Daniele Vital Vich

**COMUNIDADE MICROBIANA E PRODUÇÃO DE
METANO EM REATOR ANAERÓBIO EM
BATELADA COM METILAMINA COMO FONTE
DE CARBONO**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutora em Ciências (Programa de
Engenharia Hidráulica e Saneamento).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Amâncio Varesche

São Carlos

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/ USP

V634c	<p>Vich, Daniele Vital</p> <p>Comunidade microbiana e produção de metano em reator anaeróbio em batelada com metilamina como fonte de carbono / Daniele Vital Vich ; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche. -- São Carlos, 2010.</p> <p>Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Engenharia Hidráulica e Saneamento) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.</p> <p>1. Tratamento biológico anaeróbio. 2. Arquéias metanogênicas. 3. Methanomethylovorans. 4. Metanogênese. 5. Metilamina. 6. Redução de sulfato. 7. Comunidade microbiana. I. Título.</p>
-------	--

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato (a): Bacharel **DANIELE VITAL VICH**

Tese defendida e julgada em 13/08/2010 perante a Comissão Julgadora:

Prof^a. Dr^a. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE** (Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovado

Prof. Dr. **MARCELO LOUREIRO GARCIA**
(Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"/UNESP/Campus de Rio Claro)

APROVADA

Prof. Dr. **ARTUR LUIZ DA COSTA DA SILVA**
(Universidade Federal do Pará/UFPA)

Aprovada

Prof. Dr. **ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA**
(Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"/UNESP/Campus de Jaboticabal)

Aprovada

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Hidráulica e Saneamento

Prof. Titular **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

***D**edico este trabalho a Deus, fonte inesgotável de inteligência, sabedoria, força,
coragem, amor e compaixão.*

*Aos meus amados pais José Roberto e Maria Isabel, ao meu irmão Junior e aos meus avós
Reinaldo, Aparecida, Irene e Waldomiro.*

*A toda minha família e a todos os meus amigos, que tornam esse momento ainda mais
importante e especial.*

*A todos os meus professores, da “EMEI Aracy Pereira Lopes”, da “EEPG Coronel
Paulino Carlos”, do “Colégio Objetivo São Carlos”, da “UNESP Rio Claro” e da “USP
São Carlos”, sem os quais essa Tese não existiria.*

*“Sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só,
mas sonho que se sonha junto é realidade.”*

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

À CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro durante a pesquisa.

À professora Maria Bernadete A. Varesche, pela orientação e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos professores do SHS, em especial Marcelo Zaiat, Eugênio Foresti e Wiclef Dymurgo Marra Junior, pela troca de conhecimentos e pelo agradável convívio.

Às técnicas do LPB, Eloísa, Janja e Isabel.

Aos funcionários do SHS, em especial Sá, Pavi, Rose, Flávia e Fernanda.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Processos Biológicos (LPB).

Ao professor Marcelo L. Garcia (Marcelinho), por me apresentar ao *software* ARB, pela colaboração nos trabalhos científicos e pela amizade.

Às meninas queridas do SHS: Lissa, Renata, Bruna, Lorena, Márcia, Cristina, Mercia, Ana Flavia, Tatiana, Juliana e Andreza.

Aos meninos queridos do SHS: Jorge, Alexandre, Gunther, Leonardo, Joel, Netto, Luiz Ricardo, Gustavo e Djalma.

Aos meus alunos de iniciação científica Alexandre e Eduardo, pela ajuda no laboratório e pela amizade.

Aos alunos de graduação mais lindos do mundo Rachel, Anne, Heber e Conrado. Obrigada pelos momentos divertidos e pela amizade.

Ao Tiagão, pela amizade sempre sincera.

Ao Cléber, pelo carinho e amizade de anos.

Ao querido Rafael (Ceri), pela amizade, solicitude e pelos momentos de descontração. Obrigada por aumentar minha coleção de ovelhas e por ser minha companhia nos mais variados passeios.

Ao querido Gláucio, que mesmo com toda a distância geográfica que nos separa, nunca esquece de nossa amizade. Você mora no meu coração.

Aos amigos queridos que carinhosamente chamo Bloco do Café. Glauce, Gabriel e Andrey, vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho. Obrigada pela amizade, pelas risadas, pelas conversas e por tornarem meus dias de trabalho mais felizes.

Ao querido Theo (Theozito), por ser uma das pessoas que melhor me conhece nesse mundo. Obrigada pela companhia diária, pelo carinho, pelo Brit, pelas ovelhinhas, pela paciência, por me emprestar seus conhecimentos quando solicitados, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e principalmente por estar presente e ser parte de todos os meus momentos felizes. Essa tese também é um pouquinho sua!

Ao meu primo Rogério, pela nossa linda amizade de 28 anos.

À minha querida prima Camila, amiga de todas as horas, que vi crescer, que me ajudou na montagem das tabelas de biologia molecular e que me acompanhou nos melhores (e piores) finais de semana, quase sempre no bar novo da Rua Sete de Setembro.

A todos os meus tios e primos, que cuidam de mim com tanto carinho e torcem pelo meu sucesso.

Aos melhores avós do mundo Reinaldo (Nardinho), Aparecida e Irene, por serem meu porto sempre seguro.

Ao meu avô Waldomiro (*in memorian*), por tudo o que vivemos juntos.

Ao meu pai José Roberto, minha mãe Maria Isabel, meu irmão Junior e meus “irmãozinhos” Lady e Marley. Obrigada por todo o amor, paciência e confiança.

A toda a minha família e a todos meus amigos que me acompanharam nesses 28 anos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

Resumo

VICH, D. V. (2010) **Comunidade microbiana e produção de metano em reator anaeróbio em batelada com metilamina como fonte de carbono.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

A degradação da metilamina foi investigada por meio da avaliação da velocidade específica máxima de produção de metano (VEM_{CH_4}) e da comunidade microbiana relacionada aos Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Para isso, foram realizados dois ensaios com reatores anaeróbios em batelada inoculados com lodo granulado oriundo de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves. Em todos os ensaios, os reatores controle, que não receberam adição de metilamina, apresentaram VEM_{CH_4} de $0,04 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. O primeiro ensaio avaliou a degradação da metilamina em diferentes concentrações de inóculo (2,5, 5,0 e $10,0 \text{ g STV L}^{-1}$) e substrato (1.550 e $3.100 \text{ mg metilamina L}^{-1}$). A concentração de CH_4 esperada estequiometricamente foi atingida em todos os reatores ($37,50$ e $75,00 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$, para concentrações de 1.550 e $3.100 \text{ mg metilamina L}^{-1}$, respectivamente), exceto para aquele com $2,5 \text{ g STV L}^{-1}$ e $3.100 \text{ mg metilamina L}^{-1}$, que produziu somente $2,04 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$. A maior velocidade específica máxima de produção de CH_4 foi $4,42 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, obtida nos reatores com $2,5 \text{ g STV L}^{-1}$ e $1.550 \text{ mg metilamina L}^{-1}$. Os reatores inoculados com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$ tiveram VEM_{CH_4} de $2,31$ e $2,34$ para 1.550 e $3.100 \text{ mg metilamina L}^{-1}$, respectivamente. Os reatores com $1.550 \text{ mg metilamina L}^{-1}$ e $10,0 \text{ g STV L}^{-1}$ apresentaram VEM_{CH_4} de $1,28 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. A concentração de $N-NH_4^+$ excedeu em $12,9\%$, $0,7\%$ e $18,3\%$ o valor esperado (698 mg L^{-1}) para os reatores com $1.550 \text{ mg metilamina L}^{-1}$ e $2,5$, $5,0$ e $10,0 \text{ g STV L}^{-1}$, respectivamente. Nos reatores com $3.100 \text{ mg metilamina L}^{-1}$, as concentrações finais de $N-NH_4^+$ foram 122 e 1.726 mg L^{-1} para concentrações de inóculo de $2,5$ e $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$, respectivamente. O segundo ensaio comparou diferentes relações metilamina/sulfato ($0,71$, $1,26$ e $2,18$) em reatores inoculados com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$ contendo $1.550 \text{ mg metilamina L}^{-1}$. As concentrações de CH_4 esperadas estequiometricamente foram atingidas em todos os reatores. As velocidades específicas máximas de formação de CH_4 foram de $2,54$, $2,31$ e $3,14 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para as relações metilamina/sulfato $0,71$, $1,26$ e $2,18$, respectivamente. Em todos os reatores, a concentração de $N-NH_4^+$ atingiu média final de 1200 mg L^{-1} . Os reatores controle consumiram $71,9\%$ do sulfato adicionado. Os reatores com relação metilamina/sulfato $0,71$, $1,26$ e $2,18$ consumiram $49,6\%$, $61,6\%$ e $83,2\%$ de todo o sulfato adicionado, respectivamente. Nos dois ensaios, os exames microscópicos revelaram a presença de cocos, bacilos, filamentos, cocos e sarcinas fluorescentes. Nos reatores alimentados apenas com metilamina, o sequenciamento de fragmentos da região 16S do rRNA detectou cinco Filos do Domínio *Bacteria* (*Acidobacteria* – 4% , *Firmicutes* – 11% , *Proteobacteria* – 14% , *Spirochaetes* – 13% e *Synergistes* – 47%). Nos reatores com metilamina e sulfato, sete Filos foram detectados (*Firmicutes* – 45% , *Proteobacteria* – 7% , *Spirochaetes* – 2% , *Synergistes* – 16% , *Chloroflexi* – 4% , *Thermotogae* – 8% e *Planctomycetes* – 1%). Nos dois ensaios, o Domínio *Archaea* foi predominantemente representado pelas Famílias *Methanomicrobiaceae*, *Methanosaetaceae* e *Methanosarcinaceae*, com presença de *Methanomethylovorans hollandica*, uma espécie de arqueia metanogênica com metabolismo especializado na degradação de metilamina.

Palavras-chave: tratamento biológico anaeróbio, arqueias metanogênicas, *Methanomethylovorans*, metanogênese, metilamina, redução de sulfato

Abstract

VICH, D. V. (2010) **Microbial community and methane production in anaerobic batch reactor with methylamine as carbon source**. PhD. (Thesis) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

The degradation of methylamine was investigated assessing the maximum specific methane production rate (MSR_{CH_4}) and the microbial community related to *Bacteria* e *Archaea* Domains. For this, two tests were performed in anaerobic batch reactors inoculated with granular sludge from an UASB reactor used in the treatment of poultry wastes. In all experiments, the control reactors, without methylamine addition, showed MSR_{CH_4} of $0.04 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g TVS}^{-1} \text{ day}^{-1}$. The first experiment evaluated the degradation of methylamine at different inoculum concentrations (2.5, 5.0 and $10.0 \text{ g TVS L}^{-1}$) and substrate concentrations (1,550 and $3,100 \text{ mg methylamine L}^{-1}$). The stoichiometrically expected CH_4 concentration was reached in all reactors (37.50 and $75.00 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$, for methylamine concentrations of $1,550$ and $3,100 \text{ mg methylamine L}^{-1}$, respectively), except for the reactor with 2.5 g TVS L^{-1} and $3,100 \text{ mg methylamine L}^{-1}$, that produced only $2.04 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$. The highest maximum specific methane production rate was $4.42 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g TVS}^{-1} \text{ day}^{-1}$, reached in the reactors with 2.5 g TVS L^{-1} and $1,550 \text{ mg methylamine L}^{-1}$. The reactors inoculated with 5.0 g TVS L^{-1} had MSR_{CH_4} of 2.31 and 2.34 for $1,550$ and $3,100 \text{ mg methylamine L}^{-1}$, respectively. The reactors with $1,550 \text{ mg methylamine L}^{-1}$ and $10.0 \text{ g TVS L}^{-1}$ had MSR_{CH_4} of $1.28 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g TVS}^{-1} \text{ day}^{-1}$. The NH_4^+ -N concentrations exceeded 12.9%, 0.7% and 18.3% the expected value (698 mg L^{-1}) for the reactors with $1,550 \text{ mg methylamine L}^{-1}$ and 2.5 , 5.0 and $10.0 \text{ g TVS L}^{-1}$, respectively. In the reactors with $3,100 \text{ mg methylamine L}^{-1}$, the final concentrations of NH_4^+ -N were 122 and $1,726 \text{ mg L}^{-1}$ for inoculum concentrations of 2.5 and 5.0 g TVS L^{-1} , respectively. The second experiment compared different methylamine/sulfate ratios (0.71, 1.26 and 2.18) on reactors inoculated with 5.0 g TVS L^{-1} containing $1,550 \text{ mg methylamine L}^{-1}$. The stoichiometrically expected CH_4 concentration was reached in all reactors. The maximum specific methane production rates were 2.54, 2.31 and $3.14 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g TVS}^{-1} \text{ day}^{-1}$ for methylamine/sulfate ratios of 0.71, 1.26 and 2.18, respectively. In all reactors, the average NH_4^+ -N final concentration was $1,200 \text{ mg L}^{-1}$. The control reactors consumed 71.9% of the added substrate. The reactors with methylamine/sulfate ratios of 0.71, 1.26 and 2.18 consumed 49.6%, 61.6% and 83.2% of all the added sulfate, respectively. In both experiments, the microscopic analysis revealed cocci, rods, filaments, fluorescent cocci and sarcinas. In the reactors fed with methylamine only, the sequencing of 16S rRNA fragments detected five Phyla of the *Bacteria* Domain (*Acidobacteria* – 4%, *Firmicutes* – 11%, *Proteobacteria* – 14%, *Spirochaetes* – 13% and *Synergistes* – 47%). In the reactors with methylamine and sulfate, seven Phyla were detected (*Firmicutes* – 45%, *Proteobacteria* – 7%, *Spirochaetes* – 2%, *Synergistes* – 16%, *Chloroflexi* – 4%, *Thermotogae* – 8% e *Planctomycetes* – 1%). In both experiments, *Archaea* Domain was mainly represented by *Methanomicrobiaceae*, *Methanosaetaceae* and *Methanosarcinaceae* Families, with the presence of *Methanomethylovorans hollandica*, a methanogenic archaea specie with specific metabolism for methylamine degradation.

Keywords: anaerobic biological treatment, methanogenic archaea, *Methanomethylovorans*, methanogenesis, methylamine, sulfate reduction,

Índice

Índice de figuras	i
Índice de tabelas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Metilamina	5
3.2. Vias Metanogênicas	6
3.3. Atividade Metanogênica Específica e Velocidade Específica Máxima de Produção de Metano	9
3.4. Degradação anaeróbia da metilamina	12
3.5. Bactérias Envolvidas na Degradação da Metilamina	16
3.6.1. Arquéias Metanogênicas	22
3.6.2. Arquéias Metanogênicas de Digestores Anaeróbios	28
3.7. A ordem Methanosarcinales	29
3.8. Diversidade Microbiana Presente no Lodo Granulado Usado como Inóculo	31
	33

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Configuração dos Reatores Anaeróbios	35
4.2. Metilamina	36
4.3. Condições Experimentais	36
4.3.2. Solução Traço de Metais	37
4.3.3. Solução de Vitaminas	38
4.4. Análises Físico-Químicas	39
4.5. Análise Cromatográfica	39
4.6. Avaliação da Velocidade Máxima Específica de Produção de Metano	40
4.7. Exames Microscópicos	41
4.8. Análises de Biologia Molecular	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Produção de Gases nos Reatores Anaeróbios em Batelada	44
5.1.1. Avaliação de Diferentes Concentrações de Inóculo e Metilamina	44
5.1.2. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato	50
5.1.3. Análise Comparativa dos Ensaios	54
5.2. Velocidade de Produção de Metano nos Reatores Anaeróbios em Batelada	61

5.2.1. Avaliação de Diferentes Concentrações de Inóculo e Metilamina	61
5.2.2. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato	66
5.2.3. Análise Comparativa dos Ensaio	71
5.3. Nitrogênio Amoniacal nos Reatores Anaeróbios em Batelada	73
5.3.1. Avaliação de Diferentes Concentrações de Inóculo e Metilamina	73
5.3.2. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato	74
5.3.3. Análise Comparativa dos Ensaio	75
5.4. Sulfato e Sulfeto nos Reatores Anaeróbios em Batelada	77
5.4.1. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato	77
5.5. Diversidade Microbiana nos Reatores Anaeróbios em Batelada	79
5.5.1. Avaliação de Diferentes Concentrações de Inóculo e Metilamina	79
5.5.2. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato	93
5.5.3. Comparação entre os dois ensaios	109
6. CONCLUSÕES	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

Índice de Figuras

Figura 3.1. Vias da metanogênese: hidrogenotrófica (setas azuis), acetoclástica (setas verdes) e metilotrófica (setas vermelhas).	8
Figura 3.2: Vias de degradação anaeróbia da metilamina.	14
Figura 3.3: Elétrons da via oxidativa são transferidos para a via redutora por carreadores de elétrons (<i>bacterial electron carriers</i> – BEC) presentes nos microrganismos. Dependendo da concentração de H_2 ambiente, BEC pode transferir elétrons a prótons via hidrogenase (H_2ase) para formar H_2 interno (H_2 int) ao invés de metano. Elétrons são transferidos do BEC pela via redutora em uma velocidade R_1 e pelo H_2 ext em velocidade R_2 .	15
Figura 3.4: Árvore filogenética baseada na comparação de seqüências do gene RNAr 16S. A linha tracejada para Nanoarchaeota indica a posição incerta da ramificação desse braço (Huber <i>et al.</i> , 2006).	21
Figura 4.1: Fluxograma experimental do ensaio com variações nas concentrações de inóculo e metilamina (MA).	34
Figura 4.2: Fluxograma experimental do ensaio com diferentes relações metilamina/sulfato.	35
Figura 5.1: Concentração de CH_4 e CO_2 ($mmol\ L^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com $2,5\ g\ L^{-1}$ de inóculo e sem metilamina (controle): (■,○) dados experimentais; (—, ---) ajuste linear.	45
Figura 5.2: Concentração de CH_4 e CO_2 ($mmol\ L^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com $2,5\ g\ L^{-1}$ de inóculo e com $1.550\ mg\ L^{-1}$ de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—, ----) ajuste sigmoidal de Boltzmann.	46
Figura 5.3: Concentração de CH_4 e CO_2 ($mmol\ L^{-1}$) ao longo do tempo no reator R1 com $2,5\ g\ L^{-1}$ de inóculo e com $3.100\ mg\ L^{-1}$ de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—, ---) ajuste linear.	46
Figura 5.4: Concentração de CH_4 e CO_2 ($mmol\ L^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com $5,0\ g\ L^{-1}$ de inóculo e sem metilamina (controle): (■,○) dados experimentais; (—,) ajuste linear.	47

-
- Figura 5.5:** Concentração de CH₄ e CO₂ (mmol L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com 5,0 g L⁻¹ de inóculo e com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—,) ajuste sigmoidal de Boltzmann. 48
- Figura 5.6:** Concentração de CH₄ e CO₂ (mmol L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com 5,0 g L⁻¹ de inóculo e com 3.100 mg L⁻¹ de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—,) ajuste sigmoidal de Boltzmann. 48
- Figura 5.7:** Concentração de CH₄ e CO₂ (mmol L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com 10,0 g L⁻¹ de inóculo e sem metilamina (controle): (■,○) dados experimentais; (—,) ajuste linear. 49
- Figura 5.8:** Concentração de CH₄ e CO₂ (mmol L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com 10,0 g L⁻¹ de inóculo e com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—,) ajuste sigmoidal de Boltzmann. 50
- Figura 5.9:** Concentração de CH₄ (a), CO₂ e H₂S (b) (mmol.L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores sem metilamina e com sulfato: (—, , ---) ajuste sigmoidal de Boltzmann. 51
- Figura 5.10:** Concentração de CH₄ (a), CO₂ e H₂S (b) (mmol.L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores com relação metilamina/sulfato 0,71: (—, , ----) ajuste sigmoidal de Boltzmann. 52
- Figura 5.11:** Concentração de CH₄ (a), CO₂ e H₂S (b) (mmol.L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores com relação metilamina/sulfato 1,26: (—, , ----, -·-·-) ajuste sigmoidal de Boltzmann. 53
- Figura 5.12:** Concentração de CH₄ (a), CO₂ (b) e H₂S (b) (mmol.L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores com relação metilamina/sulfato 2,18: (—,) ajuste sigmoidal de Boltzmann. 54
- Figura 5.13:** Concentração de CH₄ do ensaio de comparação entre diferentes concentrações de inóculo e metilamina (primeiro ensaio): ■ concentração estequiométrica; ■ máxima concentração experimental. 56
- Figura 5.14:** Concentração de CH₄ do ensaio de comparação entre diferentes relações metilamina/sulfato (segundo ensaio): ■ concentração estequiométrica; ■ máxima concentração experimental. 57

Figura 5.15: Concentrações de CO ₂ do ensaio de diferentes concentrações de inóculo e metilamina (primeiro ensaio): ■ concentração estequiométrica; ■ máxima concentração experimental.	57
Figura 5.16: Concentrações de CO ₂ do ensaio de diferentes relações metilamina/sulfato (segundo ensaio): ■ concentração estequiométrica; ■ máxima concentração experimental.	58
Figura 5.17: Velocidade de produção de CH ₄ (mmol L ⁻¹ dia ⁻¹) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 2,5 g STV L ⁻¹ e alimentados com 1.550 mg L ⁻¹ de metilamina: (a) – reator 1, (b) – reator 2.	62
Figura 5.18: Velocidade de produção de CH ₄ (mmol L ⁻¹ dia ⁻¹) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ e alimentados com 1.550 mg L ⁻¹ de metilamina: (a) – reator 1, (b) – reator 2.	63
Figura 5.19: Velocidade de produção de CH ₄ (mmol L ⁻¹ dia ⁻¹) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ e alimentados com 3.100 mg L ⁻¹ de metilamina: (a) – reator 1, (b) – reator 2.	63
Figura 5.20: Velocidade de produção de CH ₄ (mmol L ⁻¹ dia ⁻¹) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 10,0 g STV L ⁻¹ e alimentados com 1.550 mg L ⁻¹ de metilamina: (a) – reator 1, (b) – reator 2.	64
Figura 5.21: Concentração inicial (■) e final (■) de sólidos totais voláteis nos reatores alimentados com diferentes concentrações de metilamina e inóculo.	65
Figura 5.22: Velocidade específica máxima de produção de metano nos reatores alimentados com diferentes concentrações de metilamina e inóculo.	66
Figura 5.23: Velocidade de produção de CH ₄ (mmol L ⁻¹ dia ⁻¹) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ e alimentados com 1269 mg L ⁻¹ de sulfato: (a) – reator 1, (b) – reator 2, (c) – reator 3.	67

-
- Figura 5.24:** Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$, alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina e com relação metilamina/sulfato 0,71: (a) – reator 1, (b) – reator 2, (c) – reator 3 68
- Figura 5.25:** Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$, alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina e com relação metilamina/sulfato 1,26: (a) – reator 1, (b) – reator 2, (c) – reator 3, (d) – reator 4. 69
- Figura 5.26:** Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$ alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina e com relação metilamina/sulfato 2,18: (a) – reator 1, (b) – reator 2. 69
- Figura 5.27:** Concentração inicial (■) e final (■) de sólidos totais voláteis nos reatores alimentados com diferentes relações metilamina/sulfato. 70
- Figura 5.28:** Velocidade específica máxima de produção de metano nos reatores alimentados com diferentes relações metilamina/sulfato. 71
- Figura 5.29:** Concentrações iniciais, finais e teóricas de N-NH_4^+ nos reatores alimentados com diferentes concentrações de inóculo e metilamina: ■ N-NH_4^+ inicial, ■ N-NH_4^+ final, ■ N-NH_4^+ estequiométrico. 73
- Figura 5.30:** Concentração de nitrogênio amoniacal ao longo da operação dos reatores: □ – controle com sulfato; ○ - 0,71; ▲ - 1,26 e ▼ – 2,18 74
- Figura 5.31:** Concentração inicial, final e teórica de N-NH_4^+ nos reatores alimentados com diferentes relações metilamina/sulfato: ■ N-NH_4^+ inicial, ■ N-NH_4^+ final, ■ N-NH_4^+ estequiométrico. 75
- Figura 5.32:** Concentração de sulfato ao longo do tempo nos reatores anaeróbios em batelada: □ – controle (sem metilamina e com sulfato); ○ - 0,71; ▲ - 1,26 e ▼ – 2,18. 77
- Figura 5.33:** Concentração de sulfeto ao longo do tempo nos reatores anaeróbios em batelada: □ – controle (sem metilamina e com sulfato); ○ - 0,71; ▲ - 1,26 e ▼ – 2,18. 78

Figura 5.34: Concentração inicial e final de sulfato e sulfeto nos reatores alimentados com diferentes relações metilamina/sulfato: ■ S-sulfato inicial, ■ S-sulfato final, ■ S-sulfeto inicial, ■ S-sulfeto final.	79
Figura 5.35: Morfologias encontradas nos reatores anaeróbios: bacilos (a, b), filamentos (c), cocos (d, e, g, h) e sarcinas (f).	80
Figura 5.36: Estrutura da comunidade microbiana relacionada ao Domínio <i>Bacteria</i> dos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ e alimentados com 1.550 mg metilamina L ⁻¹ .	82
Figura 5.37: Estrutura da comunidade microbiana relacionada ao Domínio <i>Archaea</i> dos reatores inoculados com 5,0 STV g L ⁻¹ de e alimentados com 1.550 mg metilamina L ⁻¹ .	86
Figura 5.38: Árvore filogenética (Parsimônia Interativa - ARB) de amostras da biomassa retirada dos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ e alimentados com 1.550 mg metilamina L ⁻¹ . A barra indica 10% de divergência entre as seqüências de DNA).	91
Figura 5.39: Morfologias encontradas nos reatores anaeróbios: bacilos (a, d), filamentos (g), cocos (c, e, f, h) e sarcinas (b).	94
Figura 5.40: Estrutura da comunidade microbiana relacionada ao Domínio <i>Bacteria</i> dos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ , alimentados com 1.550 mg metilamina L ⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26.	95
Figura 5.41: Estrutura da comunidade microbiana relacionada ao Domínio <i>Archaea</i> dos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ , alimentados com 1.550 mg metilamina L ⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26.	103
Figura 5.42: Árvore filogenética (Parsimônia Interativa - ARB) de amostras da biomassa retirada dos reatores inoculados com 5,0 g L ⁻¹ de STV, alimentados com 1.550 mg L ⁻¹ de metilamina e submetidos à relação metilamina/sulfato=1,26. A barra indica 10% de divergência entre as seqüências de DNA.	107

Figura 5.43: Comparação entre os clones pertencentes aos Filos do Domínio *Bacteria* encontrados nos reatores inoculados com 5,0 g L⁻¹ de STV e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de STV (primeiro ensaio - ■) e nos reatores inoculados com 5,0 g L⁻¹ de STV, alimentados com 1.550 mg L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato=1,26 (segundo ensaio - ■).

Índice de Tabelas

Tabela 3.1: Habitats das arqueias metanogênicas	24
Tabela 3.2: Reações metanogênicas	25
Tabela 3.3: Características das famílias de <i>Methanosarcinales</i>	30
Tabela 4.1: Composição do meio basal Zinder	37
Tabela 4.2: Composição da solução traço de metais	38
Tabela 4.3: Composição da solução de vitaminas	38
Tabela 4.4: Variáveis analisadas e métodos de análise	39
Tabela 4.5: Características gerais dos diferentes iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos de RNAr 16S das comunidades microbianas de arqueia e bactéria, pela técnica da PCR	42
Tabela 4.6: Condições utilizadas no termociclador para a amplificação dos fragmentos do RNAr 16S com os diferentes iniciadores, pela técnica da PCR	43
Tabela 5.1: Valores médios de duração da fase <i>lag</i> e concentração máxima de CH ₄ e CO ₂ no <i>headspace</i> dos reatores anaeróbios em batelada	60
Tabela 5.2: Sólidos voláteis totais, velocidade máxima e velocidade máxima específica de produção de metano nos dois ensaios.	72
Tabela 5.3: Concentração inicial e final de nitrogênio amoniacal	76
Tabela 5.4: UTOS do Domínio <i>Bacteria</i> obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ e alimentados com 1.550 mg L ⁻¹ de metilamina e microrganismos relacionados	84
Tabela 5.5: UTOS do Domínio <i>Archaea</i> obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ e alimentados com 1.550 mg metilamina L ⁻¹ e microrganismos relacionados	90
Tabela 5.6: UTOS do Domínio <i>Bacteria</i> obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L ⁻¹ , alimentados com 1.550 mg metilamina L ⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26 e microrganismos relacionados	98

Tabela 5.7: UTOS do Domínio *Archaea* obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹, alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26 e microrganismos relacionados

104

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Sabino

1. INTRODUÇÃO

A metilamina é usada para diversas finalidades, dentre as quais se destacam: produção de inseticidas, herbicidas, fungicidas, surfactantes, explosivos, produtos farmacêuticos, químicos fotográficos, tintas, tecidos, solventes, borrachas e anti-corrosivos; inibição da polimerização de hidrocarbonetos durante a destilação; prevenção do enovelamento e coagulação em látex naturais e sintéticos; prevenção da polimerização em removedores de tintas.

Anaerobiamente, a metilamina é degradada pela via metilotrófica da metanogênese, realizada pelas arqueias metanogênicas. Essa via tem diversas variantes possíveis. A mais estudada é quando compostos com um carbono, ou seja, compostos C-1 (compostos que não têm ligação carbono-carbono), como metanol, metilaminas e metilsulfetos, podem ser usados tanto como doadores quanto como aceptores de elétrons (Van de Wijngaard *et al.*, 2002). Metano, dióxido de carbono e amônia não ionizada são os produtos obtidos a partir da utilização da metilamina sob tais condições.

No Laboratório de Processos Biológicos (LPB), pertencente ao Departamento de Hidráulica e Saneamento da USP de São Carlos (SHS/EESC-USP), as pesquisas voltadas à degradação da metilamina começaram em 2005 com estudos acerca da degradação do pesticida Aldicarbe sob condições anaeróbias, publicados na tese de Damasceno (2008). A degradação deste pesticida tem a metanogênese estimulada pela elevada hidrólise de N-metil carbamatos produzindo metilamina, que é usada subsequentemente por arqueias metanogênicas. Concomitante a pesquisa mencionada anteriormente, Vich (2006) estudou a atividade metanogênica específica (AME) e a comunidade microbiana de reatores anaeróbios em batelada inoculados com lodo granulado oriundo de reator UASB e metilamina como fonte de carbono. Nesse trabalho, o aumento da AME foi proporcional ao aumento das concentrações de metilamina. Os exames microscópicos revelaram semelhança de morfologias microbianas em todos os reatores estudados, com presença de sarcinas, bacilos, coco-bacilos, filamentos e cocos.

A AME pode ser definida como a capacidade máxima de produção de metano por consórcio de microrganismos anaeróbios, realizada em condições controladas de laboratório, para viabilizar a atividade bioquímica máxima de conversão de substratos orgânicos a biogás. A AME pode ser utilizada como um parâmetro de monitoramento da eficiência da população metanogênica presente em um reator biológico e, como tal, constitui-se, ainda, em importante ferramenta para o controle operacional de reatores anaeróbios (Foresti et al, 1999).

A diversidade de uma comunidade microbiana pode ser estudada por meio de técnicas dependentes de culturas. Entretanto, estes métodos não descrevem fielmente a comunidade que ocorre naturalmente, pois favorecem apenas os microrganismos capazes de crescer sob condições controladas e exigências nutricionais determinadas

pelo meio de cultivo. Sabendo-se que a dinâmica de crescimento da maioria dos microrganismos ainda é desconhecida, a aplicação, nas últimas duas décadas, de técnicas de Biologia molecular que investigam diretamente as amostras ambientais e independentem de culturas tem permitido uma melhor caracterização dos sistemas de biorreatores. O Laboratório de Processos Biológicos (LPB) tem realizado importantes trabalhos de identificação de microrganismos envolvidos em diferentes processos de tratamento, a partir de análises do gene RNAr 16S. Já foram investigadas as comunidades microbianas presentes em biorreatores destinados ao tratamento de surfactantes (Duarte, 2006; Oliveira, 2010), clorofenóis (Domingues, 2007), pesticidas (Damasceno, 2008), drenagem ácida de minas (Rodriguez, 2010), entre outros compostos.

Neste sentido, o presente trabalho visou determinar a atividade metanogênica específica da degradação anaeróbia de metilamina em reatores em batelada com diferentes concentrações de inóculo e metilamina como única fonte de carbono. A degradação da metilamina em presença de sulfato também foi avaliada em reatores com diferentes relações metilamina/sulfato, para verificação de variações físico-químicas e microbiológicas durante o processo. A comunidade microbiana presente nos diferentes ensaios foi avaliada por meio de clonagem e seqüenciamento de fragmentos da região 16S do RNA ribossomal. Todas as informações obtidas como resultados desta pesquisa serão úteis na compreensão das vias de degradação da metilamina e na caracterização de microrganismos anaeróbios relacionados aos Domínios *Bacteria* e *Archaea* presentes nesses reatores, já que são escassos os relatos científicos sobre a diversidade e fisiologia de microrganismos anaeróbios de ambiente tropical envolvidos na degradação de compostos de um carbono.

“Todos comem e bebem; são poucos os
que sabem distinguir os sabores.”

Confúcio

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar a comunidade microbiana e a influência da metilamina no potencial de formação de metano em reatores anaeróbios em batelada sob condições metanogênica e sulfetogênica.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a influência de diferentes concentrações de inóculo e metilamina na velocidade máxima específica de produção de metano;
- Determinar e comparar a velocidade máxima específica de produção de metano nos reatores metanogênicos e sulfetogênicos;
- Caracterizar a comunidade microbiana presente nos reatores por meio de exames microscópicos;
- Analisar filogeneticamente a comunidade microbiana dos reatores anaeróbios em batelada por meio do seqüenciamento parcial do RNA ribossomal 16S para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, ria, dance, chore e viva intensamente cada momento de sua vida, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charlie Chaplin

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Metilamina

A metilamina, CH_3NH_2 , possui peso molecular de $31,1 \text{ g mol}^{-1}$, ponto de ebulição de $-6,32^\circ\text{C}$ (760 mm Hg) e odor semelhante à amônia. É uma alquilo amina C_1 , industrialmente produzida a partir de metanol e amônia como matérias primas. A reação de síntese sempre resulta em três isômeros: mono, di e trimetilamina (Corbin *et al.*, 1997).

A metilamina é usada como composto intermediário na síntese de diversos produtos químicos agrícolas, como herbicidas, fungicidas, inseticidas, biocidas e acaricidas. Nesse contexto, um dos usos da metilamina é a produção de metilditiocarbamato, um fumigante e esterilizante de solos aplicado em plantações de batatas e tomates, além do uso doméstico em jardins. A metilamina também é usada na síntese de metil isocianato, que por sua vez é usado na fabricação dos agrotóxicos carbaryl, aldicarb, trimethocarb, carbofuran e carbosulfan.

Diversos produtos farmacêuticos possuem a metilamina como um composto intermediário de síntese. Dentre os fármacos que possuem metilamina em sua composição, destacam-se os analgésicos com efeitos sedativos e anti espasmódicos, tranqüilizantes, antidepressivos, relaxantes musculares, levotiroxina, adrenalina, efedrina e soluções de contraste de raio X, além de diversos produtos de uso veterinário.

A metilamina é usada como catalisador ou como matéria prima na produção de compostos com atividades catalíticas, como aditivo de combustíveis para melhorar o desempenho de motores, como matéria prima na indústria de higiene pessoal, como revelador fotográfico, como propelente para foguetes. É também usada no tratamento de gás natural e petróleo, na produção de explosivos aquosos, usados na indústria de mineração devido à facilidade e segurança no manuseio, na fabricação de resinas para desmineralização e deionização de água, na indústria de borracha, na fabricação de detergentes e surfactantes e na fabricação de tintas e solventes (Yaws, 2001).

Códigos de segurança, que avaliam compostos químicos, englobam a metilamina em suas classificações quanto à periculosidade. De acordo com esses códigos, a metilamina é considerada corrosiva, nociva, de alto risco à saúde e de inflamabilidade extrema (NIOSH/OSHA, 1981).

3.2. Vias Metanogênicas

Existem três diferentes vias de produção do metano, que variam quanto ao composto de carbono usado como substrato e quanto à fonte do potencial redutor (Figura 3.1). A via hidrogenotrófica é a mais difundida, sendo encontrada em todas as cinco ordens de arqueias metanogênicas: *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* e *Methanopyrales*. Essa via envolve a redução

do CO₂, com H₂ como doador de elétrons, e é composta por sete passos centrais (Reeve *et al.*, 1997). Formiato também pode ser convertido a metano por essa via, atuando como fonte de CO₂ e potencial redutor. Duas outras vias são encontradas na ordem Methanosarcinales, a acetoclástica e a metilotrófica.

Na via acetoclástica, o acetato é dividido em um grupo metil e CO, subseqüentemente oxidado para prover elétrons (Meuer *et al.*, 2002). O grupo metil da degradação do acetato é ligado à metanopterin (ou sarcinapterin, para *Methanosarcina*) antes de ser reduzido a metano em duas reações enzimáticas, homólogas às que ocorrem nos últimos dois passos da via hidrogenotrófica (Figura 3.1).

A via metilotrófica, também presente no gênero *Methanosphaera*, de Methanobacteriales (Van de Wijnngaard *et al.*, 2002), tem diversas variantes possíveis. A via mais estudada é quando compostos com um carbono, ou seja, compostos C₁ podem ser usados tanto como doadores quanto como aceptores de elétrons (Figura 3.1). Uma molécula dos compostos C₁ é oxidada (fazendo a via hidrogenotrófica na direção reversa, de metil-CoM a CO₂) provendo elétrons para a redução de três moléculas adicionais a metano. Entretanto, na presença de metanol e H₂/CO₂, algumas *Methanosarcinales* podem reduzir este composto C₁ usando apenas o último passo da via metanogênica hidrogenotrófica (metil-CoM a CH₄), tirando elétrons do hidrogênio (Figura 3.1).

Figura 3.1. Vias da metanogênese: hidrogenotrófica (setas azuis), acetoclástica (setas verdes) e metilotrófica (setas vermelhas).

Fonte: Adaptado de Graham e White (2002)

Para a síntese de cofatores, a metanopterina hidrogenase (*mptH*) desempenha papel importante na biossíntese de tetra-hidrofolato, e a metanopterina nitrogenase (*mptN*) está envolvida na biossíntese de metanopterina. Tetra-hidrofolato e metanopterina são dois transportadores intermediários de C_1 na metanogênese. A biossíntese da coenzima F_{420} se apoia nas *cof* enzimas (*cofC*, *cofD*, *cofE*, *cofG* e *cofH*). As *aks* enzimas (*aksA*, *aksD*, *aksE* e *aksF*) participam nos dois passos de elongação oxiácida da biossíntese da coenzima B_9 , a qual se associa à coenzima M na etapa final

da metanogênese. Esta última coenzima é o menor cofator orgânico conhecido, mas é um transportador de grupo metil essencial para a metanogênese; a coenzima M é produzida pelas *com* enzimas (*comA*, *comB*, *comC*, *comD* e *comE*).

Apesar das vias se iniciarem de maneiras diferentes, todas acabam no mesmo passo, a reação da metil-coenzima M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$) com uma coenzima secundária, denominada coenzima B (CoB-SH), para formação do metano (Graham e White, 2002).

3.3. Atividade Metanogênica Específica e Velocidade Específica Máxima de Produção de Metano

A atividade metanogênica específica (AME) pode ser definida como a capacidade máxima de produção de metano por consórcio de microrganismos anaeróbios, realizada em condições controladas de laboratório, para viabilizar a atividade bioquímica máxima de conversão de substratos orgânicos a biogás. A determinação da capacidade do lodo anaeróbio em produzir metano é importante porque a remoção de elétrons equivalentes, ou seja, compostos reduzidos causadores da demanda química de oxigênio (DQO) da água residuária a ser tratada, só ocorrerá de fato com a formação do metano, que por ser praticamente insolúvel em água e, portanto, escapa facilmente da fase líquida (Aquino *et al.*, 2007).

Desta forma, a AME pode ser utilizada como um parâmetro de monitoramento da eficiência da população metanogênica presente em um reator biológico e, como tal, constitui-se ainda em uma importante ferramenta para o controle operacional de reatores anaeróbios (Foresti *et al.*, 1999). O conhecimento da AME do lodo de determinado reator permite estabelecer, em última análise, a capacidade máxima de remoção de DQO da fase líquida, e por isso permite estimar a carga orgânica máxima que pode ser aplicada com minimização do risco de desbalanceamento do processo anaeróbio.

Fazendo uma análise inversa, a AME permite determinar a massa mínima de lodo anaeróbio a ser mantida no reator para a remoção de determinada carga orgânica aplicada. Consequentemente o conhecimento da AME possibilitaria a adoção de procedimentos mais racionais para o descarte de lodo de sistemas anaeróbios (Aquino *et al.*, 2007).

Os trabalhos de Valcke e Verstraete (1983), De Zeeuw (1984) e Dolfig e Bloemen (1985) foram pioneiros no desenvolvimento e uso dos testes de AME, como ferramenta de caracterização e avaliação de reatores anaeróbios. No Brasil, pesquisas sobre o teste de AME começaram a ser feitas cerca de dez anos depois. A tese de doutorado de Penna (1994) foi o primeiro trabalho que avaliou condições de incubação e implantação do teste de AME. Os artigos de Penna *et al* (1995) e Monteggia (1997) foram as primeiras comunicações científicas nacionais que discutiram a necessidade para a harmonização do teste de AME. Há na literatura diferentes protocolos para a determinação da atividade metanogênica de lodos anaeróbios. Os protocolos diferem entre si nos procedimentos adotados para a incubação do lodo e para a quantificação do metano produzido (Aquino *et al.*, 2007). Como não há um consenso em relação à melhor condição de incubação do lodo anaeróbio, bem como para a medição do metano produzido, não se pode sugerir um procedimento único para a determinação da AME.

Para se avaliar a atividade metanogênica de determinado lodo deve-se alimentá-lo com substrato que suporte apenas a atividade metabólica dos microrganismos metanogênicos. Cerca de 70% do metano produzido advém da clivagem do acetato durante metabolismo dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos. Os 30% restantes de metano são produzidos por microrganismos hidrogenotróficos a partir da redução do dióxido de carbono. Desta forma, muitos pesquisadores utilizam comumente sais de acetato ou ácido acético como substrato. O cálculo da AME através do uso de

apenas acetato como fonte de carbono e energia subestima em no mínimo 30% a capacidade máxima de produção de metano, uma vez que microrganismos hidrogenotróficos têm maiores velocidades de crescimento que os acetoclásticos (Harper e Poland, 1986; Pavlostathis e Giraldo-Gomez, 1991) e certamente estarão presentes em reatores reais devido à degradação de substrato mais complexo (proteínas, carboidratos e lipídeos) que resulta em produção de hidrogênio e gás carbônico.

No sentido de se avaliar a atividade metanogênica de ambos os grupos de microrganismos, acetoclásticos e hidrogenotróficos, alguns pesquisadores (Field *et al*, 1987; Florencio *et al*, 1993) utilizam uma mistura de ácidos graxos voláteis (AGVs), comumente constituída de acetato (C_2), propionato (C_3) e butirato (C_4), na proporção de 100:100:100 g L⁻¹, respectivamente. A DQO resultante da mistura de AGVs tem a proporção de 24,3:34,4:41,3 % para C_2 , C_3 e C_4 , respectivamente (Aquino *et al.*, 2007). Nesse caso, o teste avaliará não só a atividade dos microrganismos metanogênicos, mas também a capacidade sintrófica do sistema, ou seja, a atividade dos microrganismos que convertem propionato e butirato em acetato.

Em relação à concentração do substrato utilizado, é importante ressaltar que o teste de AME deve ser feito com excesso de substrato e nutrientes, de forma que a cinética de degradação se aproxime de uma reação de pseudo ordem zero, passando a depender apenas da concentração dos microrganismos (inóculo) presentes. Desta forma, o importante é que a concentração de substrato seja maior que o valor de K_s , que no caso dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos situa-se na faixa de 11 a 421 mg L⁻¹ de acetato (Harper e Pohland, 1986; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991). Sendo assim, 2 g L⁻¹ de acetato seria suficiente para garantir excesso de substrato e, de fato, essa concentração é o valor de referência recomendado por Monteggia (1997), que

concluiu que o uso de concentrações de 2 a 4 g L⁻¹ de ácido acético resultou em valores máximos de AME.

Segundo Penna (1994), para cada quantidade de biomassa, existe uma faixa adequada de quantidade de substrato, que varia com a natureza e atividade do lodo. Ou seja, a relação alimento/microrganismo que resulte em maior valor de AME deve ser pesquisada caso a caso. Além disso, Penna (1994) chega a sugerir a utilização, como substrato durante o teste, da própria água residuária que alimenta o reator que forneceu o lodo para o teste. Essa proposição decorre do fato do autor ter verificado que a AME obtida com a água residuária foi similar àquela obtida quando se usou uma mistura de AGVs como substrato (Aquino *et al.*, 2007).

Na presente pesquisa, para não haver conflito com os testes clássicos, que utilizam acetato, butirato e propionato, a denominação atividade metanogênica específica (AME), utilizada por Vich (2006) em ensaios semelhantes de degradação de metilamina, foi substituído pelo termo velocidade específica máxima (VEM), e teve por objetivo avaliar a condição que resulte na capacidade máxima de produção de metano pelo consórcio de microrganismos anaeróbios oriundos do lodo de inóculo, para viabilizar a atividade bioquímica máxima de conversão de metilamina a biogás.

3.4. Degradação anaeróbia da metilamina

Anaerobiamente, a metilamina é degradada pela via metilotrófica da metanogênese, realizada pelas arqueias metanogênicas. Essa via tem diversas variantes possíveis. A mais estudada é quando compostos C₁, como metanol, metilaminas e metilsulfetos, podem ser usados tanto como doadores quanto como receptores de elétrons (Van de Wijngaard *et al.*, 2002).

As vias de conversão de todos esses compostos a metano seguem caminhos semelhantes. O primeiro passo sempre é a transferência de um grupo metil do substrato para a coenzima M (CoM), formando metil-CoM. A CoM é metilada em uma reação catalisada por três proteínas. Usando a metilamina, um polipeptídeo de 52 KDa chamado monometilamina metiltransferase (MMAMT) metila o cofator corrinóide ligado a um segundo polipeptídeo, a monometilamina corrinóide peptídeo (MMCP). MMCP metilado serve então como substrato para metilcobamida: CoM metiltransferase *mtbA* (MT2-A), a qual metila a CoM (Burke *et al.*, 1998).

A metil -CoM é posteriormente oxidada a CO₂ ou reduzida a CH₄. Uma entre quatro moléculas de metil-CoM é oxidada a CO₂, fornecendo seis elétrons para a redução de três moléculas de metil-CoM a CH₄. A Figura 3.2 ilustra as vias de degradação anaeróbia da metilamina.

A degradação da metilamina produz metano, dióxido de carbono e amônia não ionizada, segundo a equação:

Esta estequiometria é observada quando o microrganismo usa todo seu poder redutor para gerar metano, sem perder H₂.

As reações metilotróficas não envolvem diretamente o H₂, mas são controladas pela concentração de H₂ devido à transferência de elétrons via enzima hidrogenase. A variação da concentração de H₂ pode influenciar a formação de produtos reduzidos e oxidados provenientes do metabolismo das arqueias metanogênicas. Menor concentração de H₂ extracelular aumenta a produção e perda por difusão do H₂ da célula metanogênica, resultando em mais produtos com carbono oxidado (Finke *et al.*, 2007).

Figura 3.2: Vias de degradação anaeróbica da metilamina

Fonte: Finke *et al.*, 2007

Elétrons do grupo metil são transferidos gradualmente da via oxidativa para a via redutora de degradação por carreadores de elétrons (*bacterial electron carriers* – BEC), como a coenzima F_{420} , resultando em um raio previsível de oxidação e redução de 1:3 (Figura 3.2, reação R_1). Uma perda alternativa de elétrons é gerada pela redução de prótons a H_2 catalisada pela hidrogenase (Meuer *et al.*, 2002). Essa redução, presente nos domínios *Archaea* e *Bacteria*, é reversível (Vignais *et al.*, 2001; Meuer *et al.*, 2002; Welander & Metcalf, 2005; Finke *et al.*, 2007).

A direção da catálise (redução de prótons a H_2 ou oxidação do H_2 a prótons) depende da diferença no potencial redox entre H_2/H^+ e $\text{BEC}_{\text{ox}}/\text{BEC}_{\text{red}}$. A constante de atividade das hidrogenases trabalha para equalizar o potencial redox nos dois sistemas para alcançar o equilíbrio. À medida que o pH intracelular (e conseqüentemente a concentração de H^+) é mantido constante, a direção da transferência de elétrons pelos carreadores depende diretamente da concentração de H_2 intracelular. A alta permeabilidade da membrana celular e o alto coeficiente de difusão do H_2 garantem

fluxo constante de H_2 dentro ou fora da célula, dependendo do gradiente de concentração. Portanto, a atividade dos carreadores é sujeita ao controle das concentrações de H_2 extracelular.

O grau do metabolismo oxidativo frente ao redutor nos substratos com grupo metil (% CO_2) é determinado por velocidades relativas de produção de CH_4 (R_1) e produção e perda de H_2 (R_2) (Figura 3.3). Essas representam o balanço entre velocidades de transporte de elétrons e transformação enzimática em cada uma das vias competidoras e da velocidade na qual H_2 é transferido através da membrana celular. Se a atividade da hidrogenase em relação à transferência de elétrons entre BEC e H_2 é rápida em comparação ao fluxo de H_2 transmembrana, o valor de porcentagem do CO_2 vai variar quase que exclusivamente com o fluxo de H_2 através da membrana, determinado pela concentração de H_2 extracelular. Deste modo, a diminuição das concentrações de H_2 extracelular deve favorecer R_2 e resultar no aumento correspondente da porcentagem de CO_2 (Finke *et al.*, 2007).

Figura 3.3: Elétrons da via oxidativa são transferidos para a via redutora por carreadores de elétrons (*bacterial electron carriers* – BEC) presentes nos microrganismos. Dependendo da concentração de H_2 ambiente, BEC pode transferir elétrons a prótons via hidrogenase (H_2ase) para formar H_2 interno (H_2 int) ao invés de metano. Elétrons são transferidos do BEC pela via redutora em uma velocidade R_1 e pelo H_2 ext em velocidade R_2 .

Fonte: Finke *et al.*, 2007

3.5. Bactérias Envolvidas na Degradação da Metilamina

Microrganismos do Domínio *Bacteria* podem utilizar a metilamina como substrato para seu crescimento. Dentre os diversos grupos microbianos, podemos destacar os organismos metilotróficos como principais degradadores de metilamina (Bowman, 2006).

Microrganismos metilotróficos são capazes de usar compostos C₁ como fonte de energia e carbono. Essa habilidade é encontrada dentro do Filo *Proteobacteria*, incluindo as subdivisões Alfa, Beta e Gama. Dentro de *Alfaproteobacteria* são encontrados quatro gêneros de microrganismos metilotróficos obrigatórios e facultativos restritos (*Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocapsa* e *Methylocella*) e um grande grupo, com mais de dez Gêneros, como *Methylobacterium*, *Methylopila* e *Hyphomicrobium*, com bactérias metilotróficas facultativas.

A subdivisão *Gamaproteobacteria* é representada por nove Gêneros de bactérias metanotróficas obrigatórias (*Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylothermus*, *Methylomicrobium*, *Methylosphaera*, *Methylobacter*, *Methylocaldum*, *Methylohalobius* e *Methylosarcina*) e três Gêneros de bactérias metilotróficas não metanotróficas (*Methylophaga*, *Marinobacterium* e *Pseudomonas*). *Betaproteobacteria* é representada por três Gêneros (*Methylobacillus*, *Methylophilus* e *Methylovorus*) dentro da família *Methylophilaceae* e por um único Gênero, *Methylibium*, dentro de *Burkholderiales* (Bowman, 2006).

Por exemplo, dentre essas metilotróficas, todas as espécies de *Paracoccus* são cocóides, com diâmetro entre 0,4 e 0,9 nm, ou cocobacilos com aproximadamente 2nm. Ocorrem como células isoladas, aos pares ou agrupadas. Todas são gram-negativas e a maioria das espécies é sésil. Todas as espécies crescem aerobiamente em ampla

variedade de substratos orgânicos e algumas espécies são capazes de crescer anaerobiamente com nitrato ou óxido nitroso como receptor final de elétrons, na redução desassimilativa a gás N₂. As espécies de *Paracoccus* capazes de usar a metilamina como substrato são *P. desnitrificans*, *P. versutus*, *P. kondratievae*, *P. methylovorus*, *P. kocurii*, *P. alkaliphilic* e *P. aminophilus* (Kelly *et al.*, 2006).

Methylobacterium é caracterizada pela presença de carotenóides de coloração rosa, estritamente aeróbias e metilotróficas facultativas. Ocorrem na forma de bacilos isolados ou em rosetas, são móveis e suas células são gram-negativas. Espécies capazes de crescer em metilamina como fonte de carbono ou nitrogênio são *M. zatmanii*, *M. extorquens*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. aminovorans*, *M. organophilum*, *M. chloromethanicum*, *M. dichloromethanum* e *M. thiocyanatum* (Green, 2006).

Doronina *et al.* (2003) descreveram uma nova espécie de *Methylophaga*, *M. natronica*, capaz de usar metilamina como fonte de carbono, além de metanol e frutose. Organismos pertencentes a este Gênero são bacilos aeróbios, metilotróficos facultativos, gram-negativos, móveis e se dividem por fissão binária. Crescem em meio alcalino, com bicarbonato de sódio ou cloreto de sódio. A metilamina é usada como fonte de carbono, junto com nitrato, glutamato, uréia e amônia. Espécies incluídas nesse Gênero capazes de usar a metilamina são *M. alcalica*, *M. marina*, *M. thalassica*, *M. sulfidovorans*.

Kalyuzhnaya *et al.* (2006) isolaram uma *Proteobacteria*, *Methylostenobacter mobilis*, que utiliza a metilamina como única fonte de carbono, energia e nitrogênio. Bactérias pertencentes a esse gênero são bacilos gram-negativos, móveis por meio de um único flagelo e se reproduzem por fissão binária. *M. mobilis* é aeróbia, apresenta as mesmas características aplicadas ao Gênero, cresce em temperatura de 30°C e em pH entre 5 e 8.5. Não é comumente encontrada em enriquecimentos tradicionais de laboratório, pois

é desfavorecida durante a competição com outros microrganismos que usam a metilamina. Seu metabolismo e genoma foram quase completamente descritos por meio de técnicas que desvendaram a comunidade microbiana complexa envolvida na dinâmica de compostos C_1 nos sedimentos do lago Washington (EUA) (Kalyuzhnaya et al, 2008).

Alain *et al.* (2010) isolaram uma Espécie de bactéria redutora de sulfato (BRS) capaz de usar metilamina como fonte de carbono. *Thermodesulfatator atlanticus*, isolada em fontes hidrotermais, é anaeróbia estrita e termofílica. Morfologicamente apresenta-se como bacilo gram-negativo de crescimento quimiolitotrófico, capaz de crescer com hidrogênio como fonte de energia e sulfato como receptor de elétrons, com crescimento entre 55 e 70°C, e pH entre 5,5 e 8,0.

3.6. Domínio *Archaea*

O trabalho pioneiro de Carl Woese na década de 70, usando dados de seqüências de pequenas subunidades do RNA ribossomal para classificar todas as formas de vida, levou à descoberta das arqueias (Woese e Fox, 1977). O Domínio *Archaea* representa uma terceira linhagem de descendência evolutiva, uma segunda linhagem procariótica, distinta do Domínio *Bacteria* bem como das células eucarióticas do Domínio *Eucarya*. Estudos seguintes à descoberta, acerca de dados bioquímicos e genéticos, deram sustentação ao sistema de reclassificação de Woese e, especificamente, à idéia de que os microrganismos englobados no Domínio *Archaea*, em muitos aspectos, se assemelham mais às células eucarióticas do que às células bacterianas (Woese *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1987; Woese, 1987; Allers e Meravech, 2005).

Os primeiros microrganismos de *Archaea* eram metanogênicos, halófilos extremos e termoacidófilos, como *Thermoplasma* e *Sulfolobus*. Logo no início, estabeleceu-se a noção de *Archaea* como organismo extremófilo. No entanto, a classificação das metanogênicas como extremófilas nunca foi convincente, pois são comumente encontradas no rúmen, intestino e digestores anaeróbios, que são *habitats* de muitas outras bactérias.

Análises de amplificação por PCR de genes do RNAr de uma variedade de *habitats* conduziram à compreensão da diversidade microbiana sem necessidade de isolamento em meios de cultura. A aplicação desta premissa para uma variedade de ambientes extremos e não extremos, por pesquisadores tais como Norman Pace e Edward DeLong, levou à descoberta surpreendente de que as *Archaea* estão presentes em proporções significativas ou até mesmo predominam em uma variedade de *habitats* extremos e também não extremos, como águas do oceano, sedimentos de água doce e solos (DeLong *et al.*, 1994. Barns *et al.* 1994, 1996, DeLong 1992, 2005).

A diversidade de sequências do gene RNAr de *Archaea*, em muitos casos, excedeu a estimativa de diversidade que havia sido determinada em trabalhos dependentes de cultura, e sugeriu fenótipos muito além das arqueias cultivadas, representadas por organismos metanogênicos, halofílicos extremos e termofílicos que metabolizam compostos de enxofre. Na verdade, a considerável divergência de sequências do gene RNAr foi tomada como um reflexo da diversidade fisiológica (DeLong 1998b).

O número absoluto de arqueias presentes em muitos *habitats* as coloca como principais integrantes dos ecossistemas globais. Porém, essas arqueias de ambientes não extremos são resistentes ao cultivo e transformam suas contribuições fisiológicas e ecológicas em um jogo de adivinhação (DeLong 1998a, 1998b). Amostras ambientais

analisadas por metodologias independentes de cultura levaram à detecção generalizada de arqueias em ambientes não extremos e comprovaram que representantes do Domínio *Archaea* estão por toda parte (Olsen, 1994, DeLong 1998a, 1998b).

O Domínio *Archaea* é formado por dois filos principais, Crenarchaeota e Euryarchaeota (Figura 3.4). A última edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrrity *et al.*, 2002) reconhece que as Crenarchaeota cultiváveis dividem-se em quatro ordens: *Caldisphaerales*, *Desulfurococcales*, *Sulfolobales* e *Thermoproteales*. Todas as culturas puras desse filo são termofílicas, com exceção das arqueias que oxidam amônia em baixas temperaturas (Könneke *et al.*, 2005). Dentre os microrganismos termofílicos de Crenarchaeota, há representantes aeróbios e anaeróbios com ampla diversidade de fisiologias, incluindo quimioheterotróficos, quimiolitotróficos e fermentativos.

Os organismos cultiváveis do filo Euryarchaeota são aparentemente mais diversos em relação à tolerância ambiental, pois nele há representantes mesofílicos, termofílicos, hipertermofílicos e halofílicos extremos. Estão inclusas em Euryarchaeota várias ordens de microrganismos metanogênicos (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* e *Methanopyrales*), assim como halofílicos extremos (*Halobacteriales*), redutores de sulfato (*Archaeoglobales*) e vários termofílicos (*Thermococcales* e *Thermoplasmatales*). Em adição a esses dois principais braços de *Archaea*, dois filos foram propostos. O primeiro, Korarchaeota, foi detectado e reconhecido somente por análises do gene RNAr 16S de várias amostras ambientais datadas anteriormente aos estudos de Barns *et al.*(1994,1996). Até 2006, nenhum membro desse filo havia sido cultivado (Chaban *et al.*, 2006). Um segundo filo adicional, Nanoarchaeota, foi proposto para nano simbiontes hipertermófilos que crescem aderidos à superfície de espécies de *Ignococcus* (Huber *et al.*, 2002c).

Figura 3.4: Árvore filogenética baseada na comparação de seqüências do gene RNAr 16S. A linha tracejada para Nanoarchaeota indica a posição incerta da ramificação desse braço (Huber *et al.*, 2006).

Além das conhecidas coleções de culturas de *Archaea* cultivadas, verificou-se ao longo da última década coleções de arqueias não cultivadas. Esses microrganismos são alocados dentro de Crenarchaeota e Euryarchaeota, assim como em Korarchaeota. Sua detecção, por meios moleculares, indicou claramente o predomínio e a presumida importância das arqueias não restritas aos ambientes extremos (Olsen, 1994, DeLong, 1998b).

O estudo desses organismos, em muitos casos, é limitado à detecção de sua presença por meio de uma variedade de técnicas moleculares. Como as metodologias

evoluem, tanto nos métodos de cultivo como nos métodos de detecção molecular, é certo que a importância dessas espécies será desvendada (Chaban *et al.*, 2006)

Grandes dificuldades técnicas foram superadas até mesmo para amostras de ambientes extremos, como as de orifícios do fundo do mar em erupção, onde *Archaea* são encontradas. Outros obstáculos superados permitiram o cultivo de muitas arqueias de extremos de temperatura, pH e anaerobiose. Uma faceta estranha de investigação das arqueias certamente é a relativa facilidade com a qual pesquisadores têm sido capazes de obter culturas puras de diferentes arqueias de ambientes extremos, tais como orifícios marinhos hidrotermais e áreas vulcânicas, em comparação às águas do oceano e solos (Chaban *et al.*, 2006).

Com a vasta quantidade de novos dados associados aos já acumulados acerca da diversidade e distribuição das arqueias, pareceu oportuno reunir as informações de todos os subgrupos principais. Sedo assim, foram publicadas análises específicas sobre a ecologia ou habitats de grupamentos específicos de arqueias, tais como metanogênicas (Garcia *et al.*, 2000), halófilas extremas (Oren, 2002), ou hipertermófilas (Huber *et al.*, 2000a; Stetter, 1995) ou mesmo a compilação de informações sobre os habitats dos principais grupos de *Archaea* cultivadas e não cultivadas (Chaban *et al.*, 2006).

3.6.1. Arqueias Metanogênicas

Todas as arqueias metanogênicas precisam de um potencial redox extremamente baixo para crescerem (-0,3 V; Zinder, 1993) e, portanto, os habitats das metanogênicas são restritos àqueles típicos de anaerobiose extrema, mas não se restringe àqueles limitados à luz, sulfato, nitrato e contendo materiais orgânicos complexos (Deppenmeier, 2002). Apesar disso, o subgrupo de *Archaea* composto pelas arqueias

metanogênicas, consegue habitar grande variedade de ambientes que também podem coincidir com os ambientes dos outros dois subgrupos principais de *Archaea* cultivados, ou seja, hipertermófilos e halófilos extremos.

As metanogênicas foram encontradas em faixas de temperatura entre 0°C e mais de 100°C, com representantes psicrófilos, mesofílicos, termofílicos e hipertermófilos. Além disso, as metanogênicas foram encontrados em concentrações de NaCl variando de níveis de água doce a marinha e hipersalina. Diferentes metanogênicas podem ser encontradas em uma faixa de pH variando de moderadamente ácida até pH acima de 9. Um resumo das arqueias metanogênicas representativas de diferentes habitats é dada na Tabela 3.1.

Apesar da ampla diversidade filogenética das metanogênicas como um grupo, o número de substratos utilizados para metanogênese é extremamente pequeno (Tabela 3.2), e para muitos microrganismos é limitada a um ou dois substratos. A maioria dos compostos utilizados para a síntese de CH₄ são simples, muitas vezes contendo apenas um carbono. Os substratos mais comuns para a metanogênese incluem CO₂/H₂, formiato e acetato, embora mais raramente é utilizado metanol, metilaminas, dimetilsulfetos e CO (Tabela 3.2). Em alguns casos, álcoois superiores podem atuar como doadores de hidrogênio (2 propanol/CO₂, 2-butanol/CO₂; Widdel, 1986; Zellner e Winter, 1987).

Vários metais, incluindo Fe, Al e Zn, podem também atuar como doadores de elétrons para a metanogênese a partir do CO₂ (Daniels *et al.*, 1987; Belay e Daniels, 1990). A maioria das arqueias metanogênicas (denominadas hidrogenotróficas) pode reduzir CO₂ a CH₄ utilizando H₂ como redutor. A bioquímica e enzimologia das reações metanogênicas (Tabela 3.2) nos vários substratos têm sido extensivamente revistas (Keltjens e Vogels, 1993; Zinder, 1993; Thauer, 1998; Ferry, 1999; Deppenmeier, 2002).

Tabela 3.1: Habitats das arqueias metanogênicas

Habitats das arqueias metanogênicas	Gêneros representativos
Intestino humano	<i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanosphaera</i>
Boca humana	<i>Methanobrevibacter</i>
Rumem	<i>Methanobacterium</i>
Intestino posterior de insetos	<i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanomicrococcus</i>
Endossimbiontes	<i>Methanoplanus</i>
Árvores	<i>Methanobrevibacter</i>
Campos de arroz	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanosaeta</i> , <i>Methanosarcina</i>
Turfeiras	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanospirillum</i>
Solos	<i>Methanosarcina</i>
Sedimentos de água doce	<i>Methanoculleus</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanomethylovorans</i>
Águas quentes e geisers	<i>Methanothermobacter</i> , <i>Methanothermus</i>
Ambientes altamente salinos	<i>Methanocalculus</i> , <i>Methanohalophilus</i>
Lagos alcalinos	<i>Methanosalsum</i>
Pântanos salobros	<i>Methanococcus</i> , <i>Methanococcoides</i> , <i>Methanlobus</i>
Sedimentos marinhos	<i>Methanococcus</i> , <i>Methanogenium</i> , <i>Methanoculleus</i>
Respiradouros hidrotermais	<i>Methanocaldococcus</i> , <i>Methanopyrus</i> , <i>Methanotorris</i>
Reservatórios de petróleo	<i>Methanothermococcus</i> , <i>Methanobacterium</i>
Regiões polares	<i>Methanococcoides</i> , <i>Methanogenium</i>
Subsuperfícies profundas	<i>Methanosarcina</i> , <i>Methanobacterium</i>
Digestores de esgoto	<i>Methanosaeta</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanobacterium</i>

Fonte: Chaban *et al.*, 2006

Tabela 3.2: Reações metanogênicas

Reação	Gênero representativo
$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	A maioria das metanogênicas: <i>Methanobacterium</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanopyrus</i> <i>Methanosarcina</i>
$4 \text{ Formiato} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	<i>Methanococcus</i> <i>Methanogenium</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanocorpusculum</i>
$\text{Acetato} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanosaeta</i>
$\text{Metanol} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	<i>Methanosphaera</i> <i>Methanomicrococcus</i>
$4 \text{ Metanol} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanohalophilus</i>
$2 \text{ Etanol} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ Acetato}$	<i>Methanospirillum</i>
$4 \text{ 2-Propanol} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{ acetona} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	<i>Methanospirillum</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanocorpusculum</i>
$4 \text{ Metilamina} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_4^+$	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcoides</i> <i>Methanolobus</i>
$2 \text{ Dimetilamina} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ NH}_4^+$	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcoides</i> <i>Methanolobus</i>
$4 \text{ Trimetilamina} + 6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{ CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 4 \text{ NH}_4^+$	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcoides</i> <i>Methanolobus</i>
$2 \text{ Dimetilsulfeto} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{H}_2\text{S}$	<i>Methanomethylovorans</i> <i>Methanohalophilus</i> <i>Methanosalsum</i>
$4 \text{ CO} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2$	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanosarcina</i>

Fonte: Chaban *et al.*, 2006

As arqueias metanogênicas podem ser encontradas em três amplos ecossistemas (Garcia et al., 2000). Em habitats, tais como pântanos, turfeiras, campos de arroz, sedimentos de água doce e digestores, a matéria orgânica complexa é completamente degradada a CH_4 e CO_2 por meio da atividade combinada de uma variedade de diferentes organismos. Bactérias hidrolíticas e fermentativas degradam polímeros complexos (tais como polissacarídeos diversos) a H_2 , álcoois e ácidos graxos. Ácidos graxos e álcoois são posteriormente convertidos pelas bactérias sintróficas a acetato, H_2 e CO_2 . As bactérias acetogênicas também podem converter CO_2 mais H_2 em acetato. O CO_2/H_2 e acetato são então convertidos a CH_4 pelas metanogênicas, na etapa terminal do processo. Nestes habitats, cerca de um terço do CH_4 deriva do CO_2/H_2 , enquanto a maior parte (dois terços) deriva de acetato (Zinder 1993; Liesack et al. 2000).

Em habitats anaeróbios existe a concorrência por substratos, como o H_2 , por vários grupos de bactérias, como as redutoras de sulfato. Quando níveis suficientes de sulfato estão presentes, como nos ambientes marinhos, as redutoras de sulfato geralmente ganham a competição com as metanogênicas pela maior variedade de produtos de fermentação utilizados por elas como substratos. As BRS esses substratos a CO_2 enquanto reduzem sulfato a H_2S . Como consequência, a presença de sulfato resulta em inibição da síntese de CH_4 a partir de CO_2/H_2 e acetato. Essa inibição não acontece quando o substrato é metanol ou metilaminas (Oremland e Polcin 1982), denominados substratos não-competitivos, pois as redutoras de sulfato mostram pouca afinidade por eles, enquanto certos gêneros de arqueias metanogênicas (*Methanosarcina*, *Methanomethylovorans*, *Methanolobus* e *Methanococcoides*) podem usá-los para a metanogênese (Zinder, 1993; Garcia et al., 2000).

As metilaminas aparecem no ambiente marinho pela degradação bacteriana de compostos osmorregulatórios, como a glicina betaína, e são responsáveis pela formação

de 35 a 61% do metano presente nesses ambientes (King, 1984). O metanol pode aparecer como resultado da degradação anaeróbia de pectinas de plantas (Schink e Zeikus, 1980).

Outro tipo de *habitat* bem estudado para as metanogênicas é o rúmen e trato digestivo da maioria dos animais vivos (incluindo seres humanos e artrópodes). Nesse caso, a degradação da matéria orgânica complexa é incompleta, pois a maioria dos intermediários, especialmente os ácidos graxos voláteis, é absorvida pelo animal para sua nutrição. Neste ambiente, as metanogênicas hidrogenotróficas são especialmente importantes, pois possuem tempo de geração entre quatro e doze horas, e a maior fração de CH₄ é gerada por representantes de *Methanobrevibacter* e *Methanobacterium*. As arqueias metanogênicas crescem mais lentamente com acetato como substrato, com tempo de geração de aproximadamente 130 horas (Weimer, 1998). Essa lentidão impossibilita sua permanência no rúmen, onde o tempo de retenção é menor que um dia (Zinder, 1993). No entanto, metanogênicas que usam o acetato, como *Methanosarcina*, foram isoladas do rúmen, embora provavelmente elas estivessem metabolizando outros substratos no rúmen, com taxas de crescimento mais rápidas do que aquelas obtidas em acetato.

Finalmente, em alguns habitats (por exemplo, fontes termais), substratos para a metanogênese são formados a partir de processos geológicos na ausência de matéria orgânica. H₂ e CO₂ estão entre os gases que jorram destas fontes termais terrestres. Não surpreendentemente, quando metanogênicas são isoladas a partir destes ambientes, elas são espécies termofílicas hidrogenotróficas, tais como *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Zeikus *et al.*, 1980) e *Methanothermobacter fervidus* (Stetter *et al.*, 1981).

3.6.2. Arquéias Metanogênicas de Digestores Anaeróbios

Muitos estudos de grupos metanogênicos presentes em digestores foram publicados. Estes incluem aqueles que utilizam abordagens imunológicas (Macario e Conway de Macário, 1988), sondas de oligonucleotídeos (Raskin *et al.*, 1994) e métodos dependentes de culturas. O papel da metanogênese nos digestores anaeróbios é a etapa terminal na transformação de materiais orgânicos complexos a CH₄. Este processo envolve uma complexa interação de organismos hidrolíticos e fermentativos, bactérias oxidadoras de ácidos graxos (muitas vezes sintróficas) e bactérias acetogênicas, antes da atividade das metanogênicas (Schink, 1997).

Metanogênicas utilizadoras de hidrogênio e formiato são fundamentais para a remoção de produtos finais, principalmente hidrogênio, que causa a inibição das bactérias sintróficas (Conrad, 1999). A maioria dos estudos revela uma variedade de arqueias metanogênicas acetoclásticas, especialmente *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, e aquelas que utilizam CO₂/H₂ e formiato, como *Methanogenium*, *Methanobrevibacter* e *Methanobacterium*. Oito espécies diferentes de arqueias metanogênicas (*Methanosarcina barkeri*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter arboriphilus*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus voltae*, *Methanotrix soehngenii* e *Methanotrix* sp.) já foram detectadas em um único reator mesofílico (Macario e Conway de Macario, 1988).

Estudos com de lodo de digestor anaeróbio mesofílico de uma estação de tratamento de esgoto francesa, com técnicas independentes de culturas, identificaram um novo grupo de arqueias metanogênicas. Esse novo grupo representou 66% de toda a biblioteca de 256 seqüências do gene RNAr 16S de *Archaea* (Chouari *et al.*, 2005) e foi

enriquecido por meio de ensaios de crescimento em formiato ou CO_2/H_2 . Os resultados indicaram que esses microrganismos formam uma linhagem separada dentro do grupo das metanogênicas. Sequências do gene RNAr 16S deste grupo foram similares às sequências recuperadas de diferentes ambientes, sugerindo ampla distribuição dessas arqueias ainda não cultivadas.

Digestores anaeróbios ainda são ricas fontes de novas espécies dentro dos principais gêneros de arqueias metanogênicas. *Methanobrevibacter acididurans* é uma arqueia metanogênica hidrogenotrófica ácido tolerante, isolada a partir de lodo de reator acidogênico (pH 5,0) usado no tratamento de água residuária de destilaria de álcool (Savant *et al.*, 2002). *Methanobacterium congolense* é uma arqueia metanogênica hidrogenotrófica isolada de um reator anaeróbio de fluxo pistonado, com pH 7,0 e temperatura de 35°C, usado no tratamento de resíduos de casca de mandioca crua (Cuzin *et al.*, 2001). *Methanoculleus palmolei* é uma arqueia metanogênica cocóide, isolada em reator termofílico (55°C) usado no tratamento da água residuária contendo óleo de palma, cem vezes mais recalcitrante que o esgoto doméstico (Zellner *et al.*, 1998).

3.7. A ordem *Methanosarcinales*

Os organismos da ordem *Methanosarcinales* são capazes de utilizar vasta gama de substratos orgânicos para a metanogênese (incluindo as metilaminas), podendo percorrer as vias hidrogenotrófica, metilotrófica e acetoclástica de degradação. Todavia, algumas espécies podem usar apenas uma das vias metabólicas, enquanto outras utilizam as três vias.

Representantes desse grupo estão presentes em ambientes anaeróbios, sendo encontrados em água corrente, lama e sedimento marinhos, rúmen de ungulados, lagoas

de dejetos animais, lodo de reatores de digestão anaeróbia e fezes de animais. Sequências genéticas do RNAr 16S que aparentemente pertencem a organismos da ordem *Methanosarcinales* foram detectadas em águas presentes nas fissuras de minas de ouro da África do Sul (Takai *et al.*, 2001), encanamentos de gás industriais (Zhu *et al.*, 2003) e na cavidade periodontal humana (Robichaux *et al.*, 2003).

Quanto à morfologia, membros dessa ordem podem ser cocóides, pseudosarcinas ou bacilos embainhados. A maioria das células possui parede celular protéica, algumas vezes envolta por bainha ou heteropolissacarídeo. Na parede celular não há presença de peptideoglicana ou pseudomureína. As células são estritamente anaeróbias, e obtêm energia com a concomitante produção de metano. A ordem *Methanosarcinales* compreende duas famílias, *Methanosarcinaceae* e *Methanosaetaceae*. Suas características distintivas estão listadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Características das famílias de *Methanosarcinales*

FAMÍLIA	CARACTERÍSTICAS
<i>Methanosarcinaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Cocóides ou pseudosarcinas; - Algumas células podem usar acetato e algumas podem reduzir CO₂ com H₂ como substrato catabólico; - Nenhuma cataboliza formiato; - Algumas células são gram-positivas e outras são gram-negativas; - Células móveis ou sésseis; - Lipídeos contêm mio-inositol, etanolamina e glicerol como grupos polares; - % C+G = 36-46; - Habitats incluem sedimentos aquáticos, digestores de lodo anaeróbios e trato gastrointestinal de animais.
<i>Methanosaetaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Bacilos embainhados; - Acetato é o único substrato catabólico; - Bainha gram-negativa; sésseis; lipídeos contêm mio-inositol, etanolamina e galactose como grupos polares; - % C+G = 49-54; - Habitats incluem sedimentos anaeróbios e digestores de lodo anaeróbios.

Fonte: Whitman *et al.*, 2001.

Arquéias pertencentes à Família *Methanosaetace* usam apenas o acetato como substrato catabólico. A Família *Methanosarcinaceae* é composta por microrganismos com células cocóides ou pseudosarcinais que podem obter energia pela transformação de compostos metilados, dentre eles a metilamina. Os Gêneros capazes de catabolizar a metilamina são *Methanosarcina*, *Methanomethylovorans*, *Methanolobus*, *Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Methanohalophilus* e *Methanosalsum* (Garcia *et al.*, 2000; Boone *et al.*, 2001).

3.8. Diversidade Microbiana Presente no Lodo Granulado Usado como Inóculo

O lodo granulado, proveniente de reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) usado no tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves (Avícola Dacar S/A, Tietê-SP), tem sido usado com inóculo em vários estudos do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) – SHS-EESC-USP, tais como trabalhos de Ribeiro (2001), Hirasawa (2003, 2007), Carmo (2004), Vich (2006), Sarti (2007) e Damasceno (2008) devido à sua diversidade microbiana.

Hirasawa (2007) caracterizou o lodo granulado de inóculo por microscopia óptica e por hibridação fluorescente *in situ* (FISH). Na caracterização morfológica, houve predomínio de bacilos com extremidades arredondadas, bacilos ovalados, bacilos delgados, cocos, filamentos e filamentos septados, além de arqueias metanogênicas semelhantes à *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. Foi observada também presença de bacilos e cocos fluorescentes. O resultado da quantificação microbiana na amostra de inóculo por meio de FISH revelou que o lodo granulado era predominantemente metanogênico, com 61,8% (erro padrão – EP: 3,1%) de microrganismos detectados com a sonda ARC915. As porcentagens de bactérias totais (detectados com a sonda

EUB338) e bactérias redutoras de sulfato – BRS (detectados com a sonda SRB385) contaram com 37,9% (EP: 1,4%) e 14,5% (EP: 0,8%), respectivamente. A condição metanogênica deste lodo granulado foi relatada anteriormente por Hirasawa (2003), cujas porcentagens médias de bactérias totais (EUB338) e arqueias metanogênicas (ARC915) foram iguais a 44,8% (EP: 2,7%) e 59,5% (EP 1,8%), respectivamente. Nesse trabalho, o autor não quantificou a porcentagem de BRS devido a problemas de homogeneização das amostras.

Sarti (2007), em seu trabalho de caracterização do lodo por microscopia óptica, encontrou as mesmas morfologias relatadas por Hirasawa (2007), com exceção dos bacilos fluorescentes. As porcentagens médias de microrganismos detectadas pelas sondas EUB338, ARC915 e SRB 385 foram, respectivamente, 49,8% (EP: 3,3%), 56,7% (EP: 3,2%) e 27,9 % (EP: 1,1%).

Segundo Raskin *et al.* (1994), a soma das porcentagens das células pertencentes aos Domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, hibridadas com as sondas ARC915, EUB338 e EUK516, respectivamente, deve ser igual a 100%. Entretanto, nos trabalhos de Hirasawa (2003, 2007) e Sarti (2007), foram usadas apenas sondas ARC915 e EUB338, pelo fato de organismos eucariontes geralmente não estarem presentes nos sistemas de tratamento anaeróbio. A somatória das células hibridadas com as duas sondas deveria ser 100%. Entretanto, muitas vezes esse valor é superestimado, como resultado da interferência da intensidade do sinal fluorescente, preparação da amostra e desprendimento dos arranjos celulares.

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

4. MATERIAL E MÉTODOS

O primeiro ensaio visou investigar a influência das concentrações de inóculo e de metilamina na velocidade específica de produção de metano, assim como caracterizar a comunidade microbiana relacionada aos Domínios *Bacteria* e *Archaea*. Para isso, foram adotadas diferentes concentrações de inóculo e de metilamina. A comunidade microbiana relacionada aos Domínios *Bacteria* e *Archaea* foi investigada nos reatores inoculados com 5,0 g L⁻¹ de sólidos totais voláteis (STV) e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina. A Figura 4.1 apresenta o fluxograma experimental dessa etapa.

Figura 4.1: Fluxograma experimental do ensaio com variações nas concentrações de inóculo e metilamina (MA).

O segundo ensaio objetivou verificar a velocidade específica de produção de metano em diferentes relações metilamina/sulfato, relativas às concentrações de massa, nos reatores com 5,0 g L⁻¹ de inóculo e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina. As relações estudadas foram de 0,71 (1.550 mg L⁻¹ de metilamina e 2183 mg L⁻¹ de sulfato), 1,26 (1.550 mg L⁻¹ de metilamina e 1230 mg L⁻¹ de sulfato) e 2,18 (1.550 mg L⁻¹ de metilamina e 711 mg L⁻¹ de sulfato). Os reatores controle, que não foram

alimentados com metilamina, receberam adição de 1269 mg L^{-1} de sulfato. Assim como no primeiro ensaio, a comunidade microbiana relacionada aos Domínios *Bacteria* e *Archaea* foi investigada, apenas nos reatores com relação metilamina/sulfato igual a 1,26. A Figura 4.2 apresenta o fluxograma experimental dessa etapa.

Figura 4.2: Fluxograma experimental do ensaio com diferentes relações metilamina/sulfato.

4.1. Configuração dos Reatores Anaeróbios

Para montagem dos reatores anaeróbios em batelada, foram empregados frascos de vidro Duran® de 2 litros, com 1 litro de volume reacional e 1 litro de *headspace*. Os frascos foram fechados com tampa de butila e rosca plástica com abertura central.

4.2. Metilamina

A metilamina é um gás à temperatura ambiente, com peso molecular de 31,1 g mol⁻¹, ponto de ebulição de -6,32°C (760 mm Hg) e odor semelhante à amônia. Nesse trabalho foi usado cloridrato de metilamina (CH₃NH₂-HCl), da Sigma-Aldrich®. Antes de cada ensaio, a solução estoque foi preparada na concentração 5M.

4.3. Condições Experimentais

Os reatores foram inoculados com lodo granulado oriundo de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dacar, Tietê-SP, Brasil). Antes da inoculação, os grânulos foram lavados em água corrente para remoção dos resíduos remanescentes do reator UASB, batidos em liquidificador para rompimento de sua estrutura e submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 15 minutos.

Os reatores foram alimentados com meio de cultivo basal (Tabela 4.1) descrito por Zinder *et al.* (1984), acrescido de solução traço de metais (Tabela 4.2) e solução de vitaminas (Tabela 4.3). O meio de cultura foi submetido à atmosfera de gás He (100%) por aproximadamente 20 minutos, tamponado com 1 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio e reduzido com 0,5 g L⁻¹ de sulfeto de sódio. Após adição da biomassa, os reatores foram submetidos ao esgotamento da matéria orgânica proveniente do inóculo, por meio da incubação dos frascos durante uma semana. Após esse período, gás He (100%) foi novamente fluxionado nos frascos para a troca do *headspace*. Metilamina e sulfato foram adicionados aos reatores de acordo com as necessidades de cada ensaio. A incubação foi realizada em temperatura de 30°C ± 1°C e agitação de 150 rpm

(Domingues, 2002). Após a adição da fonte de carbono, não houve mais despressurização dos frascos.

4.3.1. Meio Basal

O meio basal de cultivo (Zinder *et al.*, 1984) foi preparado em 1000mL de água ultrapurificada, e está descrito na Tabela 4.1. Os sais minerais e reagentes foram dissolvidos na ordem dada na tabela e submetidos à atmosfera de gás He (100%).

Tabela 4.1. Composição do meio basal Zinder

Componentes	Quantidade (q.s.p. 1000 mL)
NH ₄ Cl	0,5g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,4g
K ₂ HPO ₄	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05g
Solução Traço de Metais	10,0mL

Fonte: Zinder *et al.* (1984)

4.3.2. Solução Traço de Metais

A solução traço de metais foi preparada pela dissolução inicial de Tritriplex III em 200mL de água ultrapurificada. Elevou-se imediatamente o pH para 7,0 com solução de KOH 10% (m/v). Os demais sais foram dissolvidos na ordem e quantidade apresentada na Tabela 4.2, e o volume foi completado para 1000mL. A solução foi submetida à atmosfera de nitrogênio (100%) por 20 minutos, fechada sob anaerobiose, autoclavada a 121°C e 1atm durante 20 minutos e armazenada na ausência de luz e temperatura de 4°C.

Tabela 4.2. Composição da solução traço de metais

Componentes	Quantidade (q.s.p. 1000 mL)
Tritriplex III	4,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,086g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,17g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21g
H ₃ BO ₃	0,19g
NiCl ₂	0,02g
Na ₂ MoO ₄	0,01g

Fonte: Zinder *et al.* (1984)

4.3.3. Solução de Vitaminas

A solução de vitaminas foi preparada adicionando-se os ingredientes da Tabela 4.3 em 1000mL de água ultrapurificada previamente fervida por aproximadamente 15 minutos e submetida à atmosfera de N₂ (100%). A solução final foi esterilizada a frio em sistema Millipore com membrana de tamanho de poros de 0,22µm e armazenada em frascos sob condições de assepsia, em ausência de luz e temperatura de 4°C.

Tabela 4.3. Composição da solução de vitaminas

Componentes	Quantidade (q.s.p. 1000 mL)
Biotina	0,002g
Ácido Fólico	0,002g
Tiamina.HCl	0,005g
Riboflavina	0,005g
Ácido Nicotínico	0,005g
Pantotenato de Cálcio	0,005g
Piridoxina.HCl	0,010g
Vitamina B ₁₂	0,0001g
Ácido Lipóico	0,005g

Fonte: Touzel e Albagnac (1983); Dubourguier (1987)

4.4. Análises Físico-Químicas

As variáveis físicas e químicas monitoradas durante a realização dos ensaios, bem como os métodos utilizados, estão descritas na Tabela 4.4. As análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005). Nos ensaios da Etapa 1, as análises foram realizadas no início e ao término da operação dos reatores. Nos ensaios da Etapa 2, as variáveis foram monitoradas em intervalos de aproximadamente 72 horas.

Tabela 4.4. Variáveis analisadas e métodos de análise

Variável	Método	Protocolo APHA (2005)
pH	Eletrométrico	4500-H ⁺ B
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	Turbidimétrico	4500-SO ₄ ²⁻ E
Sulfeto (S ²⁻)	Azul de Metileno	4500-S ²⁻ D
N-amoniaco	Fenato	4500-NH ₃ F
Sólidos Totais, Sólidos Totais Voláteis (ST, STV)	Gravimétrico	2540 B (Sólidos Totais Secados a 103-105°C) 2540 E (Sólidos Fixos e Voláteis a 550°C)

4.5. Análise Cromatográfica

A concentração dos gases metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) e sulfídrico (H₂S) no *headspace* dos reatores foi monitorada por meio de cromatografia gasosa. Foi utilizado cromatógrafo Gow-Mac Instrument Co[®], modelo 69, com coluna Porapak-Q[®] (comprimento de 2,0 m e diâmetro interno de 1/4”) com detector de condutividade térmica, série 150. O gás de arraste usado foi o hidrogênio super seco.

Para o cálculo da concentração do gás metano ($\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$) foi preparada curva analítica de calibração.

4.6. Avaliação da Velocidade Máxima Específica de Produção de Metano

A determinação da velocidade máxima específica de produção de metano foi para avaliar o potencial da biomassa na conversão do substrato (fonte de carbono na forma de metilamina) em CH_4 . O ensaio constituiu na determinação, por cromatografia gasosa, da concentração de metano presente no biogás produzido no *headspace* dos reatores de 2000 mL. A metodologia usada para o cálculo da atividade metanogênica foi adaptada dos trabalhos de Araújo (1995), Oliveira (1997), Steil (2001) e Vich (2006).

Os valores das áreas de metano obtidas foram convertidos, por meio da equação da reta padrão, em mmols de CH_4 nas CNTP. Os valores de metano obtidos para 1 mL (volume retirado para a amostragem) foram convertidos para o *headspace* de cada frasco, a partir da seguinte equação:

$$\text{CH}_4 (\text{mmol}) = \frac{\text{CH}_4_{\text{amostra}} (\text{mmol}) V_{\text{headspace}} (\text{mL})}{V_{\text{injetado}} (\text{mL})} \quad (4.1)$$

Onde CH_4 (mmol) é a quantidade total de metano no headspace do reator, $\text{CH}_{4\text{amostra}}$ (mmol) é a quantidade de metano na amostra injetada no cromatógrafo, $V_{\text{headspace}}$ (mL) é o volume do headspace do reator e V_{injetado} (mL) é o volume de amostra injetado no cromatógrafo.

Usando o *software* ORIGIN[®] 7.5, foi traçada uma curva com os valores do metano no *headspace* (mmol L^{-1}) em função do tempo. Uma sigmóide de Boltzmann

(equação 4.2) foi ajustada aos dados experimentais, e a velocidade máxima de produção de metano foi determinada por meio de sua derivação. A determinação da velocidade máxima específica de produção de metano foi feita dividindo-se a velocidade máxima de formação de metano pela concentração de biomassa de cada reator.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (4.2)$$

Onde y é a variável dependente, x é a variável independente, A₁ é a assíntota horizontal esquerda, A₂ é a assíntota horizontal direita, x₀ é o ponto de inflexão e dx é uma constante de tempo.

4.7. Exames Microscópicos

As amostras examinadas ao microscópio foram aquelas provenientes do inóculo e a biomassa de todos os reatores anaeróbios em batelada. As amostras foram examinadas sob luz comum, contraste de fase e fluorescência. Uma gota de amostra foi colocada em fina camada de ágar 2% solidificado, disposto entre lâmina e lamínula, para diminuir o movimento das células. Foi usado microscópio Leica® DM LB, acoplado a câmara Leica® DC 200 e *software* Image-Pro plus® (versão 4.5.0.19).

4.8. Análises de Biologia Molecular

A avaliação da diversidade da comunidade microbiana foi realizada a partir de fragmentos do gene RNAr 16S, por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), clonagem, sequenciamento e análises filogenéticas. O DNA foi extraído segundo o protocolo de Melvin *et al.* (1994). A amplificação dos fragmentos de

DNA por PCR empregou iniciadores específicos para o Domínio *Bacteria* e *Archaea* (Tabela 4.5). As condições usadas no termociclador para os diferentes iniciadores estão expressos na Tabela 4.6.

A clonagem foi feita com pGEM[®] Easy Vector System I, de acordo com as especificações do fabricante. Os clones cresceram em meio LB e foram submetidos à PCR com iniciadores M13. Os produtos de PCR foram purificados com kit Illustra[®] GFX (*GE Healthcare*) e seqüenciados em seqüenciador automático 310 ABI Prism[®] (*Applied Biosystem*). As seqüências obtidas foram editadas no programa DNASTar[®] (*Lasergene Sequence Analysis*), alinhadas com microrganismos da base de dados do *Greengenes* (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-NAST_align.cgi) e analisadas filogeneticamente no software ARB[®] (Ludwig *et al.*, 2004).

Tabela 4.5: Características gerais dos diferentes iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos de RNAr 16S das comunidades microbianas de arqueia e bactéria, pela técnica da PCR

	Iniciadores	Seqüência (5' – 3')	Tamanho dos fragmentos amplificados	Referência
	M13F	GTA AAA CGA CGG CCAG		Messing (1983)
	M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC		
Domínio <i>Bacteria</i>	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	1073 pb	Lane (1991)
	1100R	GGG TTG CGC TCG TTG		
Domínio <i>Archaea</i>	46F	YTA AGC CAT GCR AGT	971 pb	Øvreas <i>et al.</i> (1997)
	1017R	GGC CAT GCA CCW CCT CTC		Barns <i>et al.</i> (1994)
	109F	ACK GCT CAG TAA CAC GT	825 pb	Grosskopf <i>et al.</i> (1998)
	934R	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT		

Para definição das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi usado o programa DOTUR[®] (Schloss e Handelsman, 2005). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada por meio do programa DNADIST (algoritmo do Kimura) do pacote PHYLIP[®] 3.63 (FELSENSTEIN: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), a partir do alinhamento feito usando-se o programa Clustal X[®] 2.0, com definições de parâmetros padrão. Os números de UTOs e de seqüências de cada UTO foram determinados considerando-se a distância evolutiva de 0,03.

Tabela 4.6: Condições utilizadas no termociclador para a amplificação dos fragmentos do rRNA 16S com os diferentes iniciadores, pela técnica da PCR

Iniciadores	Ciclos	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da Extensão	Resfriamento
M13F M13R	25	94°C 5 min	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 7 min	4°C
27F 1100R	15	94°C 2 min	94°C 1 min	69° C 30 s	72°C 3 min	-	-
	20	-	94°C 1 min	63°C 30s	72°C 3 min	72°C 7 min	4°C
46F 1017R	30	94°C 5 min	94°C 1 min	40°C 1 min	72°C 3 min	72°C 10 min	4°C
109 F 934 R	38	94°C 5 min	94°C 1,5 min	60°C 45 s	72°C 1,5 min	72°C 6 min	4°C

**“A natureza reservou para si tanta liberdade que
não a podemos nunca penetrar completamente
com o nosso saber e a nossa ciência.”**

Johann Wolfgang Von Goethe

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de Gases nos Reatores Anaeróbios em Batelada

5.1.1. Avaliação de Diferentes Concentrações de Inóculo e Metilamina

As concentrações de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) foram monitoradas durante trinta dias nos reatores montados em duplicata (R1 e R2) e submetidos a diferentes concentrações de metilamina e inóculo. Nos reatores inoculados com 2,5 g L⁻¹ de sólidos totais voláteis (STV) (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3), os reatores controle, que não receberam adição de metilamina apresentaram comportamento linear de produção de gases, com concentração final média de $3,62 \pm 0,15$ mmol L⁻¹ de CH₄ e $0,82 \pm 0,06$ mmol L⁻¹ de CO₂ (Figura 5.1).

Figura 5.1: Concentração de CH₄ e CO₂ (mmol L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com 2,5 g L⁻¹ de inóculo e sem metilamina (controle): (■,○) dados experimentais; (—, ---) ajuste linear.

Os reatores alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina e inoculados com 2,5 g L⁻¹ de STV atingiram concentrações finais médias de $38,5 \pm 2,45$ mmol L⁻¹ de CH₄ e $6,85 \pm 0,44$ mmol L⁻¹ de CO₂. Nesses reatores, a produção de gases teve comportamento sigmoidal, com fase *lag* de aproximadamente 15 dias (Figura 5.2).

Os reatores também inoculados com 2,5 g L⁻¹ de STV e alimentados com 3.100 mg L⁻¹ de metilamina tiveram comportamento linear de produção de gases, semelhante aos reatores controle, e acumularam 2,04 e 0,85 mmol L⁻¹ de CH₄ e CO₂, respectivamente (Figura 5.3). Nessa condição, uma das duplicatas foi perdida, devido ao rompimento do frasco R2 durante o fluxionamento de gás Hélio (He) 100%.

Figura 5.2: Concentração de CH_4 e CO_2 (mmol L^{-1}) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo e com 1.550 mg L^{-1} de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—, ----) ajuste sigmoidal de Boltzmann.

Figura 5.3: Concentração de CH_4 e CO_2 (mmol L^{-1}) ao longo do tempo no reator R1 com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo e com 3.100 mg L^{-1} de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—, ---) ajuste linear.

Os reatores inoculados com $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de STV também foram monitorados durante 30 dias. As concentrações de CH_4 e CO_2 acumuladas ao longo do tempo nesses reatores estão expressas nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6. Nos reatores controle, aos quais não foi adicionada metilamina, as concentrações finais médias acumuladas de CH_4 e CO_2

foram de $5,99 \pm 0,03$ e $1,97 \pm 0,04$ mmol L⁻¹, respectivamente. Nesses reatores, a curva de produção de gases teve comportamento linear (Figura 5.4).

Nos reatores alimentados com 5,0 g L⁻¹ de STV e 1.550 mg L⁻¹ de metilamina, as curvas de produção de gases apresentaram comportamento sigmoidal e a fase *lag* teve duração aproximada de sete dias. As concentrações finais médias de gases atingidas nesses reatores foram de $39,29 \pm 1,18$ mmol L⁻¹ de CH₄ e $7,72 \pm 0,42$ mmol L⁻¹ de CO₂ (Figura 5.5).

Figura 5.4: Concentração de CH₄ e CO₂ (mmol L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com 5,0 g L⁻¹ de inóculo e sem metilamina (controle): (■,○) dados experimentais; (—,.....) ajuste linear.

Nos reatores alimentados com 3.100 mg L⁻¹ de metilamina e inoculado com 5,0 g L⁻¹ de STV, a produção de gases também teve comportamento sigmoidal, com 12 dias de fase *lag* e concentrações médias finais de $76,29 \pm 1,43$ e $14,83 \pm 0,10$ mmol L⁻¹ de CH₄ e CO₂, respectivamente (Figura 5.6).

Figura 5.5: Concentração de CH_4 e CO_2 (mmol L^{-1}) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo e com 1.550 mg L^{-1} de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—,) ajuste sigmoidal de Boltzmann.

Figura 5.6: Concentração de CH_4 e CO_2 (mmol L^{-1}) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo e com 3.100 mg L^{-1} de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—,) ajuste sigmoidal de Boltzmann.

Os reatores inoculados com $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de STV foram monitorados durante 15 dias (Figuras 5.7 e 5.8). Os reatores controle, sem metilamina, também apresentaram curva de produção de gases com comportamento linear, com concentrações finais médias de CH_4 e CO_2 de $5,72 \pm 0,28$ e $2,43 \pm 0,19 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente (Figura

5.7). Nos reatores com 1.550 mg L^{-1} de metilamina, a curva de concentração de CH_4 e CO_2 em função do tempo teve comportamento sigmoidal, com valores finais médios de $37,48 \pm 0,43$ e $7,86 \pm 0,16 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.8). Nessa condição, a fase *lag* teve duração aproximada de cinco dias.

Não foi possível determinar a curva de produção de gases em função do tempo para os reatores inoculados com $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de STV e acrescidos de 3.100 mg L^{-1} de metilamina, pois a pressão dos gases no interior dos frascos ocasionou rompimento da tampa de butila, em todas as vezes em que o ensaio foi realizado.

Figura 5.7: Concentração de CH_4 e CO_2 (mmol L^{-1}) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo e sem metilamina (controle): (■,○) dados experimentais; (—,.....) ajuste linear.

Figura 5.8: Concentração de CH_4 e CO_2 (mmol L^{-1}) ao longo do tempo nos reatores R1 e R2 com $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo e com 1.550 mg L^{-1} de metilamina: (■,○) dados experimentais; (—,) ajuste sigmoidal de Boltzmann.

5.1.2. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato

No segundo ensaio, no qual foram testadas diferentes relações metilamina/sulfato (0,71, 1,26 e 2,18), os reatores anaeróbios em batelada inoculados com $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de STV e 1.550 mg L^{-1} de metilamina foram monitorados durante 40 dias (Figuras 5.9 a 5.12). Os reatores controle, que não receberam adição de metilamina, alimentados apenas com meio basal e 1269 mg L^{-1} de SO_4^{-2} , atingiram concentrações máximas de $2,14 \pm 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de CH_4 , $2,61 \pm 0,13 \text{ mmol L}^{-1}$ de CO_2 e $0,91 \pm 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ de gás sulfídrico (H_2S) (Figura 5.9).

Os reatores submetidos às relações metilamina/sulfato de 0,71, 1,26 e 2,18 apresentaram curvas de produção de gases com comportamento sigmoidal, com fase *lag* de aproximadamente 10 dias para todas as condições estudadas. As concentrações máximas de CH_4 atingidas nesses reatores foram de $38,83 \pm 0,36$, $38,03 \pm 1,19$ e $36,75 \pm 0,71 \text{ mmol L}^{-1}$ para as relações metilamina/sulfato de 0,71, 1,26 e 2,18,

respectivamente. As máximas concentrações de CO_2 nessa mesma seqüência de reatores foram de $8,83 \pm 0,52$, $8,30 \pm 0,84$ e $8,63 \pm 0,00 \text{ mmol L}^{-1}$ e as concentrações de H_2S foram de $1,18 \pm 0,04$, $0,93 \pm 0,07$ e $1,21 \pm 0,21 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente (Figuras 5.10, 5.11 e 5.12).

Figura 5.9: Concentração de CH_4 (a), CO_2 e H_2S (b) (mmol.L^{-1}) ao longo do tempo nos reatores sem metilamina e com sulfato: (—, , ----) ajuste sigmoidal de Boltzmann.

Figura 5.10: Concentração de CH_4 (a), CO_2 e H_2S (b) (mmol.L^{-1}) ao longo do tempo nos reatores com relação metilamina/sulfato 0,71: (—, ·····, ----) ajuste sigmoidal de Boltzmann.

Figura 5.11: Concentração de CH_4 (a), CO_2 e H_2S (b) (mmol.L^{-1}) ao longo do tempo nos reatores com relação metilamina/sulfato 1,26: (—, ·····, ----, -·-·-) ajuste sigmoidal de Boltzmann.

Figura 5.12: Concentração de CH₄ (a), CO₂ (b) e H₂S (b) (mmol.L⁻¹) ao longo do tempo nos reatores com relação metilamina/sulfato 2,18: (—,) ajuste sigmoidal de Boltzmann.

5.1.3. Análise Comparativa dos Ensaios

A degradação da metilamina pelas arqueias metanogênicas produz CH₄, CO₂ e amônia não ionizada, segundo a equação:

Nos dois ensaios, pode-se perceber que as concentrações de CH_4 atingiram os valores esperados estequiometricamente, independentemente das concentrações de inóculo, metilamina ou adição de sulfato, exceto para os reatores inoculados com 2,5 g L^{-1} de STV e alimentados com 3.100 mg L^{-1} de metilamina. Nesses reatores, a produção de CH_4 foi mais lenta quando comparada às demais condições e a concentração máxima obtida durante todo o ensaio (2,04 mmol $\text{CH}_4 \text{ L}^{-1}$) foi inferior à concentração de CH_4 dos reatores controles inoculados com a mesma concentração de inóculo ($3,62 \pm 0,15$ mmol $\text{CH}_4 \text{ L}^{-1}$).

Experimentos de digestão anaeróbia com reatores em batelada são amplamente usados para testar a viabilidade e o grau de digestão anaeróbia de diversos compostos orgânicos (Healy e Young, 1979; Shelton e Tiedje, 1984; Grady, 1985; Battersby e Wilson, 1989). O crescimento da biomassa a partir de inóculo com baixa concentração de microrganismos é muitas vezes incerto ou tardio (Calam, 1969; Meyrath e Suchanek, 1972). O sucesso da digestão anaeróbia em reatores em batelada implica no uso de concentrações corretas de inóculo e substrato. O balanço ideal para superar a limitação da biomassa e evitar a sobrecarga de matéria orgânica deve ser encontrado. A limitação da biomassa anaeróbia acarreta em produção lenta de CH_4 , enquanto que o excesso de matéria orgânica resulta na total inibição da atividade da biomassa ou, pelo menos, uma fase *lag* de aclimação (Fernández e Encina, 2009).

Nos reatores inoculados com 2,5 g L^{-1} de STV e alimentados com 3.100 mg L^{-1} de metilamina, a relação substrato/inóculo, com relação a valores de massa, foi de 1,24. Talvez essa relação tenha sido limitante no processo de degradação da metilamina pelos microrganismos presentes no lodo de inóculo, por conter excesso de substrato, visto que os outros ensaios, que empregaram relações substrato/inóculo menores, não apresentaram inibição na produção de CH_4 e apenas variações no período de fase *lag*.

Nas Figuras 5.13 e 5.14 estão representadas as concentrações de CH_4 esperadas estequiometricamente e as obtidas durante o primeiro ensaio, que comparou diferentes concentrações de inóculo e metilamina, e para o segundo ensaio com diferentes relações metilamina/sulfato, respectivamente. As concentrações de CO_2 , nos dois ensaios, não atingiram os valores estequiométricos esperados (Figuras 5.15 e 5.16).

No primeiro ensaio, os reatores inoculados com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de STV atingiram concentração máxima de CO_2 de 54,8% e 3,4% do total esperado para a degradação completa da metilamina nas concentrações de 1.550 e 3.100 mg L^{-1} de metilamina, respectivamente. Nos reatores inoculados com $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de STV as concentrações foram de 61,8% e 59,3% em relação às esperadas teoricamente, respectivamente. Os reatores com $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo e 1.550 mg L^{-1} de metilamina apresentaram apenas 62,9% de CO_2 (Figura 5.15).

Figura 5.13: Concentração de CH_4 do ensaio de comparação entre diferentes concentrações de inóculo e metilamina (primeiro ensaio): ■ concentração estequiométrica; ■ máxima concentração experimental.

Figura 5.14: Concentração de CH₄ do ensaio de comparação entre diferentes relações metilamina/sulfato (segundo ensaio): ■ concentração estequiométrica; ■ máxima concentração experimental.

Figura 5.15: Concentrações de CO₂ do ensaio de diferentes concentrações de inóculo e metilamina (primeiro ensaio): ■ concentração estequiométrica; ■ máxima concentração experimental.

No segundo ensaio, no qual os reatores foram inoculados com 5 g L⁻¹ de STV e 1.550 mg L⁻¹ de metilamina, as concentrações de CO₂ atingiram 70,64%, 66,4% e 69,04% dos valores estequiométricos calculados para os reatores submetidos às relações metilamina/sulfato de 0,71, 1,26 e 2,18, respectivamente (Figura 5.16).

Figura 5.16: Concentrações de CO₂ do ensaio de diferentes relações metilamina/sulfato (segundo ensaio): ■ concentração estequiométrica; ■ máxima concentração experimental.

Como as concentrações estequiométricas de CH₄ foram obtidas para todas as concentrações estudadas, pode-se inferir que toda a metilamina adicionada aos reatores foi degradada. Os valores obtidos de CO₂, inferiores aos estequiometricamente esperados para todas as condições estudadas, podem ser atribuídos ao fato de que parcela deste gás estaria dissolvida no meio líquido e, também, porque microrganismos utilizadores de CO₂, como as arqueias hidrogenotróficas, estariam consumindo a parcela remanescente deste gás para seu crescimento e manutenção dentro dos reatores.

Na Tabela 5.1 estão apresentados os resultados referentes a duração da fase *lag* e concentrações máximas de CH₄ e CO₂ acumuladas no *headspace* dos reatores anaeróbios em batelada durante a realização dos dois ensaios.

Pode-se perceber aumento no período da fase *lag* de acordo com o aumento da concentração de metilamina para cada concentração de inóculo estudada, exceto para os reatores inoculados com 2,5 g L⁻¹ e alimentados com 3.100 mg L⁻¹ de metilamina, já discutidos anteriormente. A menor fase *lag*, com duração de cinco dias, foi observada nos reatores inoculados com 10,0 g L⁻¹ de STV e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina. O emprego de alta concentração de inóculo para reduzir a duração da fase *lag* é uma estratégia muito usada para aumentar a eficiência dos processos de degradação. (Chen e Hashimoto, 1996). Nesses reatores, a relação substrato/inóculo foi de 0,155.

Tanto para os reatores inoculados com 2,5 g L⁻¹ de STV e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina quanto para os reatores inoculados com 5,0 g L⁻¹ de STV e alimentados com 3.100 mg L⁻¹ de metilamina, a relação substrato/inóculo foi igual a 0,62. Nesses reatores, o período de fase *lag* foi de 15 dias e 12 dias, respectivamente. Isso mostra que, mesmo com relação substrato/inóculo igual, maior concentração de inóculo requer um período menor de adaptação ao substrato.

Nos reatores inoculados com 5,0 g L⁻¹ de SVT e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina (relação substrato/inóculo 0,31), o que determinou a diferença na duração da fase *lag* foi a presença de sulfato durante os ensaios. Os reatores alimentados somente com metilamina apresentaram um período de adaptação ao substrato de sete dias. Nos reatores alimentados com metilamina e sulfato, a fase *lag* teve duração de dez dias, independentemente da relação metilamina/sulfato empregada. A competição entre arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (BRS) pelo H₂, intermediário

nos processos de metanogênese e de redução de sulfato, pode reduzir a eficiência de produção de CH_4 . Do ponto de vista termodinâmico, as bactérias redutoras de sulfato levam vantagem sobre o uso de hidrogênio (Harada et al., 1994). Além disso, as constantes cinéticas do modelo de Monod (μ_m – velocidade específica máxima de crescimento e K_S – constante de saturação do substrato) mostram que a razão μ_m/K_S é maior para as BRS do que para as metanogênicas, indicando maior velocidade específica de crescimento para as mesmas concentrações de substrato. Isso explica o fato da produção de metano ser mais tardia em reatores contendo sulfato, mesmo quando adotadas as mesmas concentrações de inóculo e metilamina.

Tabela 5.1: Valores médios de duração da fase *lag* e concentração máxima de CH_4 e CO_2 no *headspace* dos reatores anaeróbios em batelada

Concentração de inóculo (g L^{-1})	Concentração de metilamina (mg L^{-1})	Fase <i>lag</i> (dias)	Concentração máxima de CH_4 (mmol L^{-1})	Concentração máxima de CO_2 (mmol L^{-1})
Primeiro Ensaio				
2,5	controle	0	$3,62 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,06$
2,5	1.550	15	$38,50 \pm 2,45$	$6,85 \pm 0,44$
2,5	3.100	0	2,04	0,85
5,0	controle	0	$5,99 \pm 0,03$	$1,97 \pm 0,04$
5,0	1.550	7	$39,27 \pm 1,18$	$7,72 \pm 0,42$
5,0	3.100	12	$76,29 \pm 1,43$	$14,83 \pm 0,10$
10,0	controle	0	$5,72 \pm 0,28$	$2,43 \pm 0,19$
10,0	1.550	5	$37,48 \pm 0,43$	$7,86 \pm 0,16$
Segundo Ensaio				
5,0	controle	0	$2,14 \pm 0,10$	$2,61 \pm 0,13$
5,0 (0,71)*	1.550	10	$38,83 \pm 0,36$	$8,83 \pm 0,52$
5,0 (1,26)*	1.550	10	$38,03 \pm 0,44$	$8,30 \pm 0,84$
5,0 (2,18)*	1.550	10	$36,75 \pm 0,71$	$8,63 \pm 0$

* (relação metilamina/sulfato)

Com relação aos experimentos controle, pertencentes aos dois ensaios, a concentração de CH_4 foi maior nos reatores sem metilamina e sem sulfato ($3,6 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$, $6 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$ e $5,7 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$ nos reatores inoculados com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de

STV, 5,0 g L⁻¹ de STV e 10,0 g L⁻¹ de STV, respectivamente) em relação aos reatores sem metilamina e contendo sulfato (~ 2 mmol L CH₄⁻¹), todos com 5,0 g L⁻¹ de STV. Esta diferença já era esperada, pois é bem estabelecido que o sulfato, quando presente em meio anaeróbio, favorece competição por substrato agindo como receptor final de elétrons nas reações de respiração anaeróbia.

As maiores concentrações de CH₄ e CO₂ no *headspace* estavam na mesma ordem de grandeza nos reatores que receberam a mesma concentração de metilamina como fonte de carbono, independentemente da concentração do inóculo, da presença de sulfato e de sua concentração. As concentrações de CH₄ e CO₂ foram de aproximadamente 36 e 8 mmol L⁻¹, respectivamente, nos reatores contendo 1.550 mg L⁻¹ de metilamina (com ou sem sulfato). Ao contrário do que ocorreu nos reatores controle, a adição de sulfato no processo não afetou a concentração máxima de CH₄, quando a metilamina foi utilizada como única fonte de carbono. Isso indica que os microrganismos produtores de metano e BRS não concorreram por metilamina, o que torna a digestão anaeróbia da metilamina ainda mais robusta.

5.2. Velocidade de Produção de Metano nos Reatores Anaeróbios em Batelada

5.2.1. Avaliação de Diferentes Concentrações de Inóculo e Metilamina

As máximas velocidades de produção de CH₄ foram determinadas para todos os reatores estudados. Os reatores controle, que tiveram comportamento linear em todas as condições estudadas, apresentaram velocidades máximas de produção de CH₄ de 0,11 ± 0,01 (2,5 g STV L⁻¹), 0,21 ± 0 (5,0 g STV L⁻¹) e 0,42 ± 0,01 (10,0 g STV L⁻¹) mmol CH₄ L⁻¹ dia⁻¹.

Nos reatores inoculados com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de STV e alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina, a velocidade máxima de produção de CH_4 ocorreu com 15 dias de ensaio, e apresentou média de $12,34 \pm 1,63 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. A velocidade máxima de produção de CH_4 nessa condição estão ilustradas na Figura 5.17, para o reator 1 (a) e reator 2 (b), respectivamente. O reator alimentado com 3.100 mg L^{-1} de metilamina apresentou comportamento linear de produção de CH_4 , com velocidade máxima de $0,06 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

Figura 5.17: Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com $2,5 \text{ g STV L}^{-1}$ e alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina: (a) – reator 1, (b) – reator 2.

Os reatores inoculados com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$ de inóculo atingiram a velocidade máxima de produção de CH_4 entre o oitavo e décimo dia de experimento, quando alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina (Figura 5.18). Nesses reatores, a velocidade média foi de $12,95 \pm 0,61 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Nos reatores com 3.100 mg L^{-1} de metilamina, a velocidade máxima de produção de CH_4 foi atingida entre o décimo quinto e o vigésimo dia de ensaio, com valor médio de $12,72 \pm 1,87 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Figura 5.19).

Figura 5.18: Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$ e alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina: (a) – reator 1, (b) – reator 2.

Figura 5.19: Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$ e alimentados com 3.100 mg L^{-1} de metilamina: (a) – reator 1, (b) – reator 2.

Os reatores com $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de STV e 1.550 mg L^{-1} de metilamina apresentaram velocidade máxima de produção de CH_4 no sexto dia de operação, com valor médio de $13,79 \pm 0,40 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (Figura 5.20).

Figura 5.20: Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com $10,0 \text{ g STV L}^{-1}$ e alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina: (a) – reator 1, (b) – reator 2.

No final da operação, a concentração de sólidos totais voláteis (STV) foi determinada para todos os reatores, os quais apresentaram aumento nas concentrações de STV, excetuando-se os reatores controles inoculados com $5,0$ e $10,0 \text{ g STV L}^{-1}$. Para esses reatores, o decréscimo médio de biomassa foi de $7,4\%$ e $13,5\%$, respectivamente. Os reatores controle inoculados com $2,5 \text{ g STV L}^{-1}$ tiveram aumento médio da biomassa de $14,4\%$.

Os reatores alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina tiveram sua biomassa aumentada em $23,6\%$, $23,8\%$ e $14,65\%$ para concentração inicial de inóculo de $2,5$, $5,0$ e $10,0 \text{ g STV L}^{-1}$, respectivamente. Os reatores com 3.100 mg L^{-1} de metilamina e $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$ inicial tiveram aumento médio de biomassa em $17,2\%$. Para essa mesma concentração de metilamina, o reator inoculado com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa apresentou maior aumento de biomassa, apesar da baixa produção de CH_4 observada durante todo o período de operação. Nesse reator, a concentração de STV aumentou $40,8\%$ em relação à concentração inoculada inicialmente. A Figura 5.21 apresenta os gráficos comparativos entre as concentrações iniciais e finais de STV.

Figura 5.21: Concentração inicial (■) e final (■) de sólidos totais voláteis nos reatores alimentados com diferentes concentrações de metilamina e inóculo.

A velocidade específica máxima de produção de CH_4 foi determinada para todos os reatores. Os reatores controle apresentaram velocidades em torno de $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, independentemente da concentração inicial de STV. A maior velocidade, ou seja, de $4,42 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, foi observada nos reatores inoculados com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de STV e 1.550 mg L^{-1} de metilamina. Os reatores alimentados com essa mesma concentração de metilamina mostraram-se menos eficientes com o aumento de concentração da biomassa, com velocidades de $2,31$ e $1,28 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para $5,0$ e $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de STV de inóculo, respectivamente. Os reatores com $5,0 \text{ g STV L}^{-1}$ e 3.100 mg L^{-1} de metilamina tiveram eficiência muito semelhante à dos reatores com mesma concentração de STV e 1.550 mg L^{-1} de metilamina, com velocidade de $2,34 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Devido à baixa produção de metano e grande aumento da

biomassa, a menor eficiência foi observada no reator com 2,5 g STV L⁻¹ e 3.100 mg L⁻¹ de metilamina, com velocidade de 0,02 mmol L⁻¹ g STV⁻¹ dia⁻¹. As velocidades máximas específicas de produção de CH₄ estão ilustradas na Figura 5.22.

Figura 5.22: Velocidade específica máxima de produção de metano nos reatores alimentados com diferentes concentrações de metilamina e inóculo.

5.2.2. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato

Assim como no primeiro ensaio, as velocidades máximas de produção de CH₄ foram determinadas para todos os reatores. Nesse ensaio, todos os reatores foram inoculados com 5 g STV L⁻¹ e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina em diferentes relações metilamina/sulfato.

Os reatores controle, que não receberam adição de metilamina, apresentaram valor médio de velocidade máxima igual a $0,24 \pm 0,02$ mmol CH₄ L⁻¹ dia⁻¹. As velocidades máximas de produção de CH₄ nessa condição estão ilustradas na Figura 5.23, para o reator 1 (a), reator 2 (b) e reator 3 (c), respectivamente.

Figura 5.23: Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 5,0 g STV L^{-1} e alimentados com 1269 mg L^{-1} de sulfato: (a) – reator 1, (b) – reator 2, (c) – reator 3.

Nos reatores com relação metilamina/sulfato 0,71, a velocidade máxima de produção de CH_4 ocorreu com dez dia de operação e teve média de $13,39 \pm 1,83$ $\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (Figura 5.24).

Figura 5.24: Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 5,0 g L^{-1} de STV, alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina e com relação metilamina/sulfato 0,71: (a) – reator 1, (b) – reator 2, (c) – reator 3.

Os reatores com relação metilamina/sulfato 1,26, que alcançaram velocidade máxima de produção de CH_4 no décimo dia de experimento, apresentaram valor médio de $5,12 \pm 0,23 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (Figura 5.25). Os reatores com relação metilamina/sulfato 2,18, que também tiveram velocidade máxima de produção de CH_4 no décimo dia de experimento, apresentaram valor médio de $5,31 \pm 0,18 \text{ mmol CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (Figura 5.26).

Figura 5.25: Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 5,0 g STV L^{-1} , alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina e com relação metilamina/sulfato 1,26: (a) – reator 1, (b) – reator 2, (c) – reator 3, (d) – reator 4.

Figura 5.26: Velocidade de produção de CH_4 ($\text{mmol L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) ao longo do tempo nos reatores inoculados com 5,0 g STV L^{-1} alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina e com relação metilamina/sulfato 2,18: (a) – reator 1, (b) – reator 2.

No final da operação, a concentração de sólidos totais voláteis (STV) foi determinada para todos os reatores, os quais apresentaram aumento na concentração de STV, excetuando-se os reatores controle, que tiveram decréscimo médio de biomassa de 3,2%.

Os reatores alimentados com relação metilamina/sulfato 0,71 tiveram sua biomassa aumentada em 11,2%. Os reatores com relação 1,26 e 2,18 tiveram aumento médio de biomassa de 4,8%, e 12,4%, respectivamente. A Figura 5.27 apresenta as concentrações iniciais e finais de STV nos reatores em batelada.

Figura 5.27: Concentração inicial (■) e final (■) de sólidos totais voláteis nos reatores alimentados com diferentes relações metilamina/sulfato.

A velocidade específica máxima de produção de CH_4 foi determinada para todos os reatores. Os reatores controle apresentaram velocidades em torno de $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g STV}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Os reatores submetidos às diferentes relações metilamina/sulfato atingiram velocidades específicas máximas de produção de CH_4 de 2,54, 2,31 e $3,14 \text{ mmol L}^{-1} \text{ g}$

STV⁻¹ dia⁻¹ para a relação de 0,71, 1,26 e 2,18, respectivamente. As velocidades máximas específicas de produção de CH₄ deste ensaio estão ilustradas na Figura 5.28.

Figura 5.28: Velocidade específica máxima de produção de metano nos reatores alimentados com diferentes relações metilamina/sulfato.

5.2.3. Análise Comparativa dos Ensaios

Os reatores controle, independente da adição de sulfato, apresentaram mesma velocidade específica de produção de metano (0,04-0,05 mmol L⁻¹ g STV⁻¹ dia⁻¹). Os reatores com 1.550 mg metilamina L⁻¹ apresentaram VEM_{CH₄} igual a 4,42, 2,31 e 1,28 mmol L⁻¹ g STV⁻¹ dia⁻¹ para concentração de inóculo de 2,5, 5,0 e 10,0 g STV L⁻¹. Vich (2006), em ensaio semelhante, obteve VEM_{CH₄} igual a 1,93 mmol L⁻¹ g STV⁻¹ dia⁻¹ para concentração de inóculo de 5,0 g STV L⁻¹ e 1.550 mg L⁻¹ de metilamina. Os reatores com 5,0 g STV L⁻¹ e 1.550 mg metilamina L⁻¹ que receberam adição de sulfato apresentaram VEM_{CH₄} igual a 2,54, 2,31 e 3,14 mmol L⁻¹ g STV⁻¹ dia⁻¹ para relações metilamina/sulfato de 0,71, 1,26 e 2,18.

Devido ao fato dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹ e com 1.550 mg metilamina L⁻¹ apresentarem valores iguais de VEM_{CH₄} (2,31 e 3,14 mmol L⁻¹ g STV⁻¹ dia⁻¹), independente da presença do sulfato, eles foram escolhidos para estudos acerca da diversidade microbiana, que serão apresentados na seção 5.5.

Os reatores com 3.100 mg metilamina L⁻¹ apresentaram VEM_{CH₄} igual a 2,34 mmol L⁻¹ g STV⁻¹ dia⁻¹ para concentração de inóculo de 5,0 g STV L⁻¹. Vich (2006), em ensaio semelhante, obteve VEM_{CH₄} igual a 1,49 mmol L⁻¹ g STV⁻¹ dia⁻¹ para concentração de inóculo de 5,0 g STV L⁻¹ e 2790 mg metilamina L⁻¹.

A Tabela 5.2 apresenta um resumo referente aos valores médios de STV, velocidade máxima de produção de metano (VM_{CH₄}) e velocidade específica máxima de produção de metano (VEM_{CH₄}) nos reatores anaeróbios em batelada.

Tabela 5.2: Sólidos voláteis totais, velocidade máxima e velocidade máxima específica de produção de metano nos dois ensaios.

Concentração de inóculo (g L ⁻¹)	Concentração de metilamina (mg L ⁻¹)	STV _{média} (g L ⁻¹)	VM _{CH₄} (mmol L ⁻¹ dia ⁻¹)	VEM _{CH₄} (mmol L ⁻¹ g STV ⁻¹ dia ⁻¹)
Primeiro Ensaio				
2,5	0 (controle)	2,68 ± 0,46	0,11 ± 0,01	0,04
2,5	1.550	2,80 ± 0,11	12,34 ± 1,63	4,42
2,5	3.100	3,01	0,06	0,02
5,0	0 (controle)	4,81 ± 0,13	0,21 ± 0	0,04
5,0	1.550	5,60 ± 0,43	12,95 ± 0,61	2,31
5,0	3.100	5,43 ± 0	12,72 ± 1,87	2,34
10,0	0 (controle)	9,33 ± 0,15	0,42 ± 0,01	0,05
10,0	1.550	10,73 ± 1,17	13,79 ± 0,40	1,28
Segundo Ensaio				
5,0	0 (controle)	4,92 ± 0,13	0,24 ± 0,02	0,05
5,0 (0,71)*	1.550	5,28 ± 0,51	13,39 ± 1,83	2,54
5,0 (1,26)*	1.550	5,12 ± 0,23	11,82 ± 0,38	2,31
5,0 (2,18)*	1.550	5,31 ± 0,18	16,67 ± 2,74	3,14

STV média: valor médio de STV inicial e final

VM_{CH₄}: velocidade máxima de produção de CH₄

VEM_{CH₄}: velocidade específica máxima de produção de CH₄

5.3. Nitrogênio Amoniacal nos Reatores Anaeróbios em Batelada

5.3.1. Avaliação de Diferentes Concentrações de Inóculo e Metilamina

No primeiro ensaio, a concentração de nitrogênio amoniacal foi determinada no momento em que a metilamina foi adicionada aos reatores e ao final do experimento. A Figura 5.29 apresenta as concentrações de N-NH_4^+ produzidas ao longo dos experimentos. Os reatores inoculados com $2,5 \text{ g STV L}^{-1}$ e alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina atingiram concentração de N-NH_4^+ que excedeu em 12,9% a concentração passível estequiometricamente. Para a mesma concentração de inóculo e concentração de metilamina de 3.100 mg L^{-1} , na qual os reatores apresentaram inibição na produção de CH_4 , foi produzido apenas 8,7% da concentração estequiométrica.

Figura 5.29: Concentrações iniciais, finais e teóricas de N-NH_4^+ nos reatores alimentados com diferentes concentrações de inóculo e metilamina: ■ N-NH_4^+ inicial, ■ N-NH_4^+ final, ■ N-NH_4^+ estequiométrico.

Os reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹ e 1.550 mg L⁻¹ de metilamina excederam em 0,7% a concentração teórica de N-NH₄⁺ e os reatores inoculados com a mesma concentração de STV e 3.100 mg L⁻¹ de metilamina excederam em 7,2% a concentração esperada. Os reatores inoculados com 10,0 g L⁻¹ de STV e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina excederam em 18,3% todo o N-NH₄⁺ passível estequiometricamente.

5.3.2. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato

A concentração de N-NH₄⁺ foi determinada durante todo o período de operação dos reatores. Nota-se, a partir do gráfico apresentado na Figura 5.30, que as concentrações atingidas no 15º dia de operação dos reatores foram mantidas até o final do experimento, que ocorreu após 70 dias de operação. As concentrações de N-NH₄⁺, exceto para os reatores controle, mantiveram-se entre 1000 e 1400 mg L⁻¹.

Figura 5.30: Concentração de nitrogênio amoniacal ao longo da operação dos reatores: □ – controle com sulfato; ○ - 0,71; ▲ - 1,26 e ▼ – 2,18

Ao final do experimento, a concentração de obtidas excedeu em 16,0%, 25,1% e 33,1% as concentrações esperadas estequiometricamente para 1.550 mg metilamina L⁻¹, nos reatores com relação metilamina/sulfato de 0,71, 1,26 e 2,18, respectivamente. Os reatores controle (sem metilamina com fonte de C e N) tiveram concentração de N-NH₄⁺ de aproximadamente 300 mg L⁻¹. As concentrações teóricas e experimentais de N-NH₄⁺ no segundo ensaio estão comparadas na Figura 5.31.

Figura 5.31: Concentração inicial, final e teórica de N-NH₄⁺ nos reatores alimentados com diferentes relações metilamina/sulfato: ■ N-NH₄⁺ inicial, ■ N-NH₄⁺ final, ■ N-NH₄⁺ estequiométrico.

5.3.3. Análise Comparativa dos Ensaios

Nos dois ensaios, pôde-se perceber que as concentrações de N-NH₄⁺ excederam os valores esperados estequiometricamente. No primeiro ensaio, no qual os tempos de operação dos reatores foram inferiores ao do segundo ensaio, esse excesso foi menos

expressivo. Os reatores do primeiro ensaio foram monitorados durante 30, 25 e 15 dias, para concentrações de inóculo de 2,5, 5,0 e 10,0 g L⁻¹ de STV, respectivamente. Os reatores pertencentes ao segundo ensaio foram monitorados durante 55 dias.

Provavelmente, esse excesso de N-NH₄⁺ quando comparado com a concentração esperada estequiometricamente, pode ser atribuído a erros do método, como por exemplo, durante a diluição das amostras, mas também à atividade endógena dos microrganismos presentes nos reatores.

A Tabela 5.3 apresenta um resumo dos resultados referentes à média entre as concentrações iniciais e finais de N-NH₄⁺ nos reatores anaeróbios em batelada durante a realização dos dois ensaios.

Tabela 5.3: Concentração inicial e final de nitrogênio amoniacal

Concentração de inóculo (g L ⁻¹)	Concentração de metilamina (mg L ⁻¹)	Concentração inicial de N-amoniacal (mg L ⁻¹)	Concentração final de N-amoniacal (mg L ⁻¹)
Primeiro Ensaio			
2,5	0 (controle)	168,5 ± 9,50	167,58 ± 0,53
2,5	1.550	165,75 ± 2,25	954,42 ± 4,21
2,5	3.100	162 ± 0	121,79 ± 0,00
5,0	0 (controle)	228,71 ± 2,06	194,42 ± 1,05
5,0	1.550	236,06 ± 0	939,16 ± 22,63
5,0	3.100	231,35 ± 0	1725,68 ± 0
10,0	0 (controle)	322,89 ± 2,89	369,47 ± 37,89
10,0	1.550	337,11 ± 13,95	1209,47 ± 6,32
Segundo Ensaio			
5,0	0 (controle)	34,38 ± 0	269,28 ± 6,26
5,0 (0,71)*	1.550	54,69 ± 3,13	1100,00 ± 51,37
5,0 (1,26)*	1.550	55,21 ± 9,55	1163,25 ± 11,62
5,0 (2,18)*	1.550	40,63 ± 8,84	1205,42 ± 10,22

* (relação metilamina/sulfato)

5.4. Sulfato e Sulfeto nos Reatores Anaeróbios em Batelada

5.4.1. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato

As concentrações de sulfato (Figura 5.32) e sulfeto (Figura 5.33) foram monitoradas durante todo o período de operação dos reatores. A adição de sulfato nos reatores acarretou em aumento do pH inicial. Os reatores alimentados somente com metilamina apresentaram, em média, no início dos ensaios, pH=7,20. Os reatores com sulfato apresentaram valores médios de pH=8,95 no início dos ensaios. No final, os reatores tiveram pH=7,15, independente da presença do sulfato, exceto para os reatores controle sem metilamina e com sulfato, que atingiram pH final de 7,67. Considerando que o acúmulo CO_2 nos reatores foi um dos responsáveis pela queda de pH, essa diferença pode ser atribuída ao fato do controle ter produzido menos CO_2 (2 mmol L^{-1}) comparado aos reatores com adição de metilamina, que produziram em média $8 \text{ mmol CO}_2 \text{ L}^{-1}$.

Figura 5.32: Concentração de sulfato ao longo do tempo nos reatores anaeróbios em batelada: □ – controle (sem metilamina e com sulfato); ○ - 0,71; ▲ - 1,26 e ▼ – 2,18.

Figura 5.33: Concentração de sulfeto ao longo do tempo nos reatores anaeróbios em batelada: □ – controle (sem metilamina e com sulfato); ○ - 0,71; ▲ - 1,26 e ▼ – 2,18.

O sulfeto acumulado ao longo do ensaio atingiu concentração máxima de aproximadamente 150 mg.L^{-1} nos reatores submetidos às diferentes relações metilamina/sulfato. Os reatores controle (sem metilamina e com sulfato) atingiram concentração média de sulfeto de 241 mg.L^{-1} . A partir desses resultados, é possível inferir que a metanogênese, favorecida pela adição de metilamina, exerceu efeito negativo na sulfetogênese, ao desviar prótons livres (H^+) para a formação de N-amoniacal e CH_4 pelas arqueias. O efeito negativo também pode ser atribuído ao fato da metilamina ser um substrato indisponível para as BRS.

Os reatores controle com sulfato consumiram 71,9% do sulfato adicionado (1.269 mg L^{-1}). Os reatores com relações metilamina/sulfato de 0,71, 1,26 e 2,18 consumiram 49,6%, 61,6% e 83,2% de todo o sulfato adicionado, para concentrações de 2.169, 1.234 e 710 mg L^{-1} de sulfato, respectivamente. Essas porcentagens indicaram maior eficiência no consumo de sulfato quando este estava presente em menores concentrações.

A concentração inicial e final de sulfato e sulfeto nos reatores está apresentada na Figura 5.34.

Figura 5.34: Concentração inicial e final de sulfato e sulfeto nos reatores alimentados com diferentes relações metilamina/sulfato: ■ S-sulfato inicial, ■ S-sulfato final, ■ S-sulfeto inicial, ■ S-sulfeto final.

5.5. Diversidade Microbiana nos Reatores Anaeróbios em Batelada

5.5.1. Avaliação de Diferentes Concentrações de Inóculo e Metilamina

A comunidade microbiana presente nos reatores pertencentes ao primeiro ensaio foi visualizada por meio de exames microscópios de contraste de fases e de fluorescência. Todos os reatores apresentaram semelhança de morfologias em todas as condições estudadas. Foram encontrados nesses reatores bacilos delgados (Figura 5.35 a), bacilos (Figura 5.35 b), filamentos (Figura 5.35 c), cocos (Figura 5.35 d), cocos fluorescentes (Figura 5.35 e, g, h) e sarcinas (Figura 5.35 f). Sarcinas e cocos fluorescentes são morfologias associadas a microrganismos do Domínio *Archaea*, família *Methanosarcinaceae*, que engloba os microrganismos metilotróficos capazes de usar a metilamina como fonte de carbono, e têm o CH₄ e o CO₂ como produtos finais de sua degradação. A morfologia filamentosa pode ser característica de microrganismos

que garantem a estrutura dos grânulos, comumente isolados de reatores UASB, como por exemplo, as arqueias hidrogenotróficas e as arqueias acetoclásticas pertencentes ao Gênero *Methanosaeta*. Cocos e bacilos são as morfologias predominantes na maioria dos grupos bacterianos.

Figura 5.35: Morfologias encontradas nos reatores anaeróbios: bacilos (a, b), filamentos (c), cocos (d, e, g, h) e sarcinas (f).

A fluorescência observada em algumas sarcinas e cocos (Figura 5.35 h), típica de alguns representantes do Domínio *Archaea*, é resultante da presença da coenzima F_{420} . Esta coenzima interage com diferentes enzimas durante a metanogênese, incluindo hidrogenase e $NADP^+$ reductase. A coenzima F_{420} também age como doadora de elétrons em pelo menos uma etapa da redução do CO_2 . A forma oxidada da coenzima F_{420} absorve luz em 420 nm e fluoresce com coloração azulada. Na forma reduzida, F_{420} torna-se incolor (Madigan *et al.*, 1997).

Devido à semelhança morfológica das amostras retiradas dos reatores pertencentes ao primeiro ensaio, apenas uma condição foi eleita para estudos de biologia molecular. Amostras retiradas dos reatores inoculados com $5,0\text{ g L}^{-1}$ de STV e alimentados com $1.550\text{ mg metilamina L}^{-1}$ foram analisadas por meio do seqüenciamento de fragmentos da região 16S do RNAr com iniciadores universais para *Bacteria* e *Archaea*. Para o Domínio *Bacteria*, foram seqüenciados 94 clones. Na comparação das seqüências desses clones com seqüências de microrganismos depositadas no banco de dados do *genebank*, foram encontrados representantes de oito grupos distintos, sendo cinco deles Filos bem consolidados (*Acidobacteria* – 4%, *Firmicutes* – 11%, *Proteobacteria* – 14%, *Spirochaetes* – 13% e *Synergistes* – 47%) e três Filos ainda em construção, recentemente propostos na literatura (*OP8* – 4%, *WS1* – 2% e *WS3* – 4%). Apenas 1% dos clones não foi classificado dentro de nenhum grupo bacteriano (Figura 5.36). Vale ressaltar que a comparação entre os Filos, apesar de estar expressa em porcentagem, representa qualitativamente e não quantitativamente a comunidade microbiana presente nesses reatores.

Figura 5.36: Estrutura da comunidade microbiana relacionada ao Domínio *Bacteria* dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹ e alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹.

Para a construção da árvore filogenética, as seqüências dos clones que apresentaram similaridade $\geq 97\%$ foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOS). A Tabela 5.4 apresenta o número de clones agrupado nas UTOS mais representativas do Domínio *Bacteria*, assim como os microrganismos aos quais se relacionam no banco de dados do *genebank*. A Figura 5.38 apresenta a árvore filogenética (parsimônia interativa) com as UTOS agrupadas em seus respectivos Filos, como se segue, para o Domínio *Bacteria*.

Acidobacteria: as UTOS 1 e 9 foram inseridas filogeneticamente na árvore dentro deste Filo. A UTO 9 apresentou apenas 83% de identidade com clone de bactéria de solo não cultivada (AF423257), isolado do trabalho de análise da composição de comunidades microbianas por técnicas de *fingerprint* conduzido por Valinsky *et al.* (2002).

Proteobacteria: as UTOs 11, 17, 18, 24 e 32 foram classificadas como pertencentes a este Filo. As UTOs 11, 24 e 32 apresentaram 100% de identidade com clone de bactéria não cultivada (AJ009471), isolada a partir de um consórcio anaeróbio presente em reator anaeróbio de leito fluidificado empregado na descloração do triclorobenzeno (Wintzingerode *et al.*, 1999). A UTO 18 apresentou apenas 80% de identidade com clone identificado como *Paenibacillus odorifer* (AJ223990), retirado do trabalho de Achouak *et al.* (1999) que estudaram comparativamente a filogenia de membros da Família *Bacillaceae* isolados das rizosferas de trigo e milho, capazes de fixar nitrogênio e formar endósporos.

Spirochaetes: as UTOS 6, 10, 19, 25, 31 e 34 foram inseridas neste Filo. A UTO 10 apresentou 95% de identidade com clone classificado como *Candidatus Cloacamonas* sp. (EU887773), isolado por Nayak e Kale (2008), ainda não publicado. A UTO 19 apresentou 86% de identidade com clone de eubactéria não cultivada (AF050580) sequenciado no trabalho de Dojka *et al.* (1998), que pesquisaram a diversidade microbiana presente em um aquífero contaminado com hidrocarbonetos (principalmente combustível de avião) e com solventes clorados em processos intrínsecos de biorremediação. As UTOs 25 e 34 apresentaram, respectivamente, identidades de 97% e 87% com bactérias não cultivadas. A UTO 25 relacionou-se ao clone AF338764 (Dollhopf *et al.*, 2003), e a UTO 34 ao clone AJ390461 (Derakshani *et al.*, 2001). As duas pesquisas visaram testar técnicas moleculares para estudos filogenéticos e de dinâmica da comunidade microbiana.

Tabela 5.4: UTOS do Domínio *Bacteria* obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹ e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina e microrganismos relacionados

UTO *	Nº de clones	Pb**	Identidade (%)	Organismo	Nº de acesso do <i>Genebank</i>	Abundância (%)	Referência (NP - não publicado)
3	2	359	100	uncultured eubacterium WCHA1-56	AF050547	2,13	Dojka <i>et al.</i> (1998)
7	2	387	98	uncultured bacterium	EU864485	2,13	Li <i>et al.</i> (2008) - NP
8	2	257	83	uncultured eubacterium WFeA1-35	AF050554	2,13	Dojka <i>et al.</i> (1998)
9	2	391	83	uncultured soil bacterium	AF423257	2,13	Valinsky <i>et al.</i> (2002)
10	2	372	95	uncultured <i>Candidatus Cloacamonas</i> sp.	EU887773	2,13	Nayak e Kale (2008) - NP
11	2	330	100	uncultured bacterium SJA-63	AJ009471	2,13	Von Wintzingerode <i>et al.</i> (1999)
12	2	307	84	<i>Aminomonas paucivorans</i> DSM 12260	AF072581	2,13	Baena <i>et al.</i> (1999)
18	2	402	80	<i>Paenibacillus odorifer</i>	AJ223990	2,13	Achouak <i>et al.</i> (1999)
19	2	359	86	uncultured eubacterium WCHB1-21	AF050580	2,13	Dojka <i>et al.</i> (1998)
20	2	330	90	uncultured bacterium	AF419691	2,13	Teske <i>et al.</i> (2002)
21	3	367	98	uncultured <i>Synergistes</i> sp.	EU887802	3,19	Nayak e Kale (2008) - NP
22	2	387	98	uncultured bacterium	EF688178	2,13	Roest (2008) - NP
23	2	339	96	uncultured bacterium	AB234270	2,13	Hiraishi <i>et al.</i> (2005)
24	2	358	100	uncultured bacterium	AJ009471	2,13	Von Wintzingerode <i>et al.</i> (1999)
25	2	346	97	uncultured bacterium	AF338764	2,13	Dollhopf <i>et al.</i> (2001)
27	2	354	92	uncultured bacterium	AF323770	2,13	Wu <i>et al.</i> (2004) - NP
28	2	276	98	uncultured bacterium	AB195866	2,13	Kim <i>et al.</i> (2005) - NP
29	3	416	98	uncultured bacterium mle 1-42	AF280863	3,19	LaPara <i>et al.</i> (2000)
30	2	361	99	unidentified bacterium	AB011302	2,13	Sekiguchi <i>et al.</i> (1998)
32	2	358	100	uncultured bacterium SJA-63	AJ009471	2,13	Von Wintzingerode <i>et al.</i> (1999)
33	2	415	98	unidentified bacterium	AB011302	2,13	Sekiguchi <i>et al.</i> (1998)
34	2	393	87	uncultured soil bacterium PBS-21	AJ390461	2,13	Derakshani <i>et al.</i> (2001)
36	2	347	96	uncultured eubacterium WCHB1-21	AF050580	2,13	Dojka <i>et al.</i> (1998)
39	2	282	100	uncultured eubacterium WCHA1-78	AF050579	2,13	Dojka <i>et al.</i> (1998)
42	3	298	98	uncultured <i>Deferribacteres</i> bacterium	EU887782	3,19	Nayak e Kale (2008) - NP
43	1	435	96	uncultured bacterium	U81735	1,06	Godon <i>et al.</i> (1997)

UTO: unidade taxonômica operacional; Pb: pares de base

Firmicutes: as UTOs 4, 13, 22, 36 e 37 foram relacionadas a este Filo. A UTO 22 apresentou 98% de identidade com clone isolado a partir do lodo de reator anaeróbio (EF688178) estudado por Roest (2008), em trabalho ainda não publicado. A UTO 36 teve 96% de identidade com clone de aquífero contaminado (AF050580) obtido no trabalho de Dojka *et al.* (1998) e já discutido anteriormente.

Synergistes: foi o Filo com maior número de representantes do Domínio *Bacteria* na árvore filogenética, abrangendo as UTOS 2, 5, 7, 12, 15, 16, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 38, 40, 41, 42 e 43. A UTO 12 apresentou 84% de identidade com clone identificado como *Aminomonas Paucivorans* (AF072581), uma espécie de bactéria anaeróbia, mesofílica e degradadora de aminoácidos. Essa espécie, isolada de uma lagoa anaeróbia pertencente a uma estação para tratamento de água residuária de laticínios, foi descrita e caracterizada por Baena *et al.* (1999). A UTO 29 teve 98% de identidade com clone de bactéria não cultivada (AF280863) verificada em trabalho que analisou filogeneticamente as comunidades microbianas presentes em reatores mesofílicos e termofílicos empregados no tratamento de efluente de indústria farmacêutica (LaPara *et al.*, 2002). As UTOs 30 e 33 apresentaram 99% e 98% de identidade, respectivamente, com clone de bactéria não cultivada (AB011302) isolada do trabalho de Sekiguchi *et al.* (1998), no qual foi estudada a diversidade filogenética do lodo granulado de reatores mesofílicos e termofílicos usados no tratamento de água residuária sintética rica em sacarose, propionato e acetato. A UTO 43 apresentou 96% de identidade com clone de bactéria não cultivada isolada do trabalho de Godon *et al.* (1997), que estimaram, por meio de técnicas moleculares, a diversidade microbiana de um reator anaeróbio de leiteo fluidizado alimentado com vinhaça.

Microorganismos do Domínio *Archaea* também foram analisados por meio do seqüenciamento de fragmentos da região 16S do RNAr, para os reatores inoculados com

5,0 g L⁻¹ de STV e alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹. Para esses reatores, foram seqüenciados 110 clones que se agruparam em 41 unidades taxonômicas operacionais (UTOS). Todos os clones obtidos foram pertencentes ao Filo *Euryarchaeota* (Figura 5.37). 82% dos clones foram relacionados a microrganismos da Classe *Methanomicrobia*, sendo 35% da Família *Methanomicrobiaceae*, 29% da Família *Methanosaetaceae* e 18% da Família *Methanosarcinaceae*. As Classes *Methanobacteria* e *Thermoplasmata* foram representadas por 10% e 4% dos clones, respectivamente. 4% dos clones não foram relacionados a nenhum grupo taxonômico. A construção da árvore filogenética foi realizada com as UTOS das seqüências dos clones que apresentaram similaridade $\geq 97\%$. A Tabela 5.5 apresenta o número de clones agrupado nas UTOS mais representativas do Domínio *Archaea*, assim como os microrganismos aos quais eles se relacionam no banco de dados do *genebank*. A Figura 5.38 apresenta a árvore filogenética (parsimônia interativa) com as UTOS inseridas no Domínio *Archaea*.

Figura 5.37: Estrutura da comunidade microbiana relacionada ao Domínio *Archaea* dos reatores inoculados com 5,0 STV g L⁻¹ de e alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹.

Microrganismos do Domínio *Archaea* são abundantes na natureza, porém há uma variedade de habitats específicos onde seu crescimento é favorecido. Lodos de digestores anaeróbios são comumente colonizados por diversas espécies de arqueias. A

UTO 10 apresentou apenas 74% de identidade com clone de arqueia não cultivada (AB233298) obtido no trabalho de Imashi *et al.* (2008) que caracterizou uma espécie recém descoberta de arqueia produtora de metano, *Methanolinea tarda*, a partir de lodo de reator metanogênico. A UTO 24 também teve 74% de identidade com clone de microrganismo não cultivado (AB266916) obtido em trabalho de caracterização da comunidade de bactérias e arqueias em lodo granulado metanogênico retirado de reator UASB usado no tratamento de água residuária com alta carga orgânica, proveniente de diversos processos da indústria de alimentos (Narihiro *et al.*, 2009).

Muitas arqueias apresentam metabolismo diferenciado, e são capazes de degradar compostos tóxicos e recalcitrantes. A UTO 14 teve 96% de identidade com clone de arqueia (AF423187) pertencente a um consórcio metanogênico capaz de degradar tolueno. Esse consórcio foi enriquecido a partir de inóculo de aquífero contaminado com creosoto e foi mantido por 10 anos com tolueno como única fonte de carbono e energia (Ficker *et al.*, 1999). A UTO 23 apresentou 96% de identidade com arqueia não cultivada (AF229776) encontrada por Wu *et al.* (2001) em pesquisa acerca da caracterização do consórcio microbiano presente em reator de lodo granulado empregado na degradação de tereftalato.

Sedimentos marinhos, de lagos e rios também são ambientes que favorecem a manutenção de alta diversidade de microrganismos do Domínio *Archaea*. A UTO 15 apresentou 93% de identidade com clone de *Euryarchaeota* não cultivado (AJ240006) encontrado em sedimentos de lagos sulfurosos (Casamayor *et al.*, 2000). As UTOS 20 e 28 tiveram 90 e 92% de identidade, respectivamente, com clones de arqueias não cultivadas (Y18087 e Y18086) isolados a partir de sedimento lacustre anaeróbico (Falz *et al.*, 1999).

Há inúmeros artigos relatando a presença de arqueias metanogênicas em campos alagados de plantação de arroz, pois eles são responsáveis por 25% de toda a produção biológica mundial de CH₄ (Liesack *et al.*, 2000). A UTO 3 apresentou 98% de identidade com clone pertencente ao gênero *Methanosaeta* (AJ244288) caracterizada em consórcio microbiano estável capaz de degradar celulose, obtido pelo enriquecimento feito a partir de solo de campos de arroz, sob condições anaeróbias (Chin *et al.*, 1999).

Turfeiras são ecossistemas responsáveis por 3%-7% da emissão global de CH₄. Enquanto acetato é tido como precursor imediato de dois terços de todo o CH₄ produzido na natureza, CO₂/H₂ aparecem como os principais precursores de CH₄ nas turfeiras (Horn *et al.*, 2003). A UTO 29 apresentou 92% de identidade com clone de arqueia não cultivada (EU155939) encontrada em trabalho de caracterização da comunidade microbiana de turfeiras, conduzido por Cadillo-Quiroz *et al.* (2008).

As populações de arqueias metanogênicas em aterros sanitários são menos estudadas. No entanto, variedade de microrganismos foi isolada e caracterizada a partir de aterros locais, onde podem existir como microrganismos de vida livre ou como simbiontes junto aos protozoários (Chaban *et al.*, 2006). A UTO 27 teve 84% de identidade com clone de arqueia não cultivada encontrada no lixiviado de um aterro municipal de resíduos sólidos (Huang *et al.*, 2003).

As arqueias metanogênicas metilotróficas já foram isoladas de diferentes *habitats*, incluindo sedimentos de mares, rios, lagos e lodo de digestores anaeróbios. Crescem em meios contendo metanol, metilaminas e outros compostos de um carbono (C₁). H₂, formiato e acetato não são substratos para seu crescimento. Na maioria das vezes, essas arqueias são mesofílicas e caracterizam-se morfologicamente por células cocóides pequenas, irregulares e gram-negativas, capazes de formar pequenos

agregados (Whitman *et al.*, 2006). A UTO 31 apresentou 97% de identidade com clone de arqueia do gênero *Methanomethylovorans* sp. (EF174501) obtido por Ding (2008) em pesquisa ainda não publicada. A UTO 13 teve 99% de identidade com clone de *Methanomethylovorans hollandica* (AF120163) isolada e caracterizada no trabalho de Lomans *et al.* (1999). Essa arqueia, obtida a partir de sedimento de rio, foi o primeiro microrganismo anaeróbio estrito capaz de ser cultivado em meio contendo dimetilsulfeto como única fonte de carbono. É uma arqueia metanogênica metilotrófica estrita, podendo crescer em meios contendo também metilamina, dimetilamina, trimetilamina, metanol e metilmercaptano. Acetato, H₂ e CO₂ não são substratos catabólicos. O crescimento é favorecido por concentrações de NaCl entre 0 e 0,04M. Concentrações superiores a essa faixa inibem seu crescimento. O pH ideal para seu crescimento é entre 6,5 e 7,0, e a faixa de temperatura ideal é entre 34 e 37°C. Suas células apresentam-se como cocos irregulares, sésseis e gram-negativos. Ocorrem em grupos de duas a quatro células com diâmetro entre 1,0 e 1,5 µm, e formam grandes agregados.

Tabela 5.5: UTOS do Domínio *Archaea* obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹ e alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹ e microrganismos relacionados

UTO *	Nº de clones	Pb**	Identidade (%)	Organismo	Nº de acesso do <i>Genebank</i>	Abundância (%)	Referência (NP - não publicado)
3	3	600	98	anaerobic methanogenic archaeon	AJ244288	2,83	Chin <i>et al.</i> (1999)
4	2	600	97	uncultured archaeon	EU591663	1,89	Zhang e Rittmann (2008) - NP
8	4	600	99	uncultured archaeon	AF424764	3,77	Williams <i>et al.</i> (2004) - NP
11	1	600	87	uncultured archaeon GA67	AB046185	0,94	Takamizawa <i>et al.</i> (2005) - NP
13	1	600	99	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	AF120163	0,94	Lomans <i>et al.</i> (1999)
14	2	600	96	toluene-degrading methanogenic consortium archaeon	AF423187	1,89	Ficker <i>et al.</i> (1999)
15	3	600	93	unidentified euryarchaeote	AJ240006	2,83	Casamayor <i>et al.</i> (2000)
19	2	600	100	<i>Methanosaeta concilii</i>	M59146	1,89	Rouviere <i>et al.</i> (1992)
20	1	600	90	unidentified archaeon	Y18087	0,94	Zepp Falz <i>et al.</i> (1999)
23	1	600	96	uncultured archaeon TA03	AF229776	0,94	Wu <i>et al.</i> (2001)
25	1	600	86	uncultured archaeon 'Soyang 1Af-1100Ar'	AF056367	0,94	Go e Ahn (2008) - NP
27	2	600	84	uncultured archaeon	AJ576230	1,89	Huang <i>et al.</i> (2003)
28	1	600	92	unidentified archaeon	Y18086	0,94	Zepp Falz <i>et al.</i> (1999)
29	1	600	92	uncultured archaeon	EU155939	0,94	Cadillo-Quiroz <i>et al.</i> (2008)
31	1	600	97	<i>Methanomethylovorans</i> sp	EF174501	0,94	Zhang (2007) - NP
41	3	460	99	uncultured archaeon	EU662676	2,83	Ding (2008) - NP

UTO: unidade taxonômica operacional; Pb: pares de base

Figura 5.38: Árvore filogenética (Parsimônia Interativa - ARB) de amostras da biomassa retirada dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹ e alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹. A barra indica 10% de divergência entre as seqüências de DNA).

5.5.2. Avaliação de Diferentes Relações Metilamina/Sulfato

A comunidade microbiana presente nos reatores pertencentes ao segundo ensaio, que avaliou as diferentes relações metilamina/sulfato, foi visualizada por meio de exames microscópios de contraste de fases e de fluorescência. Assim como aconteceu para o primeiro ensaio, todos os reatores apresentaram semelhança de morfologias em todas as condições estudadas. Foram encontrados nesses reatores bacilos (Figura 5.39 a, d), filamentos (Figura 5.39 g), cocos (Figura 5.39 c, e, f, h) e sarcinas (Figura 5.39 b).

Também devido à semelhança morfológica, visualizada pelos exames microscópicos, entre os microrganismos das amostras retiradas dos reatores estudados durante o segundo ensaio, estudos de biologia molecular foram realizados somente nas amostras retiradas dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹, alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26. Essas amostras foram analisadas por meio do seqüenciamento de fragmentos da região 16S do RNAr com iniciadores universais para *Bacteria* e *Archaea*. Para o Domínio *Bacteria* foram seqüenciados 109 clones. Na comparação das seqüências desses clones com seqüências de microrganismos depositadas no *genebank*, foram encontrados representantes de 11 grupos distintos, sendo sete deles Filos bem consolidados (*Firmicutes* – 45%, *Proteobacteria* – 7%, *Spirochaetes* – 2%, *Synergistes* – 16%, *Chloroflexi* – 4%, *Thermotogae* – 8% e *Planctomycetes* – 1%) e quatro filis ainda em construção (*OP9* – 2%, *OP10* – 2%, *WS1* – 1% e *NKB19* – 1%). 11% dos clones não foram classificados dentro de nenhum grupo bacteriano (Figura 5.40). Como já foi exposto anteriormente, a comparação desses filis, apesar de estar expressa em porcentagem, representa qualitativamente, e não quantitativamente, a comunidade microbiana presente nesses reatores.

Figura 5.39: Morfologias encontradas nos reatores anaeróbios: bacilos (a, d), filamentos (g), cocos (c, e, f, h) e sarcinas (b).

Figura 5.40: Estrutura da comunidade microbiana relacionada ao Domínio *Bacteria* dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹, alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26.

Para a construção da árvore filogenética, as seqüências dos clones que apresentaram similaridade $\geq 97\%$ foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOS). A Tabela 5.6 apresenta o número de clones agrupado nas UTOS mais representativas do Domínio *Bacteria*, assim como os microrganismos aos quais eles se relacionam no banco de dados do *genebank*. A Figura 5.42 apresenta a árvore filogenética (parsimônia interativa) com as UTOS agrupadas em seus respectivos Filos, como se segue, para o Domínio *Bacteria*.

Firmicutes: foi o Filo encontrado em maior abundância entre as amostras seqüenciadas, englobando 25 UTOS (2, 4, 6, 7, 8, 11, 15, 17, 18, 21, 25, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 43, 48, 50, 51, 53, 54 e 56).

As UTOS 6 e 32 tiveram 87% e 91% de identidade com clones representantes das espécies *Peptostreptococcus micros* (D14143) e *Finegoldia magna* (D14149),

respectivamente, isolados do estudo de Ezaki *et al.* (1994), no qual avaliaram seqüências da região 16S do DNA ribossomal de cocos anaeróbios.

A UTO 15 apresentou 94% de identidade com clone de bactéria não cultivada (EU358685) retirado de um estudo realizado para verificar a composição microbiana de reator mesofílico usado no tratamento de dejetos de suinocultura (Liu *et al.*, 2009). A UTO 25 apresentou 94% de identidade com o clone X76161, identificado como *Clostridium aminobutyricum*, isolado na pesquisa de Collins *et al.* (1994) que tiveram como proposta a combinação de cinco novos gêneros e onze novas espécies de *Clostridium*.

A UTO 36 teve 94% de similaridade com clone de *Soehngenia saccharolytica* (AY353956), isolado no trabalho de Parshina *et al.* (2003). O gênero *Soehngenia* é composto por bactérias gram-positivas, anaeróbias, mesofílicas, capazes de fixar nitrogênio em sua forma molecular. *Soehngenia saccharolytica* forma endósporos em meios sem suplementação de nitrogênio, apresenta metabolismo fermentativo, usa sulfeto e tiosulfato como reeptoires de elétrons, com formação de H₂S, e produzem NH₄⁺ em extrato de levedura.

A UTO 39 apresentou apenas 86% de identidade com clone de bactéria não cultivada (EF559122) obtido na pesquisa de Parshina *et al.* (2003), que pesquisaram microrganismos degradadores de celulose sob condições mesofílicas em amostras de resíduos sólidos. A UTO 51 apresentou 89% de identidade com clone de *Proteiniborus ethanoligenes* (EF116488), uma bactéria anaeróbia utilizadora de proteínas, isolada do trabalho de Niu *et al.* (2008). Esse microrganismo foi isolado de lodo granulado mesofílico produtor de hidrogênio, retirado de reator UASB usado no tratamento de água residuária de indústria de alimentos. *Proteiniborus ethanoligenes* é um bacilo

gram-positivo, anaeróbio, mesofílico e quimioorganotrófico. Seus principais produtos de fermentação são etanol, ácido acético, H₂ e CO₂.

A UTO 53 teve 99% de identidade com clone de bactéria não cultivada (DQ796926), identificada no trabalho de Ley *et al.* (2006), que estudaram bactérias do trato digestivo humano relacionadas à obesidade.

Proteobacteria: foi representado na árvore filogenética pelas UTOS 9, 14, 29, 42 e 52. A UTO 9 apresentou 99% de identidade com clone isolado de um cultivo de bactérias desnitrificantes isoladas de lodos ativados (Heylen *et al.*, 2006), identificado como pertencente do gênero *Acidovorax* (AM084022). Esse gênero foi descrito por Willems *et al.*, (1990), e é composto por bacilos retos ou ligeiramente curvos, que ocorrem isolados ou em pequenas cadeias, móveis por meio de um simples flagelo polar. São gram-negativos, aeróbios e quimioorganotróficos, crescendo em meios contendo aminoácidos, ácidos orgânicos ou peptonas.

A UTO 14 teve 99% de identidade com clone relacionado a uma bactéria ainda não cultivada (AY661418), retirado de reator anaeróbio termofílico usado no tratamento de tereftalato (Chen *et al.*, 2004). O tereftalato, juntamente com outros compostos orgânicos, é encontrado na água residuária da produção do ácido tereftalático purificado, que por sua vez é empregado em grandes quantidades como matéria prima na produção de filmes de poliéster, fibras têxteis e garrafas de polietileno e tereftalato.

A UTO 29 apresentou 97% de identidade com clone de *Desulfomonile limimaris* (AF230531) obtida por Sun *et al.* (2001) a partir de cultura anaeróbia de sedimento marinho enriquecida com 3-clorobenzoato. Esta bactéria redutora de sulfato tem morfologia cocóide, é gram negativa, anaeróbia estrita, e usa com doadores de elétrons benzoato, lactato, formiato, H₂, butirato, propionato e piruvato. Como aceptores de elétrons, são usados sulfato, sulfeto, tiosulfato, nitrato, fumarato e 3-clorobenzoato.

Tabela 5.6: UTOS do Domínio *Bacteria* obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹, alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26 e microrganismos relacionados

UTO *	Nº de clones	Pb**	Identidade (%)	Organismo	Nº de acesso do <i>Genebank</i>	Abundância (%)	Referência (NP - não publicado)
1	4	471	98	uncultured bacterium mle1-42	AF280863	3,67	LaPara <i>et al.</i> (2000)
4	3	598	92	uncultured bacterium	EU981271	2,75	Gniese <i>et al.</i> (2008) - NP
5	5	486	100	uncultured bacterium	AF482446	4,59	Hofman-Bang e Ahring (2008) - NP
6	2	444	87	<i>Peptostreptococcus micros</i>	D14143	1,83	Ezaki <i>et al.</i> (1994)
9	2	398	99	<i>Acidovorax</i> sp. R-25212	AM084022	1,83	Heylen <i>et al.</i> (2006)
13	2	465	99	unidentified bacterium	AB011302	1,83	Sekiguchi <i>et al.</i> (1998)
14	2	501	99	uncultured bacterium	AY661418	1,83	Chen <i>et al.</i> (2004)
15	2	470	94	uncultured bacterium	EU358685	1,83	Liu <i>et al.</i> (2009)
16	2	441	99	uncultured bacterium	AB234270	1,83	Hiraishi <i>et al.</i> (2005)
19	2	507	99	uncultured bacterium	AJ420322	1,83	von Wintzingerode <i>et al.</i> (2003) - NP
20	3	532	99	uncultured bacterium	U81735	2,75	Godon <i>et al.</i> (1997)
22	3	496	98	uncultured bacterium mle1-42	AF280863	2,75	LaPara <i>et al.</i> (2000)
25	2	490	94	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	X76161	1,83	Collins <i>et al.</i> (1994)
27	2	507	79	Thermotogales str. Dex60-136	AJ431250	1,83	Cambon-Bonavita <i>et al.</i> (2003) - NP
28	2	470	97	uncultured bacterium SHD-71	AJ278167	1,83	Schlötelburg <i>et al.</i> (2002)
29	2	495	97	<i>Desulfomonile limimaris</i>	AF230531	1,83	Sun <i>et al.</i> (2001)
32	2	523	91	<i>Finogoldia magna</i>	D14149	1,83	Ezaki <i>et al.</i> (1994)
34	2	460	99	Spirochetes bacterium enrichment culture clone	EU498367	1,83	Rowe <i>et al.</i> (2008)
35	2	488	99	uncultured bacterium	AB248651	1,83	Tang <i>et al.</i> (2007)
36	2	527	94	<i>Soehngenia saccharolytica</i>	AY353956	1,83	Parshina <i>et al.</i> (2003)
37	2	525	95	<i>Eubacterium angustum</i>	L34612	1,83	Ludwig e Woese (1995) - NP
39	2	451	86	uncultured bacterium	EF559133	1,83	Li <i>et al.</i> (2008)
40	1	506	97	anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete	AJ131819	0,92	Strous <i>et al.</i> (1999)
41	1	457	96	unidentified bacterium	AY345497	0,92	Donachie <i>et al.</i> (2008) - NP

UTO: unidade taxonômica operacional; Pb: pares de base

Continuação - Tabela 5.6: UTOS do Domínio *Bacteria* obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹, alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26 e microrganismos relacionados

UTO *	Nº de clones	Pb**	Identidade (%)	Organismo	Nº de acesso do <i>Genebank</i>	Abundância (%)	Referência (NP - não publicado)
42	1	437	98	<i>Syntrophus</i> sp.	AJ133794	0,92	Zengler <i>et al.</i> (1999)
44	1	489	87	uncultured bacterium SJA-121	AJ009490	0,92	Von Wintzingerode <i>et al.</i> (1999)
46	1	476	93	uncultured bacterium	CR933119	0,92	Chouari <i>et al.</i> (2005)
48	1	509	97	Clostridiales bacterium enrichment culture clone 12-2A	EU523731	0,92	Pemner e Foght (2008) - NP
50	1	472	97	uncultured bacterium	AM982565	0,92	Snell-Castro <i>et al.</i> (2008) - NP
51	1	549	89	<i>Proteiniborus ethanolicus</i>	EF116488	0,92	Niu <i>et al.</i> (2008)
52	1	500	98	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	X82874	0,92	Harmsen <i>et al.</i> (1995)
53	1	481	99	uncultured bacterium	DQ796926	0,92	Ley <i>et al.</i> (2006)
55	1	435	86	<i>Aminiphilus circumscriptus</i>	AY642589	0,92	Diaz <i>et al.</i> (2007)
56	1	448	98	uncultured bacterium	EU981271	0,92	Gniese <i>et al.</i> (2008) - NP

UTO: unidade taxonômica operacional; Pb: pares de base

A UTO 42 teve 98% de identidade com clone identificado como pertencente ao gênero *Syntrophus* (AJ133794), obtida por Zengles *et al.* (1999), que estudaram a formação de metano a partir de alcanos de cadeia longa por microrganismos anaeróbios. Microrganismos pertencentes a esse gênero possuem crescimento estritamente anaeróbio em ambiente mesofílico. A maioria das espécies descritas é incapaz de usar sulfato como aceptor de elétrons, mas preferencialmente reduzem prótons (ou formam formiato) e assim requerem a presença de organismos utilizadores de H₂ (ou utilizadores de formiato) como parceiros sintróficos. Em adição, sulfeto ou tiosulfato podem ser usados. Compostos orgânicos simples servem como doadores de elétrons e fontes de carbono que são oxidados de maneira incompleta a acetato ou completamente a CO₂. Espécies foram isoladas de quase todos os ambientes aquáticos anóxicos, incluindo habitats marinhos e de água doce, assim como lodo de estação de tratamento de esgoto.

A UTO 52 teve 98% de identidade com *Syntrophobacter fumaroxidans* (X82874) isolada e caracterizada no trabalho de Harmsen *et al.* (1995) como uma bactéria redutora de sulfato, gram-negativa, anaeróbia estrita, que cresce em propionato em sintrofismo com bactérias ou arqueias metanogênicas que utilizam H₂ ou formiato. Além do sulfato, fumarato e tiosulfato podem ser usados como aceptores de elétrons. Seu habitat é o logo granular de reator anaeróbio empregado no tratamento de águas residuárias contendo açúcar.

Planctomycetales: esse Filo está representado na árvore filogenética pela UTO 40, associada com 97% de identidade ao clone de bactéria do processo ANAMMOX (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) (AJ131819), isolado no trabalho de Strous *et al.* (1999) a partir de um biofilme anaeróbio.

Spirochaetes: representado apenas pela UTO 34, que apresentou 99% de identidade com clone de bactéria obtido a partir de uma cultura de *Spirochaetales* (EU498367), cultivada em meio de cultivo com percloroeteno e butirato.

Actinobacteria: Filo representado pela UTO 41, com 96% de identidade com bactéria não cultivada (AY345497) obtida no trabalho de Donachie *et al.* (2008) ainda não publicado.

Chloroflexi: esse Filo foi representado na árvore filogenética pelas UTOS 10, 28, 44 e 49. A UTO 28 teve 97% de identidade com clone de bactéria não cultivada (AJ278167) obtida por Schlötelburg *et al.* (2002), no qual foi estudada a estrutura da comunidade microbiana de reator inoculado com sedimento de rio e usado na descloração de 1,2-dicloropropano.

Synergistes: sete UTOS representaram esse filo na árvore filogenética (1, 13, 20, 22, 24, 35 e 55). As UTOS 1 e 22 apresentaram 98% de identidade com clone isolado de reator mesofílico (AF280863) pertencente a um estudo que avaliou a diversidade bacteriana de reatores mesofílicos (28 a 32°C) e termofílicos (50 a 58°C) usados no tratamento de água residuária de indústria farmacêutica (LaPara *et al.*, 2000).

A UTO 13 apresentou 99% de identidade com clone de bactéria não cultivada (AB011302) descrita em estudo comparativo da diversidade filogenética de lodo granular de reatores mesofílicos (35°) e termofílicos (55°C), usados no tratamento de água residuária sintética contendo sacarose, propionato e acetato (Sekiguchi *et al.*, 1998).

A UTO 20 teve 99% de identidade com clone de bactéria não cultivada (U81735) obtido por Godon *et al.* (1997) que avaliaram a diversidade microbiana de reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com a vinhaça residual da destilação de vinho.

A UTO 35 apresentou 99% de identidade com bactéria não cultivada (AB248651) obtida por Tang *et al.* (2007) em pesquisa que avaliou a influência da

diluição na estrutura da comunidade microbiana metanogênica em quimiostatos alimentados com butirato como única fonte de carbono.

A UTO 55 teve 86% de identidade com clone de *Aminiphilus circumscriptus* (AY642589), obtido na pesquisa de Diaz *et al.* (2007) em reator UASB empregado no tratamento de efluente de cervejaria. O gênero *Aminiphilus* é caracterizado por células gram-negativas ligeiramente curvas, estritamente anaeróbias, mesofílicas e não formadoras de endósporos. Compostos peptídicos, aminoácidos, malato, fumarato, glicerol e piruvato são fermentados. Oxigênio, tiosulfato, sulfato, sulfeto, enxofre elementar e nitrito não são usados como aceptores de elétrons para o crescimento.

Thermotogae: Este filo foi representado na árvore filogenética pelas UTOS 5 e 26. A UTO 5 apresentou 100% de identidade com clone de bactéria não cultivada (AF482446) obtida em trabalho de Hofman-Bang e Ahring (2008), ainda não publicado, que avaliou a diversidade microbiana e a dinâmica dos microrganismos oxidadores de aminoácidos em lodo granulado.

Microrganismos do Domínio *Archaea* também foram analisados por meio do sequenciamento de fragmentos da região 16S do RNAr, para os reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹ e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina. Para esses reatores, foram sequenciados 109 clones que se agruparam em 54 unidades taxonômicas operacionais (UTOS). Todos os clones obtidos foram pertencentes ao Filo *Euryarchaeota* (Figura 5.41). 89% dos clones foram relacionados a microrganismos da Classe *Methanomicrobia*, sendo 27% da Família *Methanomicrobiaceae*, 58% da Família *Methanosaetaceae* e 4% da Família *Methanosarcinaceae*. As Classes *Methanobacteria* e *Thermoplasmata* foram representadas por 2% dos clones cada. 7% dos clones foram relacionados à ordem *WSA2*. A construção da árvore filogenética foi realizada com as UTOS das seqüências dos clones que apresentaram similaridade $\geq$ 97%. A Tabela 5.7 apresenta o número de clones agrupado nas UTOS mais representativas do Domínio *Archaea*, assim como os microrganismos aos quais eles se

relacionam no banco de dados do *genebank*. A Figura 5.42 apresenta a árvore filogenética (parsimônia interativa) com as UTOS inseridas no Domínio *Archaea*.

Figura 5.41: Estrutura da comunidade microbiana relacionada ao Domínio *Archaea* dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹, alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26.

A UTO 3 apresentou 95% de identidade com clone de *Methanolinea* sp. (AB447467) obtido por Sakai *et al.* (2009) em amostras de diversos ambientes anóxicos, como sedimentos de rios e lagos, campos alagados de arroz e lodos de digestores anaeróbios, por meio do método de co-cultura. A UTO 24, isolada do mesmo trabalho, teve 94% de identidade com clone de *Methanomicrobia* não cultivado (AB236066). Microrganismos do gênero *Methanolinea* se apresentam como bacilos de extremidades retas, capazes de formar filamentos multicelulares. São arqueias anaeróbias estritas, pertencentes à Ordem *Methanomicrobiales*, e usam H₂ ou formiato durante seu crescimento e concomitante produção de CH₄ (Imashi *et al.*, 2008). A UTO 28 teve 96% de identidade com clone de arqueia não identificada (Y18081) isolada do sedimento anóxico de um lago suíço durante as pesquisas de Zeep Falz *et al.* (1999).

Tabela 5.7: UTOS do Domínio *Archaea* obtidas a partir da clonagem de amostras dos reatores inoculados com 5,0 g STV L⁻¹, alimentados com 1.550 mg metilamina L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato 1,26 e microrganismos relacionados

UTO *	Nº de clones	Pb**	Identidade (%)	Organismo	Nº de acesso do <i>Genebank</i>	Abundância (%)	Referência (NP - não publicado)
1	2	600	96	unidentified archaeon	AJ227929	1,82	Gro kopf <i>et al.</i> (1998)
3	1	600	95	<i>Methanolinea</i> sp. TNR	AB447467	0,91	Sakai <i>et al.</i> (2009)
5	6	600	99	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	AY260433	5,45	Simankova <i>et al.</i> (2003)
8	1	600	96	uncultured bacterium	AB266916	0,91	Narihiro <i>et al.</i> (2009)
12	3	600	98	toluene-degrading methanogenic consortium archaeon	AF423187	2,73	Ficker <i>et al.</i> (1999)
16	1	600	84	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	AY260433	0,91	Simankova <i>et al.</i> (2003)
18	2	599	88	<i>Methanobacterium</i> sp.	Y18734	1,82	Adachi (1999)
20	1	600	97	uncultured <i>Methanomethylovorans</i> sp.	DQ631885	0,91	de Bok <i>et al.</i> (2006)
24	1	600	94	uncultured Methanomicrobia archaeon	AB236066	0,91	Sakai <i>et al.</i> (2009)
27	1	600	100	uncultured archaeon	AF424768	0,91	Williams <i>et al.</i> (2004) - NP
28	1	600	96	unidentified archaeon	Y18081	0,91	Zepp Falz <i>et al.</i> (1999)
34	1	525	91	uncultured archaeon	EU662676	0,91	Ding (2008) - NP
37	6	463	100	<i>Candidatus Methanoregula boonei</i> 6A8	NC_009712	5,45	Copeland <i>et al.</i> (2009) - NP
45	2	434	93	uncultured archaeon	AF225667	1,82	Lueders e Friedrich (2000)
46	2	473	100	uncultured euryarchaeote a60ev	AJ287716	1,82	Brambilla <i>et al.</i> (2000) - NP
53	1	501	98	uncultured archaeon TA02	AF229775	0,91	Wu <i>et al.</i> (2001)

UTO: unidade taxonômica operacional; Pb: pares de base

A UTO 1 teve 96% de identidade com arqueia não cultivada obtida no trabalho de Großkopf *et al.* (1998), que identificou novas linhagens de *Euryarchaeota* em raízes de arroz e também no solo anóxico irrigado dos campos de arroz. A UTO 18 apresentou 84% de identidade com clone de *Methanobacterium* sp. (Y18734) obtido em trabalho de isolamento de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas em campos *alagados* de clima subtropical, conduzido por Adashi (1999).

A OTU 45 teve 93% de identidade com clone de arqueia não cultivada obtida no trabalho de Lueders e Friedrich (2000), que avaliaram a dinâmica da população de arqueias em plantação de arroz em campos *alagados* durante o processo de redução de ferro, nitrato e sulfato que antecede o início de produção de metano nesses ecossistemas.

A UTO 37 apresentou 100% de identidade com clone de *Methanoregula boonei* (NC_009712). Esta espécie de arqueia foi isolada por Bräuer *et al.* (2010) em pântano acidófilo. Microrganismos dessa espécie apresentam-se como bacilos delgados ou cocos irregulares mesofílicos, anaeróbios estritos, acidófilos, e produzem CH₄ a partir de H₂/CO₂.

A UTO 12 teve 98% de identidade com clone de arqueia (AF423187) pertencente a consórcio metanogênico capaz de degradar tolueno. Esse consórcio foi enriquecido durante o trabalho de Ficker *et al.* (1999). Microrganismo semelhante também foi identificado no reator alimentado com 1.550 mg metilamina L⁻¹ e inoculado com 5,0 g STV L⁻¹.

A UTO 31 teve 97% de identidade com clone de microrganismo não identificado (CT573674) obtido por Chouari *et al.* (2005) em trabalho de caracterização de microrganismos dos Domínios *Bacteria* e *Archaea* em lodo de reator anaeróbico. A UTO 53 apresentou 98% de identidade com arqueia não cultivada (AF229775)

encontrada no trabalho de Wu *et al.* (2001) que caracterizou um consórcio microbiano presente em reator de lodo granulado empregado na degradação de tereftalato. Clone similar a esse também foi isolado durante o primeiro ensaio, no reator alimentado com 1.550 mg L⁻¹ de metilamina e inoculado com 5,0 g STV L⁻¹.

As UTOS 5 e 16 apresentaram 99% e 84% de identidade, respectivamente, com clone de arqueia metanogênica identificada como *Methanomethylovorans hollandica* (AY260433) obtido durante a pesquisa de Simankova *et al.* (2003) que isolaram e caracterizaram novas linhagens de microrganismos metanogênicos obtidos em *habitats* terrestres frios. Essa espécie de arqueia metanogênica usa compostos metilados, como mono, di e trimetilamina, além de metanol, metilmercaptano e dimetilsulfeto. Foi a primeira linhagem metanogênica identificada capaz de degradar esses compostos em ecossistemas de água doce e fria, com temperaturas de 4-5°C. Nunca formam agregados celulares, apenas conjuntos de três ou quatro células, as quais são cocóides, irregulares, sésseis e com diâmetro entre 1 e 1,7 µm. A UTO 20 apresentou 97% de identidade com o clone do gênero *Methanomethylovorans* sp. (DQ631885) isolado em reator UASB usado para o estudo de degradação de metilmercaptano (CH₄S) por arqueias metanogênicas metilotróficas (de Bock *et al.*, 2006).

Figura 5.42: Árvore filogenética (Parsimônia Interativa - ARB) de amostras da biomassa retirada dos reatores inoculados com $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de STV, alimentados com 1.550 mg L^{-1} de metilamina e submetidos à relação metilamina/sulfato=1,26. A barra indica 10% de divergência entre as seqüências de DNA.

5.5.3. Comparação entre os dois ensaios

Com relação ao Domínio *Bacteria*, nos dois ensaios foram identificados diversos clones relacionados a microrganismos presentes em reatores anaeróbios, em aquíferos contaminados e em sedimentos marinhos, de rios e lagos. Nos reatores pertencentes ao primeiro ensaio, inoculados com 5,0 g L⁻¹ de STV e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de STV, foram identificados clones pertencentes a oito Filos distintos, como já foi discutido anteriormente. Nos reatores inoculados com 5,0 g L⁻¹ de STV, alimentados com 1.550 mg L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato=1,26 foram encontrados clones classificados em doze Filos diferentes. *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Firmicutes*, *Synergistes* e *WSI* foram os Filos representados nas duas condições estudadas. Os demais Filos estavam representados em apenas uma das condições estudadas (Figura 5.43).

O Filo *Proteobacteria*, nos reatores pertencentes ao primeiro ensaio, foi representado por microrganismos da Família *Bacillaceae* e por microrganismos presentes em consórcios responsáveis pela degradação de triclorobenzeno. Nos reatores pertencentes ao segundo ensaio, que estavam submetidos à relação metilamina/sulfato=1,26, este filo foi representado por bactérias redutoras de sulfato, relacionadas às espécies *Desulfomonile limimaris* e *Sintrophobacter fumaroxidans*. Microrganismos do gênero *Sintrophus*, capazes de crescer em associação com arqueias hidrogenotróficas e de usarem sulfeto, também estavam presentes nesses reatores. Microrganismos relacionados a bactérias desnitrificantes, presentes em sistemas de tratamento de águas residuárias ricas em amioácidos e microrganismos capazes de degradar tereftalato também foram encontrados nessa condição estudada.

Figura 5.43: Comparação entre os clones pertencentes aos Filos do Domínio *Bacteria* encontrados nos reatores inoculados com 5,0 g L⁻¹ de STV e alimentados com 1.550 mg L⁻¹ de STV (primeiro ensaio - ■) e nos reatores inoculados com 5,0 g L⁻¹ de STV, alimentados com 1.550 mg L⁻¹ e submetidos à relação metilamina/sulfato=1,26 (segundo ensaio - ■).

O Filo *Spirochaetes* foi representado, nos dois ensaios, por microrganismos presentes em águas residuárias ou sistemas de tratamento que continham compostos de difícil degradação. No primeiro ensaio, onde foram encontrados doze clones relacionados a este Filo, as bactérias encontradas estavam associadas a microrganismos presentes em aquífero contaminado com hidrocarbonetos e solventes clorados. No segundo ensaio o Filo foi representado por apenas dois clones associados a microrganismos presentes na degradação de percloroeteno.

O Filo *Firmicutes* foi o mais abundante nos reatores com adição de sulfato, sendo representado por 49 clones. No primeiro ensaio, doze clones foram relacionados a este Filo, sempre associados a microrganismos presentes em reatores anaeróbios e em áreas contaminadas com hidrocarbonetos e solventes clorados. No segundo ensaio, os clones presentes nos reatores com relação metilamina/sulfato=1,26 foram relacionados a microrganismos dos Gêneros *Peptostreptococcus* e *Finegoldia*, cocos anaeróbios comumente encontrados em reatores anaeróbios mesofílicos. Microrganismos

relacionados aos Gêneros *Clostridium*, *Proteiniborus* e *Soehngenia* também foram identificados. *Clostridium* é muito abundante em sistemas de tratamento anaeróbio de diversas águas residuárias. *Proteiniborus* é encontrado em reatores mesofílicos usados no tratamento de águas residuárias ricas em proteínas da indústria de alimentos. *Soehngenia*, também encontrado em reatores anaeróbios, é capaz de utilizar sulfeto e de produzir H_2S e NH_4^+ .

O Filo *Synergistes* foi o mais abundante nos reatores pertencentes ao primeiro ensaio, no qual não foi adicionado sulfato nos reatores, com a identificação de 44 clones pertencentes a ele. Dentre esses clones, foram identificados microrganismos semelhantes a *Aminomonas paucivorans*, uma espécie de bactéria capaz de degradar aminoácidos. Muitos dos clones identificados foram semelhantes a microrganismos presentes em reatores anaeróbios usados no tratamento de efluentes da indústria farmacêutica. Microrganismos encontrados em reatores aplicados ao tratamento de vinhaça também se assemelharam a clones pertencentes a este Filo. Nos reatores do ensaio com relação metilamina/sulfato=1,26 foram seqüenciados 17 clones pertencentes a *Synergistes*. Assim como no primeiro ensaio, os clones foram semelhantes a microrganismos encontrados em sistemas anaeróbios de tratamento de vinhaça e efluente de indústria farmacêutica. Nessa condição, foi identificado microrganismo semelhante a bactérias do Gênero *Aminiphilus*, cujos representantes são capazes de degradar aminoácidos.

Nota-se que, mesmo com a ausência de Espécies de microrganismos especializados na degradação da metilamina, o Filo *Synergistes* caracterizou-se por microrganismos presentes em sistemas de tratamento de águas residuárias potencialmente ricas em metilamina, pois esta está presente na constituição dos aminoácidos e também é usada na fabricação de diversos fármacos. A abundância de

clones relacionados a este Filo nos reatores analisados ao final dos dois ensaios pode ser um indicativo de que espécies de microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* capazes de degradar a metilamina ou compostos que a tenham como intermediário estavam presentes nesses reatores.

Com relação ao Domínio *Archaea*, os microrganismos encontrados nos reatores pertencentes aos dois ensaios foram muito semelhantes, independente da presença ou não de sulfato. Os microrganismos mais abundantes foram as arqueias hidrogenotróficas e as arqueias metanogênicas, semelhantes a microrganismos do *Genbank* provenientes de sedimentos marinhos, de rios e lagos, reatores anaeróbios, campos alagados de arroz, turfeiras e aterros sanitários. Nas duas condições estudadas foi detectada a presença de microrganismos relacionados a *Methanomethylovorans hollandica*, uma Espécie de arqueia metanogênica com metabolismo especializado na degradação de metilamina. Mesmo não sendo a Espécie mais abundante nos reatores, é provável que ela seja a responsável pela degradação de grande parcela da metilamina presente nos reatores.

Methanomethylovorans hollandica é uma Espécie caracterizada por cocos irregulares que formam pequenos agregados, geralmente de duas a quatro células, que se agrupam. Células de morfologia semelhante foram abundantemente encontradas em todos os reatores estudados, como comprovam as figuras 5.35 (e,g) e 5.39 (e,h).

**“O tempo é o melhor autor.
Sempre encontra um final perfeito.”**
Charlie Chaplin

6. CONCLUSÕES

- A metilamina, mesmo sendo um composto de fácil degradação, inibiu o crescimento da biomassa quando adotada a relação substrato/inóculo de 1,24, com relação a valores de massa. Menores relações metilamina/sulfato mostraram-se favoráveis à metanogênese, com produção de metano equivalente à esperada estequiometricamente.
- A adição de sulfato inibiu a produção de metano apenas nos reatores controle sem adição de metilamina. Na presença da metilamina, a adição de diferentes concentrações de sulfato não alterou a eficiência e a velocidade de produção de metano, evidenciando que arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato não competiram pelo uso do substrato.

- Ao final dos ensaios, os reatores mantiveram ampla diversidade de microrganismos. As morfologias detectadas pelos exames microscópicos foram bacilos, cocos, filamentos, sarcinas e cocos fluorescentes.
- O seqüenciamento dos clones relacionados ao Domínio *Bacteria* mostrou que a adição de sulfato aos reatores resultou em grande alteração na estrutura da comunidade microbiana, porém sem interferir na eficiência de produção de metano resultante da degradação da metilamina. Isso indica que a degradação bacteriana da metilamina não ocorre em proporções significantes, afirmação corroborada pelo fato de nenhuma bactéria diretamente relacionada à degradação da metilamina ter sido encontrada. Todavia, a sulfetogênese foi favorecida provavelmente pelo uso de hidrogênio e dióxido de carbono, além de alguns compostos orgânicos provenientes do próprio inóculo.
- Mesmo com a alteração da comunidade microbiana, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Synergistes* foram os Filos mais abundantes nos reatores, independente da adição de sulfato. Microrganismos do Filo *Synergistes*, abundantes no primeiro ensaio, foram obtidos em sistemas de tratamento de águas residuárias potencialmente ricas em metilamina. No segundo ensaio, o Filo *Proteobacteria* foi representado por diferentes espécies de BRS, provavelmente favorecidas pela adição de sulfato aos reatores.
- Arquéias metanogênicas consumidoras de substratos com grupo metil, prováveis responsáveis pela produção de metano resultante da degradação metilamina, estavam presentes nos reatores. Nos dois ensaios, foi detectada a presença de

Methanomethylovorans hollandica, arqueia metanogênica com metabolismo especializado na degradação de metilamina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achouak, W., Normand, P. e Heulin, T. (1999) Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the Bacillaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 (3):961-967.
- Adachi, K. (1999) Isolation of hydrogenotrophic methanogenic archaea from a subtropical paddy field. *FEMS Microbiology Ecology* 30:77-85.
- Alain, K., Postec, A., Grinsard, E., Lesongeur, F., Prieur, D., Godfroy, A. (2010) *Thermodesulfatator atlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfatereducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 33-38.
- Allers, T., e Mevarech, M. (2005) Archaeal genetics-the thirdway. *Nature Rev. Genet.* 6:58-73.
- Aquino, S. F., Chernicharo, C. A. L., Foresti, E., Santos, M. L. F. e Monteggia, L. O. (2007) Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. *Engenharia Sanitária Ambiental* 12(2): 192-201.
- Araújo, J. C. (1995) Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Baena, S., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Labat, M., Thomas, P., Garcia, J. L., Patel, B. K. (1999) *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 3:975-982.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. e Pace, N. R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 9188-9193.

- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jefferies, M. W. e Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 1609-1613.
- Battersby, N. S. e Wilson, V. (1989). Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 55:433-439.
- Belay, N., and Daniels, L. (1990) Elemental metals as electron sources for biological methane formation from CO₂. *Antonie van Leeuwenhoek* 57: 1-7.
- de Bok, F. A., van Leerdam, R. C., Lomans, B. P., Smidt, H., Lens, P. N., Janssen, A. J., Stams, A. J. (2006) Degradation of methanethiol by methylotrophic methanogenic archaea in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 72(12):7540-7547.
- Boone, D., Castenholtz, R. W. & Garrity, G. M. (2001) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, NY. 1: 211-213.
- Bowman, J. (2006) The Methanotrophs – The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. *Prokaryotes* 5: 266-289.
- Burke, S. A., Lo, S. L. e Krzycki, J. A. (1998) Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine. *Journal of Bacteriology* 180(13):3432-3440.
- Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J. B. e Zinder, S. H. (2008) Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology* 74(7):2059-2068.
- Calam, C. T. (1969). The culture of micro-organisms in liquid medium. In *Methods in Microbiology*, Vol. 1. Ed. J. R. Norris & D. W. Ribbons. Academic Press, New York.
- Carmo, D. F. (2004) Tratamento biológico termofílico de efluente sintético de polpa celulósica através do processo combinado anaeróbio-aeróbio. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Casamayor, E. O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C. e Muyzer G. (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 66(2):499-508
- Chaban, B., Sandy, Y. M. Ng e Jarrel, K. F. (2006) Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* 52:73-116.
- Chen, C. L., Macarie, H., Ramirez, I., Olmos, A., Ong, S. L., Monroy, O. e Liu, W. T. (2004) Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate. *Microbiology* 150(10):3429-3440.

- Chen, T. H. e Hashimoto, A. G. (1996) Effects of pH and substrate: inoculum ratio on batch methane fermentation. *Bioresource Technology* 56: 179-186.
- Chin, K., Lukow, T., Stubner, S. and Conrad R. (1999) Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30 degrees C). *FEMS Microbiology Ecology* 30(4):313-326.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestat, P., Weissenbach, J. e Sghir, A. (2005) Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ. Microbiol.* 7:1104-1115.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., Sghir, A. (2005) Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology* 7(8):1104-1115.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. e Farrow, J. A. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44(4):812-826.
- Conrad, R. (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28:193-202.
- Corbin, D. R., Schwarz, S. e Sonnichsen, G. C. (1997) Methylamines synthesis: A review. *Catalysis Today* 37(2): 71-102.
- Cuzin, N., Ouattara, A. S., Labat, M. e Garcia, J. L. (2001) *Methanobacterium congolense* sp. nov., from a methanogenic fermentation of cassava peel. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:489-493.
- Damasceno, L. (2008) Degradação do aldicarbe em biorreator anaeróbio horizontal de leito fixo. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Daniels, L., Belay, N., Rajagopal, B. S. e Weimer P. J. (1987) Bacterial methanogenesis from CO₂ with elemental iron as sole source of electrons. *Science* 237:509-511.
- DeLong, E. (1998a) Everything in moderation: archaea as 'nonextremophiles'. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:649-654.
- DeLong, E. (1998b) Archaeal means and extremes. *Science* 280: 542-543.
- DeLong, E. F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 89:5685-5689.
- DeLong, E. F. (2005) Microbial community genomics in the ocean. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:459-469.
- DeLong, E. F., Wu, K. Y., Prézelin, B. B. e Jovine, R. V. (1994) High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371:695-697.

- Deppenmeier, U. (2002) The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71:223-283.
- Derakshani, M., Lukow, T. e Liesack W. (2001) Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 67(2):623-631.
- Díaz, C., Baena, S., Fardeau, M. L. e Patel, B. K. (2007) *Aminiphilus circumscriptus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic amino-acid-degrading bacterium from an upflow anaerobic sludge reactor. *International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology* 57(8):1914-1918.
- Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K. e Pace, N. R. (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 3869-3877.
- Dolfing, J. e Bloemen, G. B. M. (1985) Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *Journal of Microbiological Methods* 4: 1-12.
- Dollhopf, S. L., Hashsham, S. A. e Tiedje, J. M. (2001) Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. *Microbial Ecology* 42(4): 495-505.
- Domingues, M. R. (2002) Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e de leito fixo, sob condições termofílicas. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Domingues, M. R. (2007) Investigação sobre a diversidade microbiana e a filogenia de arqueias e bactérias em consórcios anaeróbios metanogênicos, originados de sedimentos estuarinos enriquecidos com clorofenóis. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Doronina, N. V., Darmaeva, T. D e Trotsenko, Y. A. (2003) *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology* 53: 223-229.
- Duarte, I. C. S. (2006) Caracterização microbiológica da remoção e degradação de alquibenzeno linear sulfonado (LAS) em reatores anaeróbios com biofilme e células planctônicas. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Dubourguier, H. C. (1987) Curso ecologia da digestão anaeróbia. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, São Paulo.
- Ezaki, T., Li, N., Hashimoto, Y., Miura, H. e Yamamoto, H. (1994) 16S ribosomal DNA sequences of anaerobic cocci and proposal of *Ruminococcus hansenii* comb. nov. and *Ruminococcus productus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 51(2):365-371.

- Fernández, C. G. e Encina, P. A. G. (2009) Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass and Bioenergy* 33:1065-1069.
- Ferry, J. G. (1999) Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiology Reviews* 23:13-38.
- Ficker, M., Krastel, K., Orlicky, S. and Edwards, E. (1999) Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12):5576-5585.
- Field, J. A., Lettinga, G., Geurts, M. (1987) The Methanogenic Toxicity and Anaerobic Degradability of Potato Starch Wastewater Phenolic Amino Acids. *Biological Wastes* 21:37-54.
- Finke, N., Hoehler, T. M. e Jorgensen, B. B. (2007) Hydrogen 'leakage' during methanogenesis from methanol and methylamine: implications for anaerobic carbon degradation pathways in aquatic sediments. *Environmental Microbiology* 9(4):1060-1071.
- Florencio, L., Jenicek, P., Field, J. A. e Lettinga, G. (1993) Effect of Cobalt on the Anaerobic Degradation of Methanol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75:368-374.
- Foresti, E. (1999) *Fundamentos do Tratamento Anaeróbio*. In: Campos, J.R. (coordenador). *Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo*. PROSAB, Rio de Janeiro, 436 p.
- Garcia, J. L.; Bharat, K. C. P. e Ollivier, B. (2000) Taxonomic, Phylogenetic and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* 6:205-226.
- Garrity, G. (2002) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Editora Springer-Verlag, New York, 721p.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. e Moletta, R. (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63(7):2802-2813.
- Grady, Jr C. P. L. (1985). Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnology Bioengineering* 27:660-674.
- Graham, D. E. e White, R. H. (2002) Elucidation of methanogenic coenzyme biosyntheses: from spectroscopy to genomics. *Natural Products Report* 19: 133-147.
- Green, P. (2006) *Methylobacterium*, *Prokaryotes* 5:257-265.
- Großkopf, R.; Janssen, P. H. e Liesack, W. (1998) Diversity and Structure of the Methanogenic Community in Anoxic Rice Paddy Soil Microcosms as Examined by Cultivation and Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 960-969.

- Großkopf, R., Stubner, S., Liesack, W. (1998) Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12):4983-4989.
- Harada, H.; Vermura, S.; Momonoi, K. (1994) Interaction between sulphate reducing bacteria and methane producing bacteria in a UASB reactor fed with low strength wastes containing different levels of sulphate. *Water Research* 28(2):355-367.
- Harmsen, H. J. M., Kengen, H. M. P., Akkermans, A. D. M. e Stams, A. J. M. (1995) Phylogenetic analysis of two syntrophic propionate-oxidizing bacteria in enrichments cultures. *Systematic and Applied Microbiology* 18: 67-73.
- Harper, S. R. e Pohland, F. G. (1986) Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology Bioengineering* 28: 585-602.
- Healy, Jr. J. B. e Young, L. Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Applied and Environmental Microbiology* 38:84-89.
- Heylen, K., Vanparys, B., Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N. e De Vos, P. (2006) Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4): 2637-2643.
- Hiraishi, A., Kaiya, S., Miyakoda, H. e Futamata, H. (2005) Biotransformation of Polychlorinated Dioxins and Microbial Community Dynamics in Sediment Microcosms at Different Contamination Levels. *Microbial Environment* 20:227-242.
- Hirasawa, J. S. (2003) Avaliação da comunidade microbiana anaeróbia em reator sulfetogênico utilizando a hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH). *Dissertação de Mestrado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Hirasawa, J. S. (2007) Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de Biologia molecular. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Huang, L. N., Chen, Y. Q., Zhou, H., Luo, S., Lan, C. Y. e Qu, L. H. (2003) Characterization of methanogenic *Archaea* in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. *FEMS Microbiology Ecology* 46(2):171-177.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R. e Stetter, K.O. (2002c) *Nanoarchaeota*. In *The Prokaryotes*: an evolving electronic resource for the microbiological community.
- Huber, R., Huber, H., and Stetter, K.O. (2000a) Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 615-623.
- Imachi, H., Sakai, S., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Kamagata, Y., Ohashi, A. e Harada, H. (2008) *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 58(1):294-301.

- Jones, W. J., Nagle, D. P., e Whitman, W. B. (1987) Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiology Reviews* 51: 135-177.
- Kalyuzhnaya, M. G., Bowerman, S., Lara, J. C., Lidstrom, M. E. e Chistoserdova, L. (2006) *Methylothermobacter mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family *Methylophilaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2819-2823.
- Kalyuzhnaya, M. G., Lapidus, A., Ivanova, N., Copeland, A. C., McHardy, A., Szeto, E., Salamov, A., Grigoriev, I. V., Suciú, D. e outros autores (2008). High resolution metagenomics targets major functional types in complex microbial communities. *Nature Biotechnology* 26:1029-1034.
- Kelly, D., Rainey, F. A. e Wood, A. P. (2006) The genus *Paracoccus*. *Prokaryotes* 5:232-249.
- King, G. M. (1984) Metabolism of trimethylamine, choline, and glycine betaine by sulfate-reducing and methanogenic bacteria in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 48:719-725.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B. e Stahl, D. A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546.
- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing in Nucleic Acid Techniques. John Wiley and Sons Inc., New York.
- LaPara, T. M., Nakatsu, C. H., Pantea, L., Alleman, J. E. (2000) Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9):3951-3959.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. e Gordon J. I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444(7122)1022-1023.
- Li, L., Kato, C. e Horikoshi, K. (1999) Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench. *Marine Biotechnology* 1(4):391-400.
- Li, T., Mazéas, L., Sghir, A., Leblon, G. e Bouchez, T. (2009) Insights into networks of functional microbes catalysing methanization of cellulose under mesophilic conditions. *Environmental Microbiology* 11(4):889-904.
- Liesack, W., Schnell, S. e Revsbech, N. P. (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:625-645.
- Liu, F. H., Wang, S. B., Zhang, J. S., Zhang, J., Yan, X., Zhou, H. K., Zhao, G. P. e Zhou, Z. H. (2009) The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *Journal of Applied Microbiology* 106(3):952-966.
- Lomans, B. P., Maas, R., Luderer, R., Op den Camp, H. J., Pol, A., van der Drift, C. e Vogels, G. D. (1999) Isolation and characterization of *Methanomethylovorans*

- hollandica* gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater sediment, a methylotrophic methanogen able to grow on dimethyl sulfide and methanethiol. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3641-3650.
- Ludwig, W.; Strunk, O.; Westram, R.; Richter, L.; Meier, H.; Yadhukumar, A.; Buchner, T.; Lai, S.; Steppi, G. e Jobb, G. (2004) ARB: A Software Environment for Sequence Data. *Nucleic Acids Research* 32: 1363–1371.
- Lueders, T., Friedrich, M. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7):2732-2742.
- Macario, A. J. L. e Conway de Macario, E. (1988) Quantitative immunologic analysis of the methanogenic flora of digestors reveals a considerable diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 79-86.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M. & Parker, J. (2004) Microbiologia de Brock. 10ª edição. Editora Pearson Education do Brasil, São Paulo.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M. & Parker, J. (1997) Brock biology of microorganisms. Prentice Hall, Inc.
- Melvin, A. N. W. T.; Hobson, P. P. (1994) Identification of Anaerobic Digester Bacteria Using Polymerase Chain Reaction Method. *Bioresource Technology*. 47: 73-80.
- Messing, J. (1983) M13 cloning vehicles: their contribution to DNA sequencing. *Methods in molecular biology* 23: 9-22.
- Meuer, J., Kuettner, H. C., Zhang, J. K., Hedderich, R. e Metcalf, W.W. (2002) Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *The Proceedings of the National Academic of Science* 99: 5632-5637.
- Meyrath, J. e Suchanek, G. (1972). Inoculation techniques-effects due to quality and quantity of inoculum. In *Methods in Microbiology*, Vol 7. Ed. J. R. Norris & D. W. Ribbons. Academic Press, New York.
- Monteggia, L. (1997) Proposta de metodologia para avaliação do parâmetro Atividade Metanogênica Específica. 19º congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, ABES, Foz do Iguaçu-PR, Brasil.
- Narihiro, T., Terada, T., Kikuchi, K., Iguchi, A., Ikeda, M., Yamauchi, T., Shiraishi, K., Kamagata, Y., Nakamura, K. e Sekiguchi, Y. (2009) Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing, high-strength organic wastewaters. *Microbes and Environments* 24:88-96.
- Niosh/Osha (1981) Occupational health guidelines for chemical hazards. *DHHS (NIOSH)*: 81-123.

- Niu, L., Song, L. e Dong, X. (2008) *Proteiniborus ethanoligenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic protein-utilizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology* 58(1):12-16.
- Oliveira, L. L. (2010) Remoção de alquibenzeno linear sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Oliveira, R. A. (1997) Efeito das concentrações dos sólidos suspensos do afluyente no desempenho e características do lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo tratando águas residuárias de suinocultura. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Olsen, G. J. (1994) Archaea, Archaea everywhere. *Nature* 371: 657–658.
- Oremland, R. S., e Polcin, S. (1982) Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 44:1270-1276.
- Oren, A. (2002).. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:56-63.
- Øvreas, L.; Forney, L.; Daae, F. L. e Torsvik, V. (1997) Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Saelevanet, as Determined by Denaturant Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3367–3373.
- Parshina, S. N., Kleerebezem, R., Sanz, J. L., Lettinga, G., Nozhevnikova, A. N., Kostrikina, N. A., Lysenko, A. M. e Stams, A. J. (2003) *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology* 53(6):1791-1799.
- Pavlostathis, S. G. e Giraldo-Gomez, E. (1991) Kinetics of anaerobic treatment. *Water Science and Technology* 24(8):35-39.
- Penna, J. A. (1994) Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Penna, J. A., Vazoller, R. e Campos, J. R. (1995) Estudo da metodologia de atividade metanogênica específica. *Anais do 18º congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental*, ABES, Salvador.
- Raskin, L., Poulsen, L. K. Noguera, D. R. Rittmann, B. E. E Stahl, D. A. (1994) Quantitation of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1241-1248.
- Raskin, L., Stromley, J., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1232-1240.

- Reeve, J. N., Nolling, R. M. M. e Smith, D. R. (1997) Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first. *Journal of Bacteriology* 179: 5975-5986.
- Robichaux, M.; Howell, M. e Boopathy, R. (2003) Methanogenic activity in human periodontal pocket. *Current Microbiology* 46: 53–58.
- Rodriguez, R.P. (2010) Aplicação de reatores anaeróbios para remoção de sulfato de águas de drenagem ácida de minas. *Tese de Doutorado*. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Rouvière, P., Mandelco, L., Winker, S. e Woese, C. R. (1992) A detailed phylogeny for the *Methanomicrobiales*. *Systematic and Applied Microbiology* (3):363-371.
- Rowe, A. R., Lazar, B. J., Morris, R. M. e Richardson, R. E. (2008) Characterization of the community structure of a dechlorinating mixed culture and comparisons of gene expression in planktonic and biofloc-associated "*Dehalococcoides*" and *Methanospirillum* species. *Applied and Environmental Microbiology* 74(21):6709-6719.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Tseng, I. C., Ohashi, A., Harada, H. e Kamagata, Y. (2009) Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. *Applied and Environmental Microbiology* 75(14): 4892-4896.
- Sarti, E. L. (2007) Influência do oxigênio no crescimento de arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato em reatores anaeróbios em batelada. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:262-280.
- Schink, B., and Zeikus, J. G. (1980) Microbial methanol formation: a major endproduct of protein metabolism. *Curr. Microbiol.* 4: 387-389.
- Schloss, P. D. e Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3): 1501-1506.
- Schlötelburg, C., Wintzingerode, C., Hauck, R., Wintzingerode, F., Hegemann, W. e Göbel U. B. (2002) Microbial structure of an anaerobic bioreactor population that continuously dechlorinates 1,2-dichloropropane. *FEMS Microbiology Ecology* 39(3):229-237.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H. e Nakamura, K. (1998) Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 144(9):2655-2665.
- Shelton, D. R. e Tiedje, J. M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Applied and Environmental Microbiology* 47:850-857.
- Simankova, M. V., Kotsyurbenko, O. R., Lueders, T., Nozhevnikova, A. N., Wagner, B., Conrad, R. e Friedrich, M. W. (2003) Isolation and characterization of new

- strains of methanogens from cold terrestrial habitats. *Systematic and Applied Microbiology* 26(2):312-318.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005) 20th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Steil, L. (2001) Avaliação do uso de inóculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos. *Dissertação de Mestrado*, UNESP, Araraquara.
- Stetter, K.O. (1995) Microbial life in hydrothermal environments. *ASM News* 61:285-290.
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G. e Jetten, M. S. (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400(6743):446-449.
- Sun, B., Cole, J. R., Tiedje, J. M. (2001) *Desulfomonile limimaris* sp. nov., an anaerobic dehalogenating bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(2):365-371.
- Takai, K.; Moser, D. P.; DeFlaun, M.; Onstott, T. C. e Fredrickson, J. K. (2001) Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5750-5760.
- Tang, Y. Q., Shigematsu, T., Morimura, S. e Kida, K. (2007) Effect of dilution rate on the microbial structure of a mesophilic butyrate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. *Applied and Microbiology Biotechnology* 75(2): 451-465.
- Teske, A., Hinrichs, K. U., Edgcomb, V., de Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S. P., Sogin, M. L. e Jannasch, H. W. (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied Environmental Microbiology* 68(4):1994-2007.
- Touzel, J. P. e Albagnac, G. (1983) Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters* 16: 241-245.
- Valcke, D. e Verstraete, W. (1983) A practical method to estimate the acetoclastic methanogenic biomass in anaerobic reactors. *Journal of Water Pollution Control Federation* 55: 1191-1195.
- Valinsky, L., Della Vedova, G., Scupham, A. J., Alvey, S., Figueroa, A., Yin, B., Hartin, R. J., Chrobak, M., Crowley, D.E., Jiang, T. e Borneman, J. (2002) Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology* 68(7): 3243-3250.
- Van de Wijngaard, W. M.; Creemers, J.; Vogels, G. D. e Van der Drift, C. (2002) Methanogenic Pathways in *Methanospaera stadtmanae*. *FEMS Microbiology Letter*. 64: 207-211.

- Vich, D. V. (2006) Atividade metanogênica e comunidade microbiana envolvidas na degradação de metilamina. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
- Vignais, P. M., Billoud, B. e Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology reviews* 25:455–501.
- Welander, P. V. e Metcalf, W. W. (2005) Loss of the mtr operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *PNAS* 102:10664–10669.
- Whitman, W. B.; Boone, D. R.; Koga, Y. e Keswani, J. (2001). Taxonomy of methanogenic *Archaea*. In: BOONE, D., CASTENHOLTZ, R. W. & GARRITY, G. M. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, NY. 1: 211-213.
- Widdel, F. (1986) Growth of methanogenic bacteria in pure cultures with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1056-1062.
- von Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W. e Göbel, U. B. (1999) Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Applied Environmental Microbiology* 65(1): 283-286.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiology Reviews* 51: 221-271.
- Woese, C. R. e Fox, G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. e Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4576-4579.
- Wu, J. H., Liu, W. T., Tseng, I. C., Cheng, S. S. (2001) Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* 147(2):373-382.
- Yaws, C. L. (2001) *Matheson Gas Data Book*. 7ª edição. McGraw-Hill, New York.
- de Zeeuw, W. (1984) Acclimation of anaerobic sludge for UASB reactor start-up. *Tese de Doutorado*, Universidade de Wageningen, Holanda.
- Zellner, G., and Winter, J. (1987) Secondary alcohols as hydrogen donors for CO₂-reduction by methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 44: 323-328.
- Zellner, G., Messner, P., Winter, J. e Stackebrandt, E. (1998) *Methanoculleus palmolei* sp. nov., an irregularly coccoid methanogen from an anaerobic digester treating wastewater of a palm oil plant in North-Sumatra, Indonesia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48:1111-1117.

- Zengler, K., Richnow, H. H., Rosselló-Mora, R., Michaelis, W., Widdel, F. (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401(6750):266-269.
- Zepp Falz, K., Holliger, C., Grosskopf, R., Liesack, W., Nozhevnikova, A, N., Müller, B., Wehrli, B. e Hahn, D. (1999) Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2402-2408.
- Zhu, X. Y.; Lubeck, J. e Kilbanell, J. J. (2003) Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5354-5363.
- Zinder, S. H.; Cardwell, S. C.; Anguish, T.; Lee, M. e Koch, M. (1984) Methanogenesis in a Thermophilic (58° C) Anaerobic Digestor. *Methanothrix* sp. as an Important Acetoclastic Methanogen, *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 796-807.
- Zinder, S. H. (1993) Physiological Ecology of Methanogens. In: FERRY, J. G. Methanogenesis. *Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. Chapman & Hall, London, UK. 128-206.