UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

CAROLINA IBELLI BIANCO

**Caracterização da comunidade procarionte presente no tratamento anaeróbico da fração
orgânica dos resíduos sólidos urbanos em conjunto com serragem e lodo de esgoto**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos – SP

2015

CAROLINA IBELLI BIANCO

Caracterização da comunidade procarionte presente no tratamento anaeróbio da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos em conjunto com serragem e lodo de esgoto

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 Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Professor Associado Valdir Schalch

São Carlos – SP

2015

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

I578c Ibelli Bianco, Carolina
Caracterização da comunidade procarionte presente no tratamento anaeróbico da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos em conjunto com serragem e lodo de esgoto / Carolina Ibelli Bianco; orientador Valdir Schalch. São Carlos, 2015.

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, 2015.

1. biometanização mesofílica . 2. diversidade microbiana . 3. inoculação. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **CAROLINA IBELLI BIANCO**.

Título da dissertação: "Caracterização da comunidade procarionte presente no tratamento anaeróbio da fração orgânica dos resíduos sólidos urbano em conjunto com serragem e lodo de esgoto".

Data da defesa: 02/10/2015

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Valdir Schalch (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof. Dr. **Ronan Cleber Contrera**
(Escola Politécnica/EP-USP)

Aprovado

Profa. Dra. **Taís Maria Bauab**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Aprovado

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

*Dedico este trabalho a minha família,
por fornecerem a essência para que eu
me tornasse a pessoa que sou.*

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, por durante essa trajetória me proporcionar o encontro com pessoas e a vivência de experiências que me conectaram mais comigo mesma, com os outros, com o ambiente;

Aos meus pais, Silvia Helena Ibelli Bianco e João Carlos Bianco, pelo amor incondicional e dedicação com que cuidaram e cuidam de mim, pelos valores ensinados e por me concederem a mais valiosa oportunidade: a de estudar. Aos meus irmãos, Camila e Matheus, os melhores companheiros, conselheiros e ouvintes com os quais a vida me presenteou;

Ao meu orientador Professor Valdir Schalch, pela oportunidade de desenvolver este mestrado, por me apresentar a um tema (digestão anaeróbia) tão desafiante e inspirador, por confiar no meu trabalho e por ser um exemplo de profissional e de ser humano;

Às minhas amigas, Fernanda Resende Vilela e Júlia Inforzato Guermandi: tive o prazer de conhecê-las nesta jornada e de compartilharmos muito mais que nossas pesquisas em equipe. Temos diversas histórias para contar desse mestrado e uma amizade que quero levar para a vida;

À minha amiga Amanda Borges Ribeiro, pela ótima companhia em todos os momentos em que estivemos juntas: também quero levar esta amizade para a vida;

Ao Alcino de Paula, por toda presteza, alegria e entusiasmo com que nos ajudou do início ao fim dessa pesquisa: pelas ideias, esclarecimentos, contatos e pela montagem e desmontagem dos nossos reatores (sem ele este trabalho não seria possível!);

À Profa. Maria Bernadete A. Varesche Silva que, como coordenadora do Programa de Pós-graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento da EESC/USP, nos

disponibilizou a verba necessária advinda do PROEX para o desenvolvimento do nosso projeto;

Às meninas da contabilidade do SHS, Fernanda M. Struzziatto Machado e Flávia Gialorenço Canova, pela paciência em nos instruir quando à solicitação de verba e emissão de notas;

Aos estabelecimentos de São Carlos/SP que voluntariamente separaram e forneceram os resíduos sólidos orgânicos que utilizamos na pesquisa: Sacolão Recanto das Frutas, Escola Cemei Aracy Leite Pereira Lopes, restaurantes La Villa, Mamãe Natureza, Frei Damião, Tempero Manero e La Salute;

À Belarte Marcenaria pelo fornecimento da serragem e à Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho de São Carlos/SP pelo fornecimento do lodo de esgoto;

Ao pessoal do Laboratório de Saneamento da EESC/USP: Júlio Cesar Trofino, Maria Aparecida Peres Viudes (Cidinha), Paulo Fragiácomo, Sabrina Piazzzi de Andrade Marino, Bianca Aparecida Rodrigues da Silva e Aline Cristina Musetti, por todos os ensinamentos imprecindíveis para a execução das análises físico-químicas;

Às meninas do LPB da EESC/USP: Eloisa Pozzi, pela atenção e orientação quanto ao plano inicial do meu projeto e posteriormente pela ajuda com os exames de microscopia óptica; Isabel Kimiko Sakamoto, pela paciência e disponibilidade com que me ajudou na etapa da análise molecular; e Maria Angela Tallarico Adorno (Janja), pela ajuda com as análises cromatográfica e de ácidos graxos voláteis;

À Maria Teresa Hoffmann, por nos ajudar com a análise de fósforo e sempre nos receber com tanto carinho e atenção no LATAR;

Ao pessoal do Laboratório de Química da EESC/USP: Maria Diva Landgraf e alunos

Leandro Antunes e Darlan Silva, pela gentileza com a qual nos ajudaram na realização das análises de nitrogênio e COT;

Ao Wagner do LATAR, por nos auxiliar com os assuntos relacionados à medição de temperatura dos biometanizadores;

Ao Professor Ronan Cleber Contrera da Poli/USP, por mesmo distante, nos socorrer quando surgiram problemas, compartilhando conosco seus conhecimentos sobre a biometanização;

À Sá, Priscila, Rose, Cecília e Valderez, por estarem sempre dispostas a nos ajudar e a nos fornecer as informações que precisávamos;

Ao Tiago Palladino Delforno, por me auxiliar no início do projeto com a parte de biologia molecular;

Ao Felipe Pucci, por participar das discussões iniciais sobre o projeto e nos auxiliar no levantamento de materiais que seriam necessários;

Aos amigos Bruno Pessotto e Rodrigo Soares, por fornecerem lodo de esgoto de seus experimentos e pela companhia no laboratório;

Aos amigos de NEPER (Núcleo de Estudo e Pesquisa em Resíduos Sólidos) pela convivência: Rodrigo Eduardo Córdoba, Marco Aurélio de Castro, Victor Baldan, Caroline Michele Palamin, Juliana Argente Caetano, Yovana Barrera;

Aos amigos do CEFER: Regina, Rafa, Amanda, Omar, Fábio, Paula, Murilo e Evert pelos momentos de malhação, descontração, almoços e conversas;

Ao pessoal da sessão de transporte da EESC/USP, por disponibilizarem motorista e veículo para a coleta dos resíduos;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Não há uma única maneira de enxergar a vida, uma só perspectiva que valha, um absoluto no qual todas as culturas devem caber; pelo contrário, há infindáveis estradas, códigos intermináveis, uma constelação de possibilidades para cada acontecimento, cada reação, cada expressão de vida. O seu (o meu) é apenas um minúsculo lado da história.

Flávio Siqueira

Cabe ao homem compreender que o solo fértil onde tudo que se planta dá, pode secar; que o chão que dá frutos e flores, pode dar ervas daninhas; que a caça se dispersa e a terra da fartura pode se transformar na terra da penúria e da destruição. O homem precisa entender que da sua boa convivência com a natureza depende sua subsistência, que a destruição da natureza é sua própria destruição, pois a natureza é a sua essência, a sua origem e o seu fim.

Elizabeth Jhin

RESUMO

BIANCO. C. I. **Caracterização da comunidade procarionte presente no tratamento anaeróbio da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos em conjunto com serragem e lodo de esgoto.** 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Na presente pesquisa, utilizou-se a técnica molecular de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) e microscopia óptica (contraste de fase e fluorescência) para caracterizar a comunidade procarionte estabelecida em quatro biometanizadores de 50 L e em três biometanizadores de 5 L, cujo substrato principal foi a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (FORSU) acrescida de serragem (12% nos biometanizadores de 50 L e 20% nos de 5 L) e lodo de esgoto (9% e 18% nos biometanizadores de 50 L; 40% e 60% nos de 5 L). Pela análise do perfil das bandas de DGGE, verificou-se uma alteração na estrutura da comunidade de bactérias presentes no chorume dos biometanizadores de 50 L entre 60 e 120 dias de operação, período caracterizado pelo acúmulo de ácidos graxos voláteis, consumo crescente de alcalinidade, queda de pH e aumento da demanda química de oxigênio, resultando na baixa remoção de sólidos totais voláteis e na ausência de metano no biogás. Pela análise de microscopia de fluorescência, não foram detectadas metanogênicas em nenhuma das amostras de chorume dos biometanizadores de 50 L, sendo que as principais morfologias e formas de agrupamento visualizadas foram: bacilo, diplobacilos, vibrião, espirilo, diplococos e cocos em cadeia. Os biometanizadores de 5 L, por serem inoculados com maiores proporções de lodo de esgoto do que os biometanizadores de 50 L, apresentaram um processo mais equilibrado. Um dos tratamentos de 5 L (ETE 2) obteve a maior similaridade para o domínio *Archaea* entre o digestato e o respectivo inóculo, demonstrando a adaptação das arqueas exógenas ao substrato principal (FORSU), sendo esse o único tratamento para o qual detectou-se metano no biogás. Os resultados sugeriram que monitorar a comunidade microbiana que se desenvolve e atua no processo de biometanização pode trazer maior sensibilidade e especificidade na detecção e confirmação de instabilidades do sistema, garantindo intervenções somente quando necessário.

Palavras-chave: biometanização mesofílica, diversidade microbiana, inoculação.

ABSTRACT

BIANCO. C. I. **Characterization of the prokaryotic community present in the anaerobic treatment of the organic fraction of municipal solid wastes in conjunction with sawdust and sewage sludge.** 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

This dissertation addresses the use of the molecular technique of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and light microscopy (phase contrast and fluorescence) for the characterization of the prokaryotic community established in four 50 L reactors and in three 5 L reactors whose main substrate was the organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW) plus sawdust (12% in 50 L reactors and 20% in 5 L reactors) and sewage sludge (9% and 18% in 50 L reactors; 40% and 60% in 5 L reactors). The analysis of the profile of DGGE bands revealed a change in the structure of the bacterial community present in the slurry of 50 L reactors between 60 and 120 days of operation, a period characterized by the accumulation of volatile fatty acids, increasing consumption of alkalinity, decrease in pH and increase in the chemical oxygen demand, which resulted in a lower removal of volatile total solids and absence of methane in the biogas. The fluorescence microscopy analysis detected no methanogenics in the slurry samples from 50 L reactors and the main morphologies and grouping forms displayed were bacillus, diplobacilos, vibrio, spirillum, diplococci and coconuts in chain. The 5 L reactors, inoculated with higher proportions of sewage sludge than the 50 L reactors, showed a more balanced process. One of the treatments (ETE 2) displayed the highest similarity for the *Archaea* domain between the digestato and the respective inoculum, which demonstrates the adaptation of the exogenous archaea to the main substrate (OFMSW). It was the only treatment in which methane was detected in the biogas. The results suggest the monitoring of the microbial community that develops and acts in the biomethanization process can provide higher sensitivity and specificity for the detection and confirmation of instability of the system and ensure interventions only when necessary.

Keywords: mesophilic biomethanization, microbial diversity, inoculation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de blocos representando a classificação dos resíduos sólidos segundo a origem, conforme a Lei nº 12.305/10.....	11
Figura 2 - Fluxograma da hierarquia a ser adotada quanto à gestão de resíduos sólidos.....	11
Figura 3 - Participação dos principais materiais no total de RSU coletado no Brasil em 2012 (56.561.856 toneladas).....	12
Figura 4 - Árvore filogenética universal construída a partir do sequenciamento comparativo da subunidade menor do gene RNAr (apenas alguns organismos-chave ou linhagens são apresentadas em cada domínio). LUCA corresponde ao ancestral universal comum mais antigo (<i>Last Universal Common Ancestor</i>).....	19
Figura 5 - Sequência metabólica e grupos microbianos envolvidos na biometanização da FORSU (com redução de sulfato).....	20
Figura 6 - A ocorrência do ciclo redox do carbono em ambientes óxicos e anóxicos: a figura diferencia os processos autotóxicos ($\text{CO}_2 \rightarrow$ compostos orgânicos) e heterotóxicos (compostos orgânicos $\rightarrow \text{CO}_2$). As setas amarelas indicam as oxidações e as vermelhas indicam as reduções.....	25
Figura 7 - Sequência de procedimentos experimentais básicos que antecedem algumas das técnicas moleculares mais comuns (caixas pontilhadas). A sequência marcada em vermelho corresponde aos procedimentos utilizados na presente pesquisa.....	41
Figura 8 - Tambor de leite de polietileno de alta densidade adaptado para funcionar como um biometanizador experimental. a) Adaptações e peças da tampa. b) Adaptações e peças do corpo.....	49
Figura 9 - Frasco de Mariotte utilizado na medição do volume de biogás produzido.....	50
Figura 10 - Aparato para a medição da temperatura nos biometanizadores. a) Termopar encapsado com espaguete termocontrátil inserido no centro da massa de resíduos. b) Termômetro digital e termopar tipo K.....	50
Figura 11 - Biometanizadores em operação.....	51
Figura 12 - Mapa com a delimitação em vermelho da Escola de Engenharia de São Carlos/USP e a localização dos pontos de coleta da FORSU.....	52
Figura 13 - Fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos antes e após a trituração.....	53
Figura 14 - Resíduos que compuseram o conteúdo afluente dos biometanizadores. a) FORSU triturada. b) serragem. c) lodo de esgoto de reator UASB.....	53
Figura 15 - Aspecto visual da massa de resíduos de cada biometanizador após o carregamento.....	55
Figura 16 - Exemplo de drenagem e recirculação do chorume nos biometanizadores de 50 L. a) Drenagem de todo o chorume do biometanizador. b) Recirculação do chorume após correção do pH com alcalinizante.....	56

Figura 17 - Biometanizadores de 5 L. a) Adaptação em “Y” feita na tampa para a saída e coleta de biogás e para a entrada de substâncias. b) Biometanizador conectado ao aparato de Mariotte utilizado para a medição do volume de biogás produzido.....	57
Figura 18 - Estufa mantida com temperatura interna de 30°C por meio de duas lâmpadas de 60 W...	58
Figura 19 - Lodo granulado de reator UASB utilizado no biometanizador de 5 L DACAR	59
Figura 20 - Aspecto do resíduo afluyente dos biometanizadores de 5 L.....	60
Figura 21 - Esquema sobre quando foram realizadas as coletas nos biometanizadores de 50 L e de 5L, o que foi coletado e qual a análise realizada para cada amostra.....	61
Figura 22 - Amostras de chorume dos quatro reatores centrifugadas e indicação do <i>pellet</i> formado ..	62
Figura 23 - Procedimento geral de preparo da lâmina para microscopia de contraste de fase. 1) Camada de ágar para fixação da amostra. 2) Gota de amostra sobre o ágar seco. 3) Recobrimento com lamínula	62
Figura 24 - <i>Pellet</i> obtido após a centrifugação de chorume para a extração de DNA.....	63
Figura 25 - Preparo da amostra sólida (digestato) para a extração de DNA. a) Digestato obtido após a abertura dos biometanizadores de 50 L. b) Mistura de 70 g de digestato com 50 mL de água destilada. c) Coação da mistura. d) Detalhe da separação da fração sólida e da líquida da mistura. e) Fração líquida pronta para ser centrifugada. f) <i>Pellet</i> obtido após a centrifugação	64
Figura 26 - Detalhes dos componentes do <i>Kit Power Soil DNA Isolation</i> utilizado para a extração de DNA das amostras. a) Soluções químicas utilizadas em sequência. b) Tubo <i>PowerBead</i> contendo as <i>beads</i> e uma solução tampão. c) Tubo <i>Spin Filter</i> dotado de um compartimento com membrana que é removível após a eluição do DNA.....	67
Figura 27 - Injeção dos géis <i>low</i> e <i>high</i> no espaço entre as placas de vidro.....	71
Figura 28 - Detalhe do molde inserido no gel para a formação dos poços.....	71
Figura 29 - Câmara eletroforética com TAE 50X e água Milli-Q.....	72
Figura 30 - Concentração de DNA total extraído ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) das amostras de chorume dos biometanizadores de 50 L em três diferentes tempos de operação.....	79
Figura 31 - Concentração de DNA total extraído ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) das amostras de digestato dos biometanizadores de 5 L (operados por 78 dias) e dos biometanizadores de 50 L (operados por 150 dias)	79
Figura 32 - Gel de agarose 0,8% referente ao DNA extraído das amostras de chorume, digestato e inóculos, a fim de quantificar visualmente e verificar a integridade do DNA extraído	80
Figura 33 - Gel de agarose 1,2% referente aos produtos da PCR para os domínios <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> das amostras de chorume, digestato e inóculos	82
Figura 34 - Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') da comunidade de bactérias presente nas amostras de chorume e digestato dos biometanizadores de 50 L. Na referência das amostras, o	

primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”83

Figura 35 - Perfil de bandas da DGGE de fragmentos amplificados por PCR do gene RNAr 16S dos domínios *Archaea* e *Bacteria*. As amostras são os inóculos (lodos ETE e DACAR) e os digestatos dos biometanizadores de 50 L (1_D; 2_D; 3_D e 4_D) e de 5 L (ETE 1; ETE 2 e DACAR)84

Figura 36 - Análise de *Cluster* (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de RNAr 16S para o domínio *Bacteria* das amostras de chorume e de digestato dos biometanizadores de 50 L. Na referência de cada perfil (à direita), o primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”86

Figura 37 - Perfil de bandas da DGGE de fragmentos amplificados por PCR do gene RNAr 16S do domínio *Bacteria*. As amostras são chorume de três tempos de operação distintos e digestato dos biometanizadores de 50 L. Na referência de cada perfil, o primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”. As setas indicam as bandas mencionadas na discussão87

Figura 38 - Concentração (mg.L^{-1}) dos principais produtos intermediários (ácidos graxos voláteis - acético, propiônico e butírico; e álcool - etanol) gerados nos biometanizadores de 50 L durante o período de operação (150 dias). As setas em vermelho indicam as coletas de chorume para análise microbiológica.....88

Figura 39 - Gráficos dos parâmetros pH e alcalinidade referentes ao chorume dos biometanizadores de 50 L durante o período de operação (150 dias). As setas em vermelho indicam as coletas de chorume para análise microbiológica.....90

Figura 40 - Representação gráfica da DQO presente no chorume dos biometanizadores de 50 L ao longo do período de operação (150 dias). As setas em vermelho indicam as coletas de chorume para análise microbiológica.....91

Figura 41 - Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') da comunidade de arqueas presente nas amostras de inóculos (lodos ETE e DACAR), de digestato dos biometanizadores 2 e 3 (2_D e 3_D) e de digestato dos biometanizadores de 5L (ETE 1, ETE 2 e DACAR).....93

Figura 42 - Representação gráfica da concentração (em %) dos gases que compuseram o biogás dos biometanizadores de 50 L (2 e 3) e dos biometanizadores de 5 L (DACAR, ETE 1 e ETE 2) durante o período de operação de 150 e 78 dias, respectivamente.....93

Figura 43 - Análise de *Cluster* (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de RNAr 16S para o domínio *Archaea* das amostras de inóculos (lodo ETE e DACAR) e de digestato dos biometanizadores de 50 e 5L. Na referência de cada perfil (à direita), o primeiro número refere-se ao biometanizador – 2 ou 3 e a letra “D” representa “digestato”94

Figura 44 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 1 referente à 60 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Diplobacilos. b) Espirilo. c) Vibrião. d) Bacilo. e) Levedura (a indicação da seta mais larga propõe a comparação de tamanho entre uma célula procariótica e a levedura)	98
Figura 45 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 2 referente à 60 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Cocos em cadeia. b) Bacilo em forma de halteres. c) Bacilo. d) Levedura	99
Figura 46 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 3 referente à 60 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Diplococos. b) Cocos em cadeia. c) Vibrião. d) Bacilo delgado	100
Figura 47 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 4 referente à 60 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Levedura. b) Diplobacilos. c) Bacilo. d) Bacilos em cadeia. e) Vibrião. f) Cocos em cadeia	101
Figura 48 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 1 referente à 120 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Diplococos. b) Bacilo. c) Vibrião	102
Figura 49 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 2 referente à 120 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Esporo livre. b) Vibrião. c) Bacilo. d) Cocos em cadeia	103
Figura 50 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 3 referente à 120 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Bacilo. b) Espirilo. c) Vibrião. d) Cocos em arranjo irregular	104
Figura 51 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 4 referente à 120 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Forma microbiana flagelada. b) Diplobacilos. c) Vibrião. d) Bacilo. e) Vibrião com endósporo. f) Esporo livre.....	105
Figura 52 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 1 referente à 150 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Vibrião. b) Espirilo com endósporo. c) Bacilo. d) Diplobacilos. e) Bacilos em forma de halteres. f) Bacilos em cadeia. g) Bacilo delgado	106
Figura 53 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 2 referente à 150 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Cocos em cadeia. b) Diplobacilos. c) Espirilo. d) Micro-organismos organizados em paliçadas. e) Esporo livre. f) Levedura	107

Figura 54 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 3 referente à 150 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Vibrião delgado. b) Filamentosa. c) Bacilo com endósporo. d) Bacilos em cadeia. e) Diplobacilos. f) Bacilo108

Figura 55 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 4 referente à 150 dias de operação. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Micro-organismos organizados em paliçadas. b) Espirilo delgado. c) Espirilo. d) Bacilo com endósporo. e) Bacilo. f) Espiroqueta g) Diplobacilos109

Figura 56 - Microscopia de contraste de fase do inóculo proveniente do lodo de esgoto da ETE de São Carlos/SP. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Espirilo com endósporo. b) Sarcina. c) Cocos em cadeia. d) Diplobacilos. e) Cocobacilo. f) Espiroqueta. g) Vibrião. h) Bacilo. i) Espirilo. j) Diplococos110

Figura 57- Microscopia de fluorescência do inóculo proveniente do lodo de esgoto da ETE de São Carlos/SP. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Bacilo fluorescente. b) Massa microbiana fluorescente111

Figura 58 - Microscopia de contraste de fase do inóculo proveniente do lodo da avícola DACAR, Tietê/SP. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Bacilo. b) Vibrião. c) Bacilos organizados em paliçadas. d) Espirilo com endósporos. e) Diplobacilos. f) Vibrião delgado. g) Bacilo delgado112

Figura 59 - Microscopia de fluorescência do inóculo proveniente do lodo da avícola DACAR, Tietê/SP. 1 e 2) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. a) Bacilo fluorescente. b) Massa microbiana fluorescente113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados utilizados no cálculo da composição mássica do conteúdo afluyente de cada biometanizador	54
Tabela 2 - Composição em massa dos resíduos de entrada dos biometanizadores	54
Tabela 3 - Características dos resíduos de entrada dos biometanizadores de 50 L	54
Tabela 4 - Porcentagem de sólidos totais e sólidos totais voláteis presentes nos componentes das misturas afluentes dos biometanizadores de 5L	59
Tabela 5 - Caracterização dos biometanizadores de 5 L quanto à proporção de cada resíduo que compôs a massa afluyente	59
Tabela 6 - Valores de pH das misturas afluentes dos biometanizadores e as respectivas quantidades de alcalinizantes adicionadas antes da vedação	60
Tabela 7 - Características dos resíduos de entrada dos biometanizadores de 5 L	60
Tabela 8 - Massa (g) de <i>pellet</i> proveniente de chorume, digestato e inóculo pesadas dentro do tubo <i>PowerBead</i> e respectivos tempos de agitação no Vortex Adapter para a extração de DNA.....	68
Tabela 9 - Quantidade de cada componente constituinte da solução do gel gradiente desnaturante nas concentrações de 0, 45 e 65%	70
Tabela 10 - Componentes e suas respectivas quantidades utilizados no preparo dos géis 0, low e high	70
Tabela 11 - Concentração e pureza do DNA total extraído das amostras de chorume e digestato dos biometanizadores de 50 L e de 5 L e das amostras de inóculos	77
Tabela 12 - Porcentagem de remoção de sólidos totais voláteis (STV) dos biometanizadores de 50 L e 5 L comparando-se o valor do STV de entrada com o valor do STV de saída.....	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais inovações propostas pela PNRS e as respectivas deficiências de implantação ..	9
Quadro 2 – Principais configurações da tecnologia de biometanização	16
Quadro 3 - Algumas características que diferenciam os domínios <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	20
Quadro 4 - Conversões que ocorrem durante a hidrólise, respectivas exoenzimas e exemplos de bactérias hidrolíticas.....	21
Quadro 5 - Relação sintrófica exemplificada pela sequência de reações envolvidas na conversão de propionato em metano em um meio anaeróbio	26
Quadro 6 – Formas básicas mais comuns e respectivos arranjos celulares apresentados por procariotos	38
Quadro 7 - Comparação entre os métodos direto e indireto de extração de DNA aplicados ao estudo de procariotos	42
Quadro 8 - Características de cada uma das três etapas que constituem um ciclo de PCR	45
Quadro 9 - Exemplos de trabalhos que utilizaram o DGGE para analisar a comunidade microbiana presente em biometanizadores	48
Quadro 10 - Análises realizadas quinzenalmente para o monitoramento e controle da digestão anaeróbia	55
Quadro 11 - Simbologia criada para as amostras a fim de facilitar a apresentação dos dados. Na simbologia das amostras de chorume e digestato dos biometanizadores de 50 L, o primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”	65
Quadro 12 - Condições de tempo e temperatura que foram aplicadas em cada etapa da reação em cadeia da polimerase para os domínios <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	69

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 A produção de resíduos pelo homem: contexto histórico	4
3.2 FORSU sob a ótica da PNRS	10
3.3 Biometanização	14
3.3.1 Aspectos gerais	14
3.3.2 Condições operacionais	15
3.3.3 Inoculação.....	17
3.4 Microbiologia da biometanização	18
3.4.1 Sintrofia e termodinâmica.....	24
3.4.2 Fatores que afetam o crescimento microbiano	26
3.5 Diversidade microbiana.....	34
3.5.1 Microscopia óptica	35
3.5.2 Técnicas moleculares.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Biometanizadores experimentais.....	49
4.2 Coleta dos resíduos.....	51
4.3 Preparo dos resíduos e preenchimento dos reatores	52
4.4 Análises microbiológicas	61
4.4.1 Coleta das amostras	61
4.4.2 Microscopia óptica	61
4.4.3 PCR-DGGE	63
4.5 Análise dos resultados	73

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Isolamento do DNA genômico	75
5.2 Quantificação e pureza do DNA total	76
5.3 Análise dos produtos da PCR	81
5.4 Caracterização da comunidade microbiana dos biometanizadores.....	82
6 CONCLUSÕES.....	114
7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	115
REFERÊNCIAS	116
APÊNDICE – Folder para a orientação quanto à separação dos resíduos na fonte	130
ANEXO – Composição das soluções componentes do gel gradiente desnaturante.....	131

1 INTRODUÇÃO

A visão e a atitude do ser humano perante aos resíduos que gera são mutáveis ao longo do tempo. Considerar este fato torna-se importante para que sejamos flexíveis ao lidar com o tema e suas extensões, principalmente aquelas relacionadas à gestão e ao gerenciamento, pois o que ontem foi adequado, hoje pode não o ser e o que hoje se encontrou como alternativa mais pertinente, amanhã poderá ser uma prática inadmissível.

Este é um processo evolutivo, não somente no sentido de que no presente lidamos com o tema melhor (mais conscientes) do que no passado, mas sim no sentido de lidarmos da melhor forma que poderíamos frente às condições presentes.

No Brasil, dentre os resíduos sólidos urbanos (RSU) gerados diariamente, a fração orgânica compreende mais da metade em massa, sendo que normalmente é co-disposta com os demais tipos de resíduos em lixões e aterros sanitários. Um dos problemas inerentes a esse tipo de disposição inadequada é a geração de gases de efeito estufa (GEE) a partir da biodegradação da matéria orgânica.

A redução da emissão de GEE, além de ser uma diretriz expressa na Política Nacional sobre Mudança do Clima (PNMC) (Lei nº 12.187/2009; Art. 4º, II) (BRASIL, 2009), deve ser priorizada por meio de ações nacionais e de projetos previstos no Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), já que o Brasil é membro do grupo de países Partes Não-Anexo I¹ do Protocolo de Quioto (MOREIRA; GIOMETTI, 2008). Fortalecendo esse cenário de novas práticas, a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) (Lei nº 12.305/2010) proíbe o aterramento da matéria orgânica, incentivando o reaproveitamento dos resíduos sólidos, inclusive a recuperação e o aproveitamento energético (Art. 7º, XIV) através do desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias limpas, como forma de minimizar impactos ambientais (Art. 7º, IV) (BRASIL, 2010a).

Nesse contexto, o processo de biometanização da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos apresenta-se com uma alternativa pertinente, pois permite o tratamento da matéria orgânica em instalações adequadas e a recuperação de um dos principais gases de efeito estufa, o metano, que pode ser empregado como fonte complementar e renovável de energia

¹ **Partes Não-Anexo I:** agrega os países em desenvolvimento que não possuem compromissos de redução de gases de efeito estufa (dever restrito aos países Partes Anexo I), mas ficam obrigados a elaborar inventários nacionais de emissões de carbono.

(ABDELGADIR et al., 2014).

Entretanto, apesar da biometanização já ser aplicada em alguns países, principalmente da Europa, o tratamento de resíduos sólidos por esse processo ainda não é difundido, por ser considerado uma “caixa preta” (*black box*): ainda falta conhecimento que conecte a composição, dinâmica e atividade dos micro-organismos com o desempenho do biometanizador, o que impede a otimização do processo para o tratamento de resíduos sólidos orgânicos (SUPAPHOL et al., 2011; FRANKE-WHITTLE et al, 2014).

A eficiência e a estabilidade desse processo é totalmente dependente da ação combinada e sintrófica de micro-organismos pertencentes à diferentes grupos funcionais, que serão sub-aproveitados se não lhes for dada condições ideais de crescimento (pH e temperatura nas faixas ideais, nutrientes, ausência de compostos tóxicos, etc.) ou se houver problemas de difusão de substratos e produtos da solução para o interior das células (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

A presente pesquisa teve como objetivo caracterizar a diversidade microbiana de biometanizadores operados em batelada e à temperatura ambiente, tratando a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos em conjunto com diferentes proporções de serragem e lodo de esgoto. As ferramentas utilizadas no estudo da diversidade dos micro-organismos foram a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase seguida de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR/DGGE) e a técnica de microscopia de contraste de fase e de fluorescência. Foram analisadas amostras de chorume e de digestato (material sólido obtido pós-tratamento, com a abertura dos biometanizadores) de biometanizadores de 50 L e de 5 L, operados por 150 e 78 dias, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade da comunidade microbiana (domínios *Bacteria* e *Archaea*) presente na estabilização anaeróbia da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos em conjunto com diferentes proporções de serragem e lodo de esgoto, utilizando as técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)/DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e microscopia óptica.

2.2 Objetivos específicos

- Inferir sobre a diversidade microbiana presente nas frações sólida (digestato) e líquida (chorume) dos biometanizadores;
- Verificar a influência da co-digestão da FORSU com serragem e lodo (inóculo) sobre a comunidade microbiana;
- Caracterizar morfológicamente os micro-organismos dos biometanizadores por meio de microscopia óptica de contraste de fase;
- Identificar a presença de arqueas metanogênicas com microscopia de fluorescência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A produção de resíduos pelo homem: contexto histórico

Ao longo da sua existência, o ser humano tem lidado de diferentes formas com aquilo que sobra de suas atividades, podendo-se identificar, grosso modo, três fases marcantes (SISINNO, 2000; KLIGERMAN, 2000):

- 1ª fase – verifica-se a despreocupação do homem em relação aos resíduos gerados. Esta é a fase do nomadismo, sendo que pequenos grupos utilizavam os espaços até que estes não oferecessem mais abundância de recursos; o pouco de resíduo gerado era facilmente decomposto e incorporado ao ambiente devido a sua origem orgânica;
- 2ª fase – o homem passa a incomodar-se com os resíduos que se acumulam nos locais habitados, sofrendo com a deterioração das condições sanitárias e com a consequente disseminação de epidemias. Esta fase é caracterizada pela formação de grupos maiores, organizados e fixos em cidades, nas quais produzia-se grande quantidade e variedade de resíduos (além do resíduo urbano, aparece também o industrial, capaz de liberar no ambiente uma diversidade de substâncias químicas). A fim de afastar o que lhe incomodava, o homem passou a dispor seus resíduos, sem nenhum critério, em locais distantes das habitações, originando-se os lixões.
- 3ª fase – o ser humano manifesta preocupação sobre os resíduos gerados, não só por serem foco de problemas sanitários, mas por interferirem negativamente na qualidade ambiental, tanto pela disposição inadequada, quanto pela esgotabilidade das matérias-primas que lhes dão origem. A partir desta nova percepção, o homem tem adotado atitudes contra o desperdício (como a conservação dos alimentos,

reutilização e reciclagem), tem disposto os resíduos em locais construídos com sistemas de proteção e monitoramento ambientais (os aterros sanitários) e tem buscado a elaboração e a implantação de planos de gestão e gerenciamento integrado de resíduos.

Vale destacar a importante transição de consciência humana em relação às sobras de sua atividade a partir da substituição do termo “lixo”, antes empregado para se referir àquilo que era descartado e inútil, pelo termo “resíduos sólidos”. Assim, um novo sentido é atribuído ao “lixo”, pois o que não serve mais para quem descarta, pode ter potencial de transformar-se em insumo para um novo produto ou processo.

No Brasil, a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), promulgada pela Lei Federal 12.305 em 02 de agosto de 2010 e regulamentada pelo Decreto 7.404, em 23 de dezembro de 2010, traz em seu texto uma clara definição de resíduos sólidos e a sua diferença em relação aos rejeitos (termo este que mais se aproxima da ideia que dávamos ao que era denominado “lixo”):

resíduos sólidos: material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível (BRASIL, 2010a).

rejeitos: resíduos sólidos que, depois de esgotadas todas as possibilidades de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis, não apresentem outra possibilidade que não a disposição final ambientalmente adequada (BRASIL, 2010a).

Apesar da mudança de termos e da incipiente consciência, as ações humanas ainda resistem ao novo cenário, seja por carência de instrução, seja por agirmos conforme costumes arraigados na cultura. Exemplos disso estão bem próximos de nós: um deles é o de mantermos o termo “lixo” em nosso vocabulário cotidiano; o outro está no ato de ensacar nossos resíduos e os colocar da porta para fora de nossas casas traduzindo, segundo Wahba (1993), nossa ideia de “jogarmos fora” toda a imperfeição, de afastarmos tudo aquilo que incomoda, como se não tivéssemos responsabilidade alguma sobre o que geramos.

Na verdade, ignoramos nossa responsabilidade perante o que desperdiçamos como consequência da busca pelo conforto para o nosso corpo, pela existência do nosso corpo, sendo que o “lixo” gerado representa nossos excessos, aquilo que não cabe mais em nós (VALADARES, 2000). No trecho a seguir, Valadares (2000) estabelece, ainda, uma relação entre “lixo” e morte, que está presente no subconsciente humano:

O lixo, para a psicanálise, é imagem desse lugar temido que transforma o homem em depoimento, em testemunho de forma de viver e, mais ainda, aos poucos, custa-lhe a própria vida, pois o seu corpo será, também, o único traste que lhe sobra para ser apresentado como testemunho final de presença no mundo. O lixo nos lembra contínua, insistente e incomodadamente, pois, a nossa própria morte.

Algo nos falha no viver, no desfrute das graças do mundo, e essa falha

está em nosso caminho marcado naquilo que sobra, que não conseguimos aproveitar, e nos diz do nosso “mal-estar” e do “mal-estar” presente na cultura.

Desperdício é resultado direto de domínio e poder. O ser humano ultrapassou o limiar de convivência com a natureza ao tentar dominá-la por meio da tecnologia, vivendo como se fosse algo além dessa natureza e não parte integrante dela. Conforme Wahba (1993), o desperdício é a falência da proposta civilizatória da qual nos incumbimos; é o termômetro do nosso grau de construtividade.

Na contramão da natureza, que atua sob equilíbrio ao ciclar o que produz, o ser humano não está sendo capaz de resolver a questão dos seus resíduos, os quais aumentam em quantidade e complexidade, o que reflete, segundo Eigenheer (1993), uma sociedade doente, pois não consegue compreender sua própria dimensão e sentido.

De acordo com Wahba (1993), esta situação na qual nos encontramos (na qual nos colocamos) pode ser revertida pelo desenvolvimento de novas relações pautadas na transformação criativa, ou seja, aproveitarmos e valorizarmos os recursos disponíveis por meio da inovação, integrando o novo ao velho (desperdiçado).

Partindo-se da proposição de Wahba (1993), pode-se analisar a situação do Brasil perante o tema resíduos sólidos. Antes de adentrar no assunto, é válido ter em mente que o processo criativo leva a uma ideia inovadora, a qual terá sucesso se implantada com método. A criatividade é um estado de liberdade e de imaginação, estando restrita à geração de ideias, sem a preocupação em adequá-las ou aplicá-las (WECHSLER, 2011). Já a inovação surge quando se transforma a ideia em algo útil e com valor econômico, sendo que, para que seja atingido este objetivo, é necessário método (BOTELHO; CARRIJO; KAMSAKI, 2007).

A Lei nº 12.305/10, que implantou no Brasil a Política Nacional de Resíduos Sólidos,

foi sancionada após 21 anos de tramitação no Congresso Nacional e, apesar de constituir um marco regulatório que deve delimitar qualquer discussão e atividade na área de resíduos sólidos, não apresenta métodos claros para que as inovações propostas sejam implementadas (Quadro 1).

As prefeituras não possuem verba necessária para executar as mudanças propostas nem pessoal suficiente e qualificado para compor as equipes de trabalho. Atrelado a isso, a PNRS não fornece incentivos (fiscais, financeiros e creditícios) aos municípios para que estes iniciem e prossigam com as transformações previstas em lei. Há uma ineficiência quanto à implementação de prazos e quanto ao mecanismo de acompanhamento da implementação. Como consequências desse cenário, pode-se verificar os seguintes fatos:

- menos de 10% dos 5.570 municípios brasileiros elaboraram seus respectivos Planos de Gestão Integrada dentro do prazo estipulado (até 2012). A ausência de um plano dificulta o estabelecimento de metas e de indicadores de desempenho, não permite que haja controle e fiscalização, impossibilita soluções consorciadas face à economia de escala, bem como a criação de fontes de negócios com a valorização dos resíduos e a definição do cálculo para a cobrança dos serviços públicos, impedindo, ainda, o acesso do município aos recursos da União para empreendimentos e serviços relacionados à limpeza urbana e ao manejo de resíduos sólidos (SOLER, 2014);
- 60% dos municípios brasileiros não cumpriram a meta de eliminação dos lixões e de disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos até 8 de agosto de 2014, que foi o prazo final determinado pela lei (SOLER, 2014); assim, em 1 de julho de 2015, o Senado aprovou um projeto que estende até 31 de julho de 2018 o limite para a extinção dos lixões (contudo, esse projeto contém uma emenda do plenário

que escalona os prazos de acordo com o município, fazendo com que as datas limite variem entre 2018 e 2021) (SALOMÃO, 2015).

Quadro 1 - Principais inovações propostas pela PNRS e as respectivas deficiências de implantação

INOVAÇÃO	EM QUE CONSISTE	DEFICIÊNCIAS
Responsabilidade compartilhada	<p>Todos da sociedade são responsáveis pela gestão ambientalmente correta dos resíduos sólidos, de forma individualizada e encadeada.</p> <p><u>Cidadão:</u> deve repensar e rever seu papel como consumidor, sendo responsável pelo acondicionamento diferenciado e adequado dos resíduos que gera.</p> <p><u>Setor privado:</u> responsável pelo gerenciamento ambientalmente correto dos resíduos sólidos, pela sua reincorporação na cadeia produtiva e pelas inovações nos produtos que tragam benefícios socioambientais, sempre que possível.</p> <p><u>Governos federal, estadual e municipal:</u> responsáveis pela elaboração e implementação dos planos de gestão de resíduos sólidos e dos demais instrumentos previstos na PNRS, sem negligenciar nenhuma das inúmeras variáveis envolvidas na discussão sobre resíduos sólidos (BRASIL, 2010a).</p>	<p>A PNRS não indica quem deve pagar pelos custos da coleta seletiva domiciliar e quem são os responsáveis pelos efeitos indesejáveis do produto pós-consumo;</p> <p>Há uma carência de investimento em educação ambiental, a fim de tornar esta responsabilidade um ato natural e não uma obrigação;</p> <p>Desmotivação das partes envolvidas em cumprir suas funções pela ineficiência ou ausência de coleta seletiva;</p> <p>Ausência de Pontos de Entrega Voluntária (PEVs) e, quando existem, há pouca divulgação.</p>
Sistema Nacional de Informações sobre a Gestão dos Resíduos Sólidos (SINIR)	<p>É um instrumento de informação e controle, constituindo um banco de dados alimentado com informações referentes aos sistemas de gestão de resíduos sólidos implantados tanto pelo governo quanto pela iniciativa privada. Utilizará também dados provenientes de diversas fontes relacionadas no art. 72 do Decreto Regulamentador n.º 7.404/10 (BRASIL, 2010b).</p>	<p>Conforme o Plano Nacional de Resíduos Sólidos, o SINIR deveria ter sido implementado até o final de 2012, contudo o prazo não foi cumprido pelo governo, sendo que somente em 2013 o site foi disponibilizado.</p>
Logística reversa	<p>Conjunto de ações destinadas a facilitar a coleta e posterior restituição dos resíduos sólidos aos seus geradores, para que sejam tratados ou reaproveitados em novos produtos na forma de insumos, visando a não geração de rejeitos (BRASIL, 2010a).</p>	<p>A imputação de custos referente ao produto pós-consumo recai sobre setores desprivilegiados da cadeia da reciclagem, quando estes custos deveriam ser imputados àqueles que fornecem os produtos, como por exemplo as indústrias, pois são elas as responsáveis por decidir quais embalagens serão colocadas no mercado (ROUX, 2015).</p>
Acordo setorial	<p>Contrato firmado entre o poder público e fabricantes, importadores, distribuidores ou comerciantes, tendo em vista a implantação da responsabilidade compartilhada pelo ciclo de vida dos produtos (BRASIL, 2010a).</p>	<p>As responsabilidades de produtores, importadores, distribuidores e comerciantes sobre o destino dos produtos pós-consumo ainda não estão claramente definidas. Os resíduos continuam sendo dispostos em locais inadequados sendo alguns tipos são recolhidos por organizações de catadores (ABRAMOVAY, 2013).</p>

A lentidão dos municípios quanto à elaboração dos Planos de Gestão Integrada e organização das informações sobre o gerenciamento dos resíduos sólidos gerados é consequência não somente dos fatores citados (baixo grau de desenvolvimento institucional, órgãos gestores frágeis, pouca capacidade técnica, ausência de uma política de investimentos e recuperação de custos, ausência de planejamento e monitoramento, ausência de regulação e controle), mas principalmente do fato da PNRS exigir, dos brasileiros, a mudança de hábitos relacionados à produção e consumo (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010; FIESP, 2012).

3.2 FORSU sob a ótica da PNRS

Dentre a diversidade de resíduos sólidos gerados (Figura 1), destacam-se os resíduos sólidos urbanos (RSU), os quais ainda são destinados inadequadamente em todas as regiões e Estados do Brasil, mesmo com a legislação mais restritiva. Segundo a ABRELPE (2013), 60% dos municípios brasileiros fazem uso de locais impróprios para a destinação final desses resíduos coletados.

Pode-se considerar que a ideia de “locais impróprios” envolve tanto o fato de dispor aquilo que é coletado em qualquer lugar que não seja um aterro sanitário, bem como dispor em aterro sanitário os resíduos, que, diferentemente dos rejeitos, ainda possuem potencial de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis (BRASIL, 2010a).

Um dos fatores que impede a reversão do quadro apresentado é a ausência de um sistema eficiente de coleta seletiva, a qual deve ir além da disponibilização de pontos de entrega voluntária e/ou convênios com cooperativas de catadores. Os responsáveis pelos municípios devem implementar a coleta seletiva de forma a abranger toda a população, pautando-se no princípio da hierarquia para a gestão dos resíduos (Figura 2), os quais devem ser previamente separados na fonte de acordo com a sua composição (BRASIL, 2010a; ABRELPE, 2013).

A coleta seletiva ainda não é praticada assiduamente no país, acarretando o desperdício de recursos materiais e energéticos presentes nos resíduos descartados. É o caso da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (FORSU), gerada diariamente e em quantidade representativa (constitui mais da metade dos RSU coletados) (Figura 3).

Figura 1 - Diagrama de blocos representando a classificação dos resíduos sólidos segundo a origem, conforme a Lei nº 12.305/10

Fonte: Schalch; Castro; Córdoba (2013).

Figura 2 - Fluxograma da hierarquia a ser adotada quanto à gestão de resíduos sólidos

Fonte: Schalch; Castro; Córdoba (2013).

Figura 3 - Participação dos principais materiais no total de RSU coletado no Brasil em 2012 (56.561.856 toneladas)

Fonte: ABRELPE (2012).

As principais fontes geradoras de resíduos orgânicos em um município são: domicílios, feiras, sacolões, quitandas, varejões, supermercados, entrepostos de hortifrutigranjeiros, restaurantes, produtores de alimentos para entrega à domicílio, bares, lanchonetes, cantinas escolares e de empresas, floriculturas, *shopping centers*, hospitais, barracas de frutas e carrinhos de venda de alimentos preparados na hora (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010).

A prática da coleta regular em detrimento da coleta seletiva resulta na disposição conjunta da FORSU com outros tipos de resíduos, seja em aterro sanitário, aterro controlado ou lixão. Os problemas advindos dessa prática inadequada são:

- risco de poluição e contaminação ambientais, pois, quando aterrada e em estado de decomposição, a FORSU gera chorume com alta carga poluidora que pode atingir águas superficiais e subterrâneas, bem como gases contribuintes para o efeito estufa (dióxido de carbono e metano);
- a mistura da FORSU com outros resíduos inviabiliza a posterior recuperação daqueles que são passíveis de reciclagem (papel, plástico, alumínio, vidro, etc.) e, simultaneamente, dificulta a própria destinação da fração orgânica para algum tratamento biológico, devido a impossibilidade de remover tudo aquilo que não é biodegradável, além do risco de contaminá-la com substâncias tóxicas presentes em pilhas, baterias, tintas, lâmpadas fluorescentes, etc.

A Lei nº 12.305/10 proibiu o simples aterramento dos resíduos sólidos orgânicos, priorizando a coleta seletiva e a recuperação energética dos resíduos. Dentro desse contexto, cabe ressaltar que o aproveitamento energético do biogás gerado em aterro sanitário é inviável, pois os resíduos sólidos orgânicos são dispostos juntamente com resíduos que

possuem outras propriedades físico-químicas, não há controle da alteração das condições aeróbia para anaeróbia e vice-versa nem da disponibilidade de nutrientes para a atividade microbiana, dentre outros fatores. O resultado é um baixo rendimento da produção de metano no biogás, o qual deve ser queimado no próprio aterro (CHYNOWETH et al., 1992).

Quando segregada dos demais resíduos, a FORSU torna-se passível de tratamento biológico por meio da digestão aeróbia (compostagem) ou da digestão anaeróbia (biometanização) (BORGLIN; HAZEN; OLDENBURG, 2004) resultando, dentre outros benefícios, no prolongamento da vida útil do aterro sanitário (a FORSU não seria mais disposta em aterro), além da geração de um composto com valor comercial e, no caso da biometanização, tem-se também a obtenção de energia (biogás contendo metano) (REICHERT, 2005).

Comparativamente, a compostagem promove à oxidação completa dos compostos orgânicos, convertendo-os em água, gás carbônico e sais minerais, liberando a energia na forma de calor; já o processo de biometanização resulta em subprodutos orgânicos, como metano, álcoois, sulfetos e amônia, os quais ainda são passíveis de oxidação, ou seja, a via anaeróbia de degradação da matéria orgânica gera um aporte energético positivo (LEITE et al., 2003; LETTINGA ASSOCIATES FOUNDATION, 2009).

No Brasil foram empreendidas iniciativas para o tratamento da FORSU principalmente por meio da compostagem. Quanto ao tratamento por biometanização, o Brasil não dispõe de planta industrial para resíduos sólidos orgânicos, somente para efluentes líquidos sanitários, industriais (têxtil, laticínio, entre outros) e da agroindústria (suinocultura), bem como unidades de recuperação e utilização do biogás produzido em aterros sanitários e estações de tratamento de esgoto (GOMES, 2010).

Pelo fato dos sistemas de digestão anaeróbia terem sido desenvolvidos inicialmente para o tratamento de efluentes líquidos, a sua utilização no tratamento da FORSU constituiu-se em uma adaptação dessa tecnologia e, dada as particularidades dos resíduos sólidos, os sistemas enfrentam diversas dificuldades para operarem de forma adequada, além de requererem um longo tempo para a bioestabilização (FRICKE et al., 2007).

Contudo, apesar da compostagem ser uma prática amplamente testada, de baixo custo e com produção de um composto com valor comercial, a biometanização, mesmo sendo uma tecnologia mais complexa e que requer maior investimento, tem sua aplicação sendo expandida por toda a Europa, com resultados positivos (DE BAERE; MATTHEEUWS,

2012).

O principal interesse pela utilização da digestão anaeróbia recai na possibilidade de tratar os resíduos sólidos orgânicos gerados diariamente e, simultaneamente, obter uma fonte de energia renovável em um período da história humana no qual a demanda energética é crescente e dependente de combustíveis fósseis (SINGHAL; BANSAL; SINGH, 2012).

A existência de uma estação de biometanização e compostagem não dispensa a instalação de um aterro sanitário, tanto para a disposição de rejeitos, como para dar apoio em situações de emergência, quando ocorrerem falhas no sistema de tratamento ou quando este se encontrar em manutenção por longos períodos (CASTANHEIRA; FERREIRA; LOPES [200?]).

3.3 Biometanização

3.3.1 Aspectos gerais

Basicamente, a biometanização consiste na degradação biológica da matéria orgânica por uma variedade de micro-organismos anaeróbios (facultativos e obrigatórios) na ausência de oxigênio. Os produtos finais do processo são o material digerido (digestato) e o biogás (McCARTY, 1982).

O digestato é separado em fração líquida e sólida: a primeira pode ser recirculada no sistema ou então misturada aos resíduos frescos; já a segunda deve ser compostada a fim de finalizar a estabilização e promover a maturação do produto, que poderá ser utilizado como condicionador do solo (CASTANHEIRA; FERREIRA; LOPES [200?]).

Quanto ao biogás, sua composição varia conforme o material a ser degradado e às condições químicas e físicas que influenciam o processo. Em média, a proporção de gases no biogás é a seguinte (SALOMON; LORA, 2009):

- Metano (CH_4) – 40 a 75%;
- Gás carbônico (CO_2) – 25 a 40%;
- Nitrogênio (N_2) – 0,5 a 2,5%;
- Hidrogênio (H_2) – 1 a 3%;
- Oxigênio (O_2) – 0,1 a 1%;
- Gás sulfídrico (H_2S) – 0,1 a 0,5%;
- Amônia (NH_3) – 0,1 a 0,5%.

O potencial energético do biogás será resultado da concentração de metano, a qual deve estar acima de 55%, podendo então ser utilizado como fonte de energia térmica e elétrica. A concentração de metano na mistura varia em função de vários aspectos, tais como: quantidade de água e teor de sólidos voláteis no substrato, presença de agentes químicos inibidores, agitação do material, pH e temperatura (MAGALHÃES, 1986; CHYNOWETH et al., 1992).

3.3.2 Condições operacionais

O processo de biometanização pode ser caracterizado por diversas combinações de parâmetros operacionais, resultando em um conjunto de condições que serão determinantes para a ocorrência e sucesso da digestão anaeróbia. No Quadro 2 são apresentadas sinteticamente as principais possibilidades que podem ser escolhidas para se operar o tratamento da FORSU via anaeróbia.

Não existe consenso quanto à melhor configuração de biometanizador destinado ao tratamento da FORSU, pois o processo envolve caminhos bioquímicos complexos bem como está sujeito às novidades tecnológicas. Sendo assim, o conhecimento empírico é uma regra para o entendimento e disseminação dessa tecnologia (MATA-ALVAREZ; MACÉ; LLABRÉS, 2000).

Quadro 2 – Principais configurações da tecnologia de biometanização

Tipo e classificação do parâmetro operacional		Breve definição	Pontos positivos	Pontos negativos
REGIME DE ALIMENTAÇÃO	Batelada	Preenche-se o biometanizador em sua capacidade útil de uma única vez; o material a ser tratado permanece até que se obtenha a degradação desejada, para então ser removido, permitindo um novo carregamento (CASSINI, 2003; FORSTER CARNEIRO, 2005)	<ul style="list-style-type: none"> - simplicidade de projeto; - baixo investimento; - baixo consumo de água (viáveis para operação via seca) (OUEDRAOGO, 1999) 	<ul style="list-style-type: none"> - entupimentos; - risco de explosão no esvaziamento; - baixa produção de biogás (não ocorre continuamente); - formação de zonas mortas (cria-se caminhos preferenciais na recirculação do chorume) (MATA-ALVAREZ, 2002)
	Semi-contínuo	O material a ser tratado é introduzido e removido no biometanizador periodicamente (FORSTER CARNEIRO, 2005)	- apresentam desempenho semelhante aos sistemas operados em contínuo quanto à produção de metano (VAN de BERG; LENTZ, 1980)	- necessidade de tanque para mistura e alimentação periódica do biometanizador (comparando-o com o sistema batelada)
	Contínuo	A alimentação do biometanizador é realizada de maneira constante, simultaneamente à remoção de material já digerido (FORSTER CARNEIRO, 2005)	- produção contínua de biogás (fator que otimiza a geração de energia) (AUSTERMANN; ARCHER; WHITING, 2007)	- requer grandes tanques de homogeneização para manter contínua a alimentação do biometanizador (PÉREZ et al., 1997)
TEOR DE SÓLIDOS	Via seca	Alto conteúdo de sólidos na alimentação (concentração de sólidos totais entre 15 e 35%) (FORSTER CARNEIRO, 2005)	<ul style="list-style-type: none"> - produz menor volume de efluentes líquidos (requer instalações de menor porte e menos complexas para o desaguamento do material digerido); - aplicação de maior carga orgânica; - necessidade de menor volume de biometanizador (AUSTERMANN; ARCHER; WHITING, 2007) 	<ul style="list-style-type: none"> - pouca diluição de inibidores; - maior dificuldade de acesso microbiano ao material a ser digerido (VERSTRAETE; VANDEVIVERE, 2005)
	Via úmida	Baixo conteúdo de sólidos na alimentação (concentração de sólidos totais entre 4 e 10%) (FORSTER CARNEIRO, 2005)	<ul style="list-style-type: none"> - tem por base processo já conhecido de digestão anaeróbia de efluentes líquidos; - diluição de inibidores (VERSTRAETE; VANDEVIVERE, 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> - sensibilidade à sobrecarga orgânica; - geração de maior quantidade de efluente líquido que necessita de destinação; - maior volume do reator (VERSTRAETE; VANDEVIVERE, 2005)
ETAPAS DA DIGESTÃO	Uma fase	Todas as reações físico-químicas e microbiológicas ocorrem em um único biometanizador (FORSTER CARNEIRO, 2005)	<ul style="list-style-type: none"> - projeto simples; - menos sujeito às falhas técnicas; - exige menor investimento (VANDEVIVERE; DE BAERE; VERSTRAETE, 2002) 	- problemas de estabilidade (cada população microbiana atua em condições ótimas distintas e tolera de forma diferente as alterações no meio (FORSTER CARNEIRO, 2005)
	Duas fases	As reações físico-químicas e microbiológicas ocorrem em sequência e em diferentes biometanizadores (hidrólise e acidogênese em um; acetogênese e metanogênese em outro) (FORSTER CARNEIRO, 2005)	<ul style="list-style-type: none"> - melhor desempenho frente às flutuações de carga orgânica, - alimentação descontínua e excesso de substâncias inibidoras (como nitrogênio) (CASSINI, 2003) 	<ul style="list-style-type: none"> - projeto mais complexo; - requer maiores investimentos (VANDEVIVERE; DE BAERE; VERSTRAETE, 2002)
TEMPERATURA	Mesofílica	Compreende a faixa de temperatura entre 20 e aproximadamente 40°C (CHERNICHARO, 2007)	<ul style="list-style-type: none"> - consiste na faixa de temperatura ótima para a maioria das arqueas metanogênicas; - maior estabilidade do processo quanto à oscilação de temperatura (FORSTER CARNEIRO, 2005) 	- maior tempo de detenção hidráulica; (AUSTERMANN; ARCHER; WHITING, 2007)
	Termofílica	Compreende a faixa de temperatura entre 45 e 70°C. (CHERNICHARO, 2007)	<ul style="list-style-type: none"> - menor tempo de detenção hidráulica; - maior produção de biogás em menor tempo; - biometanizador de menor volume; - maior eficácia na destruição de patógenos e vírus (AUSTERMANN; ARCHER; WHITING, 2007; TURNER; BURTON, 1997) 	<ul style="list-style-type: none"> - requer gasto energético com manutenção da temperatura; - pequenas oscilações de temperatura podem desestabilizar o sistema (AUSTERMANN; ARCHER; WHITING, 2007; ROMERO; SALES; MARTINEZ, 1990)

3.3.3 Inoculação

Um dos desafios inerente à operação de biometanizadores é a manutenção da estabilidade do processo. Diversas estratégias têm sido estudadas para este fim, como por exemplo, meios para a regulação da concentração de hidrogênio e de acetato visando minimizar a inibição termodinâmica; métodos que mantenham as condições ideais para os diferentes grupos microbianos; e, ainda, alternativas capazes de contornar as deficiências cinéticas do processo (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

No contexto da última estratégia citada, a inoculação dos resíduos de entrada pode auxiliar na estabilidade à longo prazo do sistema anaeróbio (McMAHON et al., 2001) e na redução do tempo de bioestabilização dos resíduos (LOPES; LEITE; PRASAD, 2004; SILVA et al., 2012).

Os inóculos podem ser provenientes de qualquer ambiente onde a degradação anaeróbia é natural (GÜELFO, 2008), como por exemplo:

- rúmen bovino (LEITE; LOPES; PRASAD, 2001);
- esterco bovino (McMAHON et al., 2001);
- lodo de esgoto sanitário de lagoas de estabilização anaeróbias e facultativas (LEITE et al., 2003);
- lodo mesofílico procedente da recirculação de digestores anaeróbios de Estação de Tratamento de Esgoto (FORSTER-CARNEIRO; PÉREZ; ROMERO, 2007);
- fração líquida e sólida provenientes de biometanizador tratando resíduos sólidos orgânicos (FACCHIN et al., 2013);
- lixiviado bruto de aterro sanitário (XIAOFENG et al., 2014).

Na presente pesquisa, optou-se por utilizar como inóculos lodo de esgoto sanitário e lodo granular de uma avícola, ambos provenientes de reator UASB, devido às seguintes vantagens:

- são fontes de massa microbiana anaeróbia para o biometanizador, principalmente de metanogênicas (LEITE et al., 2003). Naturalmente, o ecossistema anaeróbio não se instala imediatamente após a colocação dos resíduos no biometanizador, sendo necessário um tempo para que as populações de micro-organismos possam

crescer e levar o sistema a um ponto de equilíbrio (METCALF; EDDY, 1991; SOUTO, 2005);

- contribuem com o aumento do pH do meio por apresentarem elevada alcalinidade (FORSTER-CARNEIRO et al., 2004), pois os resíduos sólidos orgânicos de origem domiciliar, principalmente restos gerados na cozinha, possuem elevada biodegradabilidade, gerando o acúmulo de ácidos graxos voláteis, consumo de alcalinidade, queda de pH e inibição da atividade metanogênica (XIAOFENG et al., 2014);
- apresentam concentração de nitrogênio superior à da matéria orgânica putrescível, podendo ser utilizado para equilibrar a relação C/N do meio (LEITE et al., 2003).

Contudo, os benefícios da utilização de um inóculo na partida do biometanizador existirão se o inóculo estiver adaptado ao tipo de resíduo e às condições de operação (GÜELFO, 2008). Além disso, é importante ter conhecimento sobre a capacidade da biomassa produzir metano, pois a remoção da DQO do resíduo ocorrerá somente com a formação desse gás (CARNEIRO, 2009).

Em condições controladas de laboratório, pode-se realizar o teste da Atividade Metanogênica Específica (AME), que indica a capacidade máxima de produção de metano por um consórcio de micro-organismos anaeróbios (AQUINO et al., 2007). Posteriormente, pode-se calcular o Potencial Metanogênico do inóculo, multiplicando o valor obtido no teste de AME pela massa de sólidos voláteis contida no biometanizador (TEIXEIRA et al., 2009).

3.4 Microbiologia da biometanização

Os micro-organismos anaeróbios envolvidos no processo de conversão da matéria orgânica em metano são pertencentes a dois domínios diferentes: *Bacteria* e *Archaea*. Inicialmente, as arqueas foram consideradas membros anômalos do domínio *Bacteria* por apresentarem o mesmo padrão de célula procariótica (no geral, ausência de núcleo verdadeiro e de organelas funcionais), possuírem um único cromossomo circular e transcreverem vários genes a partir de um mesmo mRNA policistrônico (MADIGAN et al., 2010).

Contudo, o sequenciamento comparativo do ácido ribonucleico ribossomal (RNAr) tornou as arqueas um grupo reconhecidamente distinto das bactérias típicas e revelou maior

relação genética entre *Archaea* e *Eukarya* do que entre *Bacteria* e *Archaea* (WOESE; FOX, 1977) (Figura 4).

Figura 4 - Árvore filogenética universal construída a partir do sequenciamento comparativo da subunidade menor do gene RNAr (apenas alguns organismos-chave ou linhagens são apresentadas em cada domínio). LUCA corresponde ao ancestral universal comum mais antigo (*Last Universal Common Ancestor*)

Fonte: Madigan et al. (2014).

Assim, as *Archaea* passaram a representar um novo domínio e, juntamente com o domínio *Bacteria*, integram o grupo dos procariotos. Apesar de bactérias e arqueas serem similares quanto ao tamanho e à forma, existem diferenças entre esses dois grupos de organismos quanto à organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia (Quadro 3).

A atuação conjunta e equilibrada de bactérias e arqueas em um meio anaeróbio conduzem quatro etapas principais do processo de biometanização reconhecidas até o momento: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (WEISS et al., 2008) (Figura 5). A seguir, as etapas serão descritas individualmente a fim de pontuar as características

únicas de cada uma, apesar de ocorrerem de forma simultânea (desde que as populações microbianas responsáveis por cada função estejam presentes e ativas).

Quadro 3 - Algumas características que diferenciam os domínios *Bacteria* e *Archaea*

CARACTERÍSTICA	DOMÍNIO BACTERIA	DOMÍNIO ARCHAEA
Parede celular	Contém peptidoglicano	Não contém peptidoglicano; possui um polissacarídeo similar, denominado pseudopeptidoglicano
Membrana de lipídeos	Composta por éster de ácidos graxo, formando cadeias retas	Composta por éter de ácidos graxos, formando cadeia longa e ramificadas
RNA polimerase	Existe um único tipo com estrutura quaternária simples (estrutura tridimensional)	Possuem vários tipos estruturalmente complexos. Como consequência, alguns aspectos da síntese de proteínas são diferentes da realizada por bactérias

Fonte: Vazoller; Manfio e Canhos (1999).

Figura 5 - Sequência metabólica e grupos microbianos envolvidos na biometanização da FORSU (com redução de sulfato)

Fonte: Chernicharo (2007).

Hidrólise

Primeira e decisiva etapa para o desencadeamento do processo de digestão anaeróbia, já que a seletividade da membrana citoplasmática dos micro-organismos impede que macromoléculas como proteínas, amido, celulose e lipídeos sejam transportadas para o interior da célula (ABDELGADIR et al., 2014).

A hidrólise consiste na conversão de polímeros particulados complexos em monômeros solúveis mais simples pela ação de exoenzimas secretadas pelas bactérias hidrolíticas (Quadro 4). Os produtos dessa conversão são agora passíveis de atravessar a parede celular das bactérias fermentativas, as quais atuam na próxima etapa (acidogênese) (CHERNICHARO, 2007).

Quadro 4 - Conversões que ocorrem durante a hidrólise, respectivas exoenzimas e exemplos de bactérias hidrolíticas

Conversão (polímero particulado complexo → monômero solúvel simples)	Exoenzima hidrolítica	Gêneros de bactérias com capacidade hidrolítica
Proteína → aminoácidos	protease	<i>Bacteroides, Butyvirbio, Clostridium, Fusobacterium, Selenomonas, Streptococcus, Proteus, Peptococcus, Bacillus</i>
Polissacarídeos → monossacarídeos	celulase, amilase	<i>Clostridium, Staphylococcus, Acetivibrio, Eubacterium</i>
Lipídeos → ácidos graxos	lipase	<i>Clostridium, Micrococcus, Staphylococcus</i>

Fonte: adaptado de Chernicharo (2007).

A hidrólise dos polissacarídeos ocorre em poucas horas, enquanto que proteínas e lipídeos são hidrolisados dentro de alguns dias. Nesse processo, os micro-organismos anaeróbios facultativos utilizam o oxigênio presente no meio, reduzindo o potencial redox, tornando o ambiente favorável à ação dos anaeróbios obrigatórios (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2008).

Vários fatores interferem no grau e na taxa de hidrólise do substrato, sendo que os principais são: temperatura operacional do biometanizador, tempo de residência do substrato, composição do substrato (quanto à teores de lignina, carboidrato, proteína e lipídeo), tamanho das partículas, pH do meio, concentração de nitrogênio amoniacal e de produtos da hidrólise (LETTINGA; HULSHOF POL; ZEEMAN, 1996).

Acidogênese

Na segunda etapa, as bactérias acidogênicas (anaeróbias facultativas ou obrigatórias) assimilam os produtos solúveis resultantes da hidrólise e, no interior das células, transformam os em compostos ainda mais simples como ácidos orgânicos (principalmente acético, propiônico e butírico), álcoois (etanol), cetonas (acetona), dióxido de carbono e hidrogênio, além de gerarem novas células bacterianas (CHERNICHARO, 2007).

As bactérias acidogênicas possuem crescimento rápido e são os micro-organismos que mais se beneficiam com a degradação do substrato. Assim, a etapa acidogênica não é limitante do processo de biometanização, a não ser que o substrato seja de difícil hidrólise (FORSTER-CARNEIRO, 2005; CHERNICHARO, 2007).

Os gêneros mais comuns de acidogênicas são: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Escherichia* (CHERNICHARO, 2007).

Acetogênese

A acetogênese, assim como a acidogênese, é uma via que promove a redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e da Demanda Química de Oxigênio (DQO) presentes no substrato (OSTREM, 2004).

Nessa terceira etapa, há a atuação das bactérias acetogênicas utilizadoras de hidrogênio, que produzem acetato a partir de hidrogênio e dióxido de carbono, e das bactérias acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio, as quais promovem a oxidação dos ácidos graxos voláteis em acetato e hidrogênio (CARNEIRO, 2009).

Os gêneros de micro-organismos que realizam essas conversões são *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas*. Contudo, as reações acetogênicas somente ocorrerão quando o meio apresentar baixas concentrações dos produtos gerados (acetato e hidrogênio), o que é possível pela ação de micro-organismos consumidores de tais produtos (CHERNICHARO, 2007).

Metanogênese

A etapa final do processo de biometanização tem como aceptores de elétrons o gás carbônico, o grupo metil de compostos C-1 ou o grupo metil do acetato (CHERNICHARO, 2007). Os micro-organismos responsáveis pela produção do metano são estritamente anaeróbios e pertencem ao filo *Euryarchaeota* do domínio *Archaea*.

Devido às diferenças fisiológicas, as arqueas metanogênicas são divididas em dois grupos principais (CHERNICHARO, 2007):

- arqueas hidrogenotróficas, que utilizam hidrogênio e dióxido de carbono para produzirem metano (principais gêneros: *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanospirillum*);
- arqueas acetoclásticas, as quais clivam o acetato para gerar metano e dióxido de carbono (principais gêneros: *Methanosarcina* e *Methanosaeta*).

Sulfetogênese

A sulfetogênese fará parte das vias metabólicas da digestão anaeróbia caso o substrato apresente compostos à base de enxofre, favorecendo a ação de bactérias redutoras de sulfato. Esses micro-organismos são anaeróbios estritos e reduzem compostos sulfurados (como sulfato, sulfito, etc.) à sulfetos durante a oxidação de compostos orgânicos (CHERNICHARO, 2007).

O inconveniente da presença dessa via metabólica está no estabelecimento de competição pelos substratos disponíveis entre bactérias redutoras de sulfato e micro-organismos fermentativos, acetogênicos e metanogênicos, pois as redutoras de sulfato são versáteis a ponto de utilizar toda a cadeia de ácidos voláteis, diversos ácidos aromáticos, metanol, etanol, compostos fenólicos, glicerol, açúcares, aminoácidos e hidrogênio (CHERNICHARO, 2007).

A remoção de DQO pela rota sulfetogênica leva à produção de gás sulfídrico, podendo acarretar problemas de corrosão, maus odores e toxicidade no meio, mas, principalmente, desvia a rota de produção de metano, que é um dos primordiais objetivos da utilização do processo de biometanização da FORSU (CHERNICHARO, 2007).

A magnitude da competição entre metanogênicas e redutoras de sulfato está associada particularmente ao pH e à relação DQO/SO_4^{2-} (CHERNICHARO, 2007).

- relação DQO/SO_4^{2-} menor que 7 – ocorre inibição das metanogênicas (mas com forte dependência do pH);
- relação DQO/SO_4^{2-} maior que 10 – há redução do efeito inibidor sobre as metanogênicas, pois grande parte do H_2S produzido será removido do meio, em função da maior produção de biogás.

Podem ser destacados dois grupos metabólicos de bactérias redutoras de sulfato:

- grupo de espécies que oxidam o substrato de forma incompleta até acetato, as chamadas acetoclásticas não-fermentativas, como os gêneros *Desulfobulbus* sp., *Desulfomonas* sp. e a maioria das espécies do gênero *Desulfotomaculum*;
- grupo de espécies capaz de oxidar completamente o substrato orgânico até gás carbônico, como os gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* e *Desulfonema*.

O funcionamento do processo global de biometanização está vinculado ao equilíbrio de cada etapa mencionada, as quais são interdependentes entre si, uma vez que produzem substratos umas para as outras e consomem produtos umas das outras. A sequência dos processos não pode avançar mais rápido do que o processo mais lento envolvido e, quando uma das etapas é perturbada, a digestão global é afetada negativamente (LETTINGA ASSOCIATION FOUNDATION, 2009).

3.4.1 Sintrofia e termodinâmica

Apesar da possibilidade de conversão de qualquer composto orgânico em CH₄, as metanogênicas não são capazes de realizar esse processo sozinhas, pois os substratos que utilizam geralmente não estão prontamente disponíveis e são específicos, dentre eles, pode-se citar: formiato, monóxido de carbono, metanol, 2-propanol, aminas metiladas, dimetilsulfeto, metilmercaptanas, acetato e dióxido de carbono (esse último necessita de hidrogênio como doador de elétrons) (VAZOLLER; MANFIO; CANHOS, 1999).

Assim, para que o ciclo do carbono ocorra em ambientes anóxicos (Figura 6), as metanogênicas se associam a organismos parceiros que poderão supri-las com precursores metanogênicos. A essa relação de cooperação microbiana entre dois ou mais micro-organismos para a degradação de uma substância que nenhum deles é capaz de degradar individualmente dá-se o nome de sintrofia. A maioria das reações sintróficas são fermentações secundárias, nas quais organismos fermentam os produtos de fermentação de outros anaeróbios e, assim, conservam energia (MADIGAN et al., 2010).

Entretanto, em um sistema anaeróbio, essa reação acetogênica ocorre naturalmente quando micro-organismos metanogênicos consomem os produtos gerados pelos acetogênicos, permitindo o acoplamento das reações por meio de um reagente comum.

O reagente chave para a estabilidade do processo anaeróbio é o hidrogênio (H₂) e a sua transferência interespecífica. A reação da acetogênese só será deslocada para a direita, quando a concentração de H₂ estiver baixa (a pressão parcial de H₂ não deve exceder 10⁻⁴ atm), ou seja, se houver o pronto e efetivo consumo desse reagente pelos micro-organismos hidrogenotróficos (HARPER; POHLAN, 1986).

A reação global de conversão de propionato em metano é termodinamicamente favorável ($\Delta G^{0'} < 0$), contudo, a energia liberada é de apenas 56,6 kJ, pois a energia obtida deve ser dividida entre os três tipos microbianos envolvidos: acetogênicos, metanogênicos acetoclásticos e metanogênicos hidrogenotróficos, o que explica a baixa taxa de crescimento desses micro-organismos em comparação com os acidogênicos (CHERNICHARO, 2007).

Quadro 5 - Relação sintrófica exemplificada pela sequência de reações envolvidas na conversão de propionato em metano em um meio anaeróbio

ACIDOGENESE					
Glicose	→	Propionato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2$	→	$2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$ $\Delta G^{0'} = -358,0 \text{ kJ}$
Acetogênese					
Propionato	→	Acetato	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O$	→	$CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$ $\Delta G^{0'} = +76,1 \text{ kJ}$
Metanogênese acetoclástica					
Acetato	→	Metano	$CH_3COO^- + H_2O$	→	$CH_4 + HCO_3^-$ $\Delta G^{0'} = -31,0 \text{ kJ}$
Metanogênese hidrogenotrófica					
Hidrogênio	→	Metano	$3H_2 + 0,75HCO_3^- + 0,75H^+$	→	$0,75CH_4 + 2,25H_2O$ $\Delta G^{0'} = -101,7 \text{ kJ}$
REAÇÃO GLOBAL					
Propionato	→	Metano	$CH_3CH_2COO^- + 1,75H_2O$	→	$1,75CH_4 + HCO_3^- + 0,25H^+$ $\Delta G^{0'} = -56,6 \text{ kJ}$

Fonte: Chernicharo (2007).

3.4.2 Fatores que afetam o crescimento microbiano

A digestão anaeróbia da FORSU será considerada uma forma de tratamento caso seja capaz de estabilizar a matéria orgânica presente nos resíduos. Para que isso ocorra, é necessário o desenvolvimento equilibrado dos micro-organismos decompositores, os quais são influenciados por fatores operacionais e ambientais. A seguir, são apresentadas algumas considerações sobre os principais parâmetros que interferem na dinâmica da biometanização.

Coleta seletiva

Para a destinação ambientalmente adequada dos resíduos, quando o objetivo é o tratamento, deve-se considerar em primeiro lugar não a escolha da tecnologia, mas sim a implementação de uma coleta seletiva eficiente (CECCHI et al., 1992).

No caso da biometanização, o rendimento do biogás e a utilidade do digestato serão resultados da qualidade do material de entrada. Se o substrato for proveniente da separação na fonte e da coleta seletiva é mais garantido que se obtenha elevado rendimento de biogás e um bom composto do que quando o substrato tem sua origem na separação mecânica de resíduos misturados (CITEC, 2004).

Bolzonella et al. (2006), compararam os produtos de biometanizadores de grande escala operados com resíduos separados na fonte e resíduos misturados: o primeiro tipo de substrato proporcionou um rendimento de metano de $0,40 \text{ m}^3\text{CH}_4.\text{kgSTV}^{-1}$ e o digestato, após compostado, apresentava propriedades que permitiam seu uso na agricultura; já o segundo tipo de substrato forneceu um rendimento de metano de apenas $0,13 \text{ m}^3\text{CH}_4.\text{kgSTV}^{-1}$, sendo que o digestato, após compostado, poderia ser utilizado para fins menos nobres que o agrícola (como material de cobertura de aterro sanitário ou incineração), devido a presença de plástico e outros materiais inertes.

De acordo com Khalid et al. (2011), resíduos misturados contém materiais que podem estar em quantidades tóxicas para os micro-organismos, como metais e compostos orgânicos recalcitrantes, os quais não serão degradados e permanecerão concentrados no composto final.

Assim, a coleta seletiva e a separação dos resíduos na fonte são o ponto de partida para minimizar o volume de resíduos sólidos e rejeitos gerados, bem como para reduzir os impactos causados à saúde humana e à qualidade ambiental decorrentes do ciclo de vida dos produtos, conforme previsto na PNRS (BRASIL, 2010a). Adotando-se esse novo hábito, consequentemente haverá um incentivo ao desenvolvimento e à prática da biometanização no Brasil, como ocorreu na Europa a partir dos anos 90 (DE BAERE; MATTHEEUWS, 2012).

Tamanho das partículas

Aplicar um pré-tratamento para a redução do tamanho das partículas dos resíduos orgânicos é uma maneira de facilitar a biodegradação (GUNASEELAN, 1997), pois aumenta a superfície de contato entre substrato e micro-organismos (KELLY, 2002).

Contudo, deve-se escolher com cuidado o método que será empregado para a redução das partículas, bem como o tamanho da mesma, o que dependerá do tipo de biometanizador a ser operado. Vale ressaltar que o pressuposto de que quanto menor o tamanho da partícula melhor será o desempenho do processo não é necessariamente correto (ZHANG; BANKS, 2013).

Barlaz, Ham e Schaefer (1990) verificaram que com 90 dias de operação, o resíduo com tamanho entre 250 e 350 mm produziu 32% a mais de metano do que o resíduo com tamanho entre 100 e 150 mm. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que partículas menores são rapidamente hidrolisadas, resultando no acúmulo de ácidos orgânicos que provocarão a queda de pH caso a alcalinidade do meio não seja suficiente para a neutralização. Tal condição limita a produção de metano por inibir as metanogênicas.

Quando se pretende diminuir o tamanho do resíduo de entrada, é importante levar em consideração sua origem e assim definir se há necessidade de realizar o pré-tratamento e qual o tamanho da partícula. Deublein e Steinhauser (2008) afirmam que não há influência significativa no rendimento do biogás quando substratos facilmente biodegradáveis (constituídos por 88 a 95% de matéria biodegradável) são fragmentados, devido possuírem baixo conteúdo de material estrutural (celulose, lignina, etc.). O contrário é válido para substratos ricos em material estrutural, pois a fragmentação, além de aumentar a exposição do resíduo ao ataque microbiano, promoverá o rompimento das fibras.

Mistura

Algumas alternativas podem ser empregadas para promover a mistura de um sistema anaeróbio para tratamento da FORSU, como misturadores mecânicos, recirculação do próprio efluente líquido que sai do biometanizador ou injeção do biogás produzido (APPELS et al., 2008).

O principal objetivo da mistura no interior do biometanizador é garantir o contato do substrato fresco com o consórcio de micro-organismos presentes na massa em digestão e, no caso da digestão anaeróbia, promover a interação entre os micro-organismos metanogênicos e sintróficos (REICHERT, 2005; GHANIMEH; FADEL; SAIKALY, 2012).

Indiretamente, a mistura de um sistema anaeróbio para tratamento da FORSU influencia na qualidade do ambiente no qual os micro-organismos estão inseridos, no sucesso da partida do biometanizador e na estabilidade do processo (GHANIMEH; FADEL; SAIKALY, 2012), além de assegurar que os sólidos permaneçam em suspensão, evitando a formação de zonas mortas por sedimentação (KAPARAJU et al., 2007).

De acordo com Deublein e Steinhauser (2008), somente pequenas instalações para a produção de biogás podem operar sem agitadores, sendo que aquelas que o possuem, terão o tempo e a frequência da mistura determinados conforme a configuração do biometanizador.

Segundo os autores, misturar o conteúdo do biometanizador em excesso aumenta o consumo de energia, prejudica o balanço energético do sistema e provoca distúrbios na atividade microbiana, acarretando uma queda na produção de biogás.

Na pesquisa realizada por Stroot et al. (2001), verificou-se que a agitação mecânica contínua foi inibitória, resultando em desempenho instável de sistemas fase única, com alimentação semi-contínua de resíduo sólido orgânico e elevadas taxas de carregamento. Constatou-se que nos biometanizadores com pouco grau de mistura a digestão foi estável, sem acúmulo de propionato e com pequena alteração do pH. Já nos biometanizadores operados sob agitação contínua, houve acúmulo de propionato e oscilação do pH entre 6 e 8.

Pode-se dizer que uma mistura lenta e descontínua proporciona um maior controle do processo anaeróbio, pois mantém num ritmo lento a ocorrência da hidrólise e da acidogênese. Assim, os micro-organismos sintróficos e metanogênicos têm tempo hábil para consumir os produtos das etapas iniciais, evitando-se a inibição do processo por acúmulo de substâncias. Quanto à mistura mais vigorosa, esta provavelmente não permite que aja o estabelecimento das relações sintróficas nem a justaposição espacial entre micro-organismos (NAYONO, 2009).

Em estudo de co-digestão anaeróbia mesofílica de restos de frutas e vegetais com lodo de esgoto primário, Gómez et al. (2006) verificaram que o sistema manteve desempenho estável quanto ao rendimento e à produção específica de biogás quando operado em agitação lenta. Sob esta condição de mistura, o sistema foi capaz de absorver um aumento súbito de carga orgânica, sendo que, mesmo que tenha tido um prejuízo de desempenho, o pH do meio não foi afetado e houve um aumento na produção de biogás. Entretanto, o sistema sob as mesmas condições, porém com ausência de agitação, resultou na queda da produção específica de biogás, uma vez que foi restringido o contato entre os micro-organismos e o substrato.

Temperatura

A temperatura afeta a velocidade global do processo anaeróbio, pois seleciona os micro-organismos atuantes, bem como sua velocidade de crescimento e atividade de degradação, interferindo também na constante de equilíbrio e na solubilidade dos gases (CHERNICHARO, 2007).

A biometanização, por ser uma tecnologia dependente da temperatura (os micro-

organismos anaeróbios apresentam baixa atividade caso a temperatura esteja abaixo dos 20°C) é atrativa para países tropicais como o Brasil (CHERNICHARO, 2007). O processo pode ocorrer na faixa mesofílica (15 a 45°C), desenvolvendo-se bem entre 30 e 40°C, com temperatura ótima entre 35 e 37°C, ou na faixa termofílica (50 a 65°C), para a qual a temperatura ótima encontra-se entre 57 e 62°C (SOUZA, 1984).

Comumente, a digestão anaeróbia é realizada na faixa mesofílica, a qual é mais estável e requer menos energia, apesar da faixa termofílica propiciar maiores velocidade de digestão e de remoção de patógenos (SOUZA, 1984).

Entretanto, mais importante do que operar em uma temperatura ótima ou elevada, é manter uma temperatura uniforme dentro do biometanizador, uma vez que o processo anaeróbio é considerado muito sensível às mudanças bruscas de temperatura. Oscilações maiores que 2°C por dia podem provocar um desbalanceamento entre as populações microbianas, o que gera um desequilíbrio nas velocidades de produção e de utilização de um determinado produto, com consequente falha do processo (CHERNICHARO, 2007).

Gou et al. (2014) verificaram que a temperatura tem maior efeito sobre a diversidade das populações microbianas anaeróbias do que a alteração da carga orgânica. Os autores encontraram maior riqueza de bactérias no sistema mesofílico, o qual apresentou maior estabilidade do processo (rendimento relativamente estável de CH₄ e eficiência na remoção de sólidos voláteis). Já o sistema termofílico, apesar de apresentar maior produtividade e de suportar cargas orgânicas maiores, teve um declínio mais rápido no rendimento de CH₄ e na eficiência da remoção de sólidos voláteis, demonstrando que as bactérias termofílicas são mais sensíveis às variações do ambiente do que as mesofílicas.

pH

O pH, assim como a temperatura, exerce um forte efeito sobre a seleção e a velocidade de crescimento dos micro-organismos, afetando a eficiência da digestão anaeróbia que é dependente de diversos grupos microbianos (FORSTER CARNEIRO, 2005).

Cada grupo de micro-organismos apresenta um grau de sensibilidade distinto em relação ao pH do meio: hidrolíticos – entre 6,5 e 7; acidogênicos – em torno de 6; acetogênicos – entre 7 e 7,2; metanogênicos – entre 7 e 7,5. Contudo, a manutenção de um pH em torno da neutralidade permite o desenvolvimento adequado de todos eles. Valores de pH abaixo de 4,5 ou acima de 8,3 interferem negativamente na atividade de todos os grupos

microbianos do sistema (LAY; LI; NOIKE, 1997).

Quando há uma alteração das condições ambientais do meio (como aumento da concentração de H_2 , sobrecarga de matéria orgânica, variação da temperatura, etc.), as bactérias acetogênicas são inibidas temporariamente. Entretanto, pelo fato das bactérias acidogênicas serem relativamente insensíveis a essas variações, continuam a produzir ácidos, CO_2 e H_2 , provocando uma queda do pH do meio, devido à inibição da atividade das acetogênicas e metanogênicas (DE LA RUBIA, 2003). Com o aumento da acidez do meio, há um aumento na quantidade da forma ionizada do ácido acético, que inibe a degradação de propionato, provocando seu acúmulo no reator (FUKUZAKI et al., 1990). Este fenômeno é um ciclo fechado e quase sempre irreversível.

Apesar do pH ser medido de forma fácil e rápida, não é considerado uma boa variável para o controle do processo, pois uma vez detectada uma variação importante de pH (variação essa que ocorre com certa lentidão), o fracasso do sistema pode ser irremediável (IZA², 1995 apud FORSTER CARNEIRO, 2005, p. 244).

Alcalinidade

Em um processo anaeróbio, a alcalinidade está relacionada com a capacidade do meio manter o pH frente aos distintos problemas de operação. Esta capacidade tampão pode ser proporcionada por várias substâncias, sendo assim uma medida inespecífica (FORSTER CARNEIRO, 2005).

A alcalinidade total do sistema (AT) é a soma das alcalinidades devida ao bicarbonato (AB) e aos próprios ácidos voláteis (AV):

$$AT = AB + 0,85 * 0,833AV \quad (1)$$

Na Equação 1, AT e AB são expressas em $mgCaCO_3.L^{-1}$; AV é expresso em $mgCH_3COOH.L^{-1}$; 0,85 é o fator que leva em conta o fato de que até pH 4,3 (ponto final da titulação para a determinação da alcalinidade), apenas 85% dos ácidos voláteis são detectados; e 0,833 é o fator de transformação da concentração de ácidos voláteis de CH_3COOH para $CaCO_3$ (SOUZA, 1984; RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986). O

² IZA, J. Control del proceso anaerobio. **In:** I Curso de Ingeniería Ambiental. Universidade de Lleida, p. 1-23, 1995.

sistema estará instável quando a alcalinidade devida aos ácidos voláteis ultrapassar a alcalinidade devida ao bicarbonato, o que pode levar à quedas sensíveis de pH a qualquer novo aumento na concentração de ácidos voláteis. Um valor de alcalinidade à bicarbonato desejável está entre 2.500 e 5.000 mgCaCO₃.L⁻¹, pois nesse intervalo será garantido o poder de tamponamento do meio em digestão (SOUZA, 1984).

Ácidos graxos voláteis

Os ácidos graxos voláteis (AGV) podem se acumular no biometanizador devido, principalmente, à sobrecarga orgânica, variações de temperatura e de pH. Em concentrações entre 6.000 a 8.000 mg.L⁻¹, os ácidos voláteis não são tóxicos para a digestão anaeróbia, desde que o pH seja mantido na neutralidade (McCARTY; McKINNEY, 1961). Caso haja acúmulo de ácidos voláteis no sistema, as metanogênicas serão inibidas, bem como as acidogênicas, porém, essas últimas suportam concentrações de até 40.000 mg.L⁻¹ de ácidos voláteis (DE LA TORRE; GOMA, 1981).

Quando o biometanizador atinge condições estáveis de operação, o conteúdo de ácidos permanece constante. Caso houver modificações na concentração dos AGV, essas seriam indicativas de toxicidade ou de inibição, representando um desajuste microbiológico entre acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas (FORSTER CARNEIRO, 2005).

De acordo com Bolzonella et al. (2003), a concentração de ácidos graxos voláteis é o melhor parâmetro indicativo de desequilíbrio no meio anaeróbio, pois sua variância é nítida e pode ser percebida logo após a perturbação. Segundo esses autores, a instabilidade da biometanização pode ser verificada por meio dos seguintes parâmetros, ordenados quanto à sensibilidade às alterações: concentração de AGV > alcalinidade (à pH 4) > produção de biogás > concentração de metano no biogás > alcalinidade (à pH 6) > pH.

Nutrientes

Se as concentrações ideais de nutrientes não forem supridas, alguma forma de compensação deve ser colocada em prática, seja através da aplicação de menores cargas ao sistema de tratamento seja permitindo que a eficiência do sistema seja reduzida (CHERNICHARO, 2007). A seguir, são apresentados os principais nutrientes necessários aos micro-organismos anaeróbios:

a) Nitrogênio: geralmente é o nutriente inorgânico requerido em maiores concentrações para o crescimento dos micro-organismos. Em condições anaeróbias, o nitrogênio nas formas de nitrito e nitrato não está disponível para o crescimento bacteriano, uma vez que este é reduzido a nitrogênio gás e liberado na atmosfera. A amônia e a porção de nitrogênio orgânico (liberado durante a degradação) são as principais fontes de nitrogênio utilizadas pelos micro-organismos (CHERNICHARO, 2007).

b) Fósforo: a incorporação microbiana de fósforo na digestão anaeróbia tem sido reportada como sendo aproximadamente 1/5 a 1/7 daquela estabelecida para o nitrogênio. A maioria dos micro-organismos é capaz de utilizar o ortofosfato inorgânico, que pode ser incorporado pelas células em crescimento através da mediação de enzimas denominadas fosfatases (CHERNICHARO, 2007).

c) Enxofre: a maioria dos micro-organismos, incluindo os metanogênicos, utiliza o sulfeto como fonte de enxofre, embora alguns possam utilizar a cisteína. Se o sulfato inorgânico estiver presente, este é reduzido a sulfeto pelo processo de redução desassimilativa do sulfato. O enxofre é necessário para a síntese de proteínas, sendo requerido em quantidades relativamente pequenas, aproximadamente da mesma ordem de magnitude das necessidades de fósforo. Os requisitos de enxofre para as arqueas metanogênicas fazem parte de um quadro complexo: por um lado, a presença de sulfatos pode limitar a metanogênese, pois as bactérias redutoras de sulfato competem por substratos, como o hidrogênio e o acetato; por outro, as arqueas metanogênicas dependem da produção de sulfetos para o seu crescimento. Este cenário reflete o ambiente ecológico relativamente estreito ocupado pelos micro-organismos metanogênicos, sendo que alguns compostos inorgânicos passam de concentrações ideais à tóxicas dentro de uma pequena faixa (CHERNICHARO, 2007).

Micronutrientes

Os micronutrientes constituem cerca de 4% do peso seco das células microbianas, sendo, portanto, necessários ao crescimento desses organismos (CHERNICHARO, 2007). Contudo, a questão da falta de micronutrientes geralmente é ignorada em sistemas de

tratamento de resíduos orgânicos de origem alimentar, pelo fato dessa matéria-prima ser constituída por diversas fontes de micronutrientes (ZHANG; OUYANG; LI, 2012; ZHANG et al., 2007).

As quantidades de micronutrientes requeridas pelas metanogênicas, tanto acetoclásticas quanto hidrogenotróficas, ainda não são totalmente conhecidas, integrando o grupo de fatores negativos que impedem a aplicação comercial da biometanização (FACCHIN et al., 2013).

Entretanto, sabe-se que micronutrientes como cobalto (Co), níquel (Ni), tungstênio (W), selênio (Se) e molibdênio (Mo) são essenciais para a atividade de cofatores envolvidos na bioquímica da formação do metano, bem como para manter o balanço do processo anaeróbio (ZANDVOORT et al., 2006).

3.5 Diversidade microbiana

A diversidade dos micro-organismos resulta de aproximadamente quatro bilhões de anos de alterações evolutivas que concederam às células procarióticas versatilidade para habitarem tanto a superfície quanto o interior do planeta Terra, explorando todas as formas possíveis de sobrevivência (MADIGAN et al., 2010).

Tamanho e morfologia celulares, fisiologia, motilidade, mecanismos de divisão celular, patogenicidade, biologia do desenvolvimento, adaptação aos extremos ambientais e filogenia são alguns meios de se avaliar a diversidade microbiana presente em um ambiente (MADIGAN et al., 2010).

A importância da análise da diversidade dos micro-organismos envolvidos no processo de biometanização está em se obter informações acerca das propriedades metabólicas espécie-específica responsáveis pela decomposição dos resíduos (KLAMMER; KNAPP; INSAM, 2008).

De acordo com Quintaes et al. (2012), os métodos para a análise da diversidade microbiana podem ser enquadrados em duas categorias:

- Fenotípicos (ou tradicionais) - caracterizam os produtos da expressão gênica;
- Genotípicos (ou moleculares) - analisam a estrutura genética do organismo.

Na presente pesquisa, a diversidade dos procariotos dos biometanizadores foi analisada a partir da conjunção de dados de um método fenotípico (microscopia óptica) com

dados de um método genotípico (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante – DGGE). A seguir, são abordados alguns detalhes de cada método, a fim de exemplificar as categorias fenotípica e genotípica relacionadas ao estudo de diversidade microbiana.

3.5.1 Microscopia óptica

A microscopia óptica (ou luminosa) permite a visualização de células procarióticas (e de seus componentes) que não são visíveis a olho nu por apresentarem tamanhos diminutos compreendidos entre micrômetros e nanômetros (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

A função de um microscópio óptico é formar e ampliar a imagem de uma amostra a partir da incidência de luz, a qual passa por lentes objetivas e oculares, permitindo a visualização. Ainda, o microscópio aumenta o poder de resolução do olho humano (capacidade de distinguir dois pontos muito próximos um do outro), que é restrito à faixa de 0,1 a 0,2 mm (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

Dentre os tipos de microscopia na qual o aumento é obtido por um sistema de lentes que recebem um feixe de luz, estão a microscopia de contraste de fase e a microscopia de fluorescência, ambas utilizadas nesta pesquisa para examinar as amostras provenientes dos biometanizadores.

3.5.1.1 Microscopia de contraste de fase

A microscopia de contraste de fase foi inventada em 1.936 por Frits Zernike, um físico e matemático holandês, que utilizou como princípio a natureza das ondas dos raios luminosos e o fato desses raios poderem estar em fases (quando seus picos e vales combinam-se) ou fora de fase (MADIGAN et al., 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Em um microscópio de contraste de fase, um conjunto de raios luminosos sai da fonte de luz e o outro conjunto provém da luz refletida ou difratada de uma estrutura particular na amostra. Quando os dois conjuntos de raios de luz (da fonte e refletido ou da fonte e difratado) são reunidos, a imagem da amostra é formada na lente ocular, contendo áreas que são relativamente claras (em fase), bem como intensidades de cinza até a cor negra, as quais estão fora de fase (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O resultado é uma imagem com graus variáveis de luminosidade, coletivamente denominados contrastes, que originam-se devido a presença de materiais com espessura ou densidade diferentes (quanto mais denso o material, mais clara será a sua imagem e vice-versa) (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

Pelo fato de não ser necessária a fixação da amostra na lâmina e de dispensar o uso de corantes, a microscopia de contraste de fase permite a observação de preparações à fresco (vivas), evitando-se procedimentos que poderiam matar os micro-organismos ou alterar suas características (MADIGAN et al., 2010).

3.5.1.2 Microscopia de fluorescência

Quando as espécies presentes na amostra são capazes de fluorescer (seja por serem autofluorescentes ou por serem tratadas com algum composto fluorescente), há a absorção de comprimentos de luz de ondas curtas (ultravioleta) e a produção de luz em um comprimento de onda maior (visível). Esta é a base da microscopia de fluorescência, na qual os micro-organismos emitem luz de uma cor quando iluminados com luz de outra cor (MADIGAN et al., 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A identificação de células e colônias metanogênicas pode ser realizada com o uso dessa microscopia, pois as arqueas produtoras de metano são autofluorescentes: possuem uma coenzima, a F_{420} , que participa como doadora de elétrons em várias etapas da redução de CO_2 , e, quando oxidada, absorve luz na faixa de 420 nm e fluoresce na cor verde-azulada. Caso esteja na forma reduzida, a coenzima F_{420} torna-se incolor (MADIGAN et al., 2010; OREMLAND, 1988).

3.5.1.3 Informações obtidas com a microscopia óptica

A observação microscópica de um micro-organismo permite o conhecimento de sua morfologia grosseira, ou seja, obtêm-se informações sobre o tamanho, a forma e o arranjo celulares (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

De acordo com Madigan et al. (2010), ainda não se sabe como a morfologia de uma espécie é determinada, mas possivelmente é devido à ação de forças seletivas, como por exemplo:

- otimização da captação de nutrientes (determina se uma célula será pequena ou com elevada proporção entre superfície e volume);
- mobilidade natatória em ambientes viscosos ou próximos à superfícies (determina se as células serão helicoidais ou espiraladas);
- motilidade por deslizamento (determina micro-organismos filamentosos).

Verifica-se que a morfologia não é apenas uma característica trivial da célula microbiana, mas sim uma característica geneticamente direcionada e evolutivamente selecionada para que a espécie adeque-se ao máximo a um hábitat particular (MADIGAN et al., 2010).

Tamanho

Os procariotos, em geral, apresentam dimensões médias de 1 X 2 μm , contudo, pode-se encontrar células muito pequenas, com diâmetro de aproximadamente 0,2 μm , até aquelas com diâmetro maior que 700 μm (MADIGAN et al., 2010). Comumente, os micro-organismos são visualizados pelo microscópio sob uma magnitude de 1.000 vezes (comparativamente, se uma mosca doméstica fosse vista sob a mesma magnitude, pareceria ter mais de 9 m de comprimento) (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

Uma propriedade decorrente do tamanho dos procariotos é a alta razão que apresentam entre área superficial e volume celular (quando comparados a organismos maiores de morfologia similar), ou seja, há uma grande superfície através da qual os nutrientes podem entrar em relação a um pequeno volume celular a ser alimentado. Essa particularidade explica, em partes, a alta taxa de metabolismo e crescimento dos micro-organismos, além de afetar seu processo evolutivo (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

A vantagem evolutiva de células com dimensões menores está no maior número de mutações que podem ocorrer durante a replicação do DNA, pelo fato de tais células crescerem mais rápido que células maiores, além de serem capazes de sustentar uma população maior com a mesma quantidade de recursos. Ainda, a rapidez de crescimento e de evolução está relacionada à expressão imediata das mutações nas células haplóides em detrimento das células diplóides (MADIGAN et al., 2010).

Forma e Arranjo

A forma de um micro-organismo é determinada por hereditariedade, entretanto, condições ambientais têm a capacidade de modificar a forma microbiana, dificultando sua identificação. A maioria dos procariotos é monomórfica (mantém uma única forma durante toda a vida), existindo algumas espécies que são geneticamente pleomórficas, como bactérias do gênero *Corynebacterium* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

No Quadro 6 são apresentadas as formas básicas mais comuns dos procariotos, bem como alguns agrupamentos originados a partir da divisão de tais formas.

Quadro 6 – Formas básicas mais comuns e respectivos arranjos celulares apresentados por procariotos

FORMA		ARRANJO	
Coco		diplococo
		em cadeia
		téttrade
		sarcina
		irregular
Bacilo		diplobacilos
		em cadeia
		cocobacilos
Espiralada		vibrião
		espiroqueta

Fonte: adaptado de Tortora, Funke e Case (2012).

Conhecer a morfologia dos micro-organismos que participam da biometanização dos resíduos sólidos orgânicos é importante para o entendimento do processo, mas não é suficiente para prever propriedades celulares (fisiológicas, ecológicas, filogenéticas) que fornecerão informações para a otimização e controle do sistema.

Um exemplo da limitação da técnica microscópica é que a morfologia observada de uma *Archaea* bacilar é idêntica a de uma *Bacteria* bacilar, apesar de pertencerem a domínios filogenéticos distintos (MADIGAN et al., 2010). Contudo, o uso de técnicas moleculares pode superar tal entrave e complementar o estudo de imagem, pois baseia-se na análise direta do DNA amostral a partir da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de genes conservados que diferenciam, por exemplo, membros do domínio *Archaea* e *Bacteria* (VANWONTERGHEM et al., 2014).

3.5.2 Técnicas moleculares

Vanwongerghem et al. (2014) defendem que, antes de direcionar esforços para a otimização da biometanização e de seus produtos, é necessário entender as capacidades metabólicas dos micro-organismos envolvidos no processo, bem como o nível da redundância funcional dentro da comunidade e os mecanismos fundamentais de interações interespecíes.

O estudo da comunidade microbiana de ambientes naturais e de sistemas de engenharia (como um biometanizador) torna-se limitado quando baseado apenas em métodos tradicionais de cultivo, já que os micro-organismos cultiváveis representam uma pequena fração da comunidade. Dessa forma, tende-se a subestimar a diversidade microbiana quanto à riqueza e à abundância de espécies (WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKEBRANDT, 1997). Ainda, a identificação microbiana pelos métodos de cultivo é dispendiosa, pois requer o isolamento de culturas puras seguido de vários testes para a verificação de traços fisiológicos e bioquímicos (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Embora métodos de cultivo tenham sido úteis na identificação de populações que desenvolvem processos metabólicos específicos na digestão anaeróbia (McCARTY, 1982), não permitem o entendimento completo da ecologia e fisiologia microbianas, pois não levam em consideração fatores ambientais (fontes de competição e interações bióticas e abióticas) que influenciam nas atividades e funções dos micro-organismos (VANWONTERGHEM et al., 2014).

As restrições impostas pelos métodos tradicionais impulsionaram o desenvolvimento de investigações independentes de cultivo, surgindo em 1.980 as técnicas moleculares, as quais são fundamentadas na análise direta dos ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico - DNA e ácido ribonucleico - RNA) (SU et al., 2012).

Para estudos de diversidade, os ácidos ribonucleicos ribossomais (RNAr) são considerados os mais adequados, pois estão distribuídos universalmente em todos os seres vivos de forma abundante e altamente conservada ao longo da evolução. Ainda, apresentam variabilidade em diferentes regiões da molécula, permitindo desde a comparação de organismos dentro do mesmo domínio, até a diferenciação de estirpes da mesma espécie (SANZ; KÖCHLING, 2007).

Em análises que envolvem procariotos, comumente utiliza-se a subunidade menor do RNAr (RNAr 16S), que é composta por aproximadamente 1.500 nucleotídeos. Apesar da subunidade maior (RNAr 23S) conter duas vezes mais informações e, portanto, garantir maior acurácia nas inferências filogenéticas, o RNAr 16S tornou-se referência principalmente pela facilidade de sequenciamento (REIS JUNIOR et al., 2002).

A aplicação de técnicas moleculares no estudo dos micro-organismos envolvidos no processo de biometanização fornece dados que, se analisados em conjunto com dados de técnicas complementares (que utilizam imagem, isótopo marcado e levantamento de

características físico-químicas do meio) permitirão o avanço do entendimento sobre como a estrutura e dinâmica microbianas influenciam no desempenho global e eficiência da biometanização e como a alimentação, configuração do biometanizador e condições operacionais determinam tais características da comunidade de procariotos (VANWONTERGHEM et al., 2014).

De maneira geral, os métodos moleculares podem ser divididos em dois grupos: um deles, também conhecido como técnicas de *fingerprinting*, analisa a estrutura de uma comunidade através de um perfil de amplificação de genes RNAr 16S via PCR, como, por exemplo, a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*); o outro grupo, que pode ser representado pelos sequenciamentos de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*), é constituído por métodos que envolvem o sequenciamento do gene RNAr 16S dos membros da comunidade para posterior identificação destas sequências em banco de dados (DUARTE, 2010).

Normalmente, os estudos da diversidade microbiana utilizando técnicas moleculares empregam a seguinte sequência procedimentos: amostragem; extração de DNA, RNA ou proteína; amplificação/identificação do fragmento do genoma, transcriptoma ou proteoma; distinção dos diferentes fragmentos e análise dos resultados experimentais (SU et al., 2012).

Na Figura 7 é apresentado um resumo desses procedimentos experimentais utilizados em técnicas independentes de cultivo.

Figura 7 - Sequência de procedimentos experimentais básicos que antecedem algumas das técnicas moleculares mais comuns (caixas pontilhadas). A sequência marcada em vermelho corresponde aos procedimentos utilizados na presente pesquisa

Legenda: FISH (Hibridização fluorescente *in situ*); qPCR (PCR quantitativo); T-RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição terminal); SSCP (Polimorfismo de conformação de fita simples); RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição); DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante).

Fonte: adaptado de Su et al. (2012).

3.5.2.1 Extração de DNA

Para se obter dados informativos a partir de amostras de um biometanizador, deve-se garantir que a extração de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) resulte em um produto de alta qualidade (TALBOT et al., 2008). É importante considerar que não é possível garantir resultados satisfatórios aplicando-se o mesmo protocolo ou kit de extração para amostras provenientes de diferentes ambientes/sistemas (GUO; ZHANG, 2013). Cada tipo de amostra, dependendo de sua origem e características, exigirá adaptação e otimização de um determinado procedimento de extração (TALBOT et al., 2008).

Os componentes de uma solução extratora variam de acordo com o protocolo utilizado, mas, no geral, são basicamente os seguintes: tampão estabilizador de pH, sal para

dissociar proteínas, detergente para solubilizar membranas e um agente inativante de endonucleases para proteger os ácidos nucleicos (COSTA; MOURA, 2001).

A lise das células para a liberação do material genético pode ser realizada antes ou depois de separar as células (e restos celulares) da matriz na qual se encontram. O método de extração será denominado de direto se as células são lisadas na matriz para posterior separação; enquanto que o método de extração indireto primeiramente separa as células da matriz para somente depois lisá-las (WEISS; JÉRÔME; FREITAG, 2007). No Quadro 7 são apresentadas informações comparativas entre os dois tipos de extração.

Quadro 7 - Comparação entre os métodos direto e indireto de extração de DNA aplicados ao estudo de procariotos

Método de extração	Quando utilizar	Vantagens	Desvantagens
Direto	<p>Para caracterizar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - a diversidade taxonômica dos procariotos - a diversidade de sequências de um conjunto de genes específico 	<ul style="list-style-type: none"> - o DNA extraído apresenta elevado rendimento e potencial reduzido de conter contaminantes inibitórios 	<ul style="list-style-type: none"> - o DNA extraído contém material genético de eucariotos e material extracelular, implicando em superestimação do rendimento obtido em relação aos procariotos - o DNA liberado na lise <i>in situ</i> pode se ligar em argilas ou matéria orgânica, limitando sua recuperação - os fragmentos de DNA obtidos raramente são maiores que 20 kb, o que limita estabelecer conexão entre taxonomia e função
Indireto	<p>Para construir bibliotecas metagenômicas de DNA procariótico</p>	<ul style="list-style-type: none"> - favorece a recuperação de maiores fragmentos de DNA; - favorece o estabelecimento de conexão entre taxonomia e função - o DNA extraído é exclusivo de procariotos 	<ul style="list-style-type: none"> - resulta em baixo rendimento de DNA, reduzindo o potencial de eficiência da amostra, já que a diversidade filogenética da população amostral representa a diversidade de toda a comunidade

Fonte: adaptado de Williamson et al. (2011).

Moré et al. (1994) trabalharam com amostras de sedimento rico em matéria orgânica (assim como as amostras provenientes de um biometanizador) e demonstraram que a combinação de tratamentos físicos e químicos como congelamento e descongelamento, lise das células com detergente e pelo método de “*bead beating*”, lisaram com alta eficiência

aproximadamente 96% das células contidas na amostra, bem como esporos bacterianos.

Entretanto, conforme Head, Saunders e Pickup (1998), mesmo que determinado procedimento de extração tenha fornecido bons resultados para uma amostra, a aplicação da mesma técnica em uma amostra semelhante pode gerar resultado diferente, devendo-se, portanto, determinar o grau de lise das células de forma independente para cada tipo de amostra.

Após a extração, é preciso quantificar o ácido nucleico e verificar se houve degradação da molécula. Entre as técnicas disponíveis para esse fim, as mais utilizadas são a análise comparativa em gel de agarose corado com brometo de etídio e a leitura em espectrofotômetro (COSTA; MOURA, 2001).

Logo após correr a amostra em um gel de agarose, a integridade do DNA extraído pode ser verificada, bem como a posição e intensidade da banda pode ser comparada com as bandas de um padrão de corrida (*ladder*) e, assim, estimar a concentração do DNA extraído. Contudo, a estimativa de concentração de DNA fornecida por esse método é semi-quantitativa, sendo que pode-se gerar confusão quando várias bandas são observadas juntas ou quando a corrida resulta em um “rastros” (*smear*) (CLARK; CHRISTOPHER, 2000).

O espectrofotômetro UV garante um valor de concentração de DNA mais acurado que a estimativa em gel de agarose. A leitura em espectrofotômetro é baseada nos comprimentos de onda absorvidos pelo DNA e pelos prováveis contaminantes co-extraídos.

Considerando que o DNA absorve luz na faixa de 260 nm e os contaminantes de proteínas e ácidos húmicos absorvem luz na faixa de 280 e 230 nm, respectivamente, a pureza do DNA extraído pode ser indicada pelas relações de absorbância $A_{260/280}$ (DNA/proteína) e $A_{260/230}$ (DNA/ácidos húmicos). Amostras com pureza satisfatória apresentam valores da relação $A_{260/280}$ entre 1,8 e 2 e da relação $A_{260/230}$ entre 1,8 a 2,2 (SAMBROOK; RUSSELL, 2006).

Caso o rendimento e a qualidade do ácido nucleico extraído sejam baixos, a coleta de grandes quantidades em volume/massa de amostra do biometanizador é necessária (TALBOT et al., 2008).

3.5.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A partir da etapa de extração, obtém-se o DNA total contido em uma amostra. Normalmente, o alvo das análises são apenas sequências específicas (conhecidas ou não) que estão presentes nesse DNA total. Para estudá-las através de técnicas da biologia molecular são

necessárias grandes quantidades dessas sequências que, ao invés de serem obtidas extraíndo-se mais DNA de amostras ou empregando-se os dispendiosos métodos de clonagem, podem ser geradas utilizando-se a reação em cadeia da polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

A PCR foi desenvolvida em 1.983 por Kary Mullis e consiste em uma técnica que faz cópias de um segmento de até alguns milhares de pares de bases (o alvo) dentro de um tubo de ensaio, a partir de moléculas maiores de DNA (o molde), processo esse denominado de amplificação (MADIGAN et al., 2010).

O volume de amostra requerido para a realização da PCR é significativamente pequeno e até mesmo os organismos presentes em menor número de indivíduos podem ser detectados após a amplificação (WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKEBRANDT, 1997).

Os componentes que devem estar presentes na amplificação do DNA por PCR são os seguintes (PÉREZ DE CASTRO, 2011):

- DNA molde – DNA extraído e purificado que contém determinado fragmento do qual deseja-se obter cópias;
- DNA polimerase termoestável – enzima capaz de gerar cópias de DNA a partir do DNA molde, não sendo afetada pela alta temperatura empregada na etapa de desnaturação;
- Tampão de reação – necessário para o funcionamento da DNA polimerase, apresentando, dentre outros componentes, o $MgCl_2$, que é um doador estável de íons Mg^{2+} , cofator indispensável para atividade da enzima;
- Primers (iniciadores) – delimitam o fragmento de DNA a ser amplificado;
- Nucleotídeos livres – são os chamados desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) que serão polimerizados sobre a molécula molde, para formar as cópias do fragmento desejado.

Com os componentes presentes em um tubo de ensaio, a PCR se processará em ciclos de três fases - desnaturação, hibridização e extensão (Quadro 8), que compreendem a incorporação de nucleotídeos complementares ao DNA molde pela enzima polimerase a partir da região de cadeia dupla formada pela união dos *primers* com o DNA molde. Para que esse processo ocorra, é fundamental a mudança de temperatura entre uma fase e outra (PÉREZ DE CASTRO, 2011).

Quadro 8 - Características de cada uma das três etapas que constituem um ciclo de PCR

FASE DA PCR	TEMPERATURA	O QUE OCORRE
Desnaturação	94°C	Separação das fitas do DNA molde
Hibridização	45 - 65°C	Hibridização dos <i>primers</i> com suas sequências complementares no DNA molde desnaturado
Extensão	Depende da enzima utilizada 72°C (para Taq Polimerase)	A DNA polimerase, na presença íons Mg^{2+} e dNTPs, sintetiza uma nova fita de DNA a partir da extremidade 3' OH do <i>primer</i> que se encontra hibridizado ao DNA molde

Fonte: adaptado de Pérez de Castro (2011).

Ao fim do primeiro ciclo da PCR, os fragmentos gerados não apresentam o mesmo tamanho, pois o início da amplificação se inicia a partir do extremo 3', no qual o *primer* se hibridiza com o DNA molde, e termina quando a DNA polimerase não é mais capaz de adicionar nucleotídeos. O tamanho dos fragmentos será limitado somente com a ocorrência dos próximos ciclos, pois o produto de cada ciclo será molde para o seguinte, sendo que cada vez mais os fragmentos passarão a ser limitados pelos *primers*. Como geralmente são realizados de 20 a 30 ciclos de PCR, ao final, a maioria dos fragmentos serão aqueles limitados por *primers* (do mesmo tamanho) (PÉREZ DE CASTRO, 2011).

Como um ciclo requer aproximadamente cinco minutos para ser concluído e a cada ciclo duplica-se a quantidade de DNA alvo original, em poucas horas é possível obter grande quantidade de cópias do fragmento desejado (pode-se calcular a quantidade final de fragmentos amplificados aplicando-se 2^n , onde n corresponde ao número total de ciclos) (MULLIS; FERRÉ; GIBBS, 1994; MADIGAN et al., 2010).

Deve-se ter conhecimento que a etapa de amplificação pode ser inibida por substâncias co-extraídas com o DNA total, principalmente aquele oriundo de amostras de ambientes complexos, como um biometanizador (WEISS; JÉRÔME; FREITAG, 2007).

Há três pontos principais nos quais os inibidores podem interferir, prejudicando a amplificação por PCR (WILSON, I. G., 1997):

- na lise das células (etapa necessária para a extração do DNA);
- na atividade da polimerase responsável pela amplificação do DNA alvo;
- degradando ou capturando o ácido nucleico.

No caso de amostras de biometanizadores de resíduos sólidos orgânicos, os inibidores mais comuns da PCR são as substâncias húmicas, dentre elas, o ácido húmico, sintetizado naturalmente durante o processo de decomposição química e biológica da matéria orgânica

(WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKEBRANDT, 1997).

Os modos de interferência do ácido húmico são os seguintes (ROBE et al., 2003):

- seus grupos fenólicos se ligam às amidas do DNA, provocando a desnaturação desse ácido nucleico;
- quando oxidados, formam quinonas, as quais se ligam covalentemente ao DNA;
- inibe a ação da Taq DNA polimerase, inviabilizando a amplificação via PCR.

Vários métodos de extração e purificação de DNA têm sido desenvolvidos a fim de remover inibidores e contaminantes de amostras oriundas de ambientes complexos, já que, no caso dos ácidos húmicos, pequenas quantidades (em torno de 10 ng) são capazes de inibir ou reduzir a sensibilidade e especificidade da amplificação por PCR (TSAI; OLSON, 1992).

Pelo fato de não existir um método de extração e purificação de DNA próprio para amostras de biometanizadores, Weiss, Jérôme e Freitag (2007) compararam cinco kits comerciais e um método padrão desenvolvido por Wilson K. (1997), sendo que a escolha de tais protocolos foi realizada a fim de se testar as formas típicas de isolamento de DNA: por meio de adsorção, extração ou precipitação.

Os autores verificaram qual, dentre os seis métodos, resultaria em DNA genômico que fosse passível de uma amplificação satisfatória e que representasse a comunidade microbiana total presente em amostras de um biometanizador termofílico contínuo, operado desde 1.998 na Alemanha para o tratamento de resíduos sólidos orgânicos provenientes do meio urbano e rural.

Nenhum dos métodos testados obteve um material genético que pudesse ser diretamente amplificado via PCR, pois quantidades consideráveis de inibidores, provavelmente ácidos húmicos, ainda estavam presentes no DNA extraído. O melhor resultado (com a maior concentração de DNA e maior pureza) foi obtido da adaptação que os autores fizeram do método de Wilson K. (1997), propondo a combinação de fenol/clorofórmio para a extração do DNA seguida de purificação via diálise.

Uma maneira de minimizar o efeito negativo dos inibidores sobre a amplificação seria diluir o DNA extraído. Contudo, essa prática não é recomendada, pois concentrações muito baixas de DNA podem influenciar a eficiência da PCR (WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKEBRANDT, 1997).

3.5.2.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

A diversidade da comunidade microbiana de um biometanizador pode ser analisada pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante, a qual baseia-se no princípio de que fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com sequências nucleotídicas distintas (em pelo menos um par de bases) migrarão para posições distintas em um gel de poliacrilamida, conforme diferenças no comportamento de desnaturação (MUYZER; SMALLA, 1998).

Como resultado, tem-se um perfil de bandas (impressão digital), que reflete a diversidade genética da amostra em determinado tempo e sob determinadas condições, sendo que o número de bandas corresponde, teoricamente, ao número de espécies dominantes (SANZ; KÖCHLING, 2007).

O meio de reação no interior de um biometanizador sofre variações ao longo do tempo, como por exemplo, com a entrada de material fresco para ser digerido ou com instabilidades (como alteração de pH) às quais o processo é suscetível. Dentre as técnicas moleculares disponíveis, o DGGE é adequado para o estudo da ecologia microbiana de biometanizadores por permitir que o comportamento dos micro-organismos seja monitorado a partir da análise simultânea de várias amostras coletadas em diferentes tempos de operação (MUYZER; SMALLA, 1998).

Há diversos trabalhos que utilizaram o DGGE no estudo da biometanização de resíduos sólidos orgânicos, sendo alguns exemplos apresentados no Quadro 9. A técnica de DGGE pode ser empregada em conjunto com outras técnicas moleculares. Normalmente, o sequenciamento é utilizado como técnica complementar por fornecer a afiliação filogenética de fragmentos (bandas) de interesse, uma vez que o DGGE apenas informa sobre a diversidade da comunidade microbiana, não identificando seus membros.

Apesar de amplamente utilizada, essa técnica de *fingerprinting* genético apresenta algumas limitações:

- separa fragmentos amplificados relativamente pequenos, que tenham tamanho de até 500 pb, restringindo a quantidade de informação disponível para inferências filogenéticas, bem como para o desenho de sondas (MYERS et al., 1985);
- apenas espécies com dominância acima de 1% no meio podem ser detectadas (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993; MURRAY; HOLLIBAUGH; ORREGO, 1996);

- a co-migração de fragmentos pode prejudicar a recuperação da banda de interesse, que deixará de apresentar a sequência de um único organismo (MUYZER; SMALLA, 1998).

Quadro 9 - Exemplos de trabalhos que utilizaram o DGGE para analisar a comunidade microbiana presente em biometanizadores

Origem da amostra	Objetivo relacionado à utilização do DGGE	Técnicas moleculares empregadas	Referência
Fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (proveniente de usina de triagem mecânica) inoculada com lodo fermentado (de digestor mesofílico de estação de tratamento de efluentes urbanos)	Comparar se há variações na estrutura da comunidade de arqueas metanogênicas quando varia-se o tamanho do substrato	DGGE e FISH	Bernat et al. (2015)
Quatro diferentes fontes de resíduo orgânico: - lodo de esgoto primário; - lodo ativado; - lodo de tanque séptico; - resíduos alimentares	Caracterizar a comunidade de Bacteria e Archaea em biometanizadores tratando diferentes os tipos de resíduos orgânicos	DGGE, sequenciamento e qPCR	Kim et al. (2015)
Lodo ativado co-digerido com resíduo orgânico domiciliar	Verificar o efeito de diferentes cargas orgânicas e temperaturas sobre a comunidade microbiana	DGGE	Gou et al. (2014)
Resíduo orgânico domiciliar co-digerido com resíduos de papel e plástico; inoculação com lodo de estação de tratamento de efluentes urbanos	Analisar a estrutura e diversidade da comunidade de Bacteria e Archaea	DGGE e sequenciamento	Wan et al. (2013)
Co-digestão de resíduos de frutas e vegetais (coletados em feira) com resíduos alimentares (coletados em restaurante), inoculados com lodo granular de reator UASB tratando efluente do processamento de amido	Avaliar a dinâmica da comunidade metanogênica em biometanizadores contendo diferentes proporções dos substratos da co-digestão	DGGE e sequenciamento	Lin et al. (2012)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi conduzida nas dependências da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, em conjunto com o projeto de mestrado de Fernanda Resende Vilela (*Biometanização: estudo da influência do lodo e da serragem no tratamento anaeróbio da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos*), que realizou a coleta periódica de dados físico-químicos das frações sólida, líquida e gasosa para analisar o desempenho dos mesmos biometanizadores estudados pelo presente trabalho.

4.1 Biometanizadores experimentais

Foram adaptados quatro tambores de leite de 50 L (marca Milkan) de forma que favorecessem o estabelecimento de um meio anaeróbio, permitissem a medição da temperatura no interior do biometanizador, a coleta de biogás e chorume, bem como a adição de substâncias (água, solução alcalinizante e chorume) (Figura 8).

Figura 8 - Tambor de leite de polietileno de alta densidade adaptado para funcionar como um biometanizador experimental. **a)** Adaptações e peças da tampa. **b)** Adaptações e peças do corpo

Fonte: Próprio autor.

Na tampa, a saída para biogás foi acoplada a uma mangueira de poliuretano conectada a um frasco de Mariotte de 1 L, responsável pela medição do volume de biogás produzido nos biometanizadores (Figura 9).

Figura 9 - Frasco de Mariotte utilizado na medição do volume de biogás produzido

Fonte: Próprio autor.

Na lateral do biometanizador foi inserido um tarugo de nylon perfurado no diâmetro do termopar tipo K (sensor de temperatura simples), permitindo sua passagem para o lado externo com reduzida possibilidade de entrada de oxigênio no meio interno. O termopar foi encapsado com espaguete termocontrátil para evitar sua oxidação. Para a leitura da temperatura, o sensor foi conectado a um termômetro digital (Minipa MT-405) (Figura 10).

Figura 10 - Aparato para a medição da temperatura nos biometanizadores. **a)** Termopar encapsado com espaguete termocontrátil inserido no centro da massa de resíduos. **b)** Termômetro digital e termopar tipo K

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 11 é apresentada uma visão geral do sistema, após os biometanizadores serem fechados e vedados com silicone na tampa (Adesivo Veda Calha AMAZONAS).

Figura 11 - Biometanizadores em operação

Fonte: Próprio autor.

4.2 Coleta dos resíduos

Cada biometanizador constituiu um tratamento diferente. Com o objetivo de equilibrar o sistema e favorecer a atividade microbiana, testou-se a digestão anaeróbia da FORSU em conjunto com serragem (resíduo com elevada relação C/N) e lodo de esgoto (inóculo) proveniente de reator UASB.

A FORSU foi coletada em estabelecimentos localizados ao redor da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (Figura 12). Os responsáveis pelos estabelecimentos foram previamente informados sobre o projeto através de um *folder* explicativo (Apêndice A). Optou-se por utilizar a FORSU separada na fonte para evitar resíduos não biodegradáveis e indesejados que pudessem prejudicar o processo, além de incentivar a prática da responsabilidade compartilhada, conforme estabelecido na atual Política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010) (BRASIL, 2010a).

A serragem foi fornecida pela Belarte Marcenaria e o lodo de esgoto pela Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, ambos localizados no município de São Carlos, São Paulo.

Figura 12 - Mapa com a delimitação em vermelho da Escola de Engenharia de São Carlos/USP e a localização dos pontos de coleta da FORSU

Fonte: Próprio autor.

4.3 Preparo dos resíduos e preenchimento dos reatores

No dia seguinte à coleta, a FORSU foi triturada em triturador elétrico modelo TRAPP 500E, o qual fornece um tamanho máximo de corte de 10 cm. Os resíduos coletados caracterizaram-se por ser majoritariamente restos de frutas, verduras e hortaliças (Figura 13).

A partir dos três resíduos afluentes (Figura 14), os biometanizadores foram preenchidos da seguinte forma:

- biometanizador 1 – somente FORSU (controle);
- biometanizador 2 – FORSU, serragem e lodo;
- biometanizador 3 – FORSU, serragem e o dobro da quantidade de lodo do biometanizador 2;
- biometanizador 4 – FORSU e serragem.

Figura 13 - Fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos antes e após a trituração

Fonte: Próprio autor.

Figura 14 - Resíduos que compuseram o conteúdo afluente dos biometanizadores. a) FORSU triturada. b) serragem. c) lodo de esgoto de reator UASB

Fonte: Próprio autor.

O regime de alimentação dos biometanizadores foi em batelada, com operação em fase única, via seca e temperatura mesofílica (ambiente).

A composição em massa do afluente de cada biometanizador foi calculada considerando-se a densidade e a relação C/N dos componentes, de forma a atingir 70% da capacidade útil dos biometanizadores e uma relação C/N do resíduo de entrada entre 20 a 30/1 (Tabelas 1 e 2).

Entretanto, este cálculo teórico não foi adequado, pois após o preenchimento dos biometanizadores, verificou-se que a relação C/N do material de entrada encontrava-se acima

do valor pretendido. No caso, o cálculo deveria ter sido feito na base seca. A Tabela 3 apresenta as características físico-químicas dos materiais de entrada dos biometanizadores.

Tabela 1 - Dados utilizados no cálculo da composição mássica do conteúdo afluyente de cada biometanizador

Volume do reator (Vr)	Volume ocupado pelo meio drenante (Vd)	Volume útil ((Vr – Vd)*0,7)
50 L	10,9 L	27,4 L
Componentes do afluyente	Densidade (kg.m ⁻³)	Relação C/N
FORSU triturada	868,25	16,3
Serragem	142,5	132,6
Lodo	981,5	4,64

Fonte: Próprio autor.

Tabela 2 - Composição em massa dos resíduos de entrada dos biometanizadores

Biometanizadores 50 L	FORSU triturada (kg)	Serragem (kg)	Lodo de esgoto (kg)
1	24	-	-
2	12	1,76	1,34
3	11	1,76	2,69
4	13	1,76	-

Fonte: Próprio autor.

Tabela 3 - Características dos resíduos de entrada dos biometanizadores de 50 L

Biometanizadores 50 L	pH	DQO (gO ₂ .kg ⁻¹)	ST (%)	STV (%)	U (%)	Relação C/N
1	4,34	619,5	11,04	94,92	88,96	63
2	4,14	549,5	31,58	99,84	68,42	77
3	4,20	552	21,43	95,1	78,57	62
4	4,21	517	27,74	96,06	72,26	173

Fonte: Próprio autor.

Pelo fato dos resíduos de entrada de todos os biometanizadores apresentarem baixo pH (em torno de 4), foi necessário acrescentar uma base forte (NaOH) para que o pH de partida fosse elevado à aproximadamente 8. Em cada biometanizador foram colocados 30,7 g de NaOH diluídos em 500 mL de água destilada, homogeneizando-o à massa de resíduos (Figura 15).

Figura 15 - Aspecto visual da massa de resíduos de cada biometanizador após o carregamento

Fonte: Próprio autor.

Após serem vedados, os biometanizadores foram operados por 150 dias e, durante este período, foram monitorados quinzenalmente por meio das análises apresentadas no Quadro 10 (a dissertação de mestrado de Fernanda Resende Vilela intitulada “Biometanização: estudo da influência do lodo e da serragem no tratamento anaeróbico da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (FORSU)” descreve detalhadamente o procedimento para cada análise).

Quadro 10 - Análises realizadas quinzenalmente para o monitoramento e controle da digestão anaeróbia

AMOSTRA	PARÂMETRO ANALISADO	MÉTODO UTILIZADO
Chorume	pH	Medida potenciométrica: método 4500 – H ⁺ (APHA, 2012)
	Alcalinidade (Total e à Bicarbonato)	Titulação potenciométrica: método 2320 – B (APHA, 2012)
	Ácidos Graxos Voláteis	Cromatografia gasosa (cromatógrafo GC 2010)
	Sólidos (Totais, Fixos e Voláteis)	2540 – B e 2540 – E (APHA, 2012)
	Carbono Orgânico Total	Método 5310 – B (APHA, 2012)
	Nitrogênio (Total e Amoniacal)	Método titulométrico: 4500 – B e 4500-NH ₃ (APHA, 2012)
	Demanda Química de Oxigênio	Método colorimétrico: 5220 – C (APHA, 2012)
	Fósforo (Total e Inorgânico)	Método do Ácido Ascórbico: 4500 – PE (APHA, 2012)
	Cloretos	Método Nitrato-Mercúrio: 4500-Cl ⁻ C (APHA, 2012)
	Sulfetos	Método Azul de Metileno: 4500-S ²⁻ D (APHA, 2012)
Biogás	Composição por cromatografia gasosa (CH ₄ , H ₂ , N ₂ , CO ₂ , e H ₂ S)	Cromatógrafo GC-2010 (Gás de arraste: argônio) Cromatógrafo GC-2014 (Gás de arraste: hidrogênio)

Fonte: Próprio autor.

A medição de temperatura (interna de cada biometanizador, do laboratório e da área externa ao laboratório) foi realizada diariamente, desde o dia da vedação até a abertura dos biometanizadores.

A partir do 15º dia de operação, fez-se a recirculação do chorume uma vez por semana, a fim de manter a umidade na massa de resíduos em digestão e retornar nutrientes para o sistema (Figura 16).

Todo o chorume dos biometanizadores era drenado, fazia-se a medição do pH e caso estivesse abaixo de 6,5, um alcalinizante era adicionado (foram utilizados: hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio). O cálculo da quantidade de alcalinizante adicionada foi baseado nos níveis ditos inibitórios em referências da literatura: 3500 – 5500 mg.L⁻¹ para sódio (VAN BUREN, 1979) e 2500 mg.L⁻¹ para potássio (PARKIN; OWEN, 1986).

As recirculações foram realizadas até o 2º mês de operação, pois o pH do chorume passou a apresentar valores abaixo de 6,5 e não poderiam mais ser corrigidos com alcalinizantes devido ao risco de inibição.

Figura 16 - Exemplo de drenagem e recirculação do chorume nos biometanizadores de 50 L. **a)** Drenagem de todo o chorume do biometanizador. **b)** Recirculação do chorume após correção do pH com alcalinizante

Fonte: Próprio autor.

Como não houve produção de metano em nenhum dos reatores após 97 dias de operação, decidiu-se montar biometanizadores em menor escala. A composição dos afluentes dos novos biometanizadores baseou-se na composição do biometanizador de 50 L que apresentava o melhor desempenho até então (principalmente aquele cujo chorume indicasse os menores valores de DQO e STV em relação aos valores iniciais, pH mais elevado e estável, presença de alcalinidade e maior produção de biogás).

No caso, o biometanizador 3 apresentava-se o mais promissor, pois, mesmo não produzindo metano, era o sistema que gerava mais biogás e os resultados das análises físico-

químicas do chorume indicavam maior degradação da matéria orgânica do meio.

Os três novos biometanizadores também eram tambores de leite (marca Milkan), mas agora com capacidade total de 5 L. Foram adaptados para a saída e coleta de biogás, bem como para a entrada de substâncias (Figura 17). Não foi feita nenhuma saída para o chorume e, portanto, não colocou-se meio drenante no fundo do biometanizador.

Além disso, não foi inserido termopar para a medição da temperatura, pois, durante a operação dos biometanizadores de 50 L, verificou-se que a temperatura interna do sistema assemelhava-se à temperatura ambiente. Assim, para manter uma temperatura mais estável no interior dos biometanizadores de 5 L, colocou-os dentro de uma estufa, cuja temperatura mantinha-se em torno de 30°C (Figura 18).

Figura 17 - Biometanizadores de 5 L. **a)** Adaptação em “Y” feita na tampa para a saída e coleta de biogás e para a entrada de substâncias. **b)** Biometanizador conectado ao aparato de Mariotte utilizado para a medição do volume de biogás produzido

Fonte: Próprio autor.

Figura 18 - Estufa mantida com temperatura interna de 30°C por meio de duas lâmpadas de 60 W

Fonte: Próprio autor.

Os biometanizadores de 5 L, além de conterem FORSU e serragem, foram todos inoculados, sendo as fontes de inóculo as seguintes:

- biometanizadores ETE 1 e ETE 2 – inoculados com lodo de esgoto de reator UASB proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, São Carlos/SP, o mesmo utilizado nos biometanizadores de 50 L 2 e 3 (Figura 14c);
- biometanizador DACAR – inoculado com lodo granulado de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de avicultura, obtido na Avícola Dacar, Tietê/SP (Figura 19). Este lodo foi levemente batido em liquidificador para facilitar sua homogeneização ao misturá-lo com FORSU e serragem.

O regime de alimentação dos biometanizadores de 5 L foi em batelada, com operação em fase única, via úmida e temperatura mesofílica (controlada).

Figura 19 - Lodo granulado de reator UASB utilizado no biometanizador de 5 L DACAR

Fonte: Próprio autor.

A capacidade útil dos biometanizadores de 5 L foi de 70% (3,5 L) e as proporções de inóculo, FORSU e serragem foram definidas a partir dos sólidos totais voláteis destes componentes (Tabela 4), o que permitiu calcular a massa úmida de cada mistura afluenta (Tabela 5).

Tabela 4 - Porcentagem de sólidos totais e sólidos totais voláteis presentes nos componentes das misturas afluentes dos biometanizadores de 5L

Componentes das misturas afluentes	Umidade (%)	ST (%)	STV (%)
FORSU	88,96	11,04	94,92
Serragem	6,45	93,55	96,62
Lodo ETE	95,18	4,82	62,33
Lodo DACAR	97,28	2,72	70,97

Fonte: Próprio autor.

Tabela 5 - Caracterização dos biometanizadores de 5 L quanto à proporção de cada resíduo que compôs a massa afluenta

Biometanizador 5 L	Proporção inóculo:FORSU:serragem	Massa de inóculo (kg)	Massa de FORSU (kg)	Massa de serragem (kg)
ETE 1	3:1:1	3,34	0,32	0,04
ETE 2	2:2:1	3,34	0,95	0,06
DACAR	2:2:1	3,14	0,57	0,03

Fonte: Próprio autor.

Os resíduos foram pesados em balança de precisão com capacidade de 2000 g (Marca Digimed, modelo DG-2000), sendo que após a mistura dos resíduos, fez-se a medição do pH

(pHmetro de bancada Digimed, modelo DM-22) para acertá-lo para 7,5 caso fosse necessário.

Os valores de pH obtidos após a mistura dos componentes são apresentados na Tabela 6. Mesmo que o pH das misturas estivesse próximo de 7,5, optou-se por adicionar dois alcalinizantes (bicarbonato de sódio - NaHCO_3 e bicarbonato de potássio - KHCO_3) para garantir um efeito tampão na partida dos biometanizadores (pH final em torno de 7,5). Pelo fato das misturas apresentarem consistência mais líquida, os alcalinizantes foram adicionados em pó, sem diluição em água, apenas homogeneizando-os à massa.

Tabela 6 - Valores de pH das misturas afluentes dos biometanizadores e as respectivas quantidades de alcalinizantes adicionadas antes da vedação

Biometanizador 5 L	pH	NaHCO_3 (g)	KHCO_3 (g)
ETE 1	7,11	22,72	10,46
ETE 2	6,85	28,64	14,28
DACAR	7,25	16,90	10,56

Fonte: Próprio autor.

Uma quantidade extra de mistura foi preparada para cada biometanizador como amostra para a caracterização dos afluentes (Tabela 7).

Tabela 7 - Características dos resíduos de entrada dos biometanizadores de 5 L

Biometanizador 5 L	DQO ($\text{gO}_2\cdot\text{kg}^{-1}$)	ST (%)	STV (%)	U (%)	Relação C/N
ETE 1	326,5	7,50	75,73	92,50	20,89
ETE 2	393,9	7,98	79,3	92,02	53,39
DACAR	417,4	8,19	77,1	91,81	47,62

Fonte: Próprio autor.

Os biometanizadores foram vedados com silicone na tampa e operados por 78 dias. A Figura 20 mostra o aspecto das massas afluentes antes da vedação.

Figura 20 - Aspecto do resíduo afluente dos biometanizadores de 5 L

Fonte: Próprio autor.

4.4 Análises microbiológicas

4.4.1 Coleta das amostras

Para os biometanizadores de 50 L, a primeira coleta foi feita após dois meses do início do experimento, a segunda coleta ocorreu dois meses após a primeira e a terceira coleta deu-se com o intervalo de um mês da segunda. As amostras da primeira e da segunda coleta foram somente chorume, enquanto que as amostras da terceira coleta foram chorume e digestato. Quanto aos biometanizadores de 5 L, não houve coleta periódica de chorume, sendo analisado somente o digestato após a abertura, no final do experimento (Figura 21).

A microscopia óptica (microscopia de contraste de fase e de fluorescência) foi realizada com as amostras ainda frescas. Caso não fosse possível a visualização em microscópio no dia da coleta, as amostras eram armazenadas em geladeira (à temperatura de 6 a 10°C) até o dia seguinte. Para a análise de PCR/DGGE, as amostras frescas foram centrifugadas e os *pellets* armazenados à - 20°C até o momento da extração do DNA.

Figura 21 - Esquema sobre quando foram realizadas as coletas nos biometanizadores de 50 L e de 5L, o que foi coletado e qual a análise realizada para cada amostra

Fonte: Próprio autor.

4.4.2 Microscopia óptica

Preparo das amostras

Pelo fato das amostras líquidas apresentarem poucos sólidos em suspensão, foi necessário centrifugá-las para obter um *pellet*, concentrando a biomassa. Foram centrifugados 13 mL de chorume em tubo falcon à 3500 rpm, temperatura de 25°C, por 3 minutos

(Centrífuga 5804 R eppendorf). Quando não obtida a quantidade suficiente de *pellet*, repetiu-se a centrifugação: o sobrenadante foi descartado e mais 13 mL de amostra foram centrifugados no mesmo tubo falcon (agitou-se a amostra para evitar que o *pellet* ficasse muito aderido, o que dificultaria sua transferência para a lâmina). Posteriormente, a maior parte do sobrenadante foi descartado, mantendo-se somente a quantidade suficiente para recobrir o *pellet* (Figura 22).

Figura 22 - Amostras de chorume dos quatro reatores centrifugadas e indicação do *pellet* formado

Fonte: Próprio autor.

Fixação da amostra para a observação microscópica

Para fixar a amostra sobre a lâmina, colocou-se uma camada de ágar 2%, deixando-o secar por 10 minutos. Em seguida, uma gota de amostra concentrada foi colocada sobre o ágar com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, recobrimo-a com uma lamínula (Figura 23). Aguardou-se 30 minutos para a secagem e visualização em microscópio (Microscópio Olympus BX60).

Figura 23 - Procedimento geral de preparo da lâmina para microscopia de contraste de fase. 1) Camada de ágar para fixação da amostra. 2) Gota de amostra sobre o ágar seco. 3) Recobrimento com lamínula

Fonte: Próprio autor.

4.4.3 PCR-DGGE

Preparo e armazenamento das amostras

Amostra líquida

A cada coleta, aproximadamente 80 mL de chorume de cada biometanizador foram centrifugados nas seguintes condições: 7000 rpm, à 10°C, por 5 minutos (centrífuga 5804 R – Eppendorf). O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o *pellet* (Figura 24) armazenado à – 20°C até o momento da extração do DNA.

Optou-se por centrifugar 13 mL de amostra por vez até completar aproximadamente 80 mL (ao invés de centrifugar os 80 mL de uma única vez), pois a concentração de sólidos no chorume era muito baixa e dessa forma otimizava-se a obtenção do *pellet*.

Para os inóculos ETE e DACAR, o procedimento de obtenção de *pellet* foi o mesmo aplicado para o chorume.

Figura 24 - *Pellet* obtido após a centrifugação de chorume para a extração de DNA

Fonte: Próprio autor.

Amostra sólida

Após a abertura dos biometanizadores de 50 L, 1 kg do resíduo em digestão (digestato) foi coletado e armazenado em sacos plásticos à -20°C até o momento da extração de DNA. Antes da extração, as amostras foram descongeladas em geladeira; em seguida, pesou-se aproximadamente 70 g de cada amostra e adicionou-se 50 mL de água destilada, misturando-se delicadamente. O objetivo deste procedimento foi obter uma solução contendo os micro-organismos que estavam aderidos ao digestato.

A mistura foi coada com o auxílio de uma peneira, visando-se separar a fração sólida da líquida. Para obter o *pellet* a ser utilizado na extração de DNA, centrifugou-se 13 mL da fração líquida à 7000 rpm, 10°C, por 5 minutos (centrífuga 5804 R – Eppendorf). O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o *pellet* armazenado à – 20°C até o momento da extração do DNA (Figura 25). Diferente das amostras de chorume, esta quantidade de fração líquida proveniente do digestato foi suficiente para a obtenção do *pellet*, não sendo necessário repetir a operação.

Quanto ao digestato dos biometanizadores de 5 L, o procedimento realizado para a obtenção do *pellet* restringiu-se somente à centrifugação, pois os resíduos finais destes biometanizadores apresentavam consistência mais líquida devido à inoculação com maior quantidade de lodo.

Figura 25 - Preparo da amostra sólida (digestato) para a extração de DNA. **a)** Digestato obtido após a abertura dos biometanizadores de 50 L. **b)** Mistura de 70 g de digestato com 50 mL de água destilada. **c)** Coação da mistura. **d)** Detalhe da separação da fração sólida e da líquida da mistura. **e)** Fração líquida pronta para ser centrifugada. **f)** *Pellet* obtido após a centrifugação

Fonte: Próprio autor.

OBSERVAÇÃO: para os dados que serão apresentados a partir daqui, considerar a simbologia presente no Quadro 11.

Quadro 11 - Simbologia criada para as amostras a fim de facilitar a apresentação dos dados. Na simbologia das amostras de chorume e digestato dos biometanizadores de 50 L, o primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”

DESCRIÇÃO		SIMBOLOGIA
Biometanizadores 50 L (1, 2, 3 e 4)	Chorume 1ª coleta (60 dias de operação)	1_1 2_1 3_1 4_1
	Chorume 2ª coleta (120 dias de operação)	1_2 2_2 3_2 4_2
	Chorume 3ª coleta (150 dias de operação)	1_3 2_3 3_3 4_3
	Digestato (150 dias de operação)	1_D 2_D 3_D 4_D
Biometanizadores 5 L Digestato (78 dias de operação)		ETE 1 ETE 2 DACAR
Inóculos		Lodo ETE Lodo DACAR

Fonte: Próprio autor.

Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada com o *Kit Power Soil DNA Isolation* (MOBIO Laboratories, Inc.), apropriado para remover interferentes da PCR, como ácidos húmicos (Figura 26).

Os procedimentos efetuados foram basicamente os seguintes:

- A amostra foi adicionada em um tubo contendo pequenos grânulos submersos em uma solução tampão;
- Por meio de processos químicos e mecânicos (adição de reagentes fornecidos no Kit, homogeneizações rápidas e centrifugações) as células foram lisadas;
- O DNA genômico total, retido em uma membrana de sílica, foi lavado e eluído para então ser utilizado.

A metodologia aplicada foi a proposta no próprio Kit, apenas com algumas adaptações, conforme segue:

- 1) Para *pellet* das amostras de chorume: pesou-se no mínimo 0,10 g de *pellet* dentro do tubo *PowerBead* (no protocolo original sugere-se pesar 0,25 g de amostra, contudo, devido à pequena quantidade de amostra disponível, pré-testes de extração com 0,10 g foram realizados, obtendo-se sucesso);

Para *pellet* das amostras de digestato e de inóculos: devido a maior disponibilidade de amostra, seguiu-se o protocolo original, pesando-se no mínimo 0,25 g de *pellet* dentro do tubo *PowerBead*;

- 2) Misturou-se rapidamente no vórtex;
- 3) Adicionou-se 60 µL da solução C1, misturando rapidamente no vórtex;
- 4) Os tubos foram presos horizontalmente com fita no Vortex Adapter para agitação.
Para amostras de chorume: agitou-se no Vortex Adapter por 10 minutos (foram testados os tempos 10, 15 e 20 minutos, sendo que o de 10 minutos foi suficiente para a massa mínima de 0,10 g);
Para amostras de digestato: agitou-se no Vortex Adapter por 15 minutos (foram testados os tempos 10, 15 e 20 minutos, sendo que o de 15 minutos foi suficiente para a massa mínima de 0,25 g);

Na Tabela 8 é apresentada a massa de cada amostra adicionada ao tubo *PowerBead*, com os respectivos tempos de agitação no Vortex Adapter.

- 5) Centrifugou-se os tubos à 10.000 rpm, por 30 segundos, à temperatura ambiente;
- 6) Evitando-se o *pellet*, transferiu-se 500 µL do sobrenadante para um tubo de 2 mL;
- 7) Adicionou-se 250 µL da solução C2:
 - vórtex rápido (aproximadamente 5 segundos);
 - incubação à 4°C por 5 minutos;
- 8) Centrifugou-se os tubos a 10.000 rpm, por 1 minuto, à temperatura ambiente;
- 9) Evitando-se o *pellet*, transferiu-se 600 µL do sobrenadante para um novo tubo de 2 mL;
- 10) Adicionou-se 200 µL da solução C3:
 - vórtex rápido (aproximadamente 5 segundos);
 - incubação à 4°C por 5 minutos;

- 11) Centrifugou-se os tubos a 10.000 rpm, por 1 minuto, à temperatura ambiente;
- 12) Evitando-se o *pellet*, transferiu-se 750 µL do sobrenadante para outro tubo de 2 mL;
- 13) Adicionou-se 1200 µL da solução C4;
 - vórtex rápido (aproximadamente 5 segundos);
- 14) Transferiu-se 675 µL para o *Spin Filter*;
- 15) Centrifugou-se os tubos à 10.000 rpm por 1 minuto, à temperatura ambiente;
- 16) Descartou-se a solução que atravessou o filtro;
 - Obs.: Repetiu-se por 3 vezes os três itens anteriores.
- 17) Adicionou-se 500 µL da solução C5;
- 18) Centrifugou-se os tubos à 10.000 rpm, por 30 segundos, à temperatura ambiente;
- 19) Descartou-se a solução que atravessou o filtro;
- 20) Centrifugou-se novamente os tubos à 10.000 rpm por 1 minuto, à temperatura ambiente;
- 21) Transferiu-se cuidadosamente o filtro para um tubo de 1,5 mL;
- 22) Adicionou-se 100 µL da solução C6 no centro da membrana do filtro, deixando por 1 minuto na bancada;
- 23) Centrifugou-se os tubos à 10.000 rpm, por 30 segundos, à temperatura ambiente;
- 24) Descartou-se o *Spin Filter*;
- 25) Armazenou-se o conteúdo restante (DNA extraído) à -20°C.

Figura 26 - Detalhes dos componentes do *Kit Power Soil DNA Isolation* utilizado para a extração de DNA das amostras. **a)** Soluções químicas utilizadas em sequência. **b)** Tubo *PowerBead* contendo as *beads* e uma solução tampão. **c)** Tubo *Spin Filter* dotado de um compartimento com membrana que é removível após a eluição do DNA

Fonte: Próprio autor.

Tabela 8 - Massa (g) de *pellet* proveniente de chorume, digestato e inóculo pesadas dentro do tubo *PowerBead* e respectivos tempos de agitação no Vortex Adapter para a extração de DNA

Amostra	Extração (<i>Kit Power Soil DNA Isolation</i>)	
	Massa de <i>pellet</i> (g)	Tempo (min)
1_1	0,1093	10
2_1	0,1118	10
3_1	0,1303	10
4_1	0,1464	10
1_2	0,2841	10
2_2	0,2963	10
3_2	0,3203	10
4_2	0,2409	10
1_3	0,2629	10
2_3	0,2613	10
3_3	0,2928	10
4_3	0,2482	10
1_D	0,3021	15
2_D	0,3206	15
3_D	0,3083	15
4_D	0,3186	15
ETE 1	0,3582	15
ETE 2	0,3722	15
DACAR	0,3122	15
Lodo ETE	0,3059	15
Lodo DACAR	0,3114	15

Fonte: Próprio autor.

Quantificação e pureza do DNA total

A quantificação do DNA total extraído foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop 2000), obtendo-se a concentração de DNA em $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e os valores das relações $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$. O procedimento adotado foi o seguinte:

- 1º. Zerou-se o aparelho com 2 μL de solução tampão *Elution buffer type 6* (GE Healthcare);
- 2º. Após limpar o aparelho, colocou-se 2 μL da amostra de DNA extraído, em temperatura ambiente, obtendo-se a leitura.

A quantificação visual e verificação da integridade do DNA extraído foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X. Utilizou-se 5 μL de *ladder* (KAPA Universal Ladder Kit) e 5 μL de DNA total extraído de cada amostra, corados com 0,7 μL de corante para DNA (*Blue Green Loading Dye I* – LGC Biotecnologia). A imagem do gel foi capturada e visualizada sob luz UV pelo equipamento *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

A partir do DNA extraído das amostras dos biometanizadores e dos inóculos, foram obtidos fragmentos do gene RNAr 16S para o domínio *Bacteria* e *Archaea*, utilizando-se a técnica de PCR com *primers* homólogos às regiões conservadas deste gene.

A PCR foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase presente na solução *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), que também contém dNTPs, MgCl₂ e tampão. A reação foi padronizada para um volume final de 50 µL, composto por:

- 25 µL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega);
- 1 µL de cada *primer* (senso e anti-senso);
- 4 µL de DNA molde;
- 19 µL de água *nuclease-free*.

Para o domínio *Bacteria* foi utilizado o *set primer* 968FGC – 1401R (NÜBEL et al., 1996), sendo as reações de amplificação realizadas em termociclador *Mastercycler EP Gradient* (Eppendorf). Para o domínio *Archaea*, utilizou-se o *set primer* 1100FGC – 1400R (KUDO et al., 1997) com amplificação realizada no termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer). As condições de tempo e temperatura das amplificações são apresentadas no Quadro 12.

Quadro 12 - Condições de tempo e temperatura que foram aplicadas em cada etapa da reação em cadeia da polimerase para os domínios *Bacteria* e *Archaea*

Etapas da amplificação	Ciclos	Condições para o domínio <i>Bacteria</i>		Condições para o domínio <i>Archaea</i>	
		Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Pré-desnaturação	1	7	95	5	94
Desnaturação	35	0,75	94	1	94
Anelamento	35	0,75	56	1	55
Extensão	35	1	72	1	72
Extensão final	1	10	72	7	72
Resfriamento	-	-	4	-	4

Fonte: Próprio autor.

A confirmação da dimensão e integridade do produto da PCR foi feita através da separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1X. Utilizou-se 5 µL de *ladder* (*Universal DNA Ladder Kit - KAPA*) e 5 µL de cada amostra amplificada, corados com 0,7 µL de corante para DNA (*Blue Green Loading Dye I – LGC Biotecnologia*).

A imagem do gel foi capturada e visualizada sob luz UV pelo equipamento *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

O preparo da eletroforese em gel de gradiente desnaturante seguiu a metodologia utilizada por Sakamoto (2001):

- 1) Preparou-se a solução do gel gradiente desnaturante nas concentrações de 0, 45 e 65% (Tabela 9). Para cada concentração, a uréia foi dissolvida nos reagentes líquidos, completando-se o volume para 100 mL com água Milli-Q. A solução resultante foi filtrada em membrana de porosidade de 0,2 µm. Até o momento do uso, as soluções foram armazenadas em geladeira.

Tabela 9 - Quantidade de cada componente constituinte da solução do gel gradiente desnaturante nas concentrações de 0, 45 e 65%

Componentes do gel	Concentração		
	0%	45%	65%
Bis-acrilamida 40%* (mL)	20	20	20
TAE 50X* (mL)	2	2	2
Formamida (mL)	0	18	26
Uréia (g)	0	18,9	27,3

* As composições das soluções Bis-acrilamida 40% e TAE 50X estão no ANEXO.

- 2) Montou-se o “sanduíche” com o Kit de placas de vidro (previamente limpas com álcool 100%) e o suporte;
- 3) Os géis foram preparados nas três diferentes concentrações (0, *low* – 45% e *high* – 65%) em tubos Falcon de 15 mL, a partir dos reagentes e suas respectivas quantidades apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Componentes e suas respectivas quantidades utilizados no preparo dos géis 0, *low* e *high*

Gel	Solução 0% (mL)	Solução 45% (mL)	Solução 65% (mL)	Dcode Dye solution* (µL)	APS 10% (µL)	Temed (µL)
0	3	-	-	-	20	2
Low	-	14	-	-	100	10
High	-	-	14	100	100	10

* Dcode Dye solution é uma solução corante.

- 4) Os géis *low* e *high* foram transferidos simultaneamente para o “sanduíche” de placas de vidro com o auxílio de duas seringas presas ao aparelho injetor (Figura 27).

Figura 27 - Injeção dos géis *low* e *high* no espaço entre as placas de vidro

Fonte: Próprio autor.

- 5) Após 10 minutos, colocou-se o molde (“pente”) para formar os poços (Figura 28) e com o auxílio de uma micropipeta adicionou-se o gel na concentração 0%. Aguardou-se a solidificação dos géis (mínimo de 1 hora).

Figura 28 - Detalhe do molde inserido no gel para a formação dos poços

Fonte: Próprio autor.

- 6) A câmara eletroforética foi preparada colocando-se 140 mL de TAE 50X e completando-se para o volume de 7 L com água Milli-Q (Figura 29). Em seguida, a câmara foi ligada para aquecer até 65°C, contudo, a “corrida” foi realizada posteriormente à temperatura constante de 60°C.

Figura 29 - Câmara eletroforética com TAE 50X e água Milli-Q

Fonte: Próprio autor.

- 7) O “sanduíche” foi transferido para a câmara quando esta atingiu a temperatura de 65°C. O molde foi removido e os poços foram lavados com a solução da própria câmara eletroforética, com o auxílio de uma micropipeta.
- 8) As amostras foram preparadas misturando-se 20 μ L de *template* (produto da PCR) com 4 μ L de solução corante para DGGE (*Loading Dye*), com o auxílio de uma micropipeta.
- 9) Cada amostra foi transferida para um poço;
- 10) Posteriormente, ligou-se a bomba de agitação, programando as condições da corrida: voltagem de 75 V por 16 horas;

- 11) Após o tempo da corrida, o gel foi transferido cuidadosamente da placa de vidro para uma bandeja. Adicionou-se a solução de *Vista Green* (diluída 10.000 vezes) e aguardou-se 15 minutos;
- 12) O gel foi então transferido para outra bandeja e lavado com água Milli-Q;
- 13) O excesso de água da bandeja foi removido com papel absorvente. A bandeja foi levada para o aparelho *Eagle Eye TM II* (Stratagene, La Jolla, CA, USA), acoplado a um computador com o *software Eagle Sight* para a leitura da imagem, a qual foi capturada do gel sob exposição à luz UV de 254 nm.

4.5 Análise dos resultados

Os perfis de DGGE foram analisados e comparados quanto à diversidade microbiana, utilizando-se o *software* Bionumerics 3.5 e os índices descritos a seguir.

Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H')

É uma medida de diversidade alfa (α) ou local, referindo-se à diversidade dentro de um habitat ou comunidade. Esse índice considera tanto a riqueza de espécies quanto a equitabilidade (proporção dos indivíduos de cada uma das espécies presentes em uma comunidade em relação ao total de indivíduos dessa mesma comunidade) (BARROS, 2007). Entretanto, Odum (1988) reportou que o índice H' é o que atribui um maior peso às espécies raras, prevalecendo, desta forma, o componente de riqueza de espécies.

O cálculo do índice H' é realizado com base nas intensidades das bandas do gel e na altura do pico das curvas densitométricas (ABREU et al., 2010), conforme a seguinte equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad (2)$$

Na Equação 2, H' representa a diversidade e é essencialmente adimensional; S é o número de espécies; p_i é a proporção da espécie i , estimada como n_i/N , onde n_i é a medida de importância da espécie i (número de indivíduos, biomassa) e N é o número total de indivíduos (SHANNON; WEAVER, 1949).

O índice de Shannon-Wiener permite comparar diferentes comunidades em termos de diversidade, mas não descreve o quanto as comunidades são distintas (ou similares) em termos de composição de espécies. A fim de obter essa informação, pode-se utilizar o índice de similaridade de Jaccard.

Índice de similaridade de Jaccard (Sj)

É uma medida de diversidade beta (β), a qual indica o grau de compartilhamento de espécies entre as diferentes amostras em estudo. O índice de similaridade de Jaccard permite verificar quais amostras são as mais similares (ou dissimilares) entre si, sendo calculado por par de amostras e os resultados posteriormente comparados (BARROS, 2007).

O cálculo do Sj é realizado da seguinte forma:

$$Sj = a/(a + b + c) \quad (3)$$

Considerando-se B e C amostras hipotéticas, na Equação 3, a é o número de espécies encontradas em ambas as amostras, b é o número de espécies exclusivas na amostra B e c é o número de espécies exclusivas na amostra C (BARROS, 2007). Quando dois perfis de DGGE são idênticos, o valor do índice de similaridade é 100% e quando são completamente diferentes o valor é 0%.

No presente trabalho, devido a existência de várias amostras para serem comparadas simultaneamente, a representação da diversidade β foi obtida através da análise de agrupamento (cluster) a partir da matriz contendo o índice de similaridade de Jaccard (ou dissimilaridade) para cada par de amostras. Utilizou-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages*), que faz a combinação em um único grupo das duas amostras mais similares, até que o último grupo seja combinado, originando um dendograma.

Quanto às imagens obtidas com a microscopia óptica, as melhores foram selecionadas para apresentação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento do DNA genômico

Pelo fato de ainda não existir um método específico para o isolamento de DNA genômico de amostras provenientes de biometanizadores, buscou-se por um método que fosse capaz de suprir as seguintes necessidades:

- extração direta de DNA, a fim de obter a maior quantidade possível de DNA genômico inicial, pois o objetivo dessa pesquisa foi o estudo da comunidade microbiana e não de um micro-organismo específico;
- capacidade de remoção de inibidores (principalmente ácido húmico) das amostras, visando garantir a amplificação por PCR (etapa pré-requisito para a realização da análise de diversidade por DGGE);
- ter apresentado, em trabalhos publicados, resultados satisfatórios no isolamento de DNA de amostras com características semelhantes às amostras de um biometanizador.

Assim, escolheu-se para o isolamento do DNA total das amostras dos biometanizadores o *kit PowerSoil® DNA Isolation* (MoBio), o qual baseia-se na lise direta das células por meio de ruptura física (*bead-beating*). Posteriormente, o DNA é separado da matriz e, após a aplicação de dois reagentes próprios do *kit*, patenteados como *Inhibitor Removal Technology®*, há a remoção de pigmentos (cor marrom) e a precipitação de material orgânico e inorgânico que não seja DNA, como substâncias húmicas, restos celulares e proteínas.

O *kit* é indicado para amostras ambientais com alto conteúdo de ácido húmico, como diversos tipos de solos, composto e esterco. Autores que utilizaram o *kit PowerSoil® DNA Isolation* (MoBio) relataram a obtenção de rendimentos satisfatórios de DNA para o estudo da comunidade microbiana presente em amostras de diversos ambientes complexos, como por exemplo:

- solos virgens e contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados (BALÁZS et al., 2013);
- fezes humanas (CLAASSEN et al., 2013);

- solo de área alagada (rico em matéria orgânica) e solo de área costeira (arenoso) (YOUNG; WEYRICH; COOPER, 2014);
- água de rio (para a extração de DNA foi utilizado o *pellet* resultante da centrifugação da água) (STALEY et al., 2015).

5.2 Quantificação e pureza do DNA total

Os lodos ETE e DACAR, utilizados como inóculos, apresentaram as maiores concentrações de DNA extraído, 26 e 82,2 ng.μL⁻¹, respectivamente, enquanto que os valores atingidos para as amostras dos biometanizadores não superaram a concentração de 26 ng.μL⁻¹, variando de:

- 5 a 25,5 ng.μL⁻¹ para as amostras de chorume dos biometanizadores de 50 L;
- 8,1 a 20,8 ng.μL⁻¹ para as amostras de digestato dos biometanizadores de 50 L;
- 9,5 a 15,2 ng.μL⁻¹ para as amostras de digestato dos biometanizadores de 5 L.

Todas as amostras resultaram em baixas concentrações de DNA total (Tabela 11) quando comparadas com a média das concentrações (85,54 ng.μL⁻¹) obtida por Weiss, Jérôme e Freitag (2007), que testaram diversos *kits* comerciais para extrair DNA total de amostras de chorume provenientes de biometanizadores utilizados no tratamento da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos e rurais.

Uma das explicações para a baixa concentração de DNA obtida seria a provável degradação do ácido nucleico durante a lise celular, devido à aplicação de um método físico (*bead-beating*) atrelado à velocidade e ao tempo de homogeneização. Contudo, Santos et al. (2015) utilizou o mesmo método de lise, presente no *kit Power Lyzer™PowerSoil®DNA Isolation Kit* (MoBio) para a extração de DNA de amostras de solo e comentou que, apesar de provavelmente existir uma degradação do DNA, os fragmentos recuperados apresentaram tamanhos adequados para a amplificação por PCR.

Guo e Zhang (2013) extraíram DNA de amostras de lodos ativados a partir de *kits* comerciais que utilizam a etapa de *bead-beating* para a lise celular. Além de obterem resultados satisfatórios de concentração e pureza de DNA, verificaram que a homogeneização mecânica (etapa na qual se utiliza o *bead-beating*) é necessária para a extração de DNA desse tipo de amostra.

Tabela 11 - Concentração e pureza do DNA total extraído das amostras de chorume e digestato dos biometanizadores de 50 L e de 5 L e das amostras de inóculos

Amostra		Espectrofotometria		
		Concentração de DNA _{total} (ng.µL ⁻¹)	A _{260/280}	A _{260/230}
Chorume Biometanizadores 50 L	1_1	13,2	1,73	-0,40
	2_1	5	2,03	-0,14
	3_1	15	2,06	-0,46
	4_1	6,3	2,34	-0,16
	1_2	25	1,92	-0,93
	2_2	6,1	2,11	-0,18
	3_2	21,8	1,92	-0,68
	4_2	8,7	2,13	-0,24
	1_3	17,9	2,01	-0,54
	2_3	14,7	1,84	-0,45
	3_3	23,1	1,88	-0,89
	4_3	25,5	1,91	-0,85
Digestato Biometanizadores 50 L	1_D	20,8	1,87	-0,87
	2_D	12,6	1,94	-0,35
	3_D	11,6	1,88	-0,34
	4_D	8,1	1,90	-0,24
Digestato Biometanizadores 5 L	ETE 1	11,8	1,51	-0,44
	ETE 2	9,5	1,69	-0,35
	DACAR	15,2	1,59	-0,83
Inóculos	Lodo ETE	26	1,69	-1,72
	Lodo DACAR	82,2	1,88	21,15

Fonte: Próprio autor.

Outra justificativa para as baixas concentrações de DNA obtidas seria o fato das amostras apresentarem reduzido conteúdo microbiano, reflexo de diversas variáveis, dentre as quais podem ser citadas:

1. Tempo de operação

- Pode-se observar na Figura 30 que a concentração de DNA das amostras de chorume aumentaram progressivamente com o tempo de operação, exceto para o biometanizador 1;

2. Condições propícias para o crescimento microbiano

- Embora os biometanizadores de 5 L tenham sido operados por menor tempo, seus digestatos apresentaram concentrações de DNA com valores próximos aos digestatos dos biometanizadores de 50 L (Figura 31). Tal fato pode estar relacionado às melhores condições do meio dos biometanizadores de 5 L, sobretudo no início do processo;

- A melhor concentração de DNA total extraído foi obtida da amostra de inóculo do lodo DACAR (Tabela 11), o qual possui uma peculiaridade frente às matrizes das demais amostras: os micro-organismos presentes no lodo DACAR encontram-se organizados em camadas, constituindo uma estrutura denominada grânulo (GUIOT; PAUSS; COSTERTON, 1992). Essa proximidade microbiana favorece o estabelecimento de um ambiente propício ao desenvolvimento mútuo, garantindo o acesso a uma quantidade de material genético maior do que a obtida em amostras nas quais os micro-organismos encontram-se dispersos.

Quanto à pureza do DNA extraído, dez amostras (dentre elas chorume, digestato e inóculo) apresentaram-se livres de contaminação por proteínas, com valores entre 1,8 e 2 para a relação $A_{260/280}$ (Tabela 11). Já em relação à contaminação por metabólitos secundários, como ácido húmico, todas as amostras obtiveram valores fora da faixa padrão para a relação $A_{260/230}$, a qual varia de 1,8 a 2,2 (SAMBROOK; RUSSELL, 2006).

Valores anormais da relação $A_{260/280}$ são indicativos de contaminação por proteínas, por fenol (se utilizado como reagente na extração) ou ainda um erro de medição (ASSESSMENT OF NUCLEIC ACID PURITY, 2010).

A concentração de ácido nucleico muito baixa (menor que $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) pode resultar em um valor de $A_{260/280}$ abaixo de 1,8, como o que ocorreu para a amostra do digestato ETE 2 (Tabela 11). Contudo, se a concentração de ácido nucleico está acima de $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, um residual de fenol ou de outro reagente utilizado no procedimento de extração pode explicar a relação $A_{260/280}$ abaixo do valor padrão (ASSESSMENT OF NUCLEIC ACID PURITY, 2010).

Já valores acima de 2 para a relação $A_{260/280}$ não são indicativos de nenhum problema, a não ser que esse valor apresente-se significativamente maior do que o esperado, como na amostra de chorume 4_1 (Tabela 11). Nesse caso, é sugerido avaliar o perfil espectral resultante da leitura, sendo este o principal meio para o entendimento do caso (como não foram salvos os perfis espectrais das amostras, não foi possível prosseguir a discussão para a amostra mencionada) (ASSESSMENT OF NUCLEIC ACID PURITY, 2010).

A relação $A_{260/230}$ é utilizada como indicativo de contaminantes co-extraídos que contenham ligações peptídicas e/ou resíduos aromáticos, como os ácidos húmicos (WEISS; JÉRÔME; FREITAG, 2007). Todas as amostras, exceto a do lodo DACAR, apresentaram

valores abaixo do padrão para esta relação, indicando a presença significativa de contaminantes orgânicos. O lodo DACAR apresentou uma relação $A_{260/230}$ acima de 2,2, o que pode ser consequência da medição do branco ter sido realizada em um pedestal sujo ou pelo fato da solução utilizada como branco ser inadequada (a solução branco deve ter o mesmo pH da amostra ou uma força iônica similar) (ASSESSMENT OF NUCLEIC ACID PURITY, 2010).

De acordo com Weiss, Jérôme e Freitag (2007) é improvável que o DNA extraído de amostras de biometanizadores ou de qualquer outro ambiente complexo atinja os valores padrões de pureza, pois não se pode comparar essas amostras com amostras de culturas puras.

Figura 30 - Concentração de DNA total extraído ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) das amostras de chorume dos biometanizadores de 50 L em três diferentes tempos de operação

Fonte: Próprio autor.

Figura 31 - Concentração de DNA total extraído ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) das amostras de digestato dos biometanizadores de 5 L (operados por 78 dias) e dos biometanizadores de 50 L (operados por 150 dias)

Fonte: Próprio autor.

A Figura 32 apresenta o gel de agarose para o DNA extraído de todas as amostras. Principalmente para as amostras de chorume dos biometanizadores de 50 L, percebe-se perfis eletroforéticos com arraste e bandas pouco definidas, o que pode indicar DNA degradado e baixa concentração de DNA, respectivamente.

As bandas mais intensas, indicando maior concentração de DNA, ficaram restritas às amostras de digestato dos biometanizadores de 50 e de 5 L e às amostras de inóculos (Figura 32).

Figura 32 - Gel de agarose 0,8% referente ao DNA extraído das amostras de chorume, digestato e inóculos, a fim de quantificar visualmente e verificar a integridade do DNA extraído

Fonte: Próprio autor.

Apesar da baixa qualidade e quantidade do DNA extraído de algumas amostras, prosseguiu-se para a etapa de amplificação por PCR, pois não havia disponibilidade de amostras excedentes para repetir a etapa de extração de DNA.

5.3 Análise dos produtos da PCR

Embora na etapa de extração tenha-se obtido baixas concentrações de DNA total e valores de pureza fora dos padrões, a etapa de PCR resultou em produtos que poderiam ser utilizados na DGGE. A amplificação de um fragmento de 433 pares de base (pb) do gene RNAr 16S de *Bacteria* foi realizada para todas as amostras: chorume e digestato dos biometanizadores de 50 L, digestato dos biometanizadores de 5L e inóculos. Para o domínio *Archaea*, foi amplificado um fragmento de 300 pb do mesmo gene apenas para as amostras de chorume e digestato da terceira coleta dos biometanizadores 2 e 3 de 50 L, digestato dos biometanizadores de 5 L e inóculos.

Na Figura 33 pode-se verificar o tamanho correto, em pares de base, obtidos a partir da amplificação por PCR com os primers 968FGC – 1401R para *Bacteria* e 1100FGC – 1400R para *Archaea*.

Não foi dado prosseguimento à análise de arqueas para as amostras de chorume e digestato dos biometanizadores 1 e 4, assim como de chorume da primeira e segunda coletas dos biometanizadores 2 e 3, pois não foram detectadas bandas referentes ao domínio *Archaea* quando realizado um pré-teste de PCR. As condições desfavoráveis do meio, principalmente nos biometanizadores 1 e 4 que não foram inoculados, justificam a ausência de arqueas em tais amostras. Pelo fato dos amplificados para o domínio *Archaea* referentes às amostras de chorume da terceira coleta dos biometanizadores 2 e 3 não apresentarem bandas bem definidas (mas sim um rastro no gel e bandas fracas que não corresponderam à posição das bandas das demais amostras) (Figura 33), decidiu-se excluí-las da próxima etapa de DGGE, mantendo somente as amostras de digestato desses biometanizadores.

Figura 33 - Gel de agarose 1,2% referente aos produtos da PCR para os domínios *Bacteria* e *Archaea* das amostras de chorume, digestato e inóculos

Fonte: Próprio autor.

5.4 Caracterização da comunidade microbiana dos biometanizadores

A caracterização da comunidade procarionte estabelecida durante o tratamento da FORSU nos biometanizadores de 50 L e 5 L será apresentada com base nos dados de diversidade estrutural obtidos com a DGGE e de diversidade morfológica observada por microscopia óptica. Em conjunto, serão mencionadas informações à respeito das condições físico-químicas do meio, a fim de respaldar a análise biológica dos sistemas.

5.4.1 Análise dos resultados da PCR/DGGE

A diversidade de bactérias foi maior no digestato que no chorume, o que pode ser verificado comparando-se, nos biometanizadores de 50 L, o valor do índice H' do digestato com o valor do índice H' do respectivo chorume, ambos coletados na amostragem final (150 dias de operação) (Figura 34).

Figura 34 - Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') da comunidade de bactérias presente nas amostras de chorume e digestato dos biometanizadores de 50 L. Na referência das amostras, o primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”

Fonte: Próprio autor.

Esse dado pode sugerir que o digestato seria uma melhor fonte de inóculo para os resíduos frescos do que o chorume, pois quanto maior a variedade de micro-organismos, mais rápida será a adaptação da comunidade microbiana ao novo ambiente (QUINTAES et al., 2012). Ainda, caso o biometanizador apresente algum distúrbio que prejudique a atividade de determinada população microbiana, a presença de maior diversidade pode aumentar as chances da população original ser substituída por outra população que funcionalmente realize a mesma atividade, o que é denominado de redundância funcional (ALLISON; MARTINY, 2008).

Contudo, para afirmar se a melhor capacidade inoculante é do digestato ou do chorume, deve-se considerar também a população de arqueas metanogênicas, pois o sucesso da partida e da operação de um biometanizador requer um balanço apropriado entre bactérias hidrolíticas, acidogênicas, acetogênicas e arqueas metanogênicas ativas (RITTMANN; McCARTY, 2001; CASSERLY; ERIJMAN, 2003).

Como já mencionado na análise dos produtos da PCR, não foi detectada a presença de arqueas nas amostras (chorume e digestato) provenientes dos biometanizadores 1 (preenchido somente com FORSU) e 4 (preenchido com FORSU e serragem). Somente as amostras de digestato dos biometanizadores 2 e 3 (inoculados com lodo de esgoto ETE) sugeriram, a partir

da análise dos amplificadores, que poderiam apresentar perfis contendo membros do domínio Archaea, o que foi confirmado no gel de DGGE (Figura 35).

Figura 35 - Perfil de bandas da DGGE de fragmentos amplificados por PCR do gene RNAr 16S dos domínios *Archaea* e *Bacteria*. As amostras são os inóculos (lodos ETE e DACAR) e os digestatos dos biometanizadores de 50 L (1_D; 2_D; 3_D e 4_D) e de 5 L (ETE 1; ETE 2 e DACAR)

Fonte: Próprio autor.

Apesar de não ter sido utilizado primers exclusivos para a detecção de arqueas metanogênicas no gel de DGGE, mas sim primers para o domínio *Archaea*, não se pode garantir que as bandas presentes na Figura 39 para os digestatos dos biometanizadores 2 e 3 sejam de produtoras de metano. Também, não se pode afirmar qual das duas frações, digestato ou chorume seria a mais promissora para a utilização como inóculo, pois, mesmo que não tenham sido detectadas arqueas no chorume desses biometanizadores, o método de extração de DNA utilizado pode ter sido ineficiente para o chorume, que, segundo Weiss et al. (2007), é a fração mais desafiante do biometanizador, pelo fato de conter elevadas quantidades de

substâncias inibitórias.

Barlaz; Ham e Schaefer (1989) obtiveram maiores taxas de produção de metano e melhor estabilidade do digestato final quando recircularam chorume como fonte de alcalinidade e nutrientes, enquanto que Barlaz; Ham e Schaefer (1990) afirmaram que o digestato também poderia ser utilizado como fonte de inóculo de resíduos frescos, por apresentar potencial estimulante da metanogênese.

Ambas as frações (líquida e sólida) resultantes do processo de biometanização podem ser utilizadas como inóculo de resíduos frescos, principalmente pela vantagem de possuírem uma comunidade microbiana já adaptada ao tipo de resíduo que alimentará o biometanizador, quando comparadas com qualquer outro tipo de inóculo advindo de fontes que tratem resíduos de outras origens.

Quanto à similaridade de espécies referente ao domínio *Bacteria* entre digestato e chorume, o chorume do biometanizador 4 (3ª coleta) foi o que apresentou maior coeficiente de similaridade com seu respectivo digestato (60%), sendo que a menor similaridade foi de 32% entre as frações do biometanizador 2 (Figura 36).

Ainda, quanto ao domínio *Bacteria*, os digestatos dos biometanizadores 2 e 3 apresentaram um coeficiente de similaridade de 66%, enquanto que os digestatos dos biometanizadores 1 e 4 obtiveram uma similaridade de 64% entre si. Quando comparados esses dois grupos (2 e 3; 1 e 4), verifica-se que a similaridade entre eles é baixa (32%), principalmente devido ao fator inoculação com lodo de esgoto no primeiro grupo (Figura 36).

Figura 36 - Análise de *Cluster* (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de RNAr 16S para o domínio Bacteria das amostras de chorume e de digestato dos biometanizadores de 50 L. Na referência de cada perfil (à direita), o primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”

Fonte: Próprio autor.

Quando comparados os perfis de DGGE das amostras de chorume da 1ª coleta (à 60 dias de operação) com as amostras de chorume da 2ª coleta (à 120 dias de operação) de um mesmo biometanizador de 50 L, verificou-se que a estrutura da comunidade de bactérias foi alterada em todos os tratamentos: bandas presentes nas amostras da 1ª coleta tornaram-se ausentes (ex.: Figura 37 – a), menos intensas (ex.: Figura 37 – b) ou mais intensas (ex.: Figura 37 – c); novas bandas surgiram (ex.: Figura 37 – d); e, ainda, os perfis do gel referentes à segunda coleta apresentaram maior variedade de bandas que os perfis da primeira coleta, o que é confirmado pelo aumento do índice de diversidade H' (Figura 34). A similaridade entre o chorume da 1ª e 2ª coletas quanto à diversidade de bactérias foi em torno de 50% em todos os biometanizadores (Figura 36).

Figura 37 - Perfil de bandas da DGGE de fragmentos amplificados por PCR do gene RNAr 16S do domínio Bacteria. As amostras são chorume de três tempos de operação distintos e digestato dos biometanizadores de 50 L. Na referência de cada perfil, o primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”. As setas indicam as bandas mencionadas na discussão

Fonte: Próprio autor.

A visível mudança na estrutura da comunidade de bactérias quando comparadas as amostras de chorume da 1ª e 2ª coletas dos biometanizadores de 50 L, bem como a não detecção de arqueas no chorume nem no digestato dos biometanizadores 1 e 4, podem ser considerados reflexo de um processo anaeróbio desequilibrado.

Uma forma de confirmar o desajuste microbiológico ocorrido entre acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas é por meio da concentração de ácidos graxos voláteis (AGV), os quais apresentam taxas de produção e consumo equalizadas quando o sistema encontra-se equilibrado (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Na Figura 38, verifica-se um acúmulo de AGV (ácidos acético, propiônico e butírico)

e de etanol, não só no intervalo compreendido entre a 1ª e 2ª coletas, mas durante todo o período de operação dos biometanizadores de 50 L.

Figura 38 - Concentração (mg.L^{-1}) dos principais produtos intermediários (ácidos graxos voláteis - acético, propiônico e butírico; e álcool - etanol) gerados nos biometanizadores de 50 L durante o período de operação (150 dias). As setas em vermelho indicam as coletas de chorume para análise microbiológica

Fonte: Próprio autor.

Wang et al. (2009), relataram que concentrações elevadas dos ácidos acético e butírico e de etanol nas faixas de 2.400, 1.800 e 2.400 mg.L^{-1} , respectivamente, não acarretaram inibição significativa da atividade metanogênica em digestores anaeróbios. Entretanto, quando a concentração de ácido propiônico atingiu 900 mg.L^{-1} , houve um decréscimo significativo na concentração de metanogênicas, as quais não foram capazes de recuperar sua atividade posteriormente. Os autores obtiveram rendimento de metano e concentração de metanogênicas máximos quando as concentrações de ácidos acético, butírico e propiônico e de etanol foram 1.600, 1.800, 300 e 1.600 mg.L^{-1} , respectivamente.

Utilizando-se como referências os valores encontrados por Wang et al. (2009), a

análise da Figura 38 permite dizer que todos os biometanizadores operaram a maior parte dos 150 dias sob condições inapropriadas para a produção de metano (e consequentemente, para o tratamento do resíduo sólido orgânico). Mesmo com alguns pontos de exceção, o acúmulo de ácido propiônico superou a concentração limite de 900 mg.L^{-1} e as concentrações de ácidos acético, butírico e de etanol foram maiores em até 19, 11 e 18 vezes, respectivamente, dos valores mencionados pelos autores.

Esses produtos intermediários se acumularam no sistema pelo fato de terem sido produzidos pelas acidogênicas em uma taxa maior do que eram consumidos pelas acetogênicas e metanogênicas, as quais provavelmente não estavam presentes em quantidade suficiente e, se presentes, foram inibidas pelas condições desfavoráveis do ambiente. O efeito dessa situação foi o rápido consumo da alcalinidade do meio, sendo que os ácidos livres não neutralizados provocaram a queda do pH (Figura 39), resultando na acidificação do sistema (CHERNICHARO, 2007).

O efeito cascata dos fatores físico-químicos que envolvem a acidificação do biometanizador (acúmulo de AGV, consumo de alcalinidade e queda de pH) abalam a estrutura do consórcio microbiano atuante: a queda do pH à valores inferiores a 6,8 favorece ainda mais as acidogênicas (cujo pH ótimo está entre 5,5 e 6,0) e prejudica o crescimento e a atividade das metanogênicas (cujo pH ótimo situa-se entre 6,8 e 7,2) (SOUZA, 1984).

Todos os biometanizadores, exceto o 3, já apresentavam à 60 dias de operação valores de pH abaixo da faixa considerada ideal para a ocorrência da biometanização, que situa-se entre 6,8 e 7,4, conforme Mao et al. (2015) (Figura 39). Por mais 60 dias, até o momento da 2ª coleta, não se conseguiu controlar o pH do meio, provocando a queda crescente dessa variável em todos os tratamentos, com valores entre 4,62 (biometanizador 1) e 5,72 (biometanizador 3). A alcalinidade dos sistemas foi consumida de forma progressiva, sendo que os tratamentos que apresentaram a menor e a maior capacidade tampão foram o biometanizador 1 (preenchido somente com FORSU) e o biometanizador 3 (inoculado com a maior proporção de lodo de esgoto da ETE), respectivamente (Figura 39).

Quando o processo de biometanização possui como substrato unicamente resíduos sólidos orgânicos de origem alimentar (como no caso do biometanizador 1), há uma tendência maior para o acúmulo de AGV, principalmente se o sistema operar com alta carga orgânica (GOU et al., 2014). Tal fato deve-se a esse tipo de resíduo apresentar fácil biodegradabilidade, que pode ser verificada pela proporção de sólidos totais voláteis presente

no substrato: quanto maior a massa de STV, mais biodegradável é o resíduo (na presente pesquisa, os STV representavam aproximadamente 95% dos sólidos totais da FORSU (Tabela 11)).

Figura 39 - Gráficos dos parâmetros pH e alcalinidade referentes ao chorume dos biometanizadores de 50 L durante o período de operação (150 dias). As setas em vermelho indicam as coletas de chorume para análise microbiológica

Fonte: Próprio autor.

O acúmulo de produtos intermediários mais reduzidos que o ácido acético (como etanol e ácidos butírico e propiônico) contribui diretamente para a demanda química de oxigênio (DQO), além de tais produtos não serem substratos diretos da metanogênese (MESQUITA et al., 2013).

Na Figura 40, verifica-se um aumento na concentração da DQO do chorume de todos os biometanizadores de 50 L a partir do dia em que foi realizada a 1ª coleta para análises microbiológicas, o que também deve ter sido um fator de influência para a alteração da estrutura da comunidade de bactérias da 1ª para a 2ª coleta. Como os sistemas operaram em

batelada, sem a entrada periódica de substrato, esse incremento na DQO residual provavelmente foi resultado do acúmulo de produtos intermediários.

Figura 40 - Representação gráfica da DQO presente no chorume dos biometanizadores de 50 L ao longo do período de operação (150 dias). As setas em vermelho indicam as coletas de chorume para análise microbiológica

Fonte: Próprio autor.

Nesse contexto, vale ressaltar uma observação importante feita por Chernicharo (2007): o acúmulo de AGV em um biometanizador não deve ser encarado como inevitável ou como uma condição inerente do processo; na realidade, representa o sintoma de que um ou mais grupos do consórcio anaeróbico estão sendo prejudicados, seja pelo não fornecimento das condições ideais de crescimento microbiano, seja pela não observância das limitações cinéticas e termodinâmicas.

De acordo com Bolzonella et al. (2003), a concentração de ácidos graxos voláteis é o melhor parâmetro indicativo de desequilíbrio no meio anaeróbico, pois sua variância é nítida e pode ser percebida logo após a perturbação. Segundo esses autores, a instabilidade da biometanização pode ser verificada por meio dos seguintes parâmetros, ordenados quanto à sensibilidade às alterações: concentração de AGV > alcalinidade (à pH 4) > produção de biogás > concentração de metano no biogás > alcalinidade (à pH 6) > pH.

Entretanto, é questionável utilizar apenas a concentração de AGV para afirmar que o processo anaeróbico encontra-se em desequilíbrio. Franke-Whittle et al. (2014), analisando amostras de biometanizadores de grande escala, verificaram elevadas concentrações de AGV: 2.281,9 mg.L⁻¹ de ácido acético e 8.741,3 mg.L⁻¹ de ácido propiônico. Baseando-se somente nesses dados, poderia-se julgar que o processo encontrava-se instável e, pela concentração de

ácido propiônico, o colapso do biometanizador seria iminente. Contudo, os valores de pH não apresentaram mudanças significativas e a produção de metano permaneceu estável.

A neutralização do estresse causado pelo acúmulo de AGV, impedindo que o processo fosse afetado, está conectada, dentre outros fatores, à grande escala dos biometanizadores de onde as amostras foram provenientes (volume dos biometanizadores: 110 e 173 m³) e à ótima capacidade tampão do sistema (FRANKE-WHITTLE et al., 2014).

Assim, cada biometanizador suporta um determinado acúmulo de AGV, sendo que o limite é determinado principalmente pelo tipo de material de entrada (ANGELIDAKI; ELLEGAARD; AHRING, 1993). Além disso, não é possível definir níveis específicos de AGV que indiquem falha no processo de biometanização, pois a comunidade microbiana pode estar adaptada a um ambiente com elevadas concentrações de AGV e não ser afetada (FRANKE-WHITTLE et al., 2014).

Fundamentando-se em tais observações, monitorar a comunidade microbiana que se desenvolve e atua no processo de biometanização pode trazer maior sensibilidade e especificidade na detecção e confirmação de instabilidades do sistema, garantindo intervenções somente quando necessário. Lin et al. (2012), obtiveram resultados relacionados à biometanização de resíduos sólidos orgânicos (restos de frutas e verduras; restos alimentares) que sugerem que a análise microbiana pode ser uma excelente ferramenta no diagnóstico do processo anaeróbio, pois está intrinsecamente correlacionada às alterações físico-químicas do meio.

Quanto às arqueas, embora possam estar presentes em um sistema anaeróbio, apresentando diversidade dentro da comunidade (Figura 41), não há garantia da produção de metano (como ocorreu nos biometanizadores 2, 3, DACAR e ETE 1) e, caso seja produzido, pode estar em uma concentração que inviabiliza o uso do biogás para fins energéticos, como no caso do biometanizador ETE 2, para o qual a máxima produção de metano detectada foi de apenas 24% no 34º dia de operação (Figura 42).

O biometanizador 3, que recebeu a maior proporção de inóculo dentre os biometanizadores de 50 L, apresentou um índice de diversidade H' para arqueas maior do que a do biometanizador 2 (Figura 41) e, apesar de não ter produzido metano, foi o que apresentou a maior capacidade tampão do sistema quando comparado aos demais de 50 L, provavelmente devido a uma melhor eficiência nas taxas de produção e consumo de ácidos orgânicos.

Figura 41 - Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') da comunidade de arqueas presente nas amostras de inóculos (lodos ETE e DACAR), de digestato dos biometanizadores 2 e 3 (2_D e 3_D) e de digestato dos biometanizadores de 5L (ETE 1, ETE 2 e DACAR)

Fonte: Próprio autor.

Figura 42 - Representação gráfica da concentração (em %) dos gases que compuseram o biogás dos biometanizadores de 50 L (2 e 3) e dos biometanizadores de 5 L (DACAR, ETE 1 e ETE 2) durante o período de operação de 150 e 78 dias, respectivamente

Fonte: Próprio autor.

Os valores apresentados na Figura 41 para o índice de Shannon-Wiener representam a diversidade dentro do domínio *Archaea*, que é composto tanto por arqueas metanogênicas quanto por arqueas não-metanogênicas. Assim, esse índice fornece um resultado abrangente, sendo que para se obter informações específicas sobre a presença de metanogênicas poderiam ser realizadas análises de PCR em tempo real e de sequenciamento genético (GARCIA-PEÑA et al., 2011).

O lodo DACAR apresentou uma maior diversidade de arqueas que o lodo ETE (Figura 41). Contudo, pode-se dizer que a adaptabilidade do lodo ETE foi melhor que a do lodo DACAR à digestão anaeróbia da FORSU, pois houve produção de metano no biometanizador ETE 2, o qual apresentava as mesmas proporções de inóculo/FORSU/serragem que o biometanizador DACAR (Tabela 5).

Ainda, pode-se notar na Figura 43, que o coeficiente de similaridade entre o biometanizador DACAR e a sua respectiva fonte de inóculo (lodo DACAR) é baixo quanto às arqueas (34%), podendo-se inferir que a maioria das espécies de arqueas presentes no inóculo não encontrou um ambiente adequado para desenvolver-se. Já os biometanizadores inoculados com lodo ETE apresentaram coeficientes de similaridade para arqueas de 44% (ETE 1 e 2; digestato do biometanizador 3) e 64% (digestato do biometanizador 2) com seu respectivo inóculo (Figura 43).

Figura 43 - Análise de Cluster (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de RNAr 16S para o domínio *Archaea* das amostras de inóculos (lodo ETE e DACAR) e de digestato dos biometanizadores de 50 e 5L. Na referência de cada perfil (à direita), o primeiro número refere-se ao biometanizador – 2 ou 3 e a letra “D” representa “digestato”

Fonte: Próprio autor.

Apesar das inferências mencionadas, vale ressaltar a importância de realizar o teste de Atividade Metanogênica Específica (AME) (AQUINO et al., 2007) e o cálculo do potencial

metanogênico (PM) para os inóculos (TEIXEIRA et al., 2009), a fim de auxiliar na escolha daquele que poderá ter uma melhor adaptabilidade ao sistema.

Além de fornecer micro-organismos para a partida do biometanizador, o lodo também é uma fonte de nutrientes e, principalmente, um elemento que auxilia no estabelecimento do efeito tampão do sistema, pois apresenta pH maior que o da FORSU (FORSTER-CARNEIRO et al., 2004).

Um dos fatores que propiciaram um ambiente favorável ao desenvolvimento e atividade das metanogênicas no biometanizador ETE 2 foi a manutenção do pH do sistema quando comparado aos biometanizadores de 50 L (Tabela 12). Além das arqueas metanogênicas serem mais sensíveis às condições adversas ou alterações no meio, também possuem taxa de crescimento lenta, sendo que valores de pH inferiores a 6,8 favorecem as acidogênicas e prejudicam a atividade das produtoras de metano, podendo levar à perda total do biometanizador (SOUZA, 1984).

Quanto mais equilibrado um processo anaeróbio, maior será a porcentagem de metano obtida no biogás e maior estabilidade (redução dos sólidos totais voláteis) será obtida no digestato (CASSINI et al., 2003). Na Tabela 12 são apresentados os valores de remoção de STV dos biometanizadores de 50 L e 5 L, conforme o tempo em que foram operados. Verifica-se que, mesmo tendo sido operados 72 dias a menos, os biometanizadores de 5 L apresentaram maiores remoções de STV quando comparados com os biometanizadores de 50 L, exceto pelo biometanizador 1, o qual apresentou a maior taxa de remoção, não pelo equilíbrio do sistema, mas provavelmente por conter somente FORSU que é altamente biodegradável.

Tabela 12 - Porcentagem de remoção de sólidos totais voláteis (STV) dos biometanizadores de 50 L e 5 L comparando-se o valor do STV de entrada com o valor do STV de saída

Biometanizadores	STV entrada (%)	STV saída (%)	Remoção STV (%)
50 L (operados por 150 dias)			
1	94,92	70,78	25,43
2	99,84	91,82	8,03
3	95,1	90,64	4,69
4	96,06	93,67	2,49
5 L (operados por 78 dias)			
ETE 1	75,73	66,57	12,10
ETE 2	79,3	65,62	17,25
DACAR	77,1	61,49	20,25

Fonte: Próprio autor.

Ainda assim, o desempenho de todos os biometanizadores, tanto de 50 quanto de 5 L, foram muito aquém do desejado para o tratamento da FORSU, pois, de acordo com Alves (2008), os resíduos serão considerados estabilizados apenas quando o teor de STV encontrar-se abaixo de 20%, ou seja, a remoção de STV deve ser maior que 80%.

5.4.2 Análise das imagens de microscopia óptica

A seguir, serão apresentadas imagens das morfologias microbianas encontradas nas amostras dos inóculos (lodo ETE e DACAR) e do chorume dos biometanizadores de 50 L, referentes à 60, 120 e 150 dias de operação. Para que o leitor visualize com maior clareza as morfologias identificadas, para cada imagem capturada do microscópio óptico (imagens localizadas à esquerda da Figura e nomeadas com números) fez-se um recorte e ampliação das morfologias mais nítidas (imagens localizadas à direita da Figura, identificadas com as respectivas letras).

Não foram detectadas metanogênicas em nenhuma das amostras de chorume dos biometanizadores de 50 L, sendo que as principais morfologias e formas de agrupamento visualizadas foram: bacilo, diplobacilos, vibrião, espirilo, diplococos e cocos em cadeia. Contudo, notou-se algumas singularidades morfológicas em cada tempo de operação.

Nas Figuras 44, 45, 46 e 47, referentes à 60 dias de operação, verifica-se que as formas microbianas no chorume de todos os biometanizadores ainda são delgadas e com distribuição pouco volumosa, sugerindo que, apesar dos sistemas já estarem operando à 60 dias, os micro-organismos ainda estão em fase de estabelecimento e adaptação ao meio.

Nessa 1ª coleta, a presença de uma morfologia semelhante à levedura foi comum nos biometanizadores 1, 2 e 4. A levedura pertence ao grupo dos eucariotos fúngicos, sendo a maioria aeróbia facultativa, capazes de realizar metabolismo totalmente aeróbio bem como fermentativo, o que justifica seu desenvolvimento nos biometanizadores (MADIGAN et al., 2010).

O hábitat das leveduras é caracterizado pela presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores. Como descrito anteriormente, a composição da FORSU utilizada como substrato para a digestão anaeróbia foi predominantemente restos de frutas e vegetais. Esses organismos podem apresentar-se como unicelulares ovais e geralmente são muito maiores do que as células procarióticas, como observado na Figura 44 (e) (MADIGAN et al., 2010).

Nas Figuras 48, 49, 50 e 51, referentes à 120 dias de operação, os micro-organismos já

não são delgados, embora visualmente a densidade da biomassa nas amostras permaneça semelhante à da 1ª coleta. Já nas Figuras 52, 53, 54 e 55, referentes à 150 dias de operação, nota-se um maior adensamento da comunidade microbiana, provavelmente devido à adaptação às condições do meio. Todavia, tais condições não eram favoráveis à manutenção da vida vegetativa das células, pois formas com endósporos e esporos livres foram detectados nas 2ª e 3ª coletas (tais estruturas de resistências apresentam-se microscopicamente mais refringentes que as células vegetativas).

O processo de esporulação de uma célula é desencadeado em resposta à fatores ambientais (por exemplo: carência nutricional) que impeçam a vida da célula vegetativa, sendo o endósporo um estágio latente e extremamente resistente do ciclo de vida microbiano (MADIGAN et al., 2010).

Caso o meio volte a oferecer condições favoráveis de crescimento, ocorre a germinação do esporo, que rompe sua parede transformando-se novamente em célula vegetativa (PELCZAR; REID; CHAN, 1980).

De acordo com Madigan et al. (2010), filogeneticamente a capacidade de produzir endósporos é encontrada somente em uma sublinhagem particular das bactérias gram-positivas. Contudo, esse grupo é diverso fisiologicamente, incluindo anaeróbios, aeróbios, fototróficos e quimiolitotróficos, implicando que os fatores ambientais responsáveis pela formação de endósporos podem variar conforme as diferentes espécies. Além disso, ainda não foram descritas espécies de *Archaea* capazes de formar endósporos, o que sugere que tal capacidade evoluiu algum tempo após a divergência das principais linhagens de procariotos.

Quanto às morfologias encontradas nos inóculos, a maioria coincidiu com as formas mais comuns presentes no chorume dos biometanizadores de 50 L (Figuras 56 e 58), exceto pelas sarcinas, visualizadas somente na amostra de lodo da ETE de São Carlos/SP, e pelos micro-organismos fluorescentes, detectados tanto no inóculo ETE quanto no DACAR (Figuras 57 e 59). A presença de organismos fluorescentes sugere a existência de atividade metanogênica nos inóculos, pois as produtoras de metano apresentam uma co-enzima exclusiva, a F₄₂₀, que após excitada pelo comprimento de onda de 420 nm, emite uma fluorescência de cor azul-esverdeada, permitindo detectá-las na amostra e diferenciá-las das não-metanogênicas (VOGELS; KELTJENS; VAN DER DRIFT, 1988).

Figura 44 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 1 referente à 60 dias de operação. **1 e 2**) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Diplobacilos. **b)** Espirilo. **c)** Vibrião. **d)** Bacilo. **e)** Levedura (a indicação da seta mais larga propõe a comparação de tamanho entre uma célula procariótica e a levedura)

Fonte: Próprio autor.

Figura 45 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 2 referente à 60 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Cocos em cadeia. **b)** Bacilo em forma de halteres. **c)** Bacilo. **d)** Levedura

Fonte: Próprio autor.

Figura 46 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 3 referente à 60 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Diplococos. **b)** Cocos em cadeia. **c)** Vibrião. **d)** Bacilo delgado

Fonte: Próprio autor.

Figura 47 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 4 referente à 60 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Levedura. **b)** Diplobacilos. **c)** Bacilo. **d)** Bacilos em cadeia. **e)** Vibrião. **f)** Cocos em cadeia

Fonte: Próprio autor.

Figura 48 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 1 referente à 120 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Diplococos. **b)** Bacilo. **c)** Vibrião

Fonte: Próprio autor.

Figura 49 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 2 referente à 120 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Esporo livre. **b)** Vibrião. **c)** Bacilo. **d)** Cocos em cadeia

Fonte: Próprio autor.

Figura 50 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 3 referente à 120 dias de operação. **1 e 2**) Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Bacilo. **b)** Espirilo. **c)** Vibrião. **d)** Cocos em arranjo irregular

Fonte: Próprio autor.

Figura 51 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 4 referente à 120 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Forma microbiana flagelada. **b)** Diplobacilos. **c)** Vibrião. **d)** Bacilo. **e)** Vibrião com endósporo. **f)** Esporo livre

Fonte: Próprio autor.

Figura 52 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 1 referente à 150 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Vibrião. **b)** Espirilo com endósporo. **c)** Bacilo. **d)** Diplobacilos. **e)** Bacilos em forma de halteres. **f)** Bacilos em cadeia. **g)** Bacilo delgado

Fonte: Próprio autor.

Figura 53 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 2 referente à 150 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Cocos em cadeia. **b)** Diplobacilos. **c)** Espirilo. **d)** Micro-organismos organizados em paliçadas. **e)** Esporo livre. **f)** Levedura

Fonte: Próprio autor.

Figura 54 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 3 referente à 150 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Vibrião delgado. **b)** Filamentosa. **c)** Bacilo com endósporo. **d)** Bacilos em cadeia. **e)** Diplobacilos. **f)** Bacilo

Fonte: Próprio autor.

Figura 55 - Microscopia de contraste de fase do chorume do biometanizador 4 referente à 150 dias de operação. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Micro-organismos organizados em paliçadas. **b)** Espirilo delgado. **c)** Espirilo. **d)** Bacilo com endósporo. **e)** Bacilo. **f)** Espiroqueta **g)** Diplobacilos

Fonte: Próprio autor.

Figura 56 - Microscopia de contraste de fase do inóculo proveniente do lodo de esgoto da ETE de São Carlos/SP. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Espirilo com endósporo. **b)** Sarcina. **c)** Cocos em cadeia. **d)** Diplobacilos. **e)** Cocobacilo. **f)** Espiroqueta. **g)** Vibrião. **h)** Bacilo. **i)** Espirilo. **j)** Diplococos

Fonte: Próprio autor.

Figura 57- Microscopia de fluorescência do inóculo proveniente do lodo de esgoto da ETE de São Carlos/SP. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Bacilo fluorescente. **b)** Massa microbiana fluorescente

Fonte: Próprio autor.

Figura 58 - Microscopia de contraste de fase do inóculo proveniente do lodo da avícola DACAR, Tietê/SP. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Bacilo. **b)** Vibrião. **c)** Bacilos organizados em paliçadas. **d)** Espirilo com endósporos. **e)** Diplobacilos. **f)** Vibrião delgado. **g)** Bacilo delgado

Fonte: Próprio autor.

Figura 59 - Microscopia de fluorescência do inóculo proveniente do lodo da avícola DACAR, Tietê/SP. **1 e 2)** Imagens capturadas com aumento de 1000 vezes. **a)** Bacilo fluorescente. **b)** Massa microbiana fluorescente

Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÕES

Digestato e chorume coletados de um mesmo biometanizador e em um mesmo tempo de operação apresentaram baixa similaridade de espécies para o domínio *Bacteria*, sendo que o digestato obteve uma maior diversidade de bactérias que o respectivo chorume.

A serragem, quando adicionada à FORSU sem nenhuma fonte de inóculo, proporcionou o desenvolvimento de uma comunidade microbiana semelhante àquela estabelecida no biometanizador operado somente com FORSU, apresentado, consequentemente, desempenho semelhante.

A inoculação com lodo de esgoto de reator UASB favorece a estabilidade do processo de biometanização de resíduos sólidos orgânicos, por fornecer um consórcio de micro-organismos anaeróbios e por auxiliar na manutenção do efeito tampão do sistema frente aos desequilíbrios.

A diversidade morfológica dos micro-organismos presentes no chorume dos biometanizadores de 50 L foi semelhante entre os tratamentos e ao longo do tempo de operação, sendo caracterizada principalmente por bacilo, diplobacilos, vibrião, espirilo, diplococos e cocos em cadeia. Formas com endósporos e esporos livres foram detectados em todos os biometanizadores, provavelmente como resposta às condições adversas do meio.

Apesar da microscopia de fluorescência ter detectado a presença de metanogênicas no inóculo dos biometanizadores 2 e 3 de 50 L, o chorume desses sistemas não apresentou organismos produtores de metano, sugerindo que não encontraram no interior dos biometanizadores um ambiente adequado para se desenvolverem.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Devido à presença de interferentes da PCR em amostras provenientes de biometanizadores, a escolha do método de extração de ácidos nucleicos deve ser testada e adaptada à amostra de trabalho, para que permita resultados confiáveis e reprodutíveis sobre a diversidade microbiana do meio em estudo;
- Se possível, coletar excedente de amostras (chorume, massa de resíduo em digestão, digestato) e armazená-las já na forma de *pellet* à – 20°C, caso seja necessário repetir a etapa de extração de ácido nucleico;
- Realizar o monitoramento do processo de biometanização, principalmente com técnicas moleculares (qualitativas e quantitativas), tanto da diversidade do consórcio microbiano da fração líquida (chorume) quanto da sólida (massa em digestão) e, juntamente, coletar dados físico-químicos a fim de prever possíveis distúrbios no sistema.

REFERÊNCIAS

- ABDELGADIR, A.; CHEN, X.; LIU, J.; XIE, X.; ZHANG, J.; ZHANG, K.; WANG, H.; LIU, N. Characteristics, process parameters, and inner components of anaerobic bioreactors. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- ABRAMOVAY, R. **Responsabilidades compartilhadas: PNRS - Política Nacional de Resíduos Sólidos**. 2013. Disponível em: < <http://ecolmeia.org.br/responsabilidades-compartilhadas-pnrs-politica-nacional-de-residuos-solidos/>>. Acesso em 04 de maio de 2015.
- ABRELPE - Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil**. 2012. Disponível em: <<http://www.abrelpe.org.br/Panorama/panorama2012.pdf>>. Acesso em: 21 de setembro de 2013.
- ABRELPE - Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil**. 2013. Disponível em: < <http://www.abrelpe.org.br/Panorama/panorama2013.pdf>>. Acesso em: 06 de março de 2015.
- ABREU; A. A.; ALVES; J. I.; PEREIRA; M. A.; KARAKASHEV; D.; ALVES; M. M.; ANGELIDAKI, I. Engineered heat treated methanogenic granules: A promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9577-9586, 2010.
- ALLISON, S. D.; MARTINY, J. B. H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11512–11519, 2008.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.
- ANGELIDAKI, I.; ELLEGAARD, L.; AHRING, B.K. A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 159–166, 1993.
- APHA - American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environmental Federation. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. Washington, APHA, 2012.
- APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 755–781, 2008.
- AQUINO, S. F. de; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FOREST, E.; SANTOS, M. de L. F. dos; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica

(AME) em Lodos Anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007.

ASSESSMENT OF NUCLEIC ACID PURITY. Thermo Scientific. **T042 Technical Bulletin. NanoDrop Spectrophotometers**. 2010. Disponível em: <<http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>>. Acesso em: 13 de junho de 2015.

AUSTERMAN, S.; ARCHER, E.; WHITING, K. J. **Comercial Assessment - Anaerobic Digestion Technology for Biomass Projects**. Juniper Consultancy Services Ltd for Renewable East, 2007. Disponível em: <[http://www.biomassenergycentre.org.uk/pls/portal/docs/PAGE/RESOURCES/REF_LIB_RE S/PUBLICATIONS/GUIDANCE/RENEWABLES%20EAST%20%20ANAEROBIC%20DI GESTION%20\(FULL%20REPORT\).PDF](http://www.biomassenergycentre.org.uk/pls/portal/docs/PAGE/RESOURCES/REF_LIB_RE S/PUBLICATIONS/GUIDANCE/RENEWABLES%20EAST%20%20ANAEROBIC%20DI GESTION%20(FULL%20REPORT).PDF)>. Acesso em: 13 de abril de 2015.

BALÁZS, M.; RÓNAVÁRI, A.; NÉMETH, A.; BIHARI, Z.; RUTKAI, E.; BARTOS, P.; KISS, I.; SZVETNIK, A. Effect of DNA polymerases on PCR-DGGE patterns. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 84, p. 244-249, 2013.

BARLAZ, M. A.; HAM, R. K.; SCHAEFER, D. M. Mass-balance analysis of aerobically decomposed refuse. **Journal of Environmental Engineering**, v. 115, n. 6, p. 1088-1102. 1989.

BARLAZ, M. A.; HAM, R. K.; SCHAEFER, D. M. Methane production from municipal refuse: A review of enhancement techniques and microbial dynamics. **Critical Reviews in Environmental Control**, v. 19, n. 6, p. 557-584, 1990.

BARROS, R. S. M. **Medidas de diversidade biológica**. Juiz de Fora/ MG: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2007. 13 p. (Programa de Pós-graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais).

BERNAT, K.; ZIELIŃSKA, M.; CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; WOJNOWSKA-BARYŁA, I. Biogas production from different size fractions separated from solid waste and the accompanying changes in the community structure of methanogenic Archaea. **Biochemical Engineering Journal**, v. 100, p. 30-40, 2015.

BOLZONELLA, D.; BATTISTONI, P.; MATA-ALVAREZ, J.; CECCHI, F. Anaerobic digestion of organic solid wastes: process behaviour in transiente conditions. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 1-8, 2003.

BOLZONELLA, D.; PAVAN, P.; MACE, S.; CECCHI, F. Dry anaerobic digestion of differently sorted organic municipal solid waste: a full-scale experience. **Water Science & Technology**, v. 53, n. 8, p. 23-32, 2006.

BORGLIN, S. E.; HAZEN, T. C.; OLDENBURG, C. M. Comparison of aerobic and anaerobic biotreatment of municipal solid waste. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 54, p. 815-822, 2004.

BOTELHO, M. R. A., CARRIJO, M. C., & KAMASAK, G. Y. Inovações, pequenas empresas e interações com instituições de ensino/pesquisa em 40 arranjos produtivos locais de setores de tecnologia avançada. **Revista Brasileira de Inovação**, v. 6, n. 2, p. 331- 372, 2007.

BRASIL. Lei nº 12.187, de 29 de dezembro de 2009. Institui a Política Nacional sobre Mudança do Clima – PNMC e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de dezembro de 2009.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 de agosto de 2010a.

BRASIL. Decreto nº 7.404, de 23 de Dezembro de 2010. Regulamenta a Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, cria o Comitê Interministerial da Política Nacional de Resíduos Sólidos e o Comitê Orientador para a Implantação dos Sistemas de Logística Reversa, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de dezembro de 2010b.

CARNEIRO, D.R.C. **Viabilidade técnica e económica de uma unidade centralizada de co-digestão anaeróbia de resíduos orgânicos**. 2009. 167f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Portugal, 2009.

CASSERLY, C.; ERIJMAN, L. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 7-12, 2003.

CASSINI, S. T. (Coord). **Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do biogás**. PROSAB - Programa de Pesquisas em Saneamento Básico. Rio de Janeiro: ABES, RiMa, 2003. 210p.

CASTANHEIRA, L.; FERREIRA, V.; LOPES, C. ENERGAIA – Energia e desenvolvimento sustentável na região Norte. **Valorização de resíduos orgânicos**. Portugal, [200?], 35 p.

CECCHI, F.; MATA-ALVAREZ, J.; PAVAN, P.; VALLINI, G.; POLI, F. de. Seasonal effects on anaerobic digestion of the source sorted organic fraction of municipal solid waste. **Waste Management & Research**, v. 10, p. 435-443, 1992.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Volume 5, 2.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2007. 379 p.

CHYNOWETH, D. P.; O'KEEFE, D. M.; BARKDOLL, A. W.; OWENS, J. M.; EARLE, J. F. K.; LEGRAND, R. Aerobic Versus Anaerobic Composting of Municipal Solid Wastes. In: **Energy From Biomass and Wastes**, 16., 1992. Orlando. Anais... Disponível em:< http://abe.ufl.edu/chyn/download/Publications_DC/Non-Refereed/1992%20%20Aerobic%20vs%20Anaerobic.pdf>. Acesso em: 11 de maio de 2015. Acesso em 04 de maio de 2015.

CITEC. **Guidelines for the design, production and running of high technology plants for the disposal of urban waste**. Geva Editions, Italy, 2004. 280p.

CLAASSEN, S.; TOIT, E. DU; KABA, M.; MOODLEY, C.; ZAR, H. J.; NICOL, M. P. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, p. 103–110, 2013.

CLARK, W.; K. CHRISTOPHER. An introduction to DNA: Spectrophotometry, degradation, and the “Frankengel” experiment. In: KARCHER, S. J. (Ed). Tested studies for laboratory teaching. **Proceedings of the 22nd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)**, v. 22, 2000. p. 81-99.

COSTA, M.R.; MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24p.

DE BAERE, L.; MATTHEEUWS, B. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste in Europe – Status, experience and prospects. **Waste Management**, v. 3, p. 517-526, 2012.

DE LA RUBIA, M. A. **Puesta en marcha y optimización de la degradación anaerobia termofílica de lodos de EDAR**. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade de Cádiz, Espanha, 2003.

DE LA TORRE, I.; GOMA, G. Characterization of anaerobic microbial culture with high acidogenic activity. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 23, p. 185-199, 1981.

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from waste and renewable resources: An Introduction**. Federal Republic of Germany: Wiley-VCH, Weinheim, 2008, 450 p.

DUARTE, R.T.D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e *permafrost* polares**. 2010. 202f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2010.

EIGENHEER, E. M. Lixo e desperdício. In: EIGENHEER, E. M. (Org.). **Raízes do desperdício**. Rio de Janeiro: ISER, 1993.

FACCHIN, V.; CAVINATO, C.; FATONE, F.; PAVAN, P.; CECCHI, F.; BOLZONELLA, D. Effect of trace element supplementation on the mesophilic anaerobic digestion of foodwaste in batch trials: The influence of inoculum origin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 71– 77, 2013.

FIESP - Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Departamento de Meio Ambiente (DMA). **Perguntas frequentes sobre Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS)**. 2012. 30p.

FORSTER CARNEIRO, T. **Digestión anaerobia termofílica seca de residuos urbanos: estudio de las variables del processo en el arranque y estabilización del bio-reactor**. 2005.

400f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Tecnologia de Alimentos e Tecnologias do Meio Ambiente, Universidade de Cádiz, Espanha, 2005.

FORSTER-CARNEIRO, T.; FERNÁNDEZ, L.A.; PÉREZ, M.; ROMERO L.I.; SALES, D. Biometanización de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos: Proceso SEBAC. **Revista Residuos**, v. 79, p. 148-159, 2004.

FORSTER-CARNEIRO, T.; PÉREZ, M.; ROMERO, L.I. Biomethanization of solid urban waste urban: laboratory scale and pilot scale. **HOLOS Environment**, v.7, n.1, p.87-104, 2007.

FRANKE-WHITTLE, I. H; WALTER, A.; EBNER, C.; INSAM, H. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. **Waste Management**, v. 34, p. 2080–2089, 2014.

FRICKE, K.; SANTEN, H.; WALLMANN, R.; HÜTTNER, A.; DICHTL, N. Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. **Waste Management**, v. 27, p. 30-43, 2007.

FUKUZAKI, S.; NISHIO, N.; SHOBAYASHI, M.; NAGAI, S. Inhibition of fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 719-723, 1990.

GARCIA-PEÑA, E.I.; PARAMESWARAN, P.; KANG, D.W.; CANUL-CHAN, M.; KRAJMALNIK-BROWN, R. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9447–9455, 2011.

GHANIMEH, S.; FADEL, M. E.; SAIKALY, P. Mixing effect on thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 63–71, 2012.

GOMES, F. C. de S. P. **Biometanização seca de RSU** – Estado da arte e análise crítica das principais tecnologias. 2010. 199f. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade Socioeconômica e Ambiental) – Núcleo de Pesquisas em Recursos Hídricos – Pró-Água, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2010.

GÓMEZ, X.; CUETOS, M. J.; CARA, J.; MORÁN, A.; GARCÍA, A. I. Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of the municipal solid wastes: conditions for mixing and evaluation of the organic loading rate. **Renewable Energy**, v. 31, p. 2017–2024, 2006.

GOU, C.; YANG, Z.; HUANG, J.; WANG, H.; XU, H.; WANG, L. Effects of temperature and organic loading rate on the performance and microbial community of anaerobic co-digestion of waste activated sludge and food waste. **Chemosphere**, v. 105, p. 146-151, 2014.

GÜELFO, L. A. F. **Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la FORSU**. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo. 2008. 442f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente) – Universidad de Cádiz, Departamento de Ingeniería Química, Cádiz, 2008.

GUIOT, S. R.; PAUSS, A.; COSTERTON, J. W. A structured model of the anaerobic granule consortium. **Water Science & Technology**, v. 25, n.7, p. 1-10, 1992.

GUNASEELAN, V. N. Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, p. 83-114, 1997.

GUO, F., ZHANG, T. Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 4607–4616, 2013.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 585-602, 1986.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

KAPARAJU, P.; BUENDIA, I.; ELLEGAARD, L.; ANGELIDAKI, I. Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: Lab scale and pilot scale studies. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4919–4928, 2007.

KELLY, R. J. **Solid waste biodegradation enhancements and the evaluation of analytical methods used to predict waste stability**. 2002. 66f. Master (Master in Environmental Science and Engineering) – Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2002.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ANJUM, M.; MAHMOOD, T.; DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste. **Waste Management**, v. 31, p. 1737–1744, 2011.

KIM, Y. M.; JANG, H. M.; LEE, K.; CHANTRASAKDAKUL, P.; KIM, D.; PARK, K. Y. Changes in bacterial and archaeal communities in anaerobic digesters treating different organic wastes. **Chemosphere**, v.141, p.134–137, 2015.

KLIGERMAN, D. C. A era da reciclagem X A era do desperdício. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. de. (Orgs.). Resíduos sólidos, ambiente e saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p. 99-109.

KLAMMER, S.; KNAPP, B.; INSAM, H. Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. **Waste Management & Research**, v. 26, p. 173–187, 2008.

LAY, J. J.; LI, Y.Y.; NOIKE, T. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solid sludge digestion. **Water Research**, v. 31, n. 10, p. 1518-1524, 1997.

LEITE, V. D.; LOPES, W. S.; BELLI FILHO, P.; PINTO, R. O.; CASTILHO JÚNIOR, A. B.; SOARES, H.M.; LIBÂNIO, P.A.C. Bioestabilização de Resíduos Sólidos Orgânicos. **In:** CASSINI, S. T. (Coord.). Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento de biogás. Rio de Janeiro: PROSAB, 2003. p. 95-119.

LEITE, V. D.; LOPES, W. S.; PRASAD, S. Bioestabilização anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos em reatores de batelada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.1, p.119-123, 2001.

LETTINGA ASSOCIATION FOUNDATION - for environmental protection and resource conservation. **Development of decentralised anaerobic digestion systems for application in the UK**. 2009. 60p.

LETTINGA, G., HULSHOF POL, L. W., ZEEMAN, G. Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment. Lecture Notes. **Wageningen Agricultural University**, ed. January, 1996.

LIN, J.; ZUO, J.; JI, R.; CHEN, X.; LIU, F.; WANG, K.; YANG, Y. Methanogenic community dynamics in anaerobic co-digestion of fruit and vegetable waste and food waste. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 7, p. 1288–1294, 2012.

LOPES, W. S.; LEITE, V. D.; PRASAD, S. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 261–266, 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCHLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. 14ª edição. Pearson Education, 2014, 1006p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.

MAGALHÃES, A. P. T. **Biogás: um projeto de saneamento urbano**. São Paulo: Nobel, 1986. 120 p.

MAO, C.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540–555, 2015.

MATA-ALVAREZ, J. **Biomethanization of the organic fraction of municipal solid waste**. Londres, Reino Unido. Editora: IWA Publishing, 2002. 314p.

MATA-ALVAREZ, J.; MACÉ, S.; LLABRÉS, P. Anaerobic digestion of organic solid waste. An overview of research achievements and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 3-16, 2000.

McCARTY, P. L. One hundred years of anaerobic treatment. 1982. **In:** HUGHES, D.E.; STAFFORD, D.A.; WHEATLEY, B.I.; BAADER, W.; LETTINGA, G.; NYNS, E.J.; VERSTRAETE, W.; WENTWORTH, R.L. (Eds.). **Anaerobic Digestion**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press B.V., 1981. p. 3-22.

McCARTY, P. L.; McKINNEY, R. E. Salt toxicity in anaerobic digestion. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 33, n. 4, p. 399-415, 1961.

McMAHON, K. D.; STROOT, P. G.; MACKIE, R. I.; LUTGARDE RASKIN, L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions - II: Microbial population dynamics. **Water Research**, v. 35, n. 7, p. 1817–1827, 2001.

MESQUITA, P. da L.; AFONSO, R. J. de C. F.; AQUINO, S. F. de.; LEITE, G. de S. Validação de método de cromatografia líquida para a determinação de sete ácidos graxos voláteis intermediários da digestão anaeróbia. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 295-302, 2013.

METCALF, E.; EDDY, M. **Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse**. 3 ed., Nova York, Estados Unidos: McGraw-Hill, 1991.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. **Manual para implantação de compostagem e de coleta seletiva no âmbito de consórcios públicos**. Brasília-DF: Projeto internacional de cooperação técnica para a melhoria da gestão ambiental urbana no Brasil, 2010. 75 p.

MORÉ, M.; HERRICK, J.B.; SILVA, M.O.; GHIORSE, W.C.; MADSEN, E.J. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1572–1580, 1994.

MOREIRA, H. M.; GIOMETTI, A. B. dos R. O Protocolo de Quioto e as possibilidades de inserção do Brasil no mecanismo de desenvolvimento limpo por meio de projetos em energia limpa. **Contexto Internacional**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 9-47, 2008.

MULLIS, K. B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R. A. The polymerase chain reaction. Birkhäuser, Boston, 1994. In: ARCHIBALD, A. L. **Livestock Production Science**, v. 48, n. 1, p. 79-80, 1997.

MURRAY, A. E.; HOLLIBAUGH, J. T.; ORREGO, C. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2676–2680, 1996.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127–141, 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E. C. de; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695–700, 1993.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 3131–3145, 1985.

NAYONO, S. E. **Anaerobic digestion of organic solid waste for energy production**. 2009. 152 f. Dissertação – Instituto de bioengenharia e biotecnologia de águas residuárias - Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Alemanha, 2009.

ODUM, E. P. Populações em comunidades. **In:** ODUM, E. P. (Ed). Ecologia. São Paulo: Guanabara, 1988.

OREMLAND, R.S. Biogeochemistry of methanogenic bacteria. **In:** ZEHNDER, A. J. B. (eds). Biology of anaerobic microorganisms. New York: John Wiley & Sons, p. 641-705, 1988.

OSTREM, K. **Greening waste:** anaerobic digestion for treating the organic fraction of municipal solid wastes. 2004. 54f. Dissertação (Mestrado em Earth Resources Engineering) – Foundation of School of Engineering and Applied Science, Columbia University, 2004.

OUEDRAOGO, A. 1999. Pilot scale two-phase anaerobic digestion of the biodegradable organic fraction of Bamako district municipal solid waste. **In:** II International Symposium Anaerobic Digestion of Solid Waste. Barcelona, v. 2, p. 73-76.

PARKIN, G. F.; OWEN, W. F. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. **Journal of Environmental Engineering**, n. 112, p. 867-920, 1986.

PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia:** conceitos e aplicações. 2a edição. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997. v.1, 524p.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. v.1.

PÉREZ, M.; ROMERO, L. I.; NEBOT, E.; SALES, D. Thermophilic anaerobic degradation of distillery wastewater in continuous-flow fluidized bed bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 33-38, 1997.

PÉREZ de CASTRO, A. M. **Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)**. Universidade Politécnica de Valência, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10251/10700>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.

QUINTAES, B. R.; SILVA, C. A. M. DA C. E; HINOJOSA, M. A. G.; CAMPOS, J. C. Avaliação de comunidades microbianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos – Revisão. **Revista de Ciencia & Tecnologia**, v. 12, n. 2, p. 7-19, 2012.

REICHERT, G. A. Aplicação da digestão anaeróbia de resíduos sólidos urbanos: uma revisão. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23., 2005, Campo Grande/MS. **Anais...**Campo Grande: ABES, 2005, p. 1-16.

REIS JUNIOR, F. B. dos; MENDES, I. de C.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de micro-organismos do solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 33 p.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.

RITTMANN, B. E.; McCARTY, P. P. **Environmental biotechnology: principles e applications**. Mc Graw-Hill International Editions, 754 p., 2001.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T. M; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.

ROMERO, L. I.; SALES, D.; MARTINEZ, E. Comparison of three practical processes for purifying wine distillery wastewater. **Process Biochemistry**, v. 25, p. 93-96, 1990.

ROUX, R. **Compartilhamento da responsabilidade: entraves barram a logística reversa pretendida na PNRS**. 2015. Disponível em: < <http://www.conjur.com.br/2015-abr-08/rodrigo-roux-entraves-barram-logistica-reversa-pretendida-pnrs>>. Acesso em: 04 de maio de 2015.

SAKAMOTO, I. K. **Comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica do fósforo em excesso, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**. 2001. 162f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2001.

SALOMÃO, L. **Senado aprova prorrogação do prazo para extinção de lixões**. 2015. Disponível em: < <http://g1.globo.com/politica/noticia/2015/07/senado-aprova-prorrogar-por-2-anos-extincao-de-lixoes.html>>. Acesso em: 17 de agosto de 2015.

SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1101-1007, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. 800 p.

SANTOS, S. S.; NIELSEN, T. K.; HANSEN, L. H.; WINDING, A. Comparison of three DNA extraction methods for recovery of soil protist DNA. **Journal of Microbiological Methods**, v. 115, p. 13-19, 2015.

SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, n. 42, p. 119-133, 2007.

SCHALCH, V.; CASTRO, M.A.S. de; CÓRDOBA, R.E. **Tratamento e disposição final ambientalmente adequada de resíduos sólidos urbanos**. São Carlos: Edição do autor,

2013. (Material didático da disciplina optativa Tratamento de Resíduos Sólidos. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo).

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication**. Urbana. University of Illinois Press, 1949, 117p.

SILVA, P. C. M. da; JESUS, L. L. de; FIRMO, A. L. B.; HOLANDA, S. H. de B.; SILVA, L. C. S. da. Estudo da biodegradabilidade e do potencial de geração de biogás através de monitoramento de reatores com resíduos sólidos urbanos. In: Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação (CONNEPI), 7., 2012. Palmas, Tocantins. **Anais...**Palmas: 2012.

SINGHAL, Y.; BANSAL, S. K.; SINGH, R. Evaluation of biogas production from solid waste using pretreatment method in anaerobic condition. **International Journal of Emerging Sciences**, v. 2, nº 3, p. 405-414, 2012.

SISINNO, C. L. S. Resíduos sólidos e saúde pública. **In:** SISINNO, C. L. S; OLIVEIRA, R. M. de. (Orgs.). Resíduos sólidos, ambiente e saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p. 41-57.

SOLER, F. **Prazos da Política Nacional de Resíduos Sólidos**. 2014. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/legislacao/3667234/prazos-da-politica-nacional-de-residuos-solidos#ixzz3BVApguED>>. Acesso em 02 de abril de 2015.

SOUTO, G. D. DE B. **Efeito da variação gradual da taxa de recirculação do lixiviado em reatores anaeróbios híbridos na digestão da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos**. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2005.

SOUZA, M. E. de. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. **Revista DAE**, v. 44, n. 137, p. 88-94, 1984.

STALEY, C.; GOULD, T. J.; WANG, P.; PHILLIPS, J.; COTNER, J. B.; SADOWSKY, M. J. Evaluation of water sampling methodologies for amplicon-based characterization of bacterial community structure. **Journal of Microbiological Methods**, v. 114, p. 43–50, 2015.

STROOT, P. G.; McMAHON, K. D.; MACKIE, R. I.; RASKIN, L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions: I. Digester performance. **Water Research**, v. 35, n. 7, p. 1804–1816, 2001.

SU, C.; LEI, L.; DUAN, Y.; ZHANG, K.; YANG, J. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 93, p. 993–1003, 2012.

SUPAPHOL, S.; JENKINS, S. N.; INTOMO, P.; WAITE, I. S.; O'DONNELL, A. G. Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4021–4027, 2011.

TALBOT, G.; TOPP, E.; PALIN, M. F.; MASSÉ, D.I. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. **Water Research**, n. 42, p. 513 – 537, 2008.

TEIXEIRA, A. R.; CHERNICHARO, C. A. de L.; SOUTO, T. F. da S.; PAULA, F. S. de. Influência da alteração da distribuição do tamanho de partículas no desempenho de reator UASB tratando esgoto doméstico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 2, p. 159-166, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967p.

TSAL, Y.; OLSON, B. H. Rapid method for separation of bacterial dna from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2292-2295, 1992.

TURNER, C.; BURTON, C. H. The inactivation of viruses in pig slurries: a review. **Bioresource Technology**, v. 61, p. 9-20, 1997.

VALADARES, J. de C. Ambiente e comportamento: os restos da atividade humana e o “mal-estar na cultura”. **In: SISINNO, C. L. S; OLIVEIRA, R. M. de. (Orgs.). Resíduos sólidos, ambiente e saúde: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p. 129-138.

VAN BUREN, A. (ed.). **A Chinese biogas manual.** London: Intermediate Technology Publications, 1979. 135p.

VAN DE BERG, L.; LENTZ, C. P. Effects of digester configuration, waste composition and inoculum rates of production of methane from wastes. **Proceedings – Bioenergy R&D Seminar**, 1980.

VANDEVIVERE, P.; DE BAERE, L. e VERSTRAETE, W. Types of Anaerobic Digester for Solid Wastes. **In: Biomethanization of the organic fraction municipal waste.** MATA-ALVAREZ, J. (Coord.). Londres, Reino Unido. Editora: IWA Publishing, 2002. p. 111-137.

VANWONTERGHEM, I.; JENSEN, P. D; HO, D. P., BATSTONE, D. J.; TYSON, G. W. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 55–64, 2014.

VAZOLLER, R.F.; MANFIO, G.P.; CANHOS, V.P. Domínio Archaea: Reinos Crenarcheota, Euryarcheota e Korarcheota. **In: CANHOS, V.P.; VAZZOLER, R.F. (eds). Série biodiversidade do Estado de São Paulo: Microrganismos e vírus.** São Carlos: FEA/UNICAMP, 1999. v.1.

VERSTRAETE, W., VANDEVIVERE, P. 2005. Types of anaerobic digester for solid wastes. **In: Williams, P.T. Waste treatment and disposal - Critical Reviews in Environmental Science Technology**, Ed. Wiley Institute Science. 390p.

VOGELS, G. D.; KELTJENS, J. T.; VAN DER DRIFT, C. Biochemistry of Methane Production. **In:** ZEHNDER, A. J. B. (Ed.). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, p. 707-770, 1988.

WAHBA, L. L. A sombra do desperdício. **In:** EIGENHEER, E. M. (Org.). *Raízes do desperdício*. Rio de Janeiro: ISER, 1993.

WAN, S.; SUN, L.; DOUIEB, Y.; SUN, J.; LUO, W. Anaerobic digestion of municipal solid waste composed of food waste, wastepaper, and plastic in a single-stage system: Performance and microbial community structure characterization. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 619–627, 2013.

WANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J.; MENG, L. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 848-853, 2009.

WECHSLER, S. M. Criatividade e inovação no contexto brasileiro. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE CRIATIVIDADE E INOVAÇÃO: visão e prática em diferentes contextos, 1., 2011, Manaus. **Anais...** Manaus: UFAM, 2011. p. 29-47.

WEISS, A.; JÉRÔME, V.; FREITAG, R. Comparison of strategies for the isolation of PCR-compatible, genomic DNA from a municipal biogas plants. **Journal of Chromatography B**, v. 853, p. 190–197, 2007.

WEISS, A.; JÉRÔME, V.; FREITAG, R.; MAYER, H. K. Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 163-173, 2008.

WILLIAMSON, K. E.; KAN, J.; POLSON, S. W.; WILLIAMSON, S. J. Optimizing the indirect extraction of prokaryotic DNA from soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 736-748, 2011.

WILSON, I. G. Minireview: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741–3751, 1997.

WILSON, K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. **In:** AUSUBEL, F.M. (Ed.). *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc., 1997, p. 2.4.1.

WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 213-229, 1997.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v.74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

XIAOFENG, L.; SHUANGYAN, Z.; DELAI, Z.; JINGPING, Z.; LI, L. Anaerobic co-digestion of food waste and landfill leachate in single-phase batch reactors. **Waste Management**, v. 34, p. 2278–2284, 2014.

YOUNG, J. M.; WEYRICH, L. S.; COOPER, A. Forensic soil DNA analysis using high-throughput sequencing: A comparison of four molecular markers. **Forensic Science International: Genetics**, v. 13, p. 176–184, 2014.

ZANDVOORT, M. H.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; GIETELING, J.; LENS, P. N. L. Granular sludge in full-scale anaerobic bioreactors: Trace element content and deficiencies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 337–346, 2006.

ZHANG, Y.; BANKS, C. J. Impact of different particle size distributions on anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste. **Waste Management**, v. 33, p. 297–307, 2013.

ZHANG, R.; EL-MASHAD, H. M.; HARTMAN, K.; WANG, F.; LIU, G.; CHOATE, C.; GAMBLE, P. Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 929–935, 2007.

ZHANG, L.; OUYANGA, W.; LI, A. Essential role of trace elements in continuous anaerobic digestion of food waste. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16, p. 102 – 111, 2012.

APÊNDICE – Folder para a orientação quanto à separação dos resíduos na fonte

Projeto SE PARE!

Nada se perde, tudo se transforma!

Como contribuir?

Separe os resíduos orgânicos gerados em seu estabelecimento e coloque-os em sacos plásticos. Esses resíduos serão coletados pelas alunas do projeto em data e horário combinados.

O que PODE ser colocado na sacola:

- Cascas de frutas e legumes;
- Talos de verduras;
- Casca de ovo;
- Borra/filtro de café;
- Saquinho de chá;
- Guardanapo de papel; papel toalha;
- Folhas e flores; mato/poda de jardim.

Pode-se colocar em pequena quantidade:

- Restos de alimentos preparados.

O que NÃO PODE ser colocado na sacola:

- Resíduos não biodegradáveis (plástico, vidro, metal, pilhas, tintas, têxteis, etc.);
- Medicamentos;
- Excrementos de animais domésticos;
- Resíduos de plantas tratadas com produtos químicos;
- Bituca de cigarro.

Você sabia?

O Brasil possui uma Lei (Lei nº 12.305/2010 – institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos) que determina que os resíduos sólidos orgânicos, como restos de comida e podas de jardim, sejam reciclados e/ou aproveitados energeticamente. Assim, não devem ser dispostos em aterro sanitário nem em locais inadequados. Dessa forma, prolonga-se a vida útil do aterro e evita-se danos ambientais.

O que pode ser feito?

Os resíduos sólidos orgânicos podem ser tratados através das seguintes alternativas:

- ⇒ **Compostagem:** degradação dos resíduos sólidos orgânicos por micro-organismos na presença de oxigênio. O processo estabiliza os resíduos e gera um composto final, considerado matéria fertilizante e reutilizável como condicionador do solo.
- ⇒ **Biometanização:** degradação dos resíduos sólidos orgânicos por micro-organismos na ausência de oxigênio. O processo gera o biogás, que pode ser utilizado para a produção de energia térmica ou mecânica. O resíduo digerido final deve ser compostado, obtendo-se também um condicionador do solo.

Para refletir...

Projeto SE PARE!

Está vinculado ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento da USP de São Carlos e tem como objetivo o estudo de técnicas para o tratamento de resíduos sólidos orgânicos.

Equipe e contatos:

Carolina L. Bionto – (16) 997185750
Fernanda R. Vilela – (35) 84511031
Julia J. Guarnieri – (19) 380822448

eper
Instituto de Estudos e Pesquisa em Resíduos Sólidos

ANEXO – Composição das soluções componentes do gel gradiente desnaturante

Solução Bis-acrilamida 40%

COMPONENTES	QUANTIDADE
Acrilamida	194,65 g
Bis-acrilamida	5,35 g
H ₂ O Milli-Q	500 mL

Solução tampão TAE 50X

COMPONENTES	QUANTIDADE
Tris base	242,0 g
Ácido acético	57,1 mL
EDTA 0,5M (pH 8,0)	100 mL
H ₂ O Milli-Q	Até completar 1000 mL