2.40 (e), sugere que estes “cachos” são constituídos provavelmente pela *Methanosarcina*. É possível observar nas Figura 2.40 (f, g, h), bactérias filamentosas com alguma extensão, agarradas aos cachos de bactérias, com a forma de cocos.

As bactérias em forma de bastonete, parecem ter sido substituídas pelas bactérias filamentosas, ao fim de dois meses. Ainda estão presentes nesta amostra componentes não biológicos, com o encontrado na Figura 2.40 (f).

Segundo, HICKEY ET AL. (1991), grânulos que contenham a bactéria *Methanosaeta* com forma filamentosa tendem a crescer mais do que os grânulos que contenham a *Methanosaeta* com forma de bastonete.

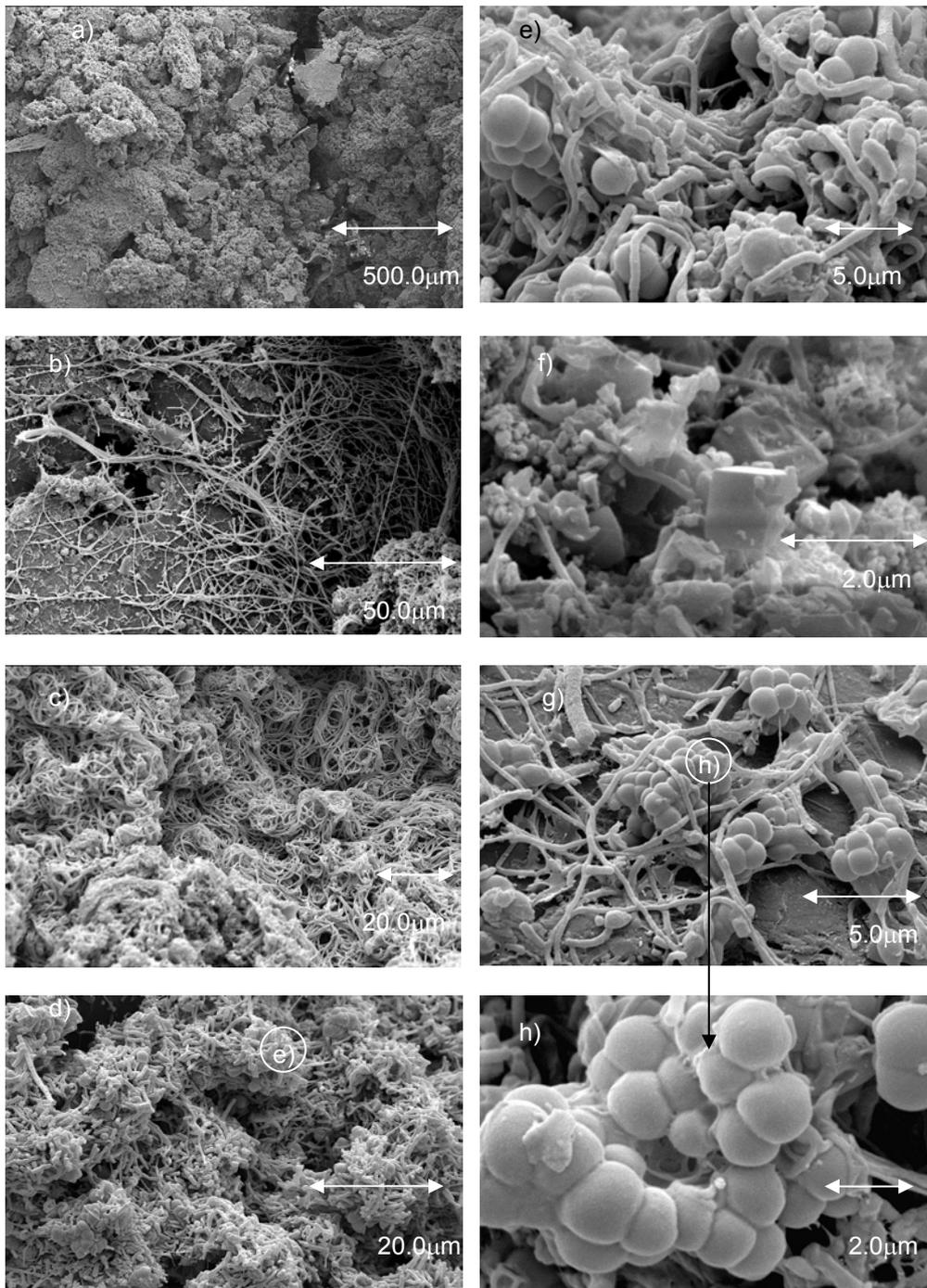


Figura 2.40 Resultados obtidos no microscópio electrónico para a amostra ao fim de 2 meses, aspecto geral (a,b,c,d,f,g), (e) aspecto pormenorizado do (d), (h) aspecto pormenorizado do (g)

As imagens seguintes correspondem as amostras ao fim de quatro meses de operação contínua do reactor (Figura 2.41). Esta amostra foi separada em três tamanhos visivelmente diferentes, que foram identificados da seguinte maneira, a fracção de maior tamanho como, grande aglomerado, a fracção de tamanho intermédio, como não finos, e por ultimo a fracção com tamanho inferior como finos. Nesta data também foi analisada o T de amostragem da purga do

## 2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

reactor. Desde o arranque até esta data, o reactor sofreu uma diminuição do tempo de retenção hidráulico (TRH) de 80.4% (TRH inicial de 105 h, para um TRH ao fim de 4 meses de 20.6 h) e a velocidade de carga orgânica teórica aumentou de  $0.7 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{dia}$  para  $1.5 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{dia}$ .

As imagens que seguidamente são apresentadas correspondem a um grande aglomerado (Figura 2.41).

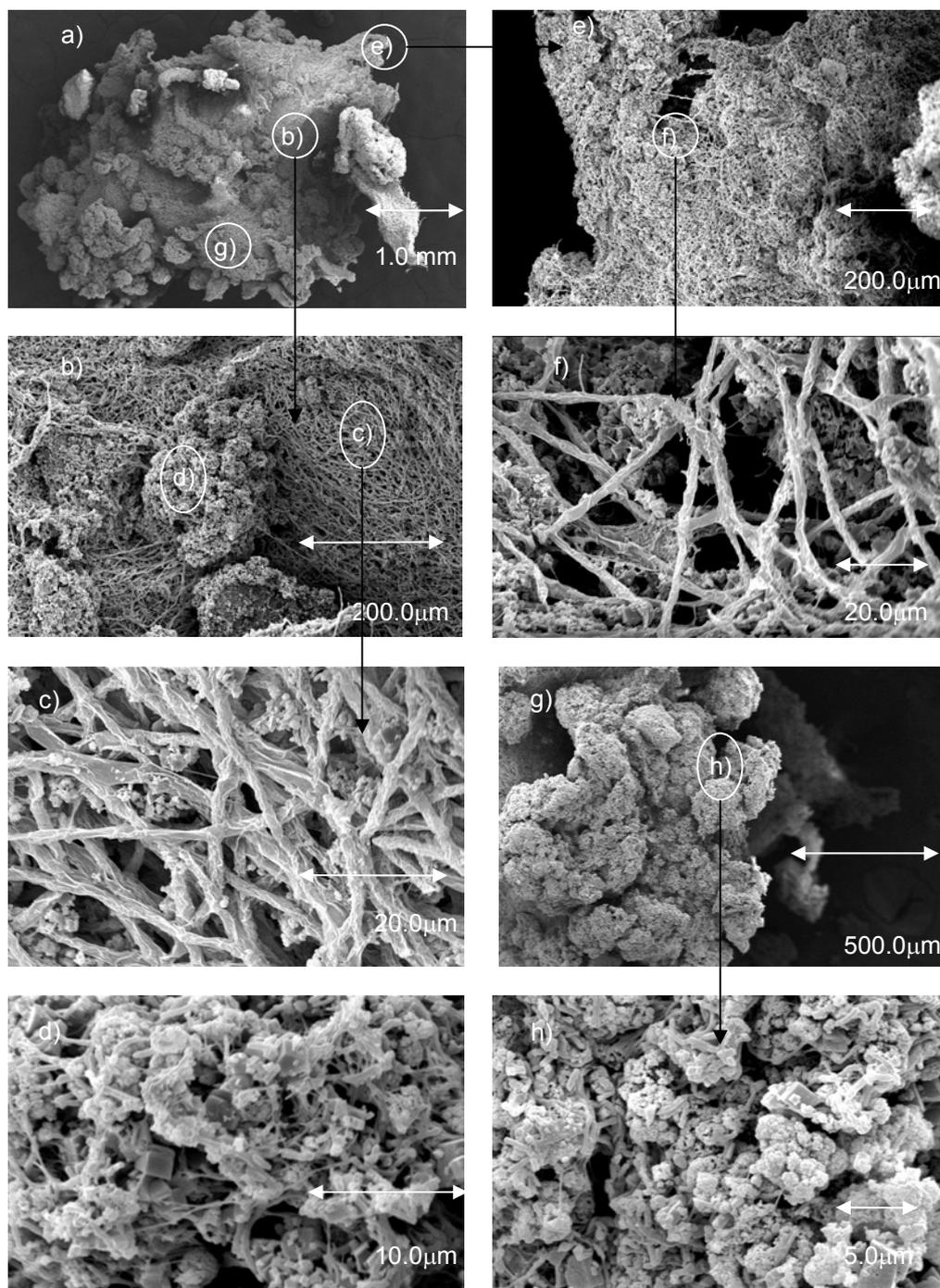


Figura 2.41 Resultados obtidos no microscópio electrónico para a amostra ao fim de 4 meses definida como grande aglomerado. (a) aspecto geral, (b,e,g) aspecto pormenorizado do grande aglomerado, (c,d) aspecto pormenorizado do (b), (f) aspecto pormenorizado do (e), (h) aspecto pormenorizado do (g)

Ao observar a Figura 2.41 (a), correspondente ao aspecto geral do grande aglomerado, já se pode observar uma estrutura que se assemelha em algo a uma estrutura granular. A este grande aglomerado parecem estar agarrados aglomerados mais pequenos, como o representado pela Figura 2.41 (g). A superfície do grande aglomerado (Figura 2.41 (b,e)) é constituída essencialmente por bactérias filamentosas semelhantes a *Methanosaeta* (Figura 2.41 (c, f)). Existem zonas em que as bactérias filamentosas estão agarradas a bactérias com forma de cocos (Figura 2.41 (d)).

Os pequenos aglomerados que estão agarrados (Figura 2.41 (g)), parecem ser constituídos por uma matriz um pouco mais complexa de bactérias filamentosas e bactérias com a forma de cocos, onde estas últimas parecem dominar a matriz. Estão igualmente presentes, constituintes não biológicos, minerais como o cálcio como se pode observar na Figura 2.42.

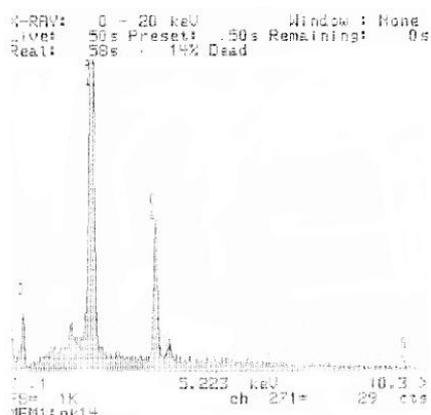


Figura 2.42 Análise qualitativa do objecto da Figura 2.41 (d).

As imagens que seguidamente são apresentadas correspondem à fracção de partículas que foram definidas anteriormente como não finos e finos (Figura 2.43).

Ao observar os aglomerados definidos como não finos (Figura 2.43 (a)), podemos verificar que têm uma forma granular, sendo estruturalmente semelhantes entre si. Existe uma semelhança na matriz biológica (Figura 2.43 (b)), com a biomassa retirada do reactor ao fim de dois meses. Esta é constituída por “cachos” de bactérias semelhantes a *Methanosarcina*, com bactérias filamentosas agarradas (Figura 2.43(c)).

Os aglomerados definidos como finos, têm igualmente formas granulares e similares entre si (Figura 2.43 (d, f)). A sua área é mais pequena como se tinha constatado visualmente, mas, no entanto, a matriz biológica da superfície é similar aos aglomerados não finos (Figura 2.43 (e, g)).

## 2. APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE IMAGEM E DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DURANTE PROCESSOS DE GRANULAÇÃO E DE DESGRANULAÇÃO

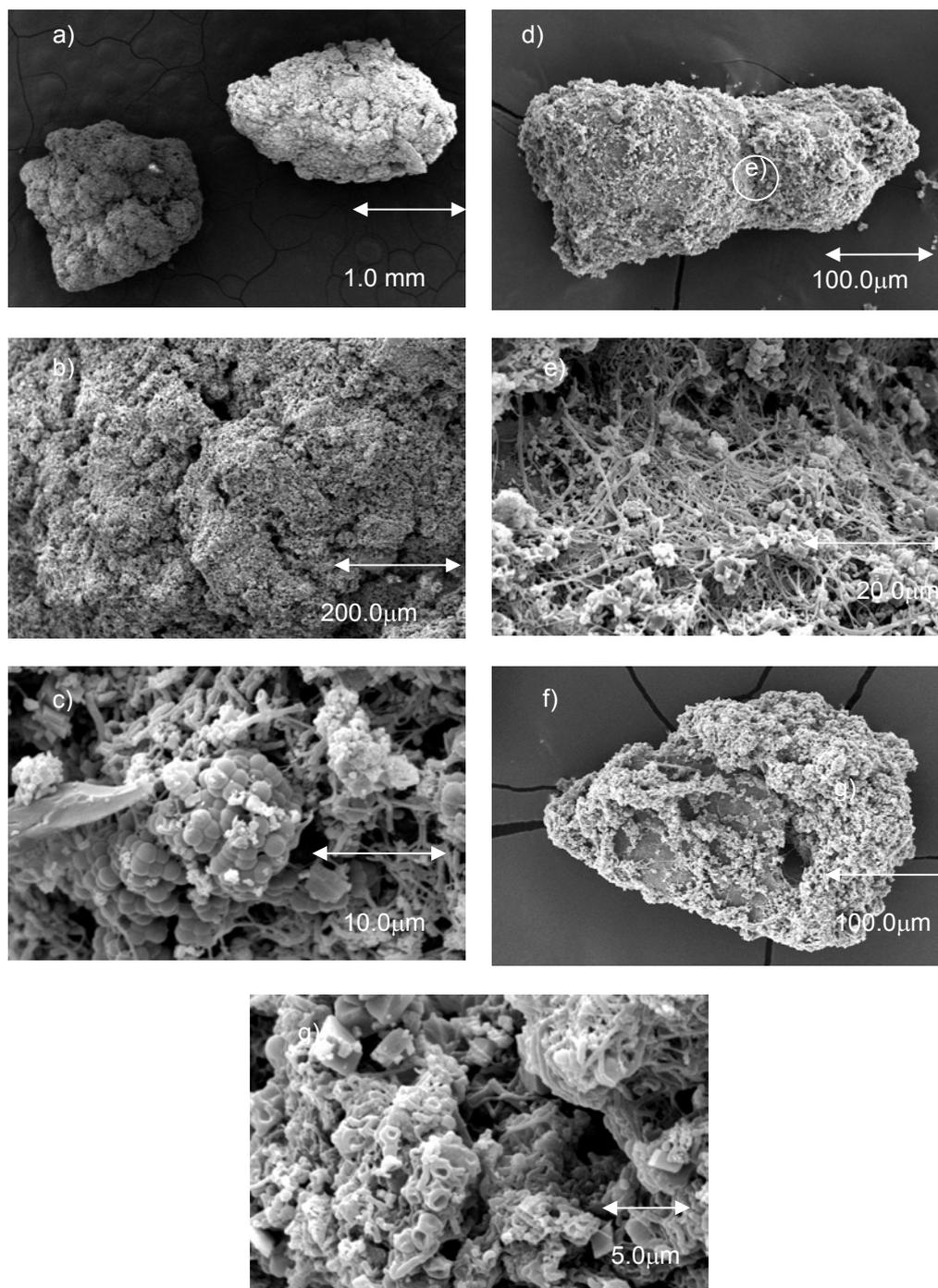


Figura 2.43 Resultados obtidos no microscópio electrónico para a amostra ao fim de 4 meses definida como não finos (a),(b, c) aspecto pormenorizado do (a), e(d, f,) definidos como finos, (e) aspecto pormenorizado do (d), (g) aspecto pormenorizado do (f)

Como se pode observar pela Figura 2.44 (a, b) as bactérias presentes são maioritariamente metanogénicas, estando distribuídas por todo o aglomerado (Figura 2.44 (c, d)).

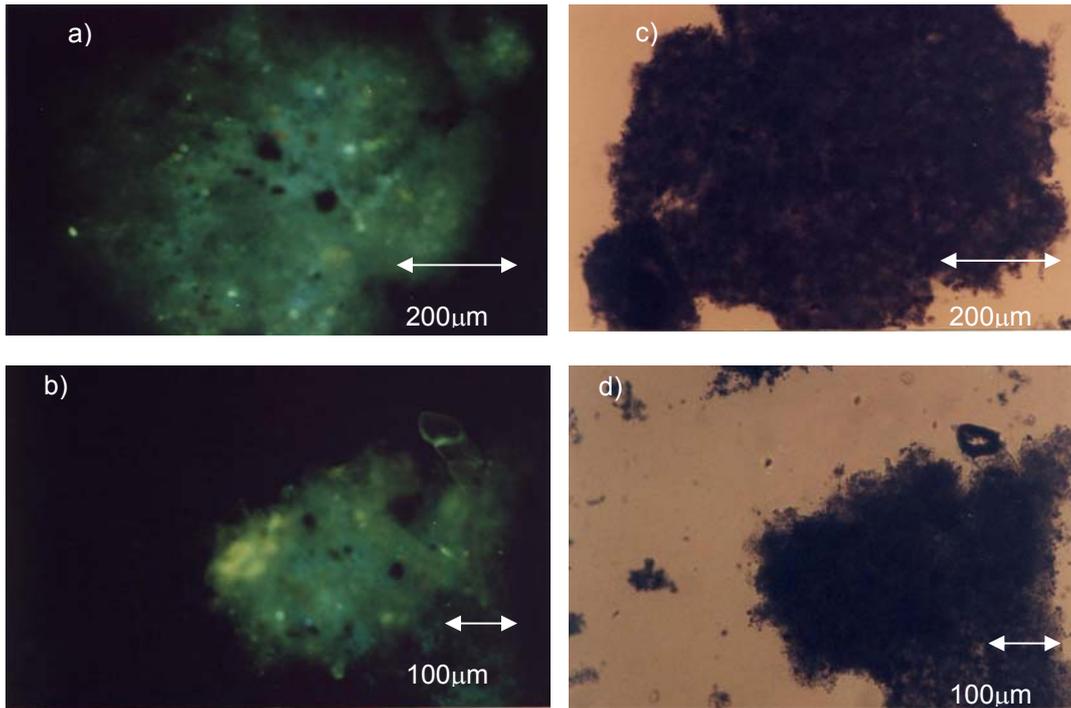


Figura 2.44 Imagem de autofluorescência a 420 nm (a, b) e a mesma imagem em campo normal (c, d) pertencentes a amostra do reactor UASB ao fim de 4 meses.

As imagens que seguidamente são apresentadas correspondem ao T de amostragem (Figura 2.45), referente ao sexto mês.

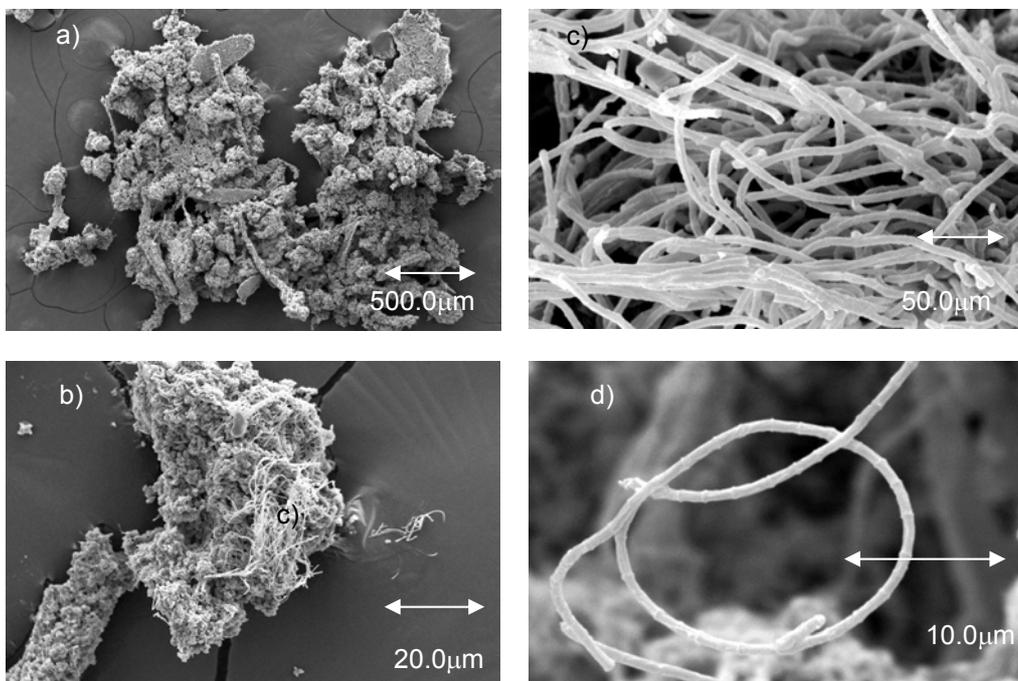


Figura 2.45 Resultados obtidos no microscópio electrónico para o T de amostragem, ao fim de 4 meses, (a,b) aspecto geral da amostra, (c) aspecto pormenorizado do (b), (d) aspecto pormenorizado de uma bactéria filamentososa.

A biomassa retirada do T de amostragem (Figura 2.45 (a, b)), não têm qualquer tipo de estrutura granular, são agregados dispersos sem forma definida. Esta amostra é constituída por agregados de bactérias filamentosas (Figura 2.45 (d)). Na Figura 2.45 (d) é possível observar em pormenor uma bactéria filamentosa. Esta amostra provavelmente foi expulsa do reactor, devido ao seu baixo tamanho e à sua estrutura desorganizada impedindo a sua sedimentação no reactor.

As imagens seguintes (Figura 2.46) correspondem às amostras ao fim de seis meses de operação contínua do reactor UASB. Desde o arranque do reactor até esta data, o reactor sofreu uma diminuição do tempo de retenção hidráulico (TRH) de 94.6% (TRH inicial de 105 h, para um TRH ao fim de 6 meses de 5.65 h) e a velocidade de carga orgânica teórica aumentou de 0.7 kg/m<sup>3</sup>. dia para 7.7 kg/m<sup>3</sup>. dia.

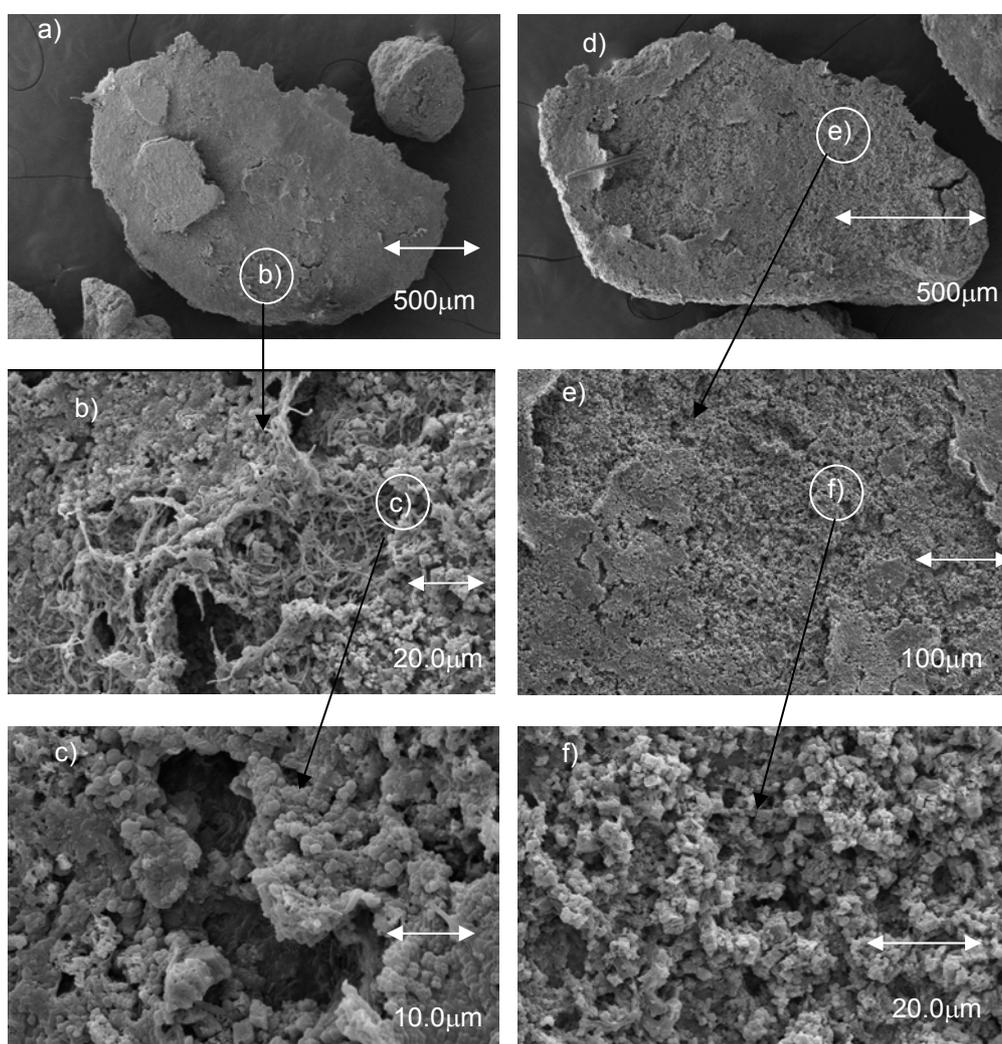


Figura 2.46 Resultados obtidos no microscópio electrónico para a amostra retirada do reactor ao fim de 6 meses, (a,d) aspecto geral da biomassa, (b,e) aspecto pormenorizado de (a,d), (c,f) aspecto pormenorizado de (b,e)

Ao observar a Figura 2.46 (a, d, e) é evidente que os agregados estão mais compactos, existindo poucos espaços livres na superfície dos grânulos e apresentando estes uma forma granular. Observando a Figura 2.46 (b) distinguem-se bactérias filamentosas em conjunto com

bactérias com uma forma de bastonete. Na Figura 2.46 (c, f) a forma de bastonete das bactérias é mais notória. Os poucos orifícios existentes nesta amostra (Figura 2.46 (b,c)) possivelmente servem para libertar o biogás ou para acesso do substrato.

De seguida estão representadas as amostras retiradas do topo do reactor (Figura 2.47) ao fim de seis meses. Estes grânulos flutuavam no topo do reactor sem sedimentar.

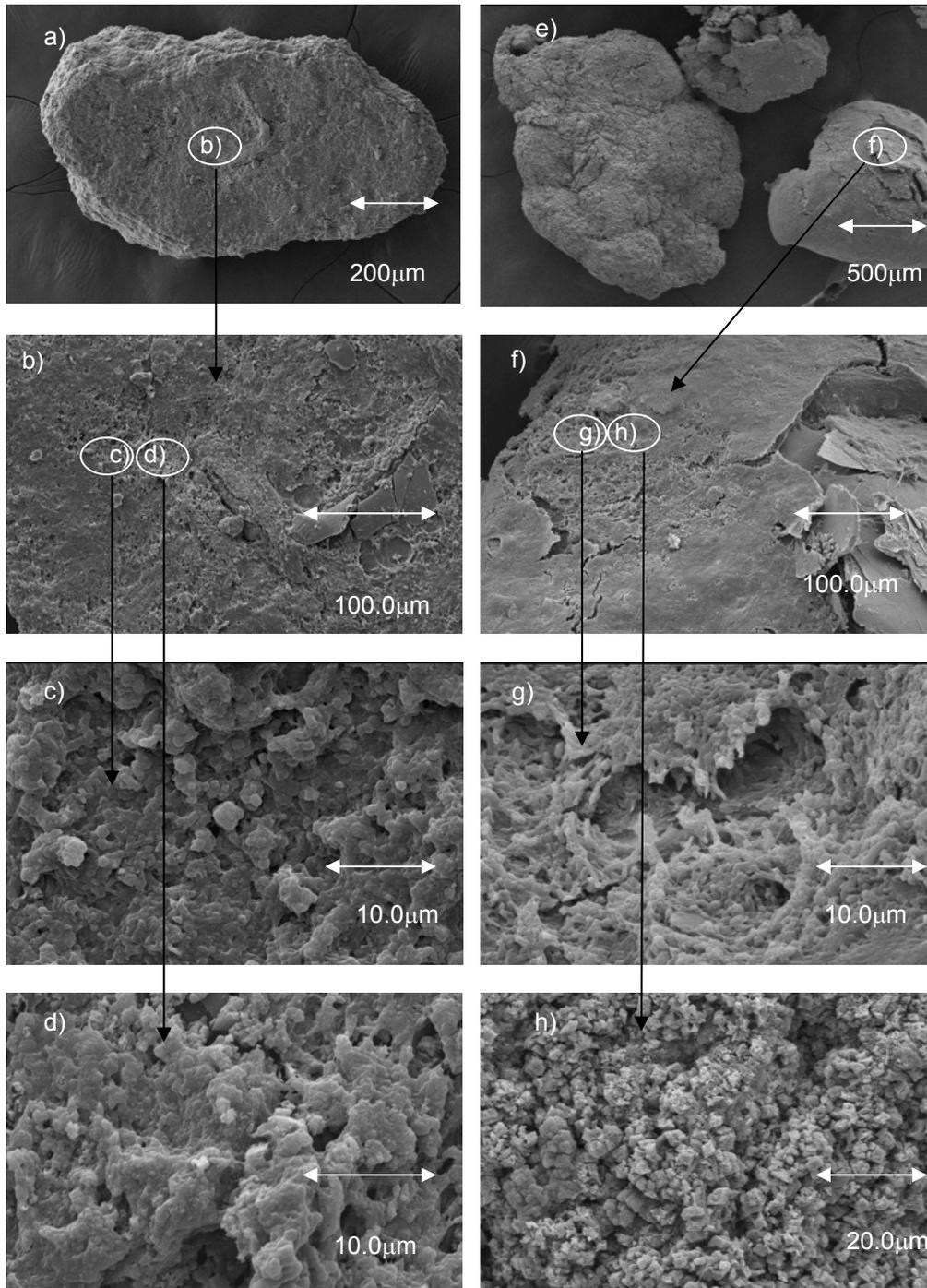


Figura 2.47 Resultados obtidos por microscopia electrónica para os grânulos flutuantes do 6.º mês, (a,e) aspecto geral dos grânulos flutuantes, (b,f) aspecto pormenorizado do (a,e), (c,d,g,h) aspecto pormenorizado (b,f)

O fenómeno de flutuação dos grânulos, foi reportado anteriormente por KOSARIC E BLASZCSYK (1990) E POR HULSHOFF POL (1989). Este fenómeno está associado a grânulos de grande dimensão assim como a grânulos cultivados em condições de baixa carga (LETTINGA ET AL, 1983). A flutuação da biomassa granular é causada por aprisionamento de biogás no centro do grânulo. Geralmente é aceite que estes espaços são criados por um decréscimo das bactérias situadas no centro do grânulo, devido à diminuição de substrato no interior do mesmo ou por uma elevada concentração de bactérias metanogénicas nesse local (KOSARIC E BLASZCSYK, 1990, ALPHENAAR ET AL., 1993). No entanto, se as cavidades são causadas pela diminuição de substrato no interior do grânulo, todos os grânulos terão tendência para flutuar, quando aumentarem de tamanho (YODA E NISHIMURA, 1997).

Segundo KOSARIC E BLASZCSYK (1990) E GROTHENIUS ET AL. (1991), os grânulos que obedecem a estas características, tenderão a partir devido à sua fraca estrutura, dando origem a pequenos fragmentos que mais tarde servirão de núcleo para outra geração de grânulos.

Os grânulos flutuantes (Figura 2.47 (a, e)) retirados do topo do reactor, apresentam uma estrutura granular, com uma superfície compacta (Figura 2.47 (d, f)). Ao observar a matriz da superfície em pormenor (Figura 2.47 (c, d, g, h)), visualiza-se um variado conjunto de bactérias, semelhante ao apresentado pelos grânulos retirados da mesma data do fundo do reactor.

## 2.5 Conclusão

A análise de imagem permitiu quantificar alterações morfológicas e de tamanho em consórcios microbianos anaeróbios durante processos de granulação e de desgranulação. Mediu-se a área média dos agregados e a área média de três gamas de tamanho de agregados definidas do seguinte modo: pequenos, entre 100 e 1000  $\mu\text{m}^2$  de área, correspondendo a um diâmetro equivalente entre 11.3 e 35.8  $\mu\text{m}$ , intermédios, entre 1000 e 20000  $\mu\text{m}^2$  de área, correspondendo a um diâmetro equivalente entre 35.8 e 159.6  $\mu\text{m}$  e grandes, superiores a 20000  $\mu\text{m}^2$  de área, correspondendo a um diâmetro equivalente superior a 159.6  $\mu\text{m}$ . Foi possível determinar a fracção em número de cada uma das gamas de tamanho de agregados acima definidas ao longo do processo. Pela quantificação do comprimento total de filamentos livres e da relação entre esta medida e a área dos flocos foi possível monitorizar o estado de agregação da biomassa de uma forma quantitativa.

Foi dada especial importância à quantificação e minimização de erros introduzidos nos resultados obtidos para os parâmetros morfológicos devidos à diluição das amostras. Concluiu-se que a diluição óptima a realizar nestes ensaios não depende só da concentração da biomassa mas também das características (tamanho e estrutura) da mesma. É importante a optimização da recolha, evitando romper ligações entre os agregados de biomassa.

A análise qualitativa de imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento permitiu observar alterações da população bacteriana ao longo do processo de granulação e também antes e após o fenómeno de desgranulação.

Com a diminuição do tempo de retenção hidráulico e conseqüente aumento da carga orgânica a biomassa começou a apresentar características diferentes. Nos inóculos utilizados já se encontravam bactérias filamentosas que poderiam ser do género *Methanosaeta*, mas sob a forma de bastonete. Com a maturação da biomassa, estas são substituídas por bactérias filamentosas. Durante o processo de granulação, também se detectaram bactérias semelhantes a *Methanosarcina*. Num estado granular, as bactérias do género *Methanosarcina* deixam de ser tão evidentes na superfície da biomassa.

## 3. Hibridização com Sondas Genéticas

---

### Sumário

Neste capítulo, apresentam-se resultados preliminares, sobre a aplicação da técnica de hibridização “in situ” com sondas genéticas. Após de uma descrição da técnica, é feita a identificação de microrganismos do domínio bactéria e do domínio arqueo, presentes em grânulos anaeróbios. Utilizou-se a sonda Arc915 marcada com o corante fluorescente CY3 e a sonda Eub338 marcada com fluoresceína para os domínios arqueo e bactéria, respectivamente.

3.1 Introdução	62
3.2 Objectivo	68
3.3 Materiais e métodos	69
3.4 Resultados e discussão	74
3.5 Conclusão	78

## 3.1 Introdução

### 3.1.1 Hibridização com sondas genéticas (FISH)

No início dos anos 80, descobriu-se que a sequência das moléculas dos ácidos ribonucleicos (RNA), existiam em múltiplas cópias nas células, cerca de  $10^4$  a  $10^5$ , abrindo o caminho para a era da identificação genética. Na década de 80, Carl Woese e os seus colaboradores, conseguiram classificar a subunidade menor do RNA ribossomal, a molécula 16S (SSU- small subunit of the ribosome), como sendo um marcador molecular poderoso a nível da identificação e classificação filogenética. Esta descoberta implicou uma alteração das árvores filogenéticas, até então existentes, assim como a relação entre os procariotas (LUDWIG E SCHLEIFER, 1999). A nomenclatura S indica a unidade de Svedberg, que mede a velocidade de sedimentação dos ribossomas, numa ultracentrifuga, desenvolvida por Theodore Svedberg (SMITH, 1984).

No fim dos anos 80, princípio dos anos 90, instaurou-se um novo método aplicado com sucesso aos estudos ambientais, que consiste na hibridização com marcadores biológicos. Este novo método, deu origem ao aparecimento de uma nova disciplina, a ecologia molecular, que se tornou uma disciplina emergente, em que se utilizam os marcadores biológicos para identificação dos microrganismos presentes nas mais diversas amostras. A utilização do rRNA, nestes estudos, é justificada pelo facto deste ser o mais abundante dos 3 tipos do RNA (mRNA, tRNA, rRNA). Em algumas bactérias o rRNA pode conter até 80% do RNA total da célula.

Existem dois tipos de hibridização com sondas de oligonucleotídeos: A hibridização "Slot Dot", que consiste, na comparação quantitativa, de determinada molécula 16S rRNA alvo, com a quantidade de 16S rRNA total da amostra a analisar. Esta técnica é obtida através da hibridização de uma mistura de ácidos nucleicos extraídos da amostra, com uma sonda de oligonucleotídeos específica para a molécula 16S rRNA alvo e uma sonda de oligonucleotídeos universal para o restante 16S rRNA da amostra. A quantificação é obtida através do cálculo da abundância relativa, que se obtém, dividindo a quantidade da sonda específica hibridizada, pela quantidade da sonda universal hibridizada.

Estes valores de relativa abundância do rRNA não podem ser directamente traduzidas em número de células, na medida em que células de diferentes espécies possuem conteúdos ribossomáticos diferentes. Mesmo para a mesma espécie, o conteúdo ribossomático pode variar com o estado de crescimento das células. No entanto, esta quantificação representa uma medida razoável da actividade fisiológica da respectiva população (AMANN ET AL., 1995). O outro método, é a hibridização "in situ".

A hibridização "in situ" de fluorescência vulgarmente conhecida por FISH ("fluorescent in situ hybridization") é uma técnica, onde o uso de sondas permite que duas ou mais sequências de 16S rRNA possam ser localizados na célula intacta.

A hibridização “Slot Dot “ é similar à hibridização “in situ”, mas na primeira, a hibridização dá-se nos ácidos nucleicos extraídos, e na segunda, a molécula 16 S rRNA alvo, é hibridizada na célula intacta. Ambas usam as sondas específicas para a sequência alvo e uma sonda universal para a detenção da toda a célula. No caso do FISH, é usado uma solução de DAPI que detecta todo o DNA, presente na célula.

Estas novas técnicas de identificação microbiana, vieram melhorar o estudo da ecologia microbiana nos digestores anaeróbios, permitindo ultrapassar as limitações das técnicas tradicionais, em que era obrigatório o cultivo das espécies. No caso dos microrganismos anaeróbios essas técnicas são especialmente críticas devido às baixas taxas de crescimento, e à necessidade de condições anaeróbias estritas (RASKIN ET AL., 1994).

As primeiras tentativas para caracterizar as amostras ambientais, através do estudo do RNA ribossomal (rRNA), começou pela utilização da molécula 5S rRNA. Estas moléculas eram directamente extraídas das amostras, separando-se por electroforese conforme a comunidade a que pertenciam. A sua sequência era analisada e comparada com as bases de dados, para encontrar a localização do microrganismo na árvore filogenética. A separação por electroforese da molécula 5S rRNA de espécies diferentes limitou esta metodologia a ecossistemas menos complexos. Estes estudos pioneiros tiveram o seu interesse, mas a informação contida na molécula 5S rRNA é relativamente reduzida, dado que só contem informação de 120 nucleótidos. A separação por electroforese da molécula 5S rRNA de espécies diferentes limitou esta metodologia a ecossistemas menos complexos (AMANN ET AL., 1995).

Na maioria dos ensaios de hibridização assistiu-se a uma substituição da utilização da molécula 5S rRNA, pelas moléculas 16S rRNA com informação de 1500 nucleótidos ou pela molécula 23S rRNA com informação de cerca de 3000 nucleotídeos. Estas duas moléculas contêm mais informação, podendo ser as espécies mais diferenciadas entre si, alcançando-se uma análise mais precisa dos microrganismos e a sua localização na árvore filogenética mais correcta (AMANN ET AL 1995). Sendo as moléculas 16S e 23S consideradas as “moléculas de ouro” da ecologia molecular, a sua comparação analítica está pela primeira vez na história da microbiologia, a facilitar a reconstrução das árvores universais filogenéticas (AMANN ET AL., 1995).

Segundo AMANN E LUDWIG (2000), existem várias razões para usar tanto a molécula 16S/18S (SSU rRNA) a mais pequena subunidade ribossomal (Figura 3.1) ou a molécula 23S/ 28S rRNA (LSU- large subunit ribosome), a maior subunidade do ribossoma, como moléculas alvo dos biomarcadores, das quais se podem referir as seguintes:

- Estão sempre presentes em todas as células;
- A sua elevada ampliação natural, com um elevado número de cópias por célula ( $10^4$ ), aumenta largamente a sensibilidade das sondas de rRNA alvo;
- O facto das células bacterianas possuírem moléculas que devido a sua função essencial, têm poucas mutações como é o caso das moléculas 16S e 23S, ambas componentes dos ribossomas;
- A aparente falta de transferência lateral de genes;
- A sua presença em várias regiões, o que torna útil para discriminar a subespécie a um nível superior na árvore filogenética;
- A existência de muitas sequências já conhecidas e decodificadas. Aproximadamente 22 000 SSU rRNA e 500 LSU rRNA estão depositadas em bases de dados;
- As estruturas primárias das moléculas 16S e 23S, são compostas por regiões de sequências tanto de baixa como de elevada conservação, ao longo do processo evolutivo.

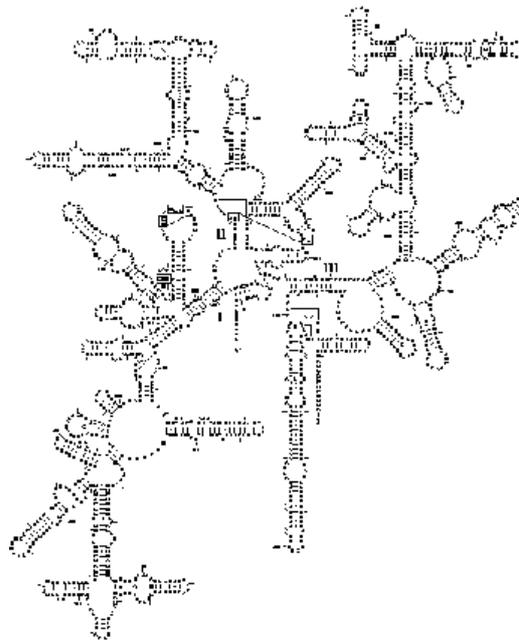


Figura 3.1 Modelo esquemático da molécula 16S rRNA (SSU)

Através da comparação e análise das sequências de RNA, arquivadas e classificadas nas diversas bases de dados, uma pesquisa comparativa das potenciais zonas alvo permite efectuar o desenho e construção das sondas para um determinado grupo, género ou espécie de microrganismos. Normalmente as sondas são constituídas por um oligonucleotídeo, com uma sequência de 16 a 20 bases quimicamente sintetizadas, complementares da pequena região específica do RNA ribossomal do microrganismo alvo. As sondas são alvo de uma região pequena, que pode ser típica para um grupo de bactérias, géneros ou espécies. Na extremidade final do oligonucleotídeo, 5', está ligado um marcador fluorescente. Existem vários marcadores fluorescentes, nomeadamente fluoresceína (FLUOS) (com uma onda de excitação de 490 nm, e onda de emissão de 520nm), tetrametilrodamina (550nm, 575nm), e os fluorocromos CY3, CY5 e

CY7, no entanto devido a sua relativa fotoestabilidade o fluorocromo CY3 tornou-se o marcador mais usual (AMANN, 1995).

Se a sonda tiver a sequência da molécula 16S ou da molécula 23S do microrganismo alvo, e como geralmente há varias cópias de rRNA por célula, ocorre a hibridização das células podendo assim ser detectadas no microscópio de epi-fluorescência.

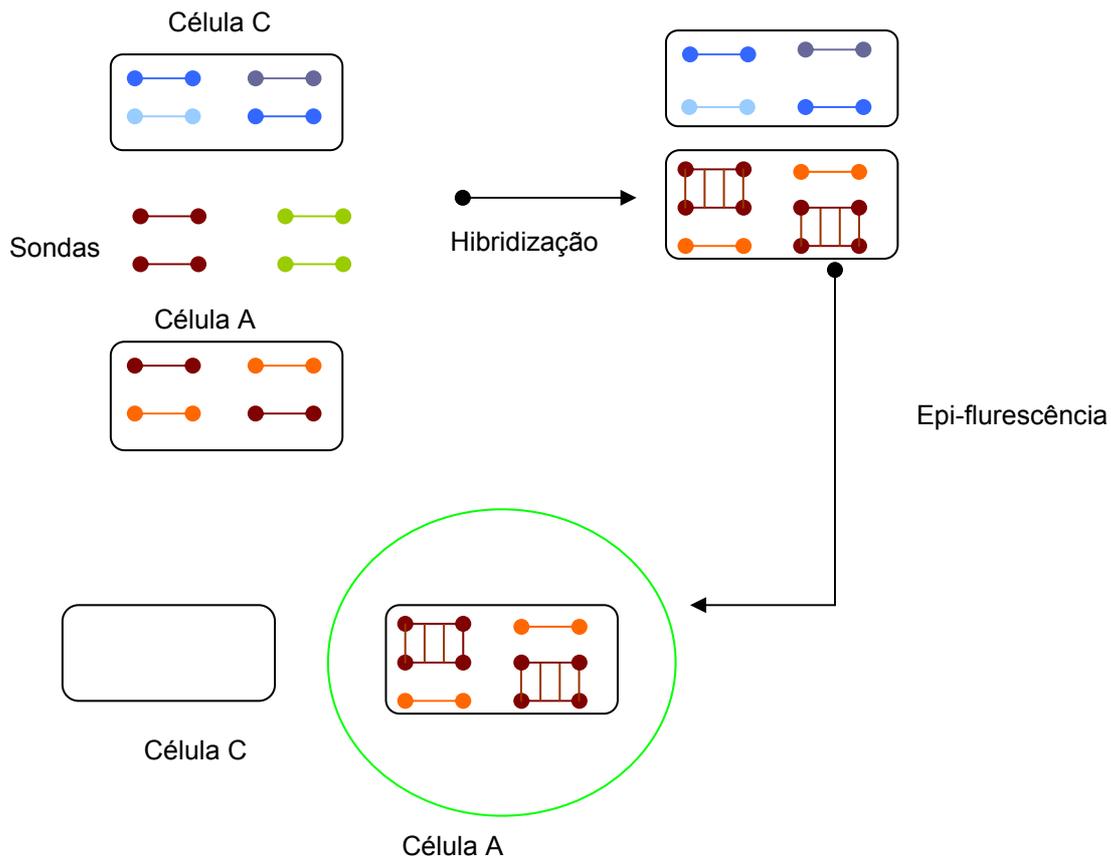


Figura 3.2 Esquema sintetizado do processo de hibridização "in situ" de uma célula

No entanto existem limitações associadas ao uso das sondas e à utilização das moléculas alvo. O 16S rRNA tem de se encontrar bem conservado para se poder distinguir entre populações relacionadas. Espécies diferentes podem ter idênticas sequências de 16S rRNA, nestes casos é preferível usar sequências de 23S rRNA, as quais têm aproximadamente o dobro do comprimento e contêm regiões altamente variáveis e distintas entre espécies similares (FOX ET AL., 1995). A heterogeneidade encontrada por vezes nos operões do rRNA de um simples organismo pode também ser um problema (NÜBEL ET AL., 1996). O operão é o gene responsável pelo controlo de uma série de processos bioquímicos, estando muitas vezes adjacente a outro, numa ligação à molécula de DNA (SMITH, 1984). Outra grande limitação é o facto de a diversidade do rRNA só estar ainda parcialmente descrita (AMANN, E LUDWIG, 1995). O inconveniente deste aspecto, reside no facto de ao utilizar uma sonda, mesmo que bem construída, esta pode hibridizar microrganismos que ainda não estejam identificados e levar a um erro crasso de identificação. O

ideal é testar uma população com mais de que uma sonda, pois pode haver organismos do mesmo grupo filogenético, em que a sequência alvo não seja perfeitamente igual.

Outro aspecto a considerar é o facto da especificidade e sensibilidade das sondas depender das condições exactas de hibridização. Parâmetros tais como, temperatura de hibridização, concentração das soluções de lavagem e de hibridização têm de ser optimizados. A maioria dos microrganismos são permeáveis às sondas de oligonucleotídeos por fixação com aldeídos (como a formalina, o paraformaldeído ou o glutaraldeído) e com álcoois (etanol e metanol). Também é a fixação que protege as células para os restantes tratamentos, pois na hibridização as células ficam expostas a elevadas temperaturas, detergentes e grandes gradientes osmóticos.

O FISH, segundo alguns autores, não pode ser considerado um método quantitativo, pois torna-se difícil estabelecer uma correlação entre a intensidade da hibridização e o número de células. A quantidade do rRNA celular depende do estado fisiológico da célula, sendo de referir que um aumento de actividade de uma população se encontra directamente relacionado com um aumento de número de células, logo de ribossoma celular (AMANN E LUDWIG, 1995). Contudo, BINNERUP ET AL. (2001), obtiveram uma correlação entre a concentração do rRNA e o número de operões de rRNA, em culturas puras para a "*Pseudomonas putida*", num biorreactor de degradação de tolueno.

### 3.1.2 FISH aplicado à estrutura biológica granular

As bactérias metanogénicas (Figura 3.3) são filogeneticamente coerentes com o reino *Eurya-archaeota* que em conjunto com a *Crena-archaeota* constituem o domínio *arqueo* (*archaea no esquema*). As bactérias metanogénicas foram o primeiro grupo a ter a sua taxonomia baseada no estudo da sequência 16S rRNA (RASKIN ET AL., 1994).

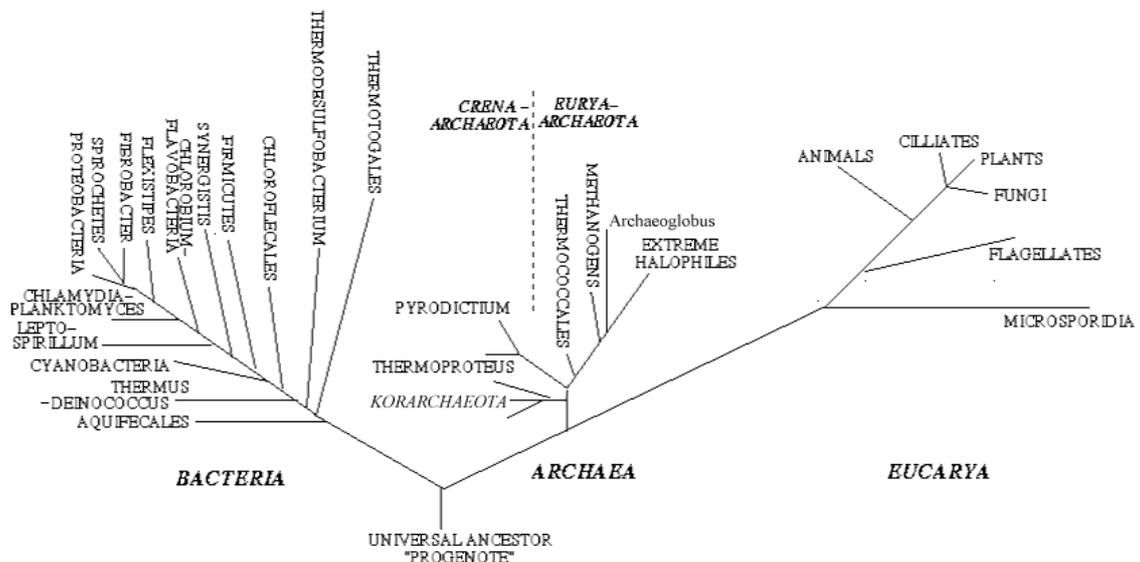


Figura 3.3 Árvore filogenética universal baseada na análise da molécula 16S rRNA

Nos grânulos dos reactores UASB, existem vários grupos de microrganismos, organizados num biofilme esférico altamente estruturado. Este biofilme tem sido largamente estudado e vários aspectos têm sido descritos quanto à função dos microrganismos presentes e sobre a sua organização espacial. Normalmente a camada interior consiste em bactérias metanogénicas acetoclasticas, sendo a camada exterior constituída por bactérias fermentativas (SEKIGUCHI ET AL.,1999).

Na ultima década foram identificadas sondas, para microrganismos anaeróbios, em biorreactores (RASKIN ET AL., 1994), e vários trabalhos usando, o FISH foram realizados, em reactores anaeróbios, como é o caso da detecção e localização de bactérias presentes em reactores alimentados com propionato (HARMSSEN ET AL., 1996), a caracterização molecular do consorcio metanogénico de um bioreactor alimentado com tolueno (FICKER ET AL., 1999), a identificação microbiana de reactores anaeróbios alimentados com efluentes corados (PLUMB ET AL., 2001), e a caracterização do consórcio microbiano de biomassa granular de degradação de tereftalato (WU ET AL., 2001).

## 3.2 Objectivo

O objectivo deste capítulo consistiu na utilização e optimização preliminar da técnica de hibridização com sondas genéticas para a identificação de bactérias metanogénicas, em grânulos provenientes de um reactor UASB descrito no capítulo 2.3.1.3

### 3.3 Materiais e métodos

#### 3.3.1 Proveniência das amostras

Todas as amostras utilizadas neste capítulo foram retiradas do reactor UASB, desenhado para obter um processo de granulação, cujo processo foi descrito com mais detalhe em 2.3.1.3. As amostras utilizadas correspondem às que foram analisadas por microscopia electrónica em 2.4.2.2, no 6.º mês, tanto a amostra do fundo do reactor como a amostra de grânulos flutuantes

#### 3.3.2 Preparação de soluções e material

Todo o material utilizado foi autoclavado, durante 20 minutos a 121 °C, para não haver interferências de microrganismos externos às amostras em estudo.

Em todas as soluções foi utilizada água, Milli-Q, que foi preparada da seguinte maneira: primeiro a água desionizada foi filtrada num filtro esterilizado (0.2µm), e posteriormente foi autoclavada durante 15 minutos a 121.°C.

Antes do início da fixação foi necessário preparar as seguintes soluções:

##### 3.3.2.1 NaOH 1M e NaCl 5M

Estas soluções foram preparadas, com água Milli-Q e posteriormente filtradas, com um filtro esterilizado de 0.2µm,

##### 3.3.2.2 Solução de PBS

- 8 g NaCl;
- 0.2 g KCl;
- 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O;
- 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- Foi adicionada água desionizada até perfazer, o volume de 1000 mL;
- Ajustou-se, a pH 7.4 com NaOH 8M, a solução foi filtrada com um filtro esterilizado de 0.2 µm e posteriormente autoclavada durante 15 minutos a 121.°C.

##### 3.3.2.3 Preparação dos slides de gelatina:

As lâminas foram mergulhadas durante 1 minuto numa solução a 70.°C, previamente filtrada de 0.1% de gelatina com 0.1% de CrK(SO<sub>4</sub>).

#### 3.3.2.4 Solução de PBS três vezes concentrada

- 2.4 g de NaCl;
- 0.06 g de KCl;
- 0.43 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O;
- 0.072 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- Foi adicionada água desionizada até perfazer, o volume de 1000mL;
- Ajustou-se, a pH 7.4 com NaOH 8M, a solução foi filtrada com um filtro esterilizado de 0.2µm e posteriormente autoclavada durante 15 minutos a 121.°C.

#### 3.3.2.5 Solução de 4% de paraformaldeído

Esta solução foi sempre preparada na hora, pois só se mantém constante durante 5 dias a 4.°C. Diluiu-se 2 g de paraformaldeído em 30 mL de Milli-Q, foi adicionado 100 µl de 1M de NaOH. Esta solução foi colocada no microondas a 350 W, durante 10 minutos. Foi adicionado 13.3 mL de solução de PBS 3 vezes concentrado ajustou-se o PH a 7.2 com 1 µl de HCl fumante e por ultimo foi adicionado água Milli-Q até perfazer o volume de 50 mL.

#### 3.3.3 Sondas utilizadas

As sondas de oligonucleotídeos 16 S rRNA utilizadas nestes ensaios foram, a sonda marcada com Cy3 correspondente ao domínio arqueio, Arc915 com uma sequência alvo 5'-GTC CTC CCC CGC CAA TTC CT-3', e uma sonda marcada com fluoresceína, correspondente ao domínio bactéria, Eub338 com uma sequência alvo 5'-CTG CTG CCT CCC GTA GGA GT-3'.

#### 3.3.4 Ensaios

Foram realizados cinco ensaios, com o objectivo de melhorar o sinal das sondas utilizadas.

##### 3.3.4.1 Ensaio I

###### 3.3.4.1.1 Fixação das células

5 mL de amostra do dia 4/12/01, previamente sonicada, foi centrifugada em dois ependorfs com volumes iguais, durante 10 minutos. De seguida a amostra foi lavada com PBS e resuspendida, novamente na solução de PBS. A amostra foi fixada, com a adição de três volumes de 4% de paraformaldeído, a um volume das células suspensas. A incubação foi realizada a 4.° C durante 3 horas. O sobrenadante, foi removido da amostra após 10 minutos de centrifugação, a amostra foi lavada duas vezes, durante 10 minutos com a solução de PBS. A amostra foi novamente resuspendida em PBS e adicionado um volume de etanol a 96%, para um volume de amostra. A amostra foi guardada a -20.° C

###### 3.3.4.1.2 Hibridização

Foram colocados nos slides com gelatina, 10 µl de amostra fixada e seca durante 10

minutos a 46 °C., de seguida lavada com água Milli-Q. A amostra colocada na lâmina foi desidratada, através da passagem sucessiva em concentrações crescentes de etanol a 50%, 80%, 96%(v/v) durante 3 minutos, deixando secar à temperatura ambiente. Foram adicionados à amostra, 10 µL da solução de hibridização (0% em formamida), e 1µL de cada sonda (Arc915 e Eub338), com uma concentração máxima de 30ng/µl, com cuidado para não raspar a superfície das lâminas. Numa caixa fechada e recoberta a alumínio foram introduzidos os slides, colocando no fundo papel humedecido com a restante solução de hibridização. Os slides são imediatamente transferidos para um forno de hibridização a 46 °C durante 3 horas. Rapidamente os slides foram passados da solução de hibridização (0%) para a solução de lavagem com 100µL de 0.1% de DAPI, deixando a incubar durante 20 minutos, num banho a 48 °C. A solução de lavagem foi removida com água destilada a 4 ° C e os slides foram secos com ar comprimido cuidadosamente para não remover as células. Foram colocadas nos slides, umas gotas de vectashield, antes da imediata colocação da lamela, que posteriormente foi recoberta com verniz.

Neste ensaio foram utilizadas as seguintes soluções:

#### Solução de hibridização (0%- formamida)

- 180 µL de 5M NaCl;
- 20 µL de 1M Tris/HCl, a pH 8;
- 800 µL de Milli-Q;
- 2 µL de SDS a10%.

#### Solução de lavagem

- 1 mL de 1 M Tris/HCl a pH 8;
- 9 mL de 5 M NaCl;
- diluir com água Milli-Q até perfazer o volume de 50 mL.

### 3.3.4.2 Ensaio II

#### 3.3.4.2.1 Fixação e hibridização

O ensaio II decorreu de maneira similar ao ensaio I (3.3.4.1.1, 3.3.4.1.2). A alteração introduzida neste ensaio foi a solução de lavagem, em que se adicionou 50 µL de SDS a 10%.

### 3.3.4.3 Ensaio III

#### 3.3.4.3.1 Fixação

As amostras utilizadas neste ensaio, foram obtidas no dia 4/12/01 e foram recolhidas do fundo do reactor e da camada flutuante. Estas amostras foram impregnadas em parafina para posterior corte do micrótomo.

A etapa de fixação decorreu de forma análoga ao ensaio I (3.3.4.1.1) utilizando 5 mL de amostra. Para proceder à inclusão em parafina, foi necessário desidratar as amostras previamente fixadas. Estas foram colocadas nas seguintes soluções alcoólicas, durante 5 minutos a 4 °C: duas vezes em etanol 50% e em soluções de ter-butanol-etanol-água com as proporções 1:4:5, 2:5:3, 7:10:3, 10:9:0. Para facilitar a passagem das amostras, entre as diferentes soluções, utilizaram-se

cestos, que estão descritos com mais pormenor no capítulo 4. Os cestos foram colocados numa solução de ter-butanol etanol absoluto (3:1), e seguidamente lavadas em ter-butanol. Todo o processo foi realizado a uma temperatura cerca de 60° C, para minimizar a solidificação da parafina. Colocaram-se os cestos em goblés e adicionaram-se 50 mL de ter-butanol seguido de 50 mL de parafina, tapou-se e deixou-se a 60 °C durante 3 horas. Colocou-se o cesto num goblé novo e adicionou-se parafina por cima a 60 °C durante 1 hora. Esta etapa foi repetida duas vezes. A biomassa foi colocada no molde colocando a cassete, onde foi vertida a parafina líquida. As cassetes com as amostras foram cortadas por um micrótopo, com uma espessura de cerca de 5 µm. As ténias de cortes, antes da montagem foram passadas numa solução alcoólica e passadas num banho termostatzado com uma temperatura de 40 °C antes de se proceder a montagem da lâmina.

Para desparafinar as lâminas, estas foram mergulhadas a 4 °C nas seguintes soluções durante cerca de 2 minutos: duas vezes em xileno e por ultimo em etanol absoluto mais xileno (1:1)

#### 3.3.4.3.2 Hibridização

O procedimento foi o descrito, em 3.3.4.1.2, mas com um tempo de hibridização de 5 horas.

#### **3.3.4.4 Ensaio IV**

##### 3.3.4.4.1 Fixação e Hbridização

Este ensaio foi realizado com as mesmas amostras e da mesma maneira do que o ensaio III (3.3.4.3.1, 3.3.4.3.2), utilizaram-se as seguintes soluções:

Solução de hibrização (35%- formamida)	Solução de lavagem
<ul style="list-style-type: none"><li>• 180 µL de 5M NaCl;</li><li>• 20 µL de 1M Tris/HCl, a pH 8;</li><li>• 350 µL de formamida;</li><li>• 450 µL de Milli-Q;</li><li>• 2 µL de SDS a 10%.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1 mL de 1 M Tris/HCl a pH 8;</li><li>• 700 µL de 5 M NaCl;</li><li>• 500 µL de 0.5 M EDTA;</li><li>• 50 µL de SDS 10%;</li><li>• diluir com água Milli-Q até perfazer o volume de 50 mL.</li></ul>

#### **3.3.4.5 Ensaio V**

##### 3.3.4.5.1 Fixação

A fixação obedeceu a mesmo método utilizado no ensaio III (3.3.4.3.1) utilizando as mesmas amostras.

##### 3.3.4.5.2 Hibridização

Foram adicionados à amostra correspondente ao dia 4/12/01, 20 µL da solução de hibridização (35%), e à amostra definida como grânulos flutuantes, 50µL da solução de hibridização (35%), e a ambas foi adicionado 1µL de sonda, de Arc915 com uma concentração de 30ng/µL. Numa caixa fechada e recoberta a alumínio, foram introduzidos os slides, colocando no fundo papel humedecido com a restante solução de hibridização. Os slides foram imediatamente transferidos para um forno de hibridização a 46 °C durante 10 horas. Rapidamente os slides foram passados da solução de hibridização (35%) para a solução de lavagem com 100µL de 0.1% de DAPI, deixando a incubar durante 20 minutos, num banho a 48 °C. Foi adicionado à amostra do reactor, 20µL da solução de hibridização (5%) e à amostra definida com de grânulos flutuantes 50µL da solução de hibridização (5%), e a ambas foi adicionado 1µL de sonda, de Eub 338 com uma concentração de 30ng/µL. Numa caixa fechada e recoberta a alumínio, foram introduzidos os slides, colocando no fundo papel humedecido com a restante solução de hibridização. Os slides foram imediatamente transferidos para um forno de hibridização a 46 °C durante 10 horas. Rapidamente os slides foram passados da solução de hibridização (5%) para a solução de lavagem com 100µL de 0.1% de DAPI, deixando a incubar durante 20 minutos, num banho a 48 °C. A solução de lavagem foi removida com água destilada a 4 °C e os slides foram secos com ar comprimido, cuidadosamente para não remover as células. Foram colocados nos slides, umas gotas de vectashield, antes da imediata colocação da lamela, que posteriormente foi recoberta com verniz.

#### Solução de hibridização ( 5%- formamida)

- 180 µL de 5M NaCl;
- 20 µL de 1M Tris/HCl, a pH 8;
- 50 µL de formamida;
- 750 µL de Milli-Q;
- 2 µL de SDS a 10%.

#### Solução de lavagem

- 1 mL de 1M Tris/HCl a pH 8;
- 6.3 mL de 5M NaCl;
- 50 µL de SDS 10%;
- diluir com água Milli-Q até perfazer o volume de 50 mL.

#### 3.3.5 Observação microscópica

As imagens foram adquiridas com um microscópio Zeiss Axioscop (Oberkochen), acoplado a uma câmara fotográfica Zeiss MC 100.

## 3.4 Resultados e discussão

### 3.4.1 Ensaio I e II

Todas as amostras foram fixadas, logo que foram removidas do reactor para garantir que estas não sofriam qualquer tipo de alteração morfológica ou biológica. Segundo STAHL ET AL. (1995) a fixação deve ser sempre realizada a fresco, nunca em amostras com mais de 24 horas.

Do ensaio I para o ensaio II foi introduzido SDS, pois o uso de SDS melhora a intensidade do sinal e reduz o ruído de background (STAHL ET AL., 1995). Esta solução foi mantida ao longo dos restantes ensaios.

Nos ensaios I e II, seguiu-se um protocolo sem adição de formamida, mas não se obtiveram resultados, embora se tenha conhecimento que as bactérias metanogénicas estão presentes na biomassa em estudo. No entanto, não se conseguiu detectar a sua localização, pois provavelmente as sondas não conseguiram penetrar nos aglomerados em estudo. A sonicação das amostras não melhorou a detecção.

### 3.4.2 Ensaio III

Para ultrapassar o obstáculo referido anteriormente, procedeu-se a uma inclusão em parafina para se obter cortes da biomassa, com 10µm de espessura. Segundo INGHAM ET AL. (1990), a vantagem de usar secções em parafina em vez de usar as criostáticas, neste tipo de ensaio, é devido à facilidade de lidar e cortar o material. As amostras podem ser guardadas, podendo ser acumuladas, retirando-as ao longo de vários passos do processo. Sem referir que o material necessário para manter e cortar as secções criostáticas é bem mais caro, e o custo económico têm de ser levado em conta pois é sempre um passo limitante em análises de rotina.

Além da inclusão em parafina, também se aumentou o tempo de hibridização de 3 horas nos ensaios I e II para 5 horas no ensaio III e para 10 horas nos ensaios IV e V. Porque as amostras provenientes de biofilmes ou agregados requerem tempos de hibridização maiores (STAHL ET AL., 1995).

O filtro de DAPI, revela o material genético presente na amostra (o DNA), que é visível em todos os ensaios.

No ensaio III é possível presenciar que o sinal do grupo arqueo é superior ao sinal do grupo bactéria (Figura 3.4 (a,b,c)). As zonas reflectidas são diferentes sendo a percentagem maior referente às bactérias.

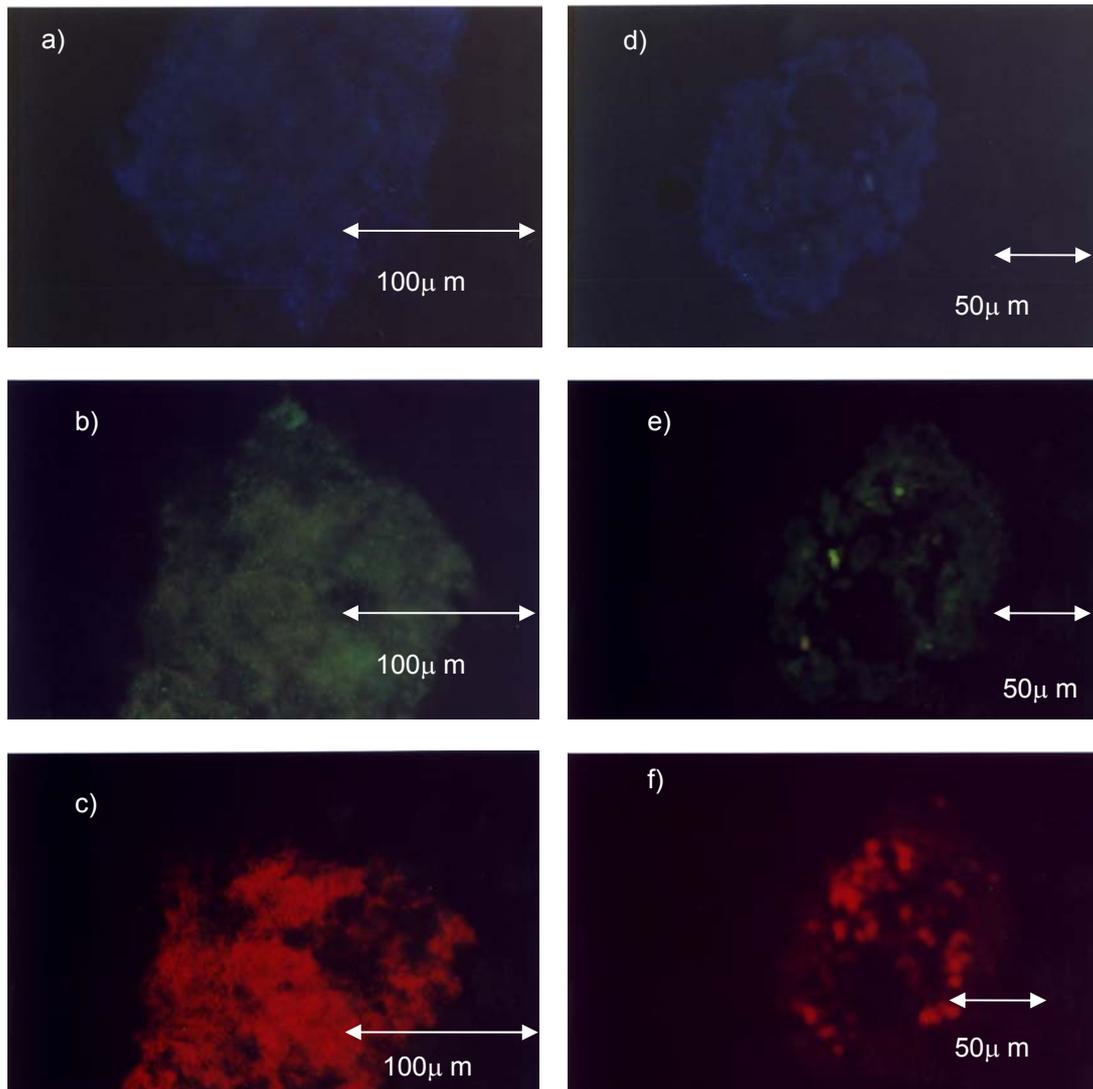


Figura 3.4 Resultados obtidos no ensaio III, do DAPI( a- reactor , d- grânulos flutuantes), da sonda Eub338 (b- reactor e- grânulos flutuantes) e da sonda Arc915 (c- reactor f- grânulos flutuantes).

Nos grânulos definidos como grânulos flutuantes (Figura 3.4 (d,e,f)), o maior sinal é igualmente do grupo arqueu, mas a localização é ligeiramente diferente. Existe um centro oco, que não contém material biológico como podemos observar pela coloração com DAPI (Figura 3.4(d)), que não identifica qualquer tipo de material genético, nesta zona. Não há uma localização preferencial do grupo arqueu e do grupo bactéria, estando ambos localizados ao longo de toda a estrutura exceptuando o já referido centro inactivo (Figura 3.4 (e,f)).

#### Ensaio IV

No ensaio IV, o sinal das arqueobactérias é relativamente melhorado com o aumento do tempo de hibridização, assim como com a percentagem de formamida adicionada (Figura 3.5 (c,f)), no entanto o sinal do domínio bactéria é bastante superior, comparativamente ao ensaio III (Figura 3.5(b, e)).

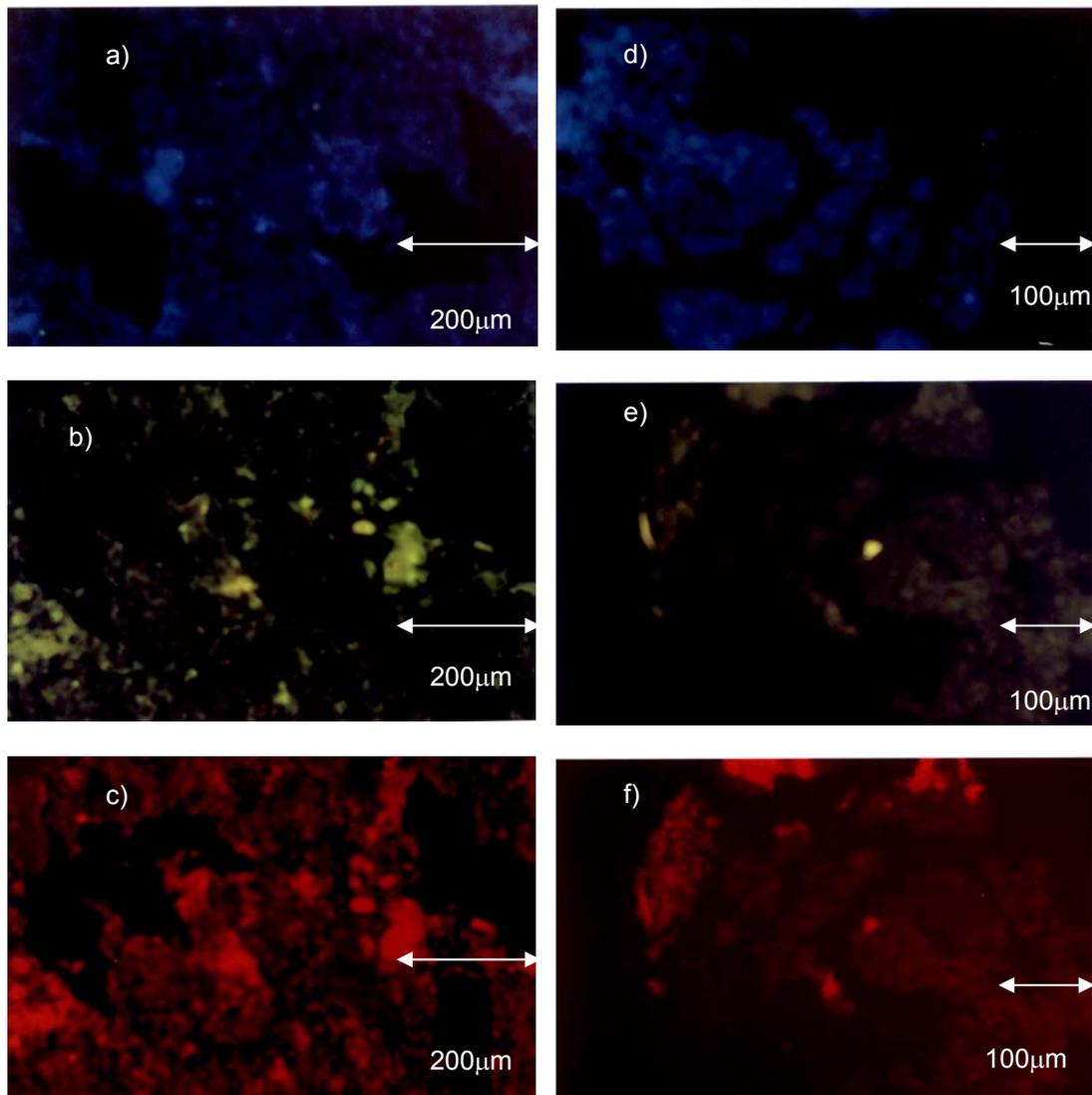


Figura 3.5 Resultados obtidos para o ensaio IV, do DAPI( a- reactor , d- grânulos flutuantes), da sonda Eub338 (b- reactor e- grânulos flutuantes) e da sonda Arc915 (c- reactor f- grânulos flutuantes).

A distribuição parece ser similar à obtida no ensaio III. Na biomassa do fundo do reactor as arqueobactérias estão distribuídas pela biomassa (Figura 3.5 (c, f)), assim como nos grânulos flutuantes. No que respeita as bactérias, estas estão localizadas mais na periferia da biomassa do reactor (Figura 3.5 (b)). Nos grânulos flutuantes, o sinal das bactérias é quase inexistente (Figura 3.5 (e))

Ao observar as Figura 3.5 (b,c) repara-se que existem espaços comuns às arqueobactérias e às bactérias, provavelmente devido ao sinal das archaeas ser tão intenso que reflecte sinal sob o filtro das bactérias. Isto pode acontecer pelo facto das células poderem estar sobrepostas ou muito juntas.

#### 3.4.3 Ensaio V

No ensaio V, manteve-se uma hibridização de 35% para as archaeas mas diminuíram-se a

percentagem de formamida na hibridização relativa as bactérias, obtendo-se neste ensaio um aumento do sinal destas, o que não foi conseguido nos ensaios anteriores.

A abundância de arqueobactérias (Figura 3.6 (c,f)) continua a ser significativamente superior à das bactérias (Figura 3.6 (b,d)), mantendo o mesmo tipo de distribuição em toda a extensão do grânulo (Figura 3.6 (c)).

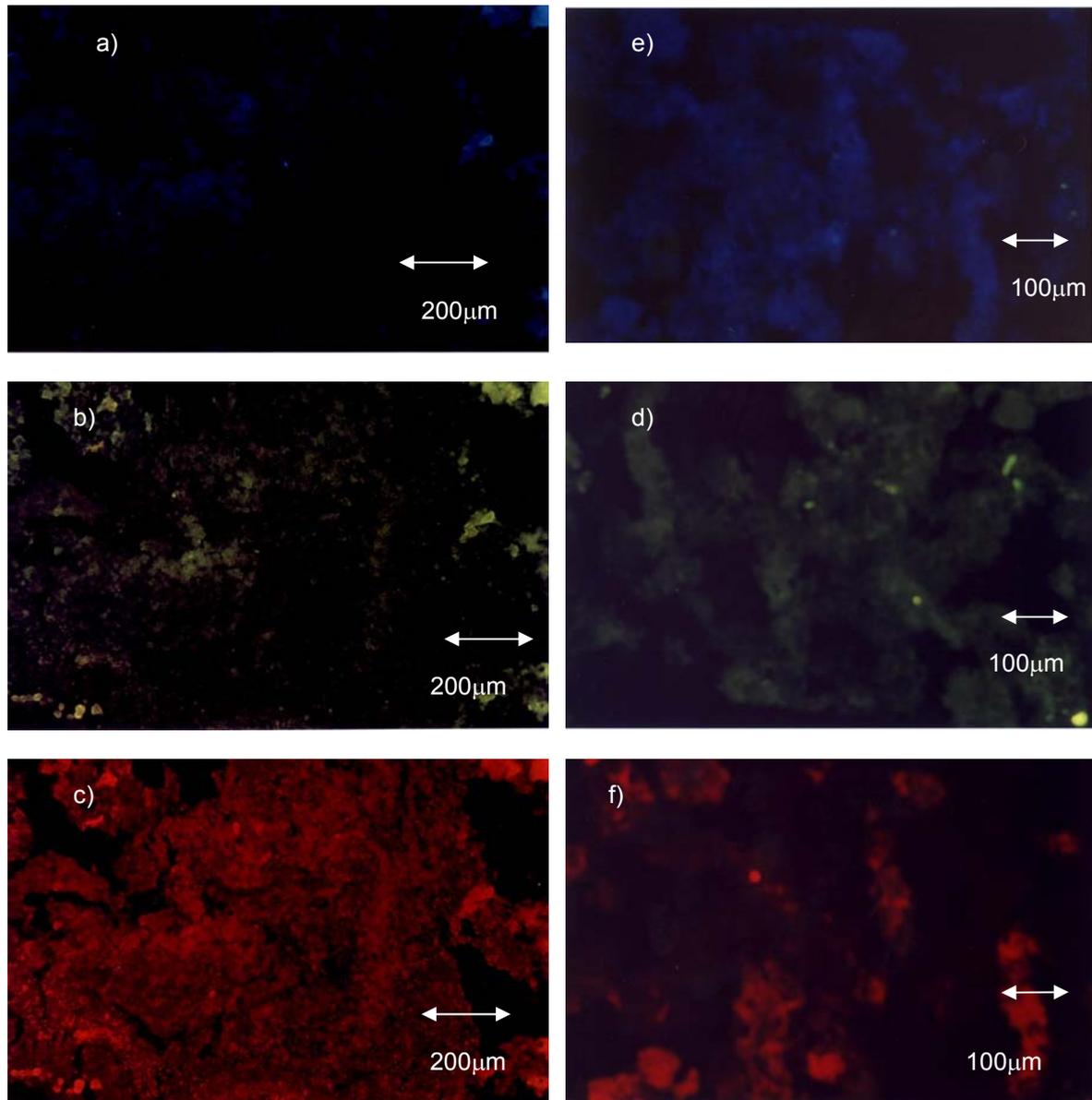


Figura 3.6 Resultados obtidos para o ensaio V, do DAPI (a- reactor , d- grânulos flutuantes), da sonda Eub318 (b- reactor e- grânulos flutuantes) e da sonda Arc915 (c- reactor f- grânulos flutuantes).

### 3.5 Conclusão

Na optimização da técnica de FISH, com as sondas Arc915 e Eub318, aplicadas a biomassa granular mesófila pode-se concluir que:

- A introdução do SDS melhora o sinal das sondas e reduz o background.
- A impregnação em parafina e corte da amostra melhora significativamente a penetração das sondas na biomassa.
- Este tipo de microorganismos necessita de um tempo de hibridização elevado (10 horas).
- A percentagem de formamida óptima não é igual para as duas sondas. Para a do domínio arqueo a percentagem ideal é a de 35%, e para o domínio bactéria é de 5 % em formamida.

Nas hibridizações efectuadas foi possível identificar e localizar bactérias e arqueobactérias em agregados microbianos anaeróbios.

## 4. Coloração de lípidos

---

### Sumário

Neste capítulo caracterizou-se biomassa anaeróbia granular proveniente dum reaktor alimentado com ácido oleico. Os ácidos gordos de cadeia longa como o ácido oleico adsorvem na biomassa impedindo a difusão de substratos e produtos e exercendo um efeito altamente tóxico para a biomassa acetogénica e metanogénica. Este trabalho consistiu na confirmação da presença de material lipídico assim como a visualização da localização deste grupo químico na biomassa em causa, recorrendo a técnicas histológicas.

4.1 Introdução	80
4.2 Objectivos	83
4.3 Materiais e métodos	84
4.4 Resultados e discussão	89
4.5 Conclusão	94

## 4.1 Introdução

Os lípidos começaram por ser definidos como “substâncias gordurosas que ocorrem naturalmente, sendo insolúveis em água, e solúveis em solventes orgânicos. Lovem em 1955 redefiniu os lípidos como possíveis derivados de ácidos gordos (HIGH, 1984)

Os lípidos mais complexos são compostos por ésteres de ácidos gordos ligados a álcoois, como o glicerol podendo também ser ésteres ligados a determinadas bases por meio de ligações amino (WEIL, 1983). São um grupo químico com uma considerável variação na sua estrutura e na sua actividade. Até recentemente estes compostos foram difíceis de manipular com as técnicas histológicas, pelo que, neste campo o desconhecimento sobre este grupo químico é ainda elevado.

Durante a 1ª etapa do processo de degradação anaeróbia de compostos lipídicos (hidrólise) cerca de 93 a 96% da carga orgânica é mantida na forma de ácidos gordos de cadeia longa (AGCL). A aplicação de reactores anaeróbios de manto de lamas granulares ao tratamento de águas residuais com lípidos, é problemática porque além dos AGCL serem altamente tóxicos para as bactérias acetogénicas e metanogénicas envolvidas no processo, também adsorvem nos agregados de biomassa, tornando-os leves e flutuantes, o que pode conduzir à sua lavagem do reactor. Em estudos prévios foi reconhecida a importância da adsorção dos AGCL na biomassa anaeróbia (ALVES ET AL., 2001, PEREIRA ET AL., 2001A, PEREIRA ET AL., 2001), tendo em vista a sua posterior metanização.

O primeiro passo da histoquímica foi dado sensivelmente há 170 anos atrás quando Rrenchmam Respail usou o iodo para colorir e identificar o amido. Desde este primeiro passo até aos dias de hoje as técnicas histológicas evoluíram, sendo hoje largamente utilizadas na identificação e localização de vários compostos nas mais diversas amostras e nos mais variados campos de aplicação (HIGH, 1984).

Quando se pretende estudar biomassa anaeróbia do ponto de vista histológico depara-se com duas dificuldades básicas: a primeira, é o facto dos grânulos constituírem na sua maioria estruturas opacas, que não podem ser estudadas ao microscópio no seu estado natural e a segunda dificuldade consiste na falta de contraste entre os componentes que se querem observar.

No primeiro caso a dificuldade pode ser ultrapassada reduzindo as estruturas a cortes suficientemente finos para que sejam transparentes. A segunda dificuldade pode ser ultrapassada com auxílio de corantes selectivos.

A preparação do material biológico para observação microscópica é morosa, correndo o risco das enzimas celulares destruírem parte das estruturas que se pretendem observar. Para impedir este processo procede-se em primeiro lugar à chamada fixação. Esta é uma etapa que envolve uma série de reacções químicas que têm como objectivo evitar a autólise das células assim como o ataque bacteriano da amostra. Os tecidos fixados não devem mudar de forma ou de volume nas

etapas seguintes (HIGH, 1984, HOPWOOD, 1994).

Os melhores agentes fixantes são o tetróxido de ósmio e o ácido crômico, mas no entanto estes dois compostos, alteram radicalmente a reactividade dos lípidos, podendo mesmo alterar a sua estrutura. Em geral as soluções fixantes usadas para fixar as células com lípidos são compostas por aldeídos, sendo normalmente utilizado o formaldeído. Outro fixador possível é o cloreto de mercúrio, embora também reaja com certos lípidos insaturados. Este fixador penetra muito mal nos tecidos provocando um encolhimento dos mesmos e normalmente é usado em conjunto com outro agente fixador, normalmente um aldeído. Na fixação podem-se perder lípidos. Segundo HOPWOOD (1994), ao utilizar na etapa da fixação soluções que contenham o cloreto de mercúrio e o dicromato de potássio é mais provável que se preservem os lípidos, havendo, no entanto as desvantagens acima mencionadas.

A seguinte etapa, denominada por desidratação permite a remoção da água dos tecidos, pela passagem do material por soluções alcoólicas de concentração crescente. Nesta etapa é possível que os lípidos sejam lavados das células. Para minimizar este efeito esta etapa, deverá ser a mais curta possível, e realizada a uma temperatura de 4°C (SANDERSON, 1994). De seguida procede-se à etapa de diafanização ou clareamento onde se faz uma substituição do álcool por um composto que seja capaz de funcionar como veículo do material de inclusão (parafina). Esta substância deve ser miscível com a parafina (<http://business.fortunecity.com>).

Seguidamente faz-se a impregnação, onde o agente diafenizante é substituído pela parafina líquida, dando-se por último a inclusão do material na mesma. Este processo têm por fim endurecer os tecidos, para que seja possível executar cortes finos do material. Se a inclusão estiver bem feita, após cada movimento da lâmina do micrótomo sai um corte e o que se segue vai colar-se ao anterior pela aresta vizinha de forma que se constituem assim fitas ou ténias de cortes. Uma vez obtidas as ténias, procede-se à coloração (HIGH, 1994, <http://business.fortunecity.com>).

Na coloração torna-se necessário remover parafina e re-hidratar os cortes, sendo a sequência utilizada a inversa da inclusão. A coloração depende da afinidade entre o corante e o tecido devido a forças de atracção como ligações hidrofóbicas, interacções reagente - reagente, ou devido a interacções reagente - tecido como é o caso das forças de Van der Waals, atracção de coulomb, pontes de hidrogénio ou ligações covalentes. (HIGH, 1994).

O termo “gordo” não têm qualquer significado estrutural mas no entanto o estado físico do lípido a analisar é de maior importância, sendo o seu ponto de ebulição determinante da sua reacção com um grande grupo de corantes organotrópicos. Este aspecto está relacionado com o comprimento da cadeia e com o grau de saturação dos seus constituintes de ácidos gordos (HIGH, 1994).

Os corantes mais utilizados na coloração dos lípidos são o óleo vermelho e o negro de Sudão. O óleo vermelho é ligeiramente solúvel em solventes orgânicos, e insolúvel em água. A coloração obtida por este corante é mais nítida do que com qualquer um dos corantes de Sudão.

O negro de Sudão B têm uma estrutura ligeiramente diferente do óleo vermelho, pois possui grupos amino. O negro de Sudão é um corante básico e irá combinar-se com grupos ácidos por isso também é mais vantajoso na identificação de fosfolípidos e do colesterol, têm uma solubilidade similar ao óleo vermelho e cora lípidos neutros por preferencial adsorção.

Estes corantes actuam por difusão simples nas gotas lípidicas, onde são mais solúveis que no meio alcoólico onde se encontravam solubilizados (HOROBIN , 1994).

O melhor solvente para os corantes é etanol a 70%, embora alguns lípidos neutros possam ser extraídos, mas esta perda é mínima (HIGH, 1994).

Com esta técnica é impossível distinguir entre as diferentes subclasses de lípidos, podendo apenas distinguir entre lípidos hidrofóbicos e hidrofílicos. O poder adsorvente dos lípidos é relacionado com a temperatura e o estado físico dos mesmos, sendo maximizado a uma temperatura próxima do seu ponto de fusão, só podendo ser corados os lípidos que sejam líquidos ou semi líquidos à temperatura ambiente. Os lípidos sólidos ou cristalinos não são corados. Os lípidos não conjugados como é o caso dos ácidos gordos, são compostos hidrofóbicos, com afinidade para os corantes organotrópicos (HIGH E LAKE, 1994).

As interações mais importantes envolvidas na coloração dos lípidos, são as ligações hidrofóbicas e as interações solvente – solvente (HOROBIN, 1994). A coloração pelo preto de Sudão é um simples processo de partição em que o corante é mais solúvel nos tecidos com lípidos do que no próprio solvente (HIGH E LAKE, 1994). No entanto segundo BANCROFT (1989), no caso dos corantes de Sudão existem evidências de que a absorção física pode ter um papel importante.

### 4.2 Objectivos

O objectivo do estudo realizado neste capítulo foi a aplicação, de técnicas histológicas para a visualização dos lípidos presentes em agregados microbianos anaeróbios. Os agregados microbianos utilizados neste estudo foram provenientes de um reactor de manto de lamelas de fluxo ascendente de leite expandido, alimentado com ácido oleico. Dos objectivos inerentes a este trabalho também consistiu a optimização do método escolhido para a identificação do material lípídico, a escolha do melhor corante para este grupo químico, assim como a comparação da análise de duas amostras provenientes de etapas diferentes da operação do reactor laboratorial.

## 4.3 Materiais e métodos

### 4.3.1 Proveniência das amostras analisadas

As amostras utilizadas neste estudo foram recolhidas de um reactor anaeróbio de manto de lamas de fluxo ascendente de leito expandido (EGSB – acrónimo de “Expanded Granular Sludge Bed”) de 10 litros, alimentado com concentrações crescentes de oleato, entre 2 e 8 g CQO/L. A operação deste reactor já foi referida anteriormente no Capítulo 2.3.1.2 – Ensaio de desgranulação. A operação deste reactor é parte do trabalho de doutoramento de Alcina Pereira, estando detalhadamente descrita em PEREIRA ET AL. (2001A). Nos primeiros 70 dias a alimentação foi constituída por leite magro (50% de CQO) e ácido oleico (50% de CQO). A partir do dia 70 e até ao final (dia 219), a fonte de carbono alimentada foi somente o ácido oleico. O inoculo foi biomassa granular, proveniente de um reactor UASB de uma indústria cervejeira. Para cada concentração de ácido oleico, foram recolhidas amostras no fundo e no topo do reactor. As amostras do topo representavam grânulos que haviam migrado do fundo devido à adsorção de AGCL. A matéria adsorvida nos agregados de biomassa foi quantificada indirectamente incubando a biomassa em frascos fechados a 37 C e 150 rpm, após 2 lavagens e centrifugações sucessivas com um tampão anaeróbio e sem a adição de qualquer fonte de carbono. Nestas experiências houve uma produção de metano correspondente à degradação anaeróbia da matéria adsorvida e quantificou-se a taxa máxima de produção de metano ( $\text{mL CH}_4/\text{gSSV}\cdot\text{dia}$ ) e o plateau da curva, correspondente à máxima produção total de metano acumulada no frasco. Na Figura 4.1 (a) está representada uma curva referente ao ensaio com a biomassa obtida no dia 162 (carga orgânica de oleato = 6 g CQO/L.dia, TRH=1 dia), onde se evidencia a maior quantidade de metano produzido na amostra recolhida no topo de reactor, em relação à amostra recolhida no fundo.

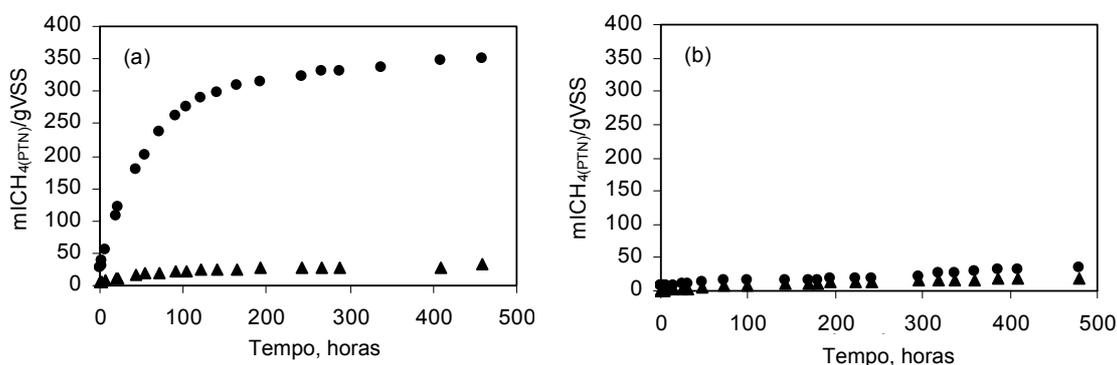


Figura 4.1 – Resultados obtidos nos testes em reactor fechado para as amostras recolhidas no fundo (▲) e no topo do reactor (●) (a) dia 162. (b) dia 219.

Na Figura 4.1 (b) está representada uma curva referente ao ensaio com a biomassa obtida no dia 219 (carga orgânica de oleato = 8 g CQO/L.dia, TRH=1 dia), onde se evidencia uma

significativa diminuição da produção de metano, relativamente ao período anterior, provavelmente devido a fenómenos de inibição.

Num trabalho realizado por PIRES ET AL. (2001) em que se extraiu a matéria adsorvida e se analisou por cromatografia gasosa, verificou-se que esta era constituída essencialmente por ácido palmítico, o que já tinha sido anteriormente sugerido por PEREIRA ET AL. (2001) e por ALVES ET AL.(2001).

### 4.3.2 Preparação de amostras para a coloração I

Neste ensaio foi analisada a amostra relativa ao dia 162. Para obter uma secção sem lípidos como termo de comparação ou ensaio em branco, procedeu-se inicialmente a uma deslipidização (remoção dos lípidos). A maioria dos lípidos pode ser extraída através de um tratamento com clorofórmio e metanol (2:1) em 1% de ácido clorídrico. O ácido clorídrico foi incluído para romper as ligações lipoproteicas. Juntaram-se 4% de água, para remover os fosfolipídeos (HIGH, 1984). A amostra ficou em contacto com esta solução durante uma hora à temperatura ambiente.

#### 4.3.2.1 Fixação

O procedimento de fixação foi efectuado para a amostra com e sem o pré-tratamento de deslipidização. A solução fixadora foi composta por, 90 % de etanol a 70%, 5% de ácido acético e 5% de formalina durante 12 horas a 4 °C. Na Figura 4.2 está representada uma fotografia dos cestos utilizados para a transferência da biomassa entre as soluções de trabalho (CLARCK, 1981).



Figura 4.2 Cesto utilizado para a transferência da biomassa entre as soluções de trabalho.

#### 4.3.2.2 Desidratação

As amostras previamente fixadas foram colocadas nas seguintes soluções alcoólicas, durante 5 minutos a 4 C: duas vezes em etanol 50% e em soluções de ter-butanol-etanol-água com as proporções 1:4:5, 2:5:3, 7:10:3, 10:9:0, 3:1:0. Por fim realizaram-se duas lavagens em ter-butanol (CLARCK, 1981).

#### 4.3.2.3 Impregnação

Todo o processo foi realizado a uma temperatura cerca de 60° C para minimizar a solidificação da parafina

Colocaram-se os cestos contendo as amostras em goblés e adicionaram-se 50 mL de ter-butanol seguido de 50 mL de parafina. Após tapar o recipiente, deixaram-se a 60 °C durante 11 horas. No final deste tempo, retira-se o cesto do goblé e coloca-se noutro goblé, vertendo parafina por cima e deixando 1 hora a 60 °C. Este processo permite remover o ter-butanol do meio de impregnação e é realizado duas vezes.

#### 4.3.2.4 Inclusão

A biomassa foi retirada do cesto e inserido na parte central do molde (Figura 4.3 (a)) colocando por cima a cassete (Figura 4.3 (b)), onde foi vertida a parafina líquida limpa até cobrir.

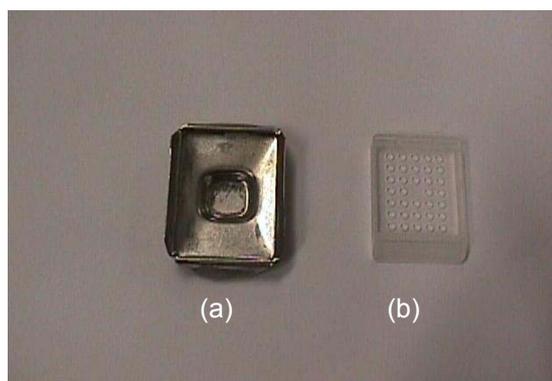


Figura 4.3 Imagem do molde (a) e das cassetes (b) utilizadas neste ensaio

#### 4.3.2.5 Corte

Após solidificação, as cassetes com as amostras foram cortadas por um micrótomo (Figura 4.4), com uma espessura de cerca de 5  $\mu\text{m}$ . Antes da montagem, os cortes foram passados por uma solução alcoólica (Figura 4.4 (b)) e seguidamente colocadas num banho de água termostaticado a 40.°C Figura 4.4 (c). Por último, os cortes são apanhados do banho com lâminas de vidro, onde se fixam naturalmente, sendo posteriormente secos à temperatura ambiente.

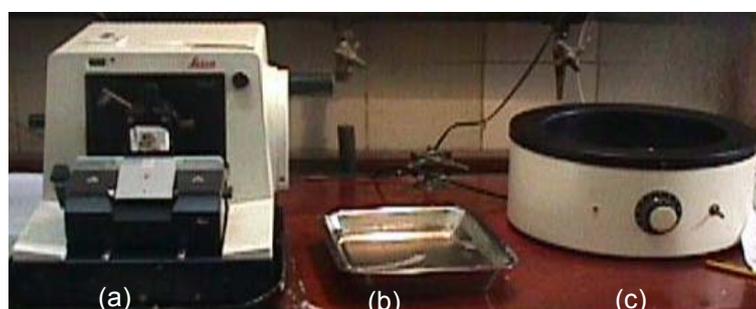


Figura 4.4 Microtomo (a), Solução alcoólica (b) e banho termostaticado (c)

#### 4.3.2.6 Desparafinação

As lâminas foram mergulhadas a 4 °C nas seguintes soluções durante cerca de 2 minutos: duas vezes em xileno puro e por último numa solução de etanol absoluto e xileno (1:1).

### 4.3.2.7 Rehidratação

As lâminas foram mergulhadas a 4 °C cerca de 2 minutos em soluções com concentrações decrescentes de etanol (etanol absoluto, etanol 96% e etanol 86%).

### 4.3.2.8 Coloração

#### 4.3.2.8.1 Negro de Sudão B

Duas lâminas com cortes da amostra e duas lâminas com cortes da amostra sem lípidos, foram mergulhadas em etanol a 70% durante 2 minutos e de seguida foram mergulhadas numa solução de negro de Sudão B em 70% etanol (1 g em 100 mL) durante 2 horas (HIGH E LAKE, 1994).

#### 4.3.2.8.2 Óleo vermelho

Duas lâminas com cortes da amostra e duas lâminas com cortes da amostra sem lípidos foram mergulhadas em etanol a 70% durante 2 minutos e de seguida foram mergulhadas numa solução de óleo vermelho em 70% etanol (1 g de corante em 100 mL) durante 2 horas (HIGH E LAKE, 1994).

### 4.3.3 Preparação de amostras para a coloração II:

Neste ensaio foi utilizada uma amostra de biomassa do topo do reactor referente ao dia 219 de operação (ver perfil de produção de metano desta amostra na Figura 4.1 (b)). Foi usado o mesmo método já descrito. Como ensaio em branco (amostra sem lípidos) utilizou-se uma amostra de biomassa anaeróbia granular proveniente de um reactor do tipo manto de lamas para o tratamento de efluente duma indústria cervejeira. É esperado que esta biomassa granular, dadas as características do efluente industrial que tratava, não tivesse uma camada lipídica externa tão evidente como a das amostras do reactor laboratorial. O reactor laboratorial foi inoculado com esta biomassa.

### 4.3.4 Preparação de amostras para a coloração III

Neste ensaio foram utilizadas as duas amostras de biomassa atrás já referidas (dia 162 e dia 219) e como controlo foram também utilizados os grânulos do reactor industrial da cervejeira. Como a etapa de fixação pode ser crítica para a preservação dos lípidos, optou-se por testar a fixação proposta por HOPWOOD (1994).

#### 4.3.4.1 Fixação

Foram colocados 10 mL de cada amostra nos cestos em contacto com a solução fixadora. A solução fixadora cujo o nome técnico é Elftma`s Fluid foi composta por cloreto de mercúrio (5 g), dicromato de potássio (2.5 g), em água até perfazer um volume de 100 mL. Esta etapa durou cerca de 3 dias à temperatura ambiente (HOPWOOD, 1994).

### **4.3.4.2 Desidratação, Impregnação Inclusão e Corte**

Estas etapas foram realizadas de acordo com os métodos já descritos anteriormente nos pontos 4.3.2.2, 4.3.2.3, 4.3.2.4 e 4.3.2.5.

### **4.3.4.3 Desparafinação**

Mergulharam-se as lâminas a 4°C nas seguintes soluções durante 2 minutos cada: duas vezes em xileno e numa solução de etanol absoluto e xileno (1:1).

Devido à utilização da solução fixador de cloreto de mercúrio houve necessidade de remover alguns precipitados negros de mercúrio, lavando as lâminas em solução de iodo (0.5%) em etanol 70% durante 15 minutos. As lâminas foram passadas em água, em 5% (p/v) de tiosulfato de sódio durante 5 minutos e por fim lavadas em água corrente (HOPWOOD, 1994).

### **4.3.4.4 Rehidratação e Coloração**

Estas etapas foram executadas de acordo com os métodos já descritos nos pontos 4.3.2.7 e 4.3.2.8.

### **4.3.5 Observação microscópica**

As imagens das amostras coradas com o negro de Sudão B foram obtidas com um microscópio Zeiss Axioscop (Oberkochen) campo claro, acoplado a uma câmara fotográfica Zeiss MC 100. As amostras coradas com o óleo vermelho foram visualizadas no mesmo microscópio e também no microscópio Diaphot 300 Nikon (Nikon Corporation, Tokyo).

## 4.4 Resultados e discussão

As fotografias apresentadas são demonstrativas das amostras analisadas. Neste estudo deveria ter-se procedido à fixação das amostras imediatamente após a sua recolha do reactor. Apesar de ser reconhecido que a biomassa anaeróbia preserva a sua actividade metanogénica a 4.°C, a sua estrutura poderá ser alterada. Por outro lado a degradação da matéria adsorvida a 4°C é detectada devido à formação de biogás nos frascos de armazenamento, o que até pode ser um aspecto interessante a investigar futuramente.

O ácido oleico é um ácido gordo insaturado com 18 carbonos, com um ponto de fusão de 64 °C. O ácido palmítico é um ácido gordo saturado com 16 carbonos, com um ponto de fusão a 14 °C. Estes ácidos gordos de cadeia longa são hidrofóbicos, e por esta razão impossíveis de distinguir por técnicas histológicas. De qualquer modo o objectivo deste estudo era aplicar e adaptar técnicas histológicas a agregados de biomassa anaeróbia no sentido de localizar nestes matéria lipídica adsorvida, considerando como matéria lipídica os ácidos gordos de cadeia longa acima referidos.

### 4.4.1 Coloração I

Os lípidos não podem ser classificados pelas suas propriedades ópticas mas é vantajoso por vezes ver as amostras com luz polarizada depois de coradas com óleo vermelho horas (HIGH E LAKE, 1994). Neste ensaio efectuou-se esta visualização não tendo sido observado nenhum grau de diferenciação a nível de cor ou de intensidade de cor, pelo que não são apresentadas as fotos correspondentes. Na Figura 4.5 estão apresentadas as fotografias obtidas no ensaio de coloração I, obtidas com o corante negro de Sudão.

Pela observação da Figura 4.5 (a) detecta-se a presença de zonas coradas a preto, preto-azulado e bronze. Não há uma localização definida das regiões coradas na estrutura observada. Além disso ao contrário do esperado a parte central apresenta-se corado ou pelo menos com um aspecto semelhante a regiões mais periféricas. A hipótese de que a matéria lipídica se encontra essencialmente na camada exterior não pode ser confirmada com base nesta foto. É interessante observar que há uma tendência de organização circular em camadas, que está de acordo com o descrito por GUIOT ET AL. (1992) e por FANG (1997) em relação à organização da estrutura dos grânulos anaeróbios. Na Figura 4.5 (b) pode ver-se a mesma amostra com maior ampliação e na Figura 4.5 (c, d) um aspecto da mesma biomassa na forma dispersa. De referir que no reactor laboratorial ocorreu um processo gradual de desgranulação que está bem descrito em AMARAL ET AL. (2001), devido à crescente concentração de oleato de sódio na alimentação. Este processo foi referido anteriormente no Capítulo 2. Assim, o aparecimento de formas de biomassa granulares e dispersas é facilmente explicado. Relativamente à coloração nestas formas mais dispersas a localização das regiões coradas é aleatória, como era esperado.

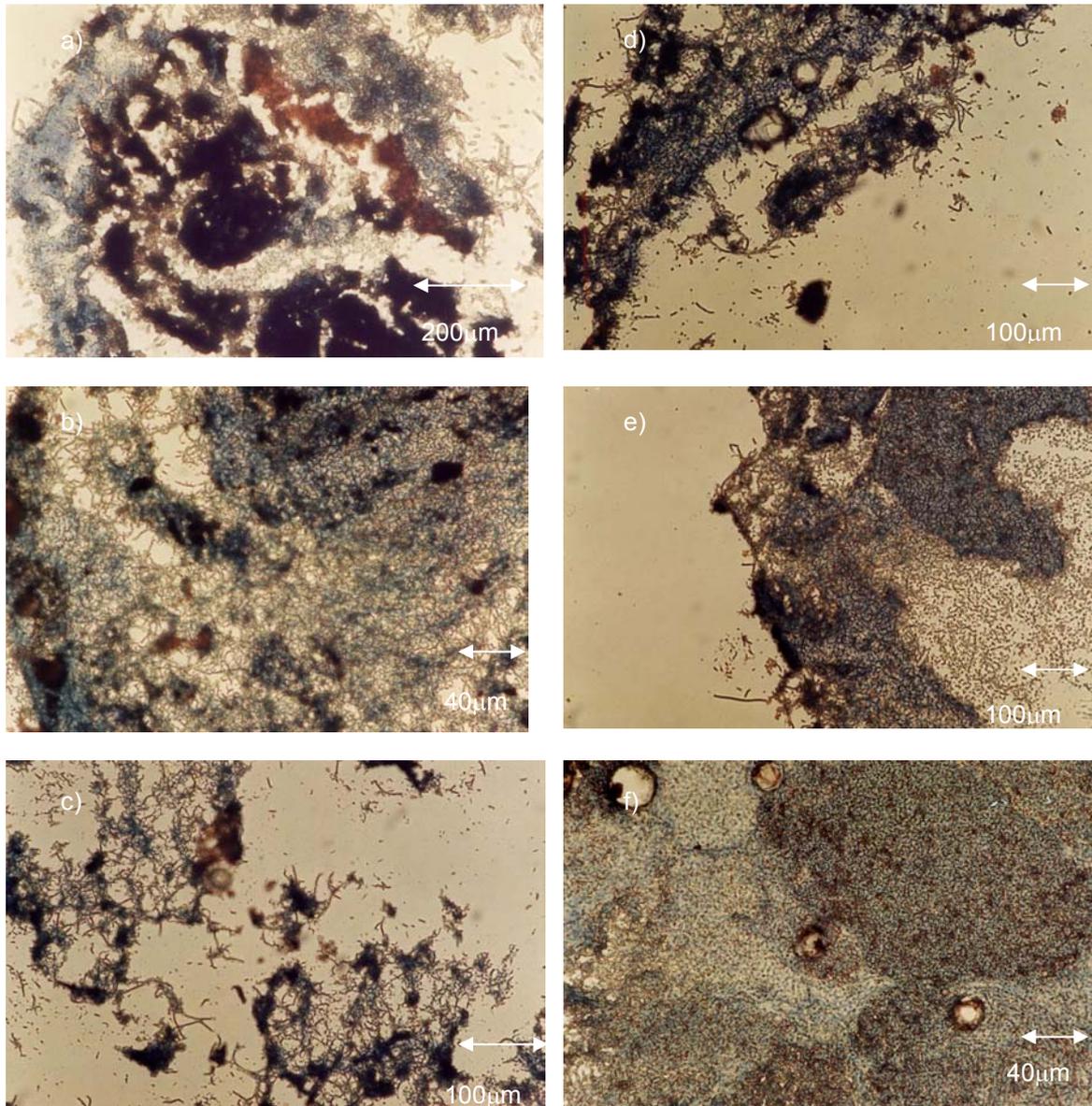


Figura 4.5 – Resultados obtidos nos ensaios de coloração I. Amostras (a, b, c, d) e controles (e, f).

Na Figura 4.5 (e, f) estão representadas fotos obtidas na coloração da amostra do controle que sofreu a deslipidização. Não há uma evidência clara de que este tratamento para remover os lípidos tenha funcionado, já que há também uma região corada bem localizada na superfície exterior da estrutura microbiana.

#### 4.4.2 Coloração II

Na Figura 4.6 estão apresentadas as fotografias obtidas no ensaio de coloração II onde se usou o negro de Sudão (a, b, c) e o óleo vermelho (d, e, f).

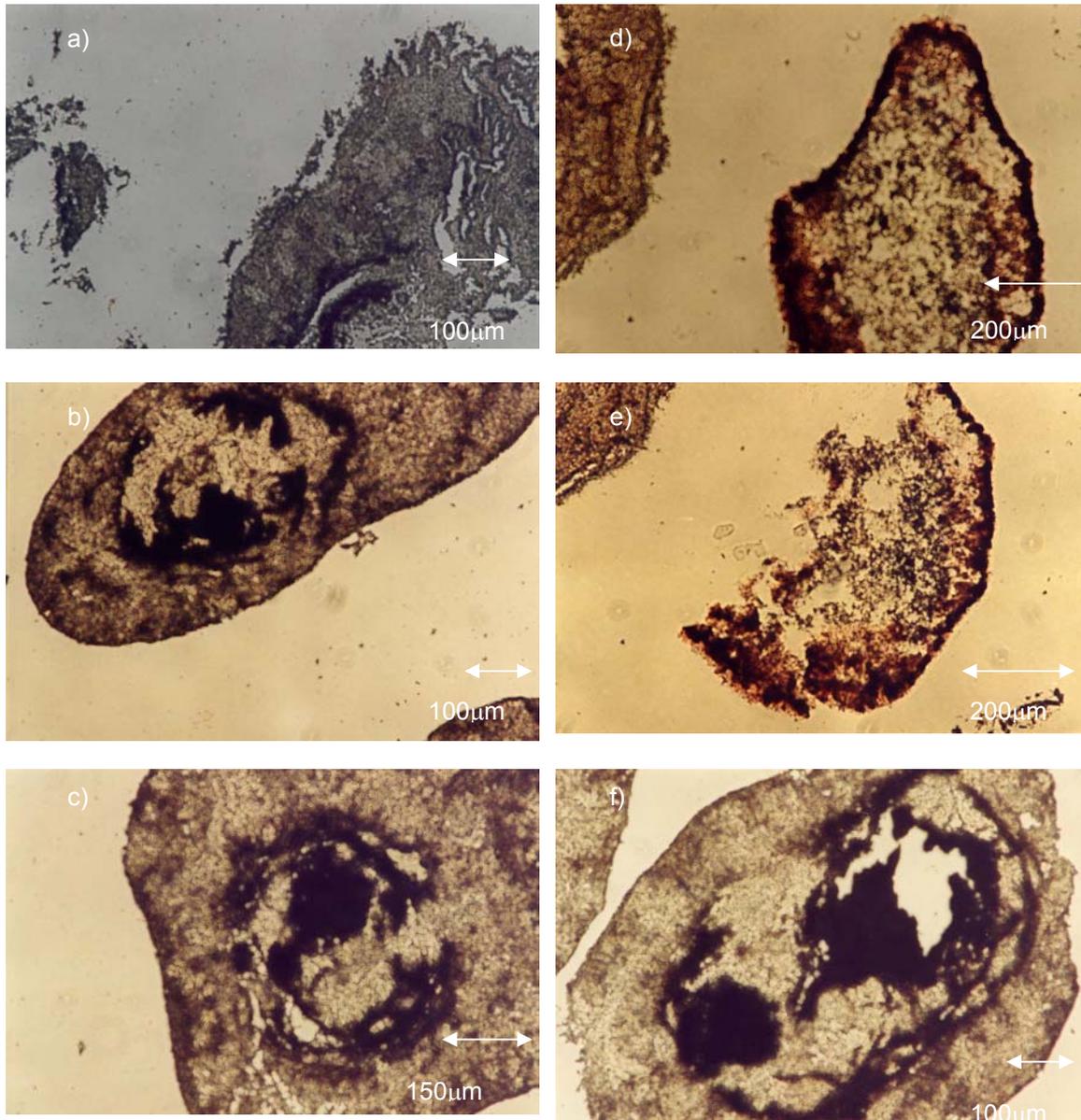


Figura 4.6 Resultados obtidos nos ensaios de coloração II. Coradas com negro de Sudão (a – amostra, b e c – controlo). Coradas com óleo vermelho (d, e – amostras e f – controlo).

Pela comparação entre a Figura 4.6 (a) e a Figura 4.6 (d) é possível concluir que na coloração com o óleo vermelho se distingue uma zona exterior corada que poderá corresponder à camada lipídica exterior. A foto da amostra corada com o negro de Sudão não permite concluir o mesmo, apesar de esta foto não ter as melhores condições de visualização.

Ao observar os grânulos corados em qualquer um dos métodos com os dois corantes, observa-se a mesma estrutura e as mesmas zonas são coradas, no centro do grânulo. É interessante observar a zona oca no interior do grânulo da Figura 4.6

FORSTER E QUAMBY (1995), analisaram histologicamente grânulos provenientes de reactores UASB, alimentados com óleo de palma, concluindo que na biomassa granular utilizada, os lípidos estão dispersos por toda a secção. Estes autores utilizaram para a coloração dos lípidos, o negro

de Sudão, mas não apresentam fotografias representativas das amostras coradas.

A biomassa granular, utilizada é constituída por grânulos anaeróbios que têm na sua constituição bactérias metanogénicas. A maioria das bactérias metanogénicas tem como constituintes da parede da membrana, lípidos polares (WHITMAN ET AL, 1992). Os lípidos chegam a constituir, cerca de 5% do peso seco das arqueobactérias (SPROTT,1992). Estas bactérias, tem inclusive como seus constituintes ácidos gordos, embora de baixo nível, cerca de 1 a 10% da fracção de lípidos polares é na sua maioria constituída por C15 a C8 (JONES ET AL,1987). Devido ao processo de digestão anaeróbia descrito no capítulo 1, estas bactérias ocupam a zona central da biomassa. O que pode implicar que a zona central corada dos grânulos da indústria cervejeira seja devido a presença das bactérias metanogénicas que pertencem ao domínio das arqueobactérias.

#### 4.4.3 Coloração III:

Na coloração das amostras do ensaio III, com o negro de Sudão (Figura 4.7 (a,b)) não se observa a camada envolvente corada, mas no entanto o interior da biomassa apresenta um aspecto semelhante aos grânulos utilizados no ensaio controlo (Figura 4.7 (a)). Este aspecto pode ser explicado, tendo em consideração que esta amostra é na realidade o inoculo após um período de operação com o oleato, sendo composta por biomassa granular com o oleato adsorvido. Na amostra retirada do dia 219 (Figura 4.7 (b, f)) esta estrutura não se mantém, pois segundo AMARAL ET AL (2001), com o aumento da concentração de ácido oleico, a biomassa tende a desgranular, como já foi referido este aspecto será descrito com mais pormenor no capítulo 5. Estas amostras (Figura 4.7 (b, f)) não apresentam uma estrutura organizada por camadas similar à do ensaio controlo, porque naturalmente a desagregação da biomassa já terá iniciado. A coloração obtida para o ensaio controle (Figura 4.7 (c)), não apresenta qualquer diferença em relação à coloração obtida para o ensaio anterior (Figura 4.6 (b, c)).

Nas colorações obtidas para as amostra com o óleo vermelho (Figura 4.7 (d,e e f)),a camada envolvente está presente. À semelhança do que foi descrito para a coloração com o negro de Sudão, a amostra referente ao dia 219 (Figura 4.7 (d,e)), perdeu a estrutura granular. A coloração obtida para o ensaio controle, (Figura 4.7 (g)) também não apresenta qualquer diferença da coloração obtida para o ensaio anterior (Figura 4.6 (f)).

Nas técnicas de histologia clássica, os lípidos podem ser largamente removidos na preparação das amostras. Por vezes, a remoção destes das amostras começa logo na fixação tradicional, a não ser que algumas precauções sejam tomadas, o que foi o caso destes ensaios. Podem ser removidos igualmente das amostras na desidratação com os álcoois. Para preparar a inclusão em parafina, é necessário trabalhar a uma temperatura superior ao ponto de fusão da mesma, superior aos 60 °C, o que pode ter implicado que os lípidos presentes com um ponto de fusão inferior, tenham passado ao estado líquido durante esta etapa, impossibilitando a sua coloração. Por isso seria ideal, numa futura abordagem preparar as amostras em ambiente criogenico

Para não existir uma perda dos lípidos ao longo do processo tradicional é quase sempre

necessário a utilização de secções criostáticas pois a rotina da parafina remove quase todos os lípidos menos as ligações lipoproteicas (HIGH, 1994).

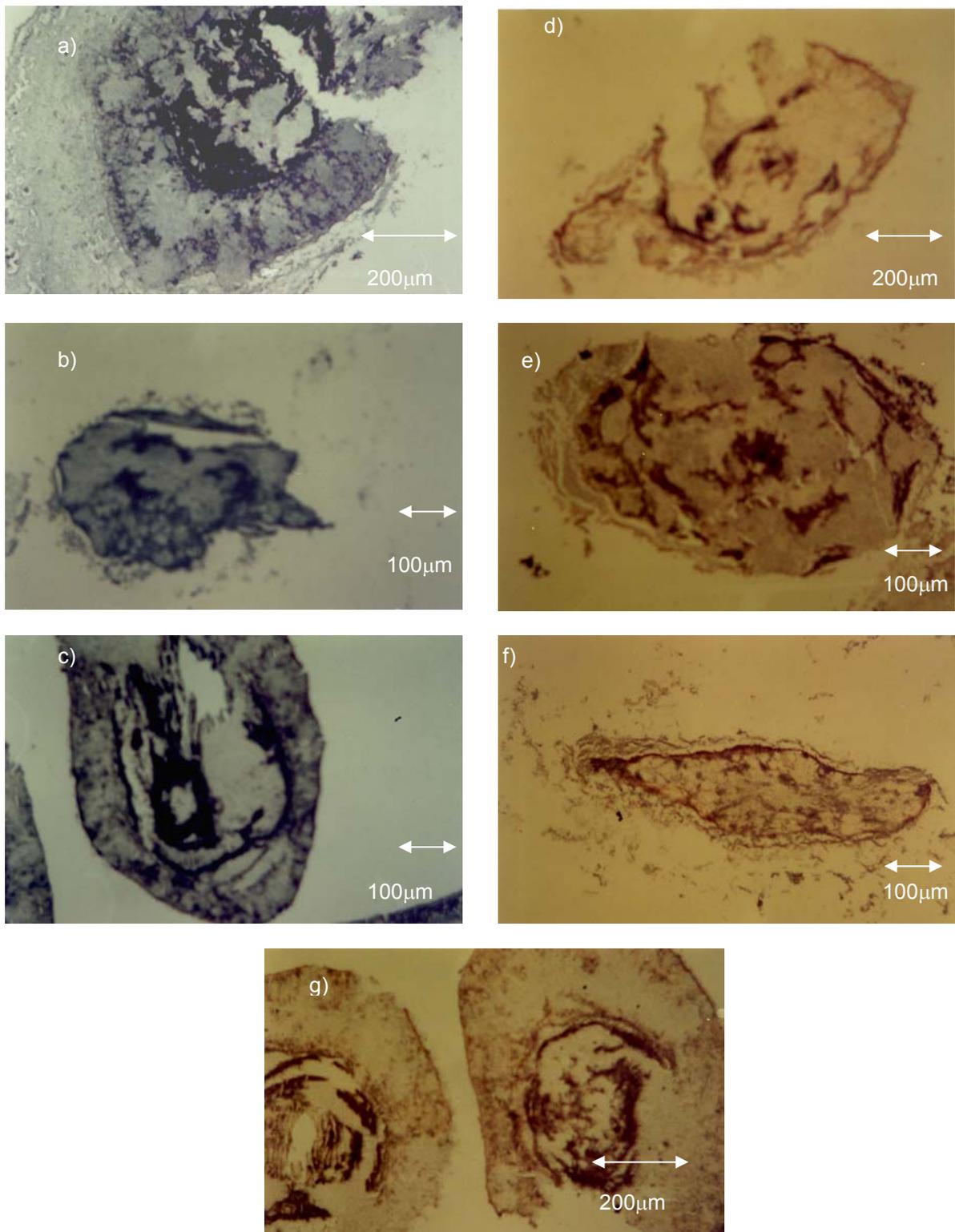


Figura 4.7 Resultados obtidos nos ensaios de coloração III. Coradas com negro de Sudão (a – amostra dia 162, b – amostra 219 e c – controlo). Coradas com óleo vermelho (d, e – amostra dia 162, f – amostra dia 219 e g – controlo)

### 4.5 Conclusão

Os resultados preliminares obtidos com a coloração dos lípidos das secções dos agregados microbianos anaeróbios permitiram obter as seguintes conclusões:

Dos dois corantes organotrópicos utilizados o mais indicado para estas amostras é o óleo vermelho. Embora provavelmente algum material lipídico tenha sido perdido durante o processo de identificação, ainda assim foi possível identificar uma zona corada na periferia dos agregados. É de realçar que além do material lipídico envolvente foi possível identificar zonas centrais coradas, essencialmente nos ensaios em controlo, podendo indicar que o centro da biomassa anaeróbia é composto por bactérias que contêm lípidos na sua constituição ou que por algum motivo o corante se fixou nesta zona.

## 5. Conclusões

A análise de imagem permitiu quantificar alterações morfológicas e de tamanho em consórcios microbianos anaeróbios durante processos de granulação e de desgranulação. Mediu-se a área média dos agregados e a área média de três gamas de tamanho de agregados. Foi possível determinar a fracção em número de cada uma das gamas de tamanho ao longo do processo e avaliar o aumento em número da fracção de maiores tamanhos. Verificou-se que havia uma selecção de partículas de tamanhos grandes dentro do reactor, por comparação entre o tamanho médio dos agregados grandes no reactor e na purga. Pela razão entre o comprimento total de filamentos livres e a área dos flocos foi possível monitorizar o estado de agregação da biomassa de uma forma quantitativa ao longo do processo.

Foi dada especial importância à quantificação e minimização de erros introduzidos nos resultados obtidos para os parâmetros morfológicos devidos à diluição das amostras. Concluiu-se que a diluição óptima a realizar nestes ensaios não depende só da concentração da biomassa mas também das características (tamanho e estrutura) da mesma. Foi identificada a importância do método de recolha das amostras do reactor para estudos deste tipo, tendo este método sido otimizado.

A análise qualitativa de imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento permitiu observar alterações da população bacteriana ao longo do processo de granulação e também antes e após o fenómeno de desgranulação.

Com a diminuição do tempo de retenção hidráulico e conseqüente aumento da carga orgânica a biomassa começou a apresentar características diferentes. Nos inóculos utilizados já se encontravam bactérias filamentosas que poderiam ser do género *Methanosaeta*, mas sob a forma de bastonete. Com a maturação da biomassa, estas são substituídas por bactérias filamentosas. Durante o processo de granulação, também se detectaram bactérias semelhantes a *Methanosarcina*. Num estado granular, as bactérias do género *Methanosarcina* deixam de ser tão evidentes na superfície da biomassa.

Nas hibridizações com sondas genéticas foi possível identificar e localizar bactérias e arqueobactérias em agregados microbianos anaeróbios. Na optimização da técnica de FISH, com as sondas Arc915 e Eub318, aplicadas a biomassa granular mesófila pode-se concluir que a introdução do SDS melhora o sinal das sondas e reduz o "background", a impregnação em parafina e corte da amostra melhora significativamente a penetração das sondas na biomassa, que este tipo de microorganismos necessita de um tempo de hibridização elevado (10 horas) e que a percentagem de formamida óptima não é igual para as duas sondas. Para a do domínio arqueo

(Arc915) a percentagem ideal é de 35%, e para o domínio bactéria (Eub338) é de 5 % em formamida.

Os resultados preliminares obtidos com a coloração dos lípidos das secções dos agregados microbianos anaeróbios permitiram retirar as seguintes conclusões:

Dos dois corantes organotrópicos utilizados (negro de Sudão e óleo vermelho) o mais indicado para estas amostras é o óleo vermelho. Embora provavelmente algum material lipídico tenha sido perdido durante o processo de identificação, ainda assim foi possível identificar uma zona corada na periferia dos agregados. As técnicas histológicas poderão ser exploradas a nível de localização de outros componente tais como polissacáridos e proteínas.

## 6. Referências Bibliográficas

- AHRING, B.K., CHRISTIANSEN, N., MATHRANI, I., HENDRIKSEN, H.V., MACARIO, A.J.L. E CONWAY DE MACARIO, E. (1992) Introduction of a de novo remediation ability, aryl reductive dechlorination, into anaerobic granular sludge by inoculation of sludge with *Desulfomonile tiedjei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3677-3682.
- ALPHENAAR (1994) Anaerobic granular sludge: characterization and factors affecting its performance. *Ph.D. Thesis*. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.
- ALPHENAAR, P.A., PEREZ, M.C., E LETTINGA G. (1993) The influence of substrate transport limitation on porosity and methanogenic activity of sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol*, 39, 27-280.
- ALVES, M., CAVALEIRO, A.J., FERREIRA, E.C., AMARAL, A.L., MOTA, M., DA MOTTA, M., VIVIER, H. E PONS, M.N. (2000) Characterisation by image analysis of anaerobic sludge under shock conditions *Wat. Sci. Technol.*, 41,12, 207-214
- ALVES, M.M., MOTA, V.J.A., ÁLVERES, P.R.M., PEREIRA, M.A E MOTA M (2001) Effects of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed reactors. Part II: oleic acid toxicity and biodegradability. *Wat. Res. (G.B.)* 35,264
- ALVES, M.M., PEREIRA, A.M., NOVAIS, J.M., POLANCO, F.F., MOTA, M. (1999) A new device to select microcarriers for biomass immobilization: application to anaerobic consortium *Wat. Environ. Res.*, 41, 72, 209-217
- AMANN, R. I. (1995) In Situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.3.6 1-5
- AMANN, R.I., E LUDWIG W. (2000) "Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology" *Fems Microbiology reviews*, 24, 555-565.
- AMANN, R.I., LUDWIG, W., E SCHLEIFER, K.H. (1995) Phylogenetic identification and In Situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 143-169.
- AMARAL, A.L.P.(1998) Desenvolvimento de análise de imagem para aplicação em processos biotecnológicos. *Universidade do Minho*, Departamento de Engenharia Biológica. Tese de Mestrado
- AMARAL, L.P., MOTA, M. E FERREIRA, E.C. (1999) Aplicações de técnicas de análise de imagem em microbiologia ambiental. *6.ª conferência nacional da qualidade do ambiente*, Lisboa, 2, 29-38.
- AMARAL, L.P., PEREIRA, M. A., NEVES, L., DA MOTTA, M., PONS, M.N., VIVIER, H., FERREIRA, E.C. E ALVES, M.M., (2001) Characterization by image analysis from two EGSB reactors treating oleic acid: automatic detection of granules disintegration. *In: Proceedings 9<sup>th</sup> World Congress on Anaerobic Digestion, 2001*, Technologisch institute vol, 1, 89-94
- BANCROFT, J.D. (1989) Histochemical techniques (Ed) *Butterworths* 141-161
- BINNERUP, S.J., BLOEM, J., HANSEN, B. M., WOLTERS, W., VENINGA, M. E HANSEN, M. (2001) Ribosomal RNA content in micro colony forming soil bacteria measured by quantity 16S rRNA hybridization and image analysis. *Fems Microbiol. Ecol.*, 1278, 1-7.
- CLARCK, G. (1981) Staining Procedures, 4.º edição (Ed) *Willians and Wilkins*
- COLLERAN, E., FINNEGAN, S. E LENS, P.N.L. (1995) Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 29-46.

- COX, P.W., PAUL, G.C. E THOMAS, C.R. (1998) Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiology*, 144, 817-827.
- DA MOTTA, M., AMARAL, L.P., NEVES, L., ARAYA, P., FERREIRA, E.C., ALVES, M.M., MOTA, M., ROCHE, N., VIVIER, H., E PONS, M. N., (2001) Efeito da diluição na caracterização da biomassa de sistemas de tratamento de efluentes por análise de imagem. *Proceedings XIV COBEQ 2002 (in press)*
- DAFFONCHIO, D., THAVEESRI, J. E VERSTRAETE, W. (1995) Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3676-3680.
- DE ZEEUW W.(1987) Granulation sludge in UASB reactors. Proc. GASMAT- workshop, 25-27 OCT.Lunteren, The Netherlands, p132
- DOLFING J. (1987) Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. *Ph.D. Thesis*, Agricultural University Wageningen, The Netherlands.
- DOLFING, J. (1988) Acetogenesis. In *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Alexander J. B. Zehnder (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 417-468.
- DOUGHERTY, E. R. (1994) Digital image processing methods *Marcel Dekker*, (Ed) Inc, New York, 1-23
- DUDLEY, B.T., GRAHAM, H. A.R., BRUTTON, A.G. E WALLIS, F. (1993) Image analysis to quantify and measure UASB digester granules. *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 279-283.
- EASTMAN, J.A. E FERGUSON, J.F. (1981). Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 53:3, 352-366.
- FANG H.H.P. (1997) Microbial distribution and syntrophic association in UASB reactors. In: *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 1, 83-90.
- FANG, H.H.P., CHUI, H.K. E LI, Y.Y. (1994) Microbial structure and activity of UASB-granules treating different wastewaters. *Wat. Sci. Technol.*, 30, 12, 87-96.
- FICKER, M., KRASTEL, K. E ORLICKYS, E.E. (1999) Molecular characterization of a toluene degradation methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 12, 5576-5585.
- FORSTER, C. F. E QUARMBY, J. (1995) The Physical Characteristics of Anaerobic granular Sludge in relation to their internal architecture. *Antonie van leeuwenhoek*, 67, 103-110.
- FOX, E.G., PITULLE, C. E HEDENSTIERNA, K.O.F. (1995) A novel approach for monitoring genetically engineered micro-organisms by using artificial, stable RNAs. *Appl. Environ. Microbiol*, 61, 10, 3661-3666.
- GLASBEY, C. A. E HORGAN, C.W. (1994) Image analysis for the biological sciences. *John Wiley & Sons*, Chichester, 1-44.
- GROBICKI, A. E STUCKEY, D.C. (1991) Performance of the anaerobic baffled reactor under steady-state and shock loading conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 344-355.
- GROTENHUIS, J.T.C., KISSEL, J.C., PLUDGE, C.M. E ZEHNDER, A.J.B. (1991) The role of substrate concentration in particle size distribution in UASB reactor. *Wat. Res.*, 25, 21-27.
- GROTENHUIS, J.T.C., SMIT, M., VAN LAMMEREN, A.A.M., STAMS, A.J.M. E ZEHNDER, A.J.B. (1991) Localization and quantification of extracellular polymers in methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol*, 36, 115-119.
- GUIOT, S.R., PAUSS, A. E COSTERTON, J.W. (1992) A structured model of the anaerobic granule consortium. *Wat. Sci. Technol*, 25, 7, 1-10.
- GUIOT, S.R., SAFI, B., FRIGON, J.C., MERCIER, P., MULLIGAN, C., TREMBLAY, R. E SAMSON, R. (1995) Performances of a full-scale novel multiplate anaerobic reactor treating cheese whey effluent. *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 398-405,
- GUJER, W. E ZEHNDER, A.J.B. (1983) Conversion processes in anaerobic digestion, *Wat. Sci. Technol.*, 15, 127-167.

- HABETS, L.H.A., ENGELAAR, A.J.H.H. E GROENEVELD, N. (1997) Anaerobic treatment of inuline effluent in an internal circulation reactor. *Wat. Sci. Technol.*, 35:10, 189-197.
- HARMSSEN, H.J.H., KENGEN, H.M.P., AKKERMANS, A.D.L., STAMS, A.J.A. E VOS, W.M. (1996). Detection and localization of syntrophic propionate oxidization bacteria in granular sludge by In Situ hybridization with 16S rRNA based in oligonucleotides probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 5,1656-16663.
- HARPER, R.S. E POHLAND F.G. (1997) Microbial consortia selection in anaerobic filters operated in different reactor configurations. *Wat. Sci. Tech.*,36,6-7,33-39
- HEPPNER, B., ZELLNER, G. E DIEKMAN, H. (1992) Start-up and operation of a propionate-degrading fluidized-bed reactor *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 810-816.
- HICKEY, R.F., WU, W.-M., VEIGA, M.C. E JONES, R. (1991) Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Wat. Sci. Technol.*, 24:8, 207-255.
- HIGH, O. B. (1984) Lipid Histochemistry. *Royal Microscopical Society*, microscopy handbooks 6 (Ed) Oxford Science publications.
- HIGH, O.B. E LAKE, B.D. (1994) Lipids. *In: Theory and Practice of histological techniques*, Bancroft J.D. e Stevens A. edição n.º4 (Ed) *Churchill Livingstone*, 213-242.
- HOOPWOOD D. (1994) Fixation and Fixatives. *In: Theory and Practice of histological techniques*, Bancroft J.D. e Stevens A. edição n.º4 (Ed) *Churchill Livingstone*, 23-46.
- HOROBIN, R.W.(1994) "The theory of staining and its practical implications" *In: Theory and Practice of histological techniques*, Bancroft J.D. e Stevens A. edição n.º4 (Ed) *Churchill Livingstone*, 81-98.
- [http:// business.fortunecity.com](http://business.fortunecity.com).
- HULSHOF POL, L., EULER, H., EITNER, A. E GROHGANZ, D. (1997) GTZ sectoral project Promotion of Anaerobic Technology for the Treatment of Municipal and Industrial Sewage and Waste. *In: Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. on Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 2, 285-292.
- HULSHOF POL, L.W., DE ZEEUW, W.J., VELZEBOER, C.T.M. E LETTINGA, G. (1983) Granulation in UASB reactor. *Wat. Sci. Technol.*, 15:8/9, 291-304.
- HULSHOFF POL, L.W. (1989) The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- HULSHOFF POL, L.W., HEIJNEKAMP, K. E LETTINGA G. (1987) "The selection pressure as a driving force behind the granulation of anaerobic Sludge" *In: Proc. Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology (GASMAT) Workshop*, G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis, L.W. Hulshoff Pol (Eds.), Puduc Wageningen, Wageningen, 154-161.
- HUSER, B.A., WUHRMANN, K. E ZEHNDER, A.J.B. (1982) *Methanothrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 132, 1-9.
- HWU, C.-S, TSENG S.-K, YUAN, C.-Y, KULIK, Z. E LETTINGA, G.,(1998)," Biosorption of long fatty acids in UASB treatment process" *Wat. Res.*, 32, 5,1571-1579.
- HWU, C.-S. (1997) Enhancing anaerobic treatment of wastewaters containing oleic acid. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- HWU, C.-S., VAN BEEK, B., VAN LIER, J.B. E LETTING, G. (1997a) Thermophilic high-rate anaerobic treatment of wastewater containing long-chain fatty acids: effect of washed out biomass recirculation. *Biotechnol. Lett.*, 19, 5, 453-456.
- INGHAM, P.W., HIDALGO, A. E TAYLOR, A.M. (1990) Advantages e limitations of In Situ hybridizations exemplified by the molecular genetic analysis of *Drasophila* development. *In: In Situ hybridization applications to developmental biology and medicine*, Society for experimental biology, seminar series 40, Harris, N e Wilkinson, D.G., 97-114.
- JÄHNE, B. (1995). Digital image processing. (Ed) Springer-Verlag, Berlin, 3-36.
- JERIS, J., E MCCARTY, P.L (1965) The biochemistry of methane fermentation using C14 tracers. *J. Wat Pollut. Control Fed.*, 37:2, 143-148.

- JIAN, C. E SHI, -Y. L. (1993) Study on mechanism of anaerobic sludge granulation in UASB reactors. *Wat. Sci. Technol*, 28, 7, 171-178.
- JONES, W.J., NAGLE, D.P. E WHITMAN, W.B. (1987) Methanogens and the diversity of Archaeobacteria. *Microbiol. Rev.*, 51:1, 135-177.
- KAMAGATA, Y. E MIKAMI, E. (1990) Some characteristics of two morphotypes of *Methanotrix soehngenii* from mesophilic anaerobic digesters. *J. Ferm. Bioeng.*, 70:4, 272-274.
- KOSARIC N. E BLASZCZYK R. (1990) Microbial aggregates in anaerobic wastewater treatment. *In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 42, A. Fiechter (Ed.) Springer - Verlag, Berlin, 27-62.
- LETTINGA G., VAN VELSEN A. F. M., HOBMA S. W., DE ZEEUW W. E KLAPWIJK A. (1980) Use of upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699-734.
- LETTINGA, G. (1995) Anaerobic digestion and wastewater treatment. *Antonie van Leewenhoek*, 67, 3-28.
- LETTINGA, G., HOBMA, S.W., HUSHOFF-POL, L.W., DE ZEIJW, W., DE JONG, P. E ROERSMA, R (1983) Design operation and economy of anaerobic treatment. *Wat. Sci. Technol*, 15, 7-8, 117-195.
- LUDWIG, W. E SCHLEIFER, K -H. (1999) Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *Asm News*, 11/99
- MACLEOD, F.A., GUIOT, S.R. E COSTERTON, J.W. (1990) Layered structure of bacterial aggregates produced in an up flow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol*, 59, 1598-1607.
- NÜBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMMAN, R.I. LUDWIG W. E BACHAUS, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16 S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperatures gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol*, 178, 19, 5636-5643.
- PACKER, H.L. E THOMAS, C.R. (1990) Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng*, 35, 870-881.
- PALMS SAM-SOON, LOEWENTHAL R. E., WENTZEL M.C. E MARAIS G.R. (1991) " A long-chain fatty acid, oleate, as sole substrate in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor systems" *Water SA* 17,1
- PARKIN, G.F. E OWEN, W.F. (1986) Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges, *J. Environ. Eng. Div. ASCE*, 112:5, 867-919.
- PEREIRA, M.A., MOTA, M., ALVES M.M. (2001) Degradation of oleic acid in anaerobic filters: the effect of inoculum acclimatization and biomass recirculation. *Water Environmental Research*, 73, 5, 612-621
- PEREIRA, M.A., PIRES, O.C., MOTA, M. E ALVES, M.M. (2001-A) Sequencing adsorption and degradation cycles towards the methanization of long chain fatty acids: comparison between granular and suspended sludge. *In: Proceedings 9<sup>th</sup> World Congress on Anaerobic Digestion, 2001*, (Ed)Technologisch institute vol, 1, 605-610
- PIRES, O.C., PEREIRA, M.A., ALVES, M.M. E MOTA, M. (2001) Extracion and analisis of long chain fatty acids adsorbed onto active and inactive anaerobic sludge. *In: Proceedings 9<sup>th</sup> World Congress on Anaerobic Digestion, 2001*, (Ed)Technologisch institute vol, 2, 469
- PLUMB, J.J, BELL, J. E STUCKEY, D.C. (2001) Microbial populations associated with treatment of an industrial dye effluent in an anaerobic baffled reactor. *Appl. Environ. Microbiol*, 67, 7, 3226-3235.
- QUARMBY, J. E FORSTER, C.F. (1995) An examination of the structure of UASB granules. *Wat. Res.*, 29, 11, 2449-2454.
- RASKIM, L., STOMBLEY, J.M., RITTMANN, B.E. E STAHL, A.D. (1994) Group-specific 16SrRNA hybridisation probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol*, 60, 1232-1240

- RINZEMA, A. (1988) Anaerobic treatment of wastewater with high concentration of lipids or sulfate. *Ph.D. Thesis*, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- RUSS, J. C. (1995) The image processing handbook (Ed) *CRC Press*, Boca Raton, 1-33.
- SANDERSON, J.B. (1984) Biological Microtecnica. *Royal microscopical society*, microscopy handbooks 28, (Ed) Bios scientific publishers
- SCHINK, B. E THAUER, R.K. (1988) Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation. In: *Proc. Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology (GASMAT) Workshop*, G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis, L.W. Hulshoff Pol (Eds.), Puduc Wageningen, Wageningen, 5-17.
- SCHMIDT J.E. E AHRING B.K. (1996) Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 229-246.
- SEKIGUCHI, Y., KAMAGATA, Y., NAKAMURA, K., OHASHI, A. E HARADA, H. (1999) Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and termophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3.1280-1288.
- SMITH, A. L. (1984) Princípios da Microbiologia. Edição(Ed) *collegue publishing*, 37-88.
- SPROTT, G.D. (1992) "Structures of archaeobacterial Membrane lipids" *Journal of Bioenergetics and Biomenbranes*, 24, 6
- STAHL, D.A., AMANN, R.I., POULSEN, L.K. E CAPMAN, W.C. (1995) Use of fluorescence probes for determinative microscopy of methanogenic archaea In: *Archaea, laboratory manual*, Rob, F.T., Place, A.R., Sowers, K.R., Schreier, H.J., Dassarma, S, e Fleischmann, 114-121.
- VAN LIER, J.B., BOERSMA, F., DEBETS, M.M.W.H. E LETTINGA, G. (1994). High rate thermophilic anaerobic wastewater treatment in compartmentalized upflow reactors. *Wat. Sci. Technol.*, 30, 251-261.
- VERSTRAETE, W. E VANDEVIVERE, P. (1997) Broader and newer applications of anaerobic digestion. In: *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 1, 67-74.
- WEIL, J.H. (1983) Bioquímica geral 4.º edição (Ed) *Fundação Calouste Gulbenkian*, 69, 239-270.
- WEILAND, P. E ROZZI, A. (1991) Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems: Discusser's Report. *Water Sci. Technol.*, 24, 8, 257-277.
- WHITMAN, W.B., BOWEN, T.L. E BOONE, D.R. (1992) The methanogenic bacteria. In: *The Prokaryotes* 2 º Edição, Balows, A., Triper, H. G., Dwerkin, M., Harden, W. e Schleifer, K. H. (Ed) Springer-Verlag New York in company, 719-767.
- WIEGANT, W. M. (1987) The spaghetti theory on anaerobic granular sludge formation, or the inevitability of granulation In: *Proc. Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology (GASMAT) Workshop*, G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis, L.W. Hulshoff Pol (Eds.), Puduc Wageningen, Wageningen, 146-153.
- WOLFE, R.S. (1992) Biochemistry of methanogenesis. In: *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*, *Biochem. Soc. Symp.* n° 58, 41-49.
- WU, J.H., LIU, W.T., TSENG, I.C., E CHENG, S.S. (2001) "Characterization of microbial consortia in a terephthalate- degrading anaerobic granular sludge system" *Microbiology*, 147,373-382.
- WU, W.M., JAIN, M.K., E ZEIKUS J.G. (1996) "Formation of fatty acid-degrading anaerobic granules by defined species" *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 6, 2037-2044.
- YODA M. E NISHIMURA S. (1997) Controlling granular sludge floatation in UASB reactors. In: *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. Anaerobic Digestion*, Sendai, Japão, Vol. 3, 579-586.
- YOUNG, J.C.E MCCARTY, P.L. (1967) The anaerobic filter for waste treatment. In: *Proc 22nd. Ind. Waste Conf.*, Purdue University, 559-575.
- YU, H.Q., FANG, H.H.P., TAY, J.H.(2000) Effects of Fe<sup>2+</sup> on granulation in upflow anaerobic sludge balnket reactor., *Wat. Sci. Technol* 41, 12, 199-205.

- YU, H.Q., TAY, J.H. E FANG, H.H.P. (2001) The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Wat. Res.*, 35, 4, 1052-1060.
- ZEIKUS, J.G. (1980) Microbial populations in digesters. In: *Anaerobic Digestion*. D.A. Stafford, B.I. Wheatley and D.E. Hughes (eds.), Applied Science Publishers, London, 61-89.