UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HIDRÁULICA E SANEAMENTO

Daniele Vital Vich

**ATIVIDADE METANOGÊNICA E COMUNIDADE MICROBIANA
ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE METILAMINA**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche

São Carlos, SP.

Agosto de 2006

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

V634a	<p>Vich, Daniele Vital</p> <p>Atividade metanogênica e comunidade microbiana envolvidas na degradação de metilamina / Daniele Vital Vich; orientador Maria Bernadete A. Varesche. -- São Carlos, 2006.</p> <p>Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.</p> <p>1. Degradação anaeróbia. 2. Metilamina. 3. Atividade metanogênica específica. 4. PCR/DGGE. I. Título.</p>
-------	---

DEDICATÓRIA

À minha mãe Maria Isabel e ao meu pai José Roberto,
pela ajuda em mais um grande passo.

À minha orientadora Dra. Maria Bernadete A. Varesche,
por acreditar neste trabalho.

Agradecimentos

À Professora Dra. Bernadete A. Varesche pela amizade, acolhimento e orientação.

À Professora Tit. Maria do Carmo Calijuri e ao Professor Assoc. Marcelo Zaiat por acreditarem no meu potencial, pela compreensão, ajuda e contribuição para o meu aperfeiçoamento profissional.

À CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante o período de vigência do mestrado.

Às secretárias do Departamento de Hidráulica e Saneamento Sá e Pavi pela constante ajuda nos assuntos burocráticos.

À Beth Moraes, Janja, Eloísa e Glauce pelos bons momentos compartilhados e pela constante ajuda no laboratório.

Aos amigos de disciplinas e LPB (em ordem alfabética): Alexandre, Ana Carolina, Ana Lúcia, Andréa, Arnaldo, Érika, Estela, Géssia, Gláucio, Gunther, Isabel, Joel, Julia, Karina. Kátia, Kelly, Lara, Lorena, Lucas, Luiz Ricardo, Magdalena, Mércia, Sandra, Tininha, Thiago e tantos outros que fizeram do LPB um ambiente gostoso para trabalhar.

À Bruna pela amizade, ajuda e momentos de descontração.

Ao Leonardo pela constante ajuda

À Carolina, Cristina e Juliana, grandes amigas para todas as horas.

À grande amiga Aracely.

Aos amigos da UNESP de Rio Claro, em especial André, Fabrício, Gleiciani, Jordan, Marcinha e Roberta, eternos companheiros de graduação.

Aos meus avós e tios pela importante base familiar, alegrias compartilhadas, carinho e suporte nas horas difíceis.

Ao Matheus pela alegria, pelo apoio e conforto nos momentos de incerteza e por acreditar no nosso futuro.

Ao meu irmão Junior e meus primos Rogério e Camila, melhores amigos.

À minha mãe Maria Isabel e ao meu pai José Roberto pela vida, exemplo e dedicação ao longo de todos esses anos.

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

**Basta olharmos para uma coisa com atenção
para que ela se torne interessante.**

Eugênio D'ors

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Árvore filogenética do Domínio <i>Archaea</i>	7
Figura 3.2: Vias da metanogênese: hidrogenotrófica (setas azuis), acetoclástica (setas verdes) e metilotrófica (setas vermelhas)	16
Figura 4.1: Fluxograma experimental	19
Figura 4.2: Reator anaeróbio em batelada	20
Figura 4.3: Reatores anaeróbios em batelada	21
Figura 4.4: Esquema de diluição do NMP	29
Figura 5.1: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio controle (1)	33
Figura 5.2: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio controle (2)	33
Figura 5.3: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (1) alimentado com 5mM de metilamina	34
Figura 5.4: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (2) alimentado com 5mM de metilamina	34
Figura 5.5: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (1) alimentado com 10mM de metilamina	35
Figura 5.6: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (2) alimentado com 10mM de metilamina	35
Figura 5.7: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (1) alimentado com 20mM de metilamina	36
Figura 5.8: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (2) alimentado com 20mM de metilamina	36
Figura 5.9: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (1) alimentado com 30mM de metilamina	37
Figura 5.10: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (2) alimentado com 30mM de metilamina	37
Figura 5.11: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (1) alimentado com 50mM de metilamina	38
Figura 5.12: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (2) alimentado com 50mM de metilamina	38
Figura 5.13: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (1) alimentado com 75mM de metilamina	39

Figura 5.14: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (2) alimentado com 75mM de metilamina	39
Figura 5.15: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (1) alimentado com 90mM de metilamina	40
Figura 5.16: Variação temporal da produção de metano no reator anaeróbio (2) alimentado com 90mM de metilamina	40
Figura 5.17: Concentração de sólidos suspensos voláteis para diferentes amostras de reatores anaeróbios alimentados com diferentes concentrações de metilamina (barra de erro de 5%)	43
Figura 5.18: Ajuste do modelo cinético de Monod	45
Figura 5.19: Concentrações de NH_4 no início e final do experimento e porcentagem de conversão de N a NH_4	46
Figura 5.20: Número Mais Provável (NMP/mL) de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas	48
Figura 5.21: Resultados das análises de DGGE dos fragmentos dos produtos de PCR amplificados com <i>primers</i> do Domínio <i>Bacteria</i> para as amostras: I-inóculo, C-controle (sem metilamina), 5 (5mM de metilamina), 10 (10mM de metilamina), 20 (20mM de metilamina), 30 (30mM de metilamina), 50 (50mM de metilamina), 75 (75mM de metilamina) e 90 (90mM de metilamina)	50
Figura 5.22: Microscopia de contraste de fase de amostras dos reatores anaeróbios em batelada: a- <i>Methanosaeta</i> sp. (Controle - sem metilamina); b- Filamento (5mM de metilamina); c- Aglomerado de bacilos (5mM de metilamina); d- Bacilos (10mM de metilamina); e- <i>Methanosarcina</i> sp. (10 mM de metilamina); f- Bacilos (20mM de metilamina)	52
Figura 5.23: Microscopia de contraste de fase e fluorescência de amostras dos reatores anaeróbios em batelada: a- <i>Methanosarcina</i> sp. (30mM de metilamina), b- <i>Methanosarcina</i> sp. (fluorescência – 30mMB de metilamina); c- <i>Methanosaeta</i> sp. (50mM de metilamina); d- Bacilos (30mM de metilamina); e- <i>Methanosarcina</i> sp. (50mM de metilamina); f- Filamento (50mM de metilamina)	53
Figura 5.24: Microscopia de contraste de fase de amostras dos reatores anaeróbios em batelada: a- <i>Methanosaeta</i> sp. (50mM de metilamina), b- <i>Methanosarcina</i> sp. (50mM de metilamina); c- Sarcinas (75mM de metilamina), d- Cocos (75mM de metilamina); e- Coco-bacilos, bacilos e <i>Methanosaeta</i> sp. (90mM de metilamina); f- Filamentos (90mM de metilamina)	54
Figura 5.25: Resultados das análises de DGGE dos fragmentos dos produtos de PCR amplificados com <i>primers</i> do Domínio <i>Archaea</i> para as amostras: I-inóculo, C-controle (sem metilamina), 5 (5mM de metilamina), 10 (10mM de metilamina), 20 (20mM de metilamina), 30 (30mM de metilamina), 50 (50mM de metilamina), 75 (75mM de metilamina) e 90 (90mM de metilamina)	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Código europeu de avaliação da LD ₅₀ de compostos químicos	5
Tabela 3.2: Avaliação do risco toxicológico de compostos químicos	5
Tabela 3.3: Código americano de avaliação de riscos á saúde de compostos químicos	5
Tabela 3.4: Avaliação da inflamabilidade de compostos químicos	6
Tabela 3.5: Substratos convertidos em metano	8
Tabela 3.6: Características das famílias de <i>Methanosarcinales</i>	10
Tabela 3.7: Propriedades fenotípicas das espécies descritas de <i>Methanosarcinales</i>	10
Tabela 3.7: continuação	11
Tabela 4.1: Volumes das soluções usadas nos reatores anaeróbios em batelada	21
Tabela 4.2: Composição do meio basal Zinder	22
Tabela 4.3: Composição da solução traço de metais	22
Tabela 4. 4: Composição da solução de vitaminas	23
Tabela 4.5: <i>Primers</i> usados nas análises de PCR	30
Tabela 5.1: Período da fase lag, produção máxima de metano e velocidade máxima de formação de metano em cada reator anaeróbio em batelada	41
Tabela 5.2: Valores de concentração de SVT obtidos nos reatores anaeróbios em batelada	42
Tabela 5.3: Valores médios de sólidos voláteis totais, atividade metanogênica aparente (AMA), atividade metanogênica específica (AME)	44
Tabela 5.4: Número Mais Provável (NMP) para bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas	47
Tabela 5.5: Frequência de microrganismos pertencentes ao Domínio <i>Archaea</i> nos reatores alimentados com metilamina	51
Tabela 5.6: Frequência de microrganismos pertencentes ao Domínio <i>Bacteria</i> nos reatores alimentados com metilamina	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AMA – atividade metanogênica aparente

AME – atividade metanogênica específica

DGGE – eletroforese em gel de gradiente desnaturante

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNAr – DNA ribossomal

metil-CoM – metil coenzima M

NMP – número mais provável

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

RNA – ácido ribonucleico

RNAr – RNA ribossomal

rpm – rotação por minuto

SVT – sólidos suspensos voláteis

UASB – reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo

LISTA DE SÍMBOLOS

R^2 – quadrado do coeficiente de correlação

® – marca registrada

RESUMO

VICH, D. V. Atividade metanogênica e comunidade microbiana envolvidas na degradação de metilamina. São Carlos, 2006. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A metilamina (CH_3NH_2) é um composto orgânico usado na produção de inseticidas, herbicidas, fungicidas, surfactantes, combustíveis fósseis, explosivos, produtos farmacêuticos, químicos fotográficos, tintas, tecidos, solventes, borrachas e anti-corrosivos. Estudos sobre tratamento de águas residuárias contendo metilamina são escassos e se restringem aos trabalhos envolvendo pesticidas carbamatados. Visando contribuir com os estudos acerca da degradação anaeróbia da metilamina, esta pesquisa estudou a comunidade microbiana e a atividade metanogênica específica em reatores anaeróbios em batelada, inoculados com lodo granular oriundo de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, sob diferentes condições nutricionais: controle – sem metilamina, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 75 mM e 90 mM de metilamina. Os reatores foram incubados sob temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm. Desses reatores foram obtidas amostras para a determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME), Sólidos Suspensos Voláteis (SVT), nitrogênio amoniacal e exames microscópicos. Ao final do experimento, foram realizados exames da biomassa por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP) e análise da diversidade microbiana por PCR/DGGE e seqüenciamento. O aumento da AME foi proporcional ao aumento das concentrações de metilamina, com inibição de produção de metano apenas nos reatores alimentados com 90mM de metilamina. Os reatores alimentados com 50mM e 75mM de metilamina apresentaram os melhores resultados, com valores médios de AME de 0,0804 mmol CH_4 /g SVT.h e 0,0825 mmol CH_4 /g SVT.h respectivamente. Nos exames microscópicos foi verificada semelhança de morfologias microbianas em todas as concentrações de metilamina estudadas. Os organismos presentes nos reatores foram *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp., bacilos, coco-bacilos, filamentos e cocos. Em relação à análise de DGGE, não houve variação significativa nos padrões de bandas, tanto para o Domínio *Archaea* quanto para o Domínio *Bacteria*. Com os resultados da técnica de Número Mais Provável (NMP) observou-se a predominância de arqueias metanogênicas dentre as bactérias anaeróbias totais.

Palavras -chave: degradação anaeróbia, metilamina, atividade metanogênica específica, PCR/DGGE.

ABSTRACT

VICH, D. V. Methanogenic activity and microbial community involved in the degradation of methylamine. São Carlos, 2006. M.Sc. Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The methylamine (CH_3NH_2) is an organic compound used in the production of insecticides, herbicides, fungicides, surfactants, fossil fuels, explosives, pharmaceuticals, photographic chemicals, paints, textiles, dyes, rubber and anticorrosive chemicals. Some studies about the treatment of wastewater containing methylamine are scarce and limited to works involving carbamate pesticides. This research aimed to study the anaerobic degradation of methylamine, the microbial community and the specific methanogenic activity in anaerobic batched reactors. The reactors were inoculated with granular sludge from a UASB reactor treating poultry wastes. Different nutritional conditions were adopted in the operation of the reactors: control (without methylamine), 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 75 mM and 90 mM of methylamine. The reactors were incubated under standard conditions: 30°C and 150rpm. Samples had been removed from the reactors to determine the specific methanogenic activity, the concentration of volatile suspended solids and ammoniacal nitrogen and the microscopic analysis. At the end of the experiment, the biomass was studied by the Most Probable Number (MPN) technique and by the microbial diversity analysis with PCR and DGGE techniques. The increase of the specific methanogenic activity was proportional to the increase of methylamine concentration. The methane production was inhibited only in the reactor that was fed with 90mM of methylamine. The reactors that were fed with 50mM and 75mM of methylamine showed the best results, with medium values of specific methanogenic activity equal to 0,0804 mmol CH_4 /g SVT.h and 0,0825 mmol CH_4 /g SVT.h, respectively. The microscopic analysis showed similarity between the microbial morphologies in all of the reactors. The observed microorganisms were *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp., rods, cocci and filaments. The DGGE analysis did not show significant variation in the standard profile of the *Archaea* and *Bacteria* domains. The results of the MPN technique revealed the predominance of the methanogenic archaea among the total anaerobic bacteria.

Key Words: anaerobic degradation, methylamine, specific methanogenic activity, PCR/DGGE.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Metilamina	4
3.2. Domínio <i>Archaea</i>	6
3.3. A Ordem Methanosarcinales	9
3.4. Família Methanosarcinaceae	12
3.4.1. <i>Methanosarcina</i>	12
3.4.2. <i>Methanolobus</i>	12
3.4.3. <i>Methanococcoides</i>	12
3.4.4. <i>Methanohalobium</i>	13
3.4.5. <i>Methanohalophilus</i>	13
3.4.6. <i>Methanosalsum</i>	13
3.5. Família Methanosaetaceae	13
3.6. Vias Metanogênicas	14
3.7. Técnicas para análise da comunidade microbiana	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	19

4.1. Montagem e operação dos reatores anaeróbios em batelada	20
4.2. Composição e preparo do meio de cultura e soluções estoque	21
4.2.1. Meio basal Zinder	21
4.2.2. Solução traço de metais	22
4.2.3. Solução de vitaminas	22
4.2.4. Solução de bicarbonato de sódio	23
4.2.5. Solução redutora de sulfeto de sódio	23
4.2.6. Solução estoque de metilamina	24
4.3. Manutenção da anaerobiose	24
4.4. Limpeza e assepsia	24
4.4.1. Limpeza da vidraria	24
4.4.2. Esterilização por filtração	24
4.4.3. Esterilização em calor úmido	25
4.5. Análises cromatográficas	25
4.5.1. Determinação de metano	25
4.5.1.2. Avaliação da atividade metanogênica	25
4.5.1.3. Cálculo da atividade metanogênica específica	26
4.5.2. Determinação de ácidos orgânicos voláteis	27
4.6. Análises físico-químicas	27
4.6.1. Determinação de nitrogênio amoniacal	27
4.6.2. Determinação de sólidos voláteis totais	28
4.7. Análise da diversidade microbiana	28
4.7.1. Exames microscópicos	28
4.7.2. Avaliação quantitativa dos grupos microbianos anaeróbios	28
4.7.3. Análise de Biologia Molecular	29

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	57
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

APÊNDICE 1 – Tempo de experimento, área cromatográfica e valores de metano acumulado no *headspace* dos reatores anaeróbios em batelada alimentados com metilamina.

APÊNDICE 2 – Determinação da velocidade máxima de produção de metano nos reatores anaeróbios em batelada alimentados com metilamina

ANEXO 1 – Curva de Calibração do Metano

1. INTRODUÇÃO

Resíduos tóxicos lançados a cada ano no ambiente podem ser transportados por milhares de quilômetros contaminando águas superficiais, subterrâneas e aquíferos, usados no abastecimento de cidades, indústrias e na agricultura. Seus efeitos danosos podem ser sentidos durante décadas após sua exposição, aumentando a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias e processos de tratamento desses resíduos.

Entre os resíduos gerados pelas atividades humanas, considerável parte é composta por materiais orgânicos que, não tratados e acumulados desordenadamente, podem levar à poluição da água e do solo, à disseminação de doenças entre a população humana e animal, além de provocar odores desagradáveis.

No início de 1960, carbamatos foram desenvolvidos como alternativa ao DDT e outros pesticidas organoclorados. Os carbamatos constituem 25% da produção anual de pesticidas e são usados em todo o mundo para o controle de insetos, ácaros e nematóides.

É reconhecido que aplicações freqüentes de carbamatos podem resultar em aumento da concentração ou adaptação de microrganismos capazes de degradá-los via mecanismos como indução enzimática, mutação ou transferência genética, aumentando conseqüentemente a velocidade da biodegradação. A degradação destes pesticidas tem a metanogênese estimulada pela elevada hidrólise de N-metil carbamatos produzindo metilamina, que é usada subseqüentemente por arqueias metanogênicas.

A metilamina (CH_3NH_2) também é usada para diversas finalidades, dentre as quais se pode destacar: (1) produção de inseticidas, herbicidas, fungicidas, surfactantes, combustíveis fósseis, explosivos, produtos farmacêuticos, químicos fotográficos, tintas, tecidos, solventes, borrachas e anti-corrosivos; (2) inibição da polimerização de hidrocarbonetos durante a destilação; (3) prevenção do enovelamento e coagulação em látex naturais e sintéticos; (4) prevenção da polimerização em removedores de tintas.

A metilamina é estudada: (1) em sistemas de biofiltros, para neutralização de seu odor e sua retirada do ar; (2) em ambientes estuarinos, para controle do fluxo de N que ocorre no sedimento e no material particulado suspenso, contribuindo para as florações algais; (3) na área médica, pois desempenha importante papel em distúrbios do sistema nervoso observados durante doenças renais e hepáticas. A via metabólica de degradação da metilamina tende à formação de formaldeído em níveis tóxicos capazes de provocar arteriosclerose.

Estudos sobre tratamento de águas residuárias contendo metilamina são escassos e se restringem aos trabalhos envolvendo pesticidas carbamatados. Mesmo sendo tóxica, ainda não foram desenvolvidas tecnologias de tratamento e remoção da metilamina no ambiente.

Sendo assim, este trabalho tem como caráter inovador a caracterização da comunidade microbiana envolvida na degradação anaeróbia de metilamina e conseqüente produção de metano em reatores em batelada com diferentes concentrações desse composto. Todas essas informações são úteis na compreensão das vias de degradação dos pesticidas carbamatados e no desenvolvimento de tecnologias que visem à recuperação de eventuais áreas contaminadas com metilamina.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar a atividade metanogênica específica e a comunidade microbiana envolvidas na degradação de metilamina em reatores anaeróbios em batelada.

2.1. Objetivos específicos

- Quantificar as bactérias anaeróbias e arqueias metanogênicas por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP).
- Caracterizar a comunidade microbiana em relação ao Domínio *Bacteria* e Domínio *Archaea* de reatores anaeróbios em batelada por meio de técnicas de Biologia Molecular e exames microscópicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Metilamina

A metilamina é um gás à temperatura ambiente, com peso molecular de 31,1, ponto de ebulição de $-6,32^{\circ}\text{C}$ (760mm Hg) e odor semelhante a amônia. Outros sinônimos para o composto são metilamina anidro, monometilamina, aminometano, carbinamina, mercurialina e metanamina (OSHA, 2006).

Em sua forma gasosa, a metilamina irrita severamente o sistema respiratório e os olhos. Sua LD_{50} (dose letal capaz de matar 50% da população testada) é de 0,1 a 0,2 g/kg em ratos expostos oralmente à solução aquosa de 40%. Rápidas exposições em ambientes com 20 a 100 ppm do gás produzem irritações transitórias nos olhos, nariz e garganta. Dermatites e conjuntivites são ocasionalmente observadas em trabalhadores depois de exposição prolongada ao vapor. Experimentos com animais submetidos ao contato de uma gota de solução de metilamina aquosa 5% mostraram o desenvolvimento de conjuntivite hemorrágica, opacidade superficial na córnea e edemas. Uma gota de solução aquosa 40% causou necrose quando aplicada à pele de coelhos, e danos à córnea quando em contato com os olhos (OSHA, 2006).

Códigos de segurança, que avaliam compostos químicos, englobam a metilamina em suas classificações quanto à periculosidade. De acordo com as Tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4, a metilamina é considerada corrosiva, nociva, de alto risco à saúde e de inflamabilidade extrema.

Tabela 3.1. Código europeu de avaliação da LD₅₀ de compostos químicos

Categoria de Risco do Composto	
Categoria de Risco	<p>1- Extremamente perigoso: a LD₅₀ para coelhos expostos por contato direto é menor que 50 mg/kg</p> <p>2- Muito perigoso: a LD₅₀ para coelhos expostos por contato direto é entre 50 mg/kg e 200 mg/kg</p> <p>3- Perigoso: a LD₅₀ para coelhos expostos por contato direto é entre 400 mg/kg e 2000 mg/kg</p> <p>4- Outros: Esse composto tem baixa toxicidade ou nenhuma informação disponível</p>

Fonte: OSHA (2006).

Tabela 3.2. Avaliação do risco toxicológico de compostos químicos

Código Europeu de Risco Toxicológico do Composto		
Código de Risco	TX = Muito Tóxico	T = Tóxico
C, X	CX = Altamente corrosivo	CAN = Carcinogênico
	C = Corrosivo	X = nocivo
	XI = Irritante	S = Alergênico
	V = Baixa toxicidade	n.a. = informações não disponíveis

Fonte: OSHA (2006).

Tabela 3.3. Código americano de avaliação de riscos à saúde de compostos químicos

Avaliação dos Riscos à Saúde - NFPA *	
NFPA	0 = NENHUM: Danos são causados sob condições não usuais de exposição ou sob dosagens extremas.
3	1 = DESPREZÍVEL: Rápida exposição causa danos leves e reversíveis
	2 = MODERADO: Rápida exposição causa danos temporários e permanentes; pode resultar em danos maiores.
	3 = ALTO: Rápida exposição resulta em maiores danos temporários ou permanentes; perigoso à vida.
	4 = EXTREMO: Rápida exposição resulta em danos maiores ou morte.

* NFPA = *National Fire Protection Association* – EUA

Fonte: OSHA (2006).

Tabela 3.4. Avaliação da inflamabilidade de compostos químicos

Avaliação da Inflamabilidade - NFPA	
Inflamabilidade	0 = NENHUM: Não é inflamável
4	1 = MÍNIMO: Inflamável em altas temperaturas
	2 = MODERADO: Inflamável em temperaturas moderadas.
	3 = SEVERO: Inflamável em todas as temperaturas
	4 = EXTREMO: Gases ou líquidos muito inflamáveis

Fonte: OSHA (2006).

3.2. Domínio *Archaea*

Fração significativa da biosfera terrestre contém ambientes anaeróbios nos quais microrganismos convertem matéria orgânica complexa em metano e dióxido de carbono. Esses microrganismos são encontrados em diversos habitats, tais como rúmen, trato intestinal, digestores de águas residuárias, raízes, sedimentos de rios, lagos e mares. O processo de conversão da matéria orgânica complexa a compostos simples, representados pelas formas mais oxidada (CO_2) e reduzida (CH_4) do carbono, requer interação de grupos específicos de organismos anaeróbios (FERRY, 1999).

Segundo FERRY (1999), organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* convertem a matéria orgânica em hidrogênio, gás carbônico, formiato e acetato, enquanto, alguns organismos do Domínio *Archaea* convertem todos esses produtos em metano. Ampla variedade de arqueias metanogênicas possui metabolismo anaeróbio obrigatório, enquanto que outras espécies são encontradas em ambientes extremos.

O Domínio *Archaea* consiste de três divisões: Crenarchaeota, que contém as arqueias redutoras de enxofre hipertermófilas, Euryarchaeota, que compreende ampla diversidade de organismos, incluindo as espécies metanogênicas, as halófilas extremas e uma espécie hipertermófila, e Korarchaeota, uma divisão descrita mais recentemente, que engloba organismos hipertermófilos pouco conhecidos, ainda não cultivados em laboratório. Na figura 3.1 está mostrada a árvore filogenética do Domínio *Archaea*

Figura 3.1. Árvore filogenética do Domínio Archaea

Fonte: Adaptado de MADIGAN *et al.* (2004)

As arqueias produtoras de metano ou metanogênicas são reconhecidas por sua habilidade de obter energia para crescimento através da metanogênese. As arqueias metanogênicas são especializadas na produção de metano, não sendo reconhecida nenhuma espécie capaz de crescer independentemente de sua produção.

A metanogênese requer a biossíntese de seis coenzimas específicas, possui diferentes vias de degradação a metano e complexos enzimáticos específicos que atuam como força motriz no acoplamento de prótons durante a formação de membranas.

As arqueias metanogênicas apresentam ampla variedade morfológica, mas em geral, os organismos correspondem a células procarióticas com diversidade química de paredes celulares. Pelo menos 11 substratos são convertidos em metano por culturas puras de células metanogênicas. Uma classe desses substratos corresponde a substâncias contendo o grupo metil (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Substratos convertidos em metano

Substratos convertidos em metano por arqueias metanogênicas
I. Substratos com carbono oxidado
Dióxido de carbono, CO ₂ (com elétrons derivados do H ₂ , certos álcoois ou piruvato)
Formiato, HCOO ⁻
Monóxido de Carbono, CO
II. Substratos metil
Metanol, CH ₃ OH
Metilamina, CH ₃ NH ₃ ⁺
Dimetilamina, (CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺
Trimetilamina, (CH ₃) ₃ NH ⁺
Metilmercaptana, CH ₃ SH
Dimetilsulfeto, (CH ₃) ₂ S
III. Substratos acetotróficos
Acetato, CH ₃ COO ⁻
Piruvato, CH ₃ COCOO ⁻
Fonte: MADIGAN <i>et al.</i> (2004)

Na prática, as arqueias são estudadas e agrupadas de acordo com o seu metabolismo e fisiologia, sendo alocadas em diversos grupos. As espécies do Domínio *Archaea* mais conhecidas são as metanogênicas, cuja classificação taxonômica data de 1979, realizada por Balch e colaboradores (BALCH *et al.*, 1979). Devido a sua importância para o saneamento ambiental, já estão descritas aproximadamente 66 espécies de metanogênicas, em contraste com aproximadamente 24 espécies de hipertermófilas e 18 de halófilas extremas (SOWERS *et al.*, 1993; ADAMS, 1995; MADIGAN *et al.*, 2004).

Há cinco ordens que divergem filogeneticamente no filo Euryarchaeota e são denominadas “metanogênicas” como descrito a seguir (GARRITY, 2001): *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* e *Methanopyrales*. Todas as ordens contêm ampla diversidade de táxons que variam em suas características morfológicas e fisiológicas. Entretanto, todas têm em comum estilo de vida anaeróbio e a habilidade de produzir metano (BAPTESTE *et al.*, 2005).

Embora a Ordem ancestral de ramificação não seja determinada, muitas linhagens de arqueias não metanogênicas aparecem dentro da chave. A filogenia sugere que linhagens representadas por *Haloferax*, *Thermoplasma* e *Archaeoglobus* são derivadas de ancestrais metanogênicos. A redutora de sulfato *Archaeoglobus* também possui coenzimas não usuais encontradas nos organismos metanogênicos.

Em relação ao substrato usado, a metanogênese pode ser dividida em dois grupos principais. O primeiro grupo compreende organismos das Ordens *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* e *Methanopyrales*, que

usam apenas hidrogênio e gás carbônico ou formiato como fonte de energia ou substratos. Em contraste, membros da Ordem Methanosarcinales são mais versáteis e usam metanol, metilaminas ou acetato como substratos; muitos deles, também, usam hidrogênio e gás carbônico (DEPPENMEIER *et al.*, 1999). Como consequência do reduzido número de substratos e/ou hidrogênio usados pelas arqueias metanogênicas, a degradação anaeróbia da matéria orgânica é mediada por comunidades de diferentes grupos fisiológicos de bactérias anaeróbias.

No filo Euryarchaeota, podemos considerar os gêneros da ordem Methanosarcinales como principais utilizadores de metilaminas como substrato para a metanogênese.

3.3. A Ordem Methanosarcinales

Microrganismos pertencentes à Ordem Methanosarcinales catalisam a etapa final da degradação da matéria orgânica em ambientes anaeróbicos, onde a luz e aceptores finais de elétrons diferentes do CO₂ são limitados. Representantes desse grupo são cosmopolitas 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 (ROBICHAUZ *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. Os organismos da Ordem Methanosarcinales são capazes de utilizar vasta gama de substratos orgânicos para a metanogênese, 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.

A Ordem Methanosarcinales compreende duas Famílias, Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae. Suas características distintivas estão listadas na Tabela 3.6, e

comparações entre as espécies estão expressas na Tabela 3.7. A seguir encontra-se descrito informações sobre a Família Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae baseado em GARCIA *et al.* (2000) e BOONE *et al.* (2001).

Tabela 3.6. Características das famílias de *Methanosarcinales*

FAMÍLIA	CARACTERÍSTICAS
Methanosarcinaceae	<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.
Methanosaetaceae	<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)

Tabela 3.7. Propriedades fenotípicas das espécies descritas de *Methanosarcinales*

E S P É C I E	F O R M A	A G R E G A D O S	F I L A M E N T O S	C I S T O S	T A M A N H O (µm)	M Ó V E I S	C + G (% mol)	G R A M	V A C Ú O L O S	P L A S M Í D E O
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Cocos	+	-	-	1,5-2,0	-	39-44	+	+	nd
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Cocos	+	-	+	1,7-2,1	-	41	-	-	nd
<i>Methanosarcina mazei</i>	Cocos	+	-	+	1,0-3,0	-	42	+	-	nd
<i>Methanosarcina siciliae</i>	Cocos	+	-	-	nd	nd	41-43	-	-	nd
<i>Methanosarcina thermophila</i>	Cocos	+	-	-	100	-	42	+	-	nd
<i>Methanosarcina vacuolata</i>	Cocos	+	-	-	0,5-2,0	-	36	+	+	nd
<i>Methanosarcina baltica</i>	Cocos Irregulares	+	-	nd	1,5-3,0	nd	nd	nd	nd	nd

Tabela 3.7. continuação

E S P É C I E	F O R M A	A G R E G A D O S	F I L A M E N T O S	C I S T O S	T A M A N H O (μ m)	M Ó V E I S	C + G (% mol)	G R A M	V A C Ú O L O S	P L A S M Í D E O
<i>Methanosarcina lacustris</i>	Cocos	+	-	nd	1,5-3,5	-	43,4	+	nd	nd
<i>Methanosarcina semesiae</i>	Cocos Irregulares	-	-	nd	0,8-2,1	-	Nd	+	nd	nd
<i>Methanolobus tindarius</i>	Cocos	+	-	nd	0,8-1,25		45,9	-	nd	-
<i>Methanolobus bombayensis</i>	Cocos Irregulares	-	-	nd	1,0-1,5	-	39	-	nd	nd
<i>Methanolobus oregonensis</i>	Cocos Irregulares	+	-	nd	1,0-1,5	-	40,9	-	nd	nd
<i>Methanolobus taylorii</i>	Cocos	+	-	nd	0,5-1,0	-	41	-	nd	-
<i>Methanolobus vulcani</i>	Cocos Irregulares	+	-	nd	0,8-1,25	-	39	-	nd	nd
<i>Methanococcoides methylutens</i>	Cocos Irregulares	-	-	nd	0,8-1,8	-	42	-	nd	nd
<i>Methanococcoides burtonii</i>	Cocos Irregulares	+	-	nd	0,8-1,8		39,6	v	nd	nd
<i>Methanohalobium evetigatum</i>	Esferas Lisas, Poligonais e Irregulares	+	-	nd	0,2-2 (S) 5-10 (A)	-	37	nd	nd	nd
<i>Methanohalophyllus mahii</i>	Cocos Irregulares	+	-	nd	0,8-1,8	-	41	-	nd	nd
<i>Methanohalophyllus halophilus</i>	Cocos Irregulares	+	-	+	0,5-2,0	-	39	-	nd	nd
<i>Methanohalophyllus portucalensis</i>	Cocos Irregulares	+	-	nd	0,6-2,0	-	41	-	nd	nd
<i>Methanosalsum zhilinae</i>	Cocos Irregulares	+	-	nd	0,75-1,5		38-39	-	nd	nd
<i>Methanosaeta concilii</i>	Bacilos Retos	-	+	nd	0,8-1,3 (L) 2,0-7,0 (C)	-	49 $\pm$ 1,2	-	-	nd
<i>Methanosaeta thermophila</i>	Bacilos Retos	-	+	nd	0,8-1,3 (L) 2,0-7,0 (C)	-	52-54	-	+	nd

Abreviações: nd (não determinado), v (variável), S (sozinho), A (agregado), L (largura), C (comprimento), C + G (citosina + guanina)

Fonte: WHITMAN *et al.*, (2001)

3.4. Família Methanosarcinaceae

Methanosarcinaceae inclui seis gêneros de organismos com células cocóides ou pseudosarcinais. A maioria das células possui parede celular protéica. Outras células são circundadas por heteropolissacarídeo ácido. Nenhuma célula contém peptideoglicana ou pseudomureína. Os lipídeos contêm mio-inositol, etanolamina e glicerol como grupos polares. Todos os gêneros podem obter energia pela transformação de compostos metilados. O uso de acetato e a redução de CO₂ com H₂ são observados, porém nenhum gênero cataboliza formiato.

3.4.1. *Methanosarcina*

O gênero *Methanosarcina* compreende nove espécies: *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina siciliae*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina mazeii*, *Methanosarcina vacuolata*, *Methanosarcina baltica*, *Methanosarcina lacustris* e *Methanosarcina semesiae*. Todas as espécies são sésseis e capazes de catabolizar acetato, metanol, metilaminas e CO. Algumas espécies são capazes de obter energia pela redução do CO₂ com H₂.

3.4.2. *Methanolobus*

O gênero *Methanolobus* é representado por cinco espécies de morfologia cocoidal, *Methanolobus tindarus*, *Methanolobus bombayensis*, *Methanolobus oregonensis*, *Methanolobus taylorii* e *Methanolobus vulcani*. Todas as células são envoltas por membrana simples e uma camada protéica. As células podem crescer em metanol, metilaminas e algumas vezes em metilsulfitos. Nenhuma espécie cresce em H₂/CO₂, formiato, acetato ou álcoois diferentes do metanol.

3.4.3. *Methanococcoides*

O gênero *Methanococcoides* compreende duas espécies, *Methanococcoides methylutens* e *Methanococcoides burtonii*. As células são cocos irregulares, e a parede celular consiste de uma parede celular fina de espessura aproximada de 10nm. As

células usam metilaminas e metanol para o crescimento, mas não catabolisam acetato, H_2/CO_2 , dimetilsulfetos ou formiato.

3.4.4. *Methanohalobium*

O gênero *Methanohalobium* contém uma única espécie, *Methanohalobium evestigatum*. Esta espécie é halófila extrema e termófila moderada. Metilaminas são usadas como substrato para o crescimento. Não são usados acetato, formiato e H_2/CO_2 . Metanol é catalisado apenas em concentrações inferiores a 20mM (ZHILINA & ZAVARZIN, 1987, *apud* BOONE *et al.*, 1993¹).

3.4.5. *Methanohalophilus*

O gênero compreende três espécies, *Methanohalophilus mahii*, *Methanohalophilus halophilus* e *Methanohalophilus portucalensis*. Células crescem com metilaminas e metanol. Em concentrações maiores que 40mM, o metanol é tóxico às células. Não crescem em álcoois secundários, H_2/CO_2 e formiato.

3.4.6. *Methanosalsum*

Methanosalsum zhilinae é a única espécie deste gênero. Cresce em metilaminas, metanol e dimetilsulfetos. Não cresce em acetato, formiato e H_2/CO_2 . (MATHRANI *et al.*, 1988, *apud* BOONE *et al.*, 2001²).

3.5. Família Methanosaetaceae

Esta família inclui um gênero, *Methanosaeta*. E todas as células utilizam o acetato como única fonte de carbono.

¹ ZHILINA, T. N. & ZAVARZIN, G. A. (1987) *Methanohalobium evestigatus*, gen. nov. sp. nov., the extremely halophilic methanogenic archaeobacterium. *Dokl Akad Nauk SSSR* 293: 464-468

² MATHRANI, I. M.; BOONE, D. R.; MAH, R. A.; FOX, G. E. & LAU, P. P. (1988) *Methanohalophilus zhilinae*, sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 139-142

O gênero *Methanosaeta* é representado por duas espécies, *Methanosaeta concilii* e *Methanosaeta thermophila*, que metabolizam o acetato em metano e CO₂. Originalmente, estes organismos foram classificados como pertencentes ao gênero *Methanothrix*. Como a cultura que validou a espécie não era pura, a mesma foi considerada ilegítima. Cultura axênica de bacilos embainhados, acetoclásticos, mesofílicos e metanogênicos foi descrita por Patel (PATEL, 1984; PATEL, 1985) como *Methanothrix concilli* e posteriormente transferida para o novo gênero *Methanosaeta*.

3.6. 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. A via hidrogenotrófica é a mais difundida, sendo encontrada em todas as ordens de organismos. 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: via acetoclástica e via metilotrófica.

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

A via metilotrófica, também presente no gênero *Methanosphaera*, de Methanobacteriales (VAN DE WIJNGAARD *et al.*, 2002), tem diversas variantes possíveis. A via mais estudada é quando compostos com um carbono, ou seja, compostos C-1, como as metilaminas e o metanol, podem ser usados tanto como doadores quanto como aceptores de elétrons. Uma molécula dos compostos C-1 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 C-1 usando apenas o último passo da via metanogênica hidrogenotrófica (metil-CoM a CH₄), tirando elétrons de H₂ (Figura 3.1).

O gênero *Methanosphaera* apresenta variação da via metilotrófica. Esta *Methanobacteriales* não reduz CO₂ para produção de metano. As células requerem metanol e H₂ para crescer, produzindo metano em processo ainda não estudado completamente, mas semelhante à metanogênese hidrogenotrófica em seu último passo (SCHWÖRER & THAUER, 1991).

Devido à metanogênese ser encontrada somente na ramificação euriarqueal do Domínio *Archaea*, ela provavelmente originou-se nesse filo. A produção biológica do metano requer pelo menos 25 genes (em adição a mais de 20 proteínas bioquimicamente caracterizadas envolvidas na síntese de coenzimas). Genes codificando diferentes subunidades de uma enzima tendem a ficar aglomerados no genoma, mas estes aglomerados e genes codificados por monômeros ou homopolímeros são dispersos pelo genoma (REEVE *et al.*, 1997). Algumas *Methanosarcinales* possuem cerca de 250 genes envolvidos em diferentes aspectos da metanogênese (GALAGAN *et al.*, 2002). O número de genes envolvidos, assim como seu arranjo genômico disperso, faz crer que a metanogênese tenha sido adquirida por transferência genética lateral. Entretanto, porções das vias envolvidas nesse processo, com genes isolados, podem ter sido adquiridas por grandes distâncias filogenéticas. Por exemplo, enzimas homólogas às que catalisam os três primeiros passos da redução metanogênica do CO₂ são usadas para a oxidação do formaldeído em proteobactérias metilotróficas e planctomicetes. É extremamente improvável que essas enzimas estivessem presentes no ancestral comum de *Archaea* e *Bacteria* e se perderam nas linhagens procarióticas. A transferência entre domínios é uma possibilidade muito mais parcimoniosa (CHISTOSERDOVA *et al.*, 2004).

As vias metanogênicas estão esquematizadas na Figura 3.1. Para a síntese de cofatores, a metanopterina hidrogenase (*mptH*) desempenha papel importante na biossíntese de tetrahydrofolato, e a metanopterina nitrogenase (*mptN*) está envolvida na biossíntese de metanopterina. Tetrahydrofolato e metanopterina são dois transportadores intermediários de C-1 na metanogênese. A biossíntese da coenzima F420 se apóia 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 B9, 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

Figura 3.2. Vias da metanogênese: hidrogenotrófica (setas azuis), acetoclástica (setas verdes) e metilotrófica (setas vermelhas).

Fonte: Adaptado de GRAHAM & WHITE (2002)

3.7. Técnicas para análise da comunidade microbiana

As perspectivas para aplicação das técnicas de Biologia Molecular são as descritas a seguir: (a) com o sequenciamento do DNAr e RNAr os microbiologistas terão a possibilidade de identificar, isolar e caracterizar novos organismos, com respeito a estudos de filogenia e fisiologia; (b) poderá auxiliar no estudo de bactérias não

cultiváveis; (c) os microrganismos poderão ser estudados em seus nichos, possibilitando correlações entre a composição da comunidade, a relação espacial de membros diferentes e o funcionamento das populações. Essas informações serão importantes para o entendimento das relações simbióticas e, também, para o entendimento da maioria dos ciclos biogeoquímicos (SAKAMOTO, 2001).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) leva à amplificação de um bilhão de vezes um segmento de DNA. Uma molécula do DNA pode ser amplificada a quantidades que permitem a caracterização e manipulação. Esta técnica está sendo usada para detectar patógenos e doenças genéticas, para determinar a fonte de um cabelo deixado na cena de um crime e recuperar genes de fósseis (BERG *et al.*, 2004). Sua importância nos estudos microbiológicos está no fato dessa técnica permitir a amplificação de genes específicos a partir de bactérias isoladas ou de bactérias não cultivadas, para sequenciamento e avaliação filogenética (WARD *et al.*, 1990).

Técnicas de impressão digital providenciam padrão ou perfil da diversidade genética na comunidade microbiana. A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) tem sido introduzida no estudo da ecologia microbiana (MUYZER & SMALA, 1998).

O DGGE tem as vantagens de ser confiável, reprodutível, rápido e de custo relativamente baixo. Essa técnica permite a análise de várias amostras ao mesmo tempo, o que facilita os estudos de comparação entre comunidades distintas ou relacionadas e de monitoramento de mudanças espaciais e temporais em populações microbianas ao longo de sucessões ecológicas, mudanças ambientais ou processos biotecnológicos. As limitações da técnica, por outro lado, estão ligadas principalmente à eficiência na extração de DNA, aos problemas intrínsecos das técnicas de PCR e à necessidade do manuseio cuidadoso das amostras para evitar alterações na comunidade microbiana. Além disso, um dos problemas do DGGE é o baixo poder de detecção; ou seja, estima-se que apenas 1 a 2% das espécies dominantes possam ser detectadas pela técnica, além da sobreposição de bandas, decorrente de características de mobilidade similares de alguns fragmentos, ou ainda, a presença, em uma única espécie, de várias cópias do gene de DNAr 16S com pequenas diferenças na composição de bases, fazendo com que várias bandas sejam geradas.

Apesar das limitações da técnica de DGGE, ampla variedade de aplicações é possível; entre elas, visando inferir a afiliação filogenética de membros das comunidades, testar a pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de

bactérias a partir de amostras ambientais, ou estudar a dinâmica de populações específicas frente a variações nos parâmetros ambientais ou condições de operação de um sistema.

O seqüenciamento do DNAr 16S tem oferecido detalhes sobre a composição da estrutura das comunidades microbianas anaeróbias, apontando inclusive a existência e atuação de vários organismos que ainda não estavam descritos em literatura.

A produção do conhecimento através do cruzamento de informações obtidas com as técnicas moleculares e os processos funcionais em reatores é fato muito recente. FERNANDES *et al* (1999) reportaram que existe uma dinâmica populacional distinta de bactérias e arqueias em reator com 605 dias de operação, mas que parece funcionalmente estável. Assim sendo, os autores constataram que a estabilidade funcional do reator avaliada através das variáveis químicas não se refletia na estabilidade da estrutura microbiana. Essa variação na diversidade estrutural microbiana pode ser mais importante para a estabilidade do reator do que anteriormente se previa.

WALKER (1995) sugeriu que a flexibilidade metabólica do reator esta diretamente relacionada com a diversidade e a estrutura da comunidade microbiana. A flexibilidade metabólica é um recurso que ocorre no reator para evitar flutuações nas concentrações e composições da água residuária afluenta. BERLOW *et al* (1999) evidenciaram que seus resultados apontaram para o mesmo caminho. Em reatores anaeróbios estritos as arqueias dominam os processos biológicos, mas é na diversidade dos microrganismos em menor densidade, aparentemente sem importância funcional, que se encontra a flexibilidade metabólica que previne potenciais perturbações ao sistema. Portanto, a caracterização e o acompanhamento da diversidade microbiana nos reatores anaeróbios não apenas favorece a produção de conhecimento que possa vir a sugerir sobre novas vias metabólicas, mas também é crucial para avaliar a funcionalidade e estabilidade potencial dos reatores contra perturbações (HUANG, *et al.*, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Lodo granular oriundo de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dakar, Tietê) foi inoculado em reatores em batelada contendo meio Zinder, solução de bicarbonato de sódio 10%, vitaminas, solução redutora de sulfeto 5% e solução de metilamina em diferentes concentrações. Amostras dos reatores foram submetidas a diferentes análises. Na Figura 4.1 estão representados esquematicamente todos os passos do experimento. Cada etapa apresentada no esquema será posteriormente descrita em detalhes.

Figura 4.1. Fluxograma experimental

4.1. Montagem e operação dos reatores anaeróbios em batelada

O experimento foi realizado em duplicata - reatores (1) e (2), em condições controle (sem metilamina), e com 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 50mM, 75mM e 90mM de metilamina. Os frascos reatores usados foram de 2000mL (Duran), com volume útil de 1000mL e *headspace* de 1000mL (Figura 4.2).

Para inoculação, o lodo foi previamente lavado, desfragmentado e mantido sob atmosfera de N₂ (100%) à temperatura ambiente. A inoculação foi feita em meio Zinder, previamente tamponado e reduzido, sob atmosfera de N₂/CO₂ (70:30% v/v). Os frascos foram fechados com tampa de butila e rosca plástica com abertura central. Durante todo o experimento, não houve despressurização dos frascos. A incubação foi feita em estufa (Figura 4.3), sob agitação de 150 rpm (DOMINGUES, 2002) e temperatura de 30°C ± 2°C. A fonte de carbono (metilamina) foi adicionada por meio de seringas de plástico estéreis, após prévio consumo da matéria orgânica proveniente do inóculo. Os volumes das soluções para cada concentração estão apresentados na Tabela 4.1.

Figura 4.2. Reator anaeróbio em batelada

Tabela 4.1. Volumes das soluções usadas nos reatores anaeróbios em batelada

Concentração de Metilamina	Meio Zinder	Bicarb. de Sódio 10%	Solução de Vitaminas	Redutora de Sulfeto 5%	Inóculo (5g/L)	Metilamina 5M
Controle (0g/L)	878mL	10mL	10mL	10mL	102mL	-
5mM (155mg/L)	877mL					1mL
10mM (311mg/L)	876mL					2mL
20mM (622mg/L)	874mL					4mL
30mM (933mg/L)	872mL					6mL
50mM (1,55g/L)	868mL					10mL
75mM (2,33g/L)	863mL					15mL
90mM (2,79g/L)	860mL					18mL

Figura 4.3. Reatores anaeróbios em batelada

4.2. Composição e preparo do meio de cultura e soluções estoque

4.2.1. Meio basal Zinder

O meio de cultivo Zinder (ZINDER *et al.*, 1984) foi preparado em 1000mL de água ultrapurificada, e está descrito na Tabela 4.2. Os sais minerais e reagentes foram dissolvidos na ordem dada na tabela e submetidos à atmosfera de nitrogênio (100%).

Tabela 4.2. Composição do meio basal Zinder

Componentes	Quantidade (q.s.p. 1000 mL)
NH ₄ Cl	0,5g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,4g
KH ₃ PO ₄	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05g
Solução de Resarzurina 0,1%	1,0mL
Solução Traço de Metais	10,0mL

Fonte: ZINDER *et al.* (1984)

4.2.2. Solução traço de metais

A solução traço de metais foi preparada pela dissolução inicial de NTA (ácido nitriloacético) 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 4.3, e o volume foi completado para 1000mL. Sob atmosfera de nitrogênio (100%) por 20 minutos, a solução foi dividida em dois frascos Duran SCHOTT® de 500mL. Os frascos foram então fechados sob anaerobiose, autoclavados a 121°C e 1atm durante 20 minutos e armazenados a 4° C.

Tabela 4.3. Composição da solução traço de metais

Componentes	Quantidade (q.s.p. 1000 mL)
NTA	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)

4.2.3. Solução de vitaminas

A solução de vitaminas foi preparada adicionando-se os ingredientes da Tabela 4.4 em 1000mL de água ultrapurificada previamente fervida por aproximadamente 15 minutos submetida a 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. No final os frascos foram armazenados a 4° C.

Tabela 4. 4. 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 & ALBAGNAC (1983); DUBOURGUIER (1987)

4.2.4. Solução de bicarbonato de sódio

A solução estoque de bicarbonato de sódio 10% (m/v) foi preparada pela dissolução de 10g desse reagente em 100mL de água ultrapurificada previamente fervida. Após o resfriamento da água à temperatura de aproximadamente 40°C, o bicarbonato de sódio foi dissolvido e submetido à atmosfera de N₂ (100%) por aproximadamente 20 minutos. A solução foi filtrada em sistema Millipore[®], distribuída em frascos de antibiótico previamente esterilizados, e mantida à temperatura ambiente sob ausência de luz.

4.2.5. Solução redutora de sulfeto de sódio

Para o preparo da solução redutora, Na₂S. 9H₂O 5% (m/v) foi transferido para papel de filtro para secagem sob pressão com espátula plástica, para eliminar o excesso de água. O sal foi dissolvido em água ultrapurificada previamente fervida e submetida a atmosfera de N₂ (100%), por aproximadamente 20 minutos. A solução foi esterilizada por filtração em sistema Millipore[®] e armazenada à temperatura ambiente e sob ausência de luz, em frascos de antibiótico previamente esterilizados.

4.2.6. Solução estoque de metilamina

Para o preparo de solução estoque de metilamina, usada como fonte de carbono nos reatores anaeróbios, foi escolhida a concentração de 5M. Como a metilamina pura mostrou-se muito volátil, a solução foi preparada com cloridrato de metilamina ($\text{CH}_3\text{NH}_2 - \text{HCl}$), da Sigma-Aldrich, solúvel em água. O sal foi dissolvido em água ultrapurificada e armazenado em frascos de antibiótico.

4.3. Manutenção da anaerobiose

A anaerobiose foi mantida através da troca gasosa da atmosfera dos frascos através de sistema de distribuição simultânea de gases. Este compreende um sistema tubular (tubos de cobre) de transporte dos gases dos cilindros estoque (White Martins) para quatro saídas com válvulas, que controlam a vazão do gás. Em cada válvula, uma mangueira de aproximadamente 30cm foi conectada e, em sua extremidade, foi acoplada uma seringa. Para o uso de gases em sistemas estéreis, um filtro estéril da marca Corning[®], constituído de uma membrana com porosidade de 0,25 μm , foi ligado à seringa. Para injeção dos gases, as tampas dos frascos foram perfuradas por agulha estéril também acoplada ao filtro. Este sistema foi adaptado por VAZOLLER (1995).

4.4. Limpeza e assepsia

4.4.1. Limpeza da vidraria

A vidraria foi lavada com Extran diluído em água de torneira (5% v/v), enxaguada em água corrente diversas vezes para remoção total do detergente. Depois de nova lavagem com água destilada, a vidraria foi posta para secar em estufa ou estantes.

4.4.2. Esterilização a frio

A esterilização a frio foi feita por filtração em sistema Millipore[®], e empregou membranas de tamanho de poros de 0,22 μm . A solução de vitaminas, solução tampão (bicarbonato de sódio) e solução redutora (sulfeto), já descritas, foram esterilizadas a frio. Para manter condições de assepsia, foram usados forno e bico de Bunsen. As

soluções, previamente submetidas a atmosfera de N₂ (100%), foram filtradas à vácuo e distribuídas em frascos de antibiótico e Duran SCHOTT® com o auxílio de pipetas de diferentes volumes. Todo o material usado foi previamente esterilizado em autoclave (121°C e 1 atm por 20 minutos).

4.4.3. Esterilização em calor úmido

Os meios de cultura e solução traço de metais, assim como o sistema de filtração, vidrarias, seringas e agulhas usadas, foram esterilizados em calor úmido. Para isso, o material foi envolto em papéis alumínio e pardo e autoclavado em condições de 121°C e 1atm de pressão, por 20 minutos.

4.5. Análises cromatográficas

4.5.1. Determinação de metano

A concentração de metano no biogás foi monitorada através de cromatografia gasosa. Alíquotas de 1mL do *headspace* dos reatores foram retiradas com auxílio de seringa com válvula de trava (1,0mL da VICI precision sampling, Inc.) e analisadas no cromatógrafo a gás.

Utilizou-se cromatógrafo Gow-Mac Instrument Co, modelo 69, com coluna Porapak-Q (comprimento de 2,0m e diâmetro interno de 1/4”) com detector de condutividade térmica, série 150; o gás de arraste usado foi o hidrogênio super seco (White Martins). O integrador era da marca Hewlett-Packard, modelo HP 3396, série II. As condições de operação do aparelho foram: temperatura do detector, coluna e injetor 55°C e corrente de 150mA.

Para o cálculo da concentração do gás metano (mmol de CH₄/L) foi preparada curva analítica (calibração) do metano (ANEXO 1).

4.5.1.2. Avaliação da atividade metanogênica

O ensaio constituiu na determinação, por cromatografia gasosa, da concentração de metano, presente no biogás produzido no volume livre (*headspace*) dos reatores de

2000mL. Sua finalidade foi avaliar o potencial da biomassa na conversão de substrato (fonte de carbono na forma de metilamina) em metano.

Essa análise foi realizada durante todo o experimento, em frequência aproximada de quatro vezes ao dia.

4.5.1.3. Cálculo da atividade metanogênica específica

A metodologia usada para o cálculo da atividade metanogênica foi adaptada dos trabalhos de ARAÚJO (1995), OLIVEIRA (1997) e STEIL (2001).

Os valores das áreas de metano obtidas foram convertidos, por meio da equação da reta padrão, a mmols de CH₄ nas CNTP. Os valores de metano obtidos para 1mL (volume retirado para a amostragem) foram convertidos para o *headspace* de cada frasco, a partir da seguinte equação:

$$\text{n}^\circ \text{ de mols de CH}_4 \text{ no headspace (mmol)} = [\text{CH}_4] \text{ na amostra (mmol)} \times \text{volume do headspace (mL)} / \text{volume injetado da amostra (mL)}$$

Durante todo o experimento, os frascos não foram despressurizados, a fim de se manter concentrações acumuladas do biogás.

Os dados experimentais foram ajustados à sigmóide de Boltzmann (Equação 1) através do *software* Microcal Origin[®] 7.5 utilizando-o algoritmo de otimização de Levenberg-Marquardt, minimizando a somatória dos erros ao quadrado. A sigmóide ajustada foi posteriormente derivada, numericamente, com o mesmo software, a fim de se determinar as velocidades máximas de formação de metano. Dividindo-se o valor da velocidade máxima pela concentração de biomassa de cada reator (g SVT), obteve-se a atividade metanogênica aparente (AMA).

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/d_x}} + A_2 \quad (\text{Equação 1})$$

A atividade metanogênica específica (AME) foi obtida subtraindo-se a atividade metanogênica do controle dos valores das atividades obtidas com a adição de metilamina.

A concentração da biomassa em cada frasco reator foi determinada pela média entre os valores de sólidos suspensos voláteis iniciais e finais.

4.5.2. Determinação de ácidos orgânicos voláteis

Para determinação cromatográfica gasosa dos ácidos orgânicos voláteis, retirou-se dos reatores alíquotas de 5mL de amostra. As amostras foram retiradas no início e final do experimento e congeladas em frascos de antibiótico para posterior análise.

Na ocasião da análise, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio, onde foi adicionado 0,5g de NaCl, 50µL de solução de H₂SO₄, 70µL de solução de ácido crotônico (padrão interno) e 0,60mL de éter etílico. Os frascos foram tampados, agitados manualmente por 1 minuto e então centrifugados a 1000rpm e armazenados em congelador para posterior injeção no cromatógrafo (MORAES *et al*, 2000).

Utilizou-se cromatógrafo *Hewlett-packard*, modelo CG, HP 6890, com coluna HP – INNOWAX de comprimento 30m e diâmetro interno 25µm. O gás de arraste usado foi o hidrogênio, com vazão de 30mL/min e detector de ionização de chama. O aparelho foi operado sob as seguintes condições: temperatura do detector 300°C e do injetor 250°C – a coluna foi aquecida a 100°C por 3 minutos e em seguida aplicou-se gradiente de temperatura (rampa de aquecimento) de 5°C/min até atingir 180°C; fluxo de ar 300mL/min. O volume injetado foi de 1µl, usando-se seringa SGE de 10µl.

4.6. Análises físico-químicas

4.6.1. Determinação de nitrogênio amoniacal

As concentrações de nitrogênio amoniacal foram realizadas no início e final do experimento, para todos os reatores anaeróbios, por meio de análise de injeção de Fluxo (FIA do inglês *Flow Injection Analyses*). As amostras foram retiradas em alíquotas de 5mL, acidificadas com 100µl de HCl diluído e analisadas de acordo com metodologia descrita em APHA (2001).

4.6.2. Determinação de sólidos voláteis totais

A determinação dos sólidos voláteis totais (SVT) foi feita em triplicata, com o inóculo e após o término do experimento, de acordo com o APHA (2001). Neste trabalho, os resultados das análises de sólidos estão expressos em g/L.

4.7. Análise da diversidade microbiana

4.7.1. Exames microscópicos

As amostras examinadas ao microscópio foram o inóculo, as células de todos os reatores anaeróbios em batelada e as provenientes dos experimentos de contagem por NMP. 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.

Utilizou-se microscópio Leica DM LB, acoplado a câmara Leica DC 200 e *software* Image-Pro plus (versão 4.5.0.19). Foram usadas as seguintes condições de aumento: ocular 10, objetiva 100 e *zoom* de 1,25.

4.7.2. Avaliação quantitativa dos grupos microbianos anaeróbios

A técnica do Número Mais Provável (NMP) foi realizada ao final do experimento para quantificação dos grupos microbianos anaeróbios (bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas). O método constituiu na inoculação do lodo proveniente dos diferentes reatores, após duas semanas de operação.

Anteriormente à inoculação nos frascos de contagem do NMP, procedeu-se a diluição do inóculo em condições anaeróbias. Para tanto, foi utilizado meio basal Zinder, acrescido de bicarbonato de sódio (10%) e solução redutora de sulfeto de sódio (5%), sob atmosfera de N_2/CO_2 . Foram usados frascos de 30mL, sendo 10 mL de volume de solução contendo 9mL de água de diluição e 1mL de inóculo. Os frascos foram incubados a $30^\circ C \pm 2^\circ C$ durante 15 dias.

As diluições estiveram na faixa de 10^{-1} a 10^{-10} e foram feitas em quintuplicata (Figura 4.4). Após período de incubação de 15 dias, o crescimento dos microrganismos

foi avaliado pela presença de turbidez, formação de biogás e microscopia óptica de contraste de fases e de fluorescência.

Combinações de respostas positivas foram a base do cálculo para estimar o NMP, usando a tabela padrão de probabilidade (APHA, 2005), que confere o limite de confiança de 95% para cada valor determinado.

Figura 4.4. Esquema de diluição do NMP

4.7.3. Análise de Biologia Molecular

A avaliação da diversidade da comunidade microbiana foi realizada através da técnica do PCR/DGGE. O DNA foi extraído segundo o protocolo de GRIFFITHS *et al.* (2000). Na amplificação dos fragmentos do DNA foram usados *primers* específicos do Domínio *Bacteria* (NIELSEN *et al.*, 1999) e Domínio *Archaea* (KUDO *et al.*, 1997). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE.

A partir do DNA extraído da amostra foram obtidos fragmentos DNAr 16S, utilizando a técnica da amplificação, através da reação de polimerização em cadeia (PCR) com *primers* homólogos às regiões conservadas do gene RNAr 16S.

A Tabela 4.5 descreve os *primers* dos domínios *Bacteria* e *Archaea* utilizados nas análises de PCR/DGGE.

Tabela 4.5. *Primers* usados nas análises de PCR

Domínio	<i>Primers</i> e sequência (5' → 3')	Fonte
<i>Archaea</i>	1100 FGC (5'- AACCGTCGACAG TCAGGYAACGAG CGAG-3')- 1400 R (5'- CGCCGAATTCGTGCAAGGAGCAGG GAC-3') GC clamp (5' – CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGG – 3')	Kudo <i>et al.</i> (1997)
<i>Bacteria</i>	968 FGC (5'- AACGCGAAGAACCTTAC – 3') 1392 R (5'- AACGGGCGGTGTGTAC – 3') GC clamp (5'- CGCCCGCCGGGGCGCGCCCCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGG – 3')	Nielsen <i>et al.</i> (1999)

A agarose em gel eletroforético foi usada para avaliar o produto resultante da extração dos ácidos nucleicos e da amplificação dos genes por PCR.

O procedimento para a avaliação da extração dos ácidos nucleicos e da amplificação do PCR foi o mesmo; a única diferença foi o marcador usado. Para a extração dos ácidos nucleicos foi usada concentração de agarose de 1% e marcador High DNA Mass Ladder. Para verificar o produto da amplificação por PCR utilizou-se marcador Low DNA Mass Ladder.

O procedimento para realização do DGGE consistiu na preparação da solução do gel nas concentrações desejadas (40%-65% para *Bacteria* e 30%-60% para *Archaea*); depois disso, preparou-se o “sanduíche” com o *kit* de placas de vidro e suporte. Os géis foram preparados e transferidos simultaneamente para o “sanduíche” de placas. Colocou-se o pente e esperou-se a solidificação dos géis. A câmara eletroforética foi preparada adicionando-se 140mL de TAE 50X e volume de 7 litros foi completado com água ultrapurificada. A solução foi posta para aquecer a temperatura de 65°C e, após atingi-la, recebeu o *kit* de placas. As alíquotas, preparadas com a mistura de 20µL de amostra com 4µL de *loading dye*, foram transferidas para as cavidades do gel.

A bomba de agitação foi ligada e decorreu tempo de corrida de 6 horas a 60°C para *Bacteria* e 16 horas e 65°C para *Archaea*.

Utilizou-se sistema de DGGE D CodeTM - *Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia) exatamente como descrito pelos fabricantes no manual de instruções. Os géis foram corados com 10mL de solução de coloração (TAE 1x contendo 1µg/mL de Brometo de Etídeo) por 20 minutos, fotografados em câmara

escura *Eagle Yey II* (Stratagene) sob exposição à UV de 254nm e processados com o *software Eaglesight* (Stratagene - versão 3.22).

Na comparação dos padrões de bandas de DGGE, utilizou-se a equação de GILLIAN *et al.* (1998), que calcula o coeficiente de similaridade entre duas amostras (Equação 2).

$$C_s = \frac{2j}{(a + b) \times 100} \quad (\text{Equação 2})$$

A variável *a* é o número de bandas da amostra 1, *b* é o número de bandas da amostra 2 e *j* é o número de bandas comuns. A intensidade das bandas de DGGE não foi considerada fator variável.

Amostras para seqüenciamento foram obtidas através de PCR realizado a partir das bandas do DGGE, com *primers* para o Domínio *Archaea* (KUDO *et al.*, 1997) sem GC *clamp*. O seqüenciamento foi feito no Centro de Estudos de Genoma Humano do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) – USP. O resultado do seqüenciamento foi alinhado através do *software* DNASTar. A seqüência final obtida foi analisada através do banco de dados NCBI-BLAST.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de atividade metanogênica tiveram duração aproximada de 200 horas, indicando a rápida degradação da metilamina em diferentes concentrações. Os parâmetros usados para o cálculo da atividade metanogênica estão apresentados no APÊNDICE 1.

Nos reatores controle, que não receberam adição de fonte de carbono, tendo como substrato apenas o meio basal Zinder e vitaminas, ocorreu produção de metano inferior aos que receberam adição de metilamina em diferentes concentrações. A concentração de metano acumulado ficou em torno de 2,57 mmol/L em 160 horas de experimento para o reator Controle (1). O reator Controle (2), no mesmo tempo de experimento, teve valor de metano acumulado igual a 3,25 mmol/L. Nesses reatores, não existiu fase lag, pois a produção de CH₄ apresentou comportamento linear, diferente dos reatores alimentados com metilamina, que apresentaram padrão de crescimento sigmoidal. Os resultados dos reatores controle estão expressos graficamente nas Figuras 5.1 e 5.2.

Figura 5.1. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo linear ajustado) no reator anaeróbio controle (1)

Figura 5.2. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo linear ajustado) no reator anaeróbio controle (2)

Nos reatores alimentados com 5mM de metilamina observou-se fase lag com duração de 20 horas. Após aproximadamente 116 horas de experimento, a concentração de metano acumulado atingiu valor máximo de 6,91 mmol/L no reator 1 e 6,58 mmol/L no reator 2. Nas Figuras 5.3 e 5.4 a produção de metano nesses reatores está mostrada graficamente.

Figura 5.3. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (1) alimentado com 5mM de metilamina

Figura 5.4. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (2) alimentado com 5mM de metilamina

Nos reatores alimentados com 10mM de metilamina, a fase lag também teve duração de 20 horas. A produção máxima de metano nos reatores ocorreu após aproximadamente 120 horas e atingiram valores de 11,8 mmol/L no reator (1) e 9,44 mmol/L no reator (2). Nas Figuras 5.5 e 5.6 a produção de metano nesses reatores está mostrada graficamente.

Figura 5.5. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (1) alimentado com 10mM de metilamina

Figura 5.6. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (2) alimentado com 10mM de metilamina

Nos reatores alimentados com 20mM e 30mM, a fase lag foi de 50 horas do início do experimento. Os valores máximos de metano acumulado, nos reatores com 20mM de metilamina, foram obtidos após 116 horas do início do experimento e iguais a 14,7 mmol/L no reator (1) e 15,3 mmol/L no reator (2). Nos reatores alimentados com 30mM de metilamina as concentrações máximas de metano acumulado, observadas

após 122 horas do início do experimento, foram de 20 mmol/L no reator (1) e 20,4 mmol/L no reator (2). Nas figuras 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9 está mostrado graficamente a produção de metano nas duplicatas dos reatores (1) e (2) alimentados com 20mM e 30mM de metilamina.

Figura 5.7. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbico (1) alimentado com 20mM de metilamina

Figura 5.8. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbico (2) alimentado com 20mM de metilamina

Figura 5.9. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (1) alimentado com 30mM de metilamina

Figura 5.10. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (2) alimentado com 30mM de metilamina

Nos reatores alimentados com 50mM de metilamina, a fase lag teve duração de 100 horas. No reator (1) o valor máximo de metano acumulado foi igual a 37,3 mmol/L, após 170 horas. No reator (2) ocorreu o mesmo valor, após 175 horas. Nas Figuras 5.11 e 5.12 está mostrado graficamente a produção de metano nesses reatores.

Figura 5.11. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (1) alimentado com 50mM de metilamina

Figura 5.12. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (2) alimentado com 50mM de metilamina

A fase lag dos reatores alimentados com 75mM de metilamina teve duração de 120 horas. Os valores máximos de metano acumulado atingidos após aproximadamente 170 horas de experimento foram de 46,5 mmol/L no reator (1) e 37,4 mmol/L no reator (2). Nas Figuras 5.13 e 5.14 está mostrado graficamente a produção de metano nesses reatores.

Figura 5.13. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (1) alimentado com 75mM de metilamina

Figura 5.14. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbio (2) alimentado com 75mM de metilamina

Nos reatores alimentados com 90mM de metilamina a fase lag teve duração aproximada de 125 horas. Os valores máximos de metano acumulado foram obtidos após 170 horas, com valores de 38,6 mmol/L para o reator (1) e 39,6 mmol/L para o reator (2). Nas Figuras 5.15 e 5.16 está mostrado graficamente a produção de metano nesses reatores.

Figura 5.15. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbico (1) alimentado com 90mM de metilamina

Figura 5.16. Variação temporal da produção de metano (▲ - valores experimentais; — modelo sigmoidal ajustado) no reator anaeróbico (2) alimentado com 90mM de metilamina

Os valores de velocidade de formação de metano estão expressos no APÊNDICE 2. O período da fase lag, a produção máxima de metano e a velocidade máxima de formação de metano para cada reator estão expressas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Período da fase lag, produção máxima de metano e velocidade máxima de formação de metano em cada reator anaeróbico em batelada

Concentração de Metilamina	Período da Fase Lag (h)	Produção Máxima de Metano (mmol/L)	Período da Produção Máxima de Metano (h)	Velocidade Máxima da Formação de Metano (mmol/L.h)
Controle (1)	0	2,57	160	0,00674
Controle (2)	0	3,25	160	0,0115
5mM – reator (1)	20	6,91	116	0,0798
5mM – reator (2)	20	6,58	116	0,0913
10mM – reator (1)	20	11,8	120	0,0892
10mM – reator (2)	20	9,44	120	0,0976
20mM – reator (1)	50	14,7	116	0,0174
20mM – reator (2)	50	15,3	116	0,0159
30mM – reator (1)	50	20,0	122	0,346
30mM – reator (2)	50	20,4	122	0,274
50mM – reator (1)	100	37,3	170	0,442
50mM – reator (2)	100	37,3	175	0,500
75mM – reator (1)	120	46,5	170	0,635
75mM – reator (2)	120	37,4	170	0,520
90mM – reator (1)	125	38,6	170	0,446
90mM – reator (2)	125	39,6	170	0,453

Nos reatores alimentados com 5mM, 10mM, 20mM e 30mM de metilamina a fase lag foi menor, porém com baixa produção de metano, com valores em torno de 20mmol/L. Nos reatores alimentados com 50mM e 75mM de metilamina obtiveram-se os melhores resultados. Apesar da fase lag mais longa (100h e 120h, respectivamente), a produção de metano foi em torno de 40mmol/L e as velocidades máximas de formação de metano foram altas (entre 0,442mmol/L.h e 0,635mmol/L.h). Os reatores (1) e (2) alimentados com 90mM de metilamina, apesar da produção máxima de metano também em torno de 40mmol/L, tiveram decréscimo na velocidade máxima de formação de metano, que ficou em torno de 0,450mmol/L.h.

A velocidade máxima de formação de metano e os valores de sólidos suspensos voláteis foram empregados na determinação da atividade metanogênica específica de cada reator. A determinação dos Sólidos Voláteis Totais (SVT) foi feita para o inóculo e ao final do experimento, para todos os reatores. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 5.2.

A concentração inicial de Sólidos Voláteis Totais (SVT) foi de 5g/L. Os reatores controle, assim como aqueles alimentados com 5mM, 10mM e 20mM de metilamina

não tiveram aumento significativo no valor de SVT, variando entre 4,2g/L no reator (2) – 20mM e 5,6g/L no reator (1) – 5mM. Para os reatores alimentados com 30mM de metilamina, os valores de SVT foram de 6,2g/L para o reator (1) e 5,1g/L para o reator (2), respectivamente. Os reatores alimentados com 75mM de metilamina tiveram valor médio de SVT próximo a 7,5g/L. Os maiores valores de SVT foram obtidos para os reatores alimentados com 75mM e 90mM de metilamina, variando entre 8,3g/L (75mM 2) e 9,5g/L (90mM 1). A Figura 5.17 apresenta graficamente os resultados obtidos para análise dos sólidos voláteis totais, com possíveis variações dos resultados (5%) atribuídas à precisão do método, descrita no Standard Methods (APPHA, 2005)

Até a concentração de 20mM de metilamina, o crescimento não foi favorecido, levando à mortalidade celular e à seleção de microrganismos. Todavia, para os reatores alimentados com 30mM, 50mM, 75mM e 90mM de metilamina, ocorreu aumento da biomassa com acréscimo de 13%, 49%, 73% e 81% respectivamente, para valor inicial de SVT adicionado igual a 5g/L. Esses resultados indicaram que a biomassa foi favorecida com o aumento nas concentrações de metilamina, principalmente em 50mM, 75mM e 90mM.

Tabela 5.2. Valores de concentração de SVT obtidos nos reatores anaeróbios em batelada

Amostras	SVT (g/L)
Inoculo	5,0
Controle 1	5,3
Controle 2	4,4
5mM 1	5,6
5mM 2	5,0
10mM 1	5,3
10mM 2	4,3
20mM 1	4,3
20mM 2	4,2
30mM 1	6,2
30mM 2	5,1
50mM 1	7,4
50mM 2	7,5
75mM 1	9,0
75mM 2	8,3
90mM 1	9,5
90mM 2	8,6

Figura 5.17. Concentração de sólidos voláteis totais para diferentes amostras de reatores anaeróbios alimentados com diferentes concentrações de metilamina (barra de erro de 5%)

Para determinação da Atividade Metanogênica Aparente (AMA), adotou-se a média entre os Sólidos Voláteis Totais iniciais (inóculo) e os Sólidos Voláteis Totais finais de cada reator. Para cálculo da Atividade Metanogênica Específica (AME), adotou-se a média entre as atividades metanogênicas aparentes dos reatores controles A e B; esta média foi subtraída dos valores de AMA obtidos em todos os demais reatores. Os valores de AME seguiram tendência de aumento das menores para as maiores concentrações de metilamina. Os valores de AME foram 0,0131 mmol CH₄/g SVT.h e 0,0163 mmol CH₄/g SVT.h para o reator (1) e para o reator (2) - 5mM; 0,0153 mmol CH₄/g SVT.h e 0,0191 mmol CH₄/g SVT.h para os reator (1) 2 para o reator (2) - 10mM; 0,0355 mmol CH₄/g SVT.h e 0,0325 mmol CH₄/g SVT.h para o reator (1) e para o reator (2) - 20mM; 0,0597 mmol CH₄/g SVT.h e 0,0577 mmol CH₄/g SVT.h para o reator (1) e para o reator (2) - 30mM; 0,0828 mmol CH₄/g SVT.h e 0,0780 mmol CH₄/g SVT.h para o reator (1) e para o reator (2) - 50mM; 0,0887 mmol CH₄/g SVT.h e 0,0763 mmol CH₄/g SVT.h para o reator (1) e para o reator (2) - 75mM; 0,0597 mmol CH₄/g SVT.h e 0,0647 mmol CH₄/g SVT.h para o reator (1) e para o reator (2) - 90mM, respectivamente. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Valores médios de sólidos voláteis totais, atividade metanogênica aparente (AMA), atividade metanogênica específica (AME)

Reator anaeróbico em batelada	Média entre SVT inicial e final (g/L)	AMA (mmol CH ₄ /g SVT.h)	AME (mmol CH ₄ /g SVT.h)
Controle 1	5,15	0,00131	-
Controle 2	4,68	0,00245	-
5 mM 1	5,31	0,0150	0,0131
5 mM 2	5,01	0,0182	0,0163
10 mM 1	5,17	0,0173	0,0153
10 mM 2	4,65	0,0209	0,0191
20 mM 1	4,65	0,0374	0,0355
20 mM 2	4,60	0,0344	0,0325
30 mM 1	5,61	0,0616	0,0597
30 mM 2	5,07	0,0596	0,0577
50 mM 1	5,22	0,0847	0,0828
50 mM 2	6,26	0,0799	0,0780
75 mM 1	7,01	0,0906	0,0887
75 mM 2	6,65	0,0689	0,0763
90 mM 1	7,24	0,0616	0,0597
90 mM 2	6,80	0,0666	0,0647

OLIVEIRA (1997) comparou a AME de lodo mesofílico granular bruto e lavado, constatando o aumento da AME para o lodo lavado. O autor atribuiu esse resultado à retirada dos sólidos finos pela lavagem. A atividade metanogênica aparente do frasco controle inoculado com lodo bruto foi atribuída à presença de substratos facilmente degradáveis disponíveis para a metanogênese.

Neste trabalho, buscou-se minimizar interferências na determinação da AME para reatores alimentados com metilamina submetendo o lodo à lavagem e ao esgotamento prévio de matéria orgânica já existente por período de 15 dias.

STEIL (2001) determinou a AME para o efluente de biodigestor em batelada tratando resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos, usando conjuntamente os substratos acetato, propionato, butirato e formiato de sódio em cargas orgânicas que variaram de 0,25 g DQO/ g SV, 0,50 g DQO/ g SV, 0,75 g DQO/ g SV e 1,00 g DQO/ g SV. O inóculo correspondeu a 10% do substrato. Os valores médios de AME encontrados, para aves de postura, foram de 0,1984 mmol CH₄/g SVT, 0,1901 mmol CH₄/g SVT, 0,1008 mmol CH₄/g SVT e 0,0541 mmol CH₄/g SVT para valores crescentes de carga orgânica, respectivamente. Para frangos de corte, os valores foram 0,2109 mmol CH₄/g SVT, 0,0973 mmol CH₄/g SVT, 0,0558 mmol CH₄/g SVT e 0,0372 mmol CH₄/g SVT; para suínos, os valores foram 0,2532 mmol CH₄/g SVT, 0,0941 mmol CH₄/g SVT, 0,0542 mmol CH₄/g SVT e 0,1105 mmol CH₄/g SVT, respectivamente.

No presente trabalho, os valores de AMA ficaram em 0,00131 mmol CH₄/g SVT.h e 0,00245 mmol CH₄/g SVT.h para os reatores Controle (1) e (2), e variaram entre 0,0131 e 0,0887 para os reatores acrescidos de fonte de carbono (metilamina). Como os frascos reatores foram inoculados com lodo de mesma origem, e foram submetidos às mesmas condições de análise, pode-se concluir que o aumento da AME foi devido à maior disponibilidade de fontes orgânicas no substrato. Isso poderia explicar o crescente aumento da AME de acordo com o aumento das concentrações de metilamina disponibilizadas.

O modelo cinético de Monod foi ajustado aos valores da AME compreendidos entre 0mM e 75mM (Figura 5.18). A Atividade Metanogênica Específica Máxima foi determinada em 0,15 mmol CH₄/g SVT.h. Os reatores com concentração de 90mM, que apresentaram valores de atividade metanogênica inferiores aos de concentrações 50mM e 75mM, não foram ajustados ao modelo cinético.

Figura 5.18. Ajuste do modelo cinético de Monod

Os valores obtidos no teste de atividade metanogênica mostram provável inibição de produção de metano nos reatores de concentração 90mM. Esta inibição pode ser atribuída a possível erro experimental ou ao excesso de substrato.

As concentrações de N amoniacal foram determinadas no início e final do experimento. A produção aumentou de acordo com as concentrações de metilamina adotadas, com exceção do reator 90mM que teve decréscimo de produção comparado ao

reator de concentração 75mM. Os reatores controle tiveram valores finais de 202 mg/L N AMONIAL. Após 9 dias decorridos do início do experimento, quando a atividade metanogênica já estava estável em todos os reatores. Os valores de nitrogênio amoniacal finais médios para os reatores de diferentes concentrações foram, respectivamente: 144 mg/L N amoniacal (5 mM de metilamina); 197 mg/L N amoniacal (10 mM de metilamina); 441 mg/L N amoniacal (20 mM de metilamina); 566 mg/L N amoniacal (30 mM de metilamina); 828 mg/L N amoniacal (50 mM de metilamina); 1070 mg/L N amoniacal (75 mM de metilamina); 1006 mg/L N amoniacal (90 mM de metilamina). A comparação entre todas as concentrações está apresentada na Figura 5.19.

Determinou-se, também, a porcentagem de conversão do N presente na molécula de metilamina a N amoniacal. Para as menores concentrações (5 mM e 10 mM de metilamina), as moléculas de N amoniacal geradas foram usadas no metabolismo celular dos microrganismos (assimilação), e não se acumularam no meio. Reatores alimentados com metilamina em concentrações 20mM, 30mM e 50 mM apresentaram quase 100% de formação de N amoniacal a partir da amina presente na molécula de metilamina (99,3% no reator 20mM, 95,9% no reator 30mM e 95,9% no reator 50mM). Os reatores com metilamina em concentração 75mM e 90mM apresentaram certa inibição na formação de N amoniacal (86,4% no reator 75mM e 66,9% no reator 90mM).

Figura 5.19. Concentrações de N amoniacal no início e final do experimento e porcentagem de conversão de N orgânico a N amoniacal

A técnica de Número Mais Provável (NMP) foi realizada com tempo de incubação de 15 dias. Para microrganismos mesofílicos, o tempo de incubação geralmente adotado é de 30 dias. Nesse experimento, o tempo de incubação adotado foi ajustado à atividade metanogênica dos reatores alimentados com solução de metilamina, que mostraram sua eficiência máxima em apenas 11 dias. Os resultados da técnica estão expressos na Tabela 5.4 e na Figura 5.20.

Os resultados da técnica de NMP mostraram uma tendência de aumento do NMP/mL de microrganismos anaeróbios de acordo com o aumento da concentração de metilamina. As bactérias anaeróbias totais e as arqueias metanogênicas foram encontradas em quantidades de mesma ordem de grandeza. Isto indicou que quase a totalidade de microrganismos anaeróbios presentes eram representados por microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea*.

Tabela 5.4. Número Mais Provável (NMP) para bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas

Concentração de metilamina	NMP/mL	
	Bactérias Anaeróbios Totais	Arquéias metanogênicas
Controle	$2,3 \times 10^1$	0
5mM	$1,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$
10mM	$1,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
20mM	$7,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$
30mM	$7,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^6$
50mM	$7,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^5$
75mM	$1,1 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$
90mM	7×10^7	$1,1 \times 10^8$

Figura 5.20. Número Mais Provável (NMP/mL) de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas

ALVAREZ *et al.* (2000), estudaram a colonização de água residuária de indústria pesqueira por microrganismos metanogênicos e sulfetogênicos em filtro anaeróbio. Encontraram a estimativa NMP para metanogênicas da ordem de 10^8 , semelhante à observada neste estudo para as maiores concentrações de metilamina. A fonte de carbono usada foi metilamina em concentração não exposta no trabalho.

As análises de ácidos orgânicos voláteis detectaram pequenas quantidades de ácido acético no início do experimento. Ao final, todos os ácidos foram encontrados em quantidades traço. As concentrações de ácido acético presentes nos reatores foram: 8,7 mg/L (controle – sem metilamina), 8,1 mg/L (5mM), 8,2 mg/L (10mM), 7,1 mg/L (20mM), 6,8 mg/L (30mM), 7,8 mg/L (50mM), 7,2 mg/L (75mM) e 4,0 mg/L (90mM).

Os exames microscópicos realizados mostraram semelhança de morfologias microbianas para os reatores anaeróbios alimentados com as diferentes concentrações de metilamina. Em relação ao Domínio *Archaea*, foram encontrados *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp e formas encistadas. Algumas arqueias metanogênicas, notadamente *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp., têm suas morfologias distintas e podem ser identificadas em amostras naturais usando microscopia de contraste de fase e fluorescência, principalmente para *Methanosarcina* sp. (ZINDER, 1993).

Methanosarcina sp. caracteriza-se pela disposição cúbica dos cocos formando sarcinas e pela fluorescência típica 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

F₄₂₀ absorve luz em 420 nm e fluoresce com coloração azulada. Na forma reduzida, F₄₂₀ torna-se incolor (MADIGAN *et al.*, 1997).

Methanosaeta sp. é caracterizada por bacilos de extremidade reta, que formam filamentos longos e flexíveis. Nas células de *Methanosaeta* sp., a coenzima F₄₂₀ é encontrada em concentrações baixas que não causam auto fluorescência visível sob microscopia com ultra violeta (KONIG *et al.*, 1989).

A presença de *Methanosarcina* sp. explica-se pelo fato dessas arqueias usarem metilamina como substrato para produção de metano, pela via metilotrófica. A presença de *Methanosaeta* sp., que utiliza via acetoclástica de degradação, explica-se pela presença do ácido acético no lodo, mesmo em baixas concentrações.

O Domínio *Bacteria* foi representado por bacilos, cocos, coco-bacilos e filamentos. Aglomerados de bacilos estavam presentes em todos os reatores. Cocos foram raramente observados. Bacilos delgados, coco-bacilos e filamentos foram as morfologias predominantes em todas as concentrações de metilamina. A frequência dos grupos de microrganismo nos reatores anaeróbios em batelada pode ser comparada nas Tabelas 5.5 e 5.6. As Figuras 5.22, 5.23 e 5.24 mostram as diferentes morfologias encontradas.

DEL NERY *et al.* (2002) estudaram a diversidade microbiana em grânulos oriundos de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves. A técnica de Hibridação *In Situ* com Sondas Fluorescentes (FISH) foi empregada, com uso de sondas para o Domínio *Bacteria* (EUB338), Domínio *Archaea* (ARC915) e para células de *Methanosaeta* (MX825), *Methanosarcina* (MS821) e *Methanobacteriaceae* (MB1174). Os resultados mostraram predomínio de células do Domínio *Archaea* na composição do grânulo. As arqueias metanogênicas representaram entre 77,7% ($\pm 2,7$) e 85,4% ($\pm 1,5$) da composição microbiana dos grânulos. Entre as células do Domínio *Archaea*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* e *Methanobacteriaceae* apareceram em todos os grânulos. Sendo assim, a escolha desse lodo como inóculo favoreceu a degradação anaeróbia da metilamina, por se tratar de biomassa essencialmente metanogênica.

Na comparação dos padrões de bandas de DGGE, utilizou-se a equação de GILLIAN *et al.* (1998), que calcula o coeficiente de similaridade entre duas amostras. A intensidade das bandas de DGGE não foi considerada fator variável. O coeficiente de similaridade, para *Bacteria*, variou entre 92% (na comparação do inóculo com as diferentes concentrações de metilamina) e 100% (na comparação entre as diferentes concentrações de metilamina) Aparentemente a diversidade microbiana com relação ao

Domínio *Bacteria* visualizada pelas bandas do DGGE mantiveram-se constantes para todas as condições estudadas, inclusive para os controles.

As bandas de DGGE para o Domínio *Bacteria* estão representadas na Figura 5.21 pelas letras de A a G. Praticamente não houve variação no padrão de bandas entre as amostras de diferentes concentrações de metilamina. A população indicada pela banda B foi favorecida em todas as concentrações. As populações representadas pelas bandas A e C foram as mais sensíveis às alterações na composição do meio, pois foram encontradas somente no inóculo. As populações representadas pelas bandas B, D, E, F e G parecem ter sido favorecidas pelas condições do sistema.

Figura 5.21. Resultados das análises de DGGE dos fragmentos dos produtos de PCR amplificados com *primers* do Domínio *Bacteria* para as amostras: I-inóculo, C-controle (sem metilamina), 5 (5mM de metilamina), 10 (10mM de metilamina), 20 (20mM de metilamina), 30 (30mM de metilamina), 50 (50mM de metilamina), 75 (75mM de metilamina) e 90 (90mM de metilamina)

O coeficiente de similaridade, para o Domínios *Archaea*, também variou entre 92% (na comparação entre o inóculo e as diferentes concentrações de metilamina) e 100% (na comparação entre as diferentes concentrações de metilamina).

Aparentemente a diversidade microbiana com relação ao Domínio *Archaea* visualizada pelas bandas do DGGE manteve-se constante para todas as condições estudadas.

Tabela 5.5. Frequência de microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea* nos reatores alimentados com metilamina

Arquéias Metanogênicas									
MORFOLOGIA	Inóculo	Controle	5 mM	10 mM	20 mM	30 mM	50 mM	75 mM	90 mM
<i>Methanosarcina</i> sp.	+	+	+	++	++	+++	++++	++++	++++
<i>Methanosaeta</i> sp.	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Cistos de sarcinas	+	+	+	++	+++	+++	++	++	++

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados

Tabela 5.6. Frequência de microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* nos reatores alimentados com metilamina

Bactérias									
MORFOLOGIA	Inóculo	Controle	5 mM	10 mM	20 mM	30 mM	50 mM	75 mM	90 mM
Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacilos	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Bacilos curvos	-	-	++	++	++	++	++	++	++
Bacilos delgados	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Cocos-bacilos	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Filamentos	-	-	-	++	++	++	++	++	++

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros, (-) não foram observados

Figura 5.22. Microscopia de contraste de fase de amostras dos reatores anaeróbios em batelada: **a-** *Methanosaeta* sp. (Controle - sem metilamina); **b-** Filamento (5mM de metilamina); **c-** Aglomerado de bacilos (5mM de metilamina); **d-** Bacilos (10mM de metilamina); **e-** *Methanosarcina* sp. (10 mM de metilamina); **f-** Bacilos (20mM de metilamina)

Figura 5.23. Microscopia de contraste de fase e fluorescência de amostras dos reatores anaeróbios em batelada: **a-** *Methanosarcina* sp. (30mM de metilamina), **b-** *Methanosarcina* sp. (fluorescência – 30mMB de metilamina); **c-** *Methanosaeta* sp. (50mM de metilamina); **d-** Bacilos (30mM de metilamina); **e-** *Methanosarcina* sp. (50mM de metilamina); **f-** Filamento (50mM de metilamina)

Figura 5.24. Microscopia de contraste de fase de amostras dos reatores anaeróbios em batelada: **a-** *Methanosaeta* sp. (50mM de metilamina), **b-** *Methanosarcina* sp. (50mM de metilamina); **c-** *Methanosarcina* sp. (75mM de metilamina), **d-** Cocos (75mM de metilamina); **e-** Coco-bacilos, bacilos e *Methanosaeta* sp. (90mM de metilamina); **f-** Filamentos (90mM de metilamina)

As populações do Domínio *Archaea*, representadas pelas bandas de DGGE, estão indicadas na Figura 5.25 pelas letras de A a H. Não houve variação no padrão de bandas entre as amostras de diferentes concentrações de metilamina. A banda H parece representar a única população de arqueia metanogênica favorecida pelo aumento nas concentrações de metilamina, e a banda A representa a população microbiana mais favorecida em todas elas. As bandas B, C, D, E, F e G parecem ter sido favorecidas em todas as concentrações de metilamina.

A banda A presente no gel de DGGE do Domínio *Archaea* foi sequenciada e apresentou 100% de identidade com a sequência gi|42602023|gb|AY454759.1| Uncultured *Methanosaeta* sp. clone DI_E03 16S ribossomal, depositada no banco de dados do NCBI. Os membros da espécie *Methanosaeta*, primeiramente descrita por PATEL (1985), correspondem a bacilos embainhados, acetoclásticos estritos, mesofílicos e metanogênicos (GARCIA, 2000; BOONE, 2001).

Figura 5.25. Resultados das análises de DGGE dos fragmentos dos produtos de PCR amplificados com *primers* do Domínio *Archaea* para as amostras: I-inóculo, C-controle (sem metilamina), 5 (5mM de metilamina), 10 (10mM de metilamina), 20 (20mM de metilamina), 30 (30mM de metilamina), 50 (50mM de metilamina), 75 (75mM de metilamina) e 90 (90mM de metilamina)

A presença de *Methanosaeta* sp. nos reatores pode ser explicada pela presença de acetato no lodo usado como inóculo. Como a espécie possui baixo K_s para crescimento em acetato, por volta de 0,47mM, que corresponde a 28 mg de acetato (GONZALES-GIL *et al.*, 2001), é possível que a espécie tenha se desenvolvido a partir do acetato residual do lodo.

Neste trabalho, a concentração inicial de acetato presente nos reatores não foi quantificada, pois as análises de ácidos orgânicos voláteis só começaram a ser realizadas após 15 dias de inoculação, quando a matéria orgânica proveniente do lodo já havia sido previamente esgotada pelos microrganismos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- Em relação à Atividade Metanogênica Específica do lodo (AME) dos reatores pôde-se perceber que o aumento das concentrações de metilamina promoveu aumento na AME. Os melhores resultados foram observados para os reatores com metilamina em concentrações de 50mM e 75mM, que apresentaram maior produção de metano e maiores velocidades de formação de metano. O modelo cinético de Monod ajustou-se aos dados experimentais, exceto na concentração 90mM de metilamina.
- Os resultados da técnica de Número Mais Provável (NMP) mostraram que quase a totalidade de bactérias anaeróbias totais era composta por arqueias metanogênicas, pois os resultados foram obtidos na mesma ordem de grandeza. Houve ampla diversidade de microrganismos do Domínio *Bacteria*, representados por bacilos, coco-bacilos, filamento e cocos, e do Domínio *Archaea*, representados por *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. O seqüenciamento revelou a presença de *Methanosaeta* sp. mesmo para elevadas concentrações de metilamina.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Sugere-se:

- Estudo da degradação de metilamina em reator contínuo, para avaliar o comportamento dos microrganismos quando expostos por longos períodos ao composto.
- A realização de ensaios de atividade metanogênica com concentrações de metilamina superiores a 90mM, para tentativa de ajuste de modelo cinético que tenha a inibição de crescimento por excesso de substrato como um de seus parâmetros.
- Processo único de remoção de metilamina, com remoção de N AMONIACAL por bactérias que promovam a oxidação anaeróbia da amônia a nitrogênio molecular – ANAMMOX.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. W. W. (1995) Thermophilic Archaea: an overview. In: Archaea – a laboratory manual: Thermophiles. ROBB, F.T. & PLACE, A.R. (eds.). New York. Cold Spring Harbor Laboratory press 3-7.
- ALVAREZ, R. V.; ASPÉ, E. & URRUTIA, H. (2000) Colonization of supports by methanogenic and sulfate reducing bacteria in anaerobic filter – type reactors. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 42: 177-180.
- APHA, AWWA & WPCF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21a. ed, Washington, D.C., Estados Unidos.
- ARAÚJO, J. C. (1995) Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético. Dissertação de Mestrado, EESC-USP, 158p.
- BALCH, W.E.; FOX, G.E.; MAGRUM, L.J.; WOESE, C.R. & WOLFE, R.S. (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* 43 (2): 260-292
- BAPTESTE, E.; BROCHIER, C. & BOUCHER, Y. (2005) Higher-level classification of the *Archaea*: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1: 353-363.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. (2004) *Bioquímica*. Quinta Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 1059p.
- BERLOW, E. L. (1999) Some effects of weak interactions in ecological communities. *Nature* 398: 330-334
- BOONE, D. R.; MATHRANI, I. M.; LIU, Y.; MENAIA, J. A. G. F.; MAH; R. A. & BOONE, J. E. (1993) Isolation and characterization of *Methanohalophilus portucalensis* sp. nov. and DNA reassociation study of the genus *Methanohalophilus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 430-437

- 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
- CHISTOSERDOVA, L.; JENKINS, C.; KALYUZHNYAYA, M. G.; MARX, C. J.; LAPIDUS, A.; VORHOLT, J. A.; STALEY, J. T. & LIDSTROM, M. E. (2004) The enigmatic planctomycetes may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1234-1241.
- DEL NERY, V.; GIANOTTI, E. P.; DAMIANOVIC, M. H. Z.; DOMINGUES, M. R. & ZATAT, M. (2002) Granules characteristics in the profile of a plant scale upflow anaerobic sludge blanket reactor treating poultry slaughterhouse wastewater. *Anais do VII Simpósio Latinoamericano sobre Digestión Anaeróbia*. Mérida, México.
- DEPPENMEYER, U.; LIENARD, T. & GOTTSCHALK, G. (1999) Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic *Archaea*. *FEBS Letters* 457: 291-297.
- DOMINGUES, M. R. (2002) Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e de leito fixo, sob condições termofílicas. Dissertação de Mestrado, 152p.
- DUBOURGUIER, H. C. (1987) Curso ecologia da digestão anaeróbia. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, São Paulo.
- FERNANDES, A.; HUANG, S.; SESTON, S.; XING, J.; MICKEY, R.; CRIDDLE, C. & TREDJE, J. (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3697-3704.
- FERRY, J. G. (1999) Enzymology of one-carbon reactions in methanogenic pathways. *FEMS Microbiological Reviews* 23: 13-38.
- GALAGAN, J. E.; NUSBAUM, C. & ROY, A. (2002) The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Research* 12: 532-542.
- GARCIA, J. L., BHARAT, K. C. P. & OLLIVIER, B (2000) Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* 6: 205-226.
- GARRITY, G. (2001) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Editora Springer-Verlag, New York, 721p.
- GILLAN, D.; SPEKSNIJDER, A.; ZWART, G. & RIDDER, C. (1998) Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9): 3464-3472.

- GONZALES-GIL, G.; LENS, P. N. L.; VAN AELST, A.; VESPRILLE, A. I. & LETTINGA, G. (2001) Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (8): 3683-3692.
- GRAHAM, D. E. & WHITE, R. H. (2002) Elucidation of methanogenic coenzyme biosyntheses: from spectroscopy to genomics. *Natural Products Report* 19: 133-147.
- GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S. & O'DONNELL, A. G. (2000) Rapid method for coextration of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12): 5488-5491.
- HUANG, L. N.; ZHOU, H.; CHEN, Y. Q., LUO, S.; LAN, C. Y & QU, L. H. (2002) Diversity and structure of the archaeal community in the leachate of a full-scale recirculating landfill as examined by direct 16r RNA gene sequence retrieval. *FEMS Microbiology Letters* 214: 235-240.
- KONIG, H. & SETTER, A. O. (1989) Archaeobacteria. In: STALEY, J. T.; BRYANT, M. P.; PFENNING, N. & HOLF, J. G. editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins.
- KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T. & OYAZU, H. (1997) methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 39-48.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. & PARKER, J. (1997) *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall, Inc.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M & PARKER, J. (2004) *Microbiologia de Brock*. 10ª edição. Editora Pearson Education do Brasil, São Paulo, 608 p.
- MEUER, J.; KUETTNER, H. C.; ZHANG, J. K.; HEDDERICH, R. & 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 Academy of Science* 99: 5632-5637.
- MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M. & FORESTI, E. (2000) determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. *Anais da Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia*. Recife-PE. Editora universitária da UFPE 2: 235-238.
- MUYZER, G. & SMALLA, K. (1998) Applications of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology / mini review. *Antonie van Leeuwenhoek* (73) 127-141.

- NIELSEN, A. T.; LIU W. T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S. & STAHL, D. A. (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3)1251-1258.
- OLIVEIRA, R. A. (1997) Efeito das concentrações dos sólidos suspensos do afluente no desempenho e características do lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo tratando águas residuárias de suinocultura. Tese de Doutorado, EESC-USP, 375p.
- OSHA (2006) Occupational safety & health administration. U.S. department of labor. <http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org040/org040.html>. Site visitado em 12/07/2006.
- PATEL, G. B. (1984) Characterization and nutritional properties of *Methanothrix concilii* sp. nov., a mesophilic, aceticlastic methanogen. *The Canadian Journal of Microbiology* 30: 1383-1396
- PATEL, G. B. (1985) Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 17 *International Journal of Systematic Bacteriology* 35: 223-225
- REEVE, J. N.; NOLLING, R. M. M. & SMITH, D. R. (1997) Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first. *Journal of Bacteriology* (179) 5975-5986.
- ROBICHAUZ, M.; HOWELL, M. & BOOPATHY, R. (2003) Methanogenic activity in human periodontal pocket. *Current Microbiology* 46: 53-58
- SAKAMOTO, I. K. (2001) Comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados por remoção biológica do fósforo em excesso, utilizando técnicas de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Tese de Doutorado, EESC-USP.
- SCHWÖRER, B. & THAUER, R. K. (1991) Activities of formylmethanofuran dehydrogenase, methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, methylenetetrahydromethanopterin reductase, and heterodisulfide reductase in methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology* 155: 459-465.
- SOWERS, K. R.; THAI, T. T. & GUNSALUS, R. P. (1993) Transcriptional regulation of the carbon monoxide dehydrogenase gene (*cdhA*) in *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Biological Chemistry* 268: 23172-23178
- 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.

- TAKAI, K.; MOSER, D. P.; DEFLAUN, M.; ONSTOTT, T. C. & FREDRICKSON, J. K. (2001) Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5750-5760.
- TOUZEL, J. P. & ALBAGNAC, G. (1983) Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters* 16: 241-245.
- VAN DE WIJNGAARD, W. M.; CREEMERS, J.; VOGELS, G. D. & VAN DER DRIFT, C. (2002) Methanogenic pathways in *Methanospaera stadtmanae*. *FEMS Microbiology Letters* 64: 207-211.
- VAZOLLER, R. F. (1995) Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. Tese de Doutorado, EESC-USP.
- WALKER, B. (1995) Conserving biological diversity through ecosystem resilience. *Conservation Biology* 9: 747-752.
- WARD, D. M.; WELLER, R. & BATESON, M. M. (1990) Effect of oxygen status on pesticide transformation and sorption in undisturbed soil and lake sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (4) 608-616.
- WHITMAN, W. B.; BOONE, D. R.; KOGA, Y. & 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
- ZINDER, S. H.; CARDWELL, S. C.; ANGUISH, T.; LEE, M. & KOCH, M. (1984) Methanogenesis in a thermophilic (58° C) anaerobic digester. *Methanotherix* 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.
- ZHU, X. Y.; LUBECK, J. & KILBANELL, J. J. (2003) Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5354-5363

APÊNDICE 1 – Tempo de experimento, área cromatográfica e valores de metano acumulado no *headspace* dos reatores anaeróbios em batelada alimentados com metilamina.

Controle					
REATOR (1)			REATOR (2)		
Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)	Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)
0,00	1455	1,400	0,00	694	1,357
5,55	2374	1,452	5,45	2925	1,483
19,28	5297	1,616	19,20	6196	1,667
22,73	4764	1,586	22,63	6234	1,669
48,05	7194	1,723	48,12	12166	2,002
50,12	8077	1,772	50,02	13729	2,090
54,45	10301	1,897	54,33	17252	2,288
66,23	12035	1,995	66,15	18654	2,366
72,00	14897	2,155	71,88	20147	2,450
76,18	14912	2,156	76,08	23014	2,611
93,95	16200	2,229	93,87	29060	2,951
102,88	11730	1,977	98,45	21442	2,523
116,87	18822	2,376	102,77	19253	2,400
120,78	17130	2,281	116,82	30347	3,023
123,85	14791	2,149	120,77	28998	2,947
128,22	18166	2,339	123,73	24240	2,680
139,82	18092	2,335	128,10	29978	3,003
162,90	22227	2,567	139,88	29541	2,978

5mM de metilamina					
REATOR (1)			REATOR (2)		
Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)	Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)
0,00	5632	1,635	0,00	1585	1,408
5,35	6438	1,680	5,20	2960	1,485
19,13	14024	2,106	19,00	10842	1,928
22,55	15733	2,202	22,42	5629	1,635
48,03	37647	3,433	47,93	36375	3,362
49,93	44417	3,814	49,82	47414	3,982
54,25	54021	4,353	54,13	57511	4,549
66,07	58641	4,613	65,93	61478	4,772
71,82	65478	4,997	71,70	70584	5,284
76,00	80478	5,839	75,87	82417	5,948
93,78	93345	6,562	93,65	87826	6,252
116,73	99488	6,907	98,27	71209	5,319
120,70	98747	6,866	102,53	67023	5,084
123,63	93255	6,557	116,58	93687	6,581
128,00	75613	5,566	120,57	87510	6,234
139,78	87755	6,248	123,48	90525	6,404
162,70	95450	6,680	127,85	71017	5,308
			139,63	83616	6,016
			162,55	91411	6,454

10mM de metilamina					
REATOR (1)			REATOR (2)		
Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)	Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)
0,00	1225	1,387	0,00	1240	1,388
5,15	3048	1,490	5,07	3425	1,511
18,97	11480	1,963	18,88	10616	1,915
22,37	13637	2,085	22,32	11665	1,974
47,88	37991	3,453	47,80	38014	3,454
49,78	43429	3,758	49,73	38598	3,487
54,08	60317	4,707	54,00	52823	4,286
65,90	68741	5,180	65,85	62478	4,828
71,65	75847	5,579	71,58	75471	5,558
75,82	87417	6,229	75,73	89478	6,345
93,65	91730	6,471	93,60	109526	7,471
98,23	108185	7,396	98,17	108506	7,414
102,47	103514	7,133	102,40	108905	7,436
116,52	145638	9,500	116,45	144579	9,440
120,53	186685	11,806	120,45	135162	8,911
123,43	138750	9,113	123,35	139513	9,156
127,80	107794	7,374	127,72	110341	7,517
139,58	126662	8,434	139,50	126694	8,436
162,48	138756	9,113	162,42	135841	8,949

20mM de metilamina					
REATOR (1)			REATOR (2)		
Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)	Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)
0,00	2815	0,290	0,00	4933	1,596
5,08	6133	0,476	4,85	6021	1,657
18,90	15638	1,010	18,68	14537	2,135
22,33	17022	1,088	22,23	14044	2,107
43,30	38339	2,286	42,98	36267	3,356
47,85	39673	2,361	47,55	37678	3,435
51,22	47258	2,787	50,88	43107	3,740
54,05	58761	3,433	53,73	57725	4,561
65,87	70154	4,073	65,63	70147	5,259
71,62	86214	4,975	71,42	98745	6,866
75,75	107485	6,170	75,53	116845	7,882
93,68	137700	7,867	93,42	124426	8,308
98,20	153230	8,740	97,98	140486	9,210
102,40	142625	8,144	102,17	154709	10,009
116,67	260015	14,738	116,43	248804	15,295
120,42	240165	13,623	120,22	231647	14,331
123,35	251212	14,244	123,13	239550	14,775
127,72	199220	11,323	127,48	180383	11,452
139,53	226686	12,866	139,27	217752	13,551
162,42	240029	13,616	162,18	233317	14,425

30mM de metilamina					
REATOR (1)			REATOR (2)		
Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)	Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)
0,00	1658	1,412	0,00	811	1,364
4,63	2789	1,475	4,77	3495	1,515
18,48	11379	1,958	18,63	12644	2,029
21,87	13025	2,050	22,08	14044	2,107
42,82	32529	3,146	42,97	34906	3,279
47,38	34292	3,245	47,55	37335	3,416
50,85	39481	3,536	51,00	43708	3,774
53,60	52966	4,294	53,75	52030	4,241
65,45	65478	4,997	65,62	70145	5,259
71,22	76547	5,619	71,38	89478	6,345
75,35	89847	6,366	75,52	120147	8,068
93,28	109287	7,458	93,43	125281	8,356
97,80	125812	8,386	97,93	143600	9,385
101,95	134267	8,861	102,08	154170	9,979
116,23	273276	16,670	116,43	300261	18,186
120,00	293314	17,796	120,62	321295	19,368
122,93	332615	20,003	123,07	338832	20,353
127,35	271384	16,564	127,42	261651	16,017
139,05	314972	19,012	139,20	306135	18,516
161,97	338659	20,343	162,10	324982	19,575

50mM de metilamina					
REATOR (1)			REATOR (2)		
Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)	Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)
0,00	1315	1,392	0,00	2103	1,437
18,48	11451	1,962	4,55	5549	1,630
21,95	13033	2,051	18,67	698	1,358
42,80	31675	3,098	42,75	14758	2,148
47,37	32936	3,169	47,32	17114	2,280
50,87	37844	3,444	50,87	20357	2,462
53,57	50842	4,175	53,52	19970	2,440
65,47	70458	5,277	65,42	25478	2,750
71,23	78254	5,714	71,22	34911	3,280
75,37	85478	6,120	75,35	56789	4,509
93,25	99714	6,920	93,22	71031	5,309
97,78	106499	7,301	97,75	80691	5,851
101,90	120341	8,079	101,88	87444	6,231
116,25	244277	15,041	116,40	181663	11,524
120,47	256820	15,746	120,42	190244	12,006
122,88	287491	17,469	122,83	218542	13,595
127,28	238067	14,692	127,23	190441	12,017
139,02	394035	23,454	138,97	309712	18,717
146,97	456471	26,961	146,93	402566	23,933
161,93	519322	30,492	161,88	496494	29,210
170,17	640004	37,271	170,12	617325	35,997
175,25	493310	29,031	175,18	641951	37,381
186,63	504691	29,670	186,55	479432	28,251

75mM de metilamina					
REATOR (1)			REATOR (2)		
Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)	Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)
0,00	3430	1,511	0,00	1410	1,398
3,33	7641	1,748	3,28	2939	1,484
17,05	16871	2,266	17,02	12459	2,018
20,52	18157	2,338	20,48	13808	2,094
41,42	36114	3,347	41,38	30368	3,024
46,00	36225	3,353	45,98	26728	2,820
49,52	38009	3,454	49,47	31801	3,105
51,45	41167	3,631	51,78	34606	3,262
64,07	63147	4,866	64,05	54784	4,396
69,88	81478	5,896	69,85	65884	5,020
74,02	97665	6,805	73,98	98441	6,848
90,82	123290	8,244	90,85	104770	7,204
99,77	86762	6,192	99,78	66581	5,059
114,35	180833	11,477	114,28	157499	10,166
119,10	184886	11,705	119,03	164077	10,536
121,47	203556	12,753	121,43	181831	11,533
125,88	181507	11,515	125,82	153572	9,946
137,62	264592	16,182	137,57	236130	14,583
145,60	341788	20,519	145,55	318744	19,224
160,53	482491	28,423	160,47	434720	25,739
168,77	704036	40,868	168,72	642534	37,414
173,82	803761	46,471	173,80	526723	30,908
185,23	741479	42,972	185,20	423183	25,091
188,68	738571	42,809			
191,38	729841	42,318			
196,55	721547	41,852			

90mM de metilamina					
REATOR (1)			REATOR (2)		
Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)	Tempo (h)	Área Cromatográfica do Metano	Concentração de Metano no headspace (mmol/L)
0,00	896	1,369	0,00	19871	2,435
3,20	3612	1,521	3,08	18759	2,372
16,93	11852	1,984	16,82	30067	3,008
20,43	13762	2,092	20,30	30806	3,049
41,28	30619	3,039	41,15	50834	4,174
45,90	30317	3,022	49,25	59986	4,688
49,38	35891	3,335	51,17	73434	5,444
51,30	33777	3,216	63,85	88774	6,305
63,97	56478	4,491	69,63	105477	7,244
69,77	73147	5,428	73,80	139784	9,171
73,92	92488	6,514	90,65	162906	10,470
90,78	108293	7,402	99,60	126042	8,399
99,73	126018	8,398	114,08	242804	14,958
114,23	185958	11,765	118,82	250525	15,392
118,93	172138	10,989	121,20	277650	16,916
121,33	188250	11,894	125,60	228586	14,160
125,73	162247	10,433	137,37	364516	21,796
137,48	253207	15,543	145,38	478113	28,177
145,50	361224	21,611	160,25	649785	37,821
160,38	457541	27,021	168,48	881863	50,858
168,62	664091	38,625	173,57	924013	53,226
173,72	545039	31,937	185,00	681143	39,582
185,12	526367	30,888	187,52	574147	33,572
187,92	450147	26,606			

APÊNDICE 2 – Determinação da velocidade máxima de produção de metano nos reatores anaeróbios em batelada alimentados com metilamina

5mM			
Reator (1)		Reator (2)	
Tempo (h)	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)	Tempo (h)	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)
0,0	0,01038	0,0	0,00941
2,8	0,0113	2,8	0,01046
5,5	0,01329	5,5	0,01278
8,3	0,01559	8,3	0,01555
11,0	0,01823	11,0	0,01886
13,8	0,02125	13,8	0,02276
16,5	0,02466	16,5	0,0273
19,3	0,02848	19,3	0,03253
22,1	0,03271	22,0	0,03845
24,8	0,03733	24,8	0,045
27,6	0,04229	27,6	0,05208
30,3	0,04752	30,3	0,0595
33,1	0,05291	33,1	0,06697
35,8	0,0583	35,8	0,07414
38,6	0,06352	38,6	0,08057
41,4	0,06836	41,3	0,08583
44,1	0,0726	44,1	0,08952
46,9	0,07603	46,8	0,09132
49,6	0,07846	49,6	0,09108
52,4	0,07976	52,3	0,08882
55,2	0,07983	55,1	0,08474
57,9	0,07868	57,9	0,07917
60,7	0,07638	60,6	0,07252
63,4	0,07306	63,4	0,06525
66,2	0,06891	66,1	0,05776
68,9	0,06413	68,9	0,0504
71,7	0,05894	71,6	0,04343
74,5	0,05356	74,4	0,03701
77,2	0,04816	77,1	0,03126
80,0	0,04291	79,9	0,02619
82,7	0,03791	82,7	0,0218
85,5	0,03325	85,4	0,01804
88,2	0,02897	88,2	0,01487
91,0	0,0251	90,9	0,0122
93,8	0,02164		
96,5	0,01857		
99,3	0,01589		
102,0	0,01355		
104,8	0,01152		
107,5	0,00978		
110,3	0,00828		
113,1	0,007		
115,8	0,00591		
118,6	0,00499

Velocidade máxima de formação de metano.

10mM			
Reator (1)		Reator (2)	
Tempo (h)	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)	Tempo (h)	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)
0,0		0,0	
2,8	0,0223	2,8	0,01556
5,5		5,5	
8,3	0,02705	8,3	0,01998
	0,0297	11,0	0,02258
13,8	0,03254	13,8	0,02546
16,5	0,03557	16,5	0,02863
19,3	0,03879	19,3	0,0321
22,0		22,0	0,03589
24,8	0,04572	24,8	0,03998
27,5	0,0494		0,04436
30,3	0,05318	30,3	0,04901
33,0	0,05704	33,0	
35,8	0,06093		
38,6	0,0648	38,5	0,06411
	0,06859	41,3	
	0,07224	44,0	0,07437
46,8	0,0757	46,8	0,07925
49,6	0,0789	49,6	0,0838
	0,08176	52,3	0,
55,1	0,08424	55,1	
		57,8	0,09423
60,6	0,08779	60,6	0,09625
63,3	0,08879	63,3	
66,1	0,08922	66,1	0,09761
			0,09691
71,6	0,08839	71,6	0,09532
		74,3	0,09289
77,1	0,08538	77,1	0,0897
79,9		79,8	0,08587
82,6	0,08047	82,6	0,08152
88,1	0,07412	88,1	0,07178
93,6	0,06683	93,6	0,06145
99,1	0,	99,1	0,05136
101,9	0,05524	101,9	0,0466
104,6	0,05141	104,6	0,04208

Velocidade máxima de formação de metano.

20mM			
Reator (1)		Reator (2)	
Tempo (h)	Fo _o Metano (mmol/L.h)	Tempo (h)	Fo _o Metano (mmol/L.h)
0,0	0,00954	0,0	0,01311
	0,01021	2,7	0,01396
5,5		5,5	0,01575
8,3	0,01331	8,2	
11,0	0,01517	11,0	0,02002
13,8	0,01728	13,7	0,02253
16,5	0,01967		0,02533
19,3	0,02237	19,2	0,02845
	0,0254	22,0	0,03189
24,8		24,7	0,0357
27,5	0,03262	27,5	
30,3	0,03687	30,2	0,04448
33,0	0,04159	33,0	0,04949
35,8	0,04681		0,05492
38,5	0,05255	38,5	0,06077
	0,05883	41,2	0,06704
44,0		44,0	0,07371
46,8	0,07301	46,7	
49,6	0,08087	49,5	0,08806
52,3	0,08919	52,2	0,09562
55,1	0,09789		0,10333
57,8	0,10688	57,7	0,11108
	0,11602	60,5	0,11873
63,3		63,2	0,12614
66,1	0,13413	66,0	
68,8	0,1427	68,7	0,13962
71,6	0,15066	71,5	0,14536
	0,15779		0,15022
77,1	0,16386	77,0	0,15406
	0,16869	79,7	0,15678
82,6		82,5	0,15827
85,3	0,17395	85,2	
88,1	0,17421	88,0	0,15746
90,8	0,17284	90,7	0,15518
93,6	0,16991		0,15173
96,4	0,16552	96,2	0,14722
	0,15982	99,0	0,14178
101,9		101,7	0,13556
104,6	0,14527	104,5	
107,4	0,13687	107,2	0,12143

Velocidade máxima de formação de metano.

30mM			
		Reator (2)	
Tempo (	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)	Tempo (	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)
0,0	5,11147E-4	0,0	0,00354
2,7	5,70753E-4	2,7	85
5,5	2E-4	5,5	52
8,2	1E-4	8,2	53
11,0	07	11,0	21
13,7	32	13,7	29
16,5	0,00163	16,5	54
19,2	01	19,2	0,01
22,0	47	22,0	71
24,7	05	24,7	71
27,5	75	27,5	03
30,2	62	30,2	74
32,9	69	33,0	88
35,7	0,00701	35,7	552
38,4	863	38,5	0,02973
41,2	61	41,2	59
43,9	04	44,0	017
46,7	01	46,7	656
49,4	64	49,5	86
52,2	06	52,2	14
54,9	0,02943	54,9	47
57,7	93	57,7	0,08194
60,4	76	60,4	57
63,1	15	63,2	38
65,9	34	65,9	33
68,6	56	68,7	34
71,4	04	71,4	25
74,	0,11093	74,	0,16783
76,	0,13134	76,	0,18476
79,	0,1542	79,	0,20163
82,4	0,17926	82,4	0,21796
85,	0,20603	85,2	32
87,	0,23372	87,	0,2468
90,	0,26122	90,	0,25817
93,	0,28718	93,	0,26681
96,	0,31005	96,	0,27231
98,8	0,32826	98,9	0,2744
101,6	0,34043	101,7	0,27297
104,3	0,34557	104,4	0,26809
107,1	0,34325	107,2	0,26
109,8	0,33367	109,9	0,2491
112,6	0,31762	112,6	0,23588
115,3	0,29635	115,4	0,22089
118,0	0,27139	118,1	0,20472

Velocidade máxima de formação de metano.

50mM			
Reator (1)		Reator (2)	
Tempo (h)	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)	Tempo (h)	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)
0,0	0,00121	0,0	6,57911E-4
3,2	0,00133	3,2	7,25905E-4
6,3	0,0016	6,3	8,75933E-4
9,5	0,00192	9,5	0,00106
12,7	0,00231	12,6	0,00128
15,8	0,00277	15,8	0,00154
19,0	0,00333	19,0	0,00186
22,1	0,004	22,1	0,00224
25,3	0,00481	25,3	0,0027
28,5	0,00577	28,5	0,00326
31,6	0,00693	31,6	0,00393
34,8	0,00831	34,8	0,00474
38,0	0,00997	37,9	0,00571
41,1	0,01196	41,1	0,00689
44,3	0,01434	44,3	0,0083
47,4	0,01718	47,4	0,01
50,6	0,02057	50,6	0,01204
53,8	0,02461	53,8	0,0145
56,9	0,02941	56,9	0,01744
60,1	0,03511	60,1	0,02097
63,3	0,04186	63,2	0,0252
66,4	0,04982	66,4	0,03025
69,6	0,05919	69,6	0,03628
72,8	0,07015	72,7	0,04345
75,9	0,08293	75,9	0,05196
79,1	0,09771	79,0	0,06201
82,2	0,1147	82,2	0,07385
85,4	0,13405	85,4	0,08772
88,6	0,15586	88,5	0,10387
91,7	0,18014	91,7	0,12253
94,9	0,20676	94,9	0,14393
98,1	0,23544	98,0	0,1682
101,2	0,26569	101,2	0,19539
104,4	0,2968	104,3	0,22541
107,5	0,32782	107,5	0,25797
110,7	0,35759	110,7	0,29257
113,9	0,38478	113,8	0,32839
117,0	0,40804	117,0	0,36437
120,2	0,42604	120,2	0,39914
123,4	0,4377	123,3	0,43114
126,5	0,44229	126,5	0,45872
129,7	0,43949	129,6	0,48029
132,9	0,42949	132,8	0,49449
136,0	0,41294	136,0	0,50039
139,2	0,39085	139,1	0,49758
142,3	0,36448	142,3	0,48625
145,5	0,33522	145,4	0,46717
148,7	0,30439	148,6	0,44155

75mM			
Reator (1)		Reator (2)	
Tempo (h)	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)	Tempo (h)	Velocidade de Formação do Metano (mmol/L.h)
0,0	4,60383E-4	0,0	3,11119E-4
3,3	5,0985E-4	3,3	3,46782E-4
6,7	6,19409E-4	6,7	4,26282E-4
10,0	7,52496E-4	10,0	5,23997E-4
13,3	9,14157E-4	13,3	6,44098E-4
16,7	0,00111	16,7	7,91704E-4
20,0	0,00135	20,0	9,73105E-4
23,3	0,00164	23,3	0,0012
26,7	0,00199	26,7	0,00147
30,0	0,00242	30,0	0,00181
33,3	0,00294	33,3	0,00222
36,6	0,00357	36,6	0,00273
40,0	0,00433	40,0	0,00335
43,3	0,00526	43,3	0,00412
46,6	0,00638	46,6	0,00506
50,0	0,00774	50,0	0,00621
53,3	0,0094	53,3	0,00762
56,6	0,0114	56,6	0,00935
60,0	0,01382	60,0	0,01148
63,3	0,01675	63,3	0,01407
66,6	0,0203	66,6	0,01724
70,0	0,02457	70,0	0,02112
73,3	0,02973	73,3	0,02584
76,6	0,03594	76,6	0,03158
80,0	0,04339	80,0	0,03855
83,3	0,05233	83,3	0,04697
86,6	0,063	86,6	0,05713
89,9	0,07571	89,9	0,06933
93,3	0,09077	93,3	0,08388
96,6	0,10854	96,6	0,10114
99,9	0,12935	99,9	0,12144
103,3	0,15356	103,3	0,14509
106,6	0,18146	106,6	0,17231
109,9	0,21327	109,9	0,20319
113,3	0,24906	113,3	0,2376
116,6	0,28869	116,6	0,27515
119,9	0,33175	119,9	0,31507
123,3	0,37748	123,3	0,35615
126,6	0,42471	126,6	0,39679
129,9	0,47185	129,9	0,43498
133,3	0,51693	133,3	0,46849
136,6	0,5577	136,6	0,49509
139,9	0,59185	139,9	0,51281
143,2	0,61719	143,2	0,52025
146,6	0,63199	146,6	0,5168
149,9	0,63519	149,9	0,50276
153,2	0,62655	153,2	0,47923
156,6	0,6067	156,6	0,44802
159,9	0,57705	159,9	0,41129

Velocidade máxima de formação de metano.

90mM			
Reator (1)		Reator (2)	
0,0	6,21518E-4	0,0	0,00234
3,2	6,8523E-4	3,2	0,00255
6,4	8,25704E-4	6,4	0,00298
9,6	9,94942E-4	9,5	0,0035
12,7	0,0012	12,7	0,0041
15,9	0,00144	15,9	0,0048
19,1	0,00174	19,1	0,00562
22,3	0,0021	22,2	0,00659
25,5	0,00253	25,4	0,00772
28,7	0,00304	28,6	0,00904
31,9	0,00366	31,8	0,01058
35,0	0,00441	35,0	0,01238
38,2	0,00531	38,1	0,01448
41,4	0,00639	41,3	0,01693
44,6	0,00769	44,5	0,01979
47,8	0,00926	47,7	0,02312
51,0	0,01113	50,9	0,02699
54,1	0,01338	54,0	0,03149
57,3	0,01607	57,2	0,0367
60,5	0,0193	60,4	0,04273
63,7	0,02316	63,6	0,04969
66,9	0,02776	66,7	0,0577
70,1	0,03323	69,9	0,0669
73,3	0,03974	73,1	0,07742
76,4	0,04745	76,3	0,08939
79,6	0,05654	79,5	0,10296
82,8	0,06723	82,6	0,11825
86,0	0,07973	85,8	0,13535
89,2	0,09425	89,0	0,15434
92,4	0,11101	92,2	0,17524
95,6	0,13019	95,3	0,19799
98,7	0,15189	98,5	0,22245
101,9	0,17616	101,7	0,24839
105,1	0,20291	104,9	0,27543
108,3	0,23187	108,1	0,30307
111,5	0,26257	111,2	0,33068
114,7	0,29432	114,4	0,3575
117,8	0,32615	117,6	0,38266
121,0	0,35686	120,8	0,40525
124,2	0,3851	124,0	0,42436
127,4	0,40942	127,1	0,43917
130,6	0,42844	130,3	0,44898
133,8	0,44097	133,5	0,45333
137,0	0,4462	136,7	0,45199
140,1	0,44378	139,8	0,44504
143,3	0,43386	143,0	0,43281
146,5	0,41712	146,2	0,41588
149,7	0,3946	149,4	0,39503
152,9	0,36763	152,6	0,37111
156,1	0,33766	155,7	0,34507
159,3	0,3061	158,9	0,31778

Velocidade máxima de formação de metano.

ANEXO 1 – Curva de Calibração do Metano