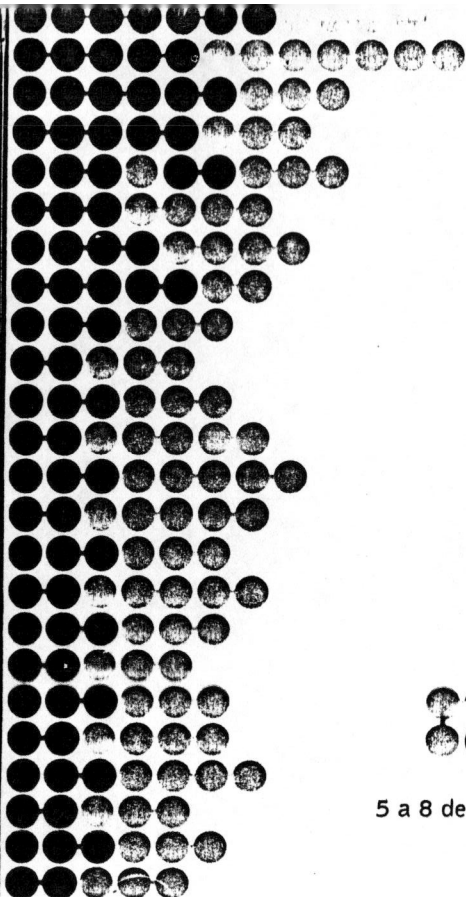




SINAFERM 2003

XIV Simpósio Nacional de Fermentações

5 a 8 de agosto 2003 | Florianópolis, SC

Conteúdo do CD-ROM

- » Apresentação
- » Comitê Organizador
- » Comitê Científico
- » Programa
- » Áreas Temáticas
- » Sistema de Busca
 - Autor e Título
 - Global (palavras-chave)
- » Apolo

© 2003

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
EQA - Depto. de Eng. Química e Eng. Alimentos
CTC - Centro Tecnológico
Cx. Postal 5040 - 88040-970 - Florianópolis, SC.
Fone: (48) 331 9715 | Fax: (48) 331 9687

Todos os direitos reservados. Proibida a reprodução total ou parcial sem a prévia autorização dos autores.

Avaliação da Comunidade Microbiana Anaeróbia usando a Hibridação *in situ* Fluorescente em Reator Sulfetogênico operado com Diferentes Materiais Suportes

Julia Sumiko Hirasawa, Ariovaldo José da Silva, Marcelo Zaiat, Eugenio Foresti, Maria Bernadete A. Varesche

H 668 a

Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento
Av. Trabalhador São-Carlense 400, Caixa Postal 359 – 13560-250 São Carlos – SP
E-mail: varesche@sc.usp.br

RESUMO

Diferentes materiais suportes (espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno reciclado de baixa densidade e cerâmica porosa à base de alumina) foram avaliados em reatores anaeróbios diferenciais horizontais, sob condições sulfetogênicas e mesofílicas (30°C), durante 28 dias de operação. O meio utilizado foi esgoto sintético, contendo 1000 mg.l⁻¹ de DQO e 1500 mg.l⁻¹ de sulfato (DQO/sulfato ≈ 0,67). A caracterização microbiana foi realizada através da hibridação *in situ* fluorescente (FISH), microscopia óptica e eletrônica de varredura. Foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos específicas para Domínio Bacteria (EUB338), Domínio Archaea (ARC915) e bactérias redutoras de sulfato (BRS) da subdivisão δ -Proteobacteria (SRB385). Na espuma, carvão, polietileno e cerâmica houve predomínio de bactérias, com 76,2%, 79,5%, 85,7% e 59,6%, respectivamente. Espuma e carvão apresentaram maiores porcentagens de BRS, com 45% e 55%, respectivamente. O carvão apresentou ligeira vantagem sulfetogênica sobre os demais suportes, com redução de sulfato de 45% e remoção de DQO de 92%.

INTRODUÇÃO

As técnicas de Biologia Molecular para visualização direta de microrganismos em seu ambiente natural vêm sendo desenvolvidas e utilizadas para auxiliar na compreensão do comportamento microbiano. Por exemplo, aquelas baseadas em análises de DNA e RNA ribossomal (RNAr) podem complementar a abordagem microbiana convencional, na determinação da presença e distribuição de espécies individuais em comunidades complexas (Amann *et al.*, 1992; Raskin *et al.*, 1996). A combinação dessas técnicas com exames microscópicos e determinações de atividades metabólicas podem servir para se atingir maior compreensão entre a estrutura microbiana e a sua função fisiológica (Raskin *et al.*, 1996).

As sondas de oligonucleotídeos complementares às regiões específicas do RNAr são usadas, por exemplo, para quantificar populações microbianas naturais e identificar novos isolados, contribuindo para aumentar a precisão no isolamento da cultura e identificação fenotípica.

Neste trabalho foi avaliada a estrutura da comunidade microbiana (porcentagem, diversidade e morfologia) de reatores anaeróbios diferenciais horizontais, preenchidos com quatro diferentes materiais suportes visando a sulfetogênese, com ênfase na aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

SYSNO 1349412
PROD 003569

ACERVO EESC

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro reatores anaeróbios diferenciais horizontais, com volume unitário de 15 mL, foram mantidos em câmara termostatzada a 30°C (Figura 1). A dosagem do meio foi realizada através de bomba peristáltica, resultando em velocidade de escoamento superficial de 0,03 cm.s⁻¹ nos reatores. O meio, simulando esgoto sintético, foi preparado como descrito por Torres (1992).

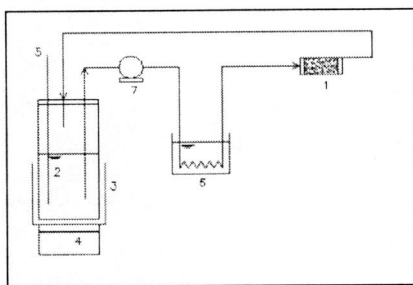


Figura 1. Desenho esquemático do aparato experimental: (1) reatores diferenciais horizontais, (2) reservatório para o meio a 5°C, (3) banho de gelo, (4) agitador magnético, (5) amostrador de meio, (6) recipiente de troca de calor a 30°C e (7) bomba peristáltica

O inóculo utilizado foi lodo granulado proveniente de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) usado no tratamento de resíduos de abatedouro de aves. O lodo foi mantido a -4°C até seu uso. O lodo foi homogeneizado em liquidificador doméstico e adicionado ao meio até resultar em 100 mg.L⁻¹ de sólidos totais voláteis (STV). Foram adicionados também sulfato de sódio (≈1500 mg.L⁻¹), soluções de sais e traços de metais. Os constituintes do meio foram adicionados de modo a obter DQO próxima de 1000 mg.L⁻¹, resultando na relação DQO/sulfato de aproximadamente 0,67. Cada sistema de quatro reatores foi preenchido com espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno reciclado de baixa densidade e cerâmica porosa à base de alumina, como suporte na imobilização da biomassa. As amostragens foram realizadas a cada 7 dias, em 28 dias de operação.

A caracterização microbiana foi realizada por microscopia óptica de contraste de fase e epifluorescência, eletrônica de varredura (MEV) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Para microscopia óptica, utilizou-se microscópio Olympus BX60-FLA com câmera acoplada para captura de imagem (*Optronics*), em software *Image Pro-Plus* versão 3.0.1. Para a análise sob MEV, a preparação das amostras foi executada de acordo com Varesche *et al.* (1997) e observadas em microscópio eletrônico de varredura LEO Mod. 440.

As sondas de oligonucleotídeos usadas para FISH (Ultra Chem Scientific Product) foram EUB338 (Domínio *Bacteria*; Amann *et al.*, 1990), NON338 (controle negativo; Manz *et al.*, 1992), ARC915 (Domínio *Archaea*; Stahl & Amann, 1991) e SRB385 (bactérias redutoras de sulfato (BRS) da subdivisão *δ-Proteobacteria*; Amann *et al.*, 1990), com marcação fluorescente rodamina na extremidade 5'. Foram utilizadas as metodologias de fixação e hibridação descritas por Araújo (2001). Antes de realizar a hibridação, os microrganismos foram desprendidos dos materiais suportes, em seguida as células foram submetidas por 1-3 minutos a 9000-12000 rpm em solução tampão fosfato salino. As amostras foram observadas em microscopia de fluorescência em Olympus BX60-FLA, usando filtros específicos para DAPI e rodamina. Para cada sonda e amostra foram quantificadas 800-1000 células coradas com DAPI e respectivas células hibridadas em 30 a 40 campos microscópicos aleatórios. A porcentagem de células hibridadas em cada campo microscópico foi calculada em relação ao número total de células coradas com DAPI.

Os resultados do FISH foram tratados estatisticamente pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a existência ou não de diferença significativa entre as comunidades microbianas detectadas pelas respectivas sondas. Em seguida, foi submetido ao pós-teste de Tukey para detectar onde ocorreram tais diferenças. Essa análise foi realizada com auxílio do software Minitab (versão 13).

A hidrofobicidade dos materiais suportes e do inóculo foi avaliada através da medida de ângulo de contato formado por uma microgota de água destilada com as respectivas superfícies. As imagens da gota com a superfície foram obtidas em microscópio ótico *MM Optics*, acoplado com câmera *LG Mod. CCM*. O ângulo de contato aparente, foi obtido traçando-se uma reta tangente à gota e o valor foi medido utilizando o software *CorelDRAW*. Essa técnica é semelhante à utilizada por Verrier *et al.* (1987).

A composição química dos materiais suportes foi observada através de espectroscopia dispersiva de raio X (EDX), em equipamento com detetor de Silício-Lítio, Oxford.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 estão apresentadas as estruturas dos materiais suportes observadas sob MEV. Foram observadas diferentes estruturas: a espuma de poliuretano e a cerâmica apresentaram superfícies porosas, o carvão vegetal apresentou cavidades na superfície e o polietileno, superfície lisa. Além disso, a espuma de poliuretano foi o único material compressível. Esses suportes foram selecionados devido à acessibilidade e ao baixo custo.

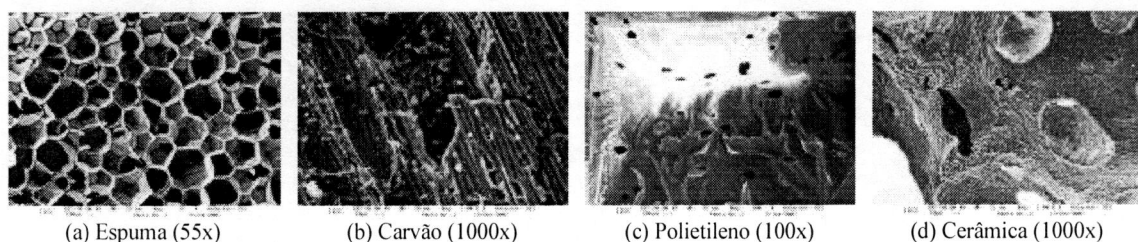


Figura 2. Materiais suportes observados sob MEV e suas respectivas magnificações.

A porcentagem em massa, através de EDX, foi obtida da média aritmética da observação em três pontos aleatórios de cada material. Os materiais eram compostos basicamente de carbono (55 a 72,4%) e oxigênio (21 a 45%), exceto a cerâmica, que era constituída à base de alumínio (57,6%). O carvão vegetal apresentou também presença de potássio (1,7%) e cálcio (1,5%). O polietileno, provavelmente por ser material reciclado, apresentou composição mais diversificada: carbono (72,4%), oxigênio (21%), flúor (9%), alumínio (0,5%) e cloro (0,6%). Essa análise foi importante para ilustrar a ausência de substâncias tóxicas ou outros compostos metálicos que poderiam interferir no processo de adesão nos suportes.

No lodo granulado as porcentagens médias de microrganismos detectadas pelas sondas EUB338 e ARC915 foram iguais a 44,8% (erro padrão - EP: 2,7%) e 59,5% (EP: 1,8%), respectivamente (Figura 3). Estes resultados indicaram um lodo predominantemente metanogênico. As arqueas metanogênicas predominantes foram os bacilos, filamentos e sarcinas. Essa condição metanogênica em lodo granulado foi também observada por Passig (1997), no estudo da degradação de compostos orgânicos em filtro anaeróbio biológico alimentado com esgoto sintético.

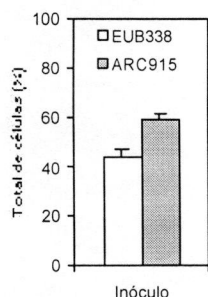


Figura 3. Composição da comunidade microbiana do inóculo. As porcentagens celulares são representadas pela quantidade de RNAr 16S microbiano para os membros do Domínio *Bacteria* (EUB338) e Domínio *Archaea* (ARC915). As barras indicam o erro padrão.

Durante a fase operacional as porcentagens de microrganismos detectados com a sonda EUB338 foram aproximadamente constantes, com médias de 76,2% (EP: 1,6%) e 79,7% (EP: 1,3%) para espuma de poliuretano e carvão vegetal, respectivamente (Figura 4a, b). As porcentagens de ARC915 variaram de 18,5% (EP: 3,6%) a 40,6% (EP: 4%) para amostras de espuma de poliuretano e de 18,8% (EP: 1,6%) a 28,4% (EP: 1,5%) para amostras de carvão. As porcentagens de BRS detectadas pela sonda SRB385 foram iguais a 58,3% (EP: 2,2%) e 69,7% (EP: 1,3%) para espuma de poliuretano e carvão vegetal, respectivamente (Figura 4a, b). Nas amostras de polietileno houve predomínio de bactérias, detectadas com a sonda EUB338 (média de 85,7%, EP: 2,2%) no período estudado. A porcentagem média de SRB385 contou com 38,1% (EP: 2,6%) (Figura 4c). As arqueas metanogênicas detectadas com a sonda ARC915 contaram com 22,9% (EP: 2,2%).

Dentre os suportes estudados, a cerâmica porosa foi o material que apresentou melhor equilíbrio entre bactérias totais (60,2%, EP: 1,0) e arqueas metanogênicas (41,9%, EP: 1,0%), como pode ser observado na Figura 4d. A porcentagem de SRB385 foi igual a 30% (EP: 1,1%). No entanto, em todas as amostragens deste material foi necessário concentrar as células antes de realizar a contagem através do FISH. Portanto, nas condições estudadas a cerâmica foi o material menos favorável à adesão microbiana do que os demais suportes.

A soma das porcentagens de células hibridadas com as sondas específicas para os Domínios *Bacteria* (EUB338), *Archaea* (ARC915) e *Eukarya* (EUK516) seria igual a 100, considerando que todas as formas vivas conhecidas pertencem a um desses três domínios (Woese *et al.*, 1987). A comunidade de *Eukarya* não é comumente encontrada no ambiente em estudo. Portanto, a soma de EUB338 e ARC915 seria aproximadamente igual a 100. Neste trabalho estes resultados variaram de 94,3% (amostra de polietileno: 14^o dia) a 121,4% (amostra de polietileno: 21^o dia). Essa subestimação e superestimação nos valores podem ter ocorrido devido à presença de polímeros, partículas abióticas e fragmentos do material suporte desprendidos no tratamento das células que interferiram na metodologia. Variações semelhantes na contagem foram observadas também por Araújo (2001).

Apesar do inóculo ser metanogênico (Figura 3), houve predomínio de bactérias já a partir do 7^o dia de operação do reator (Figura 4). Este fato pode ser explicado pela condição nutricional do meio, condições de operação dos reatores e tempo de duração dos ensaios. O meio era composto de extrato de carne, amido solúvel, sacarose, óleo de soja, bicarbonato de sódio, solução de sais (cloretos de sódio, magnésio e cálcio) e foi submetido à atmosfera de N₂ (100%). No entanto, a manutenção e crescimento de arqueas metanogênicas, provavelmente requerem condições mais específicas, tais como anaerobiose estrita e fonte nutricional relacionado com presença de ácido acético, H₂/CO₂, ácido fórmico, metanol, metilaminas ou monóxido de carbono (Zehnder, 1988).

Os reatores operados com carvão e espuma apresentaram maiores porcentagens de BRS, com cerca de 70% e 58%, respectivamente (Figura 4a, b). Ou seja, esses suportes favoreceram o crescimento de BRS e conseqüentemente a sulfetogênese. Nas condições estudadas, houve redução de sulfato de aproximadamente 39% e 45%, com eficiência média de remoção de DQO de 86% e 92% nos reatores operados com espuma e carvão, respectivamente. Portanto, estes resultados estão de acordo com a análise do FISH, demonstrando que o carvão vegetal apresentou ligeira vantagem na redução de sulfato. Para os reatores operados com polietileno e cerâmica, as porcentagens de BRS foram menores, com cerca de 38% e 30%, respectivamente. As eficiências médias de remoção de DQO para polietileno e cerâmica foram 86% e 84%, respectivamente, porém não foi observada redução de sulfato.

Picanço (2000) avaliou biofilmes aderidos em quatro diferentes materiais suportes em reator anaeróbico de fluxo ascendente (filtro anaeróbico), sob condições mesofílicas, tratando esgoto sintético semelhante ao utilizado neste trabalho. Foi observada sensível diferença na quantidade de biomassa aderida nos suportes porosos (espuma e cerâmica) do que nos não-

porosos (PVC e tijolo refratário), devido possivelmente às diferentes capacidades de retenção e porosidade específica.

A cerâmica porosa apresentou maior porcentagem de arqueas metanogênicas e menor porcentagem de BRS. O polietileno, provavelmente por ser material não-poroso, apresentou condição menos favorável de retenção de arqueas metanogênicas. De acordo com Harendranath *et al.* (1996), os materiais com superfícies lisas, tais como PVC e porcelana, não mostraram nenhuma característica estrutural de adesão e crescimento microbiano; o material poroso apresentou maior área superficial de adesão do que o de superfície lisa. Ainda conforme os autores, carvão ativado granulado e espuma de poliuretano mostraram grande número de poros, e, portanto, capacidade para crescimento e retenção de microrganismos.

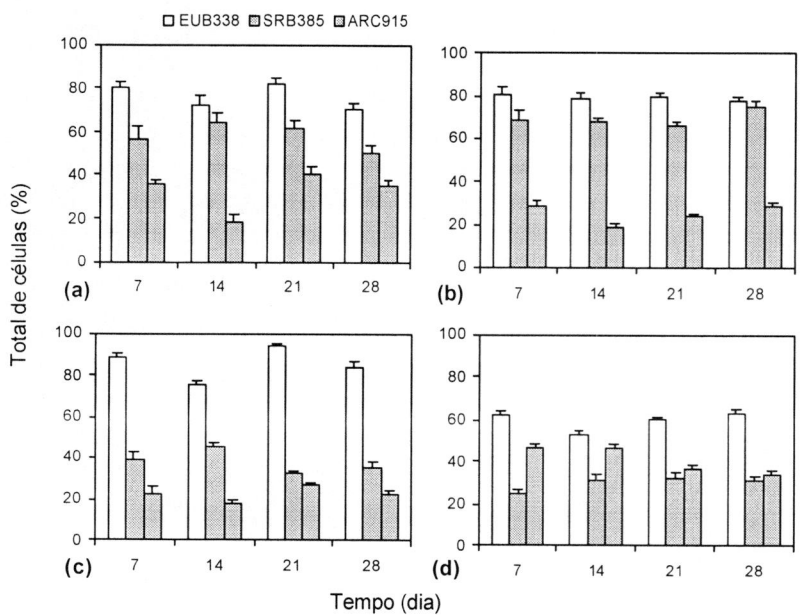


Figura 4. Composição da comunidade microbiana nas amostras de (a) espuma de poliuretano, (b) carvão vegetal, (c) polietileno e (d) cerâmica porosa durante a fase operacional. As porcentagens celulares são representadas pela quantidade de RNAr 16S microbiano para os membros do Domínio *Bacteria* (EUB338), bactérias redutoras do íon sulfato (BRS) da subdivisão delta de *Proteobacteria* (SRB385) e Domínio *Archaea* (ARC915).

Na Figura 5 estão ilustradas morfologias observadas sob MEV nos diferentes suportes.

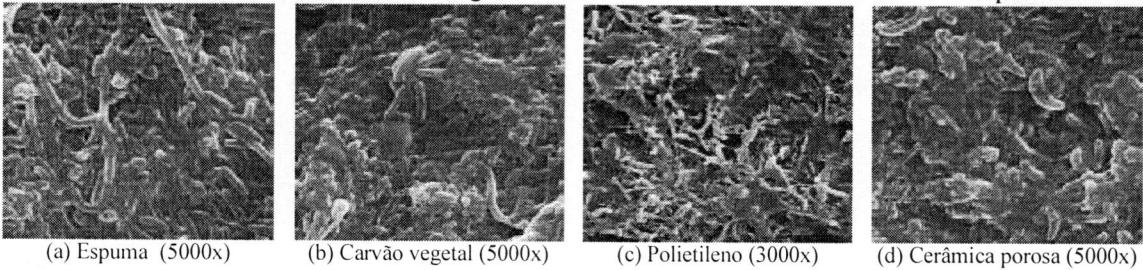


Figura 5. Morfologias observadas sob MEV nos materiais suportes dos reatores, com respectivas magnificações: (a) bacilos, cocos e filamentos; (b) bacilos com extremidades arredondadas e bacilos ovalados; (c) bacilos delgados; (d) bacilos curvos.

Resultados da análise estatística mostraram que houve diferenças significativas entre as comunidades de bactérias totais das amostras de cerâmica x carvão, espuma x cerâmica e polietileno x cerâmica. A porcentagem de BRS foi significativamente diferente de um material suporte para outro. Portanto, esses resultados, juntamente com a remoção de DQO e redução de sulfato, comprovaram que o carvão e a espuma foram mais favoráveis à sulfetogênese do que o polietileno e a cerâmica. Além disso, houve diferenças significativas nas porcentagens de arqueas metanogênicas em cerâmica x carvão e polietileno x cerâmica.

Como as condições operacionais dos reatores foram semelhantes para todos os suportes, a eficiência de adesão microbiana se deveu possivelmente às características dos materiais e

interações físico-químicas entre os materiais e o meio líquido. Porém, as interações entre superfícies bacterianas e sólidas em ambientes aquáticos envolvem uma diversidade de estratégias de colonização, composições da superfície microbiana, características da água residual e do material suporte.

As interações hidrofóbicas também podem ser importantes em casos de adesão inicial ou para promover a ocorrência de outras interações de adesão. As medidas de ângulo de contato, para avaliar a hidrofobicidade dos materiais, foram iguais a $19\pm3^\circ$, $101\pm9^\circ$, $89\pm10^\circ$ e $86\pm7^\circ$, para biomassa (inóculo), carvão vegetal, espuma de poliuretano e polietileno, respectivamente. Não foi possível medir o ângulo de contato da cerâmica por este método. Portanto, a superfície da biomassa foi hidrofílica e demais suportes apresentaram superfícies hidrofóbicas. Entretanto, essas medidas foram realizadas em água deionizada, o que pode apresentar característica de hidrofobicidade diferente quando em contato com outros meios líquidos. Araújo (2001), estudando a colonização microbiana de espécies de arqueas metanogênicas em vidro (superfície hidrofílica) e polipropileno (hidrofóbica), observou que a formação do biofilme estava relacionada com a colonização inicial em ambos os suportes. De acordo com o autor, as espécies estudadas aderiram ao mesmo tempo nos suportes, indicando que a superfície do material não interferiu significativamente na adesão microbiana.

No entanto, especificamente neste trabalho, o material ligeiramente mais hidrofóbico (carvão vegetal) apresentou maior diversidade microbiana e morfológica detectada pelo FISH e microscopia óptica. Além disso, o material suporte e a seleção microbiana favoreceram a sulfetogênese. Provavelmente, a combinação desses fatores contribuiu para essa eficiência.

Outra propriedade importante na adesão microbiana é a porosidade do material. O carvão vegetal (Figura 2b), além de ser material poroso também possui cavidades na superfície. Mendonça (1999) concluiu que o carvão ativado granulado foi o material que apresentou melhor capacidade de retenção de microrganismos devido à sua porosidade, presença dessas cavidades superficiais e alta capacidade de adsorção.

O tamanho dos poros também pode influenciar a adesão microbiana. A espuma de poliuretano era composta de macroporos comparado aos demais suportes, cuja porosidade é dada pela soma de alvéolos partidos (abertura superficial) e alvéolos intactos (Figura 2a). Ortega *et al.* (2001) observaram maior retenção de sólidos voláteis nos suportes porosos e com maior tamanho de poros. Segundo os autores, o tipo de poro afetou sensivelmente a colonização, ou seja, materiais com poros fechados foram colonizados apenas superficialmente, enquanto que materiais com poros abertos foram colonizados também em seu interior.

Os parâmetros principais que devem ser levados em conta na escolha do suporte são: permeabilidade, geometria, compressividade, resistência mecânica, sensibilidade ao cisalhamento, toxicidade, composição iônica e características hidrofóbicas / hidrofílicas (Bailey & Ollis, 1986). Dessa maneira, os materiais estudados apresentaram características essenciais de imobilização da biomassa. Apesar dos resultados serem mais favoráveis ao carvão vegetal, seguido da espuma de poliuretano, os demais suportes não devem ser descartados. Provavelmente, as condições operacionais, características do reator, da água residual, inóculo e tempo dos ensaios, objetivando a sulfetogênese, não tenham favorecido a adesão microbiana desejada. Portanto, para outras aplicações tecnológicas, os outros suportes podem ser estudados e aplicados.

CONCLUSÕES

Em todo período operacional dos reatores anaeróbios diferenciais horizontais houve predomínio de células do Domínio *Bacteria*, nos quatro materiais suportes estudados.

A análise do FISH revelou que o carvão vegetal apresentou maior porcentagem de BRS em relação aos demais suportes. Este resultado está de acordo com a maior redução de sulfato observada nos reatores operados com carvão vegetal, com eficiência média de remoção de DQO de 92%.

A cerâmica porosa foi o material que apresentou condição menos favorável à adesão de microrganismos nos reatores diferenciais em relação aos demais suportes.

A cerâmica porosa e o polietileno não favoreceram a sulfetogênese no período estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann, R. I.; Binder, B. J.; Olson, R. J. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:1919-1925.
- Amann, R. I.; Stromley, J.; Devereux, R.; Key, R.; Stahl, D. A. (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2):614-623.
- Araújo, J. C. (2001) Biofilmes Anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes, Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Bailey, J. E. & Ollis, D. F. (1986) *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition, McGraw-Hill, New York.
- Harendranath, C. S.; Anuja, K.; Singh, A.; Gunaseelan, A.; Satish, K.; Lala, K. (1996) Immobilization in fixed film reactors: an ultrastructural approach. *Water Science and Technology*, 33(8):7-15.
- Manz, W.; Amann, R.; Ludwig, W.; Wagner, M.; Schleifer, K. H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Environmental Microbiology*, 15:593-600.
- Mendonça, N. M. (1999) Caracterização do material suporte e estudo da partida de um reator anaeróbio de leito expandido utilizado no tratamento de esgoto sanitário. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Ortega, F. S.; Rocha, K. M.; Zaiat, M.; Pandolfelli, V. C. (2001) Aplicação de espumas de cerâmicas produzidas via "gelcasting" em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias. *Cerâmica*, 47(304):199-203.
- Passig, F. H. (1997) Estudo comparativo sobre a degradação de compostos orgânicos em biofilmes formados em meio suporte e grânulos desenvolvidos em um filtro biológico. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Picanço, A. P. (2000) Estudo da remoção de matéria orgânica específica e avaliação da atividade biológica dos grânulos e biofilmes formados em diferentes suportes em um reator anaeróbio. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Raskin, L.; Rittmann, B. E.; Stahl, D. A. (1996). Competition of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10):3847-3857.
- Stahl, D. A.; Amann, R. I. (1991) Development and application of nucleic acid techniques in bacterial systematics. v. 8. John Wiley & Sons, Ltd., London, England, p. 207-248.
- Torres, P. (1992). Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Varesche, M. B. A.; Zaiat, M. Vieira, L. G. T.; Vazoller, R. F.; Foresti, E. (1997) Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 48:534-538.
- Verrier, D.; Mortier, B.; Albagnac, G. (1987) Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. *Biotechnology Letters*, 9(10):735-740.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51:221-271.
- Zehnder, A. J. B. (1988) *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, Inc.