



**TÂNIA ISABEL
LOPES GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA
EM REATORES ANAERÓBIOS**



**TÂNIA ISABEL
LOPES GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA
EM REATORES ANAERÓBIOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Helena Gomes de Almeida Gonçalves Nadais, Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Professora Doutora Maria Isabel Aparício Fernandes Capela
Professora associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Jorge Humberto Gomes Leitão
Professor auxiliar do Instituto Superior Técnico de Lisboa

Professora Doutora Maria Helena Gomes de Almeida Gonçalves Nadais
Professora auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro
(Orientadora)

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Helena Nadais pela sua disponibilidade, pelas sugestões e conhecimentos transmitidos ao longo da elaboração desta tese. Agradeço também pela disponibilização do equipamento imprescindível para esta dissertação.

A todos os que passaram pelo laboratório do DAO, em especial à Tânia Gameiro e Joana Botelho pelos conhecimentos transmitidos acerca do funcionamento do microscópio e observação dos microrganismos.

À Cátia Couras que operou e monitorizou os reatores nos quais foram recolhidas as amostras de biomassa, e pela paciência que teve ao transmitir-me a informação necessária dos reatores para a composição dos meus resultados.

Agradeço profundamente aos meus pais, António e Teresa, pelo apoio, confiança, estímulo e amor demonstrados ao longo da minha vida. À minha irmã, Sónia, pelos momentos de descontração.

Agradeço ao meu namorado Luís, recentemente promovido a marido, pelo apoio, paciência e compreensão.

Finalmente, a todos os que de forma direta ou indireta contribuíram para alcançar esta etapa da minha vida.

palavras-chave

População microbiana, microrganismos *archaea* metanogénicos, indústrias do mobiliário, digestão anaeróbia, reator *UASB*.

Resumo

O objetivo deste trabalho é avaliar a comunidade microbiana presente no tratamento anaeróbio de efluentes da indústria de mobiliário de madeira.

Para tal recorreu-se ao reator *UASB* para se proceder ao tratamento anaeróbio dum efluente proveniente duma cabine de pintura e envernizamento duma indústria do mobiliário de madeira.

Foram recolhidas amostras relativas a ensaios com os reatores de forma a testar diferentes condições experimentais, tais como: carga orgânica, caudais, temperatura e pH. Foi observado o comportamento da população microbiana presente nas lamas anaeróbias recorrendo a um microscópio de contraste de fase, verificando diretamente a adaptação da população e a fluorescência metanogénica no decorrer da operação. Foram ainda aplicados os métodos de *Gram* e de *FISH*.

Os resultados demonstraram que houve uma formação de flocos mais evidente por parte da população microbiana, nas condições em que a carga orgânica foi de cerca de $1 \text{ gCQOt.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, caudal entre 0,25 e 0,5 L/h e temperatura entre 35 e 45°C.

Observou-se que no interior dos flocos a intensidade de fluorescência era mais elevada o que evidencia que a formação de flocos é importante para que a produção de biogás, pois é no interior deles que coabitam em maior número os microrganismos *archaea* metanogénicos.

Em 3 dos 9 ensaios monitorizados verificou-se um aumento da fluorescência metanogénica com o decorrer do ensaio.

Os resultados do método de *FISH* indicaram que em contacto com o efluente a estrutura da população microbiana sofre alterações em geral, diminuindo a abundância relativa de *Bacteria* e aumentando a abundância relativa de *Archaea*.

Keywords

Microbial population, methanogenic *Archaea* microorganisms, furniture industries wastewaters, anaerobic degradation, reactor *UASB*.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the microbial community present in the anaerobic treatment of a wastewater from a wood furniture industry. To this end we resorted to UASB reactor to proceed to the anaerobic treatment of an effluent from a paint booth and varnishing from a wood furniture industry. Biomass samples were collected from the reactors in order to test the effects of different experimental conditions, such as organic load, flow rates, temperature and pH.

The behavior of the anaerobic microbial population was observed using a phase contrast microscope directly checking the adjustment of the methanogenic population fluorescence during the operation. We also applied the methods of *Gram* and *FISH*. The results showed that there was flocculation evident under conditions of organic load of about $1 \text{ gCQOt.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, flow rate from 0.25 to 0.5 L/h and temperature between 35 and 45°C. It was observed that within the flocs fluorescence intensity was higher which shows that the flocculation is important for biogas production as it is within the flocs that more methanogenic *archaea* microorganisms were observed. In 3 of 9 monitored tests there was an increase in the fluorescence methanogenic during the test.

The FISH method results indicate that the contact with the effluent show undergoes changes of the structure of the microbial population in general, reducing the relative abundance of *Bacteria* is increasing relative abundance of *Archaea*.

ÍNDICE

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1. Enquadramento	1
2. Introdução	5
2.1. A indústria do mobiliário de madeiras	5
2.2. Tratamento Anaeróbio e reator UASB	6
2.2.1. A importância da granulação nos reatores UASB.....	8
2.3. Digestão Anaeróbia	10
2.3.1. Hidrólise	11
2.3.2. Acidogénese	12
2.3.3. Acetogénese.....	12
2.3.4. Metanogénese	13
2.4. Necessidades nutricionais	14
2.5. Condições ambientais.....	15
2.6. Microbiologia	17
2.6.1. Tipos de microrganismos	17
2.6.2. <i>Archaea</i> metanogénicas	18
2.7. Métodos microbiológicos	21
2.7.1. Técnicas de microscopia	22
2.7.1.1. Coloração de Gram	22
2.7.1.2. Contagem	22
2.7.1.3. Técnica de FISH	25
2.8. Objetivos.....	27
3. Metodologia	29
3.1. Descrição dos reatores UASB.....	29
3.2. Características do inóculo.....	32
3.2.1. Lamas utilizadas na avaliação da influência da carga orgânica.....	33
3.2.2. Lamas utilizadas na avaliação da influência do caudal e pH.....	36
3.2.3. Lamas utilizadas na avaliação da influência da temperatura	41
3.3. Análises físico-químicas.....	45

3.3.1.	pH e alcalinidade.....	45
3.3.2.	Sólidos.....	45
3.4.	Métodos microbiológicos	46
3.4.1.	Observação microscópica	46
3.4.2.	Amostragem e observação direta.....	46
3.4.3.	Observação de fluorescência metanogénica	47
3.4.4.	Contagem	47
3.4.5.	Coloração de Gram	49
3.4.6.	Método de FISH	50
4.	Resultados	53
4.1.	Efeito da carga orgânica	53
4.1.1.	Desempenho dos reatores UASB.....	53
4.1.2.	Estrutura da comunidade microbiana	54
4.1.3.	Resultados do método de FISH.....	68
4.2.	Efeito do caudal	70
4.2.1.	Desempenho dos reatores UASB.....	70
4.2.2.	Estrutura da comunidade microbiana	71
4.2.3.	Resultados do método de FISH.....	80
4.3.	Efeito da temperatura e do pH.....	83
4.3.1.	Desempenho dos reatores UASB.....	83
4.3.2.	Estrutura da comunidade microbiana	85
4.3.3.	Resultados do método de FISH.....	95
4.4.	Efeito da temperatura na concentração de microrganismos na biomassa	97
5.	Discussão	99
5.1.	Efeito da carga orgânica	99
5.2.	Efeito do caudal	100
5.3.	Efeito da temperatura	101
5.4.	Efeito do pH	101
5.5.	Síntese.....	102
5.6.	Método de FISH	105
6.	Conclusões e Sugestões.....	111
7.	Referências Bibliográficas.....	113
8.	Anexos	117

Anexo I – Análise da significância do declive aos resultados de FISH	117
Anexo II – Análise da significância do declive aos resultados da produção diária de CH ₄	131

Índice de Figuras

Figura 1 - Diagrama esquemático de um reator <i>UASB</i> (adaptado de Habeed <i>et al.</i> , 2011).....	7
Figura 2 - Modelo proposto que representa a estrutura em camadas de um grânulo de um reator <i>UASB</i> (ABBASI <i>et al.</i> , 2012).....	9
Figura 3 - Representação esquemática da formação de um grânulo através da anexação da microflora em torno de um núcleo (ABBASI <i>et al.</i> , 2012).....	9
Figura 4 - Representação esquemática do processo de digestão anaeróbia (adaptado de Tchobanoglous <i>et al.</i> , 2003 e Grilo, 2009).....	11
Figura 5 - Árvore filogenética universal (Rosário, 2009).....	17
Figura 6 - Árvore filogenética de metanogénicas atualizada, do domínio <i>Archaea</i> . Nomes do género e família aparecem entre aspas. Os microrganismos não-metanogénicos são indicados pelo nome do grupo (triângulos largos) (GARCIA <i>et al.</i> , 2000).....	20
Figura 7 – Câmara de Neubauer (vista de topo).....	23
Figura 8 - Superfície de contagem.....	24
Figura 9 - Local de quantificação de baixas densidades celulares (a azul) e densidades mais elevadas (a vermelho).....	24
Figura 10 - Representação esquemática do processo de hibridação <i>in situ</i> (adaptado de Sanz <i>et al.</i> , 2007).....	25
Figura 11 - Fotografias dos reatores utilizados nos ensaios experimentais.....	31
Figura 12 - Representação dos pontos de amostragem existentes nos reatores.....	32
Figura 13 - Microfotografia de uma amostra de lamas anaeróbias representando uma visão geral da população. Amostra sem diluição. (x100).....	33
Figura 14 - Microfotografia de dois flocos presentes numa amostra de lamas anaeróbias diluída na proporção 1:1. (x400).....	34
Figura 15 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> em lamas anaeróbias. Preparação sem diluição das lamas. (x400).....	34
Figura 16 - Microfotografias da aplicação da coloração de <i>Gram</i> nas lamas anaeróbias. Pormenor de dois flocos. a) Preparação com diluição das lamas 1:1, b) lamas sem diluição. (x1000).....	35
Figura 17 - Microfotografias de dois flocos e respetivas fluorescências metanogénicas de uma amostra de lamas diluídas na proporção 1:1. (x400).....	36
Figura 18 - Microfotografia de uma amostra de lamas anaeróbias sem diluição, representando uma visão geral da população. (x100).....	37
Figura 19 - Microfotografia de um floco presente numa amostra de lamas anaeróbias sem diluição. (x400).....	38
Figura 20 - Microfotografia de um floco presente numa amostra de lamas anaeróbias diluída na proporção 1:10. a) (x400) e b) a sua respetiva ampliação a (x1000).....	38
Figura 21 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> em lamas anaeróbias sem diluição. (x100).....	39

Figura 22 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> nas lammas anaeróbias. Pormenor de dois flocos Gram positivos. (x1000).....	39
Figura 23 - Microfotografias de dois flocos e respetivas fluorescências metanogénicas de uma amostra de lammas sem diluição. (x400)	40
Figura 24 - Microfotografia de um floco e a respetiva fluorescência metanogénica de uma amostra diluída na proporção de 1:10. (x400)	40
Figura 25 - Microfotografia de uma amostra de lammas anaeróbias representando uma visão geral da população. Amostra diluída na proporção de 1:1. (x100)	42
Figura 26 - Microfotografia de dois flocos presentes numa amostra de lammas anaeróbias diluídas na proporção de 1:10. a) (x400); b) (x1000).....	42
Figura 27 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> em lammas anaeróbias. Preparação sem diluição das lammas. (x400).....	43
Figura 28 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> em lammas anaeróbias. Pormenor de um floco <i>Gram</i> positivo. Lammas sem diluição. (x1000)	43
Figura 29 - Microfotografias de dois flocos e respetivas fluorescências metanogénicas de uma amostra de lammas diluídas na proporção de 1:10. (x1000).....	44
Figura 30 - Esquema de montagem da câmara de Neubauer.....	48
Figura 31 - Esquema de contagem celular.....	49
Figura 32 - Representação gráfica do volume de CH ₄ cumulativo produzido pelos reatores R1, R2 e R3 ao longo do tempo de operação.	53
Figura 33 - Representação gráfica da remoção de CQO para os reatores R1, R2 e R3 ao longo do tempo de operação.	54
Figura 34 – Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R2, em diferentes dias de operação. a) Dia 1, ponto 2: amostra sem diluição (x100); b) Dia 3, ponto 2: amostra sem diluição (x100); c) Dia 6, ponto 1: amostra sem diluição (x400); d) Dia 8, ponto 1: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400); e) Dia 16, ponto 1: amostra sem diluição (x100); f) Dia 30, ponto 1: amostra sem diluição (x100).	55
Figura 35 - Microfotografias de flocos (a; b; c; d) e respetivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1; d.1) de amostras retiradas do reator R2, ponto 1, em diferentes dias de operação, todas as amostras diluídas na proporção de 1:1. (x400) a) Dia 6; b) Dia 16; c) Dia 23; d) Dia 30.	57
Figura 36 – a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R2 ao longo do tempo de operação.	58
Figura 37 – Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R2 no 30º dia de operação. Amostra sem diluição. (x100).....	58
Figura 38 – Microfotografias da aplicação da coloração de <i>Gram</i> . a) Floco arroxeadado (x400), e a sua respetiva b) ampliação (x1000). Amostra sem diluição.	59
Figura 39 – Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R1, em diferentes dias de operação. a) Dia 1, ponto 2: amostra sem diluição (x100), b) Dia 3, ponto 2: amostra diluída na proporção de 1:1 (x100); c) Dia 6, ponto1: amostra sem diluição (x400); d) Dia 8, ponto 1: amostra diluída na proporção de 1:1 (x100); e) Dia 16, ponto 1: amostra sem diluição (x100); f) Dia 30, ponto1: amostra sem diluição (x100).....	60

Figura 40 - Microfotografias de flocos (a; b; c; d) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1; d.1) de amostras retiradas do reator R1, ponto 1, em diferentes dias de operação. a) Dia 6: amostra diluída na proporção de 1:1 (x1000); b) Dia 16: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400); c) Dia 23: amostra sem diluição (x400); d) Dia 30: amostra sem diluição (x400).	62
Figura 41 – a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R1 ao longo do tempo de operação.	63
Figura 42 – Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R1 no 30º dia de operação. Amostra sem diluição. (x100).....	63
Figura 43 - Microfotografias da aplicação da coloração de <i>Gram</i> . a) Microfotografia de um floco arroxado (x400), e a sua respetiva b) ampliação (x1000). Amostra sem diluição.....	64
Figura 44 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R3, em diferentes dias de operação. Amostras sem diluição (x100). a) Dia 1, ponto 2; b) Dia 3, ponto 2; c) Dia 6, ponto 1; d) Dia 8, ponto 1; e) Dia 16, ponto 1; f) Dia 30, ponto 1.....	65
Figura 45 - Microfotografias de flocos (a; b; c; d) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1; d.1) de amostras retiradas do reator R3, ponto 1, em diferentes dias de operação, todas as amostras diluídas na proporção de 1:1. a) Dia 6, ponto 1. (x400); b) Dia 16, ponto 1. (x1000); c) Dia 23, ponto 1. (x400); d) Dia 30, ponto 1. (x400)	66
Figura 46 - a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R3 ao longo do tempo de operação.	67
Figura 47 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R3 no 30º dia de operação. Amostra sem diluição. (x100).....	67
Figura 48 - Composição microbiana da biomassa anaeróbia presente nos reatores R1, R2 e R3 detetada com duas sondas específicas do domínio <i>Archaea</i> – CY3 e <i>Bacteria</i> – FICT.	69
Figura 49 - Representação gráfica do volume de CH ₄ cumulativo produzido pelos reatores R1, R4, R5 e R6 ao longo do tempo de operação.	70
Figura 50 - Representação gráfica da remoção de CQO para os reatores R1, R4, R5 e R6 ao longo do tempo de operação.	71
Figura 51 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R4, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação com ampliação (x100). a) Dia 3; b) Dia 7; c) Dia 13.....	72
Figura 52 - Microfotografias de flocos (a; b; c) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1) de amostras retiradas do reator R4, ponto 1, em diferentes dias de operação. a) Dia 3: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400); b) Dia 7: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400); c) Dia 13: amostra sem diluição (x400).	73
Figura 53 - a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R4 ao longo do tempo de operação.	74
Figura 54 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R4 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000).....	74
Figura 55 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R5, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação, com ampliação (x100). a) Dia 3; b) Dia 7; c) Dia 13.....	75
Figura 56 - Microfotografias de flocos (a; b; c) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1) de amostras retiradas do reator R5, ponto 1, em diferentes dias de operação. a) Dia 3:	

amostra sem diluição (x400); b) Dia 7: amostra sem diluição (x400); c) Dia 13: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400).....	76
Figura 57 - a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R5 ao longo do tempo de operação.	77
Figura 58 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R5 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)	77
Figura 59 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R6, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação, com ampliação (x100). a) Dia 3; b) Dia 7; c) Dia 13.....	78
Figura 60 - Microfotografias de flocos (a; b; c) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1) de amostras retiradas do reator R6, ponto 1, em diferentes dias de operação todas diluídas na proporção de 1:1. a) Dia 3: (x1000); b) Dia 7: (x1000); c) Dia 13: (x1000).	79
Figura 61 - a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R6 ao longo do tempo de operação.	80
Figura 62 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R6 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)	80
Figura 63 - Composição microbiana da biomassa anaeróbia presente nos reatores R1, R4, R5 e R6 detetada com duas sondas específicas do domínio <i>Archaea</i> – CY3 e <i>Bacteria</i> – FICT.....	82
Figura 64 - Representação gráfica do volume de CH ₄ cumulativo produzido pelos reatores R6, R7 e R8 a operar a diferentes temperaturas ao longo do tempo de operação.	83
Figura 65 - Representação gráfica do volume de CH ₄ cumulativo produzido pelos reatores R6 e R9 a operar a pH diferentes e temperatura iguais ao longo do tempo de operação.	84
Figura 66 - Representação gráfica da remoção de CQO para os reatores R6, R7 e R8 a operar a diferentes temperaturas ao longo do tempo de operação.	84
Figura 67 - Representação gráfica da remoção de CQO para os reatores R6 e R9 a operar a pH diferentes e temperatura iguais ao longo do tempo de operação.	85
Figura 68 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R8, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação com ampliação (x100). a) Dia 3; b) Dia 7; c) Dia 13.....	86
Figura 69 - Microfotografias de flocos (a; b; c) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1) de amostras retiradas do reator R8, ponto 1, em diferentes dias de operação todas diluídas na proporção de 1:1. a) Dia 3: (x1000); b) Dia 7: (x1000); c) Dia 13: (x1000).	87
Figura 70 - a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R8 ao longo do tempo de operação.	88
Figura 71 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R8 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)	88
Figura 72 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R7, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação com ampliação (x100). a) Dia 3; b) Dia 7; c) Dia 13.	89
Figura 73 - Microfotografias de flocos (a; b; c; d) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1) de amostras retiradas do reator R7, ponto 1, em diferentes dias de operação todas as amostras diluídas na proporção de 1:1. a) Dia 3: (x1000); b) Dia 7: (x1000); c) Dia 13: (x1000).	90
Figura 74 - a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R7 ao longo do tempo de operação.	91

Figura 75 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R7 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)	91
Figura 76 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R9, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação com ampliação (x100). a) Dia 3; b) Dia 7; c) Dia 13.	92
Figura 77 - Microfotografias de flocos (a; b; c) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1) de amostras retiradas do reator R9, ponto 1, em diferentes dias de operação todas diluídas na proporção de 1:1. a) Dia 3: (x1000); b) Dia 7: (x400); c) Dia 13: (x400).	93
Figura 78 - a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R9 ao longo do tempo de operação.	94
Figura 79 - Microfotografia da aplicação da coloração de <i>Gram</i> a uma amostra retirada do reator R9 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)	94
Figura 80 - Composição microbiana da biomassa anaeróbia presente nos reatores R6, R7, R8 e R9 detetada com duas sondas específicas do domínio Archaea – CY3 e Bacteria – FICT.	96
Figura 81 - Correlação entre a concentração de microrganismos determinada pela contagem direta e pela biomassa como SSV nos reatores R6, R7, R8 e biomassa inicial.	98
Figura 82 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio <i>Bacteria</i> nos ensaios com os reatores R1, R2, R3, R4, R5 e R6 ao longo do tempo de operação. .	107
Figura 83 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio <i>Archaea</i> em todos os ensaios com os reatores R1, R2, R3, R4, R5 e R6 ao longo do tempo de operação.	109

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características físico-químicas dos efluentes utilizados nos diferentes ensaios com os reatores UASB.	29
Tabela 2 - Características do sistema UASB utilizado nos ensaios.....	30
Tabela 3 - Descrição das condições de operação a que os reatores foram submetidos nos vários ensaios.	30
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos (SST, SSV, pH e alcalinidade) das lamas utilizadas na operação dos reatores R1, R2 e R3.	33
Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos (SST, SSV, pH e alcalinidade) das lamas utilizadas na operação dos reatores R4, R5 e R9.	37
Tabela 6 - Parâmetros físico-químicos (SST, SSV, pH e alcalinidade) das lamas utilizadas na operação dos reatores R6, R7 e R8.	41
Tabela 7 - Concentração de microrganismos pela contagem direta e pela biomassa como SSV nos reatores R6, R7, R8 e biomassa inicial.....	97
Tabela 8 - Parâmetros operacionais dos ensaios realizados, com os respectivos valores de porcentagem de remoção de CQO e produção de metano, obtidos no último dia de operação (13ºdia).	99
Tabela 9 – Síntese do comportamento da população microbiana nos diferentes ensaios.....	103
Tabela 10 - Abundância relativa de microrganismos do domínio <i>Bacteria</i> em todos os reatores ao longo do tempo de operação.	105
Tabela 11 - Resultados da avaliação de significância do declive dos resultados de FICT (Figura 82).	106
Tabela 12 - Resultados da avaliação de significância do declive dos resultados de CY3 (Figura 83).	106
Tabela 13 - Abundância relativa de microrganismos do domínio <i>Archaea</i> em todos os reatores ao longo do tempo de operação.	108

Lista de abreviaturas

UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Solúveis
CQO	Carência Química de Oxigênio
CQOt	Carência Química de Oxigênio Total
CQOs	Carência Química de Oxigênio Solúvel
CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
PIB	Produto Interno Bruto
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ETARI	Estação de Tratamento de Águas Residuais Industriais
TRH	Tempo de Retenção Hidráulico
LER	Lista Europeia dos Resíduos

1. Enquadramento

Em Portugal o setor da indústria do mobiliário de madeira conta com cerca de 5.800 empresas em atividade, empregando cerca de 36.000 pessoas (APIMA, 2012). Este setor detém particular destaque a nível nacional, na Região Norte do país. É um setor em que quase sempre as empresas têm dimensão reduzida, muito distintas em termos de produto, e com modelos de gestão familiar (AIMMP, 2007).

Como em todos os tipos de atividade industrial, neste sector são gerados resíduos resultantes dos seus processos de fabrico. Os resíduos sólidos de madeira como sejam a casca, serradura e aparas de madeira, quase sempre podem ser valorizados energeticamente, reincorporados na indústria de aglomerados ou utilizados nas atividades pecuária e avícolas. Os resíduos líquidos e lamas são os que suscitam maior preocupação, já que nem todas as empresas possuem sistemas de tratamento de águas residuais, e estes tipos de efluentes podem conter elevadas cargas de poluentes como resíduos de verniz, de lacas, de tintas e solventes orgânicos. O valor estimado de efluentes líquidos gerados neste setor industrial é superior a 680.000 m³/ano (INETI, 2000).

Sobre os sistemas de tratamento existentes para este tipo de águas residuais destacam-se: os sistemas compactos e as grandes ETARI (Estação de Tratamento de Águas Residuais Industriais).

O sistema compacto consiste num pré-tratamento de efluentes contendo colas, tintas e vernizes, limitando-se a remover uma quantidade significativa de sólidos através de tela filtrante (e depositá-los em recipientes sob a forma de uma lama que é posteriormente enviada para tratamento como resíduo). Designa-se pré-tratamento porque não há garantias de que confira ao efluente características para ser descarregado no solo ou em linha de água, embora lhe confira qualidades para ser reutilizada no processo produtivo.

As ETARI são equipamentos grandes, com custos de manutenção dispendiosos e de funcionamento complexo, existentes apenas nas maiores empresas. Os órgãos de tratamento e tecnologias são desenhados de acordo com o efluente em causa. Após tratamento os efluentes são encaminhados para um ou mais pontos de descarga ou destinos, sendo o mais comum (45%) a descarga no solo ou linha de água, havendo ainda uma parte (32%) que aproveita a ligação à rede de saneamento básico. Algumas águas residuais (23%, no subsector de fabrico de mobiliário,

dos processos de pintura e envernizamento) são tratadas como resíduos LER 08 01 19(*) ou LER 08 01 13(*) sendo enviadas para tratamento em empresas especializadas. Contudo em 2008 ainda havia empresas que descarregavam águas residuais industriais diretamente no solo ou linha de água sem que o efluente tivesse sido submetido a algum tipo de tratamento prévio (SANTANA, 2008).

Uma solução para este tipo de efluente pode ser o tratamento anaeróbio, pois este tornou-se um método bastante atraente devido à sua baixa produção de biomassa, por ter uma operação de baixo custo, por consumir pouca energia e ainda produzir metano, valorizado energeticamente. Aliado ao tratamento anaeróbio propõe-se o reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) por ser um reator de carga elevada, com grande capacidade de tratamento e com baixas exigências em termos de área.

Desenvolvidos por Lettinga e colaboradores em 1980, os reatores UASB começaram por ser idealizados para o tratamento de resíduos agroindustriais. Estes reatores têm vantagens em relação aos processos aeróbios, pois não necessitam de arejamento, têm reduzida produção de lamas e produzem metano, que pode ser reaproveitado como recurso energético. A desvantagem deste tipo de reatores é apresentarem uma eficiência de tratamento um pouco menor do que os processos aeróbios, sendo necessário um sistema de pré ou pós-tratamento para remoção de alguns poluentes. Os reatores UASB são projetados e monitorizados com base em experiência prática, sendo ainda pouco conhecida a ecologia microbiana dos processos biológicos envolvidos nestes ecossistemas (ABREU, 2007).

Vários autores relatam que, para que a operação de um reator UASB seja eficiente, a biomassa terá de ter boas propriedades de sedimentação e reter eficientemente um complexo consórcio microbiano, de modo a que haja agregação microbiana em flocos ou grânulos. É nestes flocos ou grânulos que se processa toda a bioquímica da digestão anaeróbia.

O conhecimento dos processos biológicos envolvidos na digestão anaeróbia apresenta certas limitações, devido às dificuldades de isolamento e cultivo de microrganismos. Contudo, com o uso e avanço das técnicas de biologia molecular, que não necessitam de isolamento e cultivo de microrganismos, permitindo o estudo dos mesmos no próprio ambiente, essas limitações têm vindo a diminuir.

Este trabalho pretende avaliar a diversidade microbiana presente em reatores UASB, usados no tratamento de um efluente proveniente duma cabine de pintura e envernizamento duma indústria do mobiliário de madeira. Pretende-se ainda, correlacionar a evolução das

populações microbianas com os condições de operação dos reatores para, se possível, fornecer informações que permitam otimizar essas mesmas condições.

2. Introdução

2.1. A indústria do mobiliário de madeiras

O sector de fabricação de mobiliário representava, em 2010, um volume de negócios de 1.5 mil milhões de euros (0.86% do PIB), num universo de 5.798 empresas em atividade, empregando 35.910 trabalhadores (APIMA, 2012).

O sector é constituído por quatro subsectores: Fabricação de Mobiliário para Escritório e Comércio, Fabricação de Mobiliário para Cozinha, Fabricação de Mobiliário para Casa e Outros Fins e Fabricação de Colchoaria. O subsector mais representativo com mais de 4.800 empresas (dados referentes a 2010) é o de Fabricação de Mobiliário para Casa e Outros Fins (APIMA, 2012).

Mais de 4.900 empresas tinham, em 2010, menos de 10 trabalhadores, sendo que apenas quatro empregavam mais de 249 trabalhadores. Em 2010, 61% das empresas estava localizada na zona Norte, concentrando 61% do emprego e representado 58% do volume de negócios (APIMA, 2012).

Na indústria de madeira e do mobiliário é gerada anualmente uma grande quantidade de resíduos de madeira sob variadas formas que, na sua grande maioria, são valorizáveis em diferentes utilizações como sejam o aquecimento, matéria-prima para a indústria de aglomerados e contraplacados, agrícola, florestal avícola e pecuária (INETI, 2000).

Estes resíduos provêm duma série de operações unitárias, enunciadas de seguida, que fazem parte do processo de fabrico (INETI, 2000):

Preparação da matéria-prima – que engloba um conjunto de operações de transformação, visando a obtenção de peças passíveis de sofrer outras operações;

Tratamento (impregnação) – permite aumentar a durabilidade da madeira e/ou melhorar as suas características naturais;

Maquinagem – conjunto de operações que permitem obter diferentes peças de madeira;

Montagem – permite a obtenção de produtos finais a partir da junção de diferentes peças;

Acabamentos – consistem na aplicação de produtos de proteção superficial ou de revestimento, de forma a melhorar a qualidade do produto final e aumentar a sua durabilidade.

Para além de resíduos sólidos também são gerados efluentes líquidos resultantes da cabine de acabamentos, lavagem com colas e lavagem de tanques e autoclaves. Estima-se que sejam produzidos mais de 680.000 m³/ano de efluentes líquidos (INETI, 2000).

A gestão e o destino final dos resíduos líquidos e lamas provenientes da cabine de acabamentos constituem um problema considerável (INETI, 2000), pois nem todas as empresas possuem sistemas de tratamento de águas residuais.

2.2. Tratamento Anaeróbio e reator UASB

O tratamento anaeróbio de efluentes é hoje amplamente aceite como uma tecnologia comprovada e extensivamente utilizada. Um dos principais fatores que levaram ao sucesso do tratamento anaeróbio foi a introdução de reatores de elevada carga (*high-rate reactors*). Estes reatores, que podem reter biomassa, têm uma grande capacidade de tratamento e, portanto, a sua exigência em termos de área é baixa (LATIF *et al.*, 2011).

Um dos reatores mais comuns é o reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) que tem sido usado com sucesso no tratamento de uma ampla variedade de águas residuais, mas é muitas vezes limitado pela fraca biodegradabilidade de substâncias orgânicas complexas (LATIF *et al.*, 2011). Este tipo de reator foi desenvolvido por Lettinga (LETTINGA *et al.*, 1980), e é um sistema que tem sido utilizado com sucesso no tratamento de uma vasta gama de efluentes industriais, incluindo os que contêm compostos inibidores.

Os reatores UASB foram concebidos para que a mistura mecânica fosse completamente omitida ou aplicada a um nível de intensidade relativamente baixa e/ou de forma intermitente. Para alcançar o contacto necessário e suficiente entre as lamas e as águas residuais, o sistema UASB convencional baseia-se na agitação provocada pela produção de biogás e pela distribuição uniforme da alimentação na parte inferior do reator (LETTINGA, 1995).

O reator UASB opera bombeando o efluente do fundo até ao topo do reator. Durante a sua permanência no reator, o efluente entra em contacto com a biomassa residente (lamas) que vai remover as substâncias orgânicas, ou seja, vai tratar o efluente. A biomassa é composta por agregados de microrganismos anaeróbios, formando grânulos compactos. Os sólidos orgânicos e matéria orgânica dissolvida presentes no efluente vão ser degradados e digeridos através de

transformações anaeróbias, que resultam na produção de biogás, como resultado final do processo.

Um separador gás-líquido-sólido (GLS) está situado na parte superior do reator para separar o conteúdo da solução, isto é, o efluente líquido tratado sai em cima, as partículas sólidas são intercetadas e devolvidas para baixo, e o biogás é recolhido a partir do topo do reator. Na Figura 1 representa-se um diagrama esquemático do reator UASB (HABEEB *et al.*, 2011).

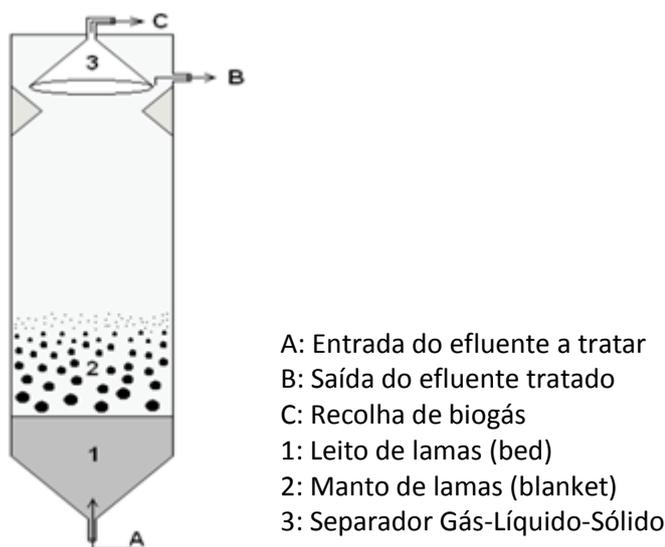


Figura 1 - Diagrama esquemático de um reator *UASB* (adaptado de Habeed *et al.*, 2011).

O bom funcionamento do reator *UASB* exige um bom contacto entre o substrato do efluente e a biomassa do leito de lamas. O período de arranque da operação inclui a imobilização das comunidades microbianas através da alimentação contínua do efluente no leito das lamas de forma a desenvolver agregações de flocos que são considerados a chave do sucesso do processo. Os grânulos podem ser desenvolvidos com sucesso dentro do reator através do fornecimento adequado de condições operacionais e ambientais (HABEEB *et al.*, 2011).

O sistema opera segundo determinadas condições que são impostas ao reator, dependendo do efluente, que são o nível de substrato mantido no reator (carga), as condições de mistura e a temperatura (LETTINGA, 1995).

O reator *UASB* apresenta condições operatórias vantajosas, tais como altos valores de carga orgânica, tempo de retenção hidráulico (TRH) curto, poucas exigências a nível energético, boas

eficiências de remoção, construção e operação relativamente simples, produção de lamas baixa e poucas exigências nutricionais (LATIF *et al.*, 2011).

2.2.1. A importância da granulação nos reatores UASB

A componente principal de um reator UASB são as lamas que fornecem uma ancoragem à microflora. É a contínua interação entre o efluente e a microflora existente nas partículas das lamas, que faz com que o tratamento seja conseguido num reator UASB. Assim, a vitalidade dos filmes microbianos por um lado, e a dimensão, forma e densidade das partículas das lamas por outro, que controlam a eficiência do tratamento de águas residuais num reator UASB. A formação de grânulos nas lamas torna-se extremamente importante não só porque estes grânulos sustentam os biofilmes ativos, mas também por proporcionar a flutuabilidade e a sedimentação necessária para permitir um contato mais vigoroso biomassa-líquido no reator (ABBASI *et al.*, 2012).

Os grânulos são partículas densas, que consistem numa mistura simbiótica entrelaçada de microrganismos anaeróbios. Cada grânulo é unidade funcional, por si só, compreendendo todos os diferentes microrganismos necessários à degradação anaeróbia da matéria orgânica. Um grânulo é um verdadeiro micro-ecossistema abrigando milhões de organismos. No entanto, nenhuma das espécies individuais desses micro-ecossistemas consegue degradar completamente os resíduos influentes, logo as associações entre componentes dos microrganismos são necessárias (ABBASI *et al.*, 2012).

Foi proposta uma estrutura em camadas para o grânulo (Figura 2), na qual um núcleo central de *archaea* metanogénicas está envolto numa camada de organismos produtores e consumidores de hidrogénio. O modelo prevê uma camada externa de bactérias que hidrolisam e acidificam a matéria orgânica complexa (ABBASI *et al.*, 2012).

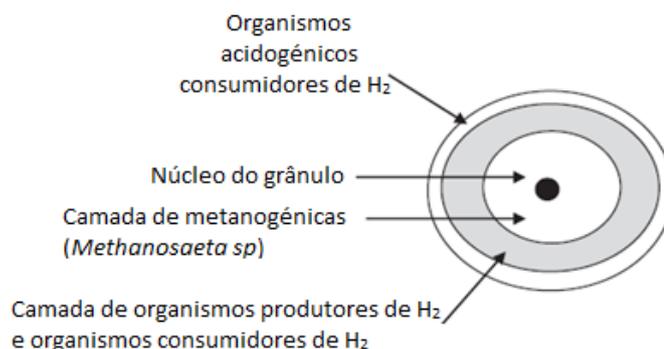


Figura 2 - Modelo proposto que representa a estrutura em camadas de um grânulo de um reator UASB (ABBASI *et al.*, 2012).

Uma vez que um reator UASB é inoculado com lamas anaeróbias e a água residual flui no sentido ascendente através da lama, a formação dos grânulos pode ocorrer lentamente, sob condições apropriadas de substrato e disponibilidade de nutrientes, pH, alcalinidade, velocidade de escoamento ascendente, etc. Os grânulos podem variar entre 0,1 a 5 mm de tamanho. Na Figura 3 encontra-se representada de forma esquemática a formação de grânulos através da anexação da microflora em torno de um núcleo (ABBASI *et al.*, 2012).

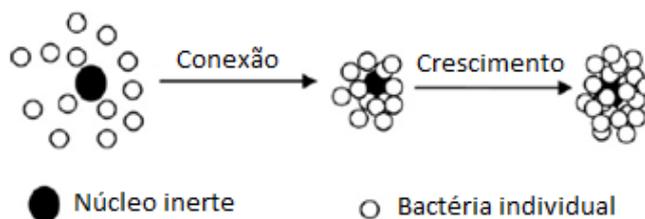


Figura 3 - Representação esquemática da formação de um grânulo através da anexação da microflora em torno de um núcleo (ABBASI *et al.*, 2012).

O ideal é um grânulo que contenha camadas concêntricas de biofilmes quase esféricas que possuam diferentes grupos tróficos bacterianos. Espera-se que cada um dos grupos tróficos de bactérias realize o seu respetivo papel na degradação da matéria orgânica, produzindo biomassa. Pensa-se que a arquea metanogénica *Methanosaeta consilii* desempenha um papel fundamental na constituição dos grânulos, sendo que os aglomerados formados pelo crescimento destes microrganismos filamentosos, funcionam como centros de nucleação que iniciam o desenvolvimento de grânulos. Isto é seguido por uma colonização de bactérias acetogénicas e

microrganismos *archaea* metanogénicos hidrogenotróficos, que conduz frequentemente a um biofilme granular com estrutura em camadas (ABBASI *et al.*, 2012).

2.3. Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo microbiológico que, em condições de ausência de oxigénio, permite transformar a matéria orgânica em metano, ocorrendo em diversos meios naturais tais como sedimentos, fontes termais e sistemas gastrointestinais, e em ambientes controlados como é o caso dos digestores anaeróbios (ALVES, 1998).

A bioquímica e a microbiologia do processo de degradação anaeróbia são muito mais complexas do que as do processo aeróbio, devido à maior variedade de caminhos metabólicos disponíveis para a comunidade anaeróbia. A degradação anaeróbia da matéria orgânica a metano e dióxido de carbono envolve uma cadeia sequencial de percursos metabólicos e requer a ação combinada e coordenada de diferentes grupos tróficos de bactérias anaeróbias (ALVES, 1998).

O processo de digestão anaeróbia é dividido em quatro fases: a hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese. Na Figura 4 é apresentado um esquema ilustrativo do processo de digestão anaeróbia.

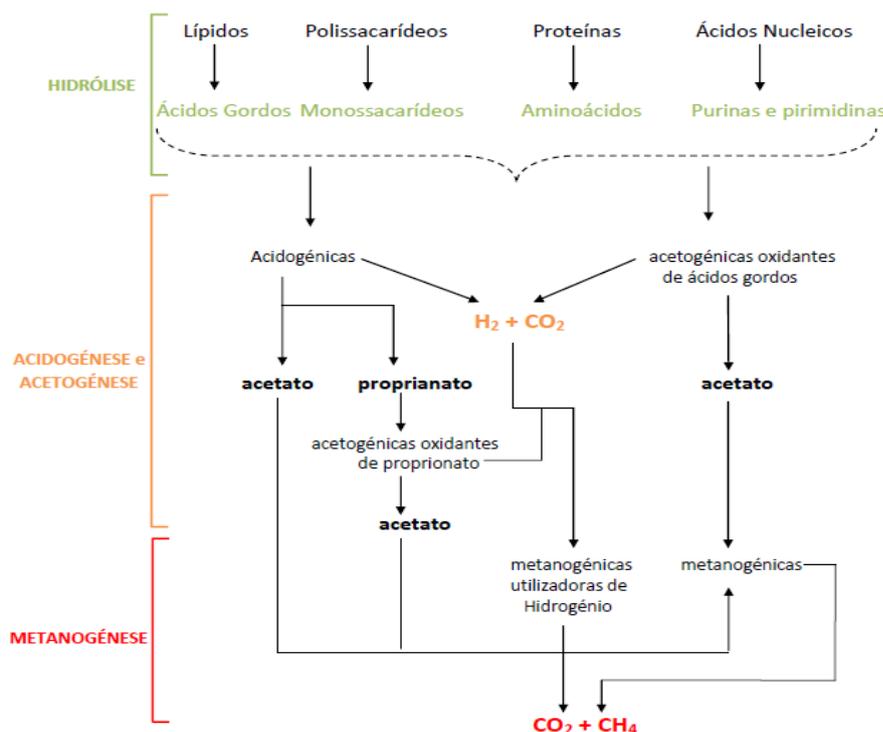


Figura 4 - Representação esquemática do processo de digestão anaeróbia (adaptado de Tchobanoglous *et al.*, 2003 e Grilo, 2009).

2.3.1. Hidrólise

A primeira etapa do processo de digestão anaeróbia consiste na hidrólise dos biopolímeros, dado que as bactérias não têm capacidade para assimilar material orgânico na forma particulada (ALVES, 1998).

A hidrólise do material particulado, bem como de material solúvel de maior dimensão, é uma etapa essencial para aumentar o acesso do substrato às células microbianas. O material orgânico particulado é convertido em compostos dissolvidos de menor peso molecular por meio de enzimas extracelulares, enzimas que são excretadas por bactérias fermentativas, também denominadas bactérias hidrolíticas. As proteínas são degradadas em peptídeos, os polissacarídeos em açúcares solúveis (mono e dissacarídeos) e os lípidos em ácidos gordos de cadeia longa e glicerol. Em certas situações, a complexidade do material orgânico pode resultar em baixas velocidades de hidrólise, tornando-a a etapa limitante de todo o processo de digestão.

Vários são os géneros bacterianos presentes no processo de digestão anaeróbia, tais como: *Clostridium*, *Micrococcus*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Bacillus*, entre outros. A abundância relativa destes microrganismos depende do tipo de substrato presente no sistema (ABREU, 2007).

2.3.2. Acidogénese

Na acidogénese, os compostos dissolvidos, gerados na fase da hidrólise, são absorvidos e metabolizados pelas bactérias fermentativas acidogénicas que, por sua vez, excretam substâncias simples, como ácidos gordos voláteis de cadeia curta, álcoois, ácido láctico e compostos inorgânicos (CO_2 , H_2 , NH_3 , H_2S , etc.).

A acidogénese é realizada, maioritariamente, por um grupo diversificado de bactérias anaeróbias obrigatórias. Entre elas: *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Escherichia*, entre outras. Os produtos metabólicos gerados pela atividade das bactérias acidogénicas são substratos importantes para as bactérias acetogénicas e para os microrganismos metanogénicos (ABREU, 2007).

2.3.3. Acetogénese

A principal função das bactérias acetogénicas na digestão anaeróbia é a produção de acetato, CO_2 e H_2 , substratos que são metabolizados pelos microrganismos metanogénicos. Podem ser caracterizados dois grupos distintos de bactérias acetogénicas, com base no seu metabolismo. O primeiro grupo é de bactérias acetogénicas produtoras de hidrogénio obrigatórias, que produzem ácido acético, CO_2 e H_2 a partir de uma grande variedade de substratos, tais como: ácidos gordos intermediários (propionato e butirato), álcoois ou outros ácidos orgânicos (valérico, isovalérico) (ABREU, 2007).

Segundo considerações termodinâmicas (energia livre) prevê-se que estas bactérias só sejam capazes de crescer em ambientes com baixas pressões de hidrogénio. Isto é possível se existirem microrganismos consumidores de hidrogénio no sistema, tais como os microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos. A maioria dos ambientes metanogénicos mantém uma concentração de H_2 baixa, que é suficiente para estimular o crescimento destas bactérias acetogénicas, evitando-se a acumulação de ácidos. A esta relação de dependência é dado o nome

de simbiose, sendo que a presença destes microrganismos simbióticos é essencial para um desempenho eficiente da digestão anaeróbia. Os géneros mais conhecidos deste tipo de microrganismos são os géneros *Syntrophomonas* e *Syntrophobacter* (ABREU, 2007).

O segundo grupo de bactérias acetogénicas são as homoacetogénicas, que são estritamente anaeróbias, catalisando a formação de acetato a partir de CO_2 e H_2 . Os géneros mais conhecidos de bactérias homoacetogénicas são *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Butribacterium*, *Clostridium* e *Pelobacter* (ABREU, 2007).

2.3.4. Metanogénese

A metanogénese é a última etapa do processo anaeróbio e é onde o metano é produzido pelos microrganismos metanogénicos por duas vias metabólicas principais: hidrogenotrófica e acetotrófica (ou acetoclástica). Os microrganismos hidrogenotróficos são autotróficos, reduzindo o CO_2 a metano e usando o H_2 como dador de eletrões, libertando H_2O . Os microrganismos acetotróficos são heterotróficos, produzindo o metano e CO_2 a partir da redução do acetato (acetogénese). Estes últimos têm grande importância em reatores anaeróbios, uma vez que é conhecido que cerca de 70% do metano produzido nestes sistemas é resultante da degradação de acetato (ABREU, 2007).

Estes microrganismos, que são anaeróbios obrigatórios, apenas conseguem crescer com substratos simples (H_2 e CO_2 , formato, metanol e acetato). Mais pormenores sobre estes microrganismos metanogénicos são dados no ponto 2.6.2.

O processo de digestão anaeróbia decorre eficazmente se as taxas de degradação em todas as fases forem iguais. Os distúrbios mais comuns nos digestores anaeróbios ocorrem devido à inibição de microrganismos formadores de metano. Se a primeira etapa é inibida, os substratos para as seguintes fases serão limitados o que, por conseguinte, leva à diminuição da produção de metano. Por outro lado, a metanogénese é inibida, pois os ácidos produzidos na acidogénese acumulam-se, fazendo com que haja perda de alcalinidade e diminuição de pH (GERARDI, 2003).

Do processo de digestão anaeróbia é obtido biogás que varia em qualidade de acordo com a composição e biodegradabilidade da matéria orgânica a degradar. Em geral, o biogás contém 55% a 70% de CH_4 , 30% a 45% de CO_2 e uma pequena fração de H_2S que pode variar entre 200 a

4000 ppm. A produção de biogás é fortemente influenciada pela temperatura, podendo trabalhar-se em condições mesófilas (30 a 40°C) ou termófilas (50 a 60°C) (FONSECA *et al.*, 2007).

2.4. Necessidades nutricionais

De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados nas suas exigências nutricionais (FERREIRA *et al.*, 1998).

A água representa cerca de 80-90% do peso total das células sendo, por isso, um fator fundamental. Os macronutrientes, ou seja, os elementos que são exigidos em quantidades relativamente elevadas e que desempenham papéis fundamentais na estrutura e metabolismo da célula, são o carbono, oxigénio, hidrogénio, azoto, enxofre, magnésio, fósforo. Os micronutrientes, que são exigidos em menores quantidades, mas funcionalmente importantes, incluem o manganês, cobalto, cobre, molibdénio e o zinco (FERREIRA *et al.*, 1998).

O carbono é um dos elementos mais importantes para o crescimento microbiano (PELCZAR *et al.*, 1993). Os microrganismos que usam carbono orgânico como principal fonte de carbono são designados heterotróficos, e os que usam dióxido de carbono como principal ou exclusiva fonte de carbono são chamados autotróficos. Alguns microrganismos, nomeadamente bactérias, são capazes de utilizar carbono orgânico e inorgânico, como principal fonte de carbono (autotróficos facultativos) (FERREIRA *et al.*, 1998).

Uma estimativa grosseira da quantidade necessária de macronutrientes N, P e S pode ser obtida pela composição e pela taxa de crescimento da população microbiana. Geralmente, o procedimento utilizado na prática para avaliar as necessidades de nutrientes baseia-se no rendimento do crescimento e na composição da biomassa. Quanto aos micronutrientes, a adição destes pode resultar no aumento da eficiência de tratamento (LETTINGA, 1995).

Os dois macronutrientes com mais interesse em qualquer tratamento biológico são o azoto e o fósforo. Estes nutrientes estão disponíveis para as bactérias anaeróbias, incluindo para os microrganismos metanogénicos, na forma de azoto amoniacal (NH_4^+ -N) e na forma de ortofosfato (HPO_4^- -P). Estes nutrientes, como todos os outros nutrientes necessários para o crescimento das bactérias estão disponíveis para elas apenas na forma solúvel (GERARDI, 2003).

Apesar do azoto amoniacal ser a forma preferida de azoto dos microrganismos metanogénicos, alguns destes microrganismos são capazes de obter azoto de outras fontes, como por exemplo, são capazes de fixar o azoto molecular (N_2) (GERARDI, 2003).

A quantidade de azoto e a quantidade de fósforo, que deve estar disponível no reator pode ser determinada a partir da quantidade de substrato ou CQO das lamas de alimentação do reator. As exigências nutricionais para os digestores anaeróbios variam muito com as taxas de carga orgânica. Geralmente, as razões CQO:N:P de 1000:7:1 e 350:7:1 são utilizadas para os resíduos de elevada carga e baixa carga, respetivamente. Estes rácios têm um valor C/N de, pelo menos 25:1, valor que é sugerido como ideal para a produção de gás (GERARDI, 2003).

O enxofre é requerido pela maior parte dos microrganismos *archaea* metanogénicos por ser um dos elementos presentes em várias coenzimas, nomeadamente na coenzima M, que está envolvida nas reações metanogénicas. Valores entre 0,56 e 1,2% (% em peso) para o conteúdo em enxofre de várias espécies de metanogénicas, foram descritos na literatura (ALVES, 1998).

É conhecida a necessidade de adicionar nutrientes a certos efluentes, de modo a obter uma eficiente remoção da matéria orgânica durante o seu tratamento anaeróbio (SANTOS *et al.*, 2010).

2.5. Condições ambientais

Vários são os fatores que influenciam a atividade dos microrganismos, assim como o rendimento do reator. O pH, alcalinidade, temperatura, toxicidade são alguns desses fatores.

As variações de pH podem causar importantes alterações na constituição microbiana dos consórcios, afetando a taxa de crescimento dos microrganismos. Afetam também o metabolismo, nomeadamente a utilização das fontes de carbono e energia. Além disso, a morfologia e a estrutura são também afetadas, com consequências para os fenómenos de adesão e floculação, aspetos de crucial importância nos digestores anaeróbios (ALVES, 1998).

Sendo o processo de digestão anaeróbia uma sequência de degradações levadas a cabo por grupos distintos de bactérias é importante saber qual o pH que maximiza a eficiência global do processo. As bactérias hidrolíticas e acetogénicas apresentam atividade máxima para valores de pH entre 7 e 7,4, as bactérias fermentativas a pH 6, e o pH óptimo para os microrganismos *archaea* metanogénicos, normalmente responsáveis pela cinética global do processo e mais

sensíveis a fatores ambientais, é entre 6,6 e 7,6. Ou seja, uma gama de pH entre 6.6 e 7.6 será apropriada para o funcionamento do processo de digestão anaeróbia (ALVES, 1998).

Neste processo, a produção de ácidos voláteis, como produtos intermediários, pode provocar uma descida acentuada do pH do meio, se não existir alcalinidade suficiente no sistema. A alcalinidade é uma medida da capacidade tampão do processo, permitindo previamente determinar qual a tolerância em ácidos gordos voláteis para que o valor do pH se mantenha na gama pretendida, e está estreitamente relacionada com a estabilidade do processo. Para a maioria dos casos práticos, uma alcalinidade entre 2500 e 5000 mg CaCO₃/L é bastante para se obter um adequado poder tampão no sistema (ALVES, 1998).

A temperatura é um dos fatores que mais influencia a eficiência do processo de digestão anaeróbia. Normalmente são consideradas três gamas de temperatura: a) gama psicrófila: < 25°C; b) gama mesófila: 30 a 45°C e c) gama termófila: > 45°C. Os microrganismos *archaea* metanogénicos apresentam um crescimento máximo na gama mesófila, para temperaturas entre 30 e 38°C e na gama termófila entre 49 e 57°C. Embora a operação a baixas e altas temperaturas seja possível, a fase de arranque pode ser um processo problemático (FONSECA *et al.*, 2007).

Os microrganismos anaeróbios são muito suscetíveis a uma grande variedade de componentes. Num digestor anaeróbio, os inibidores mais comuns são os ácidos voláteis, o sulfureto de hidrogénio e o azoto amoniacal. O efeito inibitório destes compostos depende muito do pH (FONSECA *et al.*, 2007).

Os microrganismos *archaea* metanogénicos não são necessariamente mais suscetíveis à presença de substâncias inibitórias do que as aeróbias, mas como as taxas de crescimento são baixas, as consequências de um incidente de toxicidade são mais agudas num processo anaeróbio do que num aeróbio. Podem distinguir-se diferentes tipos de toxicidade:

- toxicidade metabólica: é uma inibição competitiva de um processo metabólico, geralmente reversível, após remoção do tóxico. Ocorre na presença de sais e azoto amoniacal;
- toxicidade fisiológica: inibição que destrói componentes subcelulares (membrana, enzimas), causada por compostos fenólicos (FONSECA *et al.*, 2007).

2.6. Microbiologia

Os microrganismos têm um papel fundamental na reciclagem natural dos materiais e particularmente na decomposição de resíduos orgânicos.

O conhecimento da estrutura, dinâmica e função das diversas populações microbianas presentes num determinado habitat, assim como a sinergia das suas populações e respetiva interação com as condições ambientais, deve ser investigado por forma a garantir o controlo, otimização, rentabilização e manutenção de qualquer tipo de tratamento biológico (ROSÁRIO, 2009).

2.6.1. Tipos de microrganismos

Vários são os tipos de microrganismos que se encontram em águas naturais, águas residuais e no processo de tratamento de águas residuais, tais como, do domínio *Bacteria*, *Archaea*, *Fungi*, *Protozoa*, *Algae* e *Viruses* (TCHOBANOGLIOUS *et al.*, 2003). Na Figura 5 encontra-se representada uma árvore filogenética universal, onde se pode ver os três domínios principais *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.

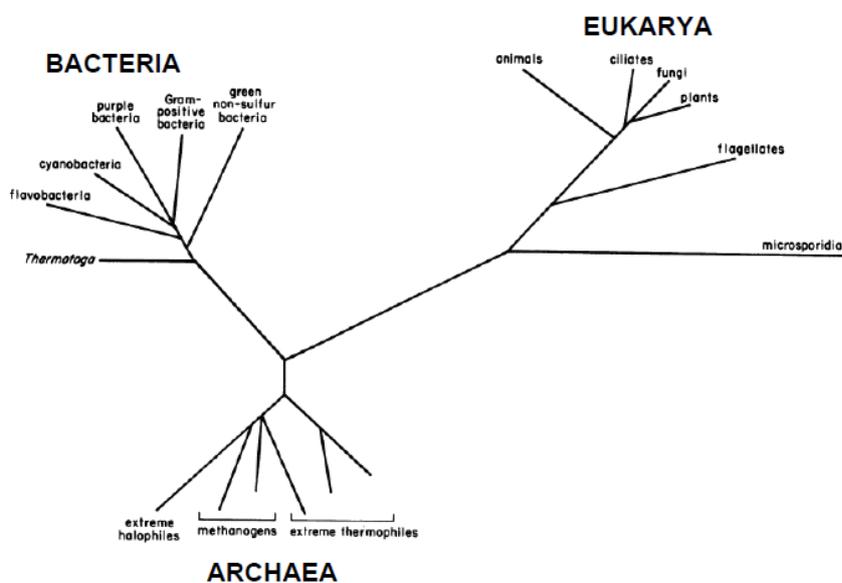


Figura 5 - Árvore filogenética universal (Rosário, 2009).

2.6.2. *Archaea* metanogénicas

Os microrganismos *archaea* metanogénicos são anaeróbios estritos que compartilham uma complexa bioquímica na síntese de metano como parte do seu metabolismo energético. A descoberta de propriedades bioquímicas e genéticas únicas destes microrganismos conduziu ao conceito de Archaeobacteria no final dos anos setenta e da proposta em 1990 para o domínio *Archaea*. Uma série de estudos vêm dando provas de que estes organismos são de valor económico. Têm sido possíveis melhorias no projeto de digestores graças aos avanços na compreensão da ecologia e fisiologia dos microrganismos metanogénicos (GARCIA *et al.*, 2000).

Características gerais dos microrganismos metanogénicos (GARCIA *et al.*, 2000)

Morfologia

Os microrganismos metanogénicos expressam uma ampla variedade de formas e tamanhos, incluindo bastonetes, cocos regulares e irregulares, bastonetes de cadeia longa, spirilla e sarcina. A mobilidade por vezes está presente e algumas espécies podem agregar-se em *clusters*. Várias espécies de *Methanosarcina* e *Methanosaeta* contêm gás nos vacúolos. A reação à coloração de *Gram* pode ser positiva ou negativa, mesmo dentro de membros do mesmo género.

Células

Existem diferenças na composição das paredes celulares entre as metanogénicas *Archaea* e *Bacteria*, e mesmo dentro das metanogénicas. As *Archaea* não contêm mureína, contêm pseudomureína ou subunidades de proteína, dependendo da ordem. Os microrganismos metanogénicos são insensíveis aos antibióticos que inibem a síntese das paredes celulares nas *Bacteria*, como a penicilina, cicloserina e valinomicina. Esta particularidade vem sendo utilizada para facilitar o isolamento de linhagens puras de metanogénicas por eliminação de contaminantes não-metanogénicos.

Nutrição e características bioquímicas

Apesar de alguns microrganismos metanogénicos serem autotróficos, o crescimento de praticamente todos os microrganismos metanogénicos é estimulado pelo acetato e, para algumas espécies, por certos aminoácidos. Alguns microrganismos metanogénicos requerem um meio de

cultura complexo, tais como extrato de levedura ou caseína digerida, vitaminas como riboflavina, ácido pantoténico, tiamina, biotina e p-aminobenzoato de metilo. Todos eles usam o NH_4^+ como fonte de azoto e algumas espécies são conhecidas por fixar azoto molecular. São necessárias quantidades vestigiais de metais, como o níquel, ferro e cobalto para todos os microrganismos metanogénicos. Na presença de enxofre molecular, os microrganismos metanogénicos formam grandes quantidades de H_2S pela redução do enxofre.

Taxonomia e diversidade filogenética das Metanogénicas

As 83 espécies de *archaea* metanogénicas descritas até agora foram separadas em três categorias nutricionais diferentes:

- a) 61 espécies de *archaea* hidrogenotróficas que oxidam H_2 e reduzem CO_2 para formar metano e, entre estas, 38 espécies de formatotróficas que oxidam o formato para formar metano;
- b) 20 espécies de metilotróficas que utilizam compostos de metilo como metanol, metilaminas, ou dimetilsulfureto e das quais 13 são espécies metilotróficas obrigatórias;
- c) 9 espécies de acetocláticas (ou acetotróficas) metanogénicas que utilizam o acetato para produzir metano, sendo duas espécies deste grupo acetotróficas obrigatórias.

Algumas espécies de metanogénicas têm características nutricionais específicas e não podem ser colocadas numa única categoria nutricional. Na Figura 6 pode ver-se a árvore filogenética dos microrganismos metanogénicos do domínio *Archaea*.

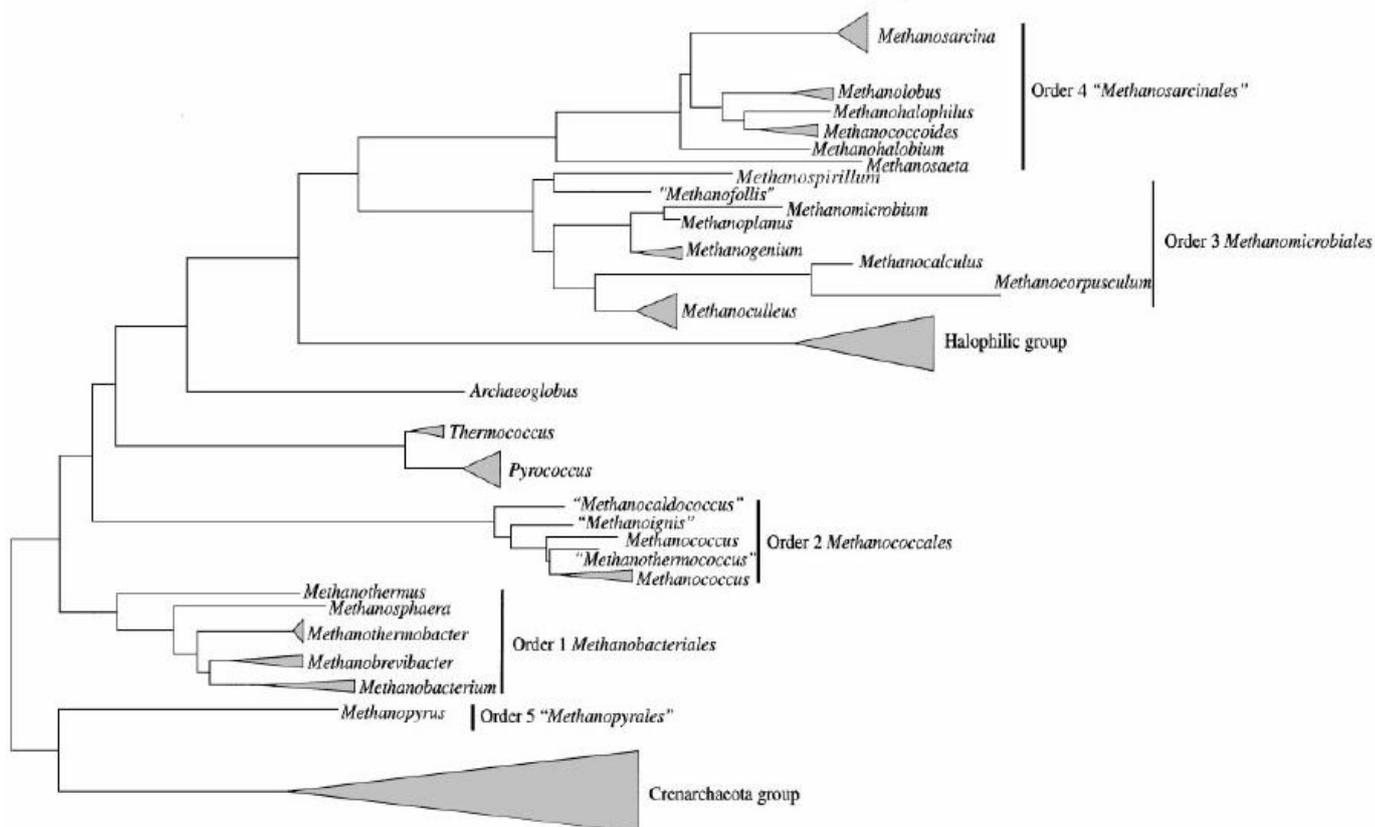


Figura 6 - Árvore filogenética de metanogénicas atualizada, do domínio *Archaea*. Nomes do género e família aparecem entre aspas. Os microrganismos não-metanogénicos são indicados pelo nome do grupo (triângulos largos) (GARCIA *et al.*, 2000).

Num sistema anaeróbio 72% dos microrganismos *archaea* metanogénicos usam acetato para produzir biogás, são as chamadas *archaea* metanogénicas acetotróficas (ou acetoclásticas), e 28% *archaea* metanogénicas hidrogenotróficas usam CO_2 e H_2 para produzir biogás.

O género *Methanosarcina*, da ordem *Methanosarcinales* e família *Methanosarcinaceae*, representa as metanogénicas acetotróficas predominantes num sistema anaeróbio. A família *Methanosaetaceae*, da mesma ordem, inclui as metanogénicas acetotróficas obrigatórias. As metanogénicas hidrogenotróficas pertencem à ordem *Methanomicrobiales* (GARCIA *et al.*, 2000).

Uma característica particular das metanogénicas é a sua autofluorescência azul-verde induzida pela radiação UV (ultravioleta) que permite a sua contagem por microscopia de autofluorescência. No entanto, este método é subjetivo devido às seguintes condições: apenas mostra metanogénicas que contenham um elevado teor de F420 como, por exemplo, metanogénicas que utilizam hidrogénio, e não podem ser contadas de todo as metanogénicas que utilizam acetato pertencentes ao género *Methanosaeta*, e ao género *Methanosarcina* que se encontram em aglomerados feitos de muitas células individuais (SOLERA *et al.*, 2001).

2.7. Métodos microbiológicos

A caracterização de comunidades microbianas pode ser feita com base em métodos *ex-situ* (ou métodos dependentes da cultura), métodos *in situ* (métodos independentes da cultura) não moleculares e métodos *in situ* moleculares (métodos baseados em DNA) (ROSÁRIO, 2009).

Os métodos *ex-situ* consistem na caracterização de comunidades microbianas e são baseados em técnicas de cultura, isolamento e identificação através das características morfológicas, fisiológicas e metabólicas. Contudo, nem sempre é possível isolar e cultivar todos os microrganismos, recorrendo-se assim aos métodos *in situ*. A vantagem dos métodos *in situ* para a deteção de microrganismos no ambiente é que não é necessário retirá-los do seu habitat, permitindo a deteção de microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis. Nestes métodos, incluem-se as técnicas baseadas em microscopia e em colorimetria, e as técnicas moleculares de microbiologia (ROSÁRIO, 2009).

As técnicas de microscopia mais frequentemente utilizadas são a microscopia em contraste de fase, epifluorescência, microscopia eletrónica de varrimento (SEM, “*scanning electron microscopy*”) e microscopia eletrónica de transmissão (TEM, “*transmission electron microscopy*”) (ROSÁRIO, 2009).

A microscopia de contraste de fase é geralmente usada para contagem direta. A microscopia de epifluorescência, baseada na coloração de ácidos nucleicos com fluorocromos, principalmente o laranja de acridina (dicloridrato de acridina-3,6-diamina) e o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), é usada em especial para enumerar microrganismos (incluindo células viáveis e não viáveis). Os dois tipos de microscopia eletrónica, SEM e TEM, são ambas usadas para a deteção e caracterização de microrganismos. A SEM é mais adequada para determinar o aspeto da superfície das células microbianas e é usada para analisar as associações entre células, nomeadamente no estudo de biofilmes. Devido ao seu maior poder de resolução, o uso da TEM é muito aplicada na deteção e identificação de vírus (ROSÁRIO, 2009).

As técnicas de colometria baseiam-se no uso de um composto que modifica a sua coloração na presença de um microrganismo (ROSÁRIO, 2009).

2.7.1. Técnicas de microscopia

Com este trabalho pretende-se aplicar algumas técnicas de microscopia e colometria, de forma a identificar e caracterizar a população microbiana presente no reator UASB. Algumas dessas técnicas são agora enumeradas.

2.7.1.1. Coloração de Gram

O método de *Gram* é um dos principais métodos para identificar bactérias. É uma técnica de coloração diferencial, isto é, as células são expostas a mais do que um corante. O método consta das seguintes etapas principais (MARQUES *et al.*, 2003):

- a) Coloração das células pelo violeta de genciana ou cristal violeta (corante primário);
- b) Precipitação do corante nas células pelo iodo;
- c) Lavagem com um agente descorante, p.e., o etanol a 95%;
- d) Coloração das células pela safranina ou fucsina diluída (contrastante)

As células que são delimitadas por uma camada relativamente espessa de peptoglicano, que é um polímero insolúvel constituinte de todas as paredes celulares bacterianas, e que proporciona um resistência estrutural à célula, em geral, mantêm o cristal violeta/ iodo da coloração de *Gram*, quando lavadas com etanol ou acetona, e são referidas como *Gram* positivas quando submetidos a coloração de *Gram*. Estas células apresentam-se coradas de violeta (CHAPMAN & HALL, 1996).

As bactérias *Gram* negativas como possuem uma camada mais fina de peptoglicano, não retêm o complexo cristal violeta/iodo quando lavadas com etanol ou acetona, logo ficam coradas de vermelho por causa da safranina, após a coloração de *Gram* (CHAPMAN & HALL, 1996).

2.7.1.2. Contagem

O processo mais comum de determinação do número de microrganismos é através de contagem direta ao microscópio, usando câmaras de contagem. Estas são lâminas de vidro que

têm reticulados com quadrículos gravados de áreas e profundidades conhecidas, que delimitam volumes precisos de amostra. Tendo em conta este volume e a diluição da amostra, pode determinar-se o número de microrganismos por mililitro de amostra inicial (FERREIRA *et al.*, 1998).

Dependendo do tamanho e da forma dos organismos a serem quantificados e do volume de amostra onde se pretende fazer a quantificação, podem ser utilizadas câmaras de contagem que vão desde a câmara de Neubauer (3 x 3 mm x 0,1 mm de profundidade), à câmara de Sedgewick Rafter (50 x 20 mm x 1 mm de profundidade).

As câmaras de Neubauer são feitas de vidro e possuem duas zonas de contagem separadas por um sulco horizontal e limitadas de cada lado por um canal vertical como se pode observar na Figura 7.

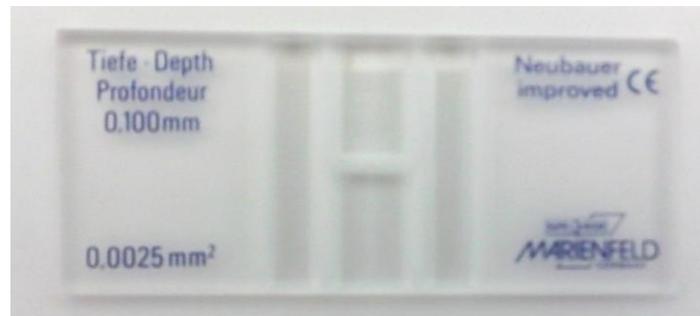


Figura 7 – Câmara de Neubauer (vista de topo).

Para que se crie um espaço que possa ser preenchido por um determinado volume, coloca-se uma lamela sobre as zonas de contagem da câmara, formando-se um espaço com uma altura de 0,1 mm.

A superfície de contagem, reticulada, está marcada com um grande quadrado que tem 3 mm de lado (Figura 8).

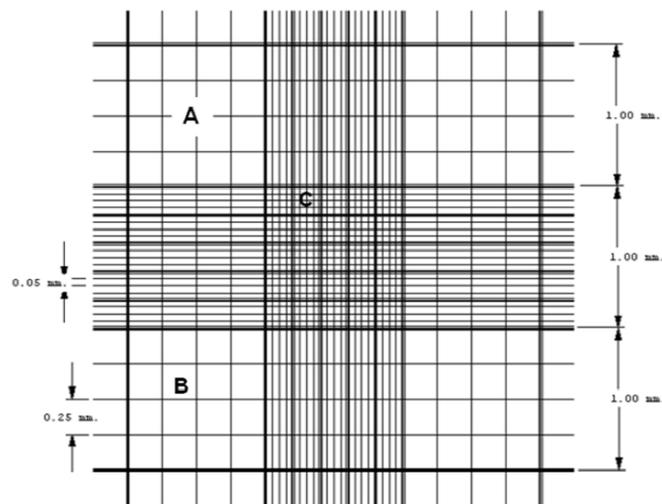


Figura 8 - Superfície de contagem.

O quadrado maior é constituído por 9 quadrados pequenos (A), cada um com 1 mm de lado. Os 4 quadrados pequenos que formam as esquinas do quadrado maior estão divididos em 16 outros quadrados mais pequenos (B), cujo lado mede 0,25 mm. Cada quadrante tem 1 mm^2 de área.

O quadrado central mais pequeno está por sua vez dividido em 25 quadrados mais pequenos (C). Grandes densidades celulares, por exemplo, são contadas nos quadrados mais pequenos que formam as esquinas do quadrado central e no quadrado mais pequeno central (Figura 9). Portanto, contam-se apenas as células contidas num volume igual a $5/25$ ou $1/5$ do volume total do quadrado central.

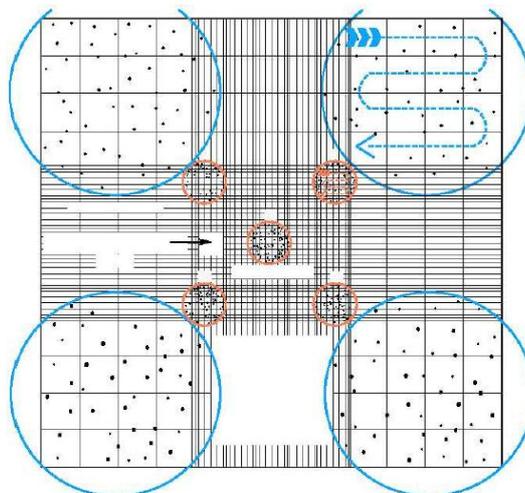


Figura 9 - Local de quantificação de baixas densidades celulares (a azul) e densidades mais elevadas (a vermelho).

2.7.1.3. Técnica de FISH

O método *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) é um método molecular para identificar e quantificar organismos específicos *in situ*. Esta técnica inclui as seguintes etapas (A, B, C e D) que estão representadas esquematicamente na Figura 10:

A – amostragem e fixação imediata em formaldeído para preservar a integridade das células, especialmente os ribossomas;

B – hibridação com uma sonda específica, marcado com um corante fluorescente, na sua extremidade 5', e combinado com uma sequência do rRNA 16S;

C – contracoloração com um marcador universal (DAPI, que se liga não especificamente, a moléculas de ADN), ou outra sonda mais geral, marcado com um diferente corante fluorescente;

D – visualização por meio de microscopia de fluorescência (SANZ *et al.*, 2007).

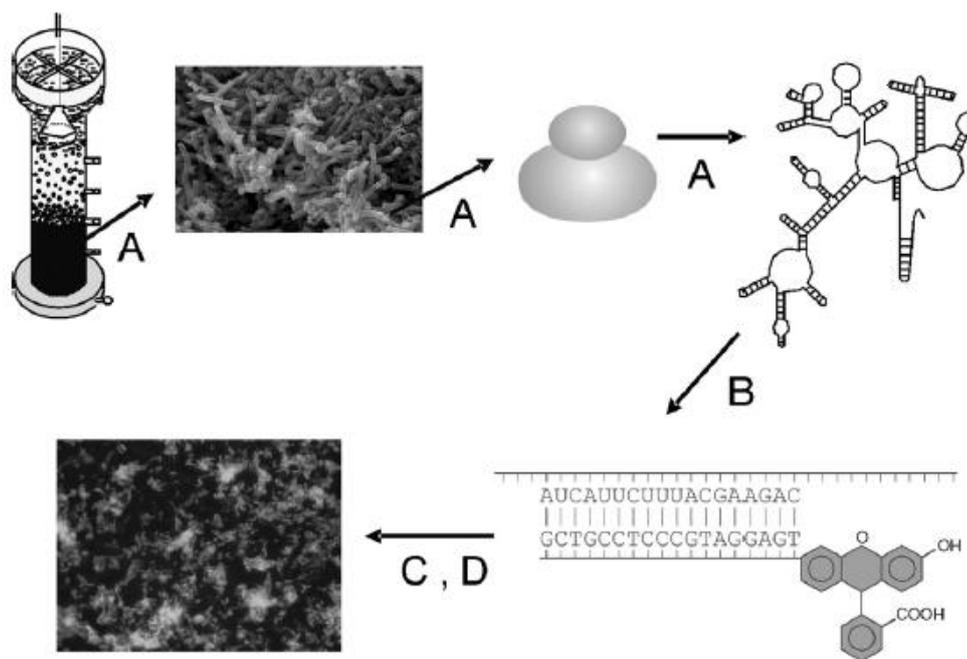


Figura 10 - Representação esquemática do processo de hibridação *in situ* (adaptado de Sanz *et al.*, 2007).

As seqüências curtas de DNA (16-20 nucleótidos) marcadas com um corante fluorescente reconhecem as seqüências de 16S rRNA nas células fixas e hibridam com elas *in situ* (DNA-RNA correspondente). Os microrganismos podem ser identificados, localizados e quantificados com

hibridação em quase todos os ecossistemas. A especificidade da sonda permite detecção/identificação taxonómica em qualquer nível desejado, a partir do Domínio até uma resolução adequada para a diferenciação entre espécies individuais (SANZ *et al.*, 2007).

Como todos os métodos, este tem as suas vantagens e desvantagens. As vantagens são: o seu uso fácil e rápido se as sondas necessárias estiverem disponíveis; visualização direta da não-cultura de microrganismos; quantificação de grupos microbianos específicos; detecção diferencial/preferencial por microrganismos ativos. Entre as desvantagens estão: necessidade de conhecimento *a priori* do ecossistema em estudo e dos microrganismos mais suscetíveis de serem detetados; necessidade de conhecimento da sua sequência de rRNA para detetar um microrganismo em particular (SANZ *et al.*, 2007).

2.8. Objetivos

O objetivo desta dissertação é a caraterização da população microbiana presente em reatores UASB utilizados na degradação anaeróbia de um efluente, proveniente duma cabine de pintura e envernizamento, duma indústria do mobiliário de madeira. Através de amostras recolhidas do interior do reator pretende-se:

- Caracterizar a população microbiana ao longo do tempo, através da aplicação de técnicas de microscopia simples e rápidas;
- Registrar e estabelecer correlações entre a comunidade microbiana e os parâmetros físico-químicos de operação do reator biológico, nomeadamente carga orgânica, caudais, temperatura, percentagem de remoção de CQO (Carência Química de Oxigénio), e produção de metano;
- Relacionar as estratégias de operação com as alterações/evolução nas populações microbiológicas;
- Detetar a presença de microrganismos metanogénicos através da observação da fluorescência metanogénica;
- Observar a presença/ausência de fluorescência metanogénica ao longo do tempo e relacionar com a produção de metano, de forma a verificar se há uma relação entre ambos;
- Através do método de FISH aplicar sondas de espécies dos domínios *Bacteria* e *Archaea* para obter a abundância relativa de ambos os domínios na degradação anaeróbia deste tipo de efluentes.

3. Metodologia

3.1. Descrição dos reatores UASB

Com este trabalho pretende-se estudar a adaptação da população microbiana, presente na biomassa anaeróbia proveniente de uma ETAR, ao contactar com um novo efluente. O efluente proveio duma indústria de mobiliário de madeira, da empresa JOPIMAR3 sediada em Oliveira do Bairro, mais precisamente duma cabine de pintura e envernizamento.

O efluente tinha um aspeto claro e transparente, com bastante matéria em suspensão branca e preta e de odor ligeiro. Na Tabela 1 pode ver-se as características físico-químicas tais como o pH, a alcalinidade, os sólidos suspensos totais (SST), os sólidos suspensos voláteis (SSV), a carência química de oxigénio total (CQOt) e a carência química de oxigénio solúvel (CQOs) dos efluentes utilizados nos diferentes ensaios monitorizados paralelamente (Couras, 2013).

Tabela 1 - Características físico-químicas dos efluentes utilizados nos diferentes ensaios com os reatores UASB.

Parâmetro	Unidades	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio
pH	-	7,4	7,3	7,6
Alcalinidade	mg CaCO ₃ /L	733	720	650
SST	mg SST /L	294	200	409
SSV	mg SSV /L	265	118	373
CQOt	g CQOtotal/L	3,725	0,962	1,048
CQOs	g CQOsolúvel/L	2,213	0,717	0,583

Este efluente foi alimentado a reatores UASB em funcionamento em descontínuo e com recirculação total do efluente tratado. A Tabela 2 descreve os reatores UASB.

Tabela 2 - Características do sistema UASB utilizado nos ensaios.

Características	Reator UASB
Material	Acrílico
Diâmetro (cm)	14
Altura (cm)	86
Volume útil (L)	6
Área superficial (cm ²)	154

Foram realizados 9 ensaios onde foram impostas diferentes condições operatórias, tais como: cargas orgânicas, caudais, temperaturas e pH. Todos os reatores foram inoculados com 3 litros de biomassa anaeróbia. As condições de operação dos reatores nos diferentes ensaios são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Descrição das condições de operação a que os reatores foram submetidos nos vários ensaios.

Parâmetros	$Q_{\text{alimentação}}$ (L/h)	Carga orgânica (g $CQO_{\text{total}} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$)	T(°C)	pH	TRH (h)	Dias de operação
Reator 1	0,5	0,962	35	7,5	12	30
Reator 2	0,5	1,705	35	7,5	12	30
Reator 3	0,5	0,624	35	7,5	12	30
Reator 4	1,25	0,962	35	7,5	4,8	13
Reator 5	0,75	0,962	35	7,5	8	13
Reator 6	0,25	0,962	35	7,5	24	13
Reator 7	0,25	0,962	55	7,5	24	13
Reator 8	0,25	0,962	45	7,5	24	13
Reator 9	0,25	0,962	35	5	24	13

A Figura 11 mostra os três reatores utilizados nos ensaios experimentais, assim como a legenda dos seus elementos.



Figura 11 - Fotografias dos reatores utilizados nos ensaios experimentais.

O efluente foi bombeado através das bombas (2) do recipiente (1) que continha o efluente a tratar, do fundo até ao topo do reator, onde entrou em contato com o lodo (biomassa) e sofreu degradação anaeróbia. Antes de chegar à cabeça do reator (4), o efluente encontra um separador gás-líquido-sólido (3) que faz a separação entre o efluente tratado, o biogás e biomassa que possa chegar ao topo do reator. O efluente tratado sai da cabeça do reator pela saída (6), e é enviado de novo para o recipiente (1). O biogás sai pelo topo da cabeça do reator (5), passa por um primeiro borbulhador (7), e no segundo borbulhador (8) encontra uma solução de hidróxido de sódio e fenolftaleína, cujo objetivo é aprisionar o CO_2 , para se poder contabilizar apenas o volume de CH_4 . Devido à pressão, o CH_4 faz deslocar a água do recipiente (9), caindo esta numa proveta (10) para assim se proceder à medição diária de volume de CH_4 produzido. Através do banho (11) os reatores foram mantidos sempre à temperatura desejada.

Os reatores dispõem de quatro pontos de amostragem, como ilustra a Figura 12.

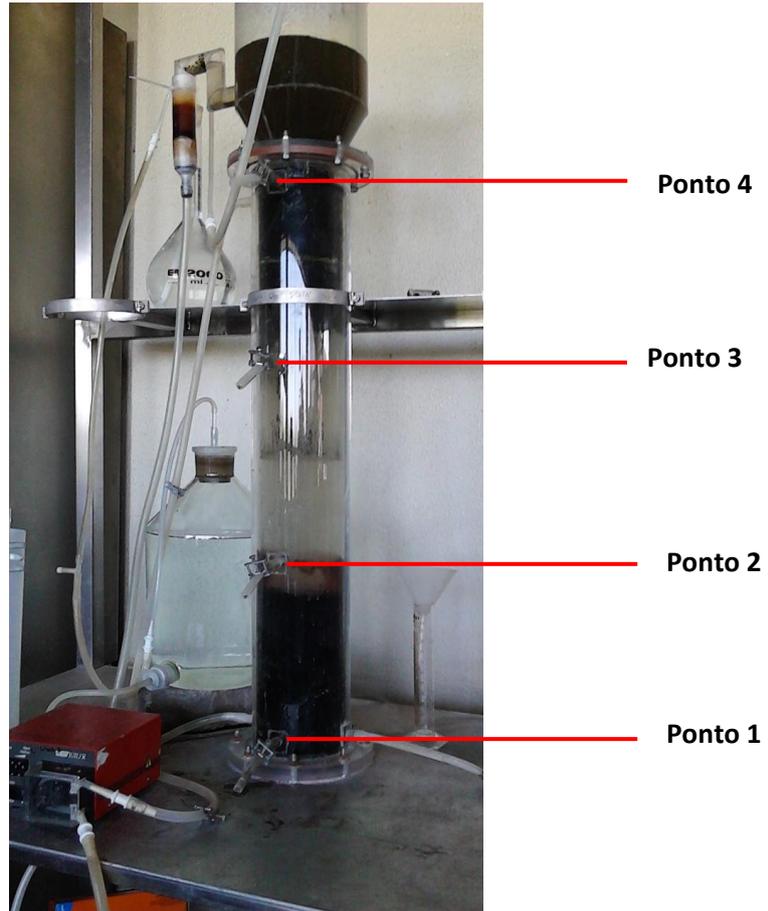


Figura 12 - Representação dos pontos de amostragem existentes nos reatores.

3.2. Características do inóculo

A biomassa inoculada nos reatores provém da ETAR da SIMRIA Norte, sendo composta por uma cultura mista. As lamas apresentavam um aspeto denso e viscoso, e bastante escuro nos ensaios com os reatores R1, R2, R3, R6, R7 e R8, sendo que nos outros ensaios não eram tão densas. Às lamas foram efetuadas análises físico-químicas por forma a determinar os SST, SSV, pH e alcalinidade, e análises microbiológicas que consistiram na observação direta de amostras das lamas ao microscópio, na aplicação da coloração de *Gram*, na observação de fluorescência metanogénica, na contagem de microrganismos e na aplicação do método de FISH.

3.2.1. Lamas utilizadas na avaliação da influência da carga orgânica

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos na caracterização físico-química das lamas utilizadas na operação dos reatores R1, R2 e R3.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos (SST, SSV, pH e alcalinidade) das lamas utilizadas na operação dos reatores R1, R2 e R3.

Parâmetro	Unidades	Valor
pH	-	7,34
Alcalinidade	mg CaCO ₃ /L	5590
SST	g SST /L	12,522
SSV	g SSV /L	9,022

Na observação visual direta pode verificar-se que a população microbiana se encontra em agregada em flocos bastante grandes e definidos. As amostras das lamas foram previamente lavadas com água destilada, e posteriormente foram diluídas na proporção de 1:1 para facilitar a sua observação ao microscópio, já que a densidade de microrganismos era elevada. Nas Figuras 13 e 14 são apresentadas microfotografias que representam uma visão geral da população e onde se pode ver a estrutura e morfologia dos flocos presentes nas lamas, respetivamente.

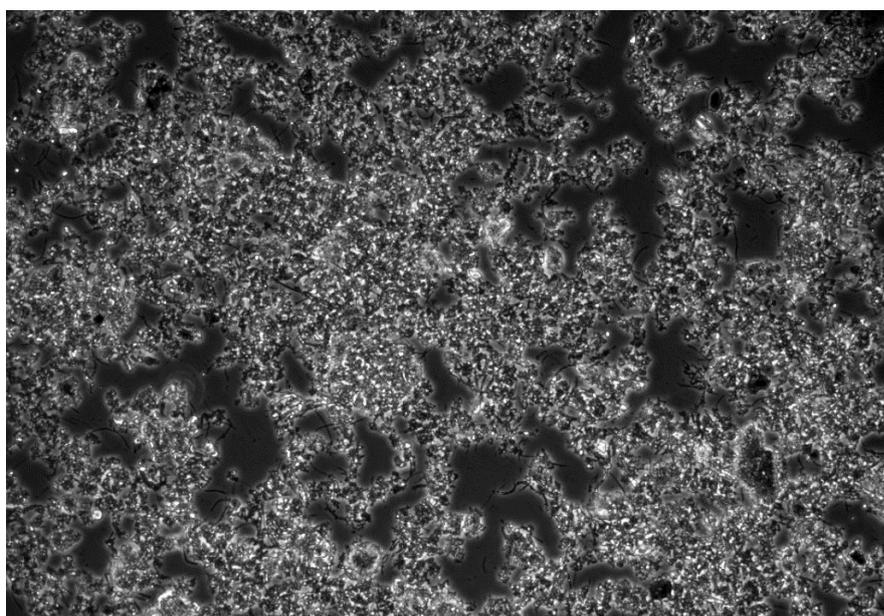


Figura 13 - Microfotografia de uma amostra de lamas anaeróbias representando uma visão geral da população. Amostra sem diluição. (x100)

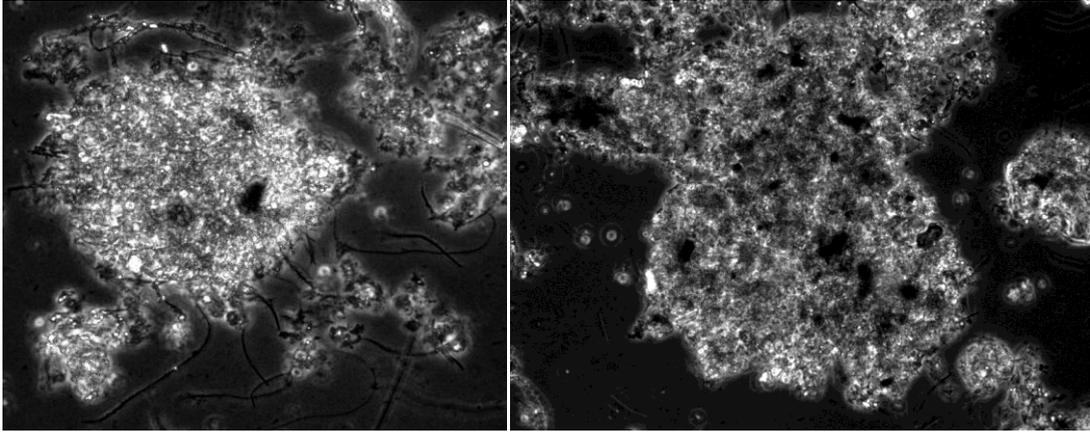


Figura 14 - Microfotografia de dois flocos presentes numa amostra de lamas anaeróbias diluída na proporção 1:1. (x400)

Após aplicada a coloração de *Gram*, tanto em lamas diluídas como em amostras de lamas brutas os resultados apontaram sempre para uma maioria de bactérias *Gram* negativas apresentando-se maioritariamente de cor avermelhada. As imagens captadas pela câmara acoplada ao microscópio não mostram as cores verdadeiras, já que só permitem a obtenção de imagens a preto e branco. A Figura 15 mostra a coloração de *Gram* aplicada às lamas vista ao microscópio.

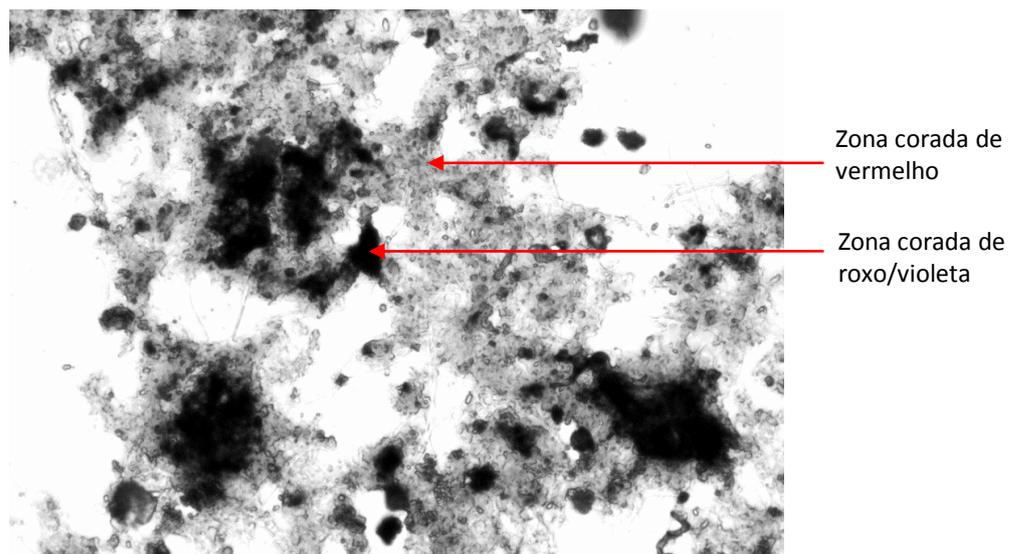


Figura 15 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* em lamas anaeróbias. Preparação sem diluição das lamas. (x400)

Na Figura 15, e nas restantes microfotografias relativas à coloração de *Gram*, os pontos mais escuros representam a cor arroxeadada (*Gram* positivas) e o restante representa a cor

avermelhada (*Gram* negativas). Como se pode ver, a zona com coloração avermelhada é maior do que a arroxeada, podendo dizer-se que a população é predominantemente *Gram* negativa.

Nas Figuras 16 a) e b) podem ver-se em pormenor dois flocos com a aplicação da coloração de *Gram*. Na zona mais escura, que corresponde ao seu interior dos flocos estes tinham uma coloração arroxeada (*Gram* positivas), e na sua zona envolvente apresentavam uma coloração avermelhada (*Gram* negativas).

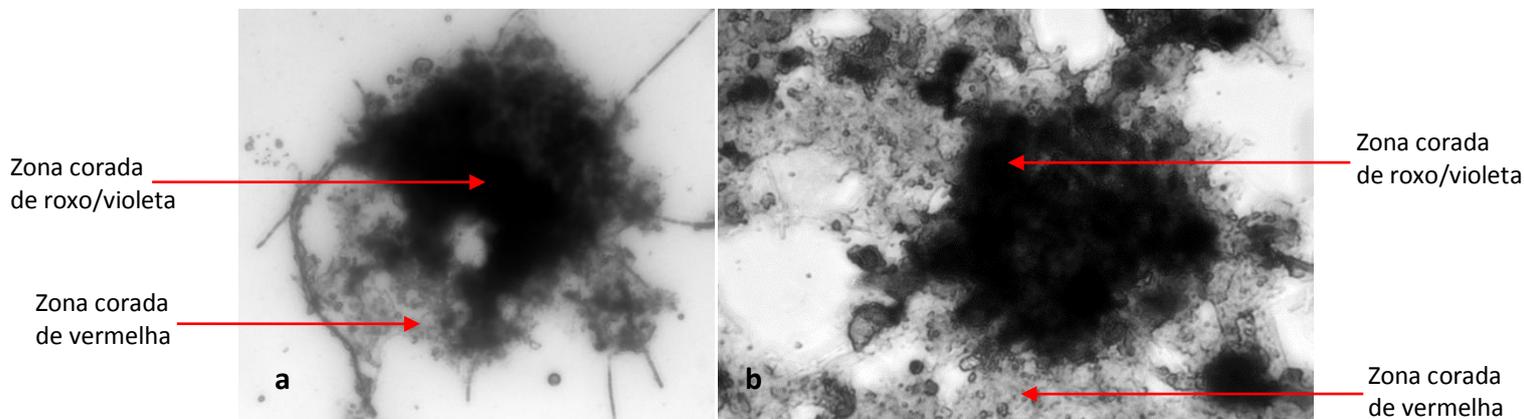
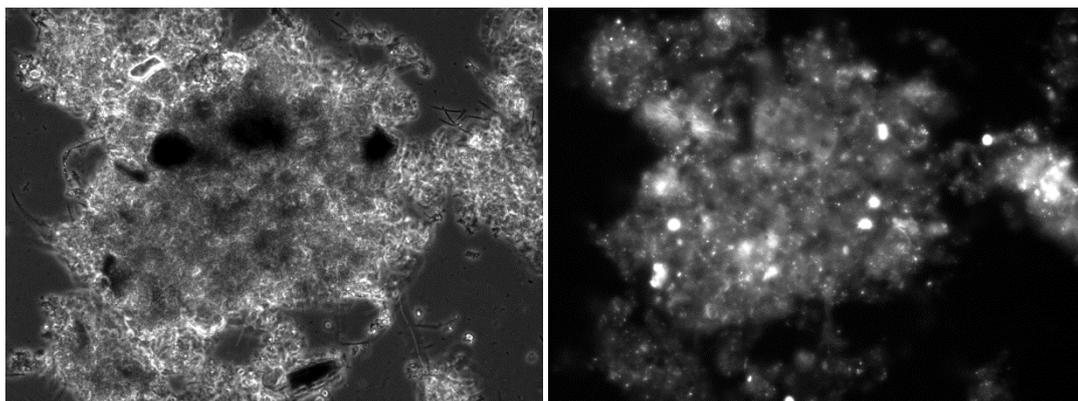


Figura 16 - Microfotografias da aplicação da coloração de *Gram* nas lamas anaeróbias. Pormenor de dois flocos. **a)** Preparação com diluição das lamas 1:1, **b)** lamas sem diluição. (x1000)

Na observação de fluorescência metanogénica (Figura 17), pode-se constatar que esta aparece principalmente no interior de flocos, ou seja, nos agregados de bactérias. Não foi possível a sua quantificação. De notar que as microfotografias sobrestimam a quantidade de fluorescência presente em cada floco, pois por vezes aparecia uma fluorescência mais intensa nas microfotografias do que a observada no microscópio.



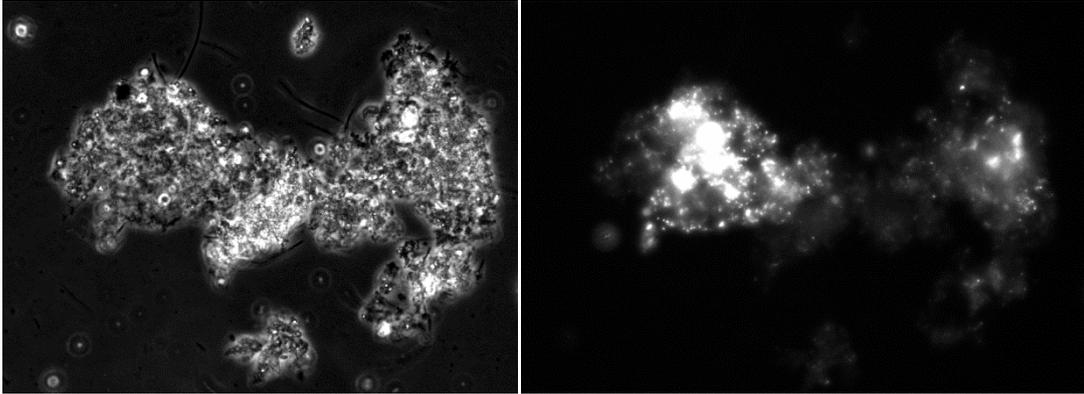


Figura 17 - Microfotografias de dois flocos e respectivas fluorescências metanogénicas de uma amostra de lamas diluídas na proporção 1:1. (x400)

Como referido na introdução (ponto 2.2.1) uma estrutura em camadas para o grânulo foi proposta (ABBASI et *al.*, 2012), sendo o seu interior constituído por *archaea* metanogénicas e estas envoltas por bactérias de várias espécies, portanto, como a fluorescência metanogénica foi observada principalmente no interior dos flocos e a população *Gram* positiva também foi verificada principalmente no interior dos flocos, pode dizer-se que neste trabalho as *archaea* metanogénicas eram na sua maioria *Gram* positivas.

Relativamente ao número de microrganismos presente nas lamas, após a contagem recorrendo a uma câmara de Neubauer, foi obtida uma concentração de 4 750 000 células/mL, sendo um valor aproximado já que este tipo de contagem envolve alguns erros.

3.2.2. Lamas utilizadas na avaliação da influência do caudal e pH

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos na caracterização físico-química das lamas usadas na operação dos reatores R4, R5 e R9.

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos (SST, SSV, pH e alcalinidade) das lamas utilizadas na operação dos reatores R4, R5 e R9.

Parâmetro	Unidades	Valor
pH	-	8,00
Alcalinidade	mg CaCO ₃ /L	3300
SST	g SST /L	8,844
SSV	g SSV /L	6,822

Da análise às amostras de lamas anaeróbias utilizadas pode verificar-se que a população era mais diluída do que a das lamas utilizadas na operação dos reatores R1, R2 e R3, contudo a população encontrava-se igualmente em flocos. As amostras de lamas foram observadas tal e qual como se encontravam, e também foram diluídas na proporção de 1:1 e 1:10 para facilitar a observação dos flocos ao microscópio. Nas Figuras 18, 19 e 20 são apresentadas microfotografias onde se pode ver a estrutura e morfologia dos flocos presentes nas lamas.

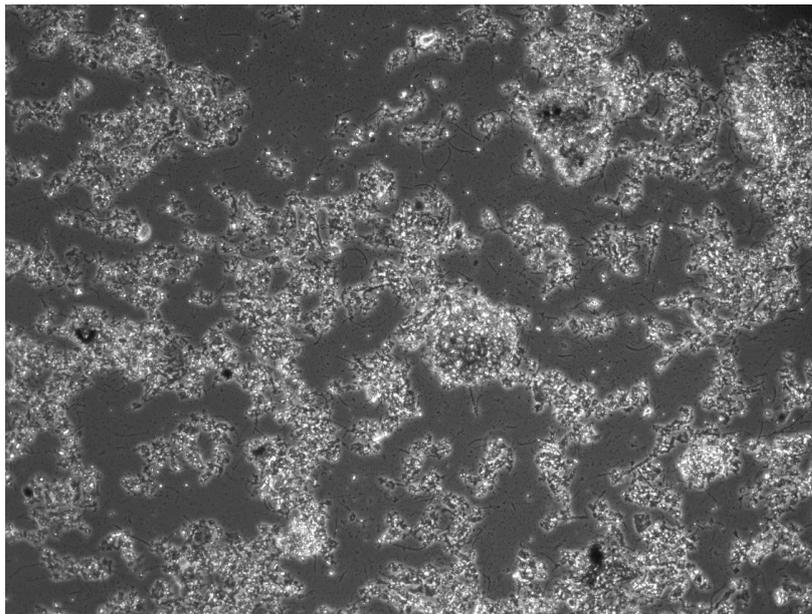


Figura 18 - Microfotografia de uma amostra de lamas anaeróbias sem diluição, representando uma visão geral da população. (x100)

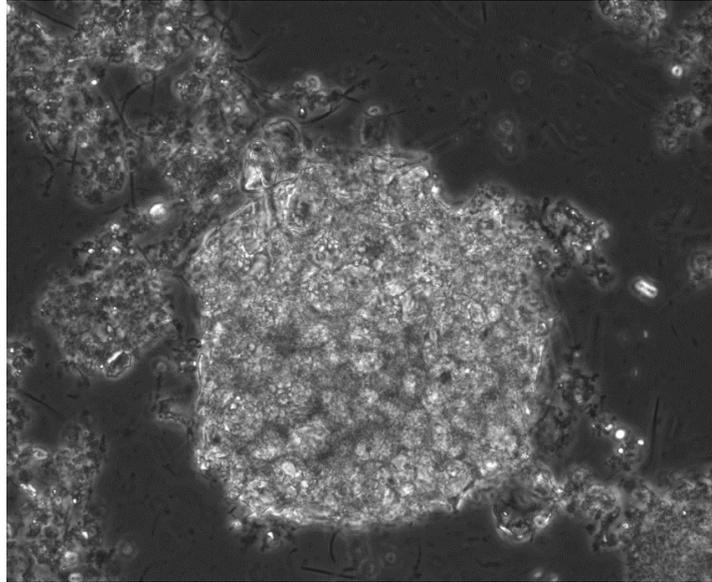


Figura 19 - Microfotografia de um floco presente numa amostra de lamas anaeróbias sem diluição. (x400)

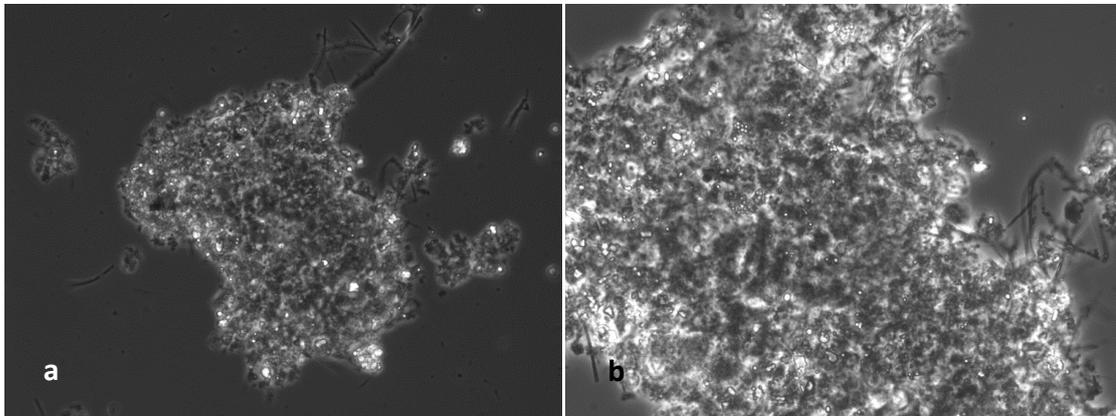


Figura 20 - Microfotografia de um floco presente numa amostra de lamas anaeróbias diluída na proporção 1:10. a) (x400) e b) a sua respetiva ampliação a (x1000).

Aplicada a coloração de *Gram* nas lamas anaeróbias brutas, os resultados demonstraram a predominância de bactérias *Gram* negativas prevalecendo nas preparações feitas a cor avermelhada. As microfotografias das Figuras 21 e 22 mostram a coloração de *Gram* aplicada às lamas vistas ao microscópio.

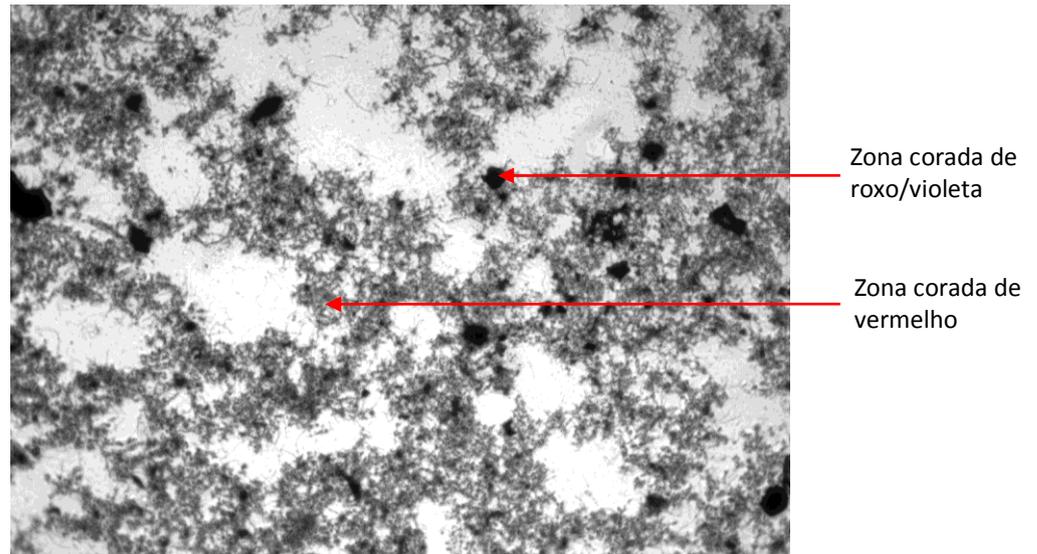


Figura 21 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* em lamas anaeróbias sem diluição. (x100)

Na Figura 22 podem ver-se dois flocos mais em pormenor com a aplicação da coloração de *Gram*. Os flocos no seu interior, zona mais escura, tinham uma coloração arroxeada (*Gram* positivas), e na sua zona envolvente apresentavam uma coloração avermelhada (*Gram* negativas).

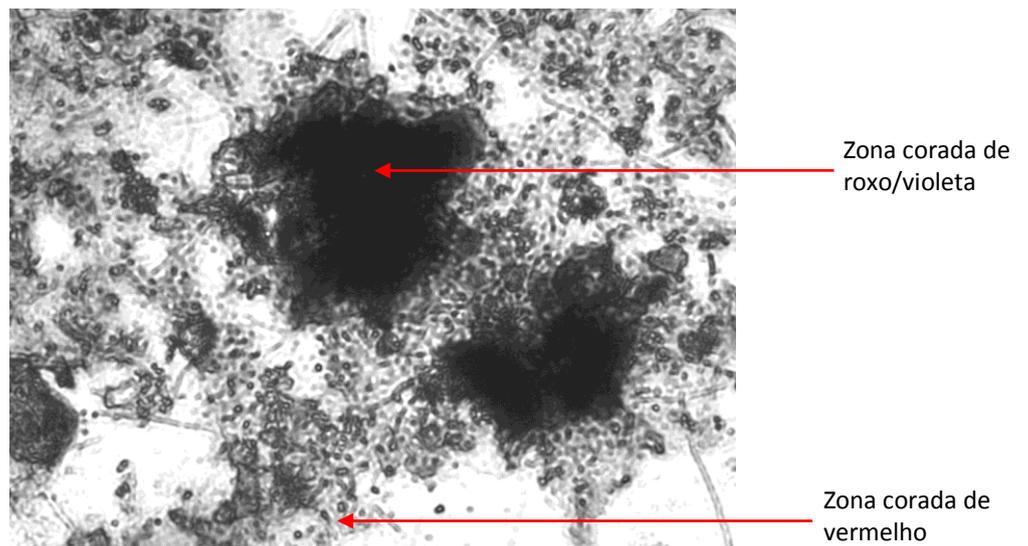


Figura 22 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* nas lamas anaeróbias. Pormenor de dois flocos *Gram* positivos. (x1000)

Na observação de fluorescência metanogénica, constata-se que esta aparece principalmente no interior de flocos, ou seja, nos agregados de bactérias. Como se pode apurar

nas microfotografias das Figuras 23 e 24 a fluorescência metanogénica é bastante intensa no interior dos flocos.

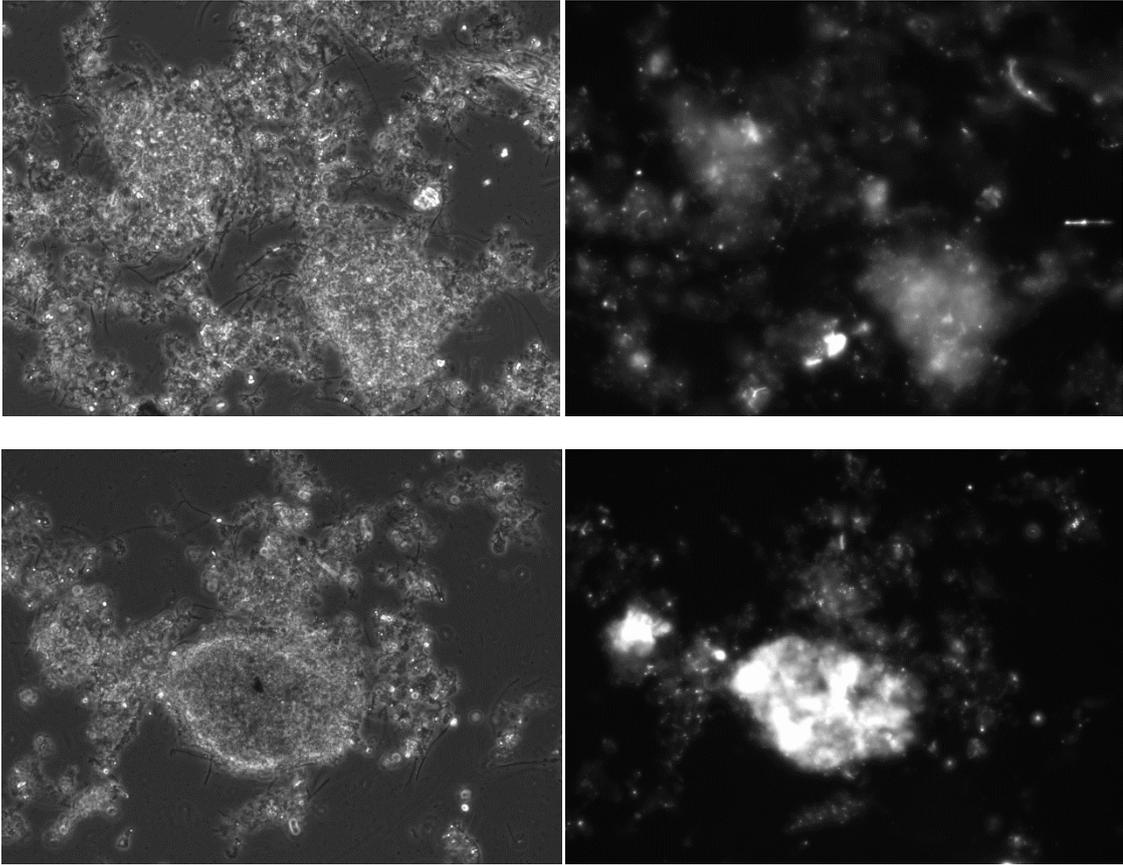


Figura 23 - Microfotografias de dois flocos e respetivas fluorescências metanogénicas de uma amostra de lamas sem diluição. (x400)

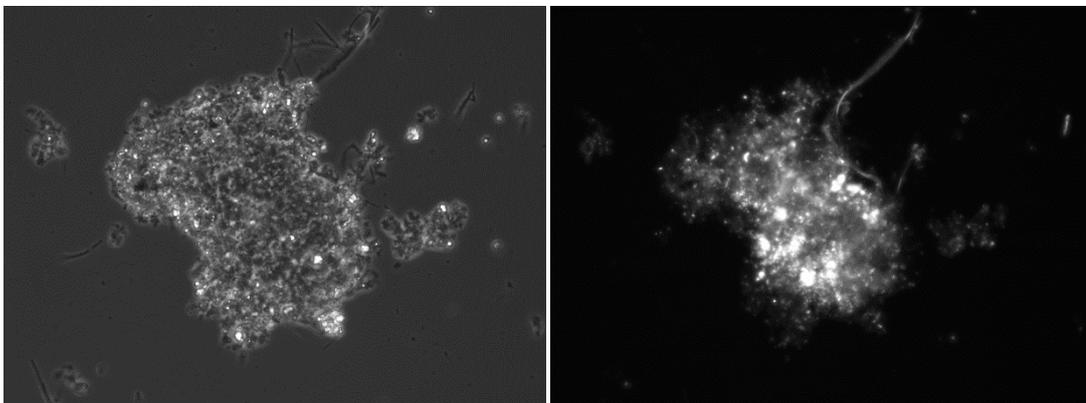


Figura 24 - Microfotografia de um floco e a respetiva fluorescência metanogénica de uma amostra diluída na proporção de 1:10. (x400)

Relativamente ao número de microrganismos presente nas lamas, após a contagem recorrendo a uma câmara de Neubauer, foi obtida uma concentração 1 175 000 células/mL, sendo um valor aproximado já que este tipo de contagem envolve alguns erros na sua determinação.

3.2.3. Lamas utilizadas na avaliação da influência da temperatura

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos na caracterização físico-química das lamas usadas na operação dos reatores R6, R7 e R8.

Tabela 6 - Parâmetros físico-químicos (SST, SSV, pH e alcalinidade) das lamas utilizadas na operação dos reatores R6, R7 e R8.

Parâmetro	Unidades	Valor
pH	-	8,00
Alcalinidade	mg CaCO ₃ /L	3067
SST	g SST /L	28,967
SSV	g SSV /L	20,950

Comparando as lamas anaeróbias utilizadas nesta avaliação com as lamas utilizadas com os restantes reatores pode dizer-se que estas lamas eram as mais densas de todas, como se pode verificar pelo valor de SSV nas Tabelas 4, 5 e 6. Na Figura 25, que mostra a visão geral da população microbiana pode ver-se que esta se encontra agregada em flocos. Foi feita uma diluição das lamas na proporção de 1:1 para facilitar a observação dos flocos ao microscópio e estes podem ver-se na Figura 26.

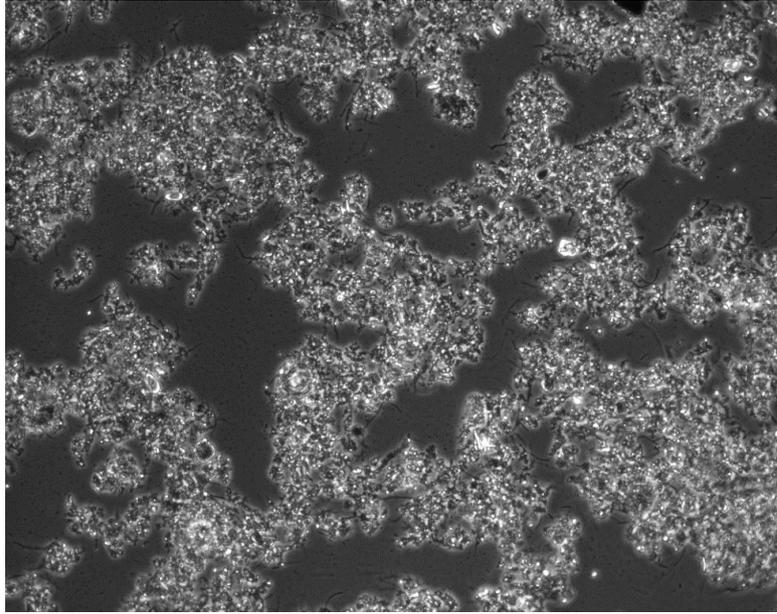


Figura 25 - Microfotografia de uma amostra de lamas anaeróbias representando uma visão geral da população. Amostra diluída na proporção de 1:1. (x100)

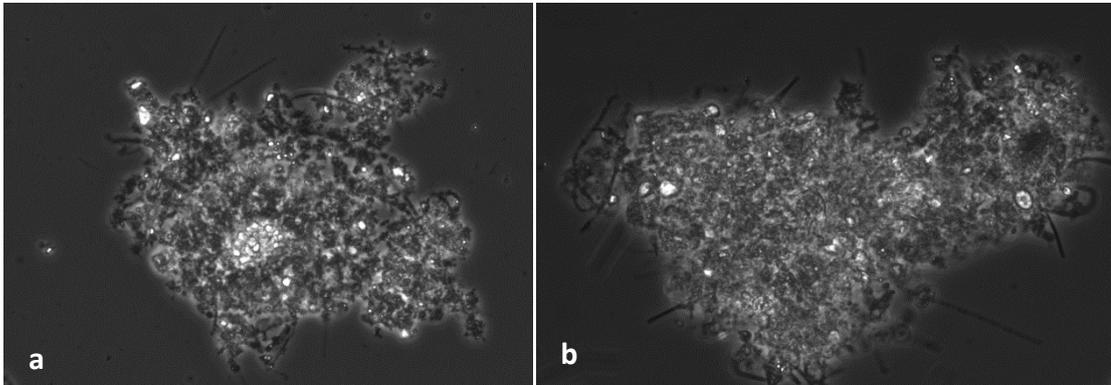


Figura 26 - Microfotografia de dois flocos presentes numa amostra de lamas anaeróbias diluídas na proporção de 1:10. **a)** (x400); **b)** (x1000).

Após a aplicação da técnica da coloração de *Gram* em lamas brutas os resultados indicaram uma maioria de bactérias *Gram* negativas, apresentando a preparação feita maioritariamente a cor avermelhada, tal como as lamas dos outros ensaios. Bactérias *Gram* positivas foram detetadas no interior dos flocos apresentado a cor arroxeadada. A Figura 27 mostra a coloração de *Gram* aplicada às lamas vista ao microscópio.

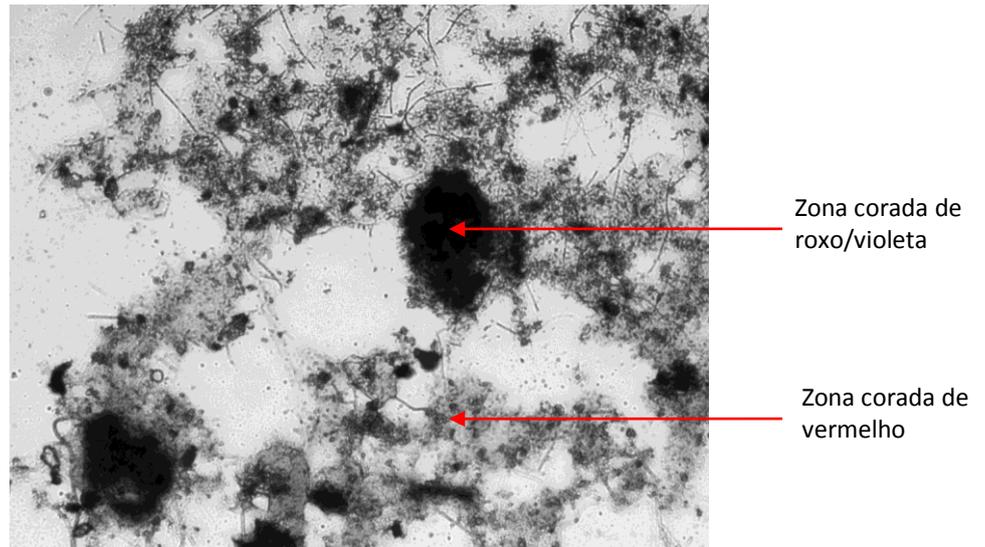


Figura 27 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* em lamas anaeróbias. Preparação sem diluição das lamas. (x400)

Na Figura 28 pode ver-se um floculo mais em pormenor com a aplicação da coloração de *Gram*, mostrando ser *Gram* positivo no seu interior (zona mais escura) e *Gram* negativo na zona envolvente (zona mais clara).

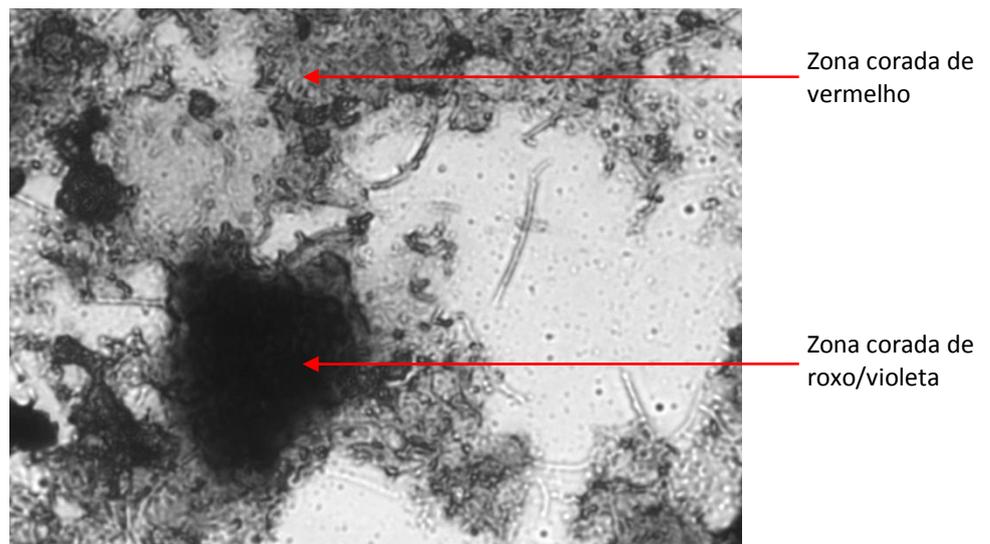


Figura 28 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* em lamas anaeróbias. Pormenor de um floculo *Gram* positivo. Lamas sem diluição. (x1000)

Na observação de fluorescência metanogénica, mais uma vez se constata que esta aparece principalmente no interior de agregados microbianos, como se pode observar nas microfotografias da Figura 29.

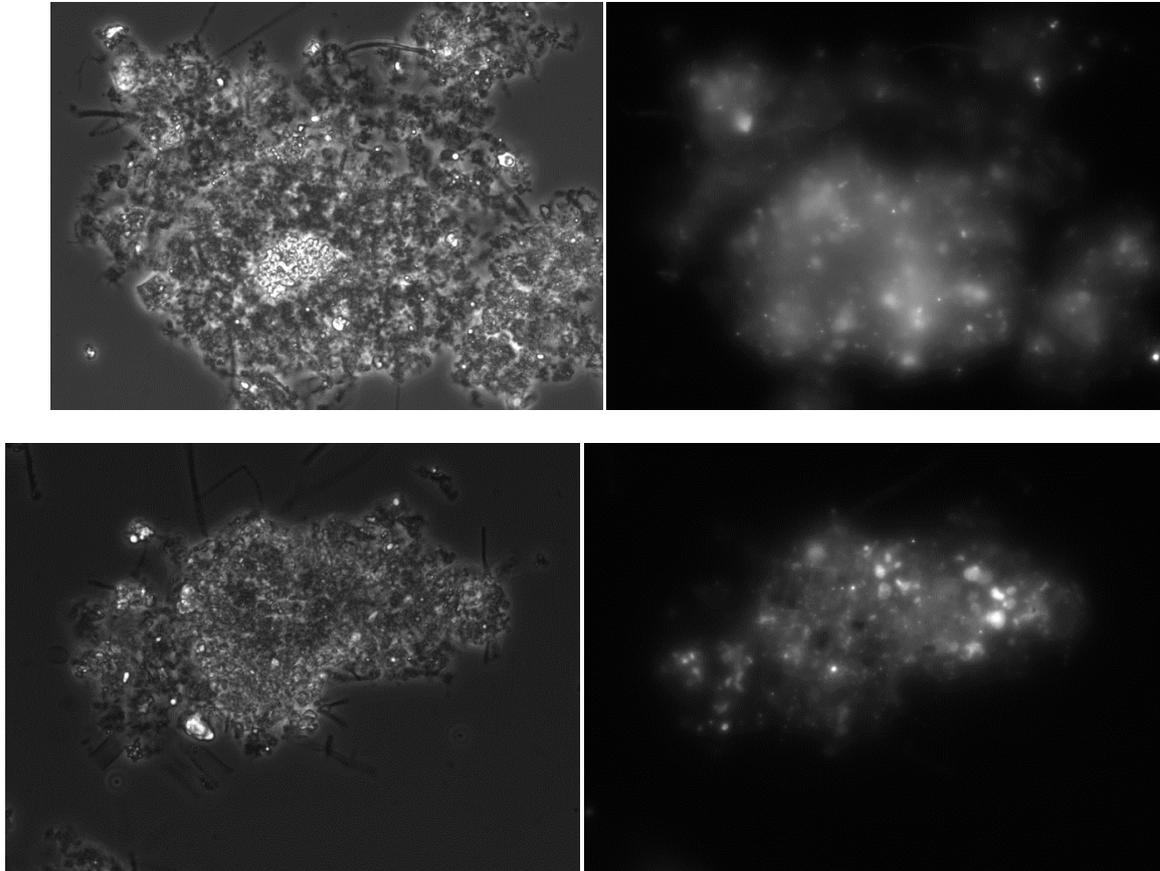


Figura 29 - Microfotografias de dois flocos e respetivas fluorescências metanogénicas de uma amostra de lamas diluídas na proporção de 1:10. (x1000)

Relativamente ao número de microrganismos presente nas lamas, após a contagem recorrendo a uma câmara de Neubauer, foi obtida uma concentração de 1 450 000 células/mL, sendo um valor aproximado já que este tipo de contagem envolve alguns erros.

Em suma, em todas as lamas anaeróbias analisadas se verificou a predominância de população *Gram* negativa (cor avermelhada), verificou-se que a população se encontrava agregada em flocos e a existência de fluorescência metanogénica principalmente, no interior desses flocos.

3.3. Análises físico-químicas

3.3.1. pH e alcalinidade

O pH foi determinado recorrendo a um medidor de pH o Mitsubishi GT-06 Automatic Titrator.

Quanto à alcalinidade foi seguido o protocolo 2320 B do Standard Methods (APHA, 1995) e usado o mesmo aparelho em que foi medido o pH. Colocaram-se 50 mL de amostra no agitador magnético deixou-se estabilizar a amostra durante alguns minutos e procedeu-se à leitura do pH. De seguida titulou-se a amostra com ácido sulfúrico a 1N, para baixar o pH até 4,5. Registou-se o volume de ácido gasto na titulação.

O cálculo da alcalinidade para este método de titulação potenciométrica de ponto final de pH é dado pela equação (1):

$$\text{Alcalinidade (mg CaCO}_3\text{. L}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Volume}_{\text{ácido padrão utilizado, mL}} \times \text{Normalidade}_{\text{do ácido padrão}}) \times 50000}{\text{Volume da amostra, mL}} \quad (1)$$

3.3.2. Sólidos

Para a determinação dos sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram tidos como referência os métodos descritos no manual Standard Methods (APHA, 1995), mais precisamente os protocolos 2540 D e E, respetivamente.

O primeiro passo foi a calcinação dos cadinhos e dos filtros na mufla a 550°C durante 60 minutos, seguido do seu arrefecimento num exsicador. Após o seu arrefecimento, os cadinhos e filtros foram pesados ($\text{massa}_{\text{cadinho+filtro}}$), procedendo seguidamente à filtração da amostra. Para se obter os sólidos suspensos totais é necessário colocar os filtros com os sólidos na estufa, pelo menos durante 24h a 105°C. Decorrido esse tempo colocam-se os cadinhos com os filtros de novo no exsicador para arrefecerem e, depois serem pesados ($\text{massa}_{\text{cadinho+filtro+amostra seca}}$). O último passo é a colocação dos cadinhos e dos filtros na mufla a 550°C durante 2 horas, de forma a se obter os sólidos suspensos voláteis. Após o seu arrefecimento os cadinhos e filtros são de novo pesados ($\text{massa}_{\text{cadinho+filtro+amostra calcinada}}$).

Para a determinação dos SST e SSV foram utilizadas as seguintes equações:

$$\text{SST (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{(m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca (g)}} - m_{\text{cadinho+filtro (g)}}) \times 1000}{\text{Volume da amostra, mL}} \quad (2)$$

$$\text{SSV (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{(m_{\text{cadinho+filtro+amostra calcinada (g)}} - m_{\text{cadinho+filtro+amostra seca (g)}}) \times 1000}{\text{Volume da amostra, mL}} \quad (3)$$

3.4. Métodos microbiológicos

3.4.1. Observação microscópica

A morfologia e atividade dos microrganismos foram observadas usando filtros de contraste de fase do microscópio Carl Zeiss Axio Imager A.2 acoplado a uma câmara Carl Zeiss AxioCam MRm. O microscópio utilizado era composto por três objetivas com ampliação de 10x, 40x e 100x, e uma lente ocular com uma ampliação de 10x. As imagens foram captadas em formato digital através do programa de software AxioVision. Associada ao sistema, estava uma câmara de fluorescência Zeiss HXP 120C.

3.4.2. Amostragem e observação direta

As amostras retiradas diretamente dos reatores foram visualizadas ao microscópio de contraste de fase, sem qualquer tipo de tratamento prévio; apenas nalguns casos onde a densidade de microrganismos era elevada se procedeu à diluição das amostras.

As amostras das lamas frescas foram analisadas logo após a sua colheita diretamente no microscópio e analisadas amostras também diluídas, sempre na proporção de 1 para 1.

O volume de amostragem utilizado para a observação direta foi sempre de 20 μL . Procedendo-se de seguida à montagem na lâmina e lamela e a sua observação ao microscópio. Primeiro utilizando a objetiva de menor ampliação 10x e depois com as objetivas de maior ampliação de 40x e 100x.

As amostras da aplicação da coloração de *Gram* foram observadas em campo claro para se poder observar a verdadeira cor. Não foi possível obter nenhuma imagem da coloração de *Gram*

com cor já que a câmara acoplada ao microscópio não o permitiu, tirando fotografias apenas a preto e branco.

A observação microscópica direta da amostra fresca tem como principais objetivos analisar a morfologia dos agregados microbianos, efetuar a contagem e identificação dos protozoários existentes na amostra e registar qualquer tipo de problema ou condição fora do normal no reator.

3.4.3. Observação de fluorescência metanogénica

Devido à presença do co-fator F420, os microrganismos *archaea* metanogénicos apresentam uma autofluorescência azul-verde quando excitados com radiação UV, mais precisamente a um comprimento de onda de 420 nm. Assim, sendo que não é necessária nenhuma preparação prévia para possibilitar a visualização da fluorescência destas bactérias, aplicou-se apenas um método clássico de montagem da amostra na lâmina, para posterior observação ao microscópio. Nalguns casos, procedeu-se à diluição da amostra na proporção 1:1 para facilitar a observação.

De notar que a intensidade de fluorescência é afetada por vários fatores como sejam, a quantidade de células viáveis, estado metabólico das células, fatores abióticos, por exemplo, bolhas e componentes fluorescentes do meio ou pela presença de outros fluoróforos (p.e. penicilina) (FONSECA *et al.*, 2007).

3.4.4. Contagem

Para a contagem da quantidade de microrganismos presentes nas amostras foi utilizada uma câmara de contagem de Neubauer. O procedimento prático consiste no seguinte:

1. Preparação da câmara de Neubauer: humedecer os lados esmerilados com água e colocar a lamela (Figura 30);
2. Tocar com a pipeta que contém a suspensão de células num dos lados da câmara, junto à lamela. Deixar sair a quantidade estritamente necessária para preencher por difusão o espaço de contagem, mas não deixar sair solução em excesso para não inutilizar a contagem;

3. Colocar a câmara no microscópio e deixar repousar a câmara no mínimo durante 3 minutos;
4. Contar as células usando o microscópio;
5. Calcular a concentração de células na suspensão fornecida (número de células contadas por unidade de volume, células/mL) pela equação (4) (BASTIDAS, 2013):

$$\frac{n^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ células contadas} \times \text{fator de correção da câmara} (10^4)}{n^{\circ} \text{ de quadrados contados} \times \text{diluição}} \quad (4)$$

Nota: os quadrados referidos são os representados pela letra A na Figura 8.

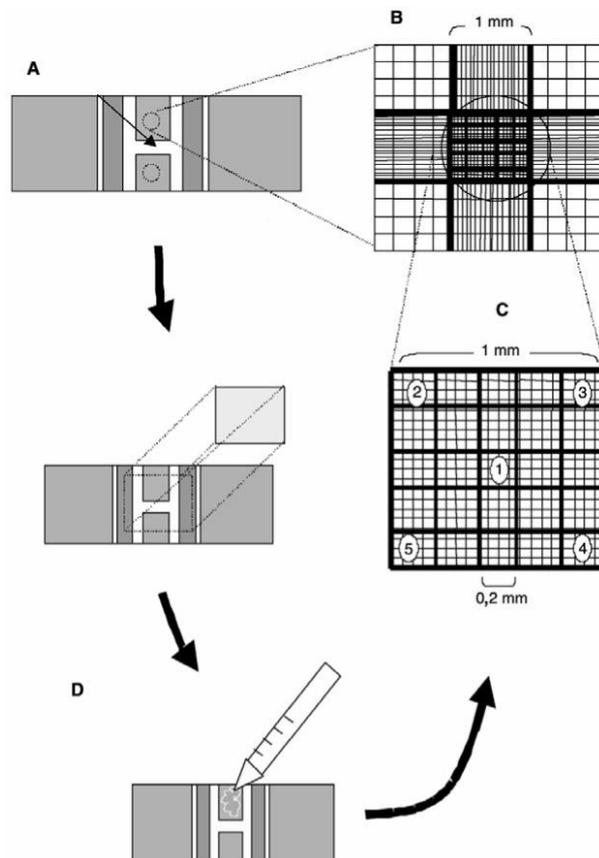


Figura 30 - Esquema de montagem da câmara de Neubauer.

De forma a uniformizar as quantificações, estipula-se que as células que fiquem em cima dos limites inferior e direito dos quadrados não sejam contadas e as células que fiquem em cima dos limites superior e esquerdo sejam contadas (Figura 31 a). Para evitar que a mesma célula seja

contada mais do que uma vez, ou não seja contada, estabelece-se que se comece a contagem num canto do quadrado e se prossiga como indicado na Figura 31 b (BASTIDAS, 2013).

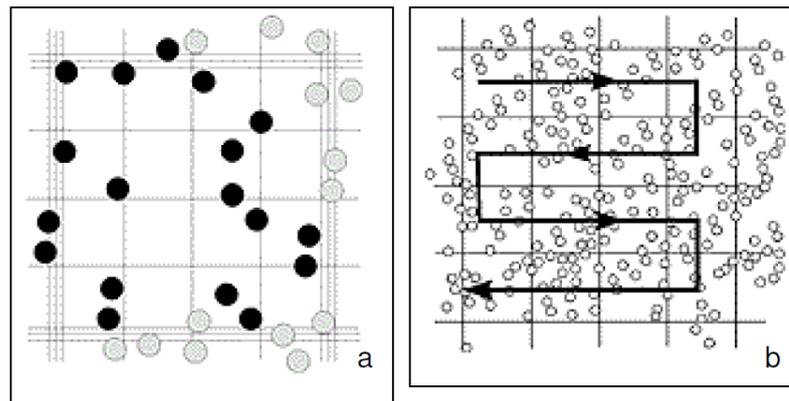


Figura 31 - Esquema de contagem celular.

3.4.5. Coloração de Gram

O método da coloração de *Gram* foi feito com base no descrito em Marques *et al.* (2003), que consiste em:

1. Colocar 20 μL de amostra na lâmina e efetuar a técnica de esfregaço, fixando o esfregaço pela ação do calor;
2. Colocar a lâmina sobre um recipiente onde possam cair os resíduos líquidos, e proceder à coloração;
3. O primeiro corante a ser usado é o cristal violeta, cobrir toda a lâmina e deixar atuar um minuto;
4. Cobrir por completo a lâmina com soluto de Lugol e deixar atuar um minuto;
5. Descorar com álcool a 95% ou acetona e deixar atuar 10-20 segundos;
6. Cobrir por completo a lâmina com safranina e deixar atuar 15 segundos;
7. Depois de cada aplicação de corante ou álcool, e decorrido o tempo de atuação, lavar com água destilada e retirar o excesso de água;
8. Colocar a lamela e observar ao microscópio com a objetiva de imersão.

As amostras não sofreram qualquer tipo de tratamento sendo colocadas tal e qual na lâmina, apenas na aplicação da coloração às lammas foram feitos alguns ensaios com as lammas diluídas na proporção de 1 para 1, para facilitar a observação.

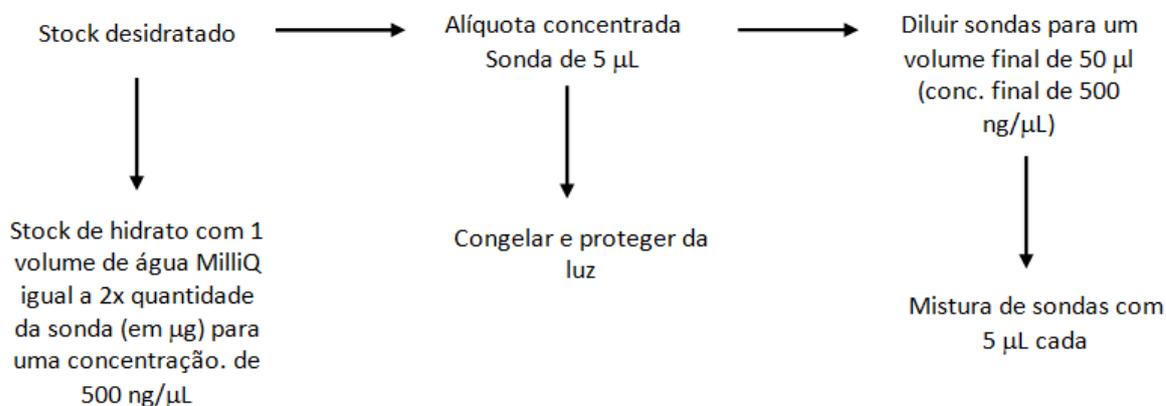
3.4.6. Método de FISH

Para a aplicação do método de FISH foi seguido o descrito por Amann (AMANN *et al.*, 1990, AMANN *et al.*, 1995).

A primeira etapa baseia-se na fixação da amostra envolvendo as seguintes etapas:

1. Adicionar 3 volumes de PFA para 1 volume de amostra (e.g.: 1,5 mL PFA: 0,5 mL amostra);
2. Reservar a 4°C entre 1 a 3 horas;
3. Centrifugar as amostras a 10.000 rpm durante 3 minutos;
4. Lavar as células do pellet com 1 mL de PBS 1x, centrifugar e repetir a lavagem;
5. Resuspender as células com 0,5 mL de PBS 1x;
6. Adicionar um volume (e.g.: 0,5 mL) de etanol puro a -20°C;
7. Reservar a -20°C.

A etapa seguinte é a aplicação de sondas que consta de:



A etapa da hibridização consiste: aplicar um volume de entre 3-30 µL de células fixas numa lâmina de vidro; secar ao ar (ou no forno a 46°C) e desidratar em séries de etanol (3 min em cada

uma): 50%, 80% e 98% de etanol. Após este procedimento, as suspensões de células desidratadas nas lâminas podem ser armazenadas indefinidamente, mas em local seco, no escuro e a -20°C .

A aplicação do método de FISH às amostras recolhidas foi realizada no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa. Logo após a recolha das amostras estas foram preservadas no congelador a $T=-20^{\circ}\text{C}$.

4. Resultados

4.1. Efeito da carga orgânica

4.1.1. Desempenho dos reatores UASB

A monitorização físico-química dos reatores UASB foi realizada num trabalho paralelo (Couras, 2013) sendo que apenas se apresentarão os gráficos de volume de CH_4 produzido e de percentagem de remoção de CQO.

Pela Figura 32 pode verificar-se que os reatores R1 e R2 com as maiores cargas apresentaram as maiores produções de CH_4 , muito semelhantes entre si. A menor produção foi registada pelo reator R3 que era o reator com a menor carga orgânica por litro de efluente.

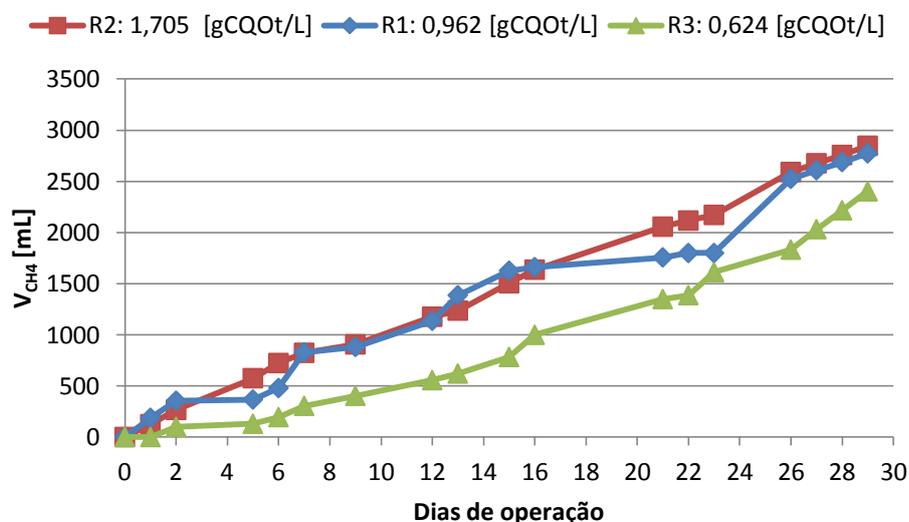


Figura 32 - Representação gráfica do volume de CH_4 cumulativo produzido pelos reatores R1, R2 e R3 ao longo do tempo de operação.

Quanto à percentagem de remoção de CQO (Figura 33), os reatores R1 e R2 atingiram os 90% no final dos 30 dias de operação, ficando o reator R3 bastante próximo dos 90%. De notar que quase 70% da remoção de CQO se deu nos dois primeiros dias de operação, estabilizando entre os 80 e 90% a partir do dia 12.

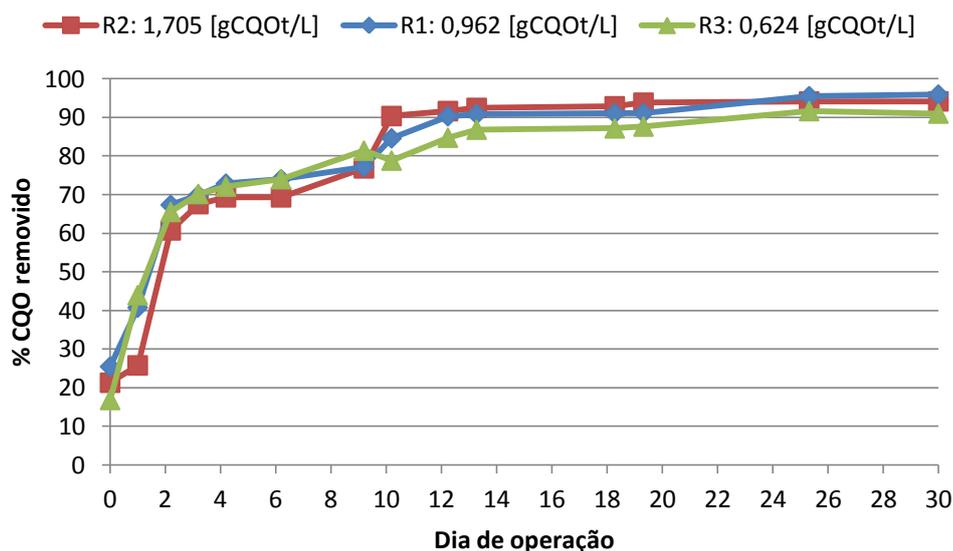


Figura 33 - Representação gráfica da remoção de CQO para os reatores R1, R2 e R3 ao longo do tempo de operação.

Neste ensaio com os reatores R1, R2 e R3 o objetivo era avaliar a influência da carga orgânica aplicada aos reatores UASB sobre a remoção de CQO e a produção de metano. Como se pode constatar os melhores resultados, em termos de remoção de CQO e produção de CH_4 , foram os dos reatores R1 e R2, que tinham as cargas mais elevadas, obtendo ambos resultados semelhantes. Contudo olhando para a eficiência de metanização dos três reatores (Tabela 7) verifica-se que foi o reator R1 com carga próxima de 1 gCQOt.L^{-1} , que obteve uma maior percentagem de eficiência de metanização da CQO removida cerca de 21%.

4.1.2. Estrutura da comunidade microbiana

As amostras retiradas dos reatores foram analisadas quando possível, assim que recolhidas, caso contrário, nas 24h seguintes. Foram recolhidas amostras nos dias 1, 2, 3, 6, 8, 16, 23 e 30 de operação. No início foram recolhidas mais frequentemente para se observar o comportamento da comunidade microbiana, depois mais espaçadamente para não perturbar o funcionamento dos reatores.

Inicialmente as amostras foram recolhidas do ponto 2 (Figura 12) já que as lamas ainda não se encontravam completamente sedimentadas. Após a sua completa sedimentação, a partir do 6º dia, as amostras começaram a ser retiradas do ponto 1.

Reator R2 (1,7 gCQOt/L.d)

Pela observação visual direta pode verificar-se uma evolução em termos de granulação e, em termos de definição dos microrganismos, deixando de existir um emaranhado de microrganismos ao longo do tempo. No final da operação (30º dia) estes flocos já se encontravam bastante bem definidos. Na Figura 34 pode verificar-se a evolução referida anteriormente nas microfotografias apresentadas.

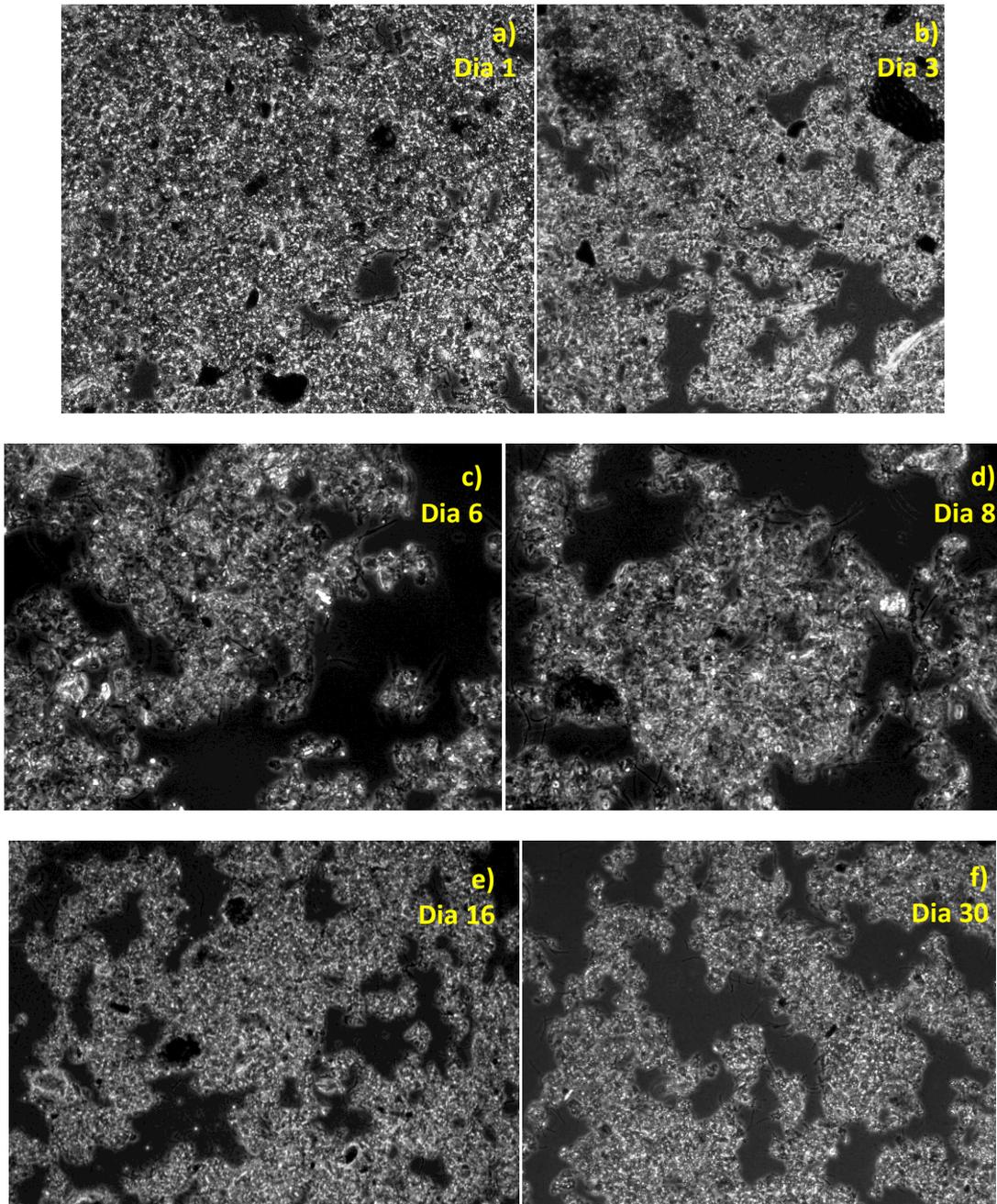
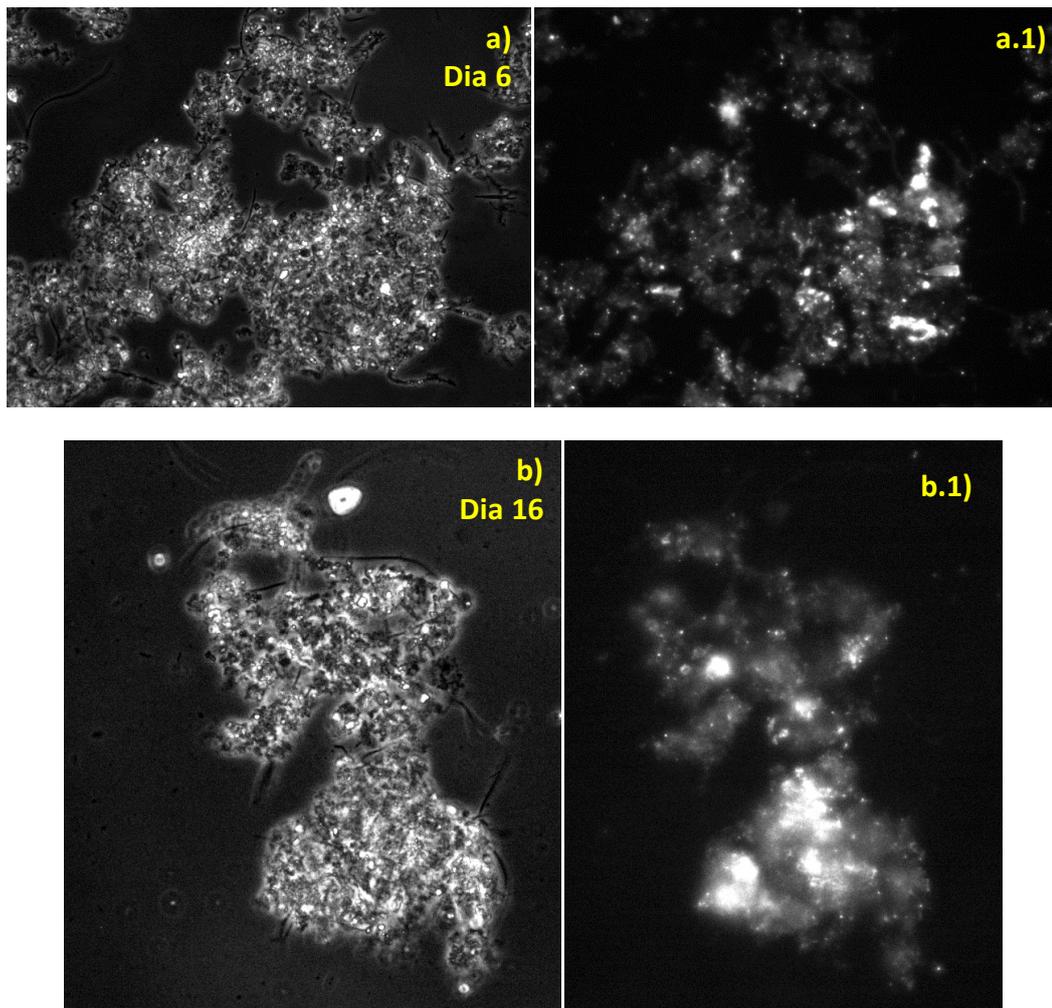


Figura 34 – Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R2, em diferentes dias de operação. **a)** Dia 1, ponto 2: amostra sem diluição (x100); **b)** Dia 3, ponto 2: amostra sem diluição (x100); **c)** Dia 6, ponto 1: amostra sem

diluição (x400); **d)** Dia 8, ponto 1: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400); **e)** Dia 16, ponto 1: amostra sem diluição (x100); **f)** Dia 30, ponto 1: amostra sem diluição (x100).

Quanto à presença de população metanogénica, tal como no reator R1 e também no reator R3, não foi avaliada a sua existência nos primeiros dias devido a problemas técnicos com a câmara de fluorescência, mas foi testada nos dias 6, 10, 23 e 30 de operação.

Na Figura 35 podem observar-se microfotografias retiradas às amostras analisadas e a respetiva fluorescência (pontos brancos) e em todas elas foi detetada a presença de fluorescência metanogénica.



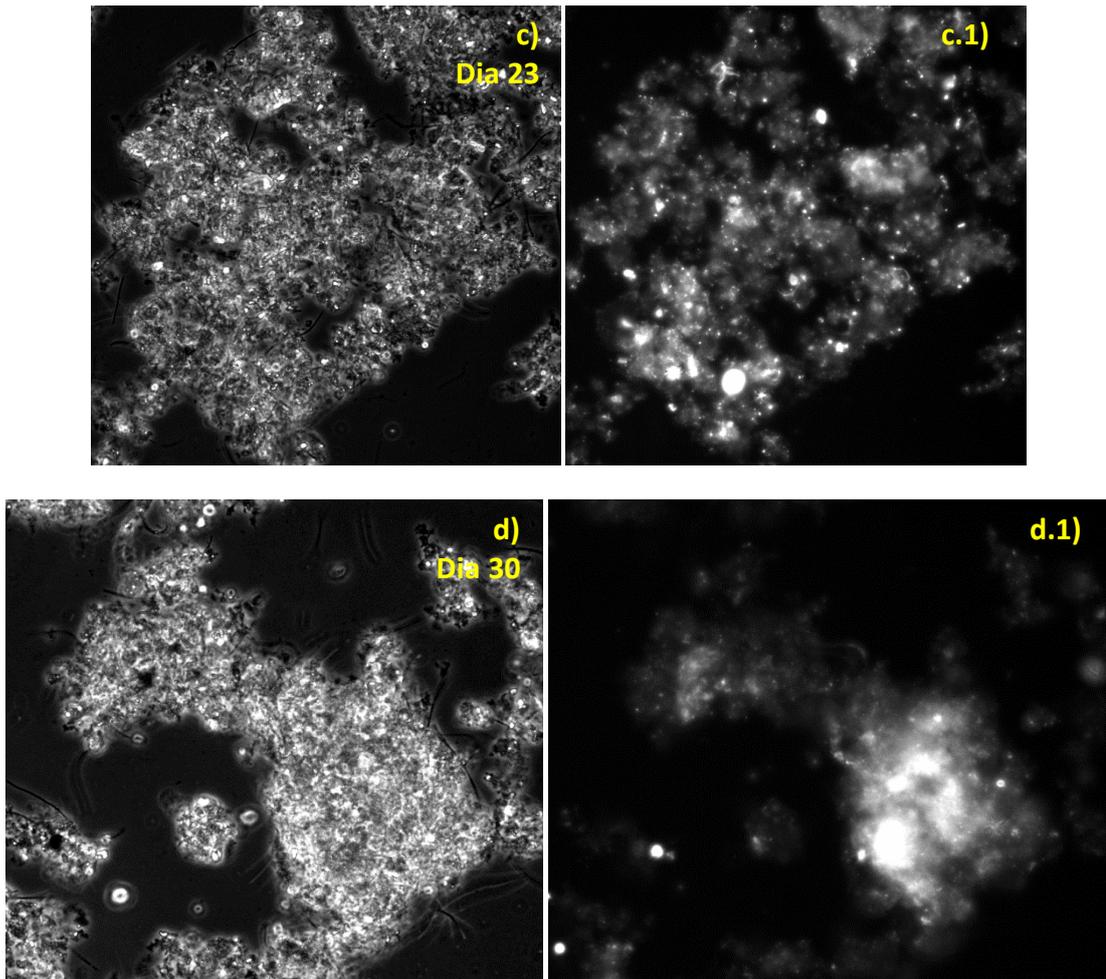


Figura 35 - Microfotografias de flocos (a; b; c; d) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1; d.1) de amostras retiradas do reator R2, ponto 1, em diferentes dias de operação, todas as amostras diluídas na proporção de 1:1. (x400) **a)** Dia 6; **b)** Dia 16; **c)** Dia 23; **d)** Dia 30.

Pela Figura 36 a) pode verificar-se que a produção diária de metano foi bastante irregular ao longo do tempo. Na observação da fluorescência metanogénica verificou-se que no 6º e 16º dia de operação a fluorescência metanogénica não era muito intensa, aumentando um pouco de intensidade nas últimas observações. O gráfico de regressão linear indica que a produção de metano aumentou ao longo da operação concordando com as observações de fluorescência metanogénica.

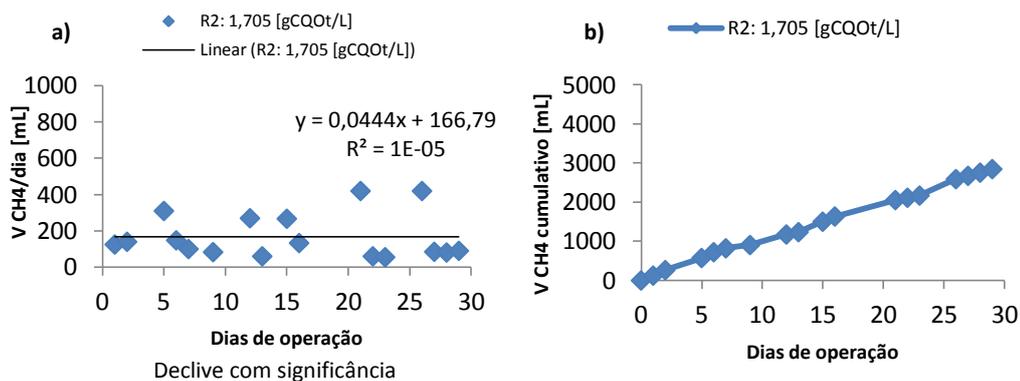


Figura 36 – a) Produção diária de metano e **b)** volume de metano cumulativo produzido pelo reator R2 ao longo do tempo de operação.

Relativamente, aos resultados da coloração de *Gram*, dos dias 2 e 30, estes apontaram sempre para uma maioria de população *Gram* negativa, tal como no reator R1 e R3. A presença de *Gram* positivas foi detetada dentro de flocos, aparecendo corados de roxo no seu interior e na sua envolvente a vermelho (*Gram* negativas), como se pode verificar nas Figuras 37 e 38.

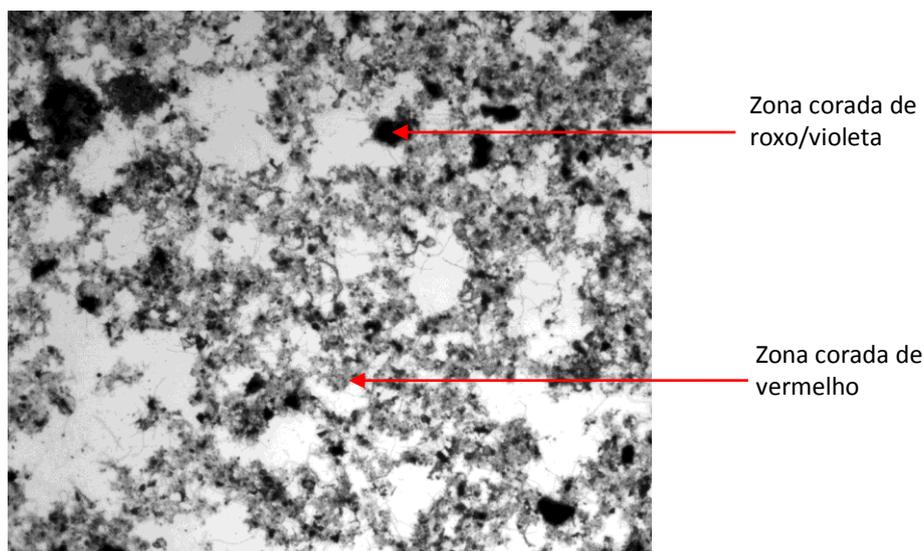


Figura 37 – Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R2 no 30º dia de operação. Amostra sem diluição. (x100)

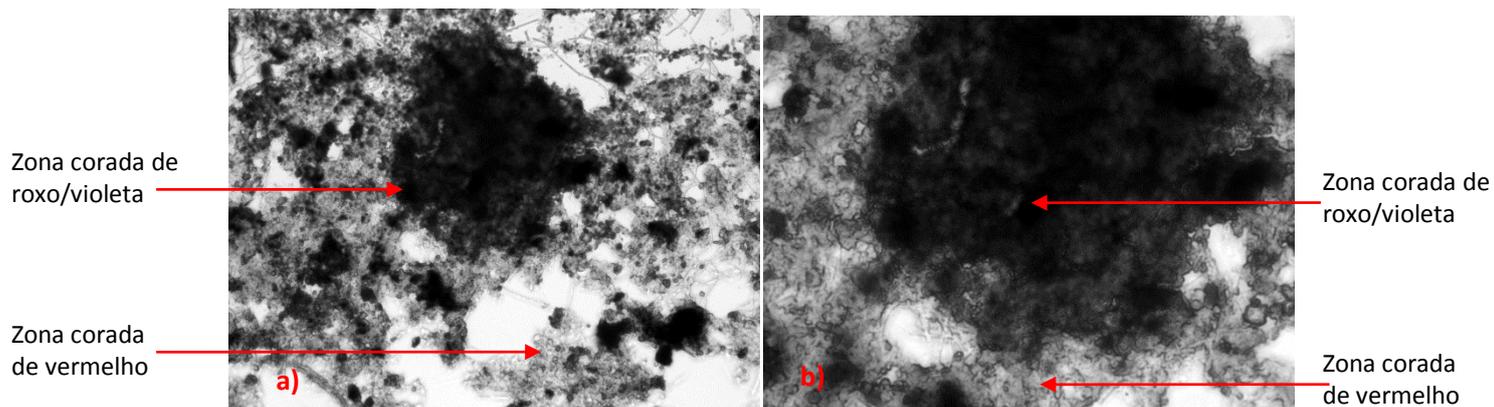
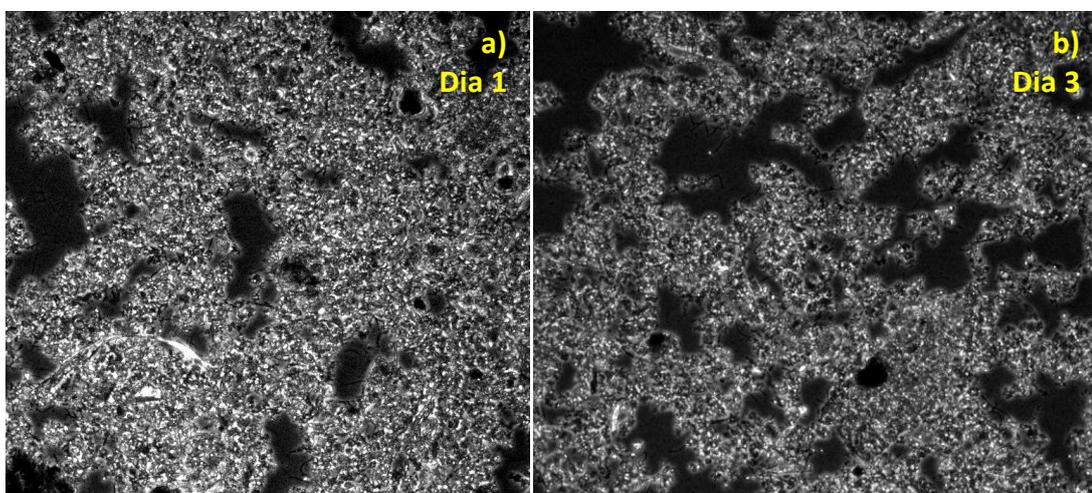


Figura 38 – Microfotografias da aplicação da coloração de *Gram*. a) Flocos arroxeados (x400), e a sua respetiva b) ampliação (x1000). Amostra sem diluição.

Reator R1 (1 gCQOt/L.d)

O que se pode observar diretamente durante a operação dos reatores foi uma evolução em termos de granulação, isto é, no início os microrganismos estavam desagregados e todos “emaranhados” e a partir do 3º dia de operação este emaranhado de microrganismos começou a desagregar-se e começaram a agregar-se em flocos. No final da operação, ao 30º dia estes flocos já estavam bastante bem definidos.

Nas Figura 39 pode verificar-se a evolução referida anteriormente nas microfotografias apresentadas.



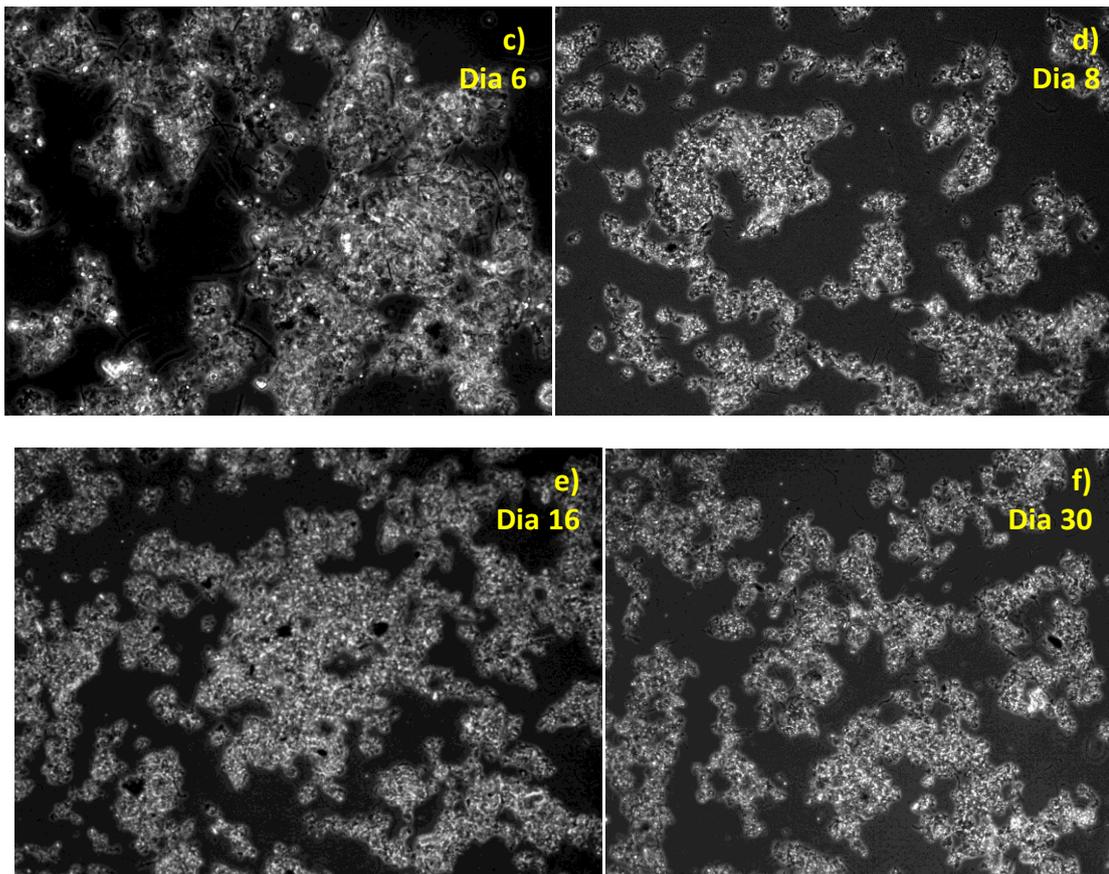
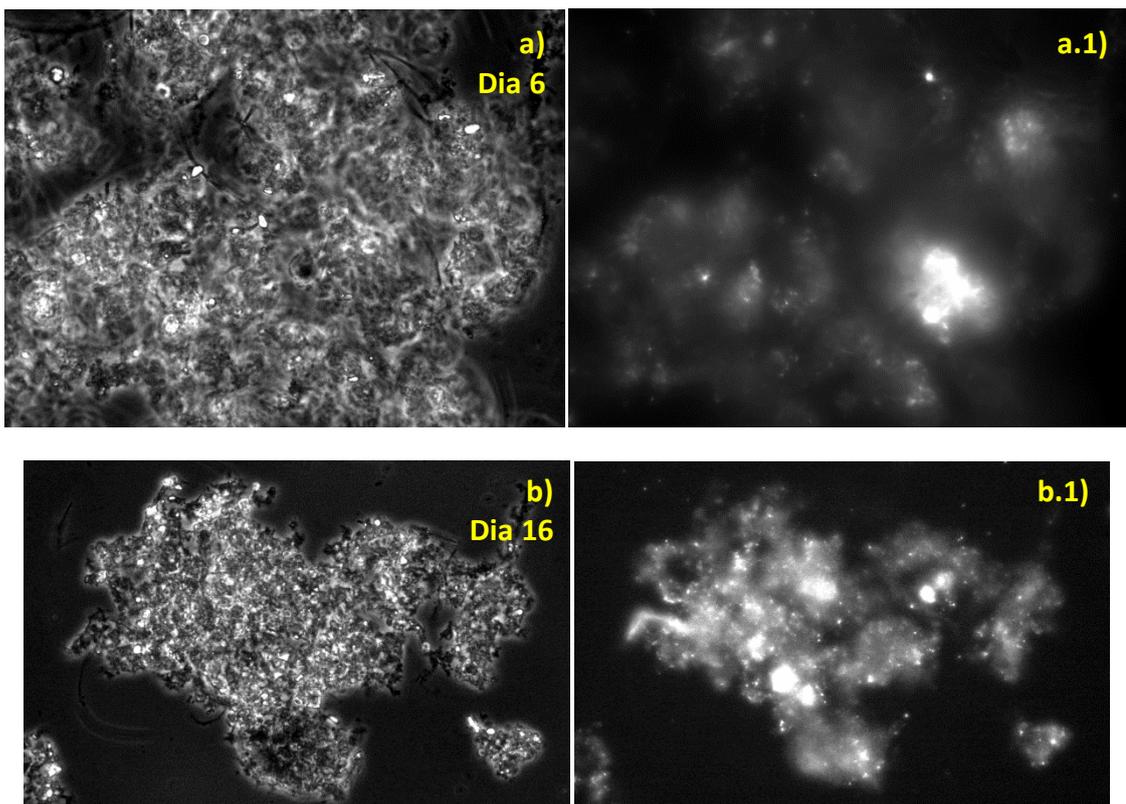


Figura 39 – Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R1, em diferentes dias de operação. **a)** Dia 1, ponto 2: amostra sem diluição (x100), **b)** Dia 3, ponto 2: amostra diluída na proporção de 1:1 (x100); **c)** Dia 6, ponto1: amostra sem diluição (x400); **d)** Dia 8, ponto 1: amostra diluída na proporção de 1:1 (x100); **e)** Dia 16, ponto 1: amostra sem diluição (x100); **f)** Dia 30, ponto1: amostra sem diluição (x100).

De notar que em todas as amostras analisadas, e em todos os dias de amostragem, se detetou a presença de protozoários. Contudo, após a deteção da presença destes organismos foram recolhidas e observadas ao microscópio amostras de todos os pontos de amostragem (Figura 12) e da alimentação, e pode-se concluir que estes microrganismos provinham da alimentação. Isto porque foi detetada nela a presença de alguns destes microrganismos e no reator apenas no ponto 1 de amostragem, nos restantes pontos não se encontravam. Significa portanto que devido às condições anaeróbias dentro do reator estes microrganismos acabavam por morrer e que a fonte de contaminação era a alimentação. O mesmo se verificou no reator R3. No reator R2, verificou-se também a presença de protozoários mas a partir do 23^o dia de operação não mais se detetou a sua presença.

Verificou-se a ausência de microrganismos/matéria suspensa em amostras recolhidas do ponto 4 (Figura 12) nos dias 1, 6, 16 e 30, pelo que se pode inferir que o leito de lamas é eficiente na remoção de SST e também que a biomassa tem boas capacidades de sedimentação.

Não foi verificada a existência de população metanogénica nos primeiros dias devido a problemas técnicos com a câmara de fluorescência, mas foi verificado nos dias 6, 10, 23 e 30 de operação. Em todas as amostras foi detetada a presença de fluorescência metanogénica, sendo que nos 23º e 30º, como os flocos já se encontravam bem definidos era possível verificar bastante fluorescência no seu interior. Na Figura 40 estão microfotografias retiradas às amostras analisadas e a respetiva fluorescência (pontos brancos).



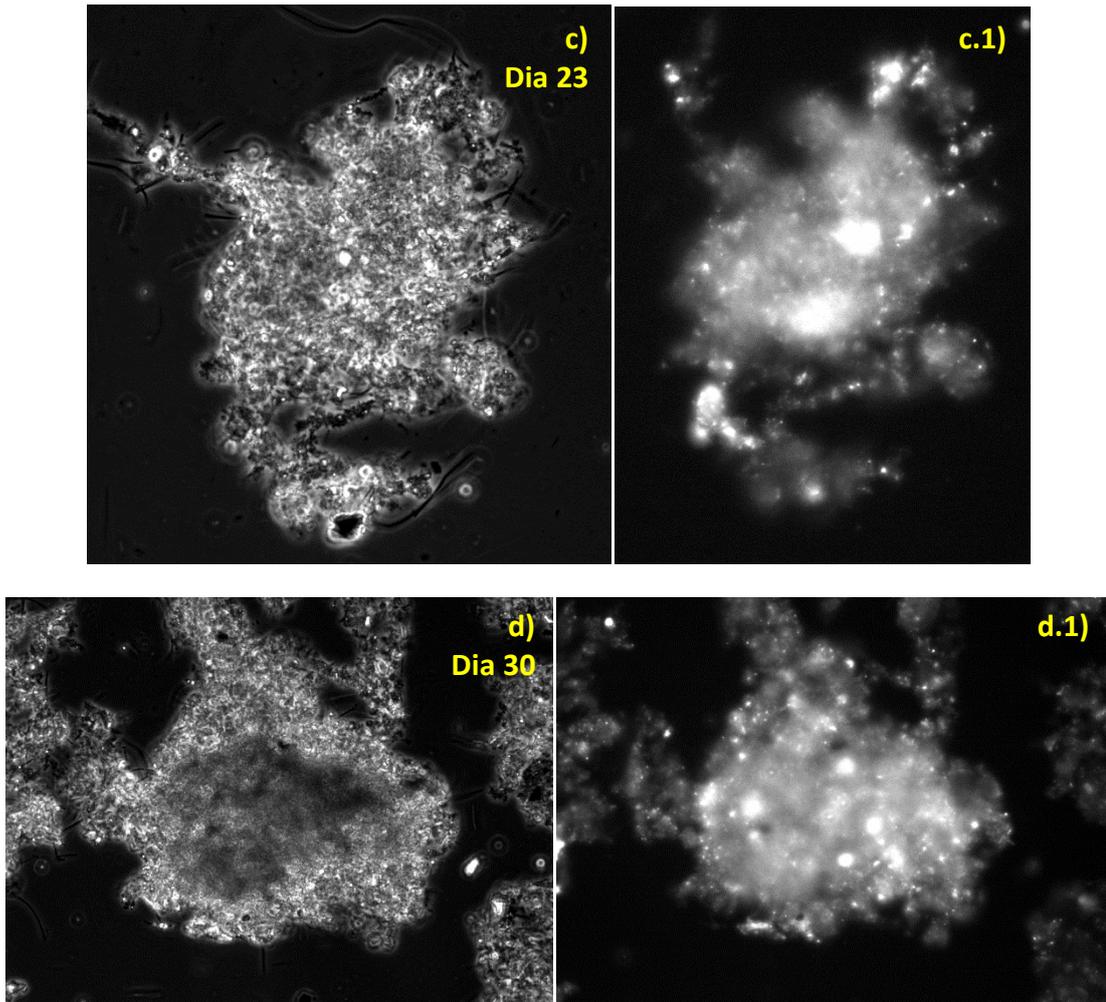


Figura 40 - Microfotografias de flocos (**a**; **b**; **c**; **d**) e respetivas fluorescências metanogénicas (**a.1**; **b.1**; **c.1**; **d.1**) de amostras retiradas do reator R1, ponto 1, em diferentes dias de operação. **a)** Dia 6: amostra diluída na proporção de 1:1 (x1000); **b)** Dia 16: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400); **c)** Dia 23: amostra sem diluição (x400); **d)** Dia 30: amostra sem diluição (x400).

Na Figura 41 apresentam-se dois gráficos que representam a produção diária de metano (a) e o volume de metano cumulativo (b) produzidos pelo reator R1. Como se pode ver a produção diária de metano foi bastante irregular ao longo do tempo de operação. O gráfico da regressão linear indica que a produção de CH_4 aumentou durante a operação. Em termos de observação da fluorescência metanogénica no dia 6 esta não se verificou muito intensa, mas veio a aumentar ao longo do tempo de operação no interior dos flocos. Nota: os resultados da análise de significância do declive da produção diária de metano podem ser verificados no Anexo II, para todos os ensaios.

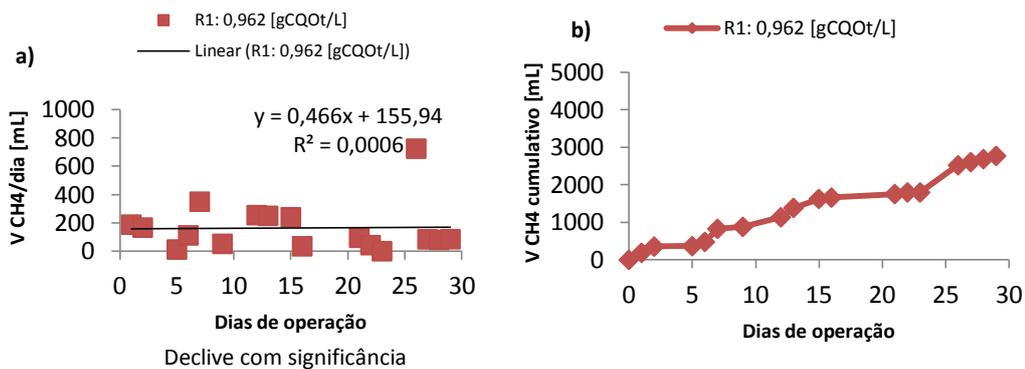


Figura 41 – a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R1 ao longo do tempo de operação.

Relativamente, aos resultados da coloração de *Gram*, dos dias 2 e 30, apontaram sempre para uma maioria de população *Gram* negativa. A presença de *Gram* positivas foi detetada dentro de flocos, aparecendo corados de roxo no seu interior e na sua envolvente a vermelho (*Gram* negativas). Nas Figuras 42 e 43 pode notar-se o referido anteriormente, onde os pontos negros representam as bactérias *Gram* positivas e o restante as bactérias *Gram* negativas. Como a fluorescência metanogénica e as bactérias *Gram* positivas foram observadas em maioria no interior dos flocos, pode dizer-se que neste trabalho as *archaea* metanogénicas são maioritariamente *Gram* positivas.

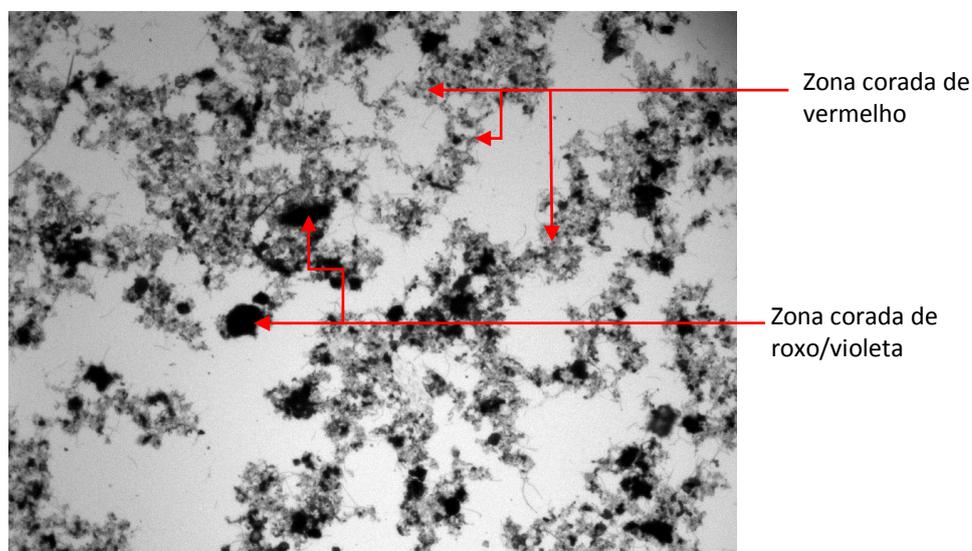


Figura 42 – Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R1 no 30º dia de operação. Amostra sem diluição. (x100)

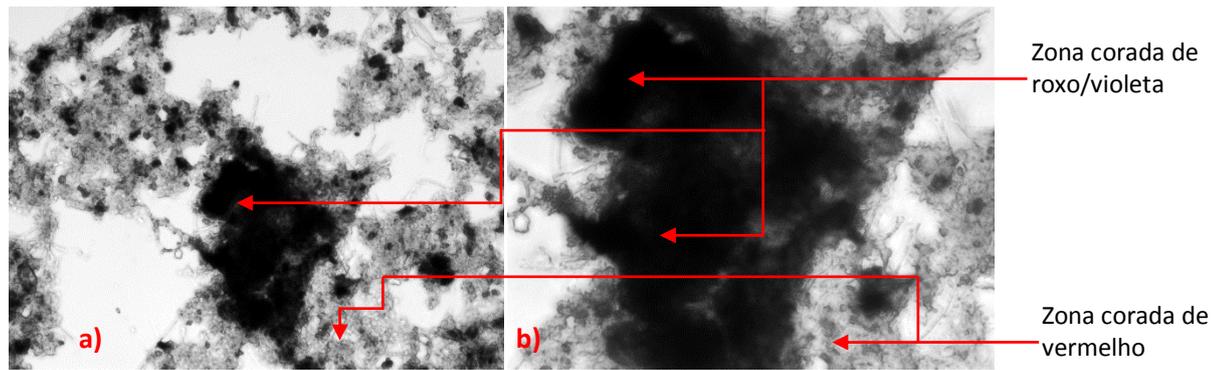
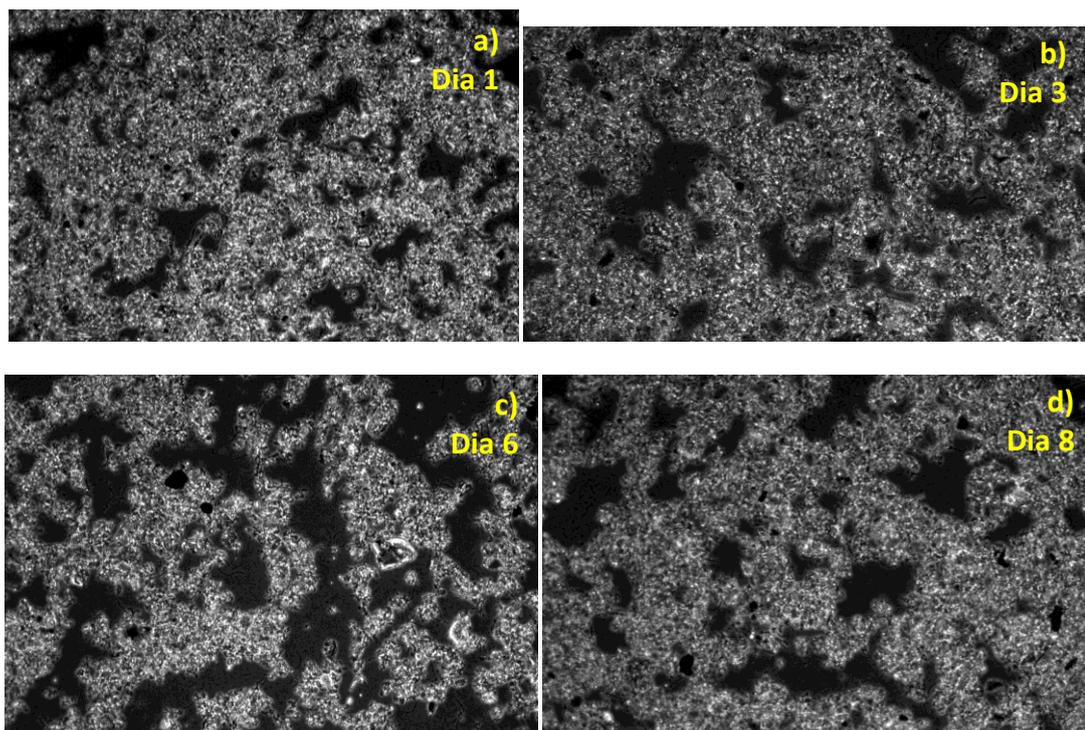


Figura 43 - Microfotografias da aplicação da coloração de *Gram*. a) Microfotografia de um flocos arroxeados (x400), e a sua respetiva b) ampliação (x1000). Amostra sem diluição.

Reator R3 (0,6 gCQOt/L.d)

Pela observação visual direta pode verificar-se uma evolução em termos de granulação deixando de existir um emaranhado de microrganismos ao longo do tempo. No final da operação (30º dia) pode dizer-se que os flocos não ficaram tão bem definidos como nos outros reatores. Na Figura 44 pode verificar-se a evolução referida anteriormente nas microfotografias apresentadas.



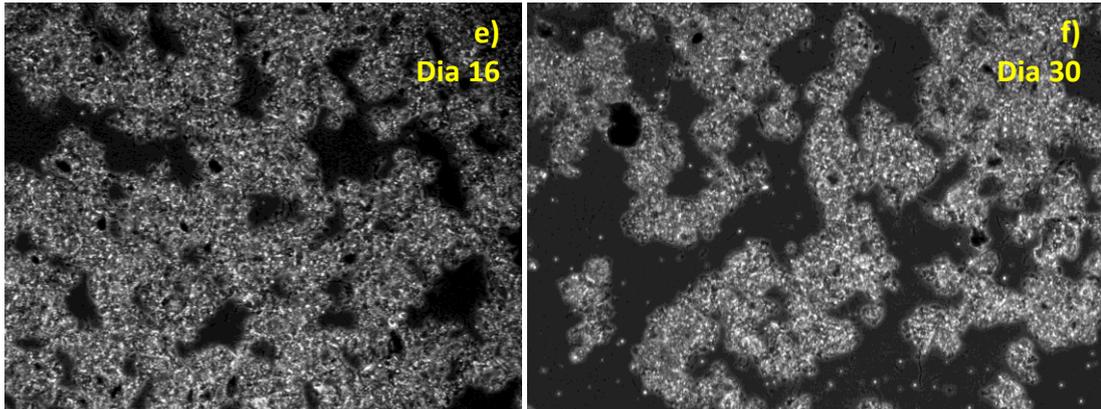
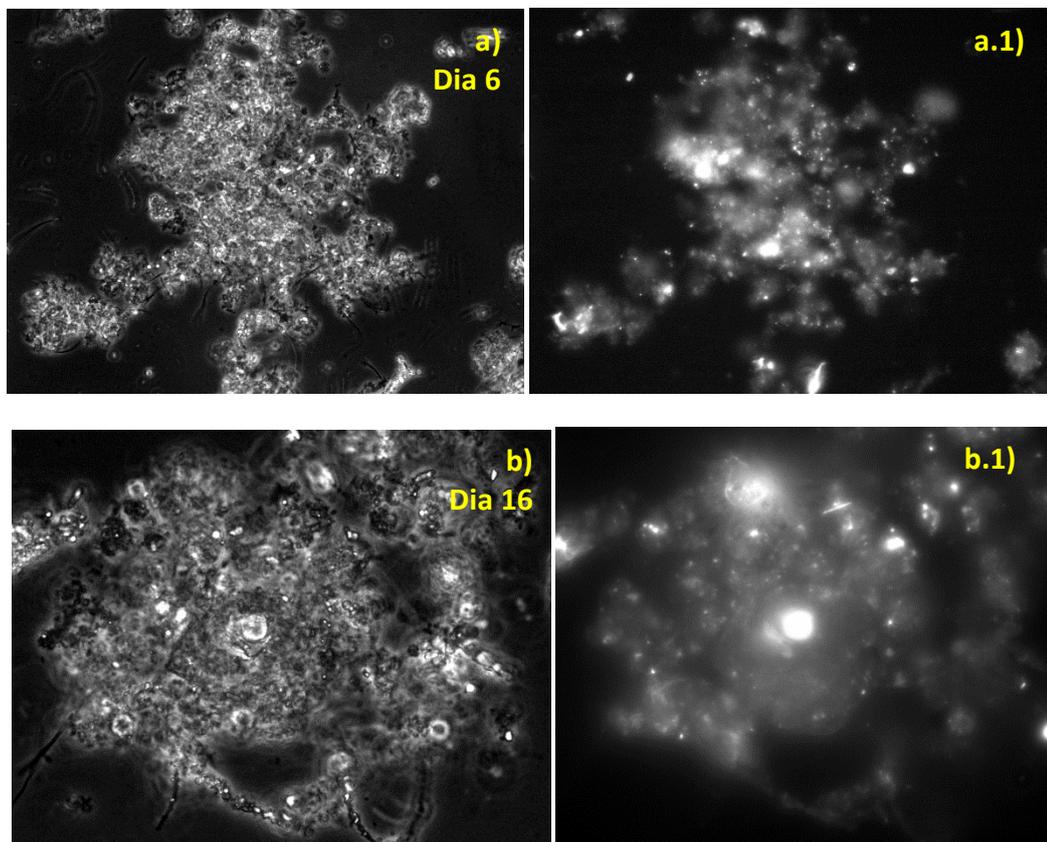


Figura 44 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R3, em diferentes dias de operação. Amostras sem diluição (x100). **a)** Dia 1, ponto 2; **b)** Dia 3, ponto 2; **c)** Dia 6, ponto 1; **d)** Dia 8, ponto 1; **e)** Dia 16, ponto 1; **f)** Dia 30, ponto 1.

A presença de população metanogénica foi avaliada nos dias 6, 10, 23 e 30 de operação. Na Figura 45 estão microfotografias retiradas às amostras analisadas e a respetiva fluorescência (pontos brancos) e em todas elas foi detetada a presença de fluorescência metanogénica.



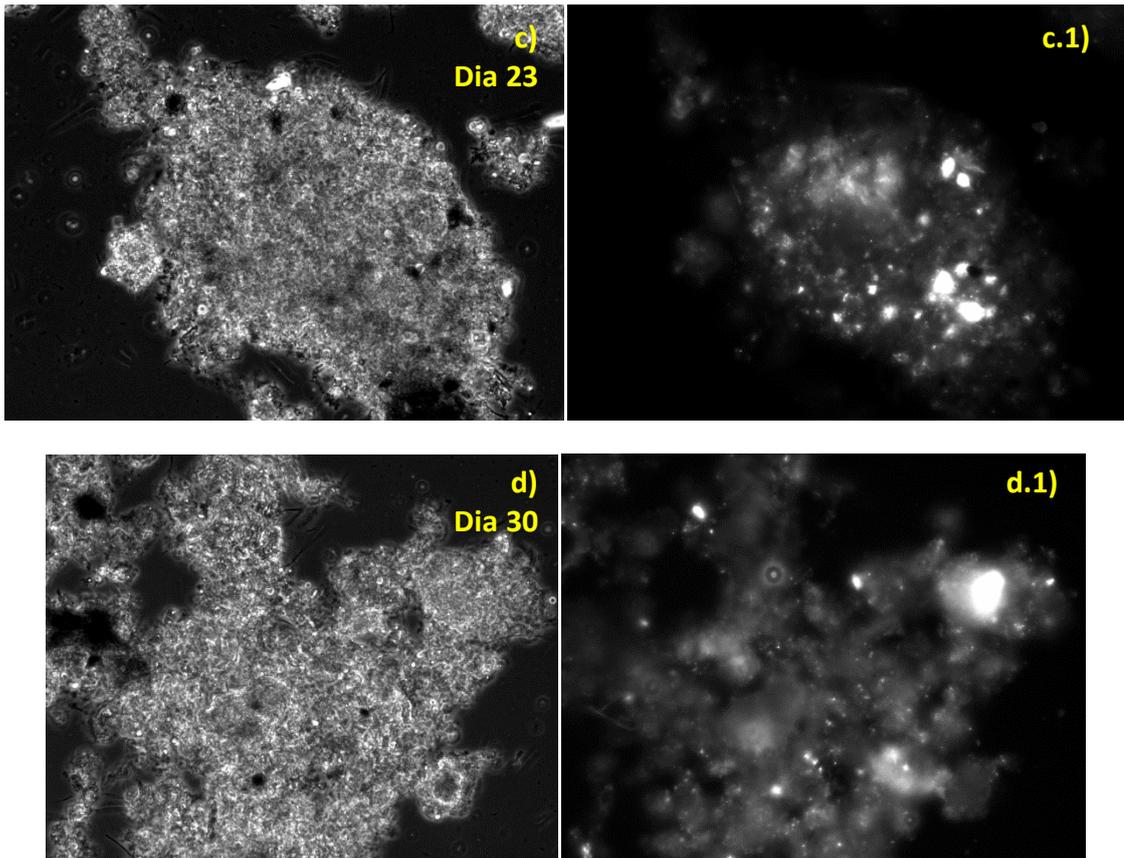


Figura 45 - Microfotografias de flocos (**a**; **b**; **c**; **d**) e respectivas fluorescências metanogénicas (**a.1**; **b.1**; **c.1**; **d.1**) de amostras retiradas do reator R3, ponto 1, em diferentes dias de operação, todas as amostras diluídas na proporção de 1:1. **a**) Dia 6, ponto 1. (x400); **b**) Dia 16, ponto 1. (x1000); **c**) Dia 23, ponto 1. (x400); **d**) Dia 30, ponto 1. (x400)

Na Figura 46 apresentam-se dois gráficos que representam a produção diária de metano (a) e o volume de metano cumulativo (b) produzidos pelo reator R3. O declive da reta da regressão linear não tem significância por isso, não se pode afirmar que a produção diária de metano teve tendência crescente. Quanto à observação da fluorescência metanogénica verificou-se que aumentou de intensidade no decorrer da operação.

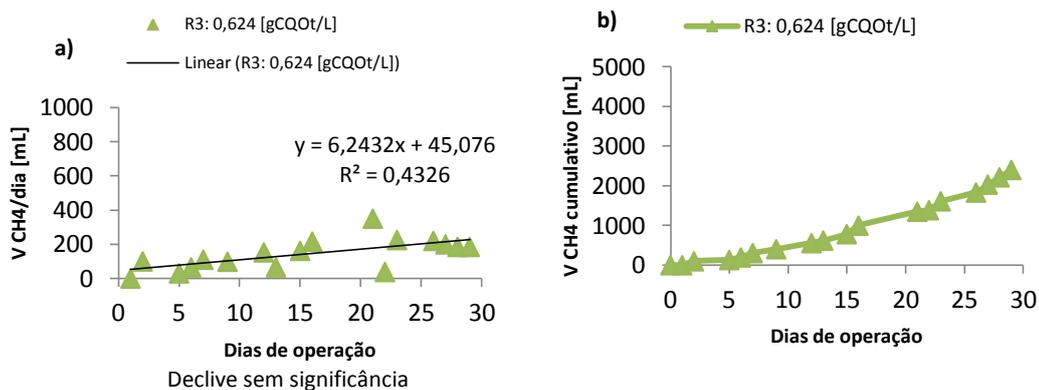


Figura 46 - a) Produção diária de metano e **b)** volume de metano cumulativo produzido pelo reator R3 ao longo do tempo de operação.

Relativamente aos resultados da coloração de *Gram*, dos dias 2 e 30, estes apontaram sempre para uma maioria de população *Gram* negativa, sendo que as bactérias *Gram* positivas foram detetadas dentro dos flocos, tal como no reator R1 e R2. Na Figura 47 pode notar-se o referido anteriormente.

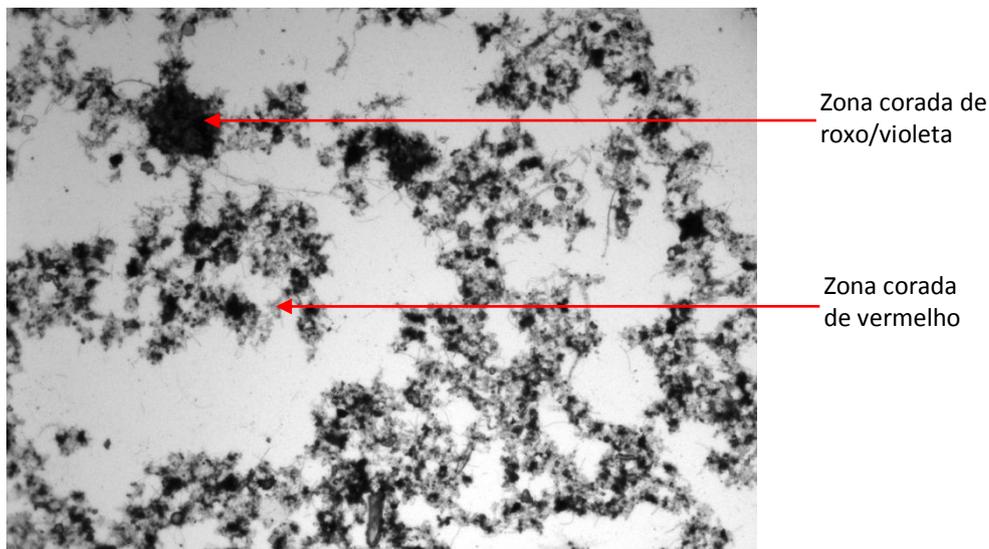
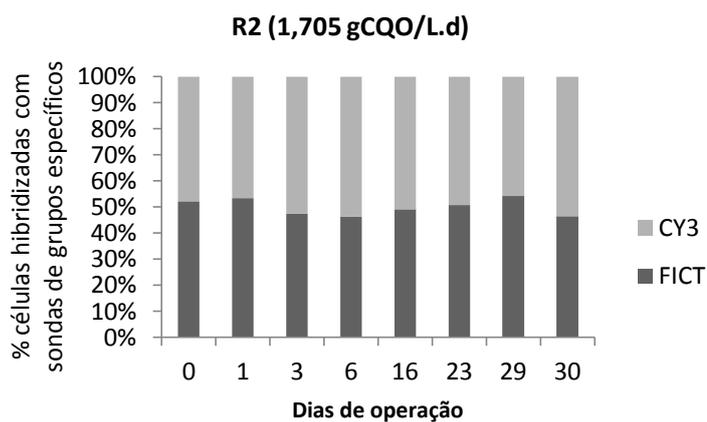


Figura 47 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R3 no 30^o dia de operação. Amostra sem diluição. (x100)

4.1.3. Resultados do método de FISH

Na aplicação do método de FISH foram aplicadas duas sondas, uma que hibridiza células do domínio *Bacteria* denominada "FICT" e a outra que hibridiza células do domínio *Archaea* denominada "CY3". Na Figura 48 estão representados os gráficos com os resultados da percentagem de células hibridizadas com as sondas utilizadas nas amostras recolhidas no decorrer da operação dos reatores R1, R2 e R3. Pode verificar-se que em todos os reatores a população de bactérias diminui em relação à população de *Archaea* do início (dia 0 - correspondente à biomassa inicial) para o final da operação. No reator R1 a população de *Archaea* cresceu cerca de 4,8%, no reator R2 cerca de 0,15% e no reator R3 cerca de 0,24%. Os gráficos da produção diária de metano dos reatores R2 e R1 (Figuras 36 e 41) indicam que a produção de metano aumentou com o decorrer da operação. Como o declive da reta da produção diária de metano do reator R3 (Figura 46) não tem significância não se pode dizer que a produção de metano aumentou ou diminuiu. Portanto, o aumento da produção de metano nos reatores com cargas de 1,7 gCQOt/L.d e 1 gCQOt/L.d coincide com o aumento da população de *Archaea* na biomassa.



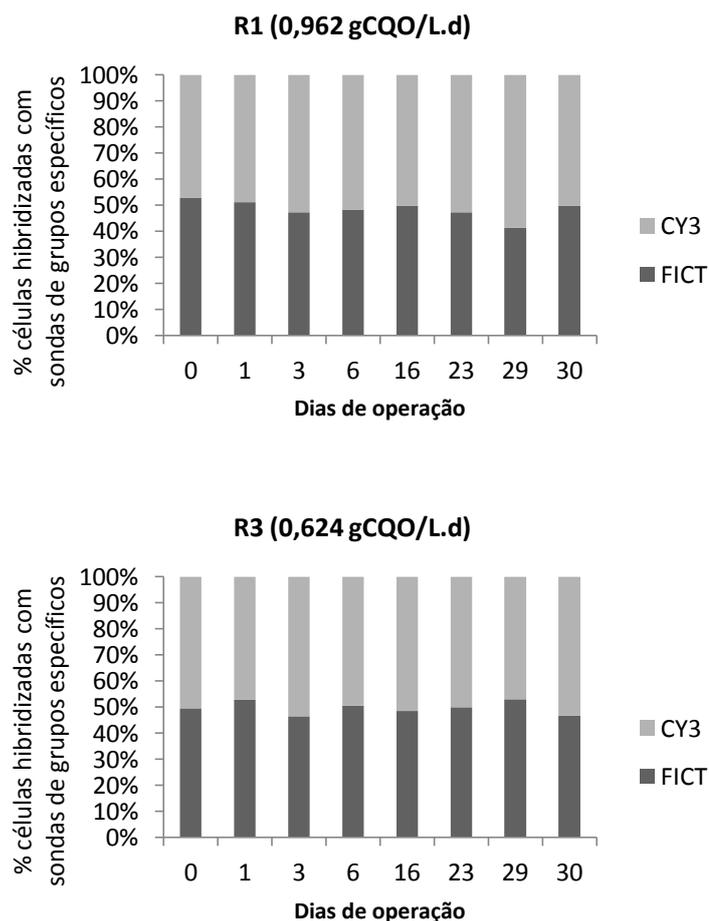


Figura 48 - Composição microbiana da biomassa anaeróbia presente nos reatores R1, R2 e R3 detetada com duas sondas específicas do domínio *Archaea* – CY3 e *Bacteria* – FICT.

De forma a avaliar se os resultados obtidos pelo método de FISH, para os reatores R1, R2 e R3, têm significado estatístico recorreu-se ao método dos mínimos quadrados. Foi avaliada a significância do declive dos resultados de FICT e CY3 para os reatores R1, R2 e R3 com um nível de confiança de 90 e 95%. Constatou-se para todos eles que o declive tem significância tanto para os resultados de FICT como para os resultados de CY3.

Os resultados da análise de significância podem ser verificados no Anexo I para todos os ensaios.

4.2. Efeito do caudal

4.2.1. Desempenho dos reatores UASB

Neste ensaio com a duração de 13 dias investigou-se o efeito do caudal no desempenho dos reatores anaeróbios, através da operação dos reatores R4 ($Q=1,25$ L/h), R5 ($Q=0,75$ L/h), R6 ($Q=0,25$ L/h) e ainda do R1 ($Q=0,5$ L/h). Foi utilizada a carga ótima encontrada no 1º ensaio (aproximadamente $1 \text{ g CQO}_{\text{total}} \cdot \text{L}^{-1}$).

Verifica-se pela Figura 49 que o reator R6 a operar com o menor caudal foi o reator com maior produção de metano, sobressaindo bastante dos outros reatores, que atingiu os 3 litros de CH_4 logo ao 2º dia de operação ultrapassando os 6 litros no final. O reator R5 ($Q=0,75$ L/h) foi o reator com menor produção de metano, não chegando a produzir 1L de metano em 13 dias de operação.

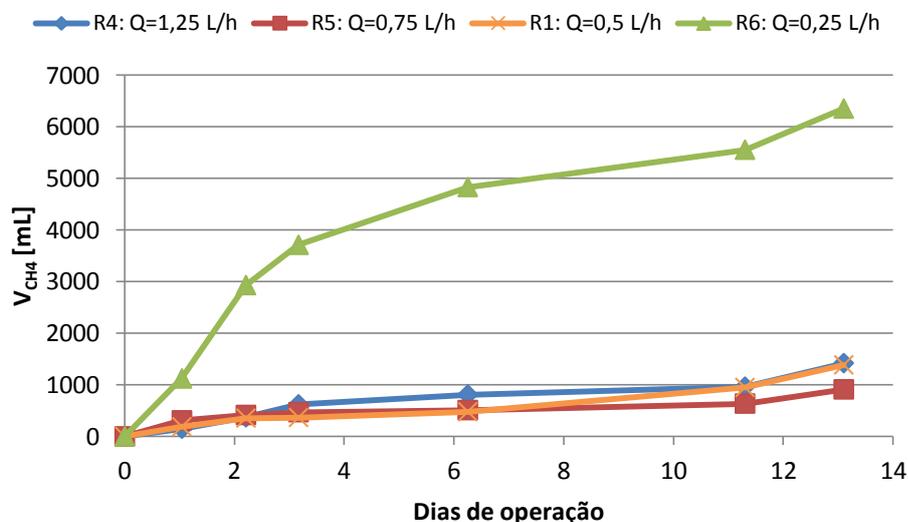


Figura 49 - Representação gráfica do volume de CH_4 cumulativo produzido pelos reatores R1, R4, R5 e R6 ao longo do tempo de operação.

A remoção de CQO pode observar-se na Figura 50 e verifica-se que os reatores R1, R4 e R5 ultrapassaram os 90% de remoção no final da operação. O reator R6 foi aquele onde se atingiu menor percentagem de CQO removido (83%), mas não muito abaixo dos restantes reatores. Este reator como referido anteriormente foi o que obteve uma maior produção de metano. Portanto, o caudal baixo prejudica a remoção de CQO mas é favorável à metanização.

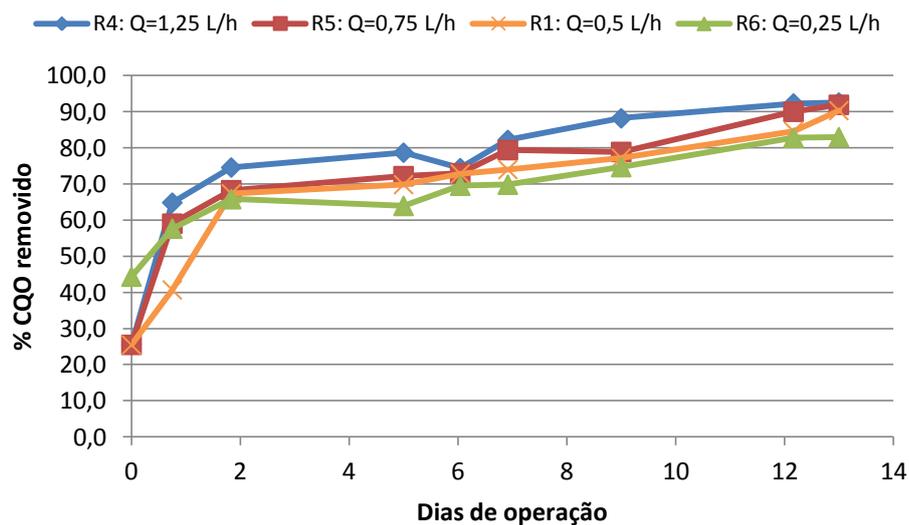


Figura 50 - Representação gráfica da remoção de CQO para os reatores R1, R4, R5 e R6 ao longo do tempo de operação.

A finalidade deste ensaio era verificar qual o efeito do caudal de recirculação no desempenho dos reatores, em termos de produção de metano e percentagem de remoção de CQO. Como se pode constatar o melhor resultado foi o do reator R6 com um caudal de 0,25 L/h que obteve no final da operação cerca do quintuplo da produção de metano em relação aos outros reatores R1, R4 e R5.

4.2.2. Estrutura da comunidade microbiana

Neste ensaio a monitorização microbiana foi feita durante 13 dias e foram recolhidas amostras nos dias 3, 7, 13.

As amostras foram sempre recolhidas do ponto 1 (Figura 12) em todos os reatores e quando possível analisadas logo após a sua colheita.

Reator 4 (1,25 L/h)

Pela observação visual direta da biomassa realizada durante a operação dos reatores pode constatar-se, tal como no 1º ensaio, que no início os microrganismos encontravam-se todos num emaranhado e no final da operação já se encontravam agregados em flocos.

Na Figura 51 pode verificar-se a evolução referida anteriormente nas microfotografias apresentadas, sendo bastante notória nas amostras recolhidas nos dias 7 e 13.

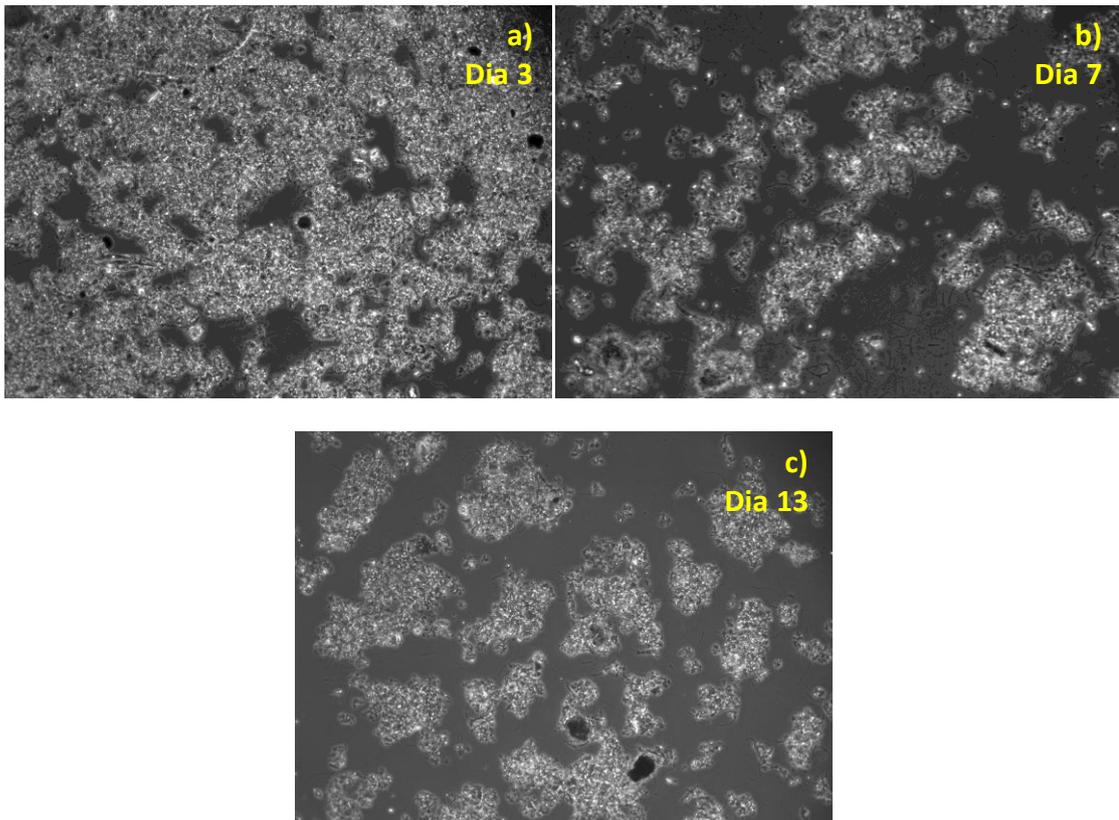


Figura 51 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R4, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação com ampliação (x100). **a)** Dia 3; **b)** Dia 7; **c)** Dia 13.

Foi detetada a presença de protozoários em todas as amostras retiradas do reator R1, que provavelmente provinham da alimentação, tal como se verificou no 1º ensaio.

Verificou-se a ausência de microrganismos/matéria suspensa em amostras recolhidas do ponto 4 (Figura 12) no dia 7, pelo que se pode deprender que o leito de lamas é eficiente na remoção de SST e também que a biomassa tem boas capacidades de sedimentação.

A presença/ausência de população metanogénica foi observada em todos os dias de amostragem, e em todos eles se verificou a presença de fluorescência metanogénica. Os pontos mais fluorescentes encontram-se no interior dos flocos, tendo a fluorescência metanogénica sido mais intensa nos dias 3 e 7, como se pode ver pelas microfotografias da Figura 52.

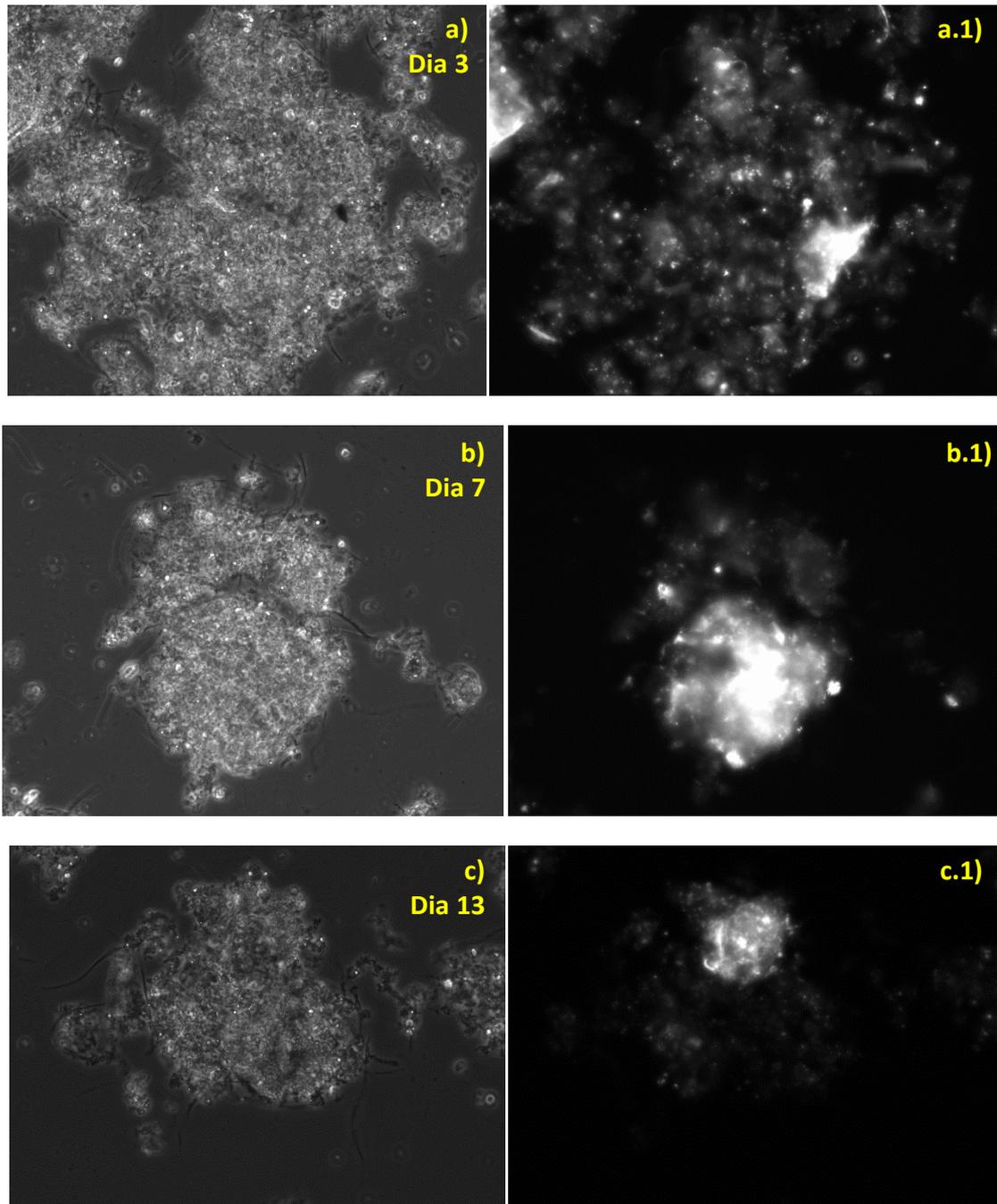


Figura 52 - Microfotografias de flocos (a; b; c) e respectivas fluorescências metanogénicas (a.1; b.1; c.1) de amostras retiradas do reator R4, ponto 1, em diferentes dias de operação. **a)** Dia 3: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400); **b)** Dia 7: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400); **c)** Dia 13: amostra sem diluição (x400).

Pela Figura 53 a) pode constatar-se que a produção diária de metano pelo reator R4 teve tendência crescente ao longo do tempo. Na observação da população microbiana verificou-se que no dia 3 a fluorescência metanogénica foi intensa tendo diminuído gradualmente ao longo do tempo de operação, não concordando com a produção diária de metano.

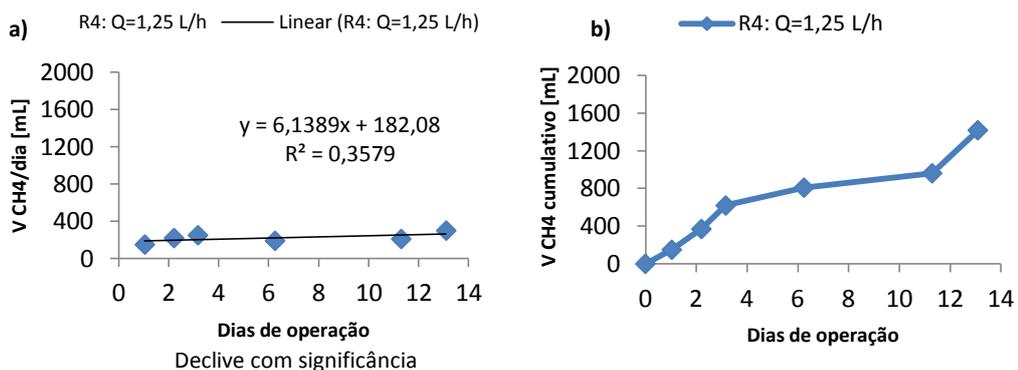


Figura 53 - a) Produção diária de metano e **b)** volume de metano cumulativo produzido pelo reator R4 ao longo do tempo de operação.

Relativamente aos resultados da coloração de *Gram* do último dia de operação, apontaram sempre para uma maioria de população *Gram* negativa. A presença de bactérias *Gram* positivas foi detetada dentro dos flocos (Figura 54), aparecendo corados de roxo no seu interior e na sua área envolvente a vermelho (*Gram* negativas).

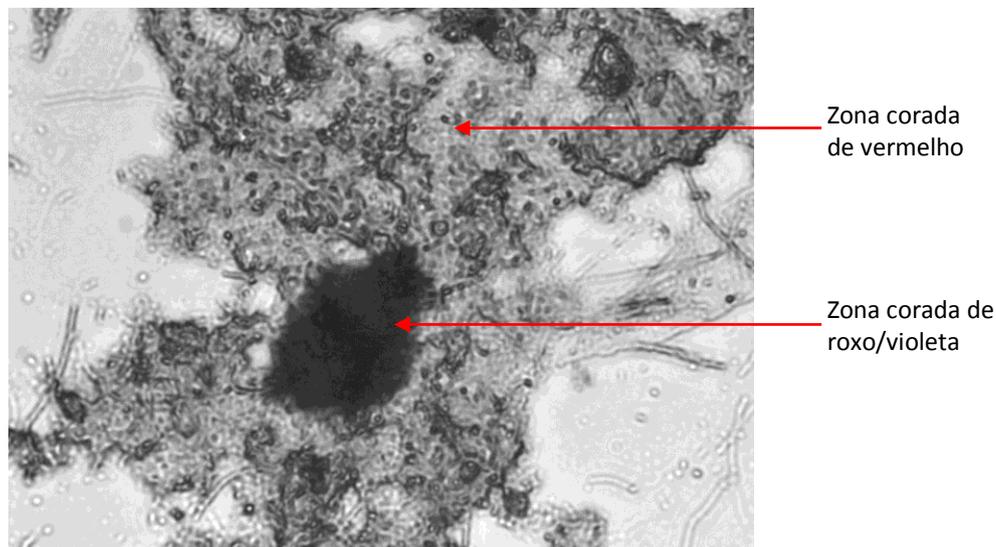


Figura 54 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R4 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)

Reator 5 (0,75 L/h)

No caso do reator R5 no início a população microbiana estava muito menos densa que no final da operação, o contrário precisamente do que foi verificado nos restantes reatores. A

formação de flocos não foi evidente, tendo sido sempre encontrados flocos bastante irregulares. Na Figura 55 pode verificar-se nas microfotografias apresentadas o referido anteriormente.

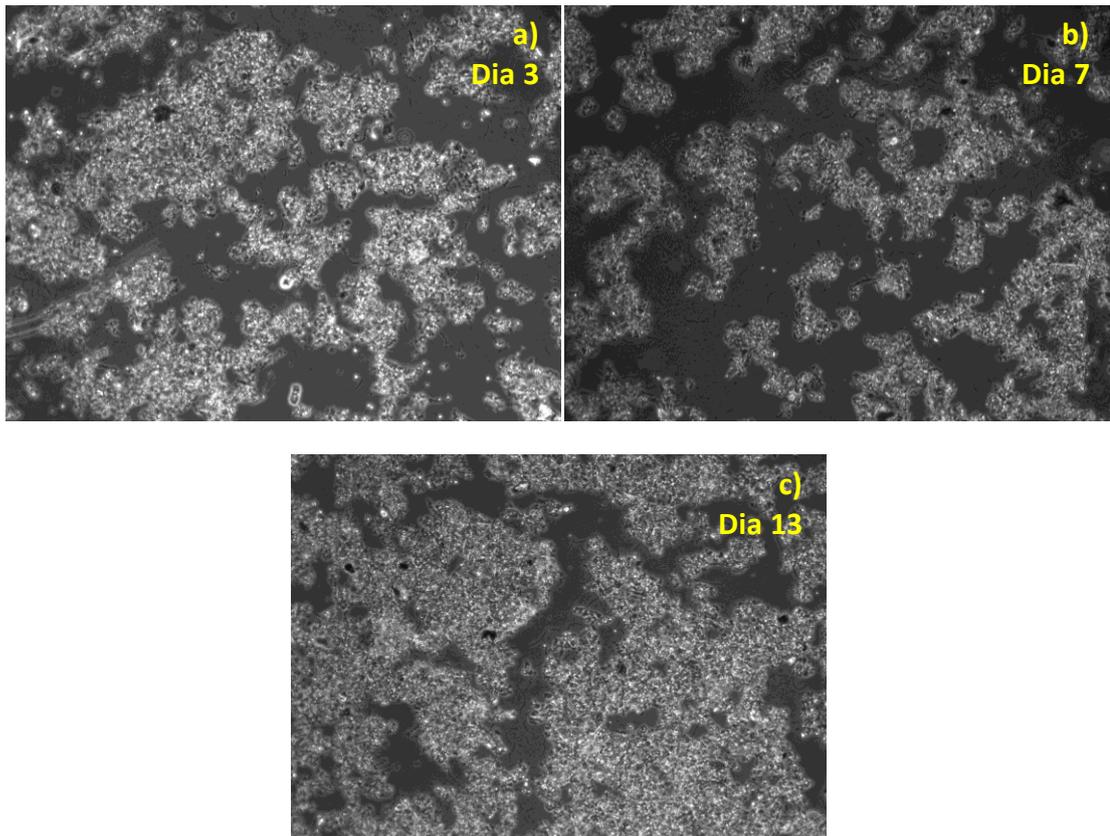
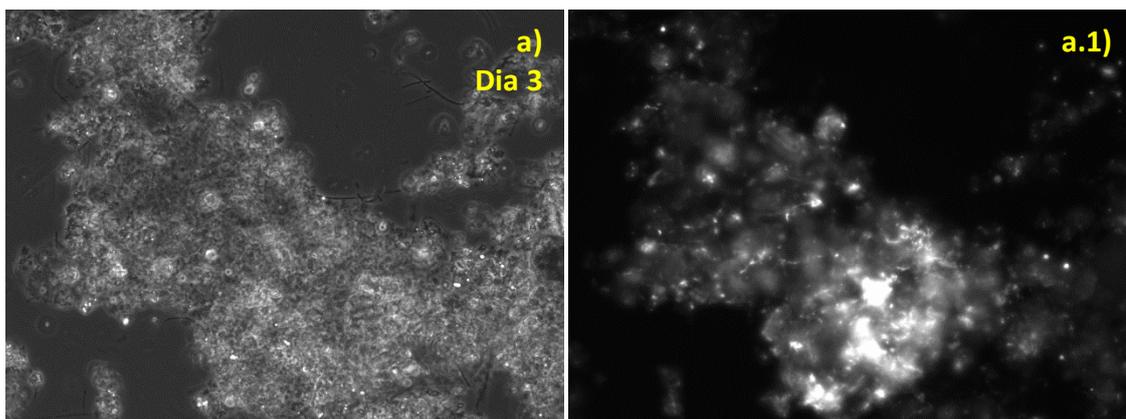


Figura 55 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R5, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação, com ampliação (x100). **a)** Dia 3; **b)** Dia 7; **c)** Dia 13.

Quanto à presença de população metanogénica, essa foi sempre detetada em todos os dias de amostragem, tendo sido mais intensa no dia 3. Na Figura 56 estão microfotografias retiradas às amostras analisadas e a respetiva fluorescência.



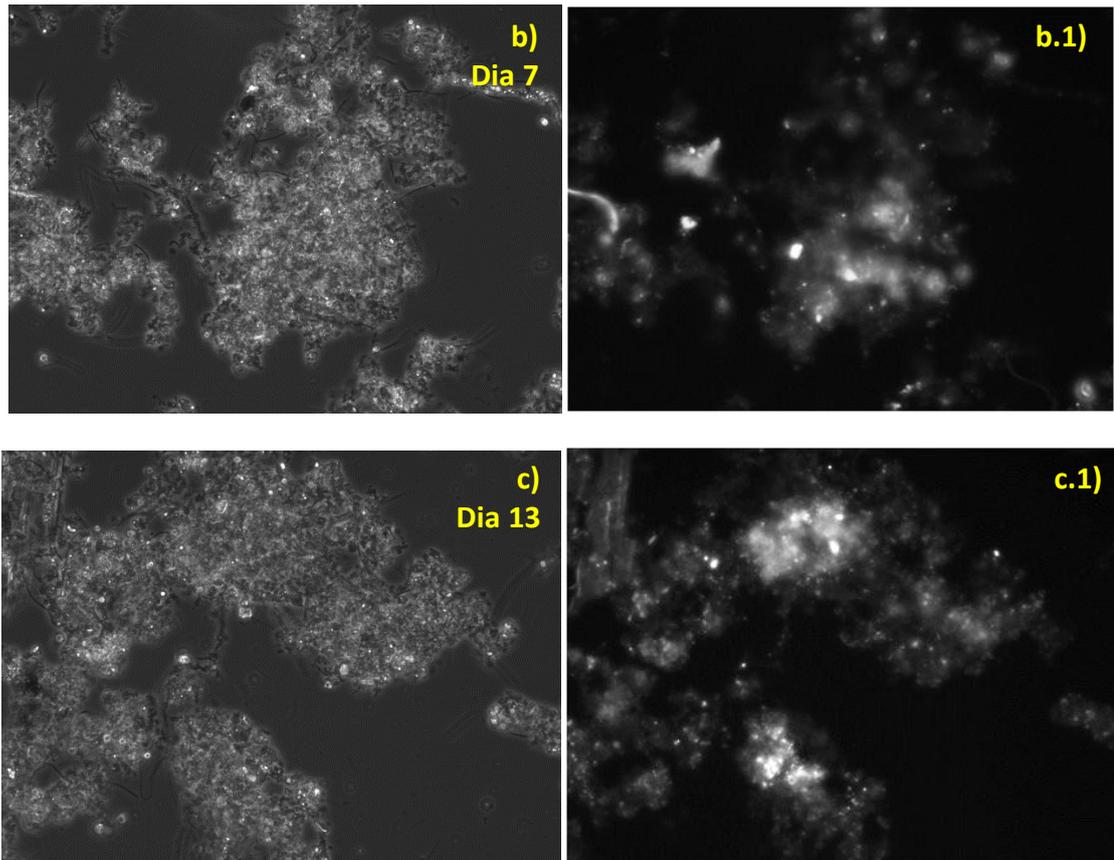


Figura 56 - Microfotografias de flocos (**a**; **b**; **c**) e respectivas fluorescências metanogénicas (**a.1**; **b.1**; **c.1**) de amostras retiradas do reator R5, ponto 1, em diferentes dias de operação. **a)** Dia 3: amostra sem diluição (x400); **b)** Dia 7: amostra sem diluição (x400); **c)** Dia 13: amostra diluída na proporção de 1:1 (x400).

Na Figura 57 a) pode ver-se que a produção diária de metano foi maior no início da operação e bastante reduzida a partir do 3º dia, tendo uma tendência decrescente. Na observação de fluorescência metanogénica (Figura 56) verificou-se que esta foi mais intensa na primeira análise (3º dia) diminuindo gradualmente ao longo do tempo de operação concordando com a produção diária de metano.

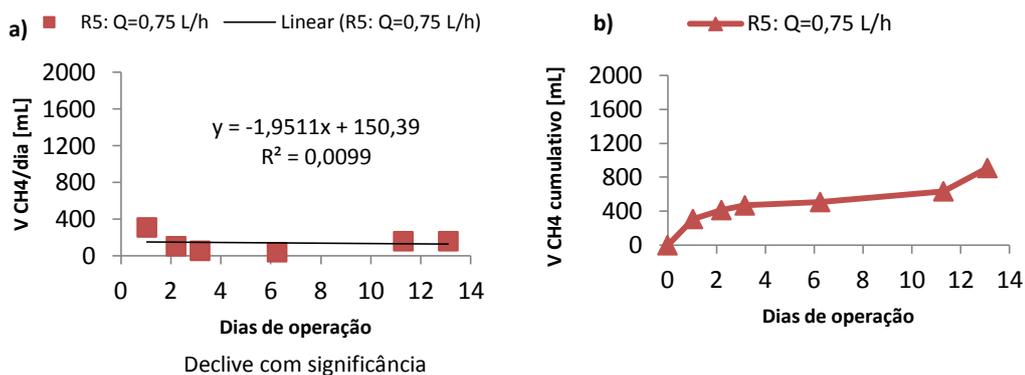


Figura 57 - a) Produção diária de metano e b) volume de metano cumulativo produzido pelo reator R5 ao longo do tempo de operação.

Quanto aos resultados da coloração de *Gram* do último dia de operação, estes indicaram sempre uma maioria de população *Gram* negativa. A presença de bactérias *Gram* positivas foi detetada dentro dos flocos (Figura 58), aparecendo corados de roxo no seu interior na sua área envolvente a vermelho (*Gram* negativas).

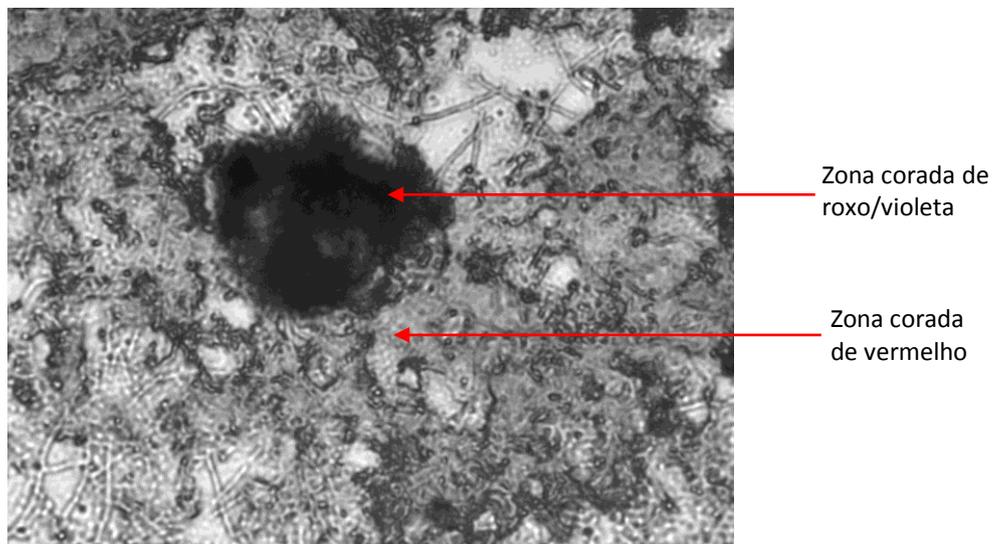


Figura 58 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R5 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)

Reator 6 (0,25 L/h; T=35°C; pH=7,5)

Pela observação visual direta do reator R6 foi possível notar uma boa formação de flocos sendo que no final da operação (13º dia) já se observavam flocos bem definidos. Na Figura 59 pode verificar-se nas microfotografias apresentadas a evolução referida anteriormente.

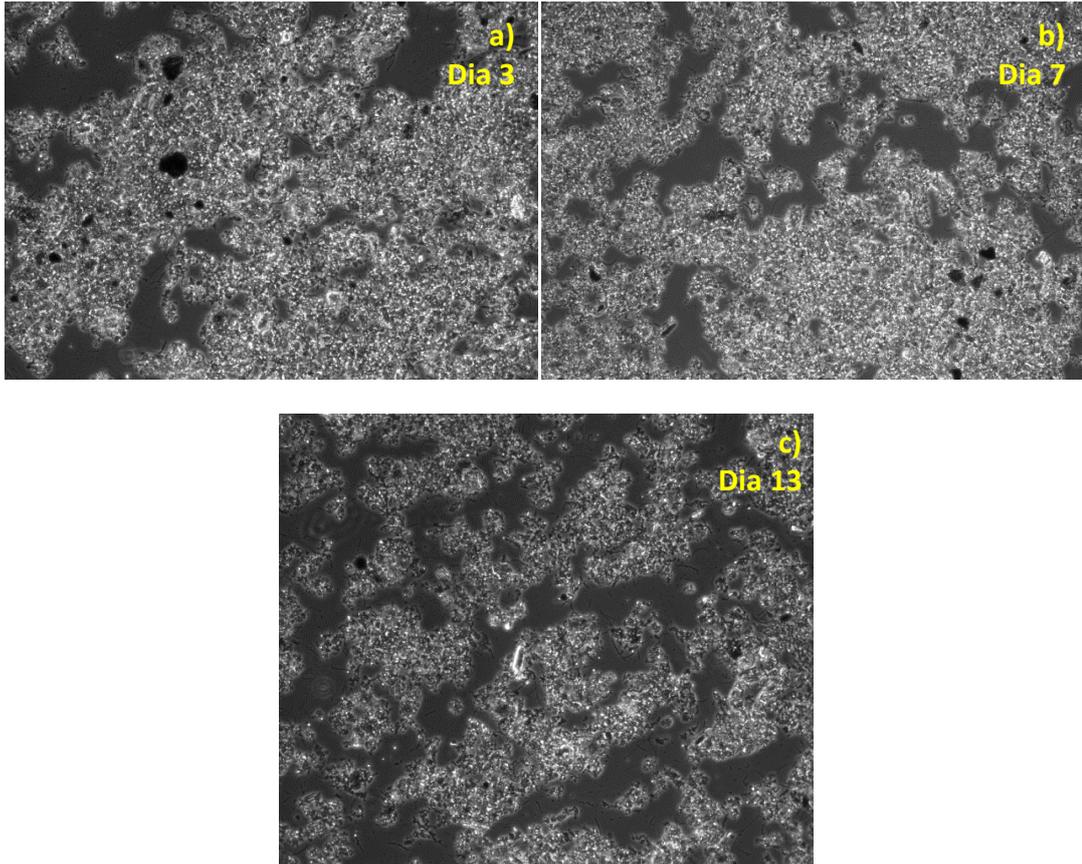
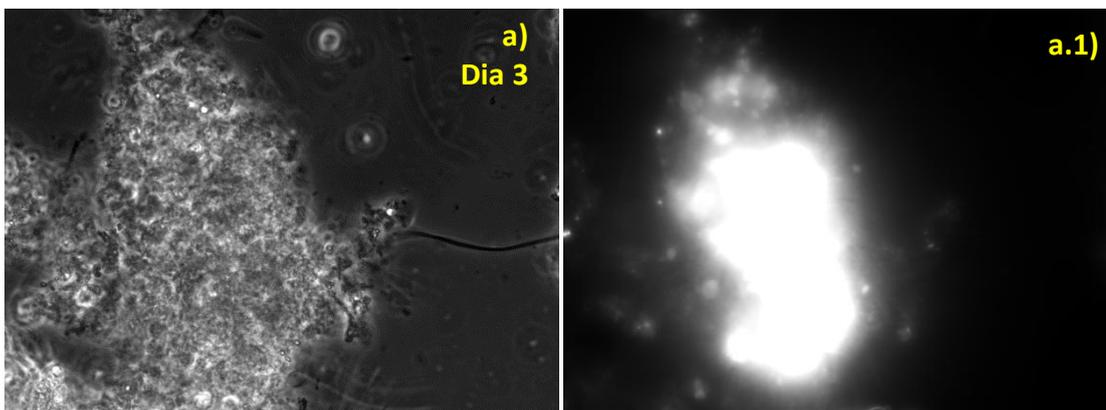


Figura 59 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R6, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação, com ampliação (x100). **a)** Dia 3; **b)** Dia 7; **c)** Dia 13.

Relativamente à presença de população metanogénica esta foi analisada em todos os dias de amostragem, e como se pode verificar nas microfotografias da Figura 60, a fluorescência metanogénica foi bastante intensa ao longo do tempo de operação, contudo verificou-se uma diminuição dessa intensidade ao longo do tempo.



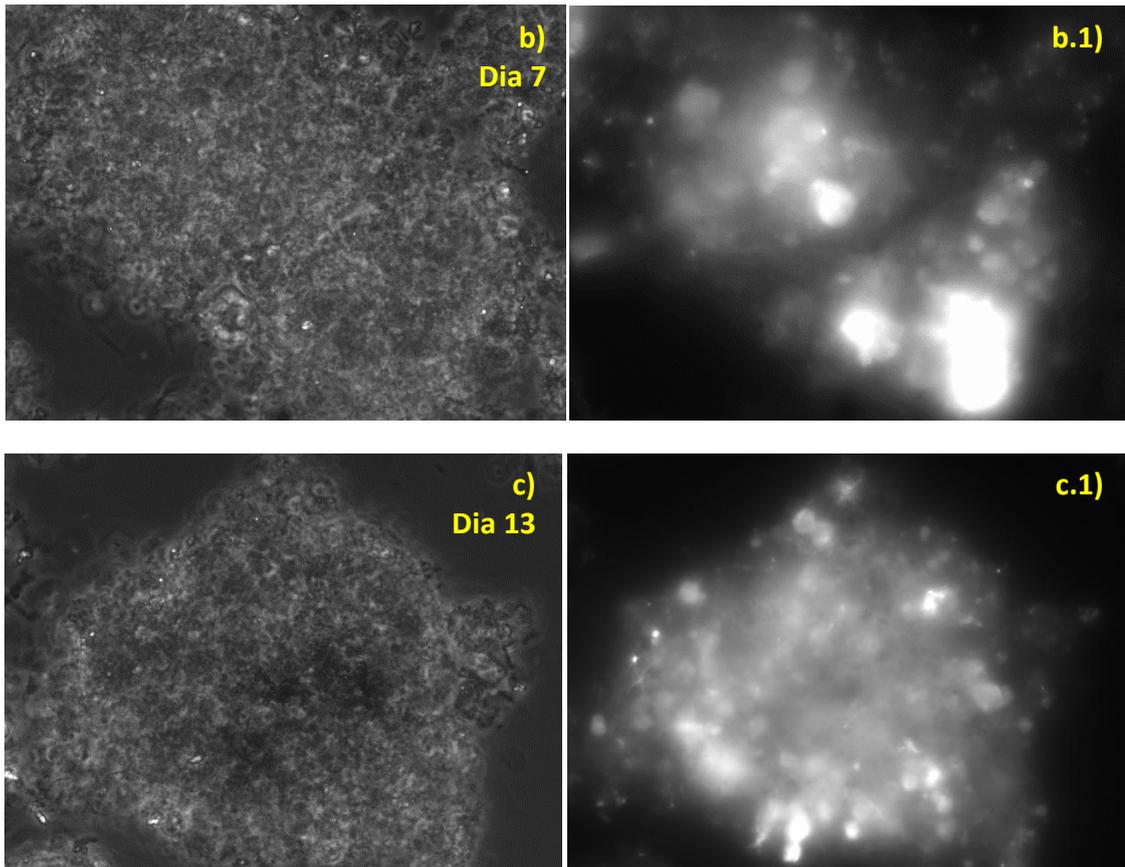


Figura 60 - Microfotografias de flocos (**a**; **b**; **c**) e respectivas fluorescências metanogénicas (**a.1**; **b.1**; **c.1**) de amostras retiradas do reator R6, ponto 1, em diferentes dias de operação todas diluídas na proporção de 1:1. **a**) Dia 3: (x1000); **b**) Dia 7: (x1000); **c**) Dia 13: (x1000).

Pela Figura 61 a) pode ver-se que a produção diária de metano atingiu o seu máximo ao segundo dia de operação, sendo que a partir daí a produção de metano veio quase sempre a diminuir. Este resultado está em sintonia com a observação da fluorescência metanogénica já que se verificou uma fluorescência metanogénica bastante intensa na primeira observação (3º dia), tendo vindo sempre a diminuir de intensidade ao longo do tempo.

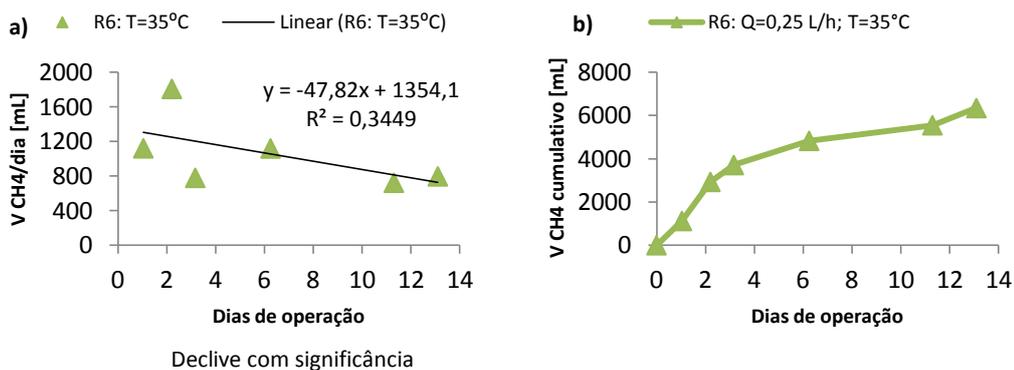


Figura 61 - a) Produção diária de metano e **b)** volume de metano cumulativo produzido pelo reator R6 ao longo do tempo de operação.

Em relação aos resultados da coloração de *Gram* do último dia de operação, estes mostraram que a população era maioritariamente *Gram* negativa. A presença de bactérias *Gram* positivas foi detetada dentro dos flocos (Figura 62), aparecendo coradas de roxo no seu interior e na sua área envolvente a vermelho (*Gram* negativas).

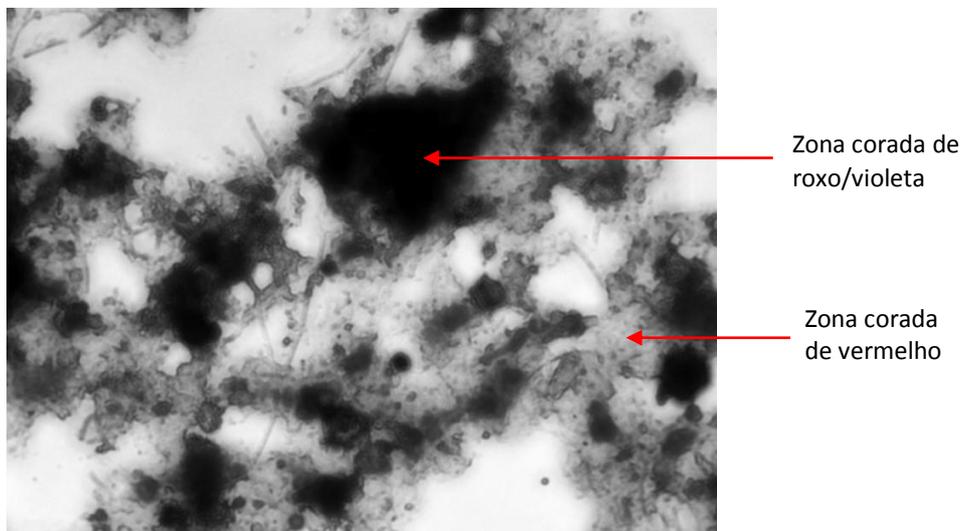


Figura 62 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R6 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)

4.2.3. Resultados do método de FISH

No estudo do efeito do caudal podem verificar-se na Figura 63 os resultados da abundância relativa de *Archaea* e *Bacteria* obtidos através do método de FISH, das amostras retiradas nos reatores R4, R5, R6 e R1.

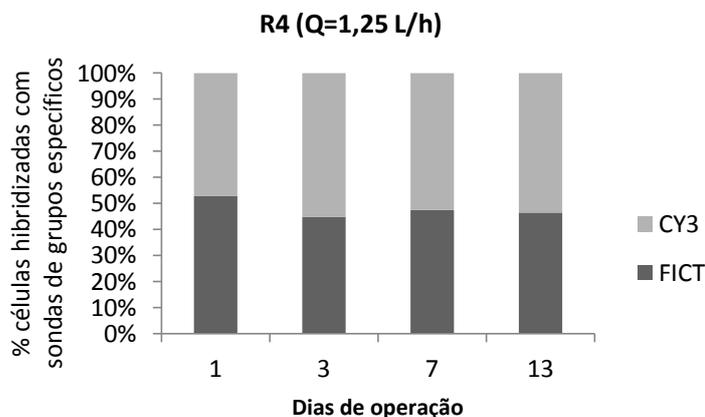
Pode constatar-se nas amostras retiradas do reator R4 ($Q=1,75$ L/h) que no final da operação a população *Archaea* era superior à população *Bacteria* e que houve um acréscimo da população *Archaea* no final, em relação à amostra inicial de biomassa, de cerca de 9,3%. Estes resultados coincidem com os resultados de produção diária de metano pelo reator R4 que pela Figura 53 aumentou ao longo do tempo.

No reator R5 ($Q=0,75$ L/h) os resultados do método de FISH indicam que a população *Archaea* aumentou cerca de 5,4%, mas no final esta era inferior à população de *Bacteria*. Os resultados da produção diária de metano (Figura 57) apontam para uma diminuição da produção ao longo da operação, não coincidindo com os resultados de FISH.

Os resultados do reator R1 ($Q=0,5$ L/h) demonstram que a população de *Archaea* aumentou em relação à população de *Bacteria* e que também aumentou a produção diária de metano (Figura 41).

Quanto ao reator R6 ($Q=0,25$ L/h) pode ver-se na Figura 63 que a população de *Archaea* se manteve na mesma percentagem no início e no final. Contudo, a população de *Archaea* foi sempre superior à população de *Bacteria* durante o tempo de operação. De notar que os valores iniciais de abundância de FICT e CY3 neste reator e nos restantes reatores usados para avaliar o efeito da temperatura (R6, R7 e R8) não correspondem aos valores reais, já que houve uma repetição desse ensaio e os valores apresentados não são aqueles correspondentes às lamas usadas. Daí poder haver discrepância entre os resultados de FISH e produção diária de metano.

Como se verifica na Figura 49 este foi o reator que mais produziu metano evidenciando-se bastante dos outros reatores. Na Figura 61 através da regressão linear pode ver-se que a produção diária de metano teve tendência a diminuir ao longo do tempo.



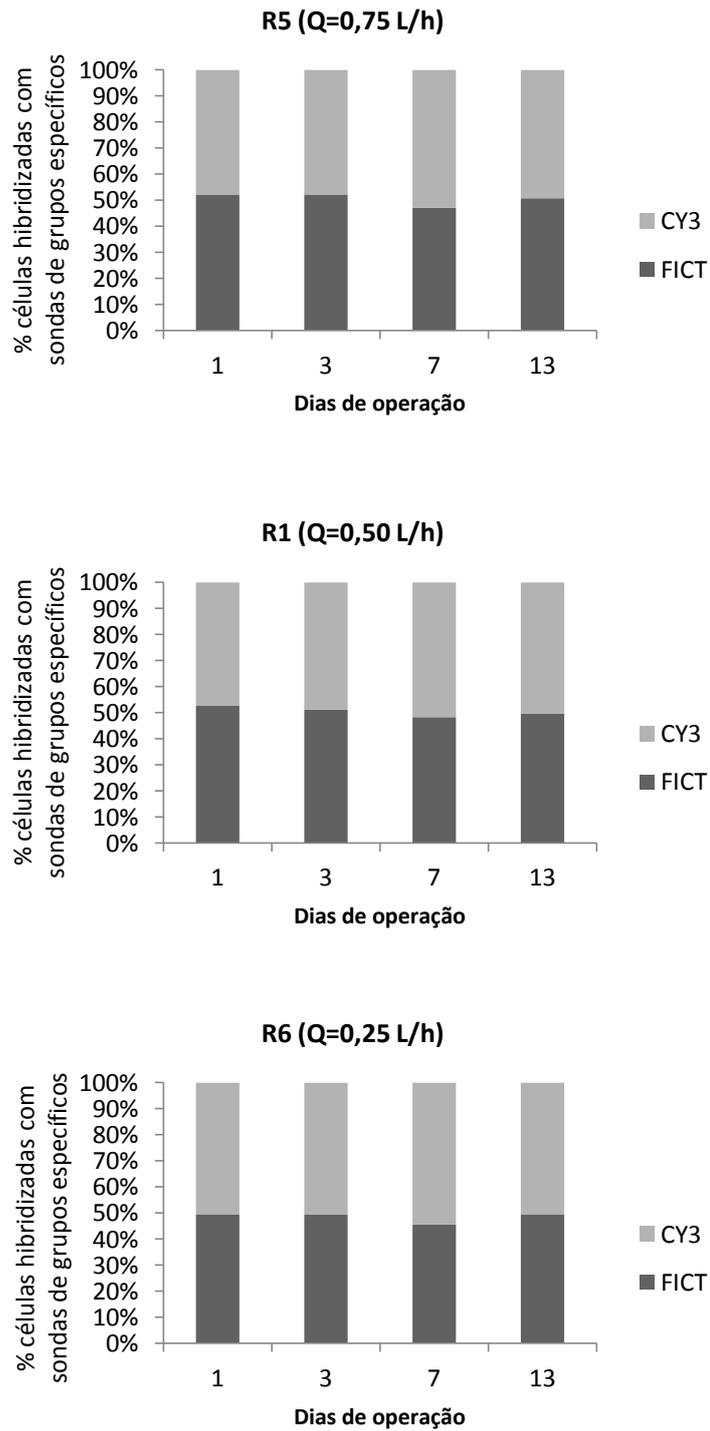


Figura 63 - Composição microbiana da biomassa anaeróbia presente nos reatores R1, R4, R5 e R6 detetada com duas sondas específicas do domínio *Archaea* – CY3 e *Bacteria* – FICT.

4.3. Efeito da temperatura e do pH

4.3.1. Desempenho dos reatores UASB

Pela Figura 64 verifica-se que o reator que apresentou maior produção de metano foi o reator R6 a operar a 35 °C. O reator R8 (T=45°C) teve um comportamento idêntico ao reator R6 apesar de ter produzido um pouco menos de metano. O que apresentou menor produção de CH₄ foi o reator R7 a operar a 55 °C.

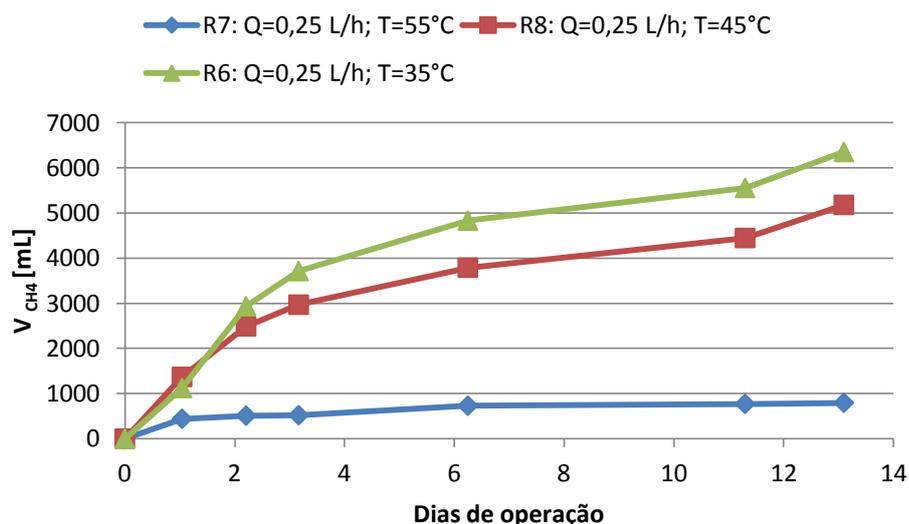


Figura 64 - Representação gráfica do volume de CH₄ cumulativo produzido pelos reatores R6, R7 e R8 a operar a diferentes temperaturas ao longo do tempo de operação.

Comparando a produção de metano obtida por dois reatores (R6 e R9) a operar à mesma temperatura, caudal, carga orgânica e pH diferentes (Figura 65), pode verificar-se um comportamento idêntico na produção de metano, ou seja, houve sempre um aumento de produção de metano semelhante entre ambos, mas o reator R6 teve sempre uma produção superior, atingindo no final o triplo da produção do reator R9.

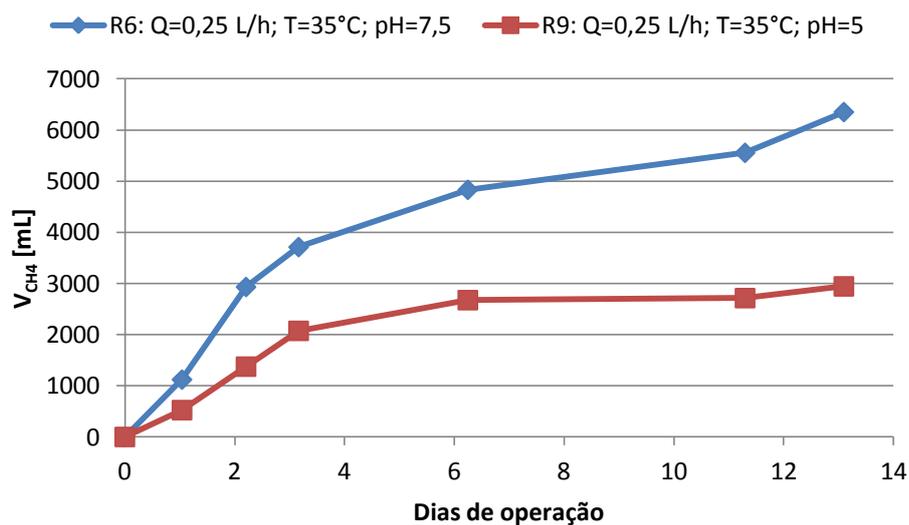


Figura 65 - Representação gráfica do volume de CH_4 cumulativo produzido pelos reatores R6 e R9 a operar a pH diferentes e temperatura iguais ao longo do tempo de operação.

De acordo com a Figura 66 pode verificar-se que os reatores R6 e R8 tiveram uma evolução em termos de percentagem de remoção de CQO muito semelhante, atingindo no final valores idênticos de cerca de 82%. O reator R7 foi aquele em que a remoção de CQO não foi tão linear e no final ficou pelos 73% de remoção.

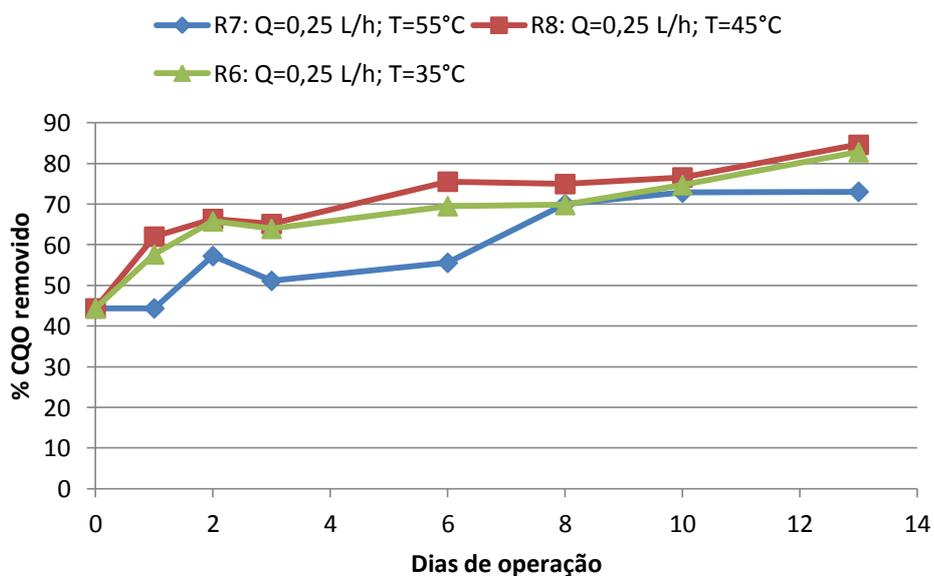


Figura 66 - Representação gráfica da remoção de CQO para os reatores R6, R7 e R8 a operar a diferentes temperaturas ao longo do tempo de operação.

Na Figura 67 com a representação da remoção de CQO com dois reatores a operar a pH diferentes constata-se que a remoção foi mais rápida no reator R9 (pH=5), mas os dois reatores comportaram-se de forma semelhante e no final obtiveram 83% de remoção.

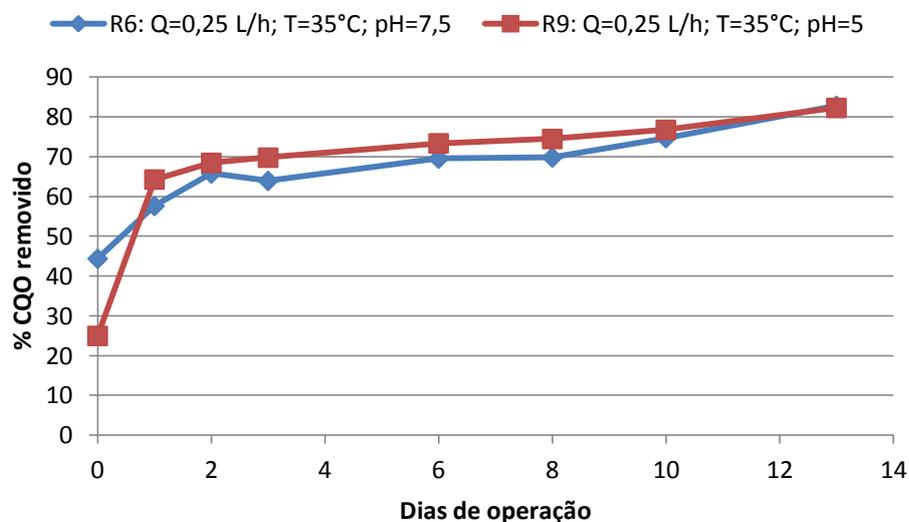


Figura 67 - Representação gráfica da remoção de CQO para os reatores R6 e R9 a operar a pH diferentes e temperatura iguais ao longo do tempo de operação.

O objetivo deste ensaio era investigar qual o efeito da temperatura na degradação do efluente em estudo, mantendo o caudal e carga orgânica iguais em todos os reatores. Como se pode constatar o melhor resultado foi o reator R6 que operou com uma temperatura de 35 °C. Os resultados do reator R7 (55 °C) foram bastante menos produtivos. E também verificar o efeito do pH mantendo a temperatura e restantes condições iguais, sendo que o reator R6 (pH=7,5) obteve uma produção de metano superior ao reator R9 (pH=5).

4.3.2. Estrutura da comunidade microbiana

Neste ensaio o tempo de operação foi de 13 dias e foram recolhidas amostras nos dias 3, 7 e 13 de operação. Pretendia-se observar a adaptação da população microbiana a diferentes temperaturas. As amostras foram sempre recolhidas do ponto 1 (Figura 12) em todos os reatores e quando possível analisadas logo após a sua colheita.

Reator R8 (T=45°C)

No reator R8 através da observação direta verificou-se que a população se agregou em flocos (Figura 68 c)). Não foi detetada a presença de protozoários em nenhum dia de operação. Na Figura 68 pode verificar-se nas microfotografias apresentadas o referido anteriormente.

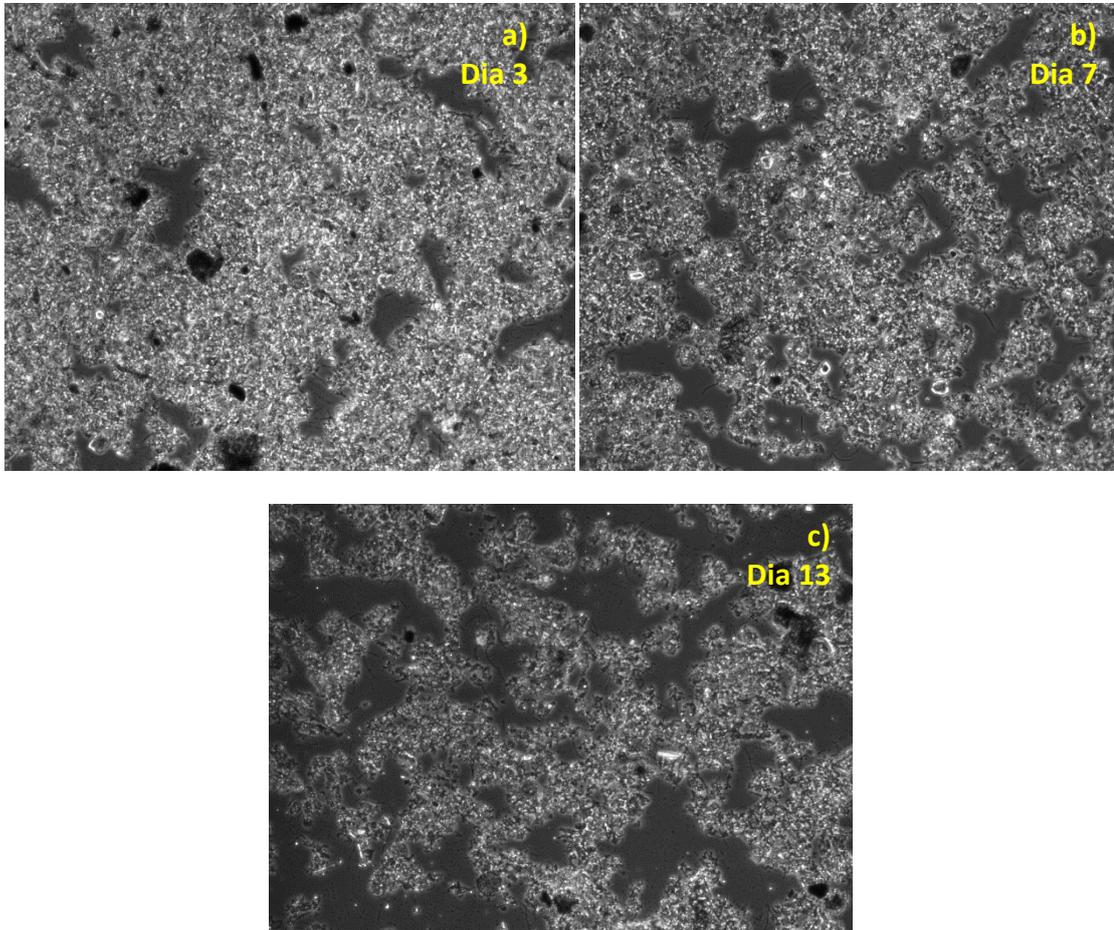


Figura 68 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R8, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação com ampliação (x100). **a)** Dia 3; **b)** Dia 7; **c)** Dia 13.

A presença de fluorescência metanogénica foi avaliada em todos os dias de amostragem, e em todos eles se verificou a sua presença. Pelas microfotografias da Figura 69 verifica-se que a fluorescência metanogénica no primeiro dia de operação foi intensa tendo diminuído ligeiramente a intensidade nos restantes dias, mas de uma maneira geral foi sempre bastante intensa.

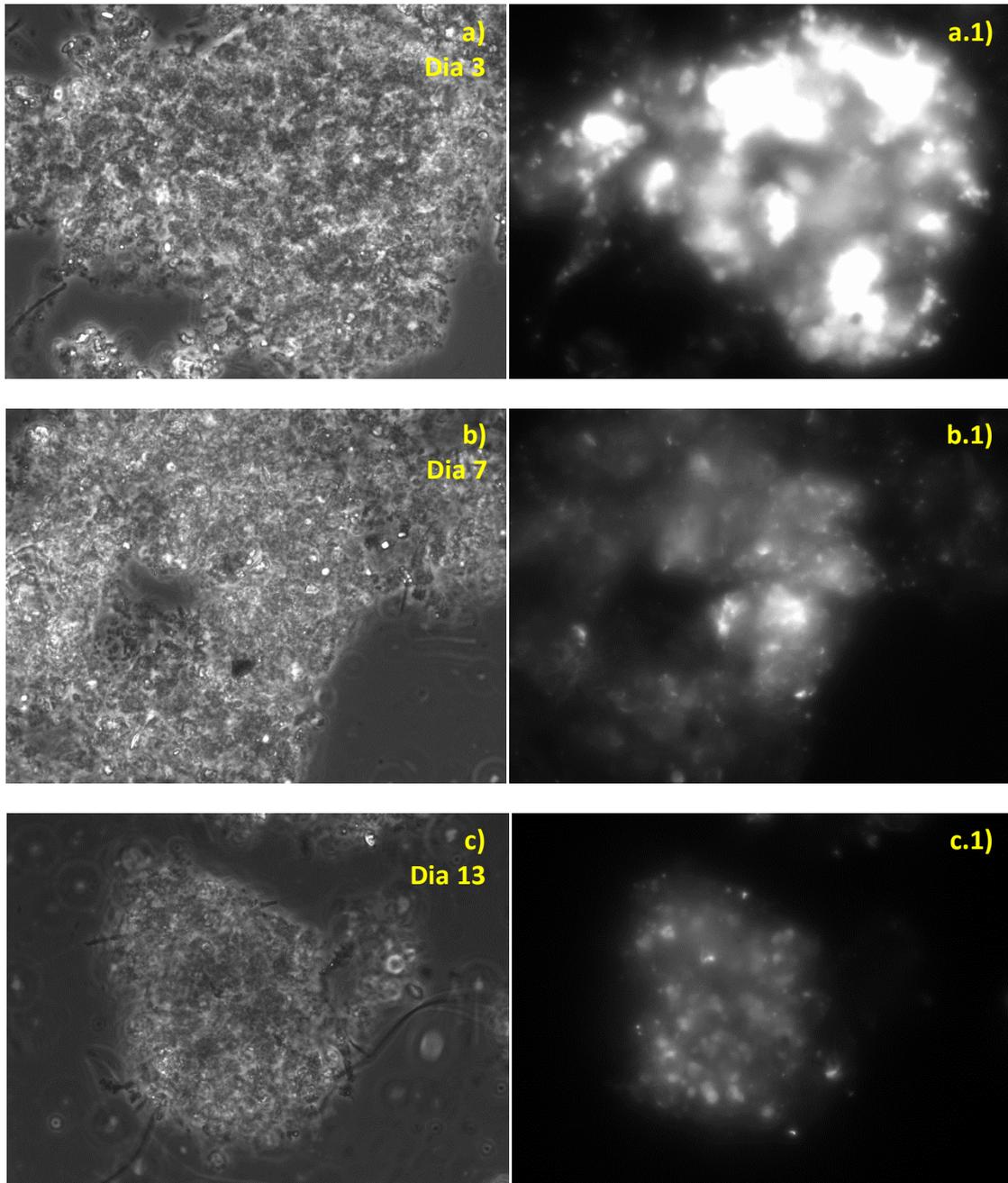


Figura 69 - Microfotografias de flocos (**a**; **b**; **c**) e respectivas fluorescências metanogénicas (**a.1**; **b.1**; **c.1**) de amostras retiradas do reator R8, ponto 1, em diferentes dias de operação todas diluídas na proporção de 1:1. **a)** Dia 3: (x1000); **b)** Dia 7: (x1000); **c)** Dia 13: (x1000).

Pode confirmar-se pela Figura 70 a) que a produção diária de metano pelo reator R8 teve bastantes oscilações, tendo um máximo no 1º dia de operação, um mínimo no 3º dia e a partir daqui manteve a sua produção mais ou menos constante. Pela observação da fluorescência metanogénica verificou-se que no 3º dia a fluorescência era bastante intensa, tendo vindo a

diminuir ligeiramente de intensidade ao longo do tempo de operação, coincidindo com a tendência decrescente da produção diária de metano.

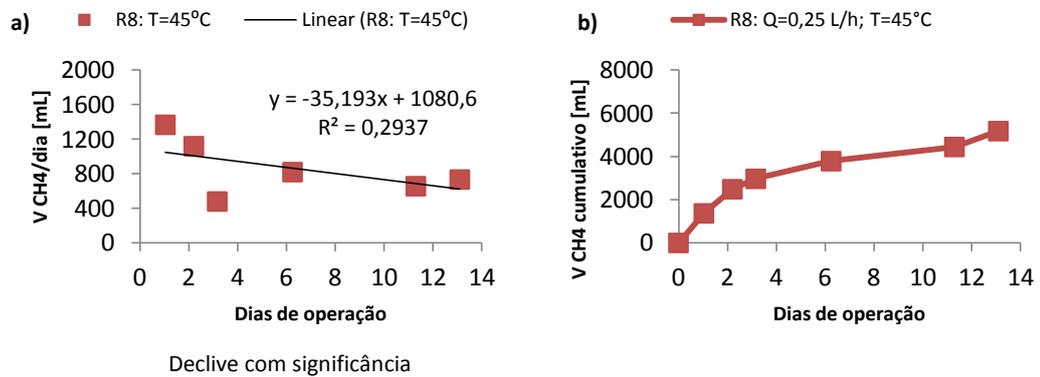


Figura 70 - a) Produção diária de metano e **b)** volume de metano cumulativo produzido pelo reator R8 ao longo do tempo de operação.

Aplicada a coloração de *Gram* a população apresentou-se maioritariamente *Gram* negativa aparecendo apenas bactérias *Gram* positivas no interior dos flocos (Figura 71).

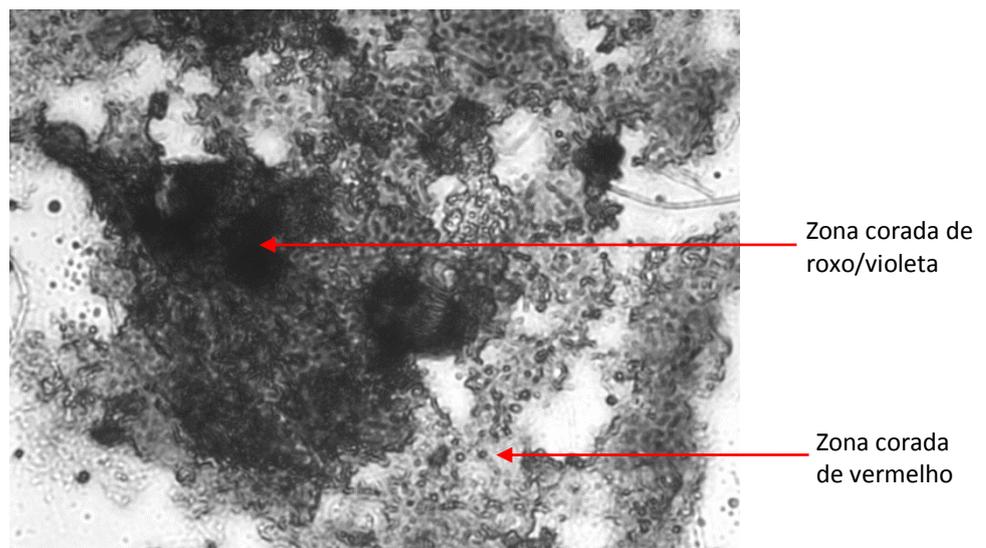


Figura 71 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R8 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)

Reator R7 (T=55°C)

Pela observação visual direta verificou-se que a população não se agregou em flocos tão evidentemente como nos reatores R6 e R8. No final da operação apenas se notou a presença de alguns flocos bem definidos. Não foi detetada a presença de protozoários em nenhum dia de operação. Na Figura 72 pode verificar-se nas microfotografias apresentadas o referido anteriormente.

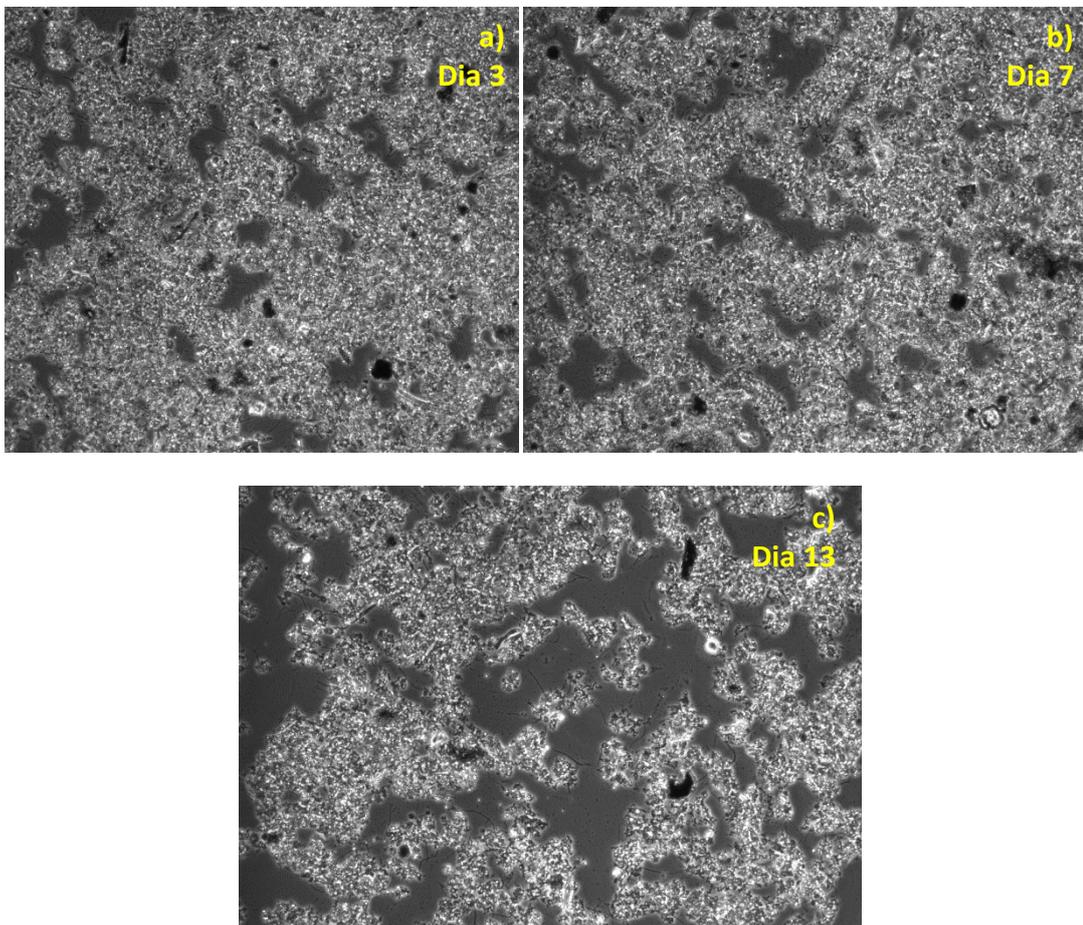


Figura 72 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R7, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação com ampliação (x100). **a)** Dia 3; **b)** Dia 7; **c)** Dia 13.

A presença de fluorescência metanogénica foi observada em todos os dias de amostragem, e em todos eles se verificou a sua presença. Como se verifica pelas microfotografias da Figura 73 a intensidade de fluorescência metanogénica foi bastante fraca em todos os dias de operação, evidenciando o facto das temperaturas elevadas serem prejudiciais à atividade dos microrganismos *archaea* metanogénicos.

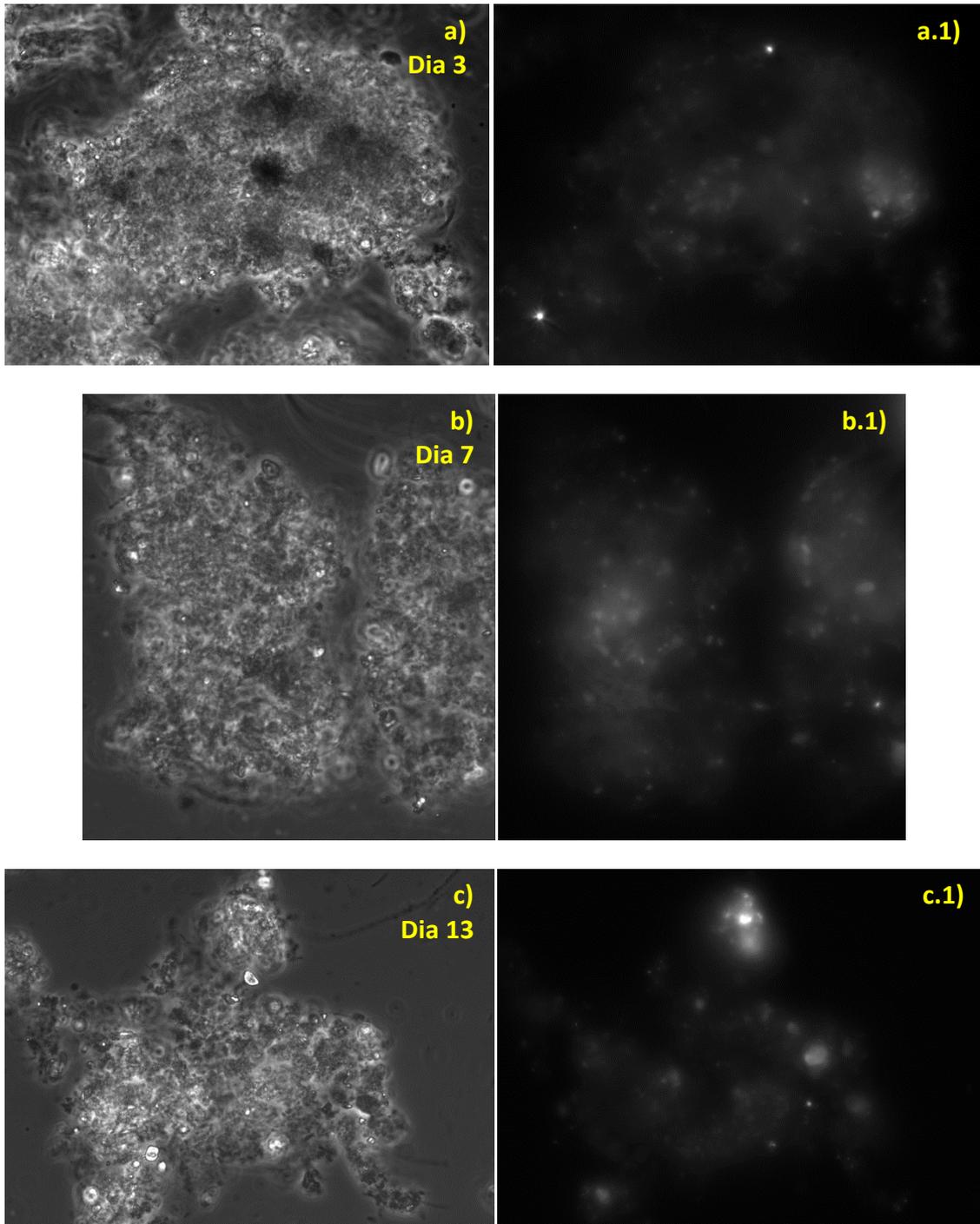


Figura 73 - Microfotografias de flocos (**a**; **b**; **c**; **d**) e respectivas fluorescências metanogénicas (**a.1**; **b.1**; **c.1**) de amostras retiradas do reator R7, ponto 1, em diferentes dias de operação todas as amostras diluídas na proporção de 1:1. **a)** Dia 3: (x1000); **b)** Dia 7: (x1000); **c)** Dia 13: (x1000).

Pela Figura 74 a) verifica-se que a produção diária de metano pelo reator R7 foi bastante fraca atingindo o seu máximo ao 1º dia, mas depois veio quase sempre a diminuir ao longo do tempo. Comparando com a observação da fluorescência metanogénica os resultados coincidem já

que nos dias em que foi verificada (3º, 7º e 13º dias), a fluorescência metanogénica foi bastante fraca concordando com a tendência decrescente da produção diária de metano.

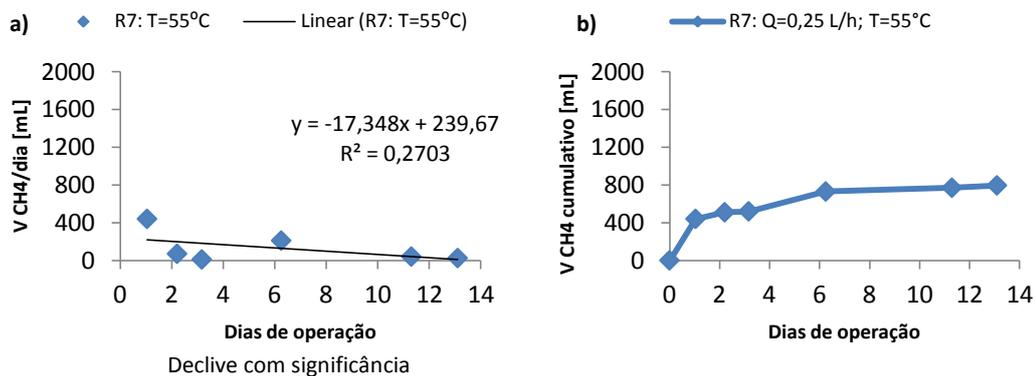


Figura 74 - a) Produção diária de metano e **b)** volume de metano cumulativo produzido pelo reator R7 ao longo do tempo de operação.

Após a aplicação da coloração de *Gram* e tal como nos restantes reatores, a população apresentou-se maioritariamente *Gram* negativa aparecendo apenas bactérias *Gram* positivas no interior dos flocos (Figura 75).

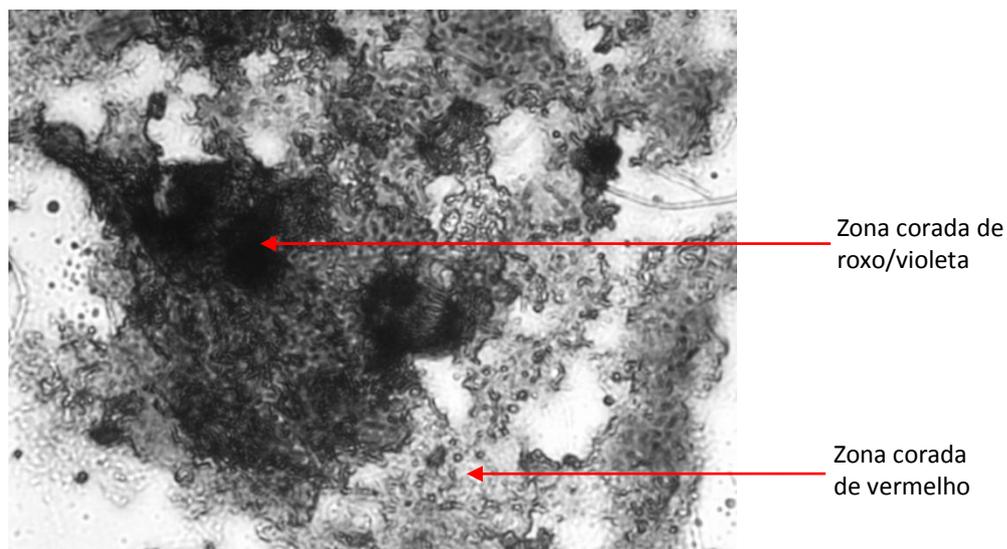


Figura 75 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R7 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)

Reator R9 (pH=5)

Pela observação visual direta verificou-se que a população se definiu em flocos mas não muito bem definidos como ocorreu noutros reatores. Foi detetada a presença de protozoários no último dia de operação. Na Figura 76 pode verificar-se nas microfotografias apresentadas o referido anteriormente.

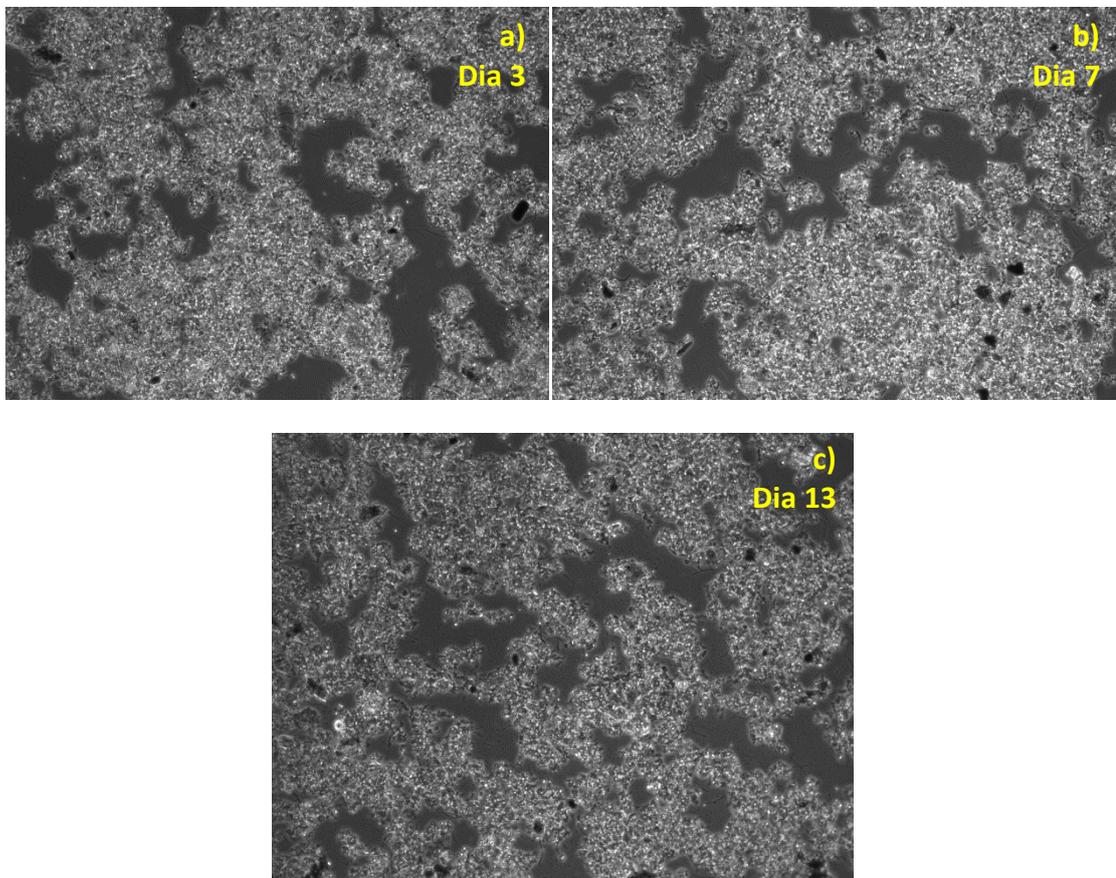


Figura 76 - Microfotografias de amostras retiradas e analisadas do reator R9, ponto 1, sem diluição, em diferentes dias de operação com ampliação (x100). **a)** Dia 3; **b)** Dia 7; **c)** Dia 13.

A presença de fluorescência metanogénica foi observada em todos os dias de amostragem, e em todos eles se verificou a sua presença. Como se verifica pelas microfotografias da Figura 77 no dia 3 a fluorescência metanogénica foi bastante intensa, diminuindo gradualmente ao longo do tempo de operação.

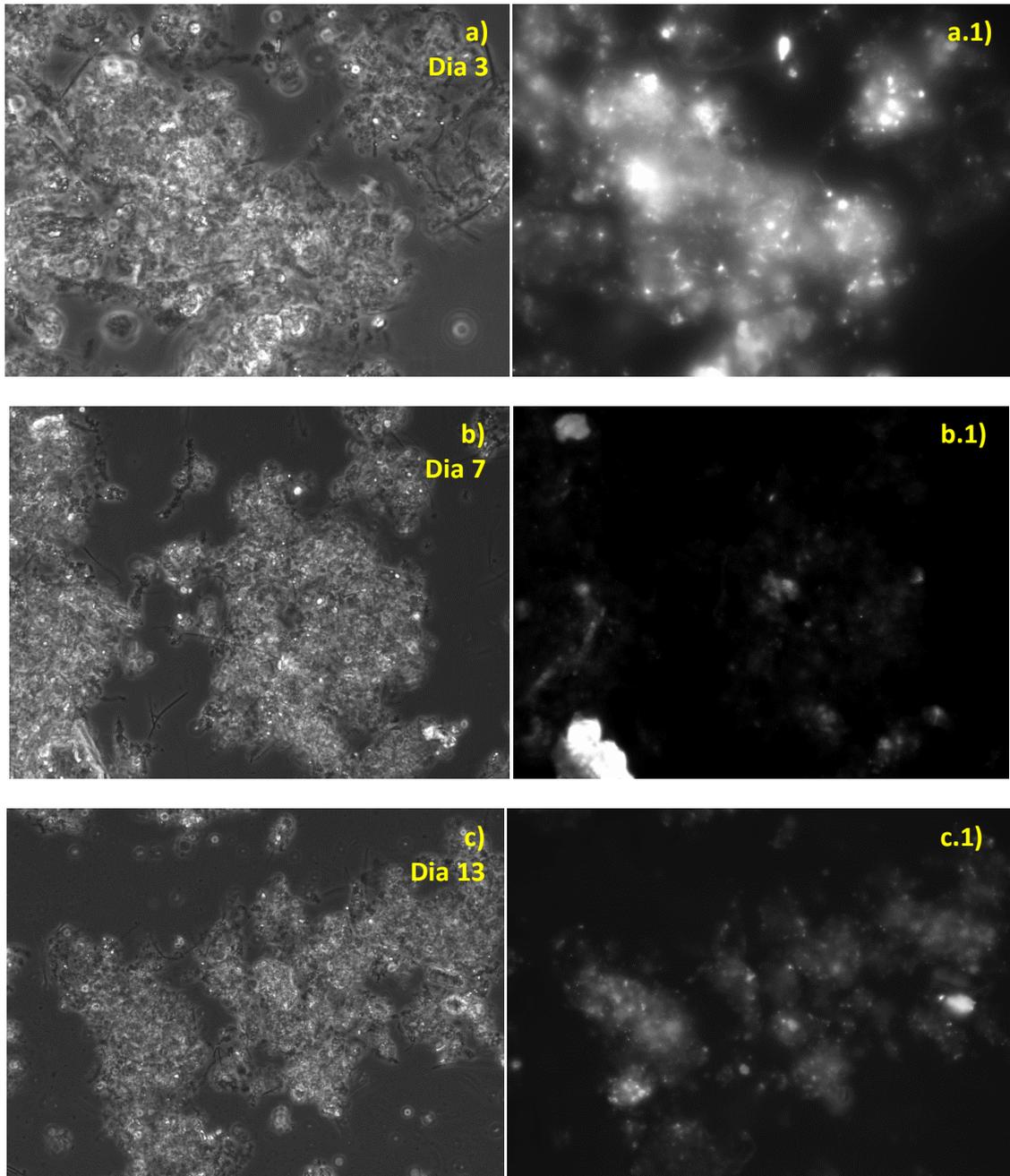


Figura 77 - Microfotografias de flocos (**a**; **b**; **c**) e respectivas fluorescências metanogénicas (**a.1**; **b.1**; **c.1**) de amostras retiradas do reator R9, ponto 1, em diferentes dias de operação todas diluídas na proporção de 1:1. **a**) Dia 3: (x1000); **b**) Dia 7: (x400); **c**) Dia 13: (x400).

Observando a Figura 78 a) constata-se que a produção diária de metano pelo reator R9 teve o seu máximo entre o 2º e 3º dia de operação diminuindo depois a sua produção gradualmente ao longo do tempo. Pela observação da fluorescência metanogénica verificou-se que esta foi bastante intensa no 3º dia tendo diminuído bastante a sua intensidade nas observações feitas nos

7º e 13º dias de operação. Portanto, a tendência decrescente da produção diária de metano coincide com a observação da fluorescência metanogénica.

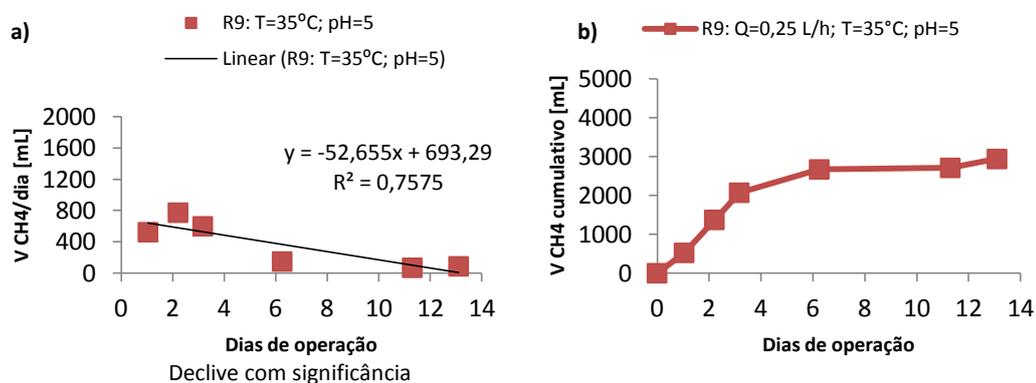


Figura 78 - a) Produção diária de metano e **b)** volume de metano cumulativo produzido pelo reator R9 ao longo do tempo de operação.

Após a aplicação da coloração de *Gram* a população apresentou-se maioritariamente *Gram* negativa, aparecendo apenas bactérias *Gram* positivas no interior dos flocos (Figura 79).

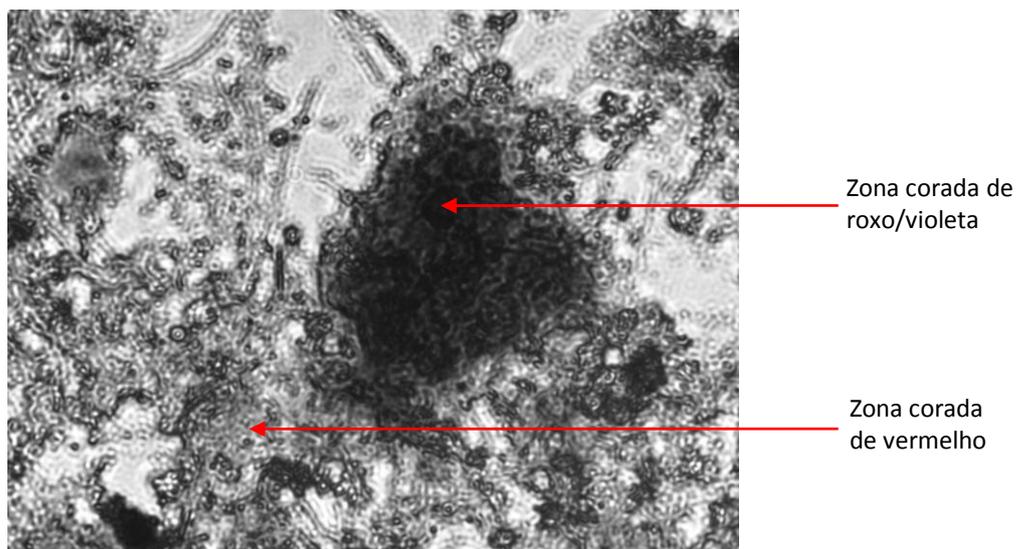


Figura 79 - Microfotografia da aplicação da coloração de *Gram* a uma amostra retirada do reator R9 no último dia de operação. Amostra sem diluição. (x1000)

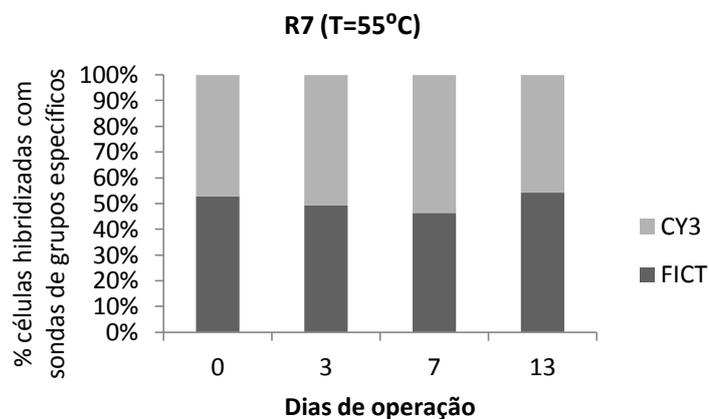
4.3.3. Resultados do método de FISH

Na Figura 80 apresentam-se os resultados da abundância relativa da população de *Archaea* e da população de *Bacteria*, no estudo do efeito da temperatura na população microbiana com os reatores R6, R7 e R8, e no estudo do efeito do pH com os reatores R6 e R9.

Neste caso pode verificar-se no gráfico do reator R7 (T=55°C) que no final da operação ao 13º dia a população *Archaea* é inferior à população de *Bacteria*, o que denota que, aliado à observação visual (Figura 72) e à produção diária de metano (Figura 74), que este nível de temperatura não favorece a presença de microrganismos do domínio *Archaea*. Os resultados de FISH indicam que a população de *Archaea* diminui cerca de 5,1% no decorrer da operação.

Quanto ao reator R8 (T=45°C) a abundância relativa de *Archaea* aumentou ligeiramente (0,006%) em relação à população de *Bacteria* não concordando com o verificado na Figura 70 da produção diária de metano que diminui ao longo do tempo.

Relativamente ao efeito do pH pode ver-se que para o reator R9 (pH=5) a população de *Archaea* diminui cerca de 8,7% ao longo do tempo, sendo inferior à população de *Bacteria* no final da operação. Portanto, a longo prazo um pH de 5 pode inibir os microrganismos do domínio *Archaea*. Como referido anteriormente, a produção de metano diminui ao longo do tempo (Figura 78) concordando assim com os resultados do método de FISH.



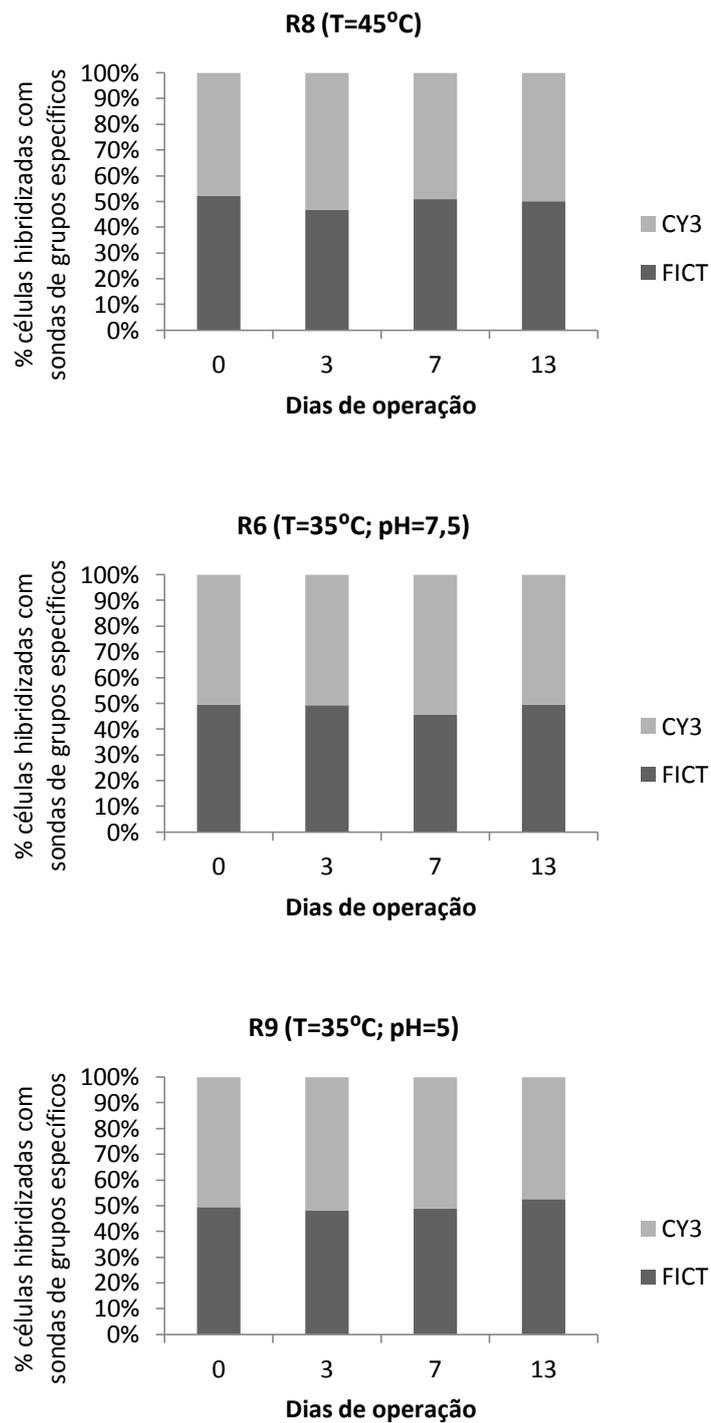


Figura 80 - Composição microbiana da biomassa anaeróbia presente nos reatores R6, R7, R8 e R9 detetada com duas sondas específicas do domínio Archaea – CY3 e Bacteria – FICT.

4.4. Efeito da temperatura na concentração de microrganismos na biomassa

No ensaio com os reatores R6, R7 e R8 em que o objetivo era avaliar o efeito da temperatura no desempenho dos reatores e na adaptação da população microbiana, recorrendo às amostras de biomassa recolhidas do interior dos reatores foram feitas análises à concentração de microrganismos através da determinação dos SSV e da contagem de microrganismos utilizando uma câmara de Neubauer. O mesmo foi feito à biomassa inicial inoculada nos três reatores.

Na Tabela 7 e na Figura 81 são mostrados os resultados obtidos.

Tabela 7 - Concentração de microrganismos pela contagem direta e pela biomassa como SSV nos reatores R6, R7, R8 e biomassa inicial.

Reator	Dia	nº células totais/mL	g VSS/L
R7 (T=55°C)	Dia 3	1.000.000	13,667
	Dia 7	1.050.000	15,267
	Dia 13	825.000	10,067
R8 (T=45°C)	Dia 3	1.000.000	14,467
	Dia 7	1.125.000	18,733
	Dia 13	950.000	13,333
R6 (T=35°C)	Dia 3	1.300.000	16,733
	Dia 7	1.350.000	21,400
	Dia 13	1.100.000	12,067
Réplica			
Biomassa inicial	#1	1.425.000	21,650
	#2	1.475.000	22,950
	#3	1.250.000	18,250

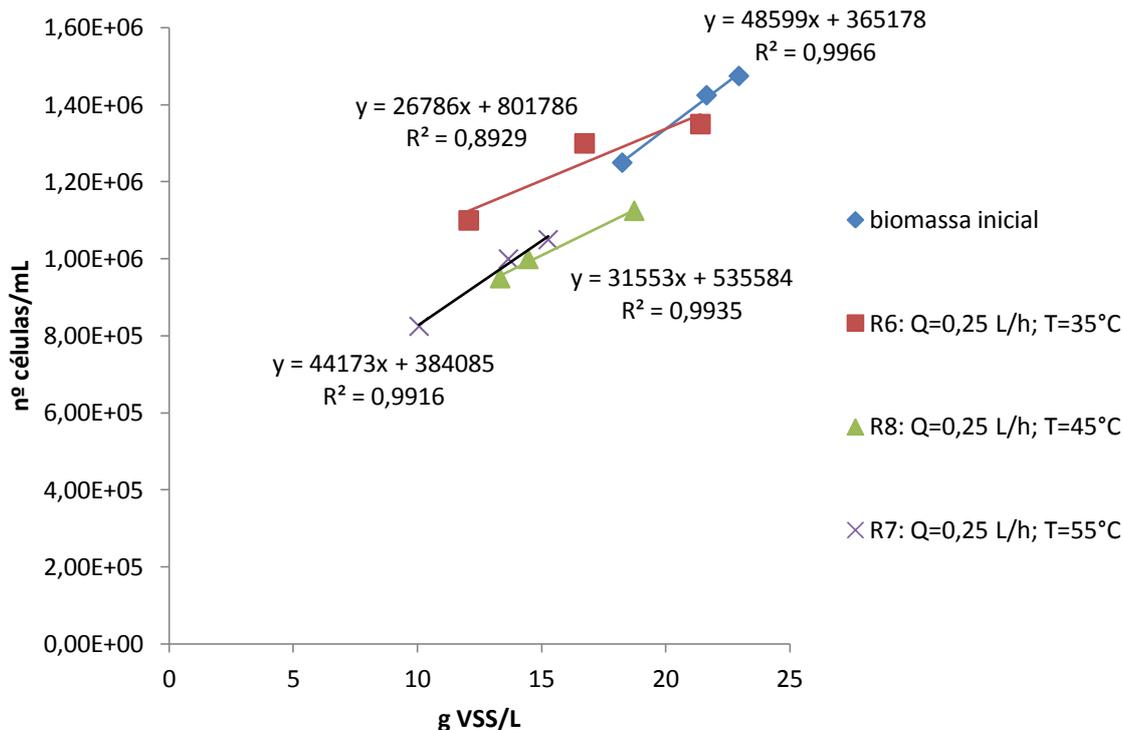


Figura 81 - Correlação entre a concentração de microrganismos determinada pela contagem direta e pela biomassa como SSV nos reatores R6, R7, R8 e biomassa inicial.

Pela Tabela 7 pode verificar-se que em todos os reatores a concentração de microrganismos, tanto determinada pelos SSV como pela contagem, diminuiu no final da operação, ou seja, a concentração foi menor no final do que no início da operação. Comparando com a concentração de microrganismos na biomassa inicial, os valores no final da operação dos reatores são também inferiores.

Pela Figura 81 constata-se uma boa correlação na determinação da concentração de microrganismos, pela contagem e pelos SSV, na biomassa inicial e nos reatores R7 e R8. O que apresenta uma menor correlação é o reator R6.

Isto pode significar que os microrganismos são removidos da biomassa por morte ou arrastamento, e que o ideal é ter tempos de operação curtos já que quanto maior for o tempo de operação, menor será o número de microrganismos no final da operação, diminuindo a eficiência do processo de digestão anaeróbia.

5. Discussão

5.1. Efeito da carga orgânica

O primeiro ensaio, a operar com os reatores R1, R2 e R3, teve como objetivo avaliar a influência da carga orgânica aplicada aos reatores UASB sobre a remoção de CQO e produção de metano. Pelos resultados da produção de metano (Figura 32) e remoção de CQO (Figura 33), pode verificar-se que o comportamento dos reatores R1 (carga = $0,962 \text{ gCQO}_t \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e R2 (carga = $1,705 \text{ gCQO}_t \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) foi bastante semelhante, ou seja, atingiram níveis de remoção de CQO e produção de metano bastante idênticos. De acordo com os valores apresentados na Tabela 8 assume-se que o melhor resultado foi obtido pelo reator R1, já que este produziu 1661 mL de metano em 13 dias de operação e teve uma eficiência de metanização de 21%.

Tabela 8 - Parâmetros operacionais dos ensaios realizados, com os respectivos valores de percentagem de remoção de CQO e produção de metano, obtidos no último dia de operação (13º dia).

	$Q_{\text{alimentação}} \text{ [L/h]}$	Carga orgânica [$\text{gCQO}_{\text{total}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$]	T [$^{\circ}\text{C}$]	pH	%CQO removido	V_{CH_4} cumulativo [mL]	Eficiência de metanização (%)
R2	0,5	1,7	35	7,5	93	1636	12
R1	0,5	1	35	7,5	91	1661	21
R3	0,5	0,6	35	7,5	87	999	20
R4	1,25	1	35	7,5	93	1420	18
R5	0,75	1	35	7,5	92	911	11
R6	0,25	1	35	7,5	83	6352	81
R8	0,25	1	45	7,5	85	5179	65
R7	0,25	1	55	7,5	73	795	12
R9	0,25	1	35	5	83	2988	56

Quanto ao comportamento da população microbiana, esta está de acordo com os resultados físico-químicos, pois foi nos reatores R1 e R2 que a população se agregou melhor em flocos, e a presença de fluorescência metanogénica foi mais notória do que no reator R3.

Contudo, foi no reator R1 que a fluorescência metanogénica foi mais intensa, e onde houve uma agregação de microrganismos formando flocos bem definidos (Figuras 40 e 39).

Pode dizer-se então que a população microbiana presente nos reatores UASB se adaptou melhor onde a carga orgânica era mais elevada ($R1=1 \text{ gCQO}_t \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e $R2= 1,7 \text{ gCQO}_t \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). No reator R3 (carga = $0,624 \text{ gCQO}_t \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) a produção de metano não foi tão elevada, pois a população microbiana não formou tão facilmente flocos (Figura 44), e a fluorescência metanogénica (Figura 45) não foi tão evidente como nos reatores R1 e R2. Portanto, uma razão F/M baixa não é favorável para a degradação anaeróbia deste efluente.

5.2. Efeito do caudal

No segundo ensaio analisou-se o efeito do caudal no desempenho dos reatores, operando os reatores R4 ($Q=1,25 \text{ L/h}$), R5 ($Q=0,75 \text{ L/h}$), R6 ($Q=0,25 \text{ L/h}$) e ainda o R1 ($Q=0,5 \text{ L/h}$) com a melhor carga encontrada no 1º ensaio, que foi aproximadamente $1 \text{ gCQO}_t \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Neste caso, em relação aos resultados físico-químicos obtidos, o reator R6 a operar com um caudal de cerca de $0,25 \text{ L/h}$ e com um TRH de 24 horas, teve o melhor desempenho em termos de produção de metano. Na Tabela 8 pode constatar-se que no final da operação o reator R6 produziu 6352 mL, o reator R1 1661 mL, o reator R4 1420 mL e o reator R5 911 mL, valores significativamente inferiores ao do reator R6. Quanto à remoção de CQO, todos os reatores ficaram entre os 80 e 93% de remoção (Figura 50).

Relativamente à observação da população microbiana nos reatores R1, R4, R5 e R6, houve claramente diferenças entre o sucedido nos reatores R1, R4 e R6, e no reator R5. Neste último não houve uma formação evidente de flocos, apresentando-se a população mais densa no final da operação do que no início. A fluorescência metanogénica também foi muito mais fraca, visualmente, do que nos outros reatores. Estas observações coincidem com os resultados da produção de metano (Figura 49) muito inferior ao obtido pelo reator R6.

No que diz respeito ao observado no reator R6, desde o início da operação se constatou que a intensidade da fluorescência metanogénica foi maior do que nos reatores R4 e R5, tendo sido encontrados vários flocos com o seu interior repleto de fluorescência metanogénica. Daí os

resultados de produção de metano obtidos (Figura 49). Os flocos encontrados neste reator eram bem definidos.

Neste ensaio, pode dizer-se que a população microbiana se adaptou melhor, ou seja, houve uma melhor formação de flocos e uma fluorescência metanogénica mais intensa, no reator onde o caudal era menor (0,25 L/h) ou seja, no reator R6. E pelas Figuras 49 e 50 verifica-se que um caudal elevado favorece a remoção de CQO mas é prejudicial à produção de metano.

5.3. Efeito da temperatura

Neste ensaio o objetivo era submeter a população microbiana a diferentes temperaturas, e verificar o seu efeito na degradação do efluente. Os reatores R6, R7 e R8 operaram com o caudal ótimo, encontrado no 2º ensaio de 0,25 L/h. O reator com a produção de metano mais elevada foi o reator R6 (Figura 64), a operar a uma temperatura de 35°C. O resultado menos satisfatório foi o do reator R7 a operar a 55°C.

Da observação da população microbiana confirma-se que a intensidade da fluorescência metanogénica foi sempre superior nos reatores R6 (T= 35°C) (Figura 60) e R8 (T= 45°C) (Figura 69), assim como a formação de flocos bem definidos (Figuras 59 e 68, respetivamente). Verifica-se então que a população se ajusta melhor a condições de temperatura mesófilas (30 a 45°C), pois os resultados obtidos no reatores R6 e R8 foram significativamente melhores do que os obtidos no reator R7, a operar a uma temperatura termófila.

5.4. Efeito do pH

Com a operação dos reatores R6 (pH=7,5) e R9 (pH=5) verificou-se o efeito do pH mantendo a temperatura e restantes condições iguais. Neste caso, em termos de produção de metano o reator R6 obteve uma produção de metano de 6352 mL e o reator R9 cerca de 3000 mL. Em termos de % de CQO removido obtiveram ambos 83%. Já em termos de eficiência de metanização o reator R6 obteve uma percentagem de 81, superior aos 56 % obtidos pelo reator R9.

Relativamente ao comportamento da população microbiana nos reatores R6 e R9, em termos de formação de flocos foi semelhante, mas a fluorescência metanogénica no reator R6 foi bastante intensa durante todo o tempo de operação, enquanto que no reator R9 a fluorescência metanogénica foi mais intensa no início coincidindo com o observado no gráfico da Figura 65.

Pode ainda dizer-se que um tempo de operação muito elevado, como no 1º ensaio de 30 dias, não é benéfico para alcançar o rendimento máximo da degradação anaeróbia deste tipo de efluente já que ao 10º dia de operação se atingiram valores de remoção de CQO da ordem dos 80% (Figura 33). Daí ter sido reduzido o tempo de operação nos outros ensaios, e foram obtidos resultados superiores de produção de metano e percentagem de remoção de CQO de cerca de 90% em apenas 13 dias de operação.

Isto poderá também estar relacionado com a biomassa inicial, visto que no ensaio com os reatores R1, R2 e R3 foram obtidos valores de eficiência de metanização baixos, enquanto que com os reatores R6 e R8, por exemplo, ambos com a mesma biomassa inicial, mas diferente da biomassa dos reatores R1, R2 e R3, os valores de metanização foram de 83% e 65%, respetivamente. Resultados bastante melhores, contudo não foi detetado nada nas análises feitas ao microscópio que indiquem diferenças significativas entre ambas as lamas. Por outro lado, como os efluentes usados nos ensaios foi sempre diferente, apesar de ter a mesma origem, poderia no caso do ensaio com os reatores R1, R2 e R3 conter alguma substância inibidora à atividade microbiana.

5.5. Síntese

Em suma, o comportamento da população microbiana nos diferentes ensaios refletiu as condições impostas aos reatores. Na Tabela 9 é apresentada uma síntese do comportamento da população microbiana nos vários ensaios.

Tabela 9 – Síntese do comportamento da população microbiana nos diferentes ensaios.

	Q [L/h]	Carga orgânica [gCQO _{total} · L ⁻¹ ·d ⁻¹]	T [°C]	pH	Formação de flocos	Fluorescência metanogénica
R2	0,5	1,7	35	7,5	Boa formação de flocos, mas melhor no R1	Menos intensa do que R1
R1	0,5	1	35	7,5	Boa formação de flocos a partir do 3º dia de operação, ao 8º dia já se encontravam bem definidos	Intensa
R3	0,5	0,6	35	7,5	Formação de flocos não evidente	Muito menos intensa do que R1 e R2
R4	1,25	1	35	7,5	Boa formação de flocos a partir do 7 dia	Mais intensa nos 7 primeiros dias
R5	0,75	1	35	7,5	Não se observou a formação de flocos	Pouco intensa e ainda menos intensa no final
R6	0,25	1	35	7,5	Boa formação de flocos	Muito Intensa
R8	0,25	1	45	7,5	Boa formação de flocos	Intensa
R7	0,25	1	55	7,5	Formação de flocos lenta	Fraca
R9	0,25	1	35	5	Boa formação de flocos	Fraca

Relativamente aos reatores usados para avaliar o efeito da carga orgânica, os reatores R1, R2 e R3, o que teve uma melhor formação de flocos e presença de fluorescência metanogénica intensa foi o reator R1 coincidindo com os resultados físico-químicos obtidos, produção de metano e remoção de CQO.

Quanto aos reatores R1, R4, R5 e R6 utilizados para avaliar o efeito do caudal os reatores R1 (Q= 0,5 L/h) e R6 (Q= 0,25 L/h) foram os que tiveram uma melhor formação de flocos e uma fluorescência metanogénica mais intensa. Em termos de produção de metano foi o reator R6 que obteve maior produção mas também teve a menor percentagem de remoção de CQO. O reator R4 foi o que obteve uma maior remoção de CQO. Neste caso, a observação direta dos microrganismos não coincidiu totalmente com os resultados físico-químicos pois, em ambos os reatores R1 e R6 se observou uma boa formação de flocos e fluorescência metanogénica intensa

mas os resultados da produção de metano indicam diferenças consideráveis entre os dois, reator R6 produziu 6352 mL e reator R1 produziu 1661 mL.

Para avaliar o efeito da temperatura foram usados os reatores R6 (T=35°C), R8 (T=45°C) e R7 (T=55°C) e onde se observou uma melhor formação de flocos e uma fluorescência metanogénica mais intensa foi nos reatores R6 e R8. As maiores produções de metano e remoção de CQO também foram obtidas nestes dois reatores.

Por último, com os reatores R6 (pH=7,5) e R9 (pH=5) foi avaliado o efeito do pH e em termos de formação de flocos ambos tiveram resultados semelhantes. Quanto à fluorescência metanogénica o reator R6 foi o que apresentou uma fluorescência metanogénica mais intensa.

Portanto, das condições impostas aos reatores as que favorecem a formação de flocos e fluorescência metanogénica intensa são: caudal entre 0,25 e 0,5 L/h, temperatura entre 35 e 45°C, carga orgânica próxima de 1 gCQOt.L⁻¹.d⁻¹ e pH 7,5.

5.6. Método de FISH

As Tabelas 10 e 13 mostram os resultados da abundância relativa da população do domínio *Bacteria* e do domínio *Archaea* obtidos em todos os 9 ensaios ao longo do tempo de operação.

Pode verificar-se que nos reatores R7 (T=55°C) e R9 (pH=5) a população de *Bacteria* aumentou no final da operação, concordando com a produção diária de metano decrescente (Figuras 74 e 78) e pela fluorescência metanogénica fraca (Figuras 73 e 77) apresentadas por estes reatores.

Tabela 10 - Abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* em todos os reatores ao longo do tempo de operação.

DIA	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
0 (biomassa inicial)	0,528	0,522	0,495	0,528	0,522	0,495	0,528	0,522	0,495
1	0,511	0,534	0,528						
2									
3	0,472	0,474	0,464	0,448	0,521	0,494	0,493	0,467	0,483
4									
5									
6	0,482	0,462	0,505						
7				0,474	0,470	0,456	0,463	0,509	0,488
8									
9									
10									
11									
12									
13				0,464	0,508	0,495	0,542	0,500	0,526
14									
15									
16	0,497	0,491	0,485						
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23	0,472	0,508	0,499						
24									
25									
26									
27									
28									
29	0,414	0,543	0,530						
30	0,497	0,464	0,467						

Nas Figuras 82 e 83 está representada a correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* e *Archaea*, respetivamente, de todos os ensaios, excetuando os ensaios realizados a T= 45°C, T= 55°C e pH= 5 ao longo do tempo de operação. Foi analisada a significância do declive para ambos os resultados com um nível de confiança de 90% e 95%, e verificou-se que este tem significado estatístico, como se pode verificar nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Resultados da avaliação de significância do declive dos resultados de FICT (Figura 82).

Hipóteses	H0: declive tem significância		
	Ha: declive não tem significância		
Nível de confiança	95%	90%	t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
t calculado	-1,19	-1,19	
n	36	36	
u = n-2	34	34	
t tabelado	1,69	1,31	

Tabela 12 - Resultados da avaliação de significância do declive dos resultados de CY3 (Figura 83).

Hipóteses	H0: declive tem significância		
	Ha: declive não tem significância		
Nível de confiança	95%	90%	t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
t calculado	1,19	1,19	
n	36	36	
u = n-2	34	34	
t tabelado	1,69	1,31	

No caso da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* verificou-se através do ponto inicial e do ponto final da reta que a população diminui cerca de 1,5% em 30 dias operação.

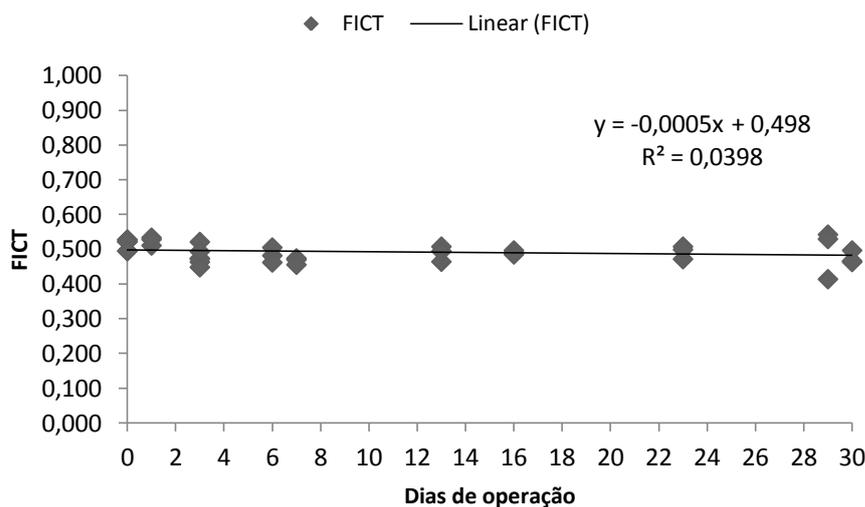


Figura 82 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* nos ensaios com os reatores R1, R2, R3, R4, R5 e R6 ao longo do tempo de operação.

Os reatores em que a população de *Archaea* aumentou foram: R1 (1 gCQOt/L.d; Q=0,5 L/h), R2 (1,7 gCQOt/L.d), R3 (0,6 gCQOt/L.d), R4 (Q=1,25 L/h), R5 (Q=0,75 L/h), R6 (T=35°C; Q=0,25 L/h) e R8 (T= 45°C). Apenas nos reatores R1, R2 e R4 é que a produção diária de metano teve tendência crescente ao longo do tempo. Nos reatores R5, R6 e R8 esta teve tendência decrescente não estando de acordo com o aumento da população de *Archaea*.

O reator R6 (T=35°C; Q=0,25 L/h) que teve o melhor desempenho em termos de produção de metano e eficiência de metanização, no final os resultados de FISH mostram uma percentagem de cerca de 50% de população do domínio *Bacteria* e cerca de 50% do domínio *Archaea*, obtendo os mesmos valores da biomassa inicial. Seria de esperar pelos resultados de produção de metano que a diferença entre a população de *Archaea* e *Bacteria* fosse a mais elevada de todos os ensaios.

Tabela 13 - Abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* em todos os reatores ao longo do tempo de operação.

DIA	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
0 (biomassa inicial)	0,472	0,478	0,505	0,472	0,478	0,505	0,472	0,478	0,505
1	0,489	0,466	0,472						
2									
3	0,528	0,526	0,536	0,552	0,479	0,506	0,507	0,533	0,517
4									
5									
6	0,518	0,538	0,495						
7				0,526	0,530	0,544	0,537	0,491	0,512
8									
9									
10									
11									
12									
13				0,536	0,492	0,505	0,458	0,500	0,474
14									
15									
16	0,503	0,509	0,515						
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23	0,528	0,492	0,501						
24									
25									
26									
27									
28									
29	0,586	0,457	0,470						
30	0,503	0,536	0,533						

No caso da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* verificou-se que do ponto inicial e do ponto final da reta que a população aumentou cerca de 1,5% em 30 dias operação.

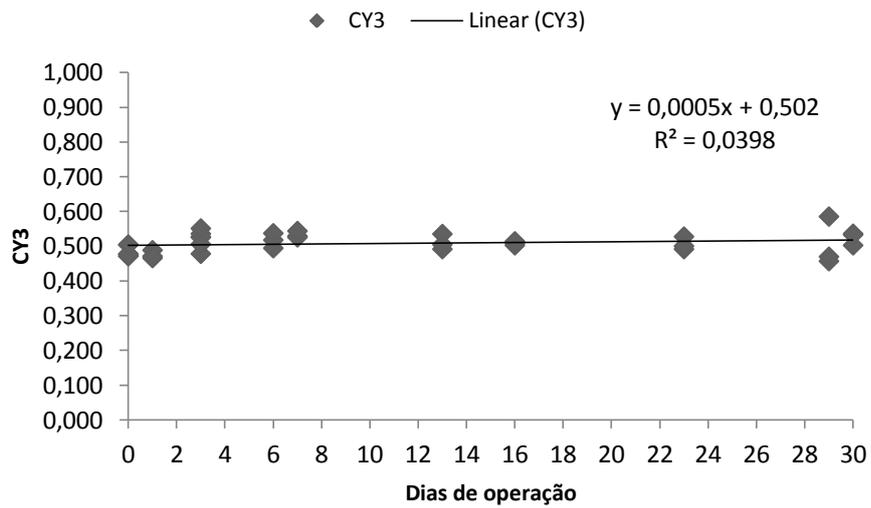


Figura 83 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* em todos os ensaios com os reatores R1, R2, R3, R4, R5 e R6 ao longo do tempo de operação.

Pela aplicação do método de FISH constata-se que o contacto com o efluente utilizado influencia a abundância das populações dos domínios *Bacteria* e *Archaea* presentes na biomassa anaeróbia.

6. Conclusões e Sugestões

Este trabalho teve como objetivo avaliar a adaptação da população microbiana utilizada em reatores UASB usados para o tratamento de um efluente proveniente duma cabine de pintura e envernizamento, duma indústria do mobiliário de madeiras.

As principais conclusões decorrentes do trabalho desenvolvido apresentam-se de seguida:

- A população microbiana adaptou-se melhor, ou seja houve uma melhor formação de flocos e fluorescência metanogénica mais intensa, nos reatores que operaram com cargas orgânicas mais elevadas e caudal de 0,25 L/h.
- Quanto ao comportamento da população microbiana a diferentes temperaturas, foi na gama mesófila (30 a 45°C) que a população se adaptou melhor, formando flocos e apresentando uma fluorescência mais intensa, afastando a possibilidade de operar a 55°C.
- No que diz respeito ao pH, que variou entre 5 e 7,5, não houve diferenças consideráveis da adaptação microbiana (formação de flocos), entre ambos os valores, mas em termos de intensidade de fluorescência metanogénica esta foi superior a pH=7,5.
- A formação de flocos é essencial para que os resultados sejam satisfatórios, já que se verificou que a intensidade metanogénica se encontra principalmente dentro destes flocos, e portanto os microrganismos *archaea* metanogénicos necessitam deste tipo de micro-ecossistemas para a conversão eficaz do CO₂ + H₂ e acetato em biogás.
- Pode dizer-se que neste trabalho os microrganismos *archaea* metanogénicos presentes são maioritariamente *Gram* positivas, pois tanto a fluorescência metanogénica como as bactérias *Gram* positivas (coradas de roxo) apareceram quase sempre no interior dos flocos.

- O efluente utilizado permite a formação de grânulos nos reatores UASB sendo portanto, em princípio, adequado ao tratamento neste tipo de reatores.
- O tempo de operação deve ser curto para que os microrganismos presentes na biomassa degradem a matéria orgânica e obtenham bons resultados em termos de produção de metano e remoção de CQO.
- O método de FISH comprovou que o contacto com o efluente influencia a abundância relativa das populações de *Bacteria* e *Archaea* presentes na biomassa anaeróbia.
- No caso do reator a operar a T= 55°C e do reator a operar a pH 5 ficou bem notória que a população de *Archaea* diminui em relação à população de *Bacteria* devido às condições impostas, coincidindo com a produção diária de metano e com a observação de fluorescência metanogénica.
- Em geral, nos ensaios onde não houve influência de outras variáveis, como temperatura entre 45°C e 55°C e pH=5, verificou-se que a população de *Archaea* aumentou cerca de 1,5% num período de contacto com o efluente de 30 dias.

Sugestões para trabalho futuro:

- Aplicar a técnica de microscopia de epifluorescência com DAPI para determinar o número total de microrganismos viáveis nos reatores;
- Desagregar as células para facilitar a observação dos flocos;
- Utilizar *software* que transforme as microfotografias adquiridas a preto e branco, pela câmara acoplada ao microscópio, a cores para auxiliar a visualização das imagens no tratamento de dados.

7. Referências Bibliográficas

ABBASI, TASNEEM; ABBASI, S. A. - Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Renewable and Sustainable Energy Reviews. ISSN 1364-0321. Vol. 16, n.º 3 (2012), p. 1696-1708.

ABREU, ÉRIKA FERREIRA DE - Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

AIMMP, (ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DE MADEIRA E MOBILIÁRIO DE PORTUGAL) - Estudo Estratégico das Indústrias de Madeira e Mobiliário. 2007.

ALVES, M. M. - Estudo e caracterização de digestores anaeróbios de leito fixo. Universidade do Minho, 1998. Dissertação para Doutoramento em Engenharia Biológica e Química na Universidade do Minho.

AMANN, R.I. [et al.] - Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 56, n.º 6 (1990), p. 1919-1925.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. - Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews. Vol. 59 (1995), p. 143-169.

APHA, AWWA, WEF- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. nineteenth ed. Washington DC, USA: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation., 1995.

APIMA, ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DAS INDUSTRIAS DE MOBILIÁRIO E AFINS - Análise de Conjuntura. (2012). Disponível em: [http://apima.pt/files/ Comercio Internacional 5183a2f5baf12.pdf](http://apima.pt/files/Comercio_Internacional_5183a2f5baf12.pdf).

BASTIDAS, OSCAR- Cell Counting with Neubauer Chamber. Technical Note, 2013. Disponível em: <http://futurescienceleaders.org/protocols/files/2013/02/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>.

COURAS, CÁTIA - Tratamento de efluentes de madeira em digestores anaeróbios. Universidade de Aveiro, 2013. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente.

CHAPMAN & HALL - Brewing Microbiology. 2nd. London, 1996. ISBN 0-412-59150-2.

FERREIRA, WANDA F. CANAS; SOUSA, JOÃO CARLOS F. DE - Microbiologia - Volume 1. Lidel - Edições Técnicas, 1998. ISBN 972-757-024-0.

FONSECA, M. MANUELA; TEIXEIRA, JOSÉ A. - Reactores Biológicos - Fundamentos e aplicações. Lidel - Edições técnicas, Lda, 2007. ISBN 972-757-366-5.

GARCIA, JEAN-LOUIS; PATEL, BHARAT K. C.; OLLIVIER, BERNARD - Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. Anaerobe. ISSN 1075-9964. Vol. 6, n.º 4 (2000), p. 205-226.

GERARDI, MICHAEL H.- The Microbiology of Anaerobic Digesters. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. ISBN/ISSN 0-471-20693-8.

GRILLO, ANDRÉ MANUEL SARDINHA - Caracterização molecular de populações microbianas em reatores anaeróbios. Universidade de Lisboa, 2009. Tese de Mestrado em Microbiologia Aplicada.

HABEEB, S.A. [et al.] - A review on granules initiation and development inside UASB Reactor and the main factors affecting granules formation process. International Journal of Energy and Environment. Vol. 2, n.º 2 (2011), p. 311-320.

INETI, INSTITUTO NACIONAL DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA INDUSTRIAL - Guia Técnico - Sector da Indústria da Madeira e do Mobiliário. Lisboa, 2000. Disponível em: http://netresiduos.trace.pt/resources/docs/guias_sectoriais/madeira_mobiliario/sectorindustria_madeiraemobiliario.pdf.

LATIF, MUHAMMAD ASIF [et al.] - Integrated application of upflow anaerobic sludge blanket reactor for the treatment of wastewaters. Water Research. ISSN 0043-1354. Vol. 45, n.º 16 (2011), p. 4683-4699.

LETTINGA, G. - Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. Antonie van Leeuwenhoek 67: 3-28. (1995).

LETTINGA, G.; VELSEO, A.F.M. van; HOBMA, S.W.; ZEEUW, W. de - Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 22, n.º 4 (1980), p. 699-734.

MARQUES, EVA; SOARES, ROSA; ALMEIDA, CARLA - Técnicas Laboratoriais de Biologia - Bloco I. Porto: Porto Editora, 2003. ISBN 972-0-42137-1.

PELCZAR, JR.; MICHAEL, J. - Microbiology: concepts and applications. New York: McGraw-Hill, 1993. ISBN 0-07-049258-1.

ROSÁRIO, ANA CRISTINA CAIS EUSÉBIO DO - Caracterização de populações microbianas em reactores "JET-LOOP" para tratamento de efluentes agro-industriais. Universidade de Lisboa, 2009. Tese de Doutoramento em Biologia.

SANTANA, P. - Indústrias transformadoras de madeira. Inspeção-Geral do Ambiente e do Ordenamento do Território, 2008.

SANTOS, ANSELMO R. LAGE [et al.] - Caracterização e tratabilidade biológica dos efluentes líquidos gerados em cabines de pintura de uma indústria moveleira. Engenharia Sanitária e Ambiental. Vol. 15, n.º 4 (2010), p. 357-366.

SANZ, JOSÉ L.; KÖCHLING, THORSTEN - Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. Process Biochemistry. ISSN 1359-5113. Vol. 42, n.º 2 (2007), p. 119-133.

SOLERA, R.; ROMERO, L. I.; SALES, D. - Determination of the Microbial Population in Thermophilic Anaerobic Reactor: Comparative Analysis by Different Counting Methods. Anaerobe. ISSN 1075-9964. Vol. 7, n.º 2 (2001), p. 79-86.

TCHOBANOGLIOUS, GEORGE; BURTON, FRANKLIN L.; STENSEL, H. DAVID - Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4nd. Metcalf & Eddy, Inc.; McGraw-Hill, 2003. ISBN 0-07-112250-8.

8. Anexos

Anexo I – Análise da significância do declive aos resultados de FISH

Para a análise da significância do declive recorreu-se ao método dos mínimos quadrados, em que:

$$y_i = \hat{a} + \hat{b}x_i$$

Sendo o t calculado dado por:

$$t_{calc} = \frac{\hat{b}}{\left[\frac{S^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}} \quad \hat{b} = \text{Declive pelos MQ}$$

E,

$$S^2 = \frac{n-1}{n-2} S_y^2 (1-r^2) \quad \left\{ \begin{array}{l} r^2 = \text{coeficiente de correlação} \\ S_y^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1} \end{array} \right.$$

Se

$$t_{calc} < t_{tab} \Rightarrow \text{n\~{a}o rejeitar } H_0$$

$$t_{calc} > t_{tab} \Rightarrow \text{rejeitar } H_0$$

Onde o t tabelado se encontra nas tabelas estatísticas com:

$$t_{tab} \quad \left\{ \begin{array}{l} v = n - 2 \\ \alpha \end{array} \right.$$

Foi analisada a significância do declive aos resultados de FISH, mais precisamente aos resultados obtidos com as sondas CY3 e FICT, correspondentes ao domínio *Archaea* e *Bacteria*, respetivamente.

I.1. Efeito da carga orgânica

Reator R2: carga 1,7 gCQOt/L.d

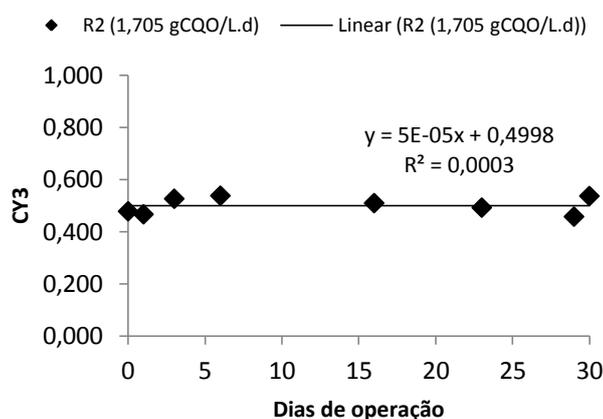


Figura 1 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R2 ao longo do tempo de operação.

Tabela 1 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R2.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	0,044	0,044	
n	8	8	
u = n-2	6	6	
t tabelado	2,45	1,94	

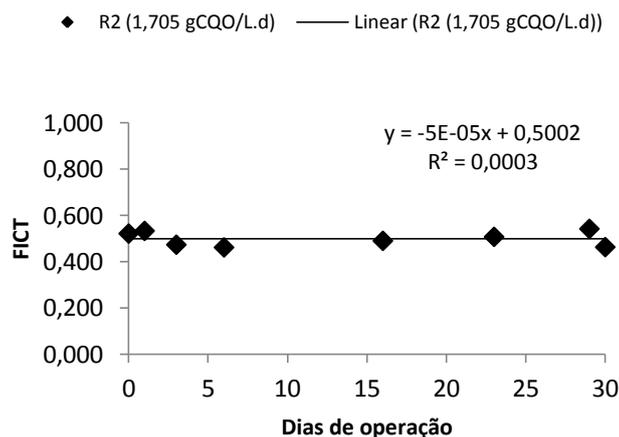


Figura 2 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R2 ao longo do tempo de operação.

Tabela 2 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R2.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	-0,044	-0,044	
n	8	8	
u = n-2	6	6	
t tabelado	2,45	1,94	

Reator R1: carga 1 gCQOt/L.d; Q=0,50 L/h

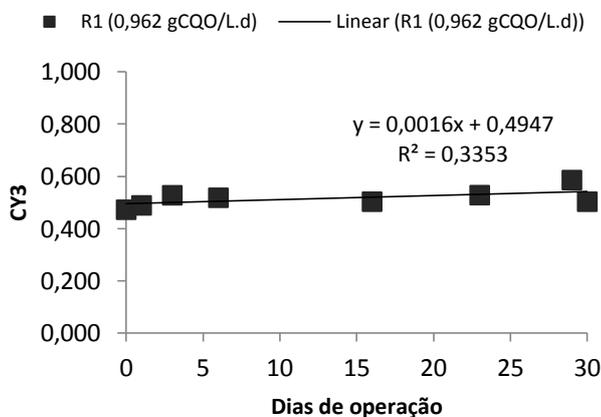


Figura 3 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R1 ao longo do tempo de operação.

Tabela 3 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R1.

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	1,740	1,740	
n	8	8	
u = n-2	6	6	
t tabelado	2,45	1,94	

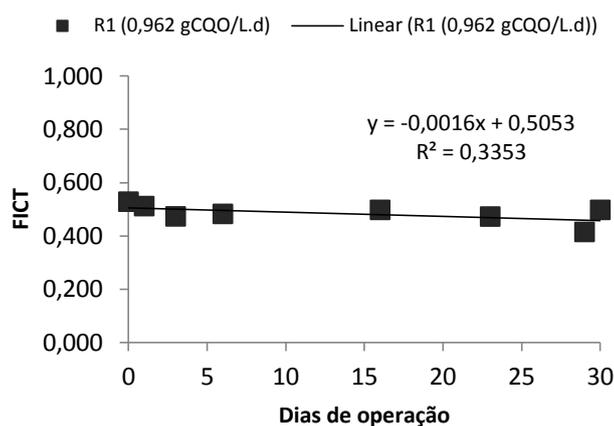


Figura 4 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R1 ao longo do tempo de operação.

Tabela 4 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R1.

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	-1,740	-1,740	
n	8	8	
u = n-2	6	6	
t tabelado	2,45	1,94	

R3: carga 0,6 gCQOt/L.d

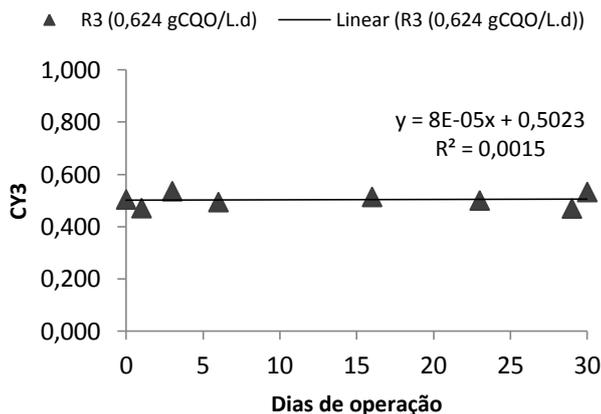


Figura 5 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R3 ao longo do tempo de operação.

Tabela 5 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R3.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	0,094	0,094	
n	8	8	
u = n-2	6	6	
t tabelado	2,45	1,94	

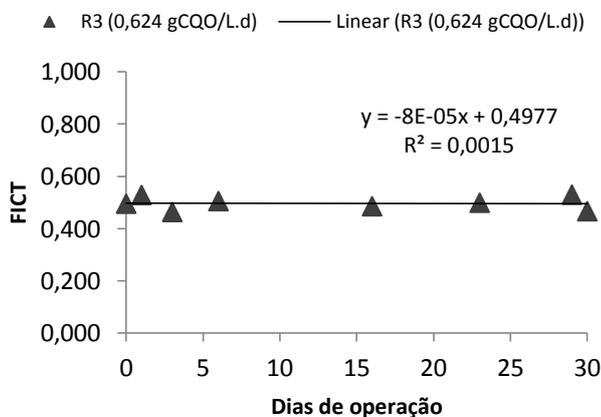


Figura 6 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R3 ao longo do tempo de operação.

Tabela 6 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R3.

Hipóteses	H0: declive tem significância		
	Ha: declive não tem significância		
Nível de confiança	95%	90%	t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
t calculado	-0,094	-0,094	
n	8	8	
u = n-2	6	6	
t tabelado	2,45	1,94	

I.2. Efeito do caudal

Reator R4: Q=1,25 L/h

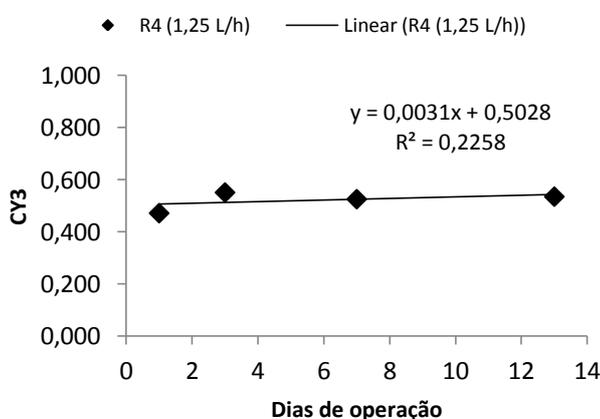


Figura 7 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R4 ao longo do tempo de operação.

Tabela 7 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R4.

Hipóteses	H0: declive tem significância		
	Ha: declive não tem significância		
Nível de confiança	95%	90%	t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
t calculado	0,764	0,764	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

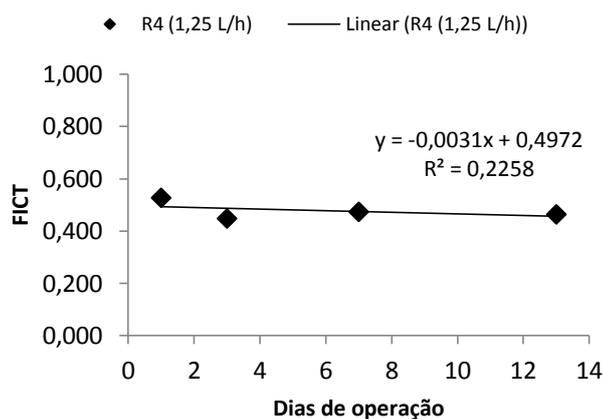


Figura 8 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R4 ao longo do tempo de operação.

Tabela 8 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R4.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	-0,764	-0,764	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

Reator R5: Q=0,75 L/h

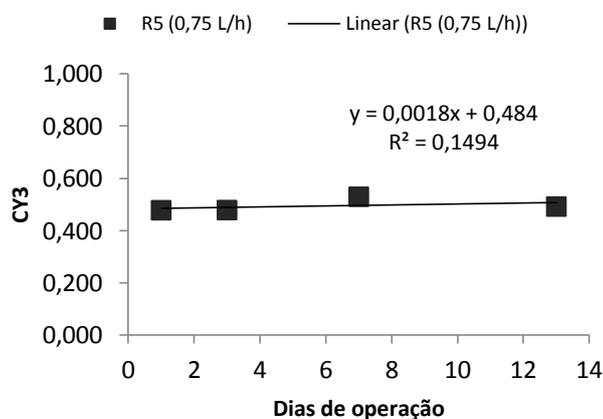


Figura 9 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R5 ao longo do tempo de operação.

Tabela 9 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R5.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	0,592	0,592	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

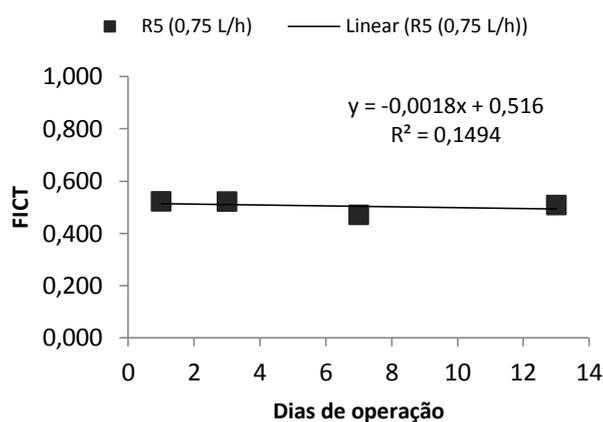


Figura 10 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R5 ao longo do tempo de operação.

Tabela 10 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R5.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	-0,592	-0,592	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

Reator R6: Q=0,25L/h; T=35°C; pH=7,5

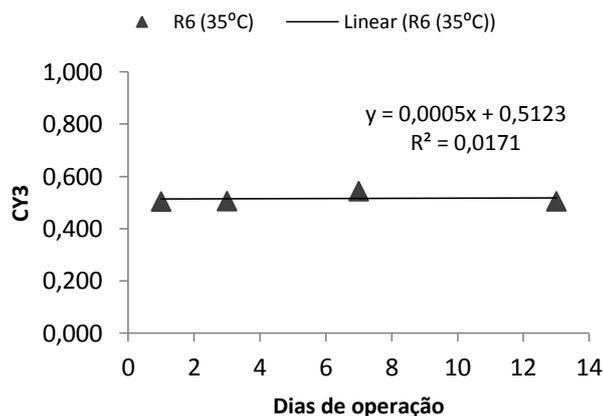


Figura 11 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R6 ao longo do tempo de operação.

Tabela 11 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R6.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	0,186	0,186	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

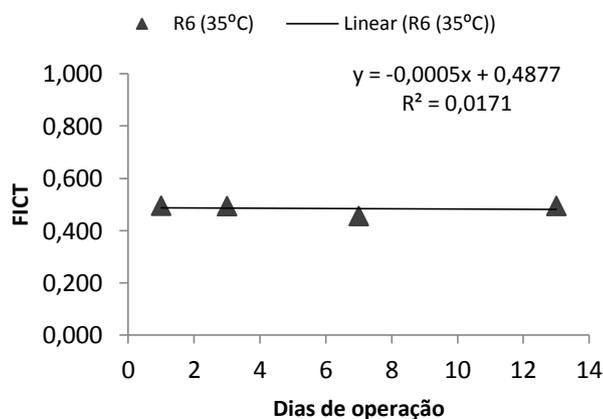


Figura 12 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R6 ao longo do tempo de operação.

Tabela 12 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R6.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	-0,186	-0,186	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

I.2. Efeito da temperatura

Reator R8: T=45°C

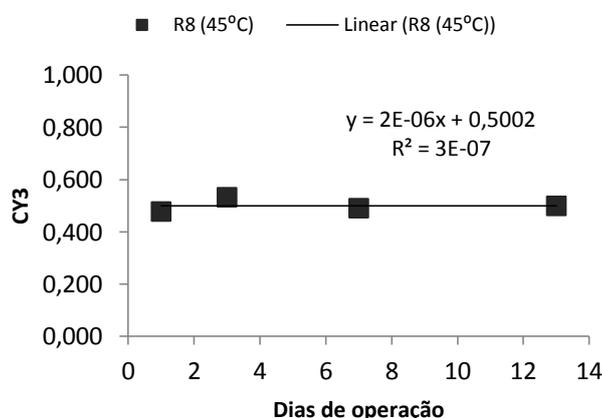


Figura 13 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R8 ao longo do tempo de operação.

Tabela 13 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R8.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	0,000781	0,000781	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

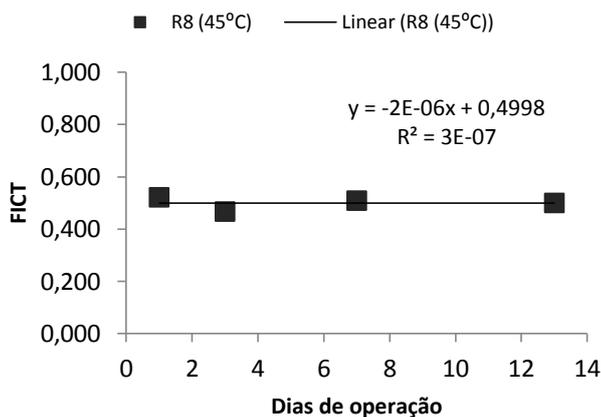


Figura 14 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R8 ao longo do tempo de operação.

Tabela 14 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R8.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	-0,000781	-0,000781	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

Reator R7: T=55°C

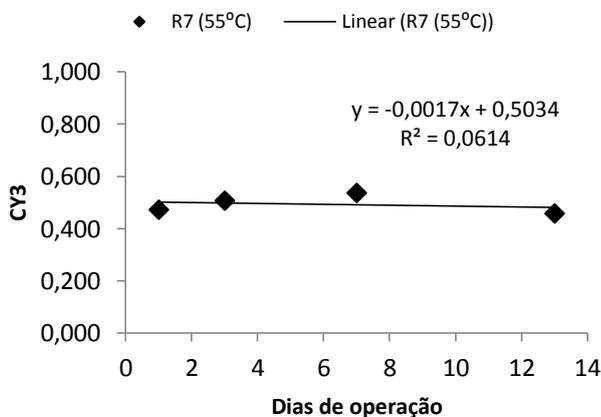


Figura 15 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R7 ao longo do tempo de operação.

Tabela 15 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R7.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	-0,36177	-0,36177	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

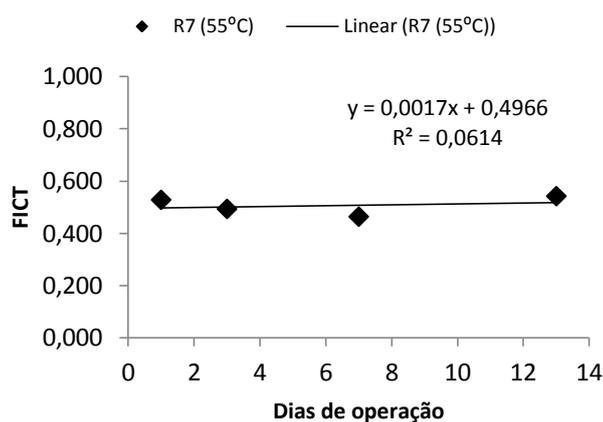


Figura 16 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R7 ao longo do tempo de operação.

Tabela 16 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R7.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	0,36177	0,36177	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

I.2. Efeito do pH

Reator R9: T=35°C; pH=7,5

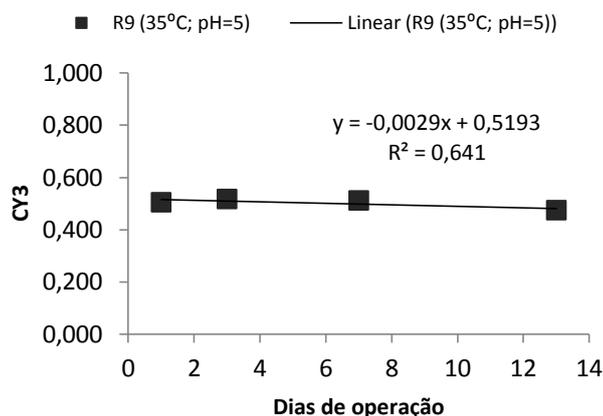


Figura 17 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Archaea* no reator R9 ao longo do tempo de operação.

Tabela 17 – Resultados da avaliação de significância do declive de CY3 do reator R9.

Hipóteses	H0: declive tem significância		t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	-1,89	-1,89	
n	4	4	
u = n-2	2	2	
t tabelado	4,303	2,92	

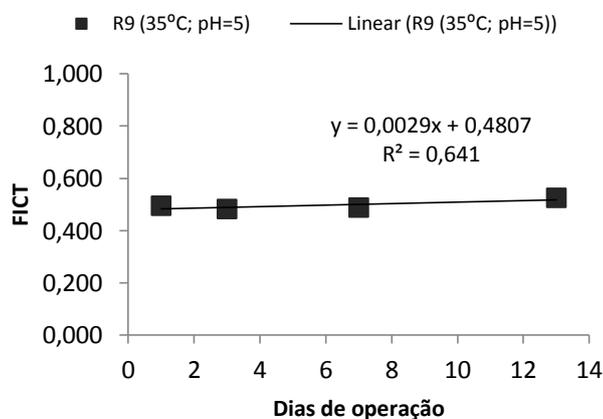


Figura 18 - Correlação entre os resultados da abundância relativa de microrganismos do domínio *Bacteria* no reator R9 ao longo do tempo de operação.

Tabela 18 – Resultados da avaliação de significância do declive de FICT do reator R9.

Hipóteses	H0: declive tem significância		
	95%	90%	
Nível de confiança	95%	90%	
t calculado	1,89	1,89	t calc < t tab → não
n	4	4	rejeitamos H0, logo o
u = n-2	2	2	declive tem
t tabelado	4,303	2,92	significância

Anexo II – Análise da significância do declive aos resultados da produção diária de CH₄.

Utilizado o mesmo método do Anexo I os resultados são apresentados de seguida, sendo que os gráficos são apresentados ao longo da tese.

Tabela 19 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R2 (1,7 g CQOt/L.d).

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	0,0133	0,0133	
n	17	17	
u = n-2	15	15	
t tabelado	2,131	1,753	

Tabela 20 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R1 (1 g CQOt/L.d).

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	0,0975	0,0975	
n	17	17	
u = n-2	15	15	
t tabelado	2,131	1,753	

Tabela 21 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R3 (0,6 g CQOt/L.d).

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	3,382	3,382	
n	17	17	
u = n-2	15	15	
t tabelado	2,131	1,753	

Tabela 22 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R4 (1,25 L/h).

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	1,493	1,493	
n	6	6	
u = n-2	4	4	
t tabelado	2,776	2,132	

Tabela 23 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R5 (0,75 L/h).

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	-0,200	-0,200	
n	6	6	
u = n-2	4	4	
t tabelado	2,776	2,132	

Tabela 24 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R6 (0,25 L/h; T= 35°C; pH=7,5).

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	-1,451	-1,451	
n	6	6	
u = n-2	4	4	
t tabelado	2,776	2,132	

Tabela 25 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R8 (T= 45°C).

Hipóteses	H0: declive tem significância Ha: declive não tem significância		
	Nível de confiança	95%	90%
t calculado	-1,077	-1,077	
n	6	6	
u = n-2	4	4	
t tabelado	2,776	2,132	

Tabela 26 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R7 (T= 55°C).

Hipóteses	H0: declive tem significância		
	Ha: declive não tem significância		
Nível de confiança	95%	90%	t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
t calculado	-0,198	-0,198	
n	6	6	
u = n-2	4	4	
t tabelado	2,776	2,132	

Tabela 27 – Resultados da avaliação de significância do declive do reator R9 (pH=5).

Hipóteses	H0: declive tem significância		
	Ha: declive não tem significância		
Nível de confiança	95%	90%	t calc < t tab → não rejeitamos H0, logo o declive tem significância
t calculado	-3,534	-3,534	
n	6	6	
u = n-2	4	4	
t tabelado	2,776	2,132	