

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CAROLINA VIEIRA DA ROCHA

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO: AVALIAÇÃO
DO BIOAUMENTO DA MICROBIOTA AUTOIMOBILIZADA**

CURITIBA

2011

MARIA CAROLINA VIEIRA DA ROCHA

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO: AVALIAÇÃO
DO BIOAUMENTO DA MICROBIOTA AUTOIMOBILIZADA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Maria Cristina Borba Braga, PhD

Coorientadora: Prof^a Dr^a Karin Braun Prado

CURITIBA

2011

Rocha, Maria Carolina Vieira da

Digestão anaeróbia de lixiviado de aterro sanitário: avaliação do bioaumento da microbiota autoimobilizada / Maria Carolina Vieira da Rocha. – Curitiba, 2011.

123 f. : il.; graf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental.

Orientadora: Maria Cristina Borba Braga

Co-orientadora: Karin Braun Prado

1. Digestão anaeróbia. 2. Aterro sanitário. I. Braga, Maria Cristina Borba. II. Prado, Karin Braun. III. Título.

CDD 628.44564



TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA CAROLINA VIEIRA DA ROCHA

"DIGESTÃO ANAERÓBIA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO: AVALIAÇÃO DO BIOAUMENTO DA MICROBIOTA AUTOIMOBILIZADA"

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

PRESIDENTE:

Maria Cristina Borba Braga
Universidade Federal do Paraná
Orientadora

MEMBROS:

Karin Braun Prado
Universidade Federal do Paraná
Co-orientadora

Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Universidade Federal do Paraná

Selma Aparecida Cubas
Universidade Positivo

Miguel Mansur Aisse
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 14 de março de 2011

**À Maria Luiza,
estrelinha.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Todo e o Sempre.

À minha luz Maria Luiza e ao meu companheiro de caminhada Leo Hoffmann.
Amo vocês.

À minha orientadora e amiga Maria Cristina Borba Braga. Por acreditar.
Juntas, tornamos isto possível.

Aos meus pais, Graça e Jazonir, pelo amor e compreensão.

Aos amigos queridos Monica Eboly, Sérgio Braga, Natália Dias, Patrícia Arns, Luiz Carlos Barbosa, Elaine Kurscheidt, Guilherme Samways, Luiz Fernando Dombrowski, Marcela Bortoletto, Karina Machado, Clarissa Sékula, Roberta Chamon, Stéphanie Meyer, Margret Engel, Alinne Mizukawa, Iara Bettinardi, Vanessa Gonçalves, Carla Cristina Bem. Se faltou mencionar alguém foi por descuido da memória e não do coração. Obrigada a todos!

À professora e coorientadora Karin Braun Prado, pela amizade, disponibilidade e apoio irrestritos. Aos seus estagiários Fernando e Renata pelo auxílio e torcida.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica- CME da Universidade Federal do Paraná e aos bons amigos Vera Regina, Rosângela e Luiz.

À Sara, Ana Cláudia e Andressa pelo apoio fundamental nas atividades do Laboratório de Engenharia Ambiental Prof. Francisco Borsari Neto.

Ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental da Universidade Federal do Paraná, pelos recursos e instalações essenciais para a realização deste estudo.

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.

Louis Pasteur (1822-1895)

Meu Deus, que maravilhas existem em uma criatura tão pequena!

Antonie Van Leeuwenhoek (1632- 1723) em carta à Royal Society of London

RESUMO

Este estudo avaliou a influência do bioaumento da microbiota sobre o processo da digestão anaeróbia de lixiviado de aterro sanitário. Foram construídos dois reatores anaeróbios em bateladas sequenciais, com biomassa autoimobilizada na forma de lodo anaeróbio proveniente da lagoa facultativa do Aterro Sanitário de Curitiba. Um dos reatores foi inoculado com microrganismos típicos, cultivados a partir do próprio lixiviado de aterro sanitário. As eficiências na remoção das variáveis DQO, COD e N-NH₃ foram de, respectivamente, 40%, 70% e 20% para o reator sem inóculo, ou reator Controle, e 60%, 75% e 21% para o reator inoculado, ou reator Teste. O arraste de sólidos, comum em sistemas em batelada, foi menor no reator Teste, provavelmente devido ao aumento na quantidade de polissacarídeo extracelular (EPS) secretado pelos microrganismos inoculados. Sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível acompanhar a evolução dos biofilmes de ambos os reatores por até 60 dias de operação. Foi constatado que o reator Teste apresentou maior quantidade de EPS secretado, conferindo uniformidade à estrutura do seu biofilme. Análises bioquímicas e moleculares confirmaram a presença de representantes das três ordens metanogênicas nas amostras de lodo, com destaque para as ordens Methanobacteriales, hidrogenotrófica e Methanosarcinales, acetoclástica. Os resultados dos ensaios da atividade metanogênica específica (AME) das amostras de lodo não apresentaram diferença significativa entre os reatores, entretanto, houve aumento da AME ao longo do tempo (40 dias) para ambos os reatores, indicando a maturação dos biofilmes. Foi realizado o perfil de concentrações de ácidos orgânicos voláteis (AGV) em um tempo de ciclo dos reatores e os resultados indicaram o acetato como o AGV mais abundante na digestão anaeróbia do lixiviado. Na última etapa do estudo foram avaliadas as eficiências de remoção das variáveis COD e N-NH₃ nos reatores em batelada alimentados com lixiviado com concentração de fosfato corrigida. A adição deste macronutriente não favoreceu a remoção da matéria orgânica ou do nitrogênio amoniacal e não foi possível afirmar, com base neste estudo, que o fósforo seja uma espécie química limitante na digestão anaeróbia do lixiviado de aterro sanitário.

Palavras-chave: digestão anaeróbia, bioaumento, lixiviado de aterro sanitário, reator anaeróbio em bateladas sequenciais

ABSTRACT

This study evaluated the influence of microbiota bioaugmentation in the process of anaerobic digestion of landfill leachate. Two anaerobic sequencing batch reactors were constructed, with self-immobilized biomass in the form of anaerobic sludge from the facultative pond of the landfill in Curitiba. One of the reactors was inoculated with typical microorganisms cultivated from leachate. The efficiencies in the removal of the variables COD, DOC and $\text{NH}_3\text{-N}$ were, respectively, 40%, 70% and 20% for the reactor without inoculum, or Control reactor, and 60%, 75% and 21% for the reactor inoculated or Test reactor. The entrainment of solid, common in batch systems, was lower in the Test reactor, probably due to the increased amount of extracellular polysaccharides (EPS) secreted by the microorganisms inoculated. Under scanning electron microscopy (SEM) was possible to follow the evolution of biofilms in both reactors for up to 60 days of operation. It was found that the Test reactor showed higher amount of EPS secreted, providing uniformity to the structure of his biofilm. Biochemical and molecular tests confirmed the presence of representatives of the three orders in methanogenic sludge samples, especially for orders Methanobacteriales, hydrogenotrophic and Methanosarcinales, acetoclastic. The results of specific methanogenic activity (SMA) of sludge samples showed no significant difference between the reactors, however, there was an increase of SMA over time (40 days) for both reactors, indicating the maturation of biofilms. The concentration profile of volatile organic acids (VGA) in a cycle time of the reactors was performed and the results indicated acetate as the most abundant VFA in anaerobic digestion of leachate. In the last stage of the study, were evaluated the removal rates of the variables COD and N-NH_3 in batch reactors fed with leachate that had phosphate concentration corrected. The addition of this macronutrient did not favor the removal of organic matter and ammonia nitrogen and could not say, based on this study, that phosphorus is the limiting chemical species in the anaerobic digestion of landfill leachate.

Key-words: anaerobic digestion, bioaugmentation, landfill leachate, anaerobic sequencing batch reactor

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DE UM BIOFILME ANAERÓBIO AO LONGO DO TEMPO EM REATOR ANAERÓBIO DE MANTA DE LODO (UASB) ...	36
FIGURA 2.2 – ORDEM METHANOBACTERIALES: A) <i>METHANOSPHAERA</i> SP. EM MEV, AUMENTO DE 20.000X; B) <i>METHANOSPHAERA</i> SP. EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE CRIO-FRATURA, AUMENTO DE 20.000X; C) <i>METHANOBREVIBACTER ARBORIPHILUS</i> , EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE CONTRASTE NEGATIVO, AUMENTO DE 20.000X; D) <i>METHANOBREVIBACTER ARBORIPHILUS</i> , EM MEV, AUMENTO 20.000X	39
FIGURA 2.3 – ORDEM METHANOMICROBIALES: A) <i>METHANOPLANUS PRETOLEARIUS</i> EM MEV, AUMENTO 25.000X; B) <i>METHANOSPIRILLUM</i> SP, EM MEV, AUMENTO DE 10.000X	40
FIGURA 2.4 – ORDEM METHANOSARCINALES: A) <i>METHANOSARCINA MAZEI</i> , EM MEV, AUMENTO DE 2.000X; B) <i>METHANOSAETA</i> SP, EM MEV, AUMENTO DE 10.000X.....	41
FIGURA 3.1 - VISTA AÉREA DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA (25° 37' 15,35"S; 49° 20' 18,82"O): (1) EMISSÁRIO CENTRAL E (2) LAGOA FACULTATIVA	50
FIGURA 3.2 - EMISSÁRIO CENTRAL DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA	50
FIGURA 3.3 - COLETA DO LODO ANAERÓBIO NA LAGOA FACULTATIVA DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA	51
FIGURA 3.4 – MEMBRANAS DE CULTIVO APÓS PROCESSAMENTO PRÉ-MEV: 1- MB-CLO; 2- MB-BACI; 3- MB-PEN E 4- MB-FREE	58
FIGURA 3.5 – REATORES: A) VISÃO GERAL, B) FUNIL DE ALIMENTAÇÃO, C) CAPE E TUBO EM "L", D) SAÍDA DO LODO.....	60
FIGURA 3.6 – CAMADA DE LODO ANAERÓBIO. 1) REATOR CONTROLE, 2) REATOR TESTE.....	61
FIGURA 3.7 – (A) REATOR DE ATIVIDADE METANOGÊNICA. R- FRASCO DE BIOMASSA; M- FRASCO DE SOLUÇÃO NAOH; T - CÂMARA DE SEGURANÇA, (B) SISTEMA DA AME DURANTE ENSAIO	64
FIGURA 3.8 – EXEMPLO DE REPRESENTAÇÃO GRÁFICA TEMPO <i>VERSUS</i> PRODUÇÃO CUMULATIVA DE METANO. A INCLINAÇÃO DO TRECHO RETO DA	

CURVA FORNECE A TAXA DE PRODUÇÃO DE METANO.....	65
FIGURA 4.1 – (A) MEIO MB, (B) MEIO MB-CLORANFENICOL, (C) MEIO MB-ACETATO, (D) MEIO MB-ACETATO-CLORANFENICOL, (E) MEIO MB-METANOL, (F) MEIO MB-METANOL-CLORANFENICOL	71
FIGURA 4.2 - BOLSÕES DE GÁS EM MEIO MB	72
FIGURA 4.3 – (A) COLÔNIAS EM REGIÃO DE INIBIÇÃO NO MEIO MB-CLORANFENICOL; (B) MORFOLOGIAS COLONIAIS OBSERVADAS, TIPOS 1 E 2	73
FIGURA 4.4 – COLÔNIAS (MEIO MB-ACETATO) EM ESTEREOMICROSCOPIA BARRA= 1MM.....	74
FIGURA 4.5 - MICRORGANISMOS SIMILARES À <i>METHANOBREVIBACTER</i> SP. BARRA= 10µM.....	74
FIGURA 4.6 – CRESCIMENTO COLONIAL EM MEIO: (A) MB-FREE; (B) MB-CLO; (C) MB-BACI E (D) MB-PEN	75
FIGURA 4.7 - CANAIS DE CIRCULAÇÃO EM MEIO MB-FREE (SETAS)	76
FIGURA 4.8 - MEIO MB-CLO. MS- SIMILAR A <i>METHANOSARCINA</i> SP.; MB-SIMILAR A <i>METHANOBREVIBACTER</i> SP.; MP- SIMILAR A <i>METHANOSPHERA</i> SP.	76
FIGURA 4.9 – (A) MICRORGANISMOS SIMILARES A <i>METHANOBREVIBACTER</i> SP. (SETAS); (B) PONTAS AFUNILADAS (“TAPERED ENDS”), CARACTERÍSTICA DE <i>METHANOBREVIBACTER</i> SP. (SETAS)	77
FIGURA 4.10 - CANAIS DE CIRCULAÇÃO EM MEIO MB-BACI (SETAS). BARRA = 1µM	77
FIGURA 4.11 - MEIO MB-PEN. SETA- MICRORGANISMOS SIMILARES À <i>METHANOSPHERA</i> SP.....	78
FIGURA 4.12 – VARIAÇÃO TEMPORAL DO PH PARA OS REATORES CONTROLE E TESTE	79
FIGURA 4.13 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA RELAÇÃO ALCALINIDADE TOTAL E ACIDEZ VOLÁTIL PARA OS REATORES CONTROLE (RC) E TESTE (RT).....	81
FIGURA 4.14 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS VOLÁTEIS NOS REATORES CONTROLE (RC) E TESTE (RT).....	82
FIGURA 4.15 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA ALCALINIDADE NOS REATORES: A) REATOR CONTROLE, B) REATOR TESTE.....	83

FIGURA 4.16 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA TEMPERATURA PARA OS REATORES CONTROLE E TESTE.....	84
FIGURA 4.17 – REMOÇÃO DA DQO DO LIXIVIADO DURANTE A OPERAÇÃO DOS REATORES CONTROLE E TESTE	84
FIGURA 4.18 – REMOÇÃO DO COD DO LIXIVIADO DURANTE A OPERAÇÃO DOS REATORES CONTROLE E TESTE	85
FIGURA 4.19 – REMOÇÃO DO NITROGÊNIO AMONIACAL DO LIXIVIADO DURANTE A OPERAÇÃO DOS REATORES CONTROLE E TESTE	86
FIGURA 4.20 – VARIAÇÃO TEMPORAL DO CONJUNTO DE SÓLIDOS DISSOLVIDOS: (A) REATOR CONTROLE, (B) REATOR TESTE	88
FIGURA 4.21 – VARIAÇÃO TEMPORAL DO CONJUNTO DE SÓLIDOS SUSPENSOS NO AFLUENTE: (A) REATOR CONTROLE, (B) REATOR TESTE ...	89
FIGURA 4.22 – BIOFILME ANAERÓBIO SOBRE A SUPERFÍCIE DOS GRÂNULOS DO LODO COLETADO. A) RC, 1º DIA DE OPERAÇÃO.; B) RT, 1º DIA DE OPERAÇÃO.); C) RC, 20º DIA DE OPERAÇÃO; D) RT, 20º DIA DE OPERAÇÃO..	92
FIGURA 4.23 – BIOFILME ANAERÓBIO SOBRE A SUPERFÍCIE DOS GRÂNULOS DO LODO COLETADO. A) RC, 40º DIA DE OPERAÇÃO. SETAS INDICAM REGIÕES SEM CRESCIMENTO (“VALES”), B) RT, 40º DIA DE OPERAÇÃO. CÍRCULO INDICA <i>CLUSTER</i> SIMILAR A <i>METHANOSARCINA SP.</i> , C) RC, 60º DIA DE OPERAÇÃO. SETA INDICA QUEBRA DO BIOFILME; D) RT, 60º DIA DE OPERAÇÃO. CÍRCULO INDICA ESTRUTURA COM MICROCANAIS	94
FIGURA 4.24 – ESPÉCIES SIMILARES A METANOGENÉTICAS NA SUPERFÍCIE DO BIOFILME A) RC, 1º DIA. MS- <i>METHANOSARCINA SP.</i> , B) RT, 1º DIA. MT- <i>METHANOSAETA SP</i> , C) IMAGEM DE REFERÊNCIA- <i>METHANOSARCINA SP</i> ; D) IMAGEM DE REFERÊNCIA- <i>METHANOSAETA SP</i>	95
FIGURA 4.25 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE. PISTAS 1 A 11- PRIMERS DOMÍNIO BACTÉRIA, COM: 1) LODO BRUTO, 2) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 3) RC 1º DIA, 4) RT 1º DIA, 5) RC 20º DIA, 6) RT 20º DIA, 7) RC 40º DIA, 8) RT 40º DIA, 9) RC 60º DIA, 10) RT 60º DIA, 11) ÁGUA. MM- MARCADOR MOLECULAR 100PB. PISTAS 12 A 22- PRIMERS DOMÍNIO ARCHAEA, COM: 12) LODO BRUTO, 13) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 14) RC 1º DIA, 15) RT 1º DIA, 16) RC 20º DIA, 17) RT 20º DIA, 18) RC 40º DIA, 19) RT 40º DIA, 20) RC 60º DIA, 21) RT 60º DIA, 22) ÁGUA. PISTAS 23 A 27: PRIMERS ORDEM METHANOBACTERIALES, COM: 23) LODO BRUTO, 24) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 25) RC 1º DIA, 26) RT 1º DIA, 27) RC 20º DIA.....	97

FIGURA 4.26 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE. PISTAS 1 A 6- PRIMERS ORDEM METHANOBACTERIALES, COM: 1) RT 20° DIA, 2) RC 40° DIA, 3) RT 40° DIA, 4) RC 60° DIA, 5) ÁGUA, 6) RT 60° DIA. MM- MARCADOR MOLECULAR 100PB. PISTAS 7 A 17- PRIMERS ORDEM METHANOMICROBIALES, COM: 7) ÁGUA, 8) LODO BRUTO, 9) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 10) RC 1° DIA, 11) RT 1° DIA, 12) RC 20° DIA, 13) RT 20° DIA, 14) RC 40° DIA, 15) RT 40° DIA, 16) RC 60° DIA, 17) RT 60° DIA. 22) ÁGUA. PISTAS 18 A 27: PRIMERS ORDEM METHANOSARCINALES, COM: 18) LODO BRUTO, 19) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 20) RC 1° DIA, 21) RT 1° DIA, 22) RC 20° DIA, 23) RT 20° DIA, 24) RC 40° DIA, 25) RT 40° DIA, 26) RC 60° DIA, 27) RT 60° DIA98

FIGURA 4.27 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE APÓS O USO DO MARCADOR MOLECULAR RAPD99

FIGURA 4.28 – VOLUME CUMULATIVO DE METANO VERSUS TEMPO. A) RC, LODO DO 1° DIA DE OPERAÇÃO. B) RT, LODO DO 1° DIA DE OPERAÇÃO. C) RC, LODO DO 20° DIA DE OPERAÇÃO. D) RT, LODO DO 20° DIA DE OPERAÇÃO. E) RC, LODO DO 40° DIA DE OPERAÇÃO. F) RT, LODO DO 40° DIA DE OPERAÇÃO 102

FIGURA 4.29 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DURANTE UM TEMPO DE CICLO (24 HORAS) NOS REATORES: A) CONTROLE. B) TESTE 104

LISTA DE QUADROS

QUADRO 2.1 - GRUPOS MICROBIANOS COMUMENTE PRESENTES EM RESÍDUOS SOB PROCESSO DE DEGRADAÇÃO	30
QUADRO 2.2 - PRINCIPAIS LIMITAÇÕES NAS FASES DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	37
QUADRO 3.1 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS COM AMOSTRAS DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA.....	51
QUADRO 3.2 – SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS E TAMANHOS DOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO ESPERADOS, EM PARES DE BASE (PB) ...	54
QUADRO 3.3 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE NUTRIENTES UTILIZADA DURANTE O TESTE DA AME	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA MÉDIA DO LIXIVIADO GERADO NO ATERRO SANITÁRIO MUNICIPAL DE CURITIBA.....	25
TABELA 4.1 - RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO MUNICIPAL DE CURITIBA (SET E OUT/2010).....	68
TABELA 4.2 - RESULTADOS PARA O CONJUNTO DE SÓLIDOS TOTAIS DO LODO ANAERÓBIO.....	70
TABELA 4.3 – RESULTADOS DAS VARIÁVEIS MONITORADAS PARA AMOSTRAS DO EFLUENTE DOS REATORES CONTROLE E TESTE	80
TABELA 4.4 – CONJUNTO DE SÓLIDOS TOTAIS (FIXOS E VOLÁTEIS) (G.L ⁻¹) PARA OS REATORES RC E RT APÓS 1, 20, 40 E 60 DIAS DE OPERAÇÃO.....	91
TABELA 4.5 – ATIVIDADE METANOGÊNCIA ESPECÍFICA (MGDQO _{CH4} /GSTV.D) PARA LODO COLETADO NOS REATORES CONTROLE E TESTE.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos graxos voláteis
AME	Atividade metanogênica específica
COD	Carbono orgânico dissolvido
COT	Carbono orgânico total
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPS	Substância polimérica extracelular
FISH	Fluorescence in situ hybridization
Ks	Constante de saturação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
MB-baci	Meio base sem antibiótico
MB-clo	Meio base com cloranfenicol
MB-free	Meio base com bacitracina
MB-pen	Meio base com penicilina
OHPA	Bactérias acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio
pb	Pares de base
PBS	Solução tampão de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Primer	Oligonucleotídeo iniciador
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SDS	Dodecil sulfato de sódio

UFC

Unidade formadora de colônia

Y

Coeficiente de produção celular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS.....	23
1.1 OBJETIVO GERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 GERAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO	24
2.1.1 Matéria orgânica dissolvida.....	25
2.1.2 Macrocomponentes inorgânicos.....	26
2.2 COMPOSIÇÃO MICROBIANA DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO.....	29
2.3 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM ATERROS SANITÁRIOS	31
2.3.1 Etapa hidrolítica ou acidogênica.....	32
2.3.2 Etapa acetogênica.....	33
2.3.3 Etapa metanogênica.....	34
2.3.4 Formação e maturação do biofilme anaeróbio	35
2.4 LIMITAÇÕES DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	36
2.5 POPULAÇÕES METANOGENICAS DE IMPORTÂNCIA PARA A DIGESTÃO ANAERÓBIA	38
2.5.1 Ordem Methanobacteriales	38
2.5.2 Ordem Methanomicrobiales	40
2.5.3 Ordem Methanosarcinales	40
2.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE METANOGENICOS	41
2.7 ATIVIDADE METANOGENICA ESPECÍFICA.....	43
2.8 SISTEMAS PARA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA	49
3.1.1 Coleta das amostras	49
3.1.2 Caracterização do lixiviado do Aterro Sanitário de Curitiba	49
3.1.3 Caracterização do lodo anaeróbio do Aterro Sanitário de Curitiba	51
3.2 CULTIVO DOS MICRORGANISMOS.....	55

3.2.1	Teste de substrato.....	55
3.2.2	Teste de Antibiótico.....	56
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS CULTIVADOS.....	57
3.3.1	Análise morfológica e estrutural.....	57
3.3.2	Análise molecular.....	58
3.4	REATORES OPERADOS EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA AUTOIMOBILIZADA.....	58
3.4.1	Descrição do sistema.....	59
3.4.2	Operação dos reatores.....	59
3.4.2.1	Inoculação do reator Teste.....	59
3.4.2.2	Alimentação dos reatores.....	61
3.4.2.3	Tempo de ciclo.....	62
3.4.2.4	Condições operacionais dos reatores.....	62
3.4.3	Monitoramento do efluente- Fase I.....	62
3.4.4	Monitoramento do lodo dos reatores RC e RT.....	62
3.4.4.1	Atividade metanogênica específica.....	63
3.4.5	Perfil da concentração de ácidos orgânicos voláteis.....	65
3.4.6	Adição de fósforo no lixiviado e monitoramento do efluente- Fase II.....	66
3.4.7	Análise estatística não-paramétrica para os reatores RC e RT.....	66
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA.....	68
4.2	LODO ANAERÓBIO DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO.....	70
4.3	CULTIVO DOS MICRORGANISMOS.....	70
4.3.1	Teste do substrato.....	71
4.3.2	Teste do antibiótico.....	74
4.3.2.1	Morfologia e estrutura colonial dos microrganismos cultivados.....	75
4.4	OPERAÇÃO DOS REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS.....	78
4.4.1	Monitoramento do efluente dos reatores - Fase I.....	79
4.4.2	Monitoramento do lodo anaeróbio.....	90
4.4.2.1	Conjunto de sólidos totais.....	90
4.4.2.2	Biofilme anaeróbio.....	91
4.4.2.3	Caracterização molecular dos microrganismos cultivados e do lodo anaeróbio dos reatores RC e RT.....	95

4.4.2.3	Atividade Metanogênica específica (AME)	100
4.4.3	Perfil de produção dos ácidos orgânicos voláteis nos reatores Controle e Teste.	103
5.	CONCLUSÕES	108
6.	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	110
	REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO

O uso de aterros sanitários como destino final de resíduos sólidos gerados em grandes centros urbanos apresenta algumas desvantagens, das quais destaca-se a geração do lixiviado, líquido de composição complexa e elevada toxicidade.

O lixiviado originado em aterros sanitários apresenta cor escura e odor forte e sua geração ocorre devido à lixiviação das substâncias presentes na massa de resíduos, resultado dos processos químicos e biológicos que ocorrem durante a degradação da matéria orgânica. Entre os compostos potencialmente tóxicos presentes no lixiviado, a amônia é um dos principais contaminantes, pois, mesmo em fase estável da digestão, sua concentração apresenta-se elevada.

Nos resíduos decompostos no interior do aterro ocorrem reações químicas e biológicas complexas que envolvem vários grupos de microrganismos, estabelecendo um consórcio microbiano. No lixiviado, há pelo menos quatro fases de decomposição mediadas por este consórcio: fase inicial aeróbia, fase ácida anaeróbia, fase metanogênica inicial e fase metanogênica estável (KJELDSEN *et al.*, 2002).

Os microrganismos presentes na fase inicial aeróbia e no início da fase ácida anaeróbia apresentam capacidade hidrolítica e são responsáveis pela secreção de enzimas que promovem a quebra de polímeros orgânicos complexos em compostos mais simples. Na fase ácida anaeróbia, que têm início após a depleção completa do oxigênio livre no meio, os microrganismos utilizam os compostos orgânicos simples gerados e produzem ácidos orgânicos de cadeia curta, como os ácidos acético, propiônico e butírico. Nas fases seguintes, metanogênicas, outros compostos metilados são convertidos a acetato ou a gás carbônico e metano pelas arqueas acetoclásticas, além da conversão do gás carbônico e do hidrogênio em metano e água, pelas arqueas hidrogenotróficas. Os dois grupos de arqueas presentes são dependentes de um terceiro grupo de microrganismos, as bactérias acetoclásticas que convertem, ainda no final da fase ácida anaeróbia, outros ácidos orgânicos de cadeia curta gerados em acetato e hidrogênio.

Todos os grupos envolvidos no processo de estabilização da matéria orgânica dos resíduos do aterro e do lixiviado gerado encontram-se fortemente vinculados por uma relação mutualística, isto é, a nutrição adequada de uma espécie depende dos

metabólitos gerados por outra espécie da microbiota. O equilíbrio, neste tipo de relação, é fundamental para a manutenção das populações microbianas.

Em meio livre de contaminantes, as relações entre os microrganismos consorciados ocorrem de forma equilibrada. Entretanto, a presença de elevada carga orgânica e/ou compostos tóxicos no meio inibe um ou mais grupos do consórcio, o que gera desequilíbrio nos processos, isto porque, os microrganismos constituintes apresentam metabolismos e tempos de geração diferentes. Por apresentarem tempo de geração mais longo e metabolismo mais lento que os demais microrganismos, as arqueas metanogênicas são consideradas como organismos limitantes dos processos anaeróbios de estabilização da matéria orgânica (MUSSATI *et al.*, 2005).

Desta forma, visando elucidar se o metabolismo mais lento das arqueas pode ser o fator limitante da digestão anaeróbia do lixiviado de aterro sanitário, o presente trabalho propôs a avaliação dos processos de estabilização da matéria orgânica, geração de metano e desenvolvimento do biofilme, em reator em bateladas sequenciais, com biomassa autoimobilizada na forma de lodo anaeróbio, com e sem inóculo de microrganismos metanogênicos cultivados. Na sequência do estudo, a adição de fósforo ao lixiviado utilizado para a alimentação dos reatores pretendeu avaliar se este nutriente pode agir como fator limitante do crescimento da biomassa e da utilização do íon NH_4^+ como fonte de nitrogênio pelos microrganismos consorciados presentes na digestão anaeróbia.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência do bioaumento da microbiota sobre o processo de digestão anaeróbia de lixiviado de aterro sanitário.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o desenvolvimento desta pesquisa as seguintes atividades foram realizadas:

- Cultivar o(s) microrganismo(s) melhor adaptado(s) ao meio de lixiviado bruto de aterro sanitário;
- Avaliar a estabilização da matéria orgânica no lixiviado de aterro sanitário alimentado em reator anaeróbio em bateladas sequenciais com biomassa autoimobilizada e inoculado com o(s) microrganismo(s) selecionado(s);
- Avaliar a evolução da atividade metanogênica em reator anaeróbio em bateladas sequenciais com biomassa autoimobilizada e inoculado com o(s) microrganismo(s) selecionado(s);
- Avaliar a estabilização da matéria orgânica após adição de fosfato ao lixiviado de aterro sanitário alimentado em reator anaeróbio em bateladas sequenciais, com biomassa autoimobilizada e inoculado com o(s) microrganismo(s) selecionado(s);
- Avaliar a variação na concentração de nitrogênio amoniacal após adição de fosfato ao lixiviado de aterro sanitário alimentado em reator anaeróbio em bateladas sequenciais, com biomassa autoimobilizada e inoculado com o(s) microrganismo(s) selecionado(s).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão apresentadas, com base em literatura recente, informações sobre o lixiviado de aterro sanitário (composição química e biológica); etapas do processo de digestão anaeróbia e características morfológicas e fisiológicas dos grupos metanogênicos presentes em processos de digestão anaeróbia.

2.1 GERAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

O lixiviado de aterro sanitário é um líquido de coloração escura e odor forte associado à grande quantidade de nitrogênio amoniacal presente no meio (VIGNERON *et al.*, 2007; BOHDZIEWICZ *et al.*, 2008; RENOUE *et al.*, 2008). Esta água residuária é gerada devido à lixiviação das substâncias presentes na massa de resíduos, resultado dos processos químicos e biológicos que ocorrem durante a degradação dos resíduos aterrados (CHRISTENSEN e KJELDSEN, 1989; CHRISTENSEN *et al.*, 1994; CHRISTENSEN *et al.*, 2001; BERTAZOLLI e PELLEGRINI, 2002).

O processo de compactação dos resíduos sólidos domésticos, associado à biodegradabilidade que ocorre em aterros, torna o sistema um ambiente biológico anaeróbio, com características similares entre aterros (KJELDSEN *et al.*, 2002). Entretanto, a biodegradabilidade do lixiviado diminui à medida que ele se torna mais estável, isto é, com grande parte do carbono orgânico do meio na forma de compostos altamente refratários (HAMADA e MATSUNAGA, 2000).

A composição química de lixiviados gerados em aterros que recebam resíduos municipais e de pequenos geradores, ou seja, sem compostos químicos ou biológicos de elevada periculosidade, pode ser dividida em quatro grupos principais (CHRISTENSEN *et al.*, 1994; CHRISTENSEN, 2001; KJELDSEN *et al.*, 2002): matéria orgânica dissolvida; macrocomponentes inorgânicos; compostos xenobióticos e metais pesados.

Morais e Zamora (2005) caracterizaram quimicamente o lixiviado gerado no aterro sanitário de Curitiba e identificaram os componentes mais expressivos em

termos de concentração, conforme apresentado na Tabela 2.1.

TABELA 2.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA MÉDIA DO LIXIVIADO GERADO NO ATERRO SANITÁRIO MUNICIPAL DE CURITIBA

Variáveis	Valores*	Variáveis	Valores*
pH	8,4 (0,1)	Enxofre	316 (23)
DQO	5.200 (27)	Magnésio	9,4
DBO	720 (81)	Ferro	13,2
TOC	1.058 (2,7)	Manganês	0,29
Cloretos	2.590 (95)	Cromo	0,45
CaCO ₃ ⁻	1.240 (45)	Cobre	0,36
Fósforo Total	11,3 (0,7)	Chumbo	0,28
Nitrogênio Amoniacal	1.200 (42)	Mercúrio	0,001
Sódio	1.512 (47)	Níquel	1,42
Potássio	1.480 (3,5)	Zinco	1,06

*Valores em mg/L, exceto pH

Valores em () apresentam o desvio-padrão

FONTE: Morais e Zamora (2005)

Os valores apresentados na Tabela 2.1 caracterizam o lixiviado do aterro sanitário de Curitiba como um resíduo de baixa biodegradabilidade (relação DBO/DQO inferior a 0,3) e com elevada carga de macrocomponentes inorgânicos, como cloretos e nitrogênio na forma amoniacal, NH₄⁺ ou NH₃. A seguir são apresentados os principais compostos químicos presentes no lixiviado de aterro sanitário que podem exercer influência no processo da digestão anaeróbia.

2.1.1 Matéria orgânica dissolvida

A matéria orgânica dissolvida presente no lixiviado bruto de aterro sanitário pode ser quantificada na forma da demanda química de oxigênio (DQO), ácidos orgânicos voláteis (AGV) ou compostos recalcitrantes como ácidos húmicos e fúlvicos (KJELDSEN *et al.*, 2002). Trata-se, portanto, de uma variável que abrange uma grande quantidade de produtos da degradação orgânica, desde compostos de pequena massa molecular, como os AGV, até compostos refratários de alta massa molecular, como os ácidos húmicos e fúlvicos (CHIAN e DEWALLE, 1977).

Estudos indicam que, no lixiviado, durante a fase acidogênica, mais de 95% do carbono orgânico dissolvido (COD) encontra-se na forma de AGV e apenas 1,3%

na forma de compostos de alta massa molecular (HARMSSEN, 1983; FRIMMEL e HEISS, 1991). Para a fase metanogênica, os valores das concentrações de AGV são muito baixos e até 60% do COD pode ser encontrado na forma de compostos refratários (HARMSSEN, 1983; ARTIOLA-FORTUNY e FULLER, 1982).

Desta forma, a análise da concentração da matéria orgânica dissolvida pode indicar a etapa em que a digestão anaeróbia se encontra além de avaliar a eficiência do tratamento aplicado na remoção de compostos orgânicos.

2.1.2 Macrocomponentes inorgânicos

Entre os macrocomponentes inorgânicos presentes no lixiviado de aterro sanitário, de importância para o processo da digestão anaeróbia, destacam-se o nitrogênio amoniacal e o fósforo. Ambos são nutrientes essenciais para as populações microbianas envolvidas no processo biológico de tratamento de efluentes. Porém, sua presença em concentrações elevadas, pode apresentar caráter inibidor ou, por outro lado, quando muito baixas, pode apresentar-se como fator limitante para o processo (MCCARTY e MCKINNEY, 1961; MCCARTY, 1964; CHERNICHARO, 2007).

2.1.2.1 Nitrogênio amoniacal

A amônia é produzida durante a hidrólise das proteínas presentes nos resíduos e seu acúmulo é uma das principais causas do desequilíbrio dos processos de digestão anaeróbia no lixiviado de aterro sanitário (EHRIG, 1983, JARREL e SAULNIER, 1988, GALLERT *et al.*, 1998).

A persistência da amônia no meio, mesmo depois de elevado tempo de estabilização do lixiviado, levou diferentes autores a considerá-la como o poluente mais persistente presente neste tipo de efluente (EHRIG, 1983; JARRELL e SAULNIER, 1988; GALLERT *et al.*, 1998; KRUMPELBECK e EHRIG, 1999; VIGNERON *et al.*, 2005; VIGNERON *et al.*, 2007).

Um estudo desenvolvido por Ehrig (1988), em aterros sanitários da Alemanha, concluiu não haver diferença significativa na concentração do nitrogênio amoniacal presente nas fases acidogênica e metanogênica da digestão anaeróbia. Posteriormente, Kumprelbeck e Ehrig (1999), estudando 50 aterros sanitários alemães com diferentes idades, constataram não haver decréscimo significativo na

concentração de amônia mesmo após 30 anos de atividade do aterro.

A toxicidade da amônia e sua interferência na digestão anaeróbia são dependentes de algumas variáveis, entre elas o pH. Em valores de pH elevado (acima de 9), pelo menos 50% do nitrogênio amoniacal encontra-se na forma livre NH_3 , o que eleva a toxicidade do meio (LAY *et al.*, 1998). A amônia, como NH_3 , pode ser transportada passivamente para o interior celular, desnaturando proteínas no interior da membrana dos microrganismos (VIGNERON, 2007). Entretanto, apesar da sua elevada toxicidade e indução ao baixo metabolismo de alguns microrganismos quando em concentrações superiores a 1500 mg.L^{-1} , o nitrogênio amoniacal na forma de íon NH_4^+ é utilizado como principal fonte de nitrogênio para muitas espécies presentes na digestão anaeróbia (BOONE e CASTENHOLZ, 2001; CHERNICHARO, 2007).

Vignerón e colaboradores (2005) atribuíram a variação da eficiência de degradação de resíduos sólidos e líquidos durante processos biológicos de tratamento à variação da concentração de amônia presente nestes meios. Enquanto alguns microrganismos podem encontrar-se aclimatados a um meio com elevada concentração de amônia, outros devem passar por uma fase de adaptação utilizando gradual aumento deste composto (BORJA *et al.*, 1996).

Lay e colaboradores (1997), estudando espécies metanogênicas na faixa de pH 6,5-8,5 e sob influência de crescente concentração de nitrogênio amoniacal, constataram que nas faixas de concentração entre 1670 mg.L^{-1} e 3620 mg.L^{-1} ; 4090 mg.L^{-1} e 5550 mg.L^{-1} e acima de 5880 mg.L^{-1} houve, respectivamente, queda de 10%, 50% e 100% na atividade metanogênica. Ainda neste estudo, os resultados mostraram que, quando a concentração de amônia livre NH_3 superou 500 mg.L^{-1} houve queda considerável no número de microrganismos metanogênicos. Entretanto, nem todas as espécies metanogênicas são afetadas da mesma forma. Borja e colaboradores (1996) constataram que espécies metanogênicas acetoclásticas são mais fortemente inibidas pela presença de elevadas concentrações de amônia no meio do que as espécies metanogênicas hidrogenotróficas. Outros autores já haviam constatado que a produção de metano a partir do acetato diminui consideravelmente em relação à produção de metano utilizando o hidrogênio como substrato, quando em presença de concentrações potencialmente tóxicas de amônia (SPROTT e PATEL, 1986; WIEGANT e ZEEMAN, 1986).

Estudando a influência da concentração de amônia na atividade metanogênica, Vigneron e colaboradores (2007) utilizaram reatores estáticos contendo concentrações crescentes de amônia de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$; $1,4 \text{ g.L}^{-1}$; $2,3 \text{ g.L}^{-1}$; $4,4 \text{ g.L}^{-1}$ e $8,6 \text{ g.L}^{-1}$. Em seus estudos, o início da fase metanogênica utilizando concentração de $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ com microrganismos metanogênicos previamente adaptados a esta condição, foi similar ao observado em concentrações mais baixas ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,4 \text{ g.L}^{-1}$) sem adaptação. Este resultado reforça afirmações de outros autores, que também haviam concluído em estudos anteriores que os microrganismos podem e devem ser aclimatados previamente quando em condições de elevada toxicidade (DEBAERE *et al.*, 1984; OMIL *et al.*, 1995; LAY *et al.*, 1997).

2.1.2.2 Fósforo

Sabe-se, da ecologia populacional, que o crescimento de um ser vivo é dependente tanto da quantidade de alimento disponível quanto da presença de macronutrientes. O fósforo, na forma de sua espécie biodisponível (fosfato), é um dos principais macronutrientes exigidos para o metabolismo dos microrganismos, assim como o nitrogênio. Entretanto, este elemento pode ser o fator limitante dos processos metabólicos do consórcio microbiano.

Lixiviados de aterro sanitário contêm altas concentrações de proteínas e ácidos voláteis produzindo biomassa de baixo coeficiente de produção celular (KLET *et al.*, 2005). Por outro lado, a concentração de fosfato é, em média, bastante baixa (MORAIS e ZAMORA, 2005). Para contornar esta limitação, em sistemas de digestão anaeróbia de efluentes contendo baixas concentrações deste nutriente (BAERE *et al.*, 1984; BRUMMELER *et al.*, 1986) pode-se adicionar fontes potenciais de fosfato como, por exemplo, o esgoto doméstico.

De acordo com Lettinga *et al.* (1996), no processo de digestão anaeróbia assume-se a relação DQO: N: P de 1.000: 5: 1 como adequada para o crescimento microbiano, considerando-se biomassa com baixo coeficiente de produção celular ($Y \sim 0,05 \text{ gSSV/gDQO}$). Desta relação, estima-se que 30% da concentração obtida a partir da DQO sejam de carbono orgânico, ou seja, C: N: P igual a 330: 5: 1.

Desta forma, a relação acima pode ser utilizada adequadamente para equilibrar as exigências nutricionais da microbiota presente neste tipo de resíduo.

2.1.2.3 Sais inorgânicos

A presença de sais inorgânicos em lixiviado de aterro sanitário deve ser avaliada. Desta forma é possível monitorar prováveis fontes de interferência no processo da digestão anaeróbia. Por exemplo, sais de cloreto existem em concentrações elevadas no lixiviado, entretanto, ânions exercem baixa influência no processo da digestão anaeróbia, sendo, inclusive, vantajosos para uso como antagonistas a elevadas concentrações de sódio e potássio (KUGELMAN e MCCARTY, 1965). Entretanto, algumas metodologias de análise de matéria orgânica como, por exemplo, o método do refluxo aberto para análise da DQO, sofrem interferência positiva na presença de cloretos (APHA, 1998). Nestes casos deve-se proceder à adição de sulfato de mercúrio nas amostras para reduzir a interferência daquele íon.

Outros sais presentes em concentrações consideráveis no lixiviado são os sais de sulfeto. Sob valores de pH elevados (acima de 8), encontram-se sob a forma dissociada (HS^-), menos tóxica. A toxicidade do H_2S decresce com o aumento da DQO do afluente, devido à maior produção de CH_4 . Uma relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{-2}$ maior do que 10 indica que não ocorrerão problemas de toxicidade com sulfeto durante a digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 2007).

Para os íons sódio e potássio, as concentrações consideradas inibidoras encontram-se acima de 4.000 mg.L^{-1} (MCCARTY, 1964). Os valores observados para sódio e potássio em lixiviado de aterro sanitário encontram-se, em média, abaixo deste valor, considerado como inibidor (MORAIS e ZAMORA, 2005).

2.2 COMPOSIÇÃO MICROBIANA DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

A microbiota de ambientes contaminados é formada por microrganismos altamente adaptados à composição química do meio, incluindo compostos inibidores ou cujas concentrações são tóxicas (GILLER *et al.*, 1998).

Se comparada a outros efluentes de carga poluente similar, a população microbiana em lixiviado de aterro sanitário é altamente diversificada (EDUARDO, 2007). Além das bactérias acidogênicas e das arqueas metanogênicas, também estão presentes bactérias patogênicas (coliformes termotolerantes), bactérias redutoras de sulfato e bactérias desnitrificantes (CHRISTENSEN *et al.*, 2001;

VAZZOLLER *et al.*, 2001). O Quadro 2.1 apresenta alguns exemplos de grupos microbianos comumente encontrados em resíduos em degradação e efluentes.

Microrganismo	Espécies Representativas
Bactérias heterotróficas	<i>Achromobacter</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Bdellovibrio</i> sp., <i>Citromonas</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Zooglea ramigera</i>
Bactérias Filamentosas	<i>Beggiatoa</i> sp., <i>Flexibacter</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Leucothrix</i> sp., <i>Microthrix parvicela</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Nostocoidia limicola</i> , <i>Spaherotillus natans</i> , <i>Thiothrix</i> sp.
Bactérias nitrificantes	<i>Nitrobacter</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp.
Bactérias envolvidas na hidrólise e acidogênese	<i>Clostridium</i> sp., <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Eubacterium cellulosolvens</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Selemonas</i> sp., <i>Megasphaera</i> sp., <i>Lachnospira multiparus</i> , <i>Peptococcus anaerobicus</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.
Bactérias envolvidas na acetogênese	<i>Syntrophomonas wolinii</i> , <i>S. Wolfei</i> , <i>Syntrophus buswellii</i> , <i>Clostridium bryantii</i> , <i>Acetobacterium woddii</i> , <i>Desulfovibrio</i> sp., <i>Desulfotomaculum</i> sp.
Arqueas envolvidas na metanogênese acetoclástica	<i>Methanosaeta</i> sp., <i>Methanosarcina</i> sp.
Arqueas envolvidas na metanogênese hidrogenotrófica	<i>Methanobacterium</i> sp., <i>Methanobrevibacter</i> sp., <i>Methanospirillum</i> sp.

QUADRO 2.1 - GRUPOS MICROBIANOS COMUMENTE PRESENTES EM RESÍDUOS SOB PROCESSO DE DEGRADAÇÃO

FONTE: Vazzoller *et al* (2001)

Huang e colaboradores (2002) estudaram a filogenia das populações metanogênicas presentes no lixiviado de um aterro sanitário desativado na província de Guangdong, China. Neste estudo foram utilizadas sondas marcadoras do gene 16S RNA ribossomal para identificar membros da comunidade metanogênica em uma célula do aterro sanitário com recirculação de lixiviado. Os resultados indicaram baixa concentração relativa de arqueas no meio (2% do 16S rRNA total extraído das amostras) com predominância do gênero *Methanospirillum*, um grupo de microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos. A segunda maior população metanogênica encontrada pertencia ao gênero *Methanosaeta*, microrganismos acetoclásticos. A presença de *Methanosaeta* é indicativa de um lixiviado mais antigo

e estabilizado, pois estes microrganismos caracterizam-se por serem sucessores na ocupação de micronichos em diferentes habitats (ZINDER *et al.*, 1984).

A utilização dos genes 16S rRNA (i.e., 16S rDNA) em análises populacionais de procaríotos em amostras ambientais baseia-se no fato de que estes genes apresentam algumas regiões altamente conservadas, isto é, idênticas em sequência, a todos os procaríotos e, ao mesmo tempo, regiões de sequência única, comuns a um mesmo gênero ou espécie (SOGIN *et al.*, 1972; PECHMAN e WOESE, 1972). Desta forma, torna-se possível a construção de “primers universais” para determinados grupos filogenéticos e a amplificação do segmento de DNA comum neste grupo pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (LIESACK *et al.*, 1991; REYSENBACH *et al.*, 1992; SUZUKI e GIOVANNONI, 1996; ZUMSTEIN *et al.*, 2000). Pode-se ainda, utilizando como marcador o gene 16S rRNA, utilizar sondas fluorescentes que possam hibridizar com o DNA de um grupo alvo, no caso, uma ordem, família ou gênero metanogênico (BURGRAFF *et al.* 1994; RASKIN *et al.*, 1994; SEKIGUCHI *et al.*, 1999; MARCHESI *et al.*, 2001; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

Muitas outras técnicas utilizando ferramentas da biologia molecular podem ser aplicadas na Engenharia Sanitária para identificação das espécies microbianas presentes e monitoramento dos processos biológicos, incluindo a PCR em tempo real (q-PCR) e a técnica do RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) (EARL *et al.*, 2003). Atualmente, há a possibilidade de se desvendar a composição microbiana de um efluente com muito mais acuracidade do que era possível com somente o uso de técnicas microbiológicas clássicas de cultivo e microscopia óptica.

2.3 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM ATERROS SANITÁRIOS

A digestão anaeróbia pode ser definida como uma sequência de processos metabólicos complexos que ocorrem durante a oxidação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios (MCCARTY, 1964). Estes processos metabólicos são conduzidos por, no mínimo, três grupos distintos de microrganismos: bactérias fermentativas e/ou acidogênicas, bactérias acetogênicas (ou sintróficas) e arqueas metanogênicas. A seguir são descritas as etapas da digestão anaeróbia em um aterro sanitário, o nicho ecológico ocupado pelos microrganismos em cada uma

destas etapas e a formação e maturação de um biofilme anaeróbio.

2.3.1 Etapa hidrolítica ou acidogênica

As etapas de hidrólise e acidogênese têm início logo após a depleção completa do oxigênio dissolvido do meio, o que para um aterro sanitário ocorre em poucos dias (KJELDSEN *et al.*, 2002). São conduzidas por diversas espécies de bactérias hidrolíticas. As espécies hidrolíticas têm a capacidade de secretar hidrolases no meio, conduzindo à quebra de polímeros em subunidades menores e mais biodisponíveis (GHALY, 1996; WATNICK e KOLTER, 2000).

A produção de ácidos orgânicos ocorre, nesta fase, devido ao grande número de espécies hidrolíticas que produzem ácidos orgânicos de cadeia curta como produtos finais da fermentação, que é a via metabólica utilizada por estas espécies quando em anaerobiose. Os ácidos orgânicos de cadeia curta são mais conhecidos na literatura como ácidos graxos voláteis (AGV), apesar de possuírem pontos de ebulição sob pressão atmosférica superiores ao da água, não sendo, portanto, facilmente volatizáveis (CHERNICHARO, 2007). Os principais AGV produzidos em um processo de digestão anaeróbia são o ácido fórmico, o ácido acético, o ácido propiônico e o ácido butírico (MCCART e MCKINNEY, 1961; MCCARTY, 1964; GHOSH *et al.*, 1975).

A produção de grande quantidade de AGV conduz à redução do pH durante a etapa acidogênica. O pH ácido torna o efluente quimicamente agressivo e pode levar à solubilização de diversos compostos. O acúmulo destes ácidos em sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes reflete o desequilíbrio do consórcio microbiano responsável pelo processo de estabilização da matéria orgânica (MCCARTY e MCKINNEY, 1961). Isto porque, a microbiota em processos anaeróbios encontra-se fortemente vinculada, metabolicamente e também estruturalmente, a agregados que constituem o biofilme microbiano (COSTERTON *et al.*, 1994; COSTERTON *et al.*, 1999; DAVEY e O'TOOLE, 2000; WATNICK e KOLTER, 2000; LIU e TAY, 2002). Uma densa camada de substância polissacarídica extracelular (EPS) forma a matriz do biofilme e confere estabilidade e resistência a este consórcio microbiano altamente especializado (WATNICK e KOLTER, 1999, FANG *et al.*, 2000; TOLKERNIELSEN *et al.*, 2000; WATNICK e KOLTER, 2000).

Estudos utilizando sondas de hibridização 16S rRNA colocam os

microrganismos acidogênicos na região mais externa dos biofilmes (DORÉ *et al.*, 1998; MANZ *et al.*, 1999, ARAUJO *et al.*, 2000). Os produtos metabólicos deste grupo devem, então, percorrer canais de circulação no interior do biofilme, tornando-se disponíveis para os demais microrganismos do consórcio (COSTERTON *et al.*, 1994; MANZ *et al.*, 1999; WIMPENNY *et al.*, 2000). Portanto, para que não haja carência de nutrientes a determinados grupos ou saturação do meio com metabólitos em excesso não degradados, o equilíbrio entre as populações acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas deve ser mantido (COSTERTON *et al.*, 1994; DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Os microrganismos acidogênicos apresentam baixo tempo mínimo de geração, muito provavelmente porque possuem reações termodinamicamente mais favoráveis do que os demais grupos de microrganismos, o que se reflete em taxas de crescimento mais elevadas (CHERNICHARO, 2007). Quando estes microrganismos encontram-se em cultivo, alguns antibióticos podem gerar zonas de inibição, entre eles cloranfenicol, bacitracina e vancomicina (HANCOCK e FITZ-JAMES, 1964; STEVENS *et al.*, 1987).

2.3.2 Etapa acetogênica

Concomitantemente à produção de AGV, durante a digestão anaeróbia em aterros sanitários, ocorre a conversão dos ácidos orgânicos intermediários (e.g. ácido propiônico e ácido butírico) em acetato, hidrogênio e gás carbônico. Esta capacidade metabólica é exclusiva de um grupo de bactérias acetogênicas que podem ser de dois tipos: consumidoras de hidrogênio, no processo de conversão de bicarbonato em acetato, e produtoras obrigatórias de hidrogênio, conhecidas pela sua sigla do inglês (OHPA) (LETTINGA *et al.*, 1996). As acetogênicas OHPA devem existir em relação sintrófica com as arqueas metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas (GUJER e ZENDER, 1983). Desta forma, a pressão parcial de hidrogênio no meio é mantida baixa, assim como a concentração de acetato, o que favorece estas reações acetogênicas de conversão (LETTINGA *et al.*, 1996).

As reações acetogênicas mediadas pelas OHPA são termodinamicamente desfavoráveis e necessitam das reações metanogênicas para que ocorram. A energia final gerada pela reação global deve ser dividida pelo consórcio de microrganismos envolvidos nesta etapa, isto é acetogênicos, metanogênicos

acetoclásticos e metanogênicos hidrogenotróficos, o que leva a uma baixa taxa de crescimento destes grupos de microrganismos, principalmente em comparação com os microrganismos acidogênicos (SCHINK, 1997).

Estruturalmente, os acetogênicos ocupam a camada intermediária no biofilme, juntamente com os metanogênicos hidrogenotróficos (HARMSEN *et al.*, 1996).

2.3.3 Etapa metanogênica

A etapa metanogênica em aterro sanitário pode ser dividida em duas fases distintas: fase metanogênica inicial e fase metanogênica estável ou estabilizada (KJELDSEN, 2002). Ambas são conduzidas por arqueas metanogênicas, um grupo amplo e diverso, com integrantes que compartilham a capacidade exclusiva de produzir metano como principal produto metabólico (WHITMAN *et al.*, 2006).

A fase metanogênica inicial começa com as primeiras concentrações mensuráveis de metano no meio. Durante esta fase, acetato, hidrogênio e outros compostos metilados produzidos pelos microrganismos acidogênicos e acetogênicos são convertidos em metano e gás carbônico ou metano e água, dependendo do substrato utilizado (JERIS e MCCARTY, 1965; MCCARTY, 1966; GHALY, 1996). No processo de degradação da matéria orgânica, a capacidade de utilizar acetato ou hidrogênio como aceptores finais de elétrons diferencia os metanogênicos em dois grupos principais: acetoclásticos e hidrogenotróficos, respectivamente. Uma terceira via pode ainda ser utilizada por alguns grupos de metanogênicos hidrogenotróficos, principalmente quando há baixa atividade dos metanogênicos acetoclásticos, com consequente baixa produção de gás carbônico (FINKE *et al.*, 2003). Trata-se da via metilotrófica, em que compostos metilados (metanol, metilamina, dimetilamina, trimetilamina) são utilizados como substrato, produzindo gás carbônico, metano e, no caso das metilaminas, amônia (VICH, 2006).

Durante a fase metanogênica estabilizada a produção de metano atinge seu valor máximo e diminui logo após a depleção da quantidade de ácidos carboxílicos no meio (KJELDSEN, 2002). Nesta fase, os valores observados para a DQO são, em grande parte, devido aos compostos recalcitrantes presentes, como ácidos fúlvicos e húmicos (BARLAZ e HAM, 1993; CHRISTENSEN *et al.*, 1994). O lixiviado de aterro sanitário permanece na fase metanogênica estável durante décadas e, até o presente momento, não foram detectadas fases posteriores nos aterros

monitorados por até 30 anos (CHRISTENSEN *et al.*, 1998).

Em relação à composição do biofilme, a camada de metanogênicos foi descrita como a mais interna ao biofilme e espaçada por amplos canais (MACLEOD *et al.*, 1990; COSTERTON *et al.*, 1994; MANZ *et al.*, 1999; WIMPENNY *et al.*, 2000). Entretanto, microrganismos acetoclásticos e hidrogenotróficos também divergem em relação a sua posição no biofilme microbiano da digestão anaeróbia. Enquanto os acetoclásticos, representados principalmente pela espécie *Methanosaeta* sp., encontram-se na camada mais interna do biofilme (MACLEOD *et al.*, 1990), os hidrogenotróficos ocupam as camadas intermediárias, juntamente com as populações de bactérias acetogênicas (UPTON *et al.*, 2000).

Por apresentarem tempo de geração mais longo que os demais microrganismos, os metanogênicos são considerados organismos limitantes do crescimento do biofilme (HUANG, 2003; MUSSATI *et al.*, 2005).

2.3.4 Formação e maturação do biofilme anaeróbio

Populações microbianas presentes em sistemas de tratamento, aeróbios ou anaeróbios, tendem a se organizar formando biofilmes complexos que conferem resistência, estabilidade e vantagens nutricionais aos consórcios microbianos (WATNICK e KOLTER, 2000).

A formação de um biofilme segue, basicamente, quatro etapas: (1) aproximação dos microrganismos a uma superfície; (2) adesão inicial mediada por forças van der Waals e eletrostáticas; (3) formação de microcolônias e (4) maturação do biofilme, com aumento da adesão celular entre diferentes microcolônias devido ao acúmulo de substância polimérica extracelular (EPS) (FANG *et al.*, 2000, TOLKERNIELSEN *et al.*, 2000, FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

Fernández e colaboradores (2008) estudaram a evolução de um biofilme anaeróbio crescido sobre lâminas de vidro submersas no interior de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB). As lâminas foram retiradas por períodos regulares durante 60 dias e visualizadas em microscopia eletrônica de varredura (Figura 2.1). A partir destes resultados, estes pesquisadores concluíram que a maturação do biofilme tem início entre 15 e 20 dias após a adesão inicial dos microrganismos à superfície de contato. O tempo de maturação dos biofilmes anaeróbios é diretamente influenciado pelos longos tempos de geração dos

microrganismos metanogênicos, que podem chegar a vários dias (WOLFE, 1982).

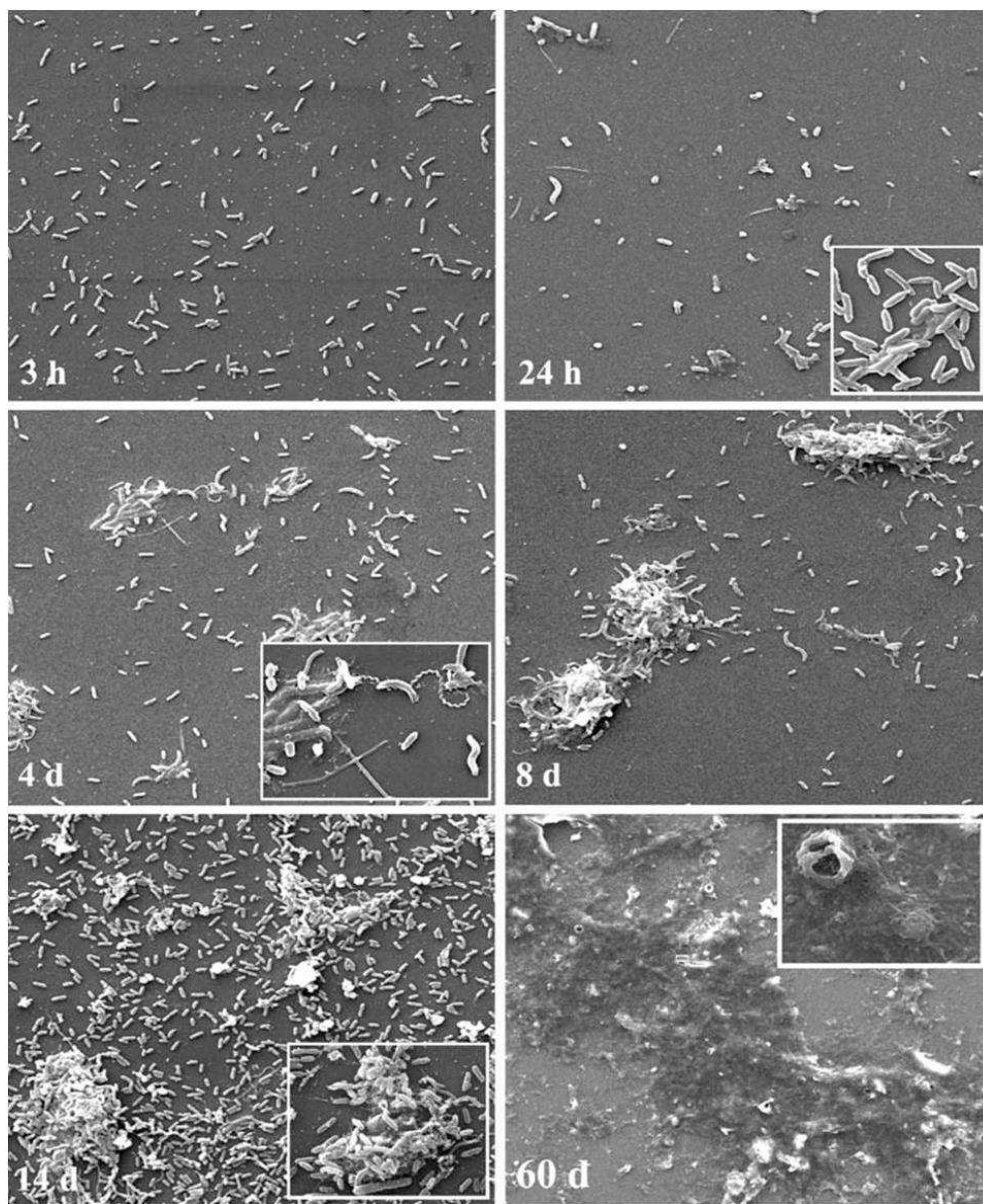


FIGURA 2.1 – FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DE UM BIOFILME ANAERÓBIO AO LONGO DO TEMPO EM REATOR ANAERÓBIO DE MANTA DE LODO (UASB)

FONTE: Fernández *et al.* (2008)

2.4 LIMITAÇÕES DA DIGESTÃO ANAERÓBIA

A estabilidade dos processos anaeróbios é dependente do equilíbrio entre as populações microbianas presentes no meio. Entretanto, estima-se que populações metanogênicas constituam apenas 2% da microbiota da digestão anaeróbia, devido

ao seu crescimento mais lento e metabolismo mais exigente que os demais microrganismos do consórcio (HUANG, 2002). Esta diferença entre as taxas de crescimento dos diferentes microrganismos no consórcio microbiano está relacionada a possíveis limitações cinéticas, principalmente em relação ao uso do ácido acético como substrato pelos metanogênicos acetoclásticos (AQUINO e CHERNICHARO, 2005). O acúmulo de dióxido de carbono, hidrogênio e ácido acético decorrente dos baixos valores da constante de saturação K_s das reações metanogênicas pode resultar em maior produção de ácidos orgânicos, como os ácidos propiônico e butírico (MCCARTY, 1966; PAVLOSTATHIS e GIRALDO-GOMEZ, 1991). O acúmulo destes ácidos orgânicos leva à diminuição do pH e ao comprometimento das populações metanogênicas (MCCARTY e MCKINNEY, 1961). Entretanto, em um ambiente com elevada alcalinidade como é o caso de lixiviados mais antigos, a capacidade de tamponamento é suficiente para neutralizar os ácidos, quando acumulados no meio (DEVLIN, 1990).

Os processos da digestão anaeróbia estão sujeitos, também, a limitações termodinâmicas e de transferência de massa (AQUINO e CHERNICHARO, 2005). O Quadro 2.2 apresenta um resumo das principais limitações cinéticas, termodinâmicas e de transferência de massa que podem ocorrer nas diferentes fases da digestão anaeróbia.

Fase	Limitações			
	Cinética	Termodinâmica	Transferência de massa	Metabólica*
Acidogênica	+	++	+	+
Acetogênica	+++	+++	+	+++
Metanogênica acetoclástica	+++	+	+	+++
Metanogênica Hidrogenotrófica	+	+	+++	++

QUADRO 2.2 - PRINCIPAIS LIMITAÇÕES NAS FASES DA DIGESTÃO ANAERÓBIA

FONTE: Aquino e Chernicharo (2005)

Notas: + pouco provável; ++ provável; +++ muito provável; * devido à presença de compostos tóxicos ou ausência de nutrientes

Outro fator limitante para os processos anaeróbios é a temperatura, que deve ser mantida em uma faixa limitada e não deve variar de forma brusca, sob o risco de perda nas populações microbianas (BERGMAN *et al.*, 1998). Entretanto, McHugh e colaboradores (2003) estudando a estrutura populacional de metanogênicos em reatores anaeróbios, concluíram que baixas temperaturas não influenciam na diversidade populacional metanogênica, apenas no número de indivíduos presentes. A diversidade microbiológica parece estar vinculada à composição química do meio (KOORNNEEF *et al.*, 1990; GROTEHUIS *et al.*, 1991). Temperaturas muito elevadas (>50°C), porém, podem alterar a composição microbiana do meio, ocorrendo a sucessão ecológica por metanogênicos termófilos, como por exemplo, *Methanosaeta thermophila* (FEY *et al.*, 2001).

2.5 POPULAÇÕES METANOGENÉTICAS DE IMPORTÂNCIA PARA A DIGESTÃO ANAERÓBIA

Os microrganismos metanogênicos encontram-se agrupados em um domínio próprio, Archaea, filogeneticamente distinto do domínio Bacteria (WOESE e FOX, 1977; WOESE *et al.*, 1990). Como características principais dos metanogênicos têm-se o metabolismo estritamente anaeróbio, o tempo de geração, em média, mais longo do que os membros do domínio Bacteria, a resistência a antibióticos como o cloranfenicol, penicilina e estreptomicina, e a produção de metano como principal produto metabólico (FORTERRE *et al.*, 2002). A seguir são descritas as principais ordens de metanogênicos encontradas na microbiota da digestão anaeróbia.

2.5.1 Ordem Methanobacteriales

Os metanogênicos membros da ordem Methanobacteriales são microrganismos hidrogenotróficos, que utilizam H₂ para reduzir CO₂ a CH₄. Alguns membros podem, ainda, utilizar íon formiato, CO ou álcoois secundários como doadores de elétron (BONIN e BOONE, 2006). A espécie *Methanosphaera* sp., entretanto, utiliza H₂ para reduzir metanol e metilaminas a metano, pela via metilotrófica (MILLER e WOLIN, 1983; MÜLLER *et al.*, 1986). Na composição lipídica da parede celular destes microrganismos encontram-se como principais componentes a pseudomureína, o caldarchaeol e mio-inositol. Sob coloração

diferencial de Gram estes organismos coram positivamente, isto é, absorvem a coloração do corante violeta cristal. Apresentam-se, em geral, sob formato de bacilos curtos, organizando-se, muitas vezes, em pares ou cadeias de até 40 µm de comprimento (BOONE e CASTENHOLZ, 2001; BONIN e BOONE, 2006). Para os microrganismos deste grupo, o íon amônio pode servir como principal fonte de nitrogênio. Apresentam sensibilidade ao antibiótico bacitracina e podem apresentar regiões de inibição do crescimento sob efeito do antibiótico cloranfenicol (BOONE e CASTENHOLZ, 2001). Os três principais gêneros mesófilos desta ordem são o *Methanobacterium*, o *Methanobrevibacter* e o *Methanosphaera* (Figura 2.2 a-d) (BALCH *et al.*, 1979).

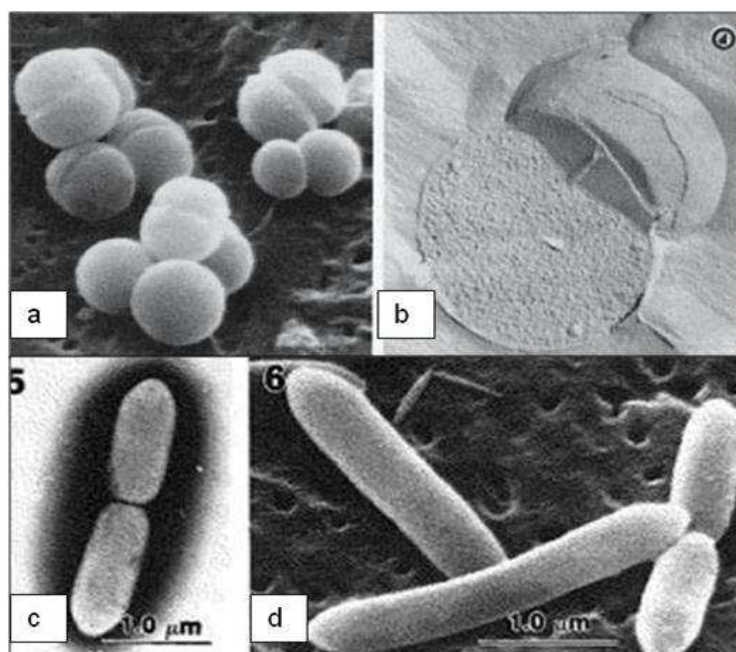


FIGURA 2.2 – ORDEM METHANOBACTERIALES: A) *METHANOSPHAERA* SP. EM MEV, AUMENTO DE 20.000X; B) *METHANOSPHAERA* SP. EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE CRIOFRATURA, AUMENTO DE 20.000X; C) *METHANOBREVIBACTER ARBORIPHILUS*, EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE CONTRASTE NEGATIVO, AUMENTO DE 20.000X; D) *METHANOBREVIBACTER ARBORIPHILUS*, EM MEV, AUMENTO 20.000X

FONTE: Boone e Castenholz (2001)

2.5.2 Ordem Methanomicrobiales

A ordem Methanomicrobiales apresenta a maior diversidade morfológica entre seus membros, variando desde microrganismos com formato achatado e angular, como no caso do gênero *Methanoplanus*, até microrganismos com formato de longas espirais, como no caso do gênero *Methanospirillum* (BOONE e CASTENHOLZ, 2001). Todas as espécies desta ordem podem utilizar H₂ e CO₂ como substratos para a metanogênese. Algumas espécies podem utilizar, ainda, íon formiato e álcoois. Entretanto, não são capazes de utilizar acetato ou compostos metilados como substrato (GARCIA *et al.*, 2006). A composição das suas membranas celulares inclui aminopentanetetrol, galactose e glicerol (KOGA *et al.*, 1998). Sob coloração Gram, coram negativamente, isto é, permitem a remoção do corante violeta cristal com solução de álcool etílico absoluto, e apresentam sensibilidade ao antibiótico cloranfenicol. Os gêneros de maior destaque para a digestão anaeróbia são o *Methanocorpusculum*, *Methanoplanus* e o *Methanospirillum* (Figura 2.3 a-b) (BOONE e CASTENHOLZ, 2001).

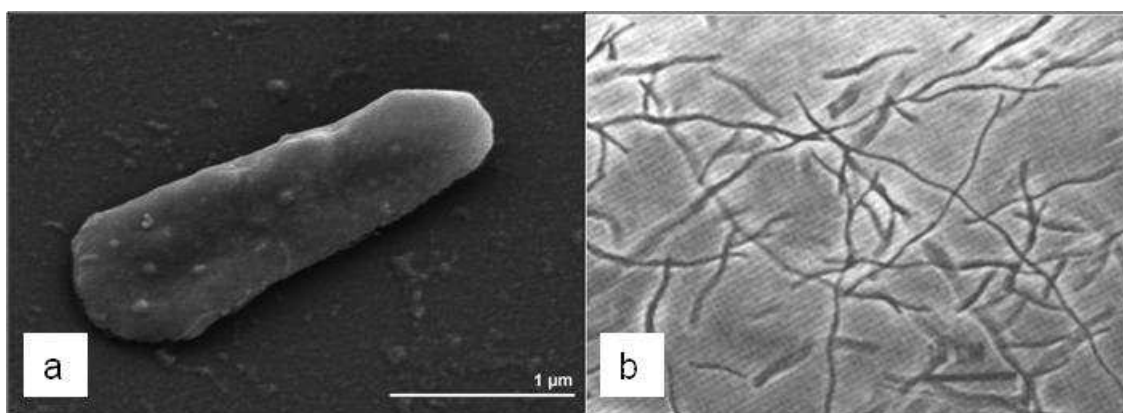


FIGURA 2.3 – ORDEM METHANOMICROBIALES: A) *METHANOPLANUS PRETOLEARIUS* EM MEV, AUMENTO 25.000X; B) *METHANOSPIRILLUM* SP, EM MEV, AUMENTO DE 10.000X

FONTE: Bonin e Boone (2006), Brambilla *et al.*(2010)

2.5.3 Ordem Methanosarcinales

Os membros da ordem Methanosarcinales podem ter o formato de cocos isolados, pseudosarcinas ou bacilos encapsulados (BOONE e CASTENHOLZ, 2001). Encontram-se disseminados em diversos habitats, incluindo sedimentos de

reservatórios, trato intestinal de animais e digestores anaeróbios. Na composição lipídica da membrana destes organismos encontram-se hidroxiarchaeol, mio-inositol e glicerol (KENDALL e BOONE, 2006). Coram Gram variável, ou seja, dentro de um mesmo gênero há espécies Gram positivas e negativas (*Methanoscina*) ou Gram negativo (*Methanosaeta*) (BOONE e CASTENHOLZ, 2001). A ordem Methanosarcinales, representada pelo versátil gênero *Methanosarcina*, possui a maior variedade de substratos utilizáveis para a metanogênese, incluindo o acetato, o H₂ e o CO₂, os compostos metilados e o íon formiato (SOWERS *et al.*, 1984; ROBINSON, 1986; FERRY, 1993). O gênero *Methanosaeta* utiliza acetato como único substrato para seu metabolismo energético (PATEL e SPROTT, 1990; GRIFFIN *et al.*, 1998), apesar de um estudo recente indicar que este gênero pode ser mais versátil no uso de substratos do que se acredita (SMITH e INGRAN-SMITH, 2007). Os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* são os dois únicos grupos capazes de converter acetato em metano, sendo conhecidos como metanogênicos acetoclásticos (Figura 2.4 a-b) (JETTEN *et al.*, 1992).

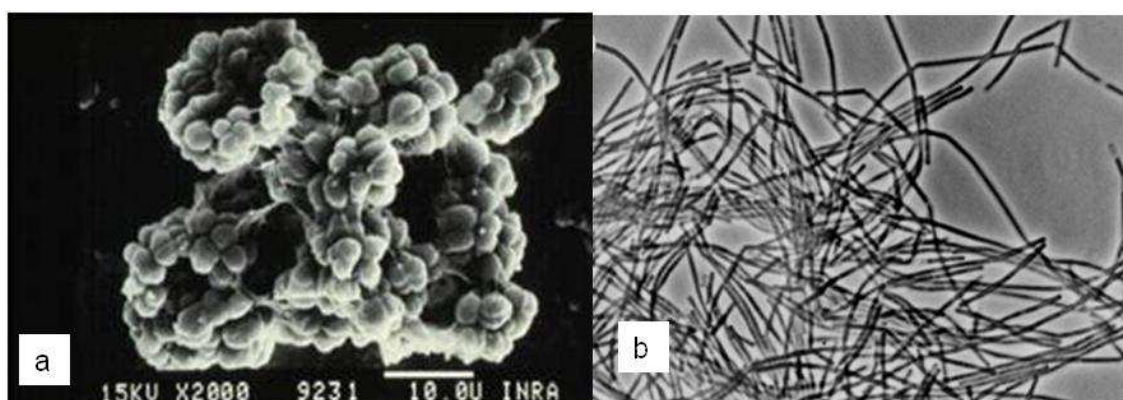


FIGURA 2.4 – ORDEM METHANOSARCINALES: A) *METHANOSARCINA MAZEI*, EM MEV, AUMENTO DE 2.000X; B) *METHANOSAETA SP*, EM MEV, AUMENTO DE 10.000X

FONTE: Deppenmeier *et al.* (2002), Mizukami *et al.* (2006)

2.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE METANOGENÉTICOS

Para a caracterização estrutural e ultra-estrutural de microrganismos existem diversas técnicas microscópicas que podem fornecer informações sobre morfologia e organização dos biofilmes microbianos. Entre as técnicas disponíveis, a Microscopia

Eletrônica de Varredura (MEV) é aquela pode ser utilizada para aumentar o conhecimento da morfologia e da composição das populações anaeróbias que coexistem na estrutura do biofilme de digestores e reatores (DÍAZ *et al.*, 2003; MONTENEGRO *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2004).

Apesar da sua importância durante a digestão anaeróbia, pouco se sabe a respeito da organização dos metanogênicos na estrutura do biofilme. Esta lacuna deve-se, em parte, às dificuldades de cultivo dos microrganismos metanogênicos (WIMPENNY *et al.*, 2000) e, também, ao preparo dos materiais para visualização tridimensional em técnicas como o MEV, que exige a desidratação completa das amostras. A maior dificuldade relacionada a este procedimento está em visualizar a estrutura colonial dos metanogênicos anterior ao processo de preparação.

Além de caracterizar morfologicamente os microrganismos presentes nos biofilmes, é importante identificar os grupos microbianos de acordo com seu material genético, utilizando-se técnicas de caracterização molecular. Estas técnicas quase sempre exigem a extração do material genético das espécies de interesse. Colônias isoladas em cultivo constituem, em geral, alvos mais fáceis para a extração do DNA. Entretanto, a maior parte dos microrganismos presentes em amostras ambientais não consegue crescer fora de seu habitat natural; poucas espécies presentes em um consórcio microbiano podem ser cultivadas e estudadas em um meio isolado. Para contornar esta limitação, uma nova abordagem genética para o estudo de populações microbianas foi desenvolvida. Trata-se da metagenômica, que considera a extração de todo o material genético presente no meio de interesse e a análise, por técnicas e marcadores moleculares diversos, da real diversidade microbiana existente (COWAN *et al.*, 2005).

A metagenômica aplicada a populações metanogênicas já é uma realidade e tem produzido resultados interessantes (ERKEL *et al.*, 2006; SAKAI *et al.*, 2007; SCHLÜTER *et al.*, 2008). Entretanto, é importante salientar que o método escolhido para extração do DNA total das amostras deve fornecer purificação adequada aos ácidos nucleicos. A presença de substâncias como ácidos húmicos e polissacarídeos em amostras de DNA pode interferir em várias técnicas de detecção molecular (KINGSLEY e RICHARDS, 2001).

Dentre as técnicas de identificação e caracterização molecular dos microrganismos metanogênicos, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando *primers* 16S rRNA específicos para grupos filogenéticos de interesse, tem

produzido bons resultados (YU *et al.*, 2005; SAWAYAMA *et al.*, 2006; HWANG *et al.*, 2008). Outras técnicas como FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*), combinada com microscopia confocal, permitem o estudo de biofilmes em ambiente natural ou industrial, utilizando sondas de hibridização fluorescentes para os genes 16S rRNA das espécies em estudo (MANZ *et al.*, 1999; MACLEOD *et al.*, 2002; DÍAZ *et al.*, 2003; FERNANDÉZ *et al.*, 2008).

Estudos filogenéticos ainda contam com poderosos marcadores moleculares capazes de detectar o perfil genético dentro de populações produzindo uma impressão de DNA única para determinado grupo. Como exemplo, o RAPD (random amplification polymorphism DNA) é um marcador molecular que utiliza um *primer* de sequência aleatória para amplificação de fragmentos de DNA ao acaso (WILLIAMS, 1990). O uso deste marcador permite a avaliação da diversidade genética em amostras ambientais e já vêm sendo utilizado na análise populacional microbiana em sistemas de lodos ativados (PUROHIT *et al.*, 2003).

2.7 ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA

Um processo de digestão anaeróbia bem sucedido depende, fundamentalmente, da existência de biomassa adaptada, com elevada atividade e resistência a variações de nutrientes ou condições do meio (MCCARTY, 1964). A viabilidade da biomassa presente e sua atividade devem ser acompanhadas, evitando, desta forma, o comprometimento do processo anaeróbio devido a uma microbiota pouco adaptada. Para avaliar o comportamento da biomassa sob o efeito de determinado efluente pode-se utilizar o teste da atividade metanogênica específica (DOLFING e BLOEMEN, 1985; FIELD *et al.*, 1987).

A atividade metanogênica específica - AME, pode ser definida como a capacidade máxima de conversão de um substrato a metano por uma comunidade de microrganismos anaeróbios, sob condições controladas em laboratório (AQUINO *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não há consenso em relação a uma metodologia específica para a realização de ensaios para a determinação da AME e, de acordo com cada pesquisador, o teste pode variar em relação à quantidade de lodo adicionado, quantidade e tipo de substrato utilizado e medição do metano, ou biogás, produzido (AQUINO *et al.*, 2007).

As concentrações iniciais de inóculo (lodo) variam de 2,0 a 5,0 g STV/L, de

acordo com o procedimento. Para testes realizados sob agitação recomenda-se maiores concentrações de inóculo (5,0g STV/L) (CHERNICHARO, 2007). Para evitar limitações metabólicas no processo, uma solução nutriente deve ser adicionada. Pode-se utilizar como substrato, glicose, ácido acético ou uma mistura de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico) (AQUINO *et al.*, 2007).

Para quantificar o biogás, ou melhor, o metano produzido durante o ensaio, os métodos a serem utilizados podem ser: manométricos, com o uso de equipamentos como respirômetros (MONTEGGIA, 1991; CHERNICHARO *et al.*, 1997) ou sistemas Oxitop® (BORGES, 2004); ou volumétricos, com a medição do volume e composição do biogás ou medição direta do volume de metano (CHERNICHARO, 2007).

2.8 SISTEMAS PARA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

Sistemas anaeróbios vêm se destacando no tratamento de lixiviado de aterro sanitário, principalmente devido à elevada carga orgânica presente neste tipo de resíduo (RENOU *et al.*, 2008). Após o desenvolvimento dos sistemas de alta taxa, que apresentam capacidade de reter grande quantidade de biomassa mesmo com a aplicação de baixos tempos de detenção hidráulica, tornou-se viável o tratamento de resíduos complexos, como o lixiviado de aterro, utilizando-se reatores anaeróbios contínuos (CHERNICHARO, 2007). Entretanto, sistemas anaeróbios descontínuos, como os reatores anaeróbios operados em bateladas seqüenciais (ASBR) vêm novamente ganhando espaço, apresentando-se como uma alternativa interessante para efluentes com fluxo intermitente. A seguir, uma breve descrição de alguns sistemas anaeróbios contínuos e descontínuos, utilizados em estudos recentes para o tratamento de lixiviado de aterro sanitário.

2.8.1 Sistemas anaeróbios contínuos

Nos últimos anos, várias configurações de reatores anaeróbios vêm sendo testadas para o tratamento de lixiviado de aterro sanitário, obtendo bons resultados (CALLI *et al.*, 2003; CALLI *et al.*, 2006; CONTRERA *et al.*, 2006). O tratamento anaeróbio é uma alternativa de baixo consumo energético, sendo menos onerosa

que processos aeróbios normalmente aplicados para lixiviados de aterro, como os lodos ativados (VELA, 2006).

Os sistemas contínuos de alta taxa, com mecanismos eficientes de retenção da biomassa, apresentam alta eficiência na remoção da DQO do lixiviado; a redução da concentração da amônia, entretanto, só foi atingida quando associada a reduções de pH ou a tratamentos aeróbios complementares (IM *et al.*, 2001; CALLI *et al.*, 2003). Exemplos de sistemas anaeróbios contínuos utilizados para o tratamento de lixiviado de aterro sanitário incluem reatores de manta de lodo com fluxo ascendente (UASB) (BERRUETA *et al.*, 1996; CALLI *et al.*, 2006), filtros anaeróbios (BIDONE *et al.*, 2007), reatores anaeróbios de leito fluidizado (GULSEN e TURAN, 2004), reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (CONTRERA *et al.*, 2006) e reatores anaeróbios compartimentados (WANG e CHEN, 2000).

2.8.2 Sistemas anaeróbios descontínuos

Pesquisas recentes na área de saneamento têm se dedicado ao tratamento biológico de águas residuárias utilizando reatores anaeróbios descontínuos (MAHVI, 2008). No Brasil, estudos sobre os reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais (ASBR) e estratégias de otimização do seu desempenho para o tratamento de efluentes têm produzido resultados promissores (LAPA *et al.*, 2003; CUBAS, 2004; MIQUELETO, 2003). Estes sistemas apresentam a vantagem de possuírem uma configuração simples, com boa remoção de matéria orgânica e de sólidos suspensos (MAHVI, 2008).

Os reatores anaeróbios em batelada também têm obtido destaque no tratamento de lixiviado de aterro sanitário (HOLLOPETER e DAGUE, 1994; KENNEDY e LENTZ, 2000; NIEZAJ *et al.*, 2005; SELLAMI *et al.*, 2009). Os valores da remoção de DQO do lixiviado de aterro durante o tratamento em batelada têm sido, em média, 60% para sistemas operados sob agitação e 40% para os casos sem nenhum sistema de agitação (HOLLOPETER e DAGUE, 1994; SELLAMI *et al.*, 2009). Este valor pode ainda variar de acordo com o restante da configuração do reator como, por exemplo, controle de temperatura e tipo de suporte utilizado para imobilização da biomassa (HOLLOPETER e DAGUE, 1994; GOMES, 2008; SELLAMI *et al.*, 2009).

Em relação à imobilização da biomassa, há dois mecanismos que permitem a

retenção dos microrganismos nos sistemas em bateladas sequenciais: a autoimobilização, que conduz à formação de grânulos (DAGUE *et al.*, 1992) e a fixação da biomassa em suportes inertes (RATUSZNEI *et al.*, 2000).

Os princípios operacionais de um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais baseiam-se em quatro etapas consecutivas: (1) alimentação, (2) reação, (3) sedimentação e (4) descarga (SUNG e DAGUE, 1995). As quatro etapas sequenciais constituem um ciclo, ou uma batelada, e o tempo entre o início da alimentação e o final da descarga é conhecido como tempo de ciclo (SUNG e DAGUE, 1995). Para reatores anaeróbios em batelada tratando lixiviado de aterro sanitário, tempos de ciclo entre 8h e 48h têm sido observados (KENNEDY e LENTZ, 2000; GOMES, 2008).

2.8.3 Granulação e biomassa autoimobilizada

A formação do lodo granular anaeróbio é o principal responsável pelo sucesso de sistemas como o UASB, em que a sedimentação e filtração do efluente é facilitada pela presença da biomassa autoimobilizada ou grânulos (HULSHOFF POL *et al.*, 2004). Uma das principais vantagens da granulação em sistemas de tratamento anaeróbios é a desvinculação do tempo de retenção hidráulica do tempo de retenção dos sólidos. Tempos de retenção de sólidos de mais de 200 dias podem ser alcançados com tempos de retenção hidráulica de apenas 6 horas (HULSHOFF POL *et al.*, 2004)

O processo de granulação, ou biogranulação, relaciona-se a interações celulares envolvendo fenômenos físicos, químicos e biológicos (LIU e TAY, 2004). As teorias sobre como se inicia o processo de biogranulação podem ser divididas em três grupos: abordagem física, microbiana e termodinâmica, onde cada um destes fatores é caracterizado como principal responsável pelo princípio da granulação.

As teorias com abordagem física consideram as condições físicas dos reatores, como por exemplo, velocidade ascensional e concentração de sólidos suspensos, para justificar a formação de grânulos nos sistemas (PEREBOOM, 1994). As teorias microbianas, por sua vez, consideram as características e atividades dos microrganismos como principal fator para a granulação, sem ignorar a importância dos fatores físicos já mencionados. Nestas teorias, a observação das características do grânulo, como por exemplo, a estrutura granular e a microbiologia

correspondente, aliam-se às condições prevaletentes nos reatores (hidrodinâmica, concentração de substratos, entre outros) para explicar a formação do grânulo anaeróbio (DOLFIN, 1987; HULSHOFF POL *et al.*, 2004).

Relacionando-se à teoria termodinâmica, a produção de polímeros extracelulares é considerada, por alguns autores, como fator determinante na granulação anaeróbia (HULSHOFF POL *et al.*, 2004). De acordo com Sam-Soon e colaboradores (1987) esta produção é estimulada por microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos, com destaque ao gênero *Methanobacterium*. Estes microrganismos, em presença de elevadas pressões parciais de hidrogênio, sintetizam altas concentrações de aminoácidos, na forma de polipeptídeos extracelulares. Estes polipeptídeos serão, portanto, responsáveis pela adesão dos microrganismos e a formação dos grânulos anaeróbios (DOLFIN, 1987).

2.8.4 Uso de microrganismos cultivados como inóculo ou bioaumento em sistemas de digestão anaeróbia

Poucos estudos em digestão anaeróbia de resíduos têm trabalhado com cultivo de microrganismos para inóculo adaptado nos sistemas (bioaumento). Ming e colaboradores (2008) cultivaram microrganismos a partir do lixiviado e os inocularam em frações orgânicas de resíduos sólidos com o objetivo de acelerar o processo de digestão anaeróbia nestes resíduos (compostagem). Como resultados, obtiveram 100% de aumento no número de indivíduos na comunidade bacteriana presente nos resíduos, com aumento de 50% na taxa de consumo de oxigênio e 27% na atividade da celulose. Qiu e colaboradores (2009) isolaram cinco linhagens dominantes a partir do lixiviado de aterro sanitário e concluíram que a adição das cinco linhagens juntas em uma concentração de 10% do volume de lixiviado a ser tratado aumentou a remoção de resíduos refratários em 30%.

Outros estudos consideram a adição de microrganismos, em sistemas anaeróbios, na forma de lodo de esgoto doméstico, por estes apresentarem biofilmes já bem estabelecidos e estáveis (RITA *et al.*, 2002; AMARAL *et al.*, 2008). Entretanto, por não serem microrganismos adaptados ao resíduo a ser tratado, a partida destes sistemas pode ser longa e o processo da digestão anaeróbia pouco eficiente (WENS *et al.*, 2001, CONTRERA, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia adotada neste estudo foi dividida em três etapas principais, a saber:

- i. análises físico-químicas do lixiviado bruto e do lodo coletados no Aterro Sanitário de Curitiba e caracterização morfológica e molecular do biofilme anaeróbio presente no lodo;
- ii. cultivo de microrganismos típicos adaptados a meio contendo lixiviado de aterro sanitário, para produção de inóculo microbiológico;
- iii. concepção e operação de reator anaeróbio em bateladas sequenciais com biomassa autoimobilizada, a ser inoculado com os microrganismos cultivados e alimentado com o lixiviado coletado no Aterro Sanitário de Curitiba.

No desenvolvimento da etapa três (iii) foram concebidos dois reatores: reator Controle (RC), sem inóculo microbiológico e reator Teste (RT), no qual foram adicionados os microrganismos cultivados. Para avaliar a eficiência da digestão anaeróbia do lixiviado de aterro sanitário nos reatores, esta etapa foi subdividida em três fases:

- 1) monitoramento das características físico-químicas do lixiviado efluente durante os primeiros 30 dias de operação dos reatores (Fase I) e acompanhamento da evolução dos biofilmes e da atividade metanogênica do lodo anaeróbio durante 60 dias de operação dos reatores;
- 2) determinação do perfil de produção e consumo de ácidos orgânicos voláteis nos reatores durante um tempo de ciclo completo;
- 3) monitoramento das concentrações de $N-NH_3$ e COD do lixiviado efluente após adição de fonte de fosfato, durante 20 dias de operação dos reatores (Fase II).

A seguir, a descrição dos métodos e técnicas utilizados no desenvolvimento deste estudo.

3.1 ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA

Localizado ao sul da cidade de Curitiba, no bairro da Caximba, o Aterro Sanitário de Curitiba (25°, 37', 11,85"S; 49°, 20', 11,86"O) foi desativado em novembro de 2010, após 21 anos de operação. Formado por três células implementadas em períodos distintos (fases I, II e III), apresenta geração de lixiviado de até 1000 m³ por dia, dependendo do regime pluviométrico. A composição deste lixiviado é altamente heterogênea devido à mistura entre lixiviados de diferentes células: lixiviado recente da fase III e lixiviado estabilizado e contendo compostos altamente refratários das fases II e III. O lixiviado originado na fase I (1989-2002) não é equalizado com aqueles das demais fases; segue diretamente para o módulo físico-químico na estação de tratamento do aterro, devido à baixa biodegradabilidade deste resíduo.

3.1.1 Coleta das amostras

Foram realizadas duas coletas de lixiviado, em setembro e outubro de 2010, no emissário central do Aterro Sanitário de Curitiba. O lixiviado era resultante da degradação dos resíduos das fases II e III, cujas operações iniciaram em 2002 e 2004, respectivamente. Juntamente com o lixiviado, durante a primeira coleta (set/2010), foram coletadas amostras de lodo anaeróbico da lagoa facultativa, componente do sistema de tratamento do lixiviado do aterro. As Figuras 3.1 a 3.3 apresentam os dois pontos de coleta no Aterro Sanitário de Curitiba.

Imediatamente após as coletas, as amostras foram acondicionadas em refrigerador, sob temperatura de 4°C ± 2°C.

3.1.2 Caracterização do lixiviado do Aterro Sanitário de Curitiba

As amostras coletadas do lixiviado do Aterro Sanitário de Curitiba foram ensaiadas para as variáveis listadas no Quadro 3.1. Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção da DQO (duplicata). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Engenharia Ambiental Professor Francisco Borsari Neto, no Departamento de Hidráulica e Saneamento, na Universidade Federal do Paraná.



FIGURA 3.1 - VISTA AÉREA DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA (25°,37' 15,35"S; 49°,20' 18,82"O): (1) EMISSÁRIO CENTRAL E (2) LAGOA FACULTATIVA

FONTE: adaptado de GOOGLE EARTH-MapLink/Tele Atlas (2010)



FIGURA 3.2 - EMISSÁRIO CENTRAL DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA



FIGURA 3.3 - COLETA DO LODO ANAERÓBIO NA LAGOA FACULTATIVA DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA

Variável	Método	Referência
DQO	Refluxo aberto- titulação colorimétrica	APHA (1998)
Conjunto de Sólidos	Gravimétrico	APHA (1998)
COD	Analizador de carbono orgânico	SHIMADZU (2003)
Alcalinidade (total/ HCO_3^- / ácidos voláteis)	Titulação potenciométrica	APHA (1998)
Nitrogênio amoniacal	Fenol-hipoclorito	WEATHERBURN (1967)
Ortofosfato	Ácido ascórbico	APHA (1998)

QUADRO 3.1 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS COM AMOSTRAS DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA

3.1.3 Caracterização do lodo anaeróbio do Aterro Sanitário de Curitiba

3.1.3.1 Conjunto de sólidos totais

O lodo anaeróbio coletado foi caracterizado para o conjunto de sólidos totais (APHA, 1998). Esta análise permitiu estimar a concentração de biomassa presente no lodo, a partir da quantidade de sólidos totais voláteis existentes nas amostras. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.1.3.2 Extração de DNA

Para identificar os grupos metanogênicos encontrados no biofilme anaeróbio de amostras de lodo, bem como a sua proporção, foi realizada a extração do DNA total presente nas amostras. A metodologia utilizada foi uma adaptação de duas metodologias clássicas de extração: método do fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e método do *salting-out* (LAHIRI e NUREMBERG, 1991), devido à dificuldade relativa à extração do DNA de complexos biológicos com grande quantidade de material extracelular. A seguir são descritas as etapas da metodologia estabelecida para este estudo.

Um volume de 100 μL de lodo foi disposto em tubo tipo Eppendorf[®], centrifugado a 3.500 rpm (2.054 x g) por 10 minutos e lavado 2X em tampão fosfato (PBS), pH 7,2. Após a lavagem, o material foi centrifugado a 1.500 rpm (377 x g) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado (*pellet*) foi macerado com o auxílio de um pistilo. O *pellet* foi suspenso em tampão de extração A (10 mM Tris pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS, 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de Proteinase K) e incubado em banho-maria, temperatura de 42°C, por 1 hora.

Após o período de incubação, foram adicionados 100 μL de solução de fenol tamponado (pH 8,0), seguindo agitação manual cuidadosa, por inversão, por 10 minutos. A seguir, o tubo foi centrifugado a 3.500 rpm (2.954 x g), por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo Eppendorf[®] e foram adicionados 200 μL de clorofórmio, seguindo agitação manual cuidadosa, por inversão, por 10 minutos. A seguir, o tubo foi centrifugado a 3.500 rpm (2.054 x g) por 10 minutos, sob temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foram adicionados 40 μL de solução 3M de acetato de sódio, pH 5,2 e 1 mL de etanol absoluto gelado. Seguiu-se um período de incubação de 15 minutos, em geladeira (4°C). Após este período, foi realizada nova centrifugação a 3.500 rpm (2.054 x g), por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 μL de etanol gelado, na concentração de 70%. A seguir, foi realizada nova centrifugação a 3.500 rpm (2.054 x g), por 10 minutos, para a sedimentação do material genético. O material precipitado foi seco em estufa a 30°C, por 10 minutos.

Após esta primeira fase, foi realizada uma nova etapa de extração, para assegurar quantidade de DNA suficiente para a realização dos ensaios posteriores. O *pellet* seco foi ressuspenso em 10 μL de tampão TE (Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM pH

8,0). Foi adicionado 1 mL de tampão de extração B (Tris 2M pH 8,0, NaCl 3M, EDTA 0,4M pH 8,0, proteinase K 100 µL/mL) no tubo da amostra que, a seguir, foi incubado em banho-maria, temperatura de 42°C, por uma noite. Ao final do processo foram adicionados 100 µL de solução de cloreto de sódio 6 M. As amostras foram resfriadas a 4°C, por 20 minutos, e centrifugadas a 3.000 rpm (1.509 x g), por 25 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 200 µL de etanol absoluto.

O material precipitado foi seco em estufa, a 30°C, por 10 minutos. O *pellet* (DNA) foi ressuspensão em solução tampão TE para preservação e armazenado sob temperatura de -20°C.

3.1.3.3 Primers metanogênicos

Para realizar a PCR a partir do DNA extraído do lodo anaeróbio, foram construídos primers (oligonucleotídeos iniciadores) capazes de reconhecer e anelar-se com sequências específicas dos genes 16S rRNA de cada grupo de interesse. Para detecção das ordens Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales e do domínio Archaea, foram empregados, respectivamente, os primers MBT857F e MBT1196R; MMB282F e MMB832R; MSL812F e MSL1159R; ARC787F e ARC1059R (YU *et al.*, 2005). Para detecção do domínio Bacteria foram empregados os primers 9F e 1515R (TEN *et al.*, 2003). A sequência de oligonucleotídeos e o tamanho dos fragmentos de amplificação esperados para cada par de primers são apresentados no Quadro 3.2.

3.1.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA obtido do lodo anaeróbio foi submetido à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers descritos na seção 3.1.3.3. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, marca Eppendorf, modelo Mastercycler gradient. Para cada PCR foi inserido um controle negativo que visava detectar possíveis contaminações por DNA. Este controle continha, no tubo de reação, todos os reagentes da PCR exceto o DNA genômico.

Nome	Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho do fragmento amplificado
Domínio Archaea	ARC787F ARC1059R	CGWAGGGGAAGCTGTAAAGT TACCGTCGTCCACTCCTT	273pb
Ordem Methanobacteriales	MBT857F MBT1196R	ATTAGATACCCSBGTAGTCC GCCATGCACCWCCTCT	343pb
Ordem Methanomicrobiales	MMB282F MMB832R	GTAACGATRVTCGCTAGGT GGTCCCCACAGWGTACC	506pb
Ordem Methanosarcinales	MSL812F MSL1159R	ATCGRTACGGGGTTGTGGG CACCTAACGRCATHGTTTAC	354pb
Domínio Bactéria	9F 1512R	GAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGHTACCTTGTTACGACTT	530pb

QUADRO 3.2 – SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS E TAMANHOS DOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO ESPERADOS, EM PARES DE BASE (pb)

FONTE: Ten *et al.* (2003), Yu *et al.* (2005)

As PCRs, para os domínios Archaea e Bacteria e para as ordens metanogênicas, foram realizadas em um volume final de 10 µL, contendo: tampão 1% (obtido do tampão 10%, constituído de 10 mM de Tris-HCl pH 8,3 e 50 mM de KCl); ddNTP 0,2 mM, cloreto de magnésio 2,5 mM; 8 pmoles de cada primer, 0,5 U de Taq polimerase, marca Invitrogen, e 2 µL de DNA amostra.

Para amplificar as sequências do domínio Archaea e da ordem Methanosarcinales foi utilizada a seguinte condição de ciclo da PCR: 30 ciclos de 94°C-1 min, 55°C-1 min e 72°C-1 min (HWANG *et al.*, 2008). Para amplificação das sequências das ordens Methanobacteriales e Methanomicrobiales a condição de ciclo da PCR foi: 30 ciclos de 94°C-1 min, 62°C-1 min e 72°C-1 min (HWANG *et al.*, 2008). Finalmente, para amplificar as sequências do domínio Bacteria, a condição de ciclo utilizada foi: 25 ciclos de 95°C- 2 min, 42°C- 30 seg e 72°C- 4 min (WEISBURG, 1991).

3.1.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Após as reações de amplificação foi realizada uma eletroforese para controle da qualidade da PCR, aplicando-se 10 µL do produto de PCR em gel de agarose

1,5% e submetendo à corrida eletroforética de 100 V por 1 hora. Após a corrida eletroforética, o gel de agarose foi corado com solução de brometo de etídeo e visualizado e fotografado em sistema UV de fotodocumentação de géis.

3.1.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a visualização em microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras de grânulos do lodo coletado foram dispostas em tubos falcon de 15 mL, contendo solução tampão de fosfato (PBS), e centrifugadas a 3500 rpm (2.054 x g) por 5 minutos. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 1 mL de solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4%, PBS) (KARNOVSKY,1965) para a fixação do material. Após duas horas, os tubos foram novamente centrifugados e o material lavado com o tampão PBS. O contraste do material foi realizado com tetróxido de ósmio por uma hora. Após a lavagem com PBS, o material foi desidratado por 10 minutos em cada uma das soluções de etanol com concentração alcóolica crescente (etanol a 50°, 70°, 90° e 100°).

Após imersão em álcool absoluto, o material foi colocado em equipamento de Ponto Crítico, modelo CPD-030 *Critical Point Dryer*, marca Bal-Tec, visando a desidratação das amostras e, em seguida, metalizado em Metalizador modelo SCD030 – Balzers Union FL 9496, marca Balzers.

O material processado foi visualizado em microscópio eletrônico de varredura, marca Jeol, modelo JSM – 6360LV.

3.2 CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

Alíquotas de 50 ml do lixiviado de aterro sanitário coletado foram transferidas para frascos estéreis, vedados e incubados por 24 h em estufa microbiológica Nova Ética, modelo 410/1ND, sob temperatura de 35°C ± 1°C. Após este período foram realizados os testes de substrato e antibiótico, descritos a seguir.

3.2.1 Teste de substrato

Para avaliar quais as possíveis vias de produção de metano utilizadas pelos microrganismos metanogênicos presentes no lixiviado de aterro sanitário, foi realizado um teste de substrato. As fontes de carbono testadas foram: lixiviado bruto

coletado, acetato e metanol.

Foi confeccionado um meio base (MB), contendo lixiviado de aterro como fonte nutriente e ágar como agente solidificante. Outros meios MB foram preparados e enriquecidos com acetato ou metanol. A adição destes compostos foi realizada durante o preparo dos meios, sendo 10 mL de acetato para 250 mL de MB e, igualmente, 10 mL de metanol para 250 mL de MB. Os meios foram autoclavados e, a seguir, colocados em câmara anaeróbia, sob ambiente gasoso composto de mistura nitrogênio e gás carbônico, na proporção 4:1.

Para avaliar como inibição do crescimento bacteriano interfere no crescimento dos microrganismos metanogênicos, foi adicionado um disco de antibiótico cloranfenicol (inibidor da síntese protéica em bactérias), concentração 30 µg, em metade dos meios confeccionados. Ao final do processo, seis tipos de meios de cultivo foram produzidos: MB, MB-acetato, MB-metanol, MB-cloranfenicol, MB-acetato-cloranfenicol e MB-metanol-cloranfenicol.

A seguir, 100 µL do lixiviado bruto foram inoculados e semeados por esgotamento sobre os meios. Os meios inoculados foram mantidos em câmara anaeróbia sob temperatura ambiente, por 20 dias.

3.2.2 Teste de Antibiótico

Os microrganismos podem ser identificados de acordo com sua resistência ou inibição na presença de determinados antibióticos (BOONE e CASTENHOLZ, 2001). Para identificar possíveis espécies de metanogênicos presentes no lixiviado de aterro sanitário foi desenvolvido um teste utilizando os antibióticos cloranfenicol, penicilina e bacitracina.

Para os ensaios, foram confeccionados meios MB contendo: a) meio com disco cloranfenicol 30µg, marca Laborclin (MB-clo); b) meio com disco bacitracina 10µg, marca Laborclin (MB-baci); c) meio com disco penicilina G 10 µg, marca Laborclin (MB-pen) e d) meio livre de antibióticos (MB-free). Os discos para antibiograma foram colocados no centro da placa de Petri e, ao seu redor, foram dispostos quatro cortes de 1mm x 1mm de membrana de nitrato de celulose, 0,45µm de diâmetro de poro, marca Sartorius Stedim Biotech. Para o meio MB-free os cortes de membrana foram dispostos ao redor do eixo central da placa. No espaço entre o disco antibiótico (centro da placa) e os cortes de membrana foram

inoculados 10 μ L de lixiviado bruto. Os meios inoculados foram mantidos em câmara anaeróbia, por 20 dias, sob temperatura ambiente.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS CULTIVADOS

Após 20 dias de cultivo anaeróbio, as colônias formadas nas placas de Petri, após os testes de substrato e antibiótico, foram analisadas utilizando as técnicas morfológicas e moleculares descritas a seguir.

3.3.1 Análise morfológica e estrutural

3.3.1.1 Estereomicroscopia e microscopia óptica

As linhagens cultivadas foram fotografadas em estereoscópio (modelo SXZ, marca Olympus) com ampliação de 520 e 560 vezes. A partir das colônias crescidas nos meios foram confeccionadas lâminas coradas pelo método de Gram para visualização em microscópio ótico BX41TF, marca Olympus, com ampliação de 1000 vezes.

3.3.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os cortes de 1 mm x 1 mm da membrana de nitrato de celulose presentes nos cultivos do teste de antibiótico foram processados de acordo com a metodologia descrita na seção 3.3.1.2.

O material processado (Figura 3.4) foi visualizado em microscópio eletrônico de varredura, marca Jeol, modelo JSM – 6360LV.

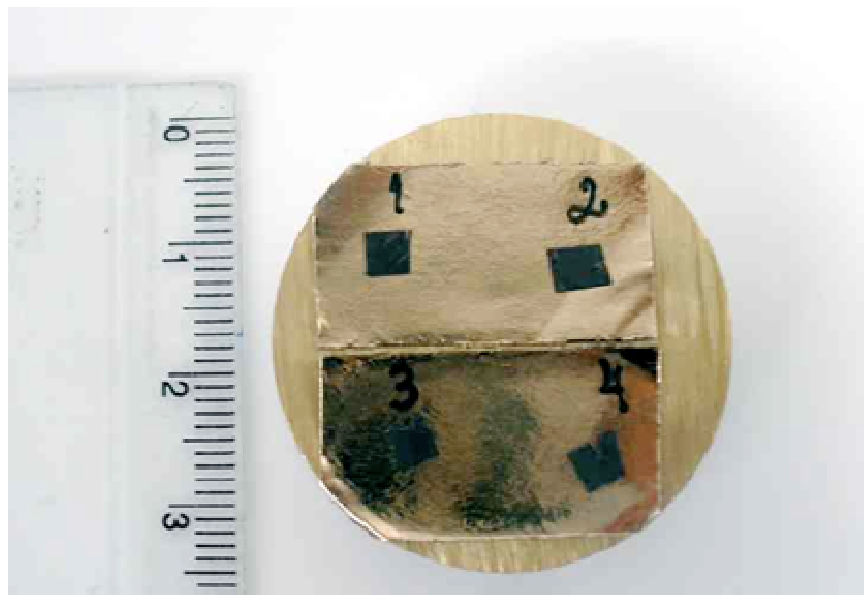


FIGURA 3.4 – MEMBRANAS DE CULTIVO APÓS PROCESSAMENTO PRÉ-MEV: 1- MB-CLO; 2- MB-BACI; 3- MB-PEN E 4- MB-FREE

3.3.2 Análise molecular

Foi realizada a extração do DNA dos microrganismos cultivados em meio MB-cloranfenicol. Foram adotados dois métodos clássicos de extração: o método do fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e o método “salting-out” (LAHIRI e NUREMBERG, 1991), conforme metodologia descrita na seção 3.1.3.2. O DNA obtido foi submetido à amplificação pela reação da cadeia da polimerase (PCR) utilizando os mesmos *primers* descritos na seção 3.1.3.1. As condições da PCR utilizadas foram as mesmas apresentadas na seção 3.1.3.3.

Os produtos obtidos com a PCR foram avaliados em eletroforese em gel de agarose 1,5%. A corrida eletroforética foi realizada sob tensão de 100 V, por 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo e visualizado e fotografado em sistema UV de fotodocumentação de géis.

3.4 REATORES OPERADOS EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA AUTOIMOBILIZADA

Para avaliar a digestão anaeróbia do lixiviado de aterro sanitário, com e sem

inóculo microbiano, foram construídos dois reatores em batelada, com biomassa autoimobilizada na forma de lodo anaeróbio e alimentação em fluxo ascendente.

3.4.1 Descrição do sistema

O sistema era composto por dois cones de Imhoff, com capacidade para 1 L cada. Uma abertura de 3 cm de diâmetro, na parte inferior de cada reator, era conectada a uma mangueira de látex, que, na sua extremidade, estava acoplada a um funil de 20 cm de diâmetro (Figura 3.5 a).

A alimentação dos reatores foi realizada por meio do funil conectado à mangueira, que deveria ser mantido elevado durante o processo (Figura 3.5 b). Após a alimentação, a abertura inferior era mantida fechada por pinças de Mohr na extremidade da mangueira conectada à base do reator.

A parte superior dos reatores foi vedada com uma placa de PVC, mantendo-se, entretanto, uma abertura na placa para o descarte do efluente. Para evitar a entrada de ar no sistema, esta abertura foi fechada por um *cap* removível, com diâmetro de 32 mm (Figura 3.5 c). A liberação do gás produzido foi realizada por meio de um tubo em “L” conectado ao *cap*.

A evolução da biomassa anaeróbia foi acompanhada por meio de retiradas por saídas laterais (Figura 3.5 d) nos períodos de 1, 20, 40 e 60 dias de operação. Estas saídas eram mantidas fechadas por pinças de Mohr.

3.4.2 Operação dos reatores

Para evitar o acúmulo de lodo na entrada da alimentação, os reatores foram preenchidos com pedras de 1 mm de diâmetro até a marca de 50 mL. Na sequência, foram adicionados 600 mL de lodo anaeróbio, coletado na lagoa facultativa do Aterro Sanitário de Curitiba, em cada reator (Figura 3.6).

3.4.2.1 Inoculação do reator Teste

A quantidade de inóculo adicionada ao reator Teste foi calculada levando em consideração a concentração total esperada de metanogênicos em um biofilme anaeróbio, que segundo Huang *et al.* (2002), não é maior do que 2%. Portanto, este valor foi adotado como base para o cálculo do inóculo a ser produzido.

As colônias crescidas em uma das placas de Petri (seção 3.2.1) contendo

meio sólido de lixiviado e o antibiótico cloranfenicol (MB-cloranfenicol) foram transferidas para 20mL de meio líquido de lixiviado autoclavado (MT). Este meio de transferência (MT) foi mantido em câmara anaeróbia $N_2: CO_2$, relação 4:1, por 48 horas. O final deste tempo de incubação foi calculado para coincidir com a adição do lodo anaeróbio nos reatores.

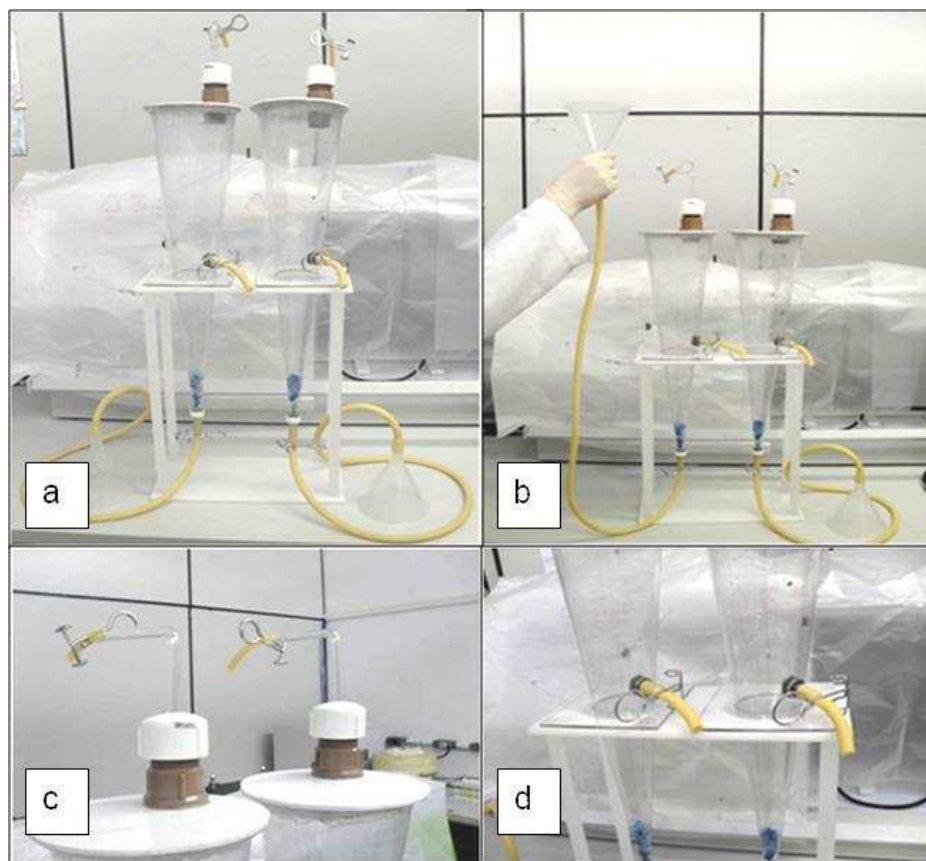


FIGURA 3.5 – REATORES: a) VISÃO GERAL, b) FUNIL DE ALIMENTAÇÃO, c) CAP E TUBO EM “L”, d) SAÍDA DO LODO

Terminado o tempo de incubação, o reator Teste foi inoculado com 12 mL do meio MT (2% do volume de 600 mL de lodo). Após a adição do inóculo, ambos os reatores foram jateados com gás nitrogênio por 5 minutos, fechados com o *cap* e mantidos em repouso por 24h.

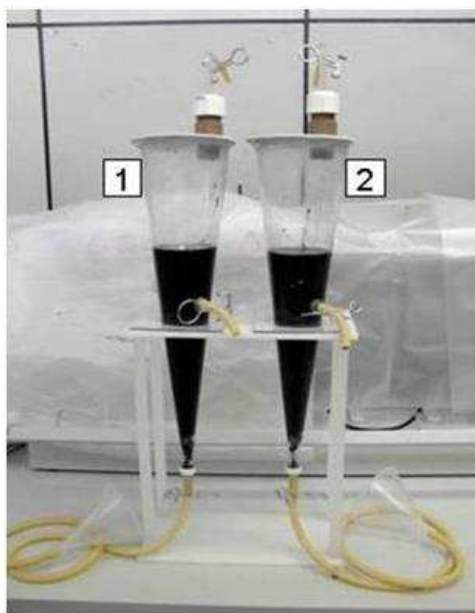


FIGURA 3.6 – CAMADA DE LODO ANAERÓBIO. 1) REATOR CONTROLE, 2) REATOR TESTE

3.4.2.2 Alimentação dos reatores

Os reatores foram projetados para receber o lixiviado de aterro sanitário como substrato durante sua operação. A carga orgânica volumétrica adotada neste experimento foi de 2 kg DQO/m³. dia (LETTINGA, 1984).

O volume de alimentação diária foi calculado mediante a aplicação da Equação 3.1.

$$V_{alim} = \frac{V_{reator} \times COV}{[DQO]} \quad (3.1)$$

Em que:

V_{alim} = volume diário de alimentação (m³/batelada)

V_{reator} = volume do reator (m³)

COV= carga orgânica volumétrica (kg DQO/m³.d)

DQO= concentração de substrato afluente (kg/m³)

O volume inicial de lixiviado alimentado por dia (V_{alim}) foi calculado considerando-se o volume dos reatores (V_{reator}) igual ao volume de lodo (600 mL). O volume útil final dos reatores foi alimentado com lixiviado até atingir 1L, após o que,

o volume de alimentação foi igual ao volume de descarte. Em função da carga volumétrica aplicada, após atingir o volume final (1L), a vazão diária de alimentação dos reatores manteve-se constante e igual a 200 mL. Este volume era, então, adicionado e removido ao final de cada tempo de ciclo dos reatores. O biogás gerado nos sistemas era liberado pelos tubos em “L” antes do início de cada ciclo.

3.4.2.3 Tempo de ciclo

O tempo de ciclo adotado para os reatores RT e RC foi de 24 horas. O tempo para alimentação e descarte do lixiviado foi de 10 minutos (5 minutos para cada etapa). O restante do tempo era utilizado para reação e sedimentação.

3.4.2.4 Condições operacionais dos reatores

Os reatores foram operados por 60 dias na primeira fase e por 20 dias na segunda fase de monitoramento do lixiviado efluente. Durante todo o período, a carga orgânica volumétrica foi mantida em 2 kg DQO/m³ dia.

Os reatores foram cobertos com papel alumínio e mantidos sob temperatura ambiente durante todo o experimento.

3.4.3 Monitoramento do efluente- Fase I

A caracterização físico-química das variáveis do lixiviado efluente dos reatores, durante os primeiros trinta dias de operação (30 tempos de ciclo), foi denominada de monitoramento da Fase I.

Durante este período, amostras do lixiviado descartado dos reatores ao final dos tempos de ciclo, foram ensaiadas para as mesmas variáveis utilizadas durante a caracterização do lixiviado bruto do aterro sanitário (seção 3.2.1), com exceção da variável fósforo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com exceção dos ensaios da DQO que foram realizados em duplicata.

3.4.4 Monitoramento do lodo dos reatores RC e RT

Amostras de lodo foram coletadas nos tempos de 1, 20, 40 e 60 dias de operação. O critério adotado para os períodos das coletas levou em conta o tempo médio de 20 dias para a maturação do biofilme anaeróbio (FERNÁNDEZ *et al.*,

2008). Portanto, o monitoramento do lodo avaliou as características do biofilme anaeróbio em três gerações ou períodos de desenvolvimento.

As amostras de lodo anaeróbio dos reatores RC e RT foram avaliadas para as seguintes variáveis: conjunto de sólidos totais, composição morfológica e estrutural dos grânulos de lodo em MEV (seção 3.3.1.2), PCR de populações com *primer* universal 16S rRNA (seção 3.3.2.3) e atividade metanogênica específica (AME).

3.4.4.1 Atividade metanogênica específica

Para os ensaios da AME foi construído um sistema de medição direta do volume de metano produzido (Figura 3.7a-b).

Este sistema é composto por um frasco reator (R), que recebeu o inóculo de biomassa (lodo), a solução de nutrientes (Tabela 3.2) e uma solução concentrada de ácidos graxos voláteis (AGV), contendo: 1,9 mL de ácido acético concentrado, 0,5 mL de ácido propiônico concentrado e 0,52 mL de ácido butírico concentrado.

Cada frasco reator foi conectado a uma câmara de segurança ou *trap* (T) cuja função era evitar o refluxo da solução presente no frasco de Mariotte (M). Este frasco (M) encontrava-se ligado ao *trap* e apresentava um volume equivalente de 250 mL de solução alcalina (NaOH 25 g/L) capaz de reter o dióxido de carbono formado no processo. Desta forma, apenas o metano produzido passava para o espaço vazio acima do frasco e era o responsável pelo deslocamento da solução alcalina. O volume deslocado era medido por meio de provetas, localizadas abaixo do frasco invertido de solução alcalina. O sistema completo da AME foi mantido sob temperatura constante de 32°C.

O volume de lodo adicionado no frasco de biomassa foi calculado com base nos resultados de sólidos totais voláteis (STV) obtidos para este lodo. O valor utilizado nesta pesquisa forneceu a concentração final da biomassa no frasco reator (R) de 2,5 g/STV L⁻¹ (CHERNICHARO, 2007; AQUINO *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 2008).

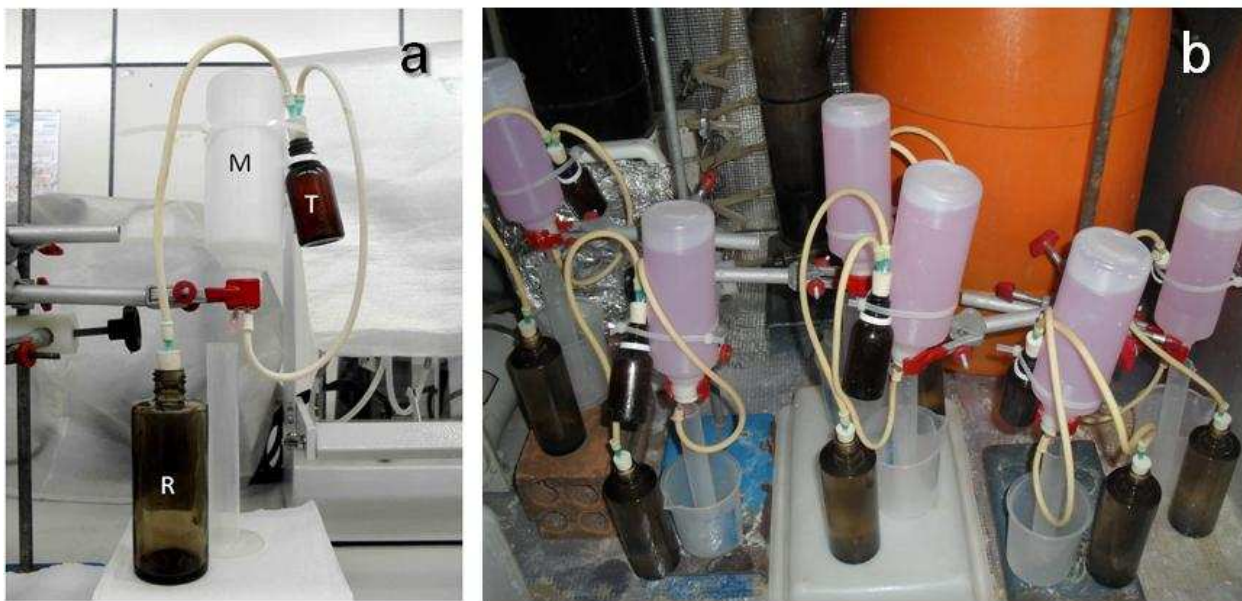


FIGURA 3.7 – (a) REATOR DE ATIVIDADE METANOGÊNICA. R- FRASCO DE BIOMASSA; M- FRASCO DE SOLUÇÃO NAOH; T - CÂMARA DE SEGURANÇA, (b) SISTEMA DA AME DURANTE ENSAIO

Nutriente	Concentração (mg. L ⁻¹)	Finalidade
NaHCO ₃	1000	Solução tampão
KH ₂ PO ₄	650	Solução tampão e macronutriente
K ₂ HPO ₄	150	Solução tampão e macronutriente
NH ₄ Cl	500	Macronutriente
MgCl ₂	100	Macronutriente
CaCl ₂ .2H ₂ O	100	Macronutriente
Extrato de levedura	50	Fonte de vitaminas

QUADRO 3.3 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE NUTRIENTES UTILIZADA DURANTE O TESTE DA AME

FONTE: Chernicharo (2007)

O volume deslocado de solução alcalina do frasco M indica a produção

cumulativa de metano ao longo do tempo. Graficamente, correlacionando tempo *versus* produção cumulativa de metano é possível obter uma curva, cuja inclinação do trecho reto fornece a taxa de produção de metano (ex: mLCH₄/h) (Figura 3.8). Para o cálculo da AME (em gDQO_{CH₄}/gSTV.d) utilizou-se a fórmula 3.2 (Aquino *et al.*, 2007):

$$AME = \frac{R \times 24}{38,5 \times STV} \quad (3.2)$$

Em que:

AME= atividade metanogênica específica (gDQO_{CH₄}/gSTV.d)

R= taxa de produção de metano (mLCH₄. h⁻¹)

24= fator de conversão (horas para dias)

38,5= fator de conversão (mLCH₄ para gDQO)

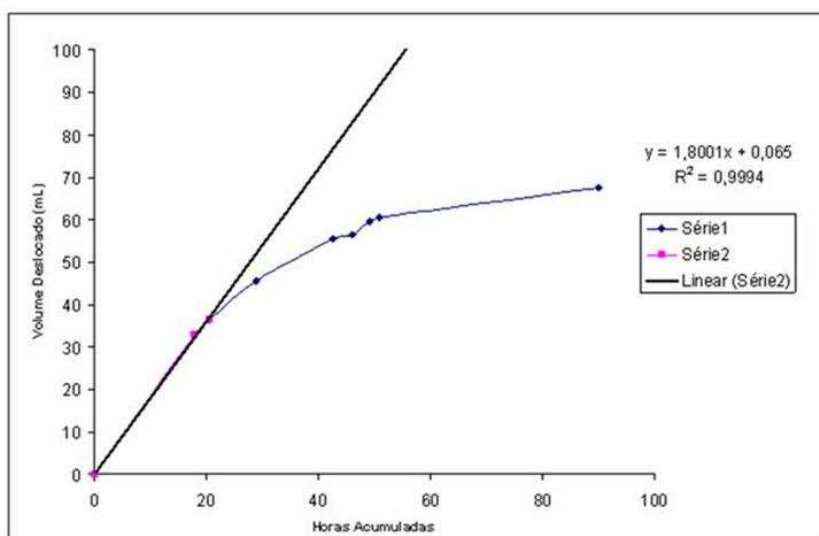


FIGURA 3.8 – EXEMPLO DE REPRESENTAÇÃO GRÁFICA TEMPO *VERSUS* PRODUÇÃO CUMULATIVA DE METANO. A INCLINAÇÃO DO TRECHO RETO DA CURVA FORNECE A TAXA DE PRODUÇÃO DE METANO

FONTE: Yoo e Braga (2008)

3.4.5 Perfil da concentração de ácidos orgânicos voláteis

Para avaliar como as fases da digestão anaeróbia se desenvolveram durante a etapa de reação em um tempo de ciclo dos reatores, foi realizado o perfil das

concentrações dos ácidos orgânicos voláteis.

A amostragem ao longo de um tempo de ciclo foi realizada ao final do 30º dia de operação. Completada a etapa da alimentação, amostras foram retiradas, de ambos os reatores, após os seguintes tempos de início da etapa reacional: 15 min, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 10h, 12h, 15h, 18h, 21h e 24h. Logo após a retirada das amostras, foram medidos o pH e a temperatura. As amostras foram filtradas a vácuo em filtro 0,45 µm, marca Stedium Biotech e diluídas 10x. Foram injetados 20 µL do material filtrado e diluído em cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu, modelo Prominence, sob fluxo de 1,6 mL min⁻¹ e leitura em 220 nm. A metodologia para calibração e leitura das concentrações de ácidos voláteis seguiu aquela proposta por Cerqueira e colaboradores (2010).

3.4.6 Adição de fósforo no lixiviado e monitoramento do efluente- Fase II

Após o término dos 60 dias de monitoramento da Fase I, a alimentação dos reatores passou a ser realizada com lixiviado de aterro sanitário corrigido para o macronutriente fósforo.

A relação 1000: 1 de DQO: P foi adotada para o cálculo da quantidade de fósforo a ser adicionada no lixiviado. Os valores de DQO e fósforo no lixiviado bruto (seção 4.1) apresentaram a relação 1000: 0,3. Portanto, para a correção da relação entre as duas variáveis, foi adicionado 0,02 g de KH₂PO₄ para cada dois litros de lixiviado bruto.

A operação dos reatores foi a mesma adotada durante a Fase I (seção 3.4.2), porém sem nova adição de microrganismos. Os reatores foram operados por 20 dias e as coletas para monitoramento foram realizadas após 1, 5, 10, 15 e 20 dias de atividade dos sistemas. O monitoramento do efluente nesta etapa foi denominado Fase II e avaliou as seguintes variáveis: nitrogênio amoniacal (WEATHERBURN, 1967), carbono orgânico dissolvido (SHIMADZU, 2003) e ortofosfato (APHA, 1998).

3.4.7 Análise estatística não-paramétrica para os reatores RC e RT

Para comparar os desempenhos obtidos pelos dois reatores, foram aplicados testes estatísticos não paramétricos (n<30). Durante a Fase I foi aplicado o teste U de Mann-Whitney para verificar se houve diferença significativa na concentração das variáveis monitoradas no efluente e no teste da AME do lodo anaeróbio entre os dois

reatores RC e RT. Para avaliar a possível relação entre a adição do fósforo no lixiviado e as remoções da matéria orgânica e nitrogênio amoniacal no afluente, foi aplicado o teste da Correlação de Spearman, para cada reator isoladamente.

Todos os testes foram realizados no software SPSS®, versão 13.0 (SPSS INC., 2004), com um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a realização das etapas deste estudo.

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO DE CURITIBA

A Tabela 4.1 apresenta os resultados para as variáveis físico-químicas do lixiviado de aterro sanitário coletado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os valores expressam a média observada.

TABELA 4.1 - RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO DO ATERRO SANITÁRIO MUNICIPAL DE CURITIBA (SET e OUT/2010)

Variáveis	Valores*	Variáveis	Valores*
pH	8,3 (0,2)	Fósforo	3,2 (0,3)
DQO	9.369 (1.159)	SST	431 (72)
COD	2.300 (380)	SSV	352 (59)
Nitrogênio amoniacal	1.800 (175)	SSF	79 (12)
Alcalinidade total	860 (219)	SDT	12.552 (429)
Alcalinidade como bicarbonato	808 (184)	SDV	3.367 (234)
Alcalinidade dos ácidos voláteis	52 (17)	SDF	9.184 (451)

Notas: SST- Sólidos Suspensos Totais; SSV- Sólidos Suspensos Voláteis; SSF- Sólidos Suspensos Fixos; SDT- Sólidos Dissolvidos Totais; SDV-Sólidos Dissolvidos Voláteis; SDF- Sólidos Dissolvidos Fixos. Valores em () apresentam o desvio-padrão

* Todos os valores em mg.L⁻¹, com exceção do pH

Conforme Christensen e colaboradores (1994) e Kjeldsen e colaboradores (2002), os valores de pH obtidos para o lixiviado caracterizado são típicos da etapa metanogênica de degradação. Apesar disto, a concentração da matéria orgânica obtida na forma de DQO indicou que o meio não se encontrava estabilizado e grande parte da matéria orgânica dissolvida poderia, ainda, ser encontrada na forma de AGV, de acordo com Harmsen (1983) e Frimmel e Heiss (1991).

A concentração do nitrogênio amoniacal presente no lixiviado de aterro sanitário de Curitiba ultrapassou o valor de 1.500 mg.L⁻¹. De acordo com Lay e

colaboradores (1997), concentrações acima deste valor podem induzir à queda gradativa da atividade metanogênica, principalmente devido à formação de gás amônia. Entretanto, no pH observado para estas amostras (8,3), a maior parte do nitrogênio amoniacal ainda se encontraria na forma de íon amônio, não tóxico e fonte de nitrogênio biodisponível para os microrganismos.

De acordo com a Tabela 4.1, mais de 93% da alcalinidade total obtida para o lixiviado caracterizado foi encontrada na forma de alcalinidade como bicarbonato (808 mg.L^{-1}). Os resultados estão de acordo com o esperado para lixiviado de aterro sanitário, no qual a amônia presente neste resíduo combina-se com dióxido de carbono, para formar bicarbonato de amônio, que age como um sistema tampão natural e já foi observado por Tajarudin e colaboradores (2006). Uma fração menor da alcalinidade total encontrou-se, ainda, na forma de sais derivados de ácidos voláteis (52 mg.L^{-1}) e, de acordo com Devlin (1990), este valor deve-se, majoritariamente, à presença de acetato nas amostras.

O valor médio encontrado para a variável fósforo ($3,2 \text{ mg.L}^{-1}$) foi condizente com os valores para este macronutriente relatados por diferentes pesquisadores como Baere e colaboradores (1984) e Morais e Zamora (2005). A relação DQO:P encontrada no lixiviado caracterizado foi de 1.000: 0,3. Esta relação está em desacordo com aquela sugerida por Lettinga (1996) como ideal para o equilíbrio dos processos biológicos (1.000:1) e permite afirmar que o fósforo encontra-se em baixas concentrações no lixiviado de aterro sanitário e pode limitar os processos biológicos de degradação da matéria orgânica neste tipo de resíduo.

O conjunto de sólidos suspensos das amostras do lixiviado de aterro sanitário de Curitiba apresentou-se, em quase sua totalidade, como frações voláteis (SSV) (352 mg.L^{-1}). Os SSV são constituídos por material de origem celular e podem contribuir para o crescimento do biofilme anaeróbio, quando em contato com biopartículas em desenvolvimento, já observado por Vangulk e Rowe (2004).

A concentração de sólidos dissolvidos no lixiviado foi a mais representativa dentre os sólidos totais. Os valores encontrados para o lixiviado do Aterro Sanitário Municipal de Curitiba estão de acordo com os resultados de Qasin e Chang (1994) para sólidos dissolvidos totais neste tipo de efluente.

4.2 LODO ANAERÓBIO DO LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO

A coleta do lodo anaeróbio para adição nos sistemas em batelada foi realizada na lagoa facultativa do Aterro Sanitário de Curitiba, por se tratar de uma potencial fonte de biomassa já adaptada ao tipo de efluente a ser utilizado como substrato.

A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos para a análise do conjunto de sólidos totais do lodo anaeróbio coletado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os valores expressam a média observada.

A alta concentração de sólidos totais observada para este lodo (23%) assemelhou-se com o que já foi observado por Gonçalves *et al.* (1997) em lodos formados em lagoas anaeróbias. Destaca-se também o avançado estado de mineralização observado neste lodo, com apenas 18% dos sólidos totais na forma de sólidos voláteis.

TABELA 4.2 - RESULTADOS PARA O CONJUNTO DE SÓLIDOS TOTAIS DO LODO ANAERÓBIO

Variáveis	Valores (g. L ⁻¹)	%
Sólidos Totais	254,8 (15,4)	100
Sólidos Totais Voláteis	46,2 (3,8)	<20
Sólidos Totais Fixos	208,7 (11,7)	>80

O lodo coletado apresentou características similares a lodos de lagoas anaeróbias do que aqueles encontrados em lagoas facultativas, nas quais se espera uma concentração de sólidos totais inferior a 10%. O acúmulo de lodo na lagoa facultativa do Aterro Sanitário de Curitiba, sem remoções periódicas durante a operação deste sistema, poderia explicar a elevada concentração de sólidos observada neste resíduo.

4.3 CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

O período de incubação em estufa microbiológica sob temperatura de 35°C, que precedeu o cultivo dos microrganismos em meios MB, visou aclimatar e estimular as espécies microbianas presentes no lixiviado. A função desta etapa foi reduzir a taxa de mortalidade deste tipo de organismo, cuja intolerância ao oxigênio

atmosférico implica na sua dificuldade em crescer sob cultivo.

4.3.1 Teste do substrato

Todos os meios contendo o lixiviado bruto (MB e variantes) apresentaram desenvolvimento colonial (Figura 4.1 a-f). Os meios contendo o antibiótico cloranfenicol, apresentaram a formação de um halo ao redor do antibiótico, definindo regiões de inibição do crescimento. O halo de inibição, entretanto foi mais evidente nos cultivos sem adição de metanol e acetato.

Foram observados bolsões de gás na superfície de todos os meios testados, provavelmente decorrentes da saída do biogás produzido no interior do meio, conforme apresentado na Figura 4.2.

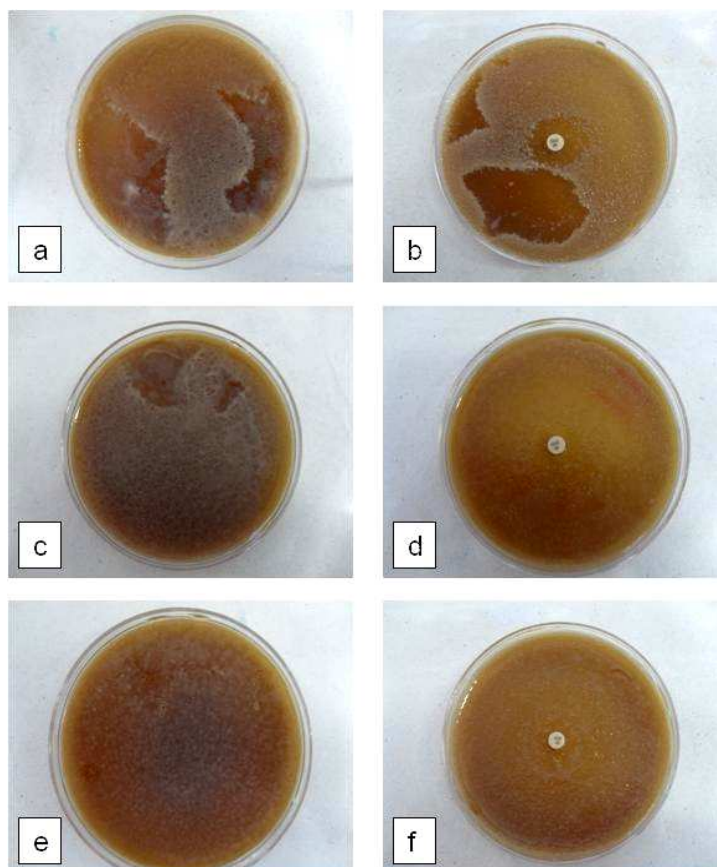


FIGURA 4.1 – (a) MEIO MB, (b) MEIO MB-CLORANFENICOL, (c) MEIO MB-ACETATO, (d) MEIO MB-ACETATO-CLORANFENICOL, (e) MEIO MB-METANOL, (f) MEIO MB-METANOL-CLORANFENICOL

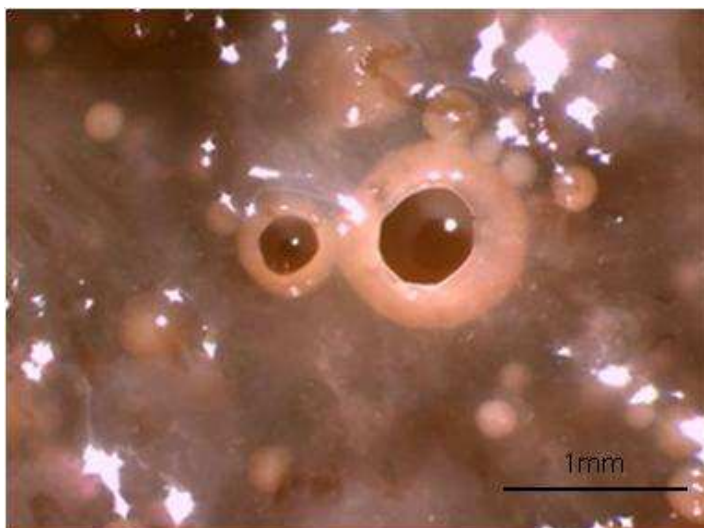


FIGURA 4.2 - BOLSÕES DE GÁS EM MEIO MB

Sob estereomicroscopia, as colônias observadas no meio MB e MB-cloranfenicol dividiram-se em dois tipos principais: (1) bordos lisos, formas arredondadas, levemente côncavas, coloração rósea ou marrom claro e (2) difusa, branca acinzentada, com forma arredondada ou elíptica. A morfologia colonial do tipo 1 assemelhou-se àquela obtida por Edwards e McBride (1975), isolando metanogênicos a partir de lodo de esgoto doméstico. As colônias observadas pelos autores nem sempre eram puras e podiam ser formadas por várias espécies de metanogênicos como, por exemplo, *Methanosarcina* spp., *Methanobacterium* spp. e *Methanospirillum* sp.

A segunda morfologia colonial observada assemelhou-se a colônias do gênero *Methanobrevibacter*, hidrogenotrófico e apareceu em maior quantidade na região de inibição ao redor do antibiótico. De acordo com Morvan e Fonty (1996), este crescimento diferenciado pode ter resultado da redução da competição de algumas bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio e bicarbonato pelo substrato das hidrogenotróficas (H_2/CO_2), o que permitiu o crescimento mais pronunciado de gêneros como *Methanobrevibacter*. Na Figura 4.3 a-b são apresentadas as imagens das colônias observadas próximas ao halo de inibição do cloranfenicol.

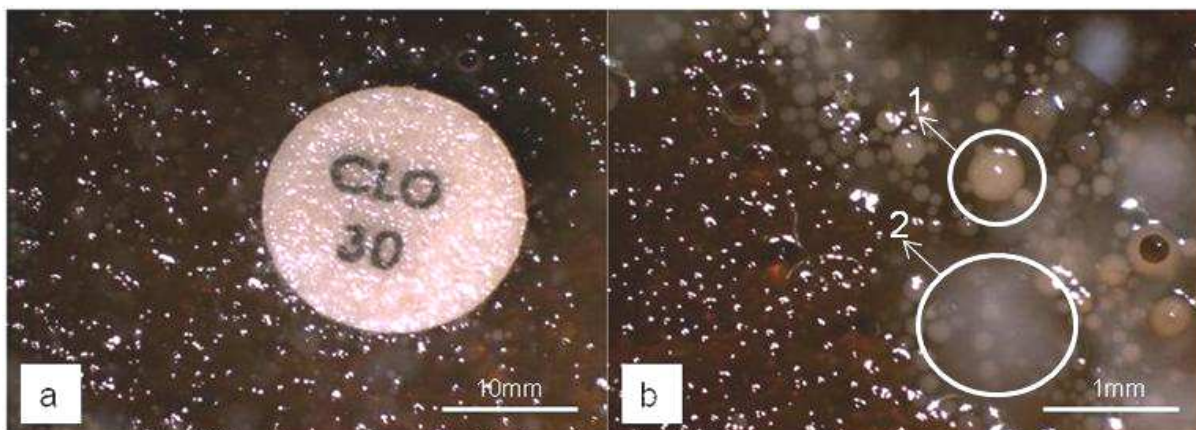


FIGURA 4.3 – (a) COLÔNIAS EM REGIÃO DE INIBIÇÃO NO MEIO MB-CLORANFENICOL; (b) MORFOLOGIAS COLONIAIS OBSERVADAS, TIPOS 1 e 2

Os meios com adição de acetato e metanol, com e sem cloranfenicol apresentaram um grande número de colônias similares ao primeiro tipo morfológico descrito no meio MB e menor crescimento de colônias similares às do gênero *Methanobrevibacter* (Figura 4.4). Isto porque os meios, contendo altas concentrações de acetato e metanol, reduzem drasticamente a atividade das bactérias acetogênicas do tipo OHPA, pois não há necessidade de converter os ácidos orgânicos formados no meio, em ácido acético. Como se trata de um consórcio intrinsecamente vinculado, a redução da atividade das acetogênicas produtoras de hidrogênio afeta diretamente o metabolismo das metanogênicas hidrogenotróficas (i. e. *Methanobrevibacter*), reduzindo também seu crescimento.

Sob microscopia óptica foram observados, nos meios MB e MB-cloranfenicol, microrganismos similares à *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp., *Methanosphaera* sp. além de grande quantidade de microrganismos similares à *Methanobrevibacter* sp. (Figura 4.5).



FIGURA 4.4 – COLÔNIAS (MEIO MB-
ACETATO) EM
ESTEREOMICROSCOPIA
BARRA= 1mm

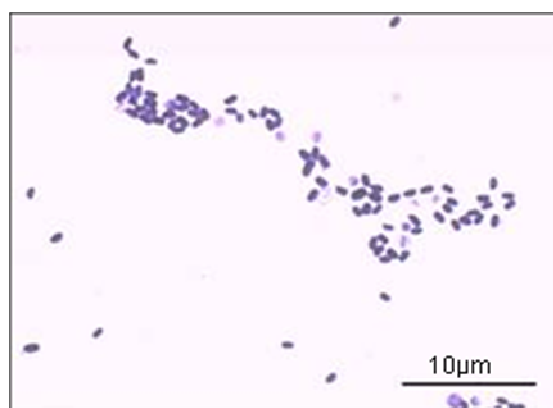


FIGURA 4. 5 - MICRORGANISMOS
SIMILARES À
METHANOBREVIBACTER
SP. BARRA= 10µm

Os meios contendo acetato e metanol também apresentaram grande quantidade de microrganismos similares a *Methanosarcina* sp., espécie metabolicamente versátil e pioneira. Para o meio contendo acetato, outro destaque foi o crescimento de microrganismos similares a *Methanosaeta* sp., um dos poucos grupos capazes de metabolizar acetato, juntamente com o gênero *Methanosarcina*. Para o meio contendo metanol, além da presença de *Methanosarcina* sp., observou-se grande quantidade de microrganismos similares a *Methanosphaera* sp. De acordo com Boone e Castenholz (2001), o metanol e as metilaminas são substratos catabólicos exclusivos de alguns membros da família *Methanosarcinaceae* (entre eles, o gênero *Methanosarcina*) e da espécie *Methanosphaera* sp., o que explica o crescimento destas espécies nos meios MB em que foi adicionado metanol.

4.3.2 Teste do antibiótico

O teste do antibiótico foi realizado como tentativa de identificação das espécies, principalmente metanogênicas, presentes nos meios cultivados.

Todas as placas apresentaram crescimento de microrganismos. Entretanto, a morfologia colonial variou de acordo com o antibiótico utilizado. O crescimento colonial dos quatro meios MB pode ser observado nas Figuras 4.6 a-d.

O meio MB-free apresentou crescimento mais disperso e o maior número de

colônias formadas. O meio MB-clo apresentou colônias morfológicamente similares ao meio MB-free, entretanto com menor dispersão. Para o antibiótico penicilina, inibidor da síntese protéica das bactérias acetogênicas, a morfologia colonial foi distinta dos meios MB-free e MB-clo, pois apresentou uma massa de crescimento branca, sem distinção clara entre as colônias. Para o antibiótico bacitracina houve menor dispersão colonial, como observado no MB-clo e, em relação a este, menor número de colônias formadas.

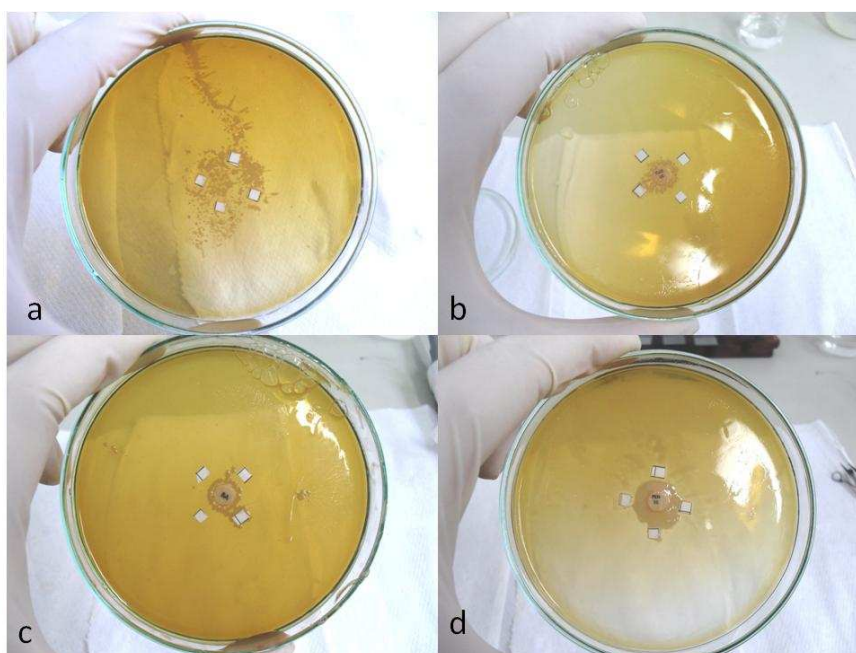


FIGURA 4.6 – CRESCIMENTO COLONIAL EM MEIO: (a) MB-FREE; (b) MB-CLO; (c) MB-BACI E (d) MB-PEN

4.3.2.1 Morfologia e estrutura colonial dos microrganismos cultivados

Em microscopia eletrônica de varredura, o material biológico presente nas placas contendo os meios MB-free e MB-clo, apresentou-se como um biofilme denso, formado por bacilos de extremidades arredondadas, e espaçados por canais (Figura 4.7). Estes canais têm como provável função a circulação de água, nutrientes e a excreção de metabólitos pelos membros do consórcio microbiano, conforme sugerido por Costerton *et al.* (1994); Costerton *et al.* (1999), Manz *et al.* (1999) e Wimpenny *et al.* (2000). O meio contendo cloranfenicol induziu ao crescimento de maior diversidade de populações metanogênicas, provavelmente por reduzir a competição com populações bacterianas (Figura 4.8). A visualização em MEV confirmou a presença da morfologia observada em microscopia óptica, similar

à espécie *Methanobrevibacter* sp. (Figuras 4.9a e 4.9b).

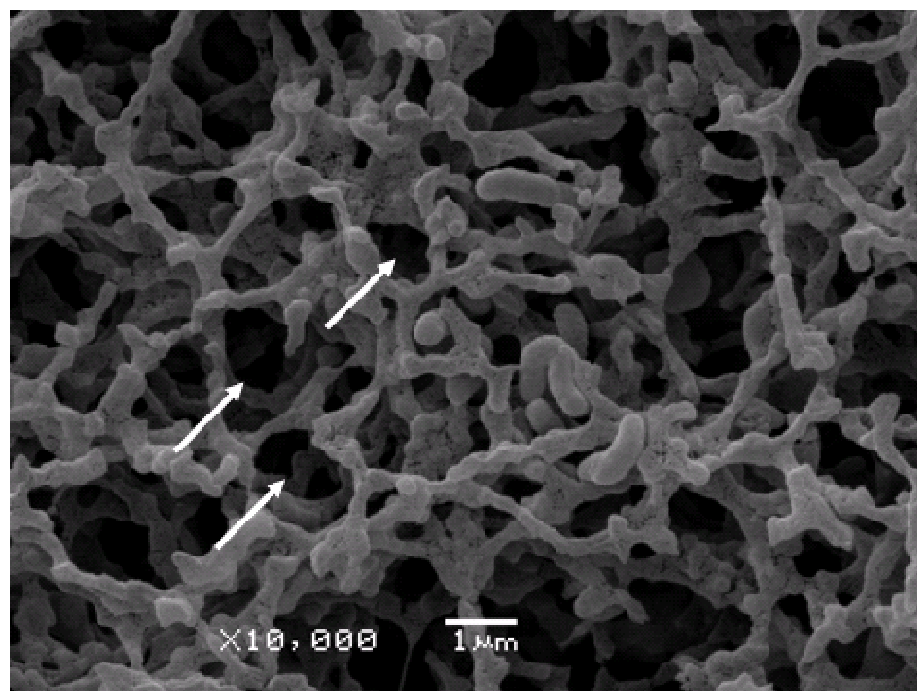


FIGURA 4.7 - CANAIS DE CIRCULAÇÃO EM MEIO MB-FREE (SETAS)

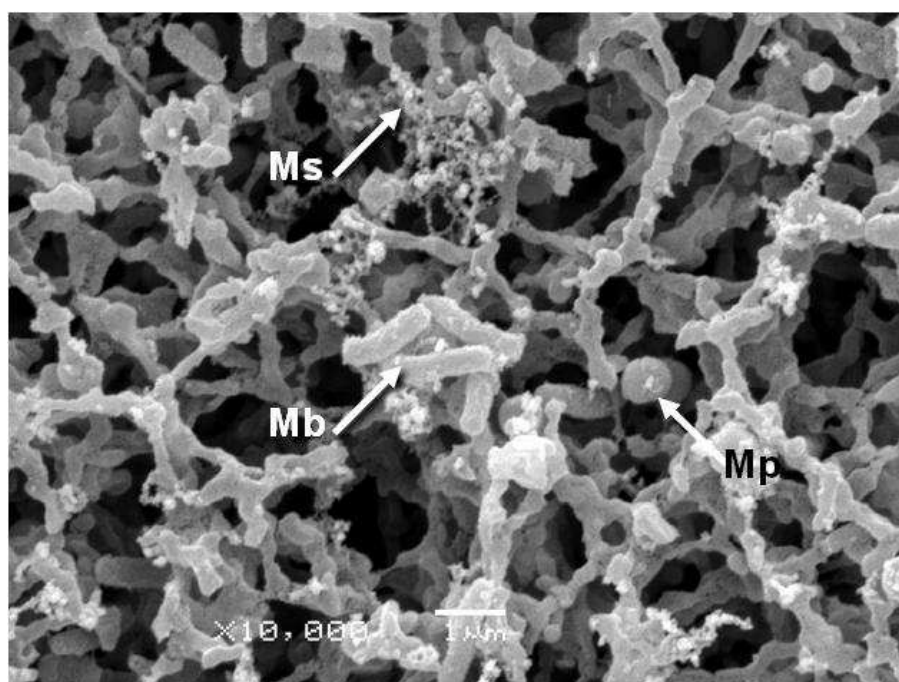


FIGURA 4.8 - MEIO MB-CLO. MS- SIMILAR A *METHANOSARCINA* SP.; MB- SIMILAR A *METHANOBREVIBACTER* SP.; MP- SIMILAR A *METHANOSPHAERA* SP.

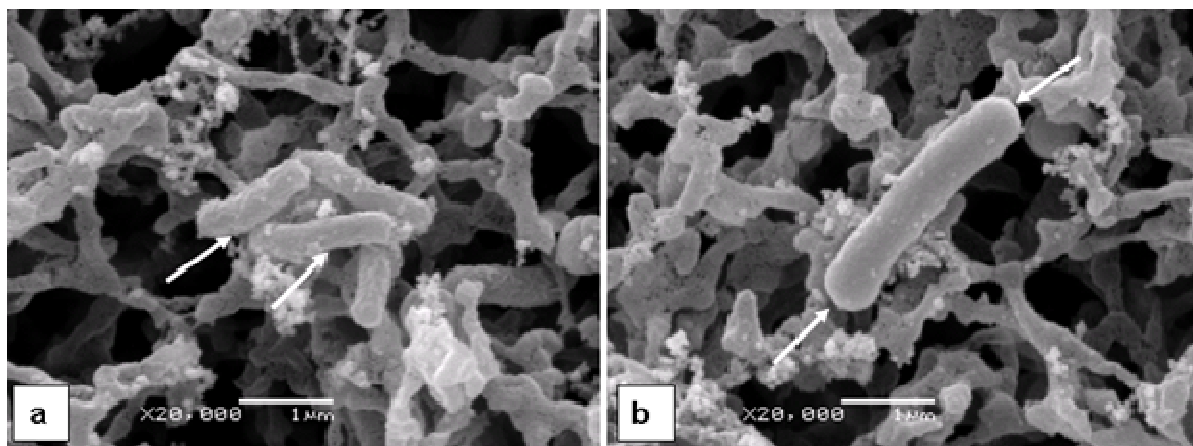


FIGURA 4.9 – (a) MICRORGANISMOS SIMILARES A *METHANOBREVIBACTER* SP. (SETAS); b) PONTAS AFUNILADAS (“TAPERED ENDS”), CARACTERÍSTICA DE *METHANOBREVIBACTER* SP. (SETAS)

Para o meio contendo bacitracina, antibiótico inibidor da síntese protéica de *Methanobrevibacter* sp., o biofilme observado foi menos denso e formado por canais mais largos (Figura 4.10). Este resultado reforça a hipótese de que a ordem Methanobacteriales, representada pelas espécies *Methanobrevibacter* spp., compreende os metanogênicos hidrogenotróficos mais bem adaptados ao meio de lixiviado bruto de aterro sanitário.

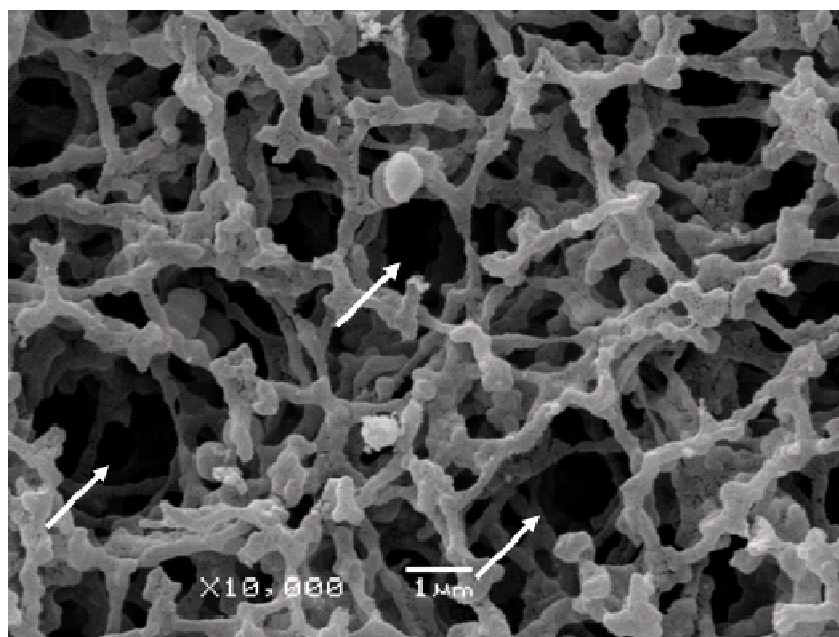


FIGURA 4.10 - CANAIS DE CIRCULAÇÃO EM MEIO MB-BACI (SETAS). BARRA = 1μm

Para o meio contendo penicilina, antibiótico inibidor das espécies acetogênicas (OHPA) e algumas espécies acidogênicas, o biofilme formado apresentou menor biodiversidade que o meio MB-clo, prevalecendo microrganismos similares a *Methanosphaera* sp. (Figura 4.11). Este resultado pode indicar a inibição indireta das populações metanogênicas associada à inibição das populações acetogênicas produtoras de hidrogênio e acidogênicas no consórcio microbiano.

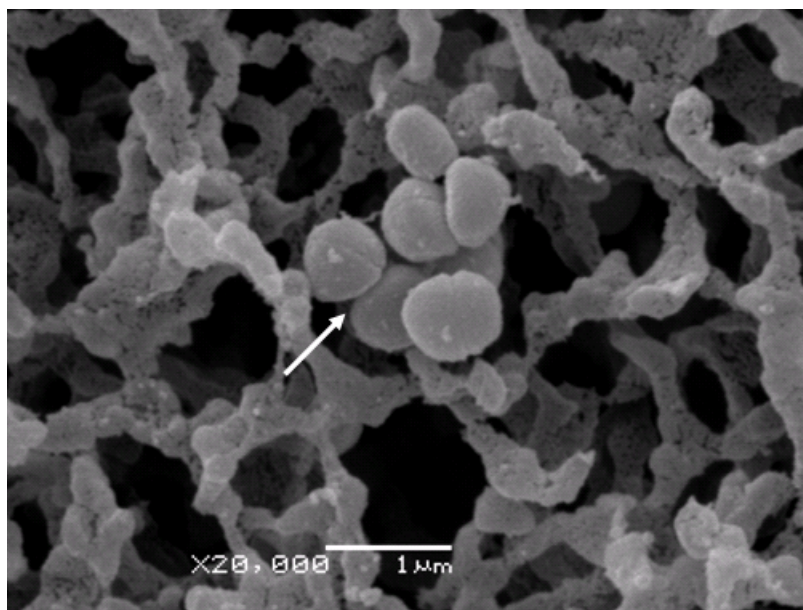


FIGURA 4.11 - MEIO MB-PEN. SETA- MICRORGANISMOS SIMILARES À *METHANOSPHAERA* SP.

Os microrganismos presentes no meio MB-cloranfenicol foram submetidos à extração e amplificação do material genético. Os resultados obtidos serão discutidos e comparados com àqueles obtidos para amostras de lodo anaeróbio (seção 4.4.2.2).

4.4 OPERAÇÃO DOS REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS

Os microrganismos cultivados em meio MB-cloranfenicol foram utilizados como inóculo no reator Teste, conforme metodologia descrita na seção 3.4.2.1. A maior diversidade de metanogênicos observada neste meio foi um fator importante na escolha desta fonte de microrganismos para produção do inóculo.

A temperatura dos reatores Controle e Teste, durante todo o experimento, não foi controlada, somente monitorada. Desta forma, pretendeu-se avaliar a adaptação

da microbiota presente no biofilme, em um ambiente com possíveis perturbações ambientais.

4.4.1 Monitoramento do efluente dos reatores - Fase I

O período compreendido pelos primeiros trinta dias de operação dos reatores foi denominado de Fase I para diferenciar esta etapa de monitoramento daquela posterior, em que houve a adição do macronutriente fósforo no lixiviado.

Durante estes trinta dias de operação, foram coletadas 20 amostras, cada uma ao final do tempo de ciclo em cada reator. A Tabela 4.1 apresenta os valores médios obtidos para cada variável analisada durante este período e também a eficiência na remoção da variável em relação ao afluente, ou seja, o lixiviado bruto do Aterro Sanitário Municipal de Curitiba. Algumas variáveis apresentaram aumento durante a operação e sua taxa de remoção foi expressa em valores negativos.

Os valores de pH observados durante a operação dos reatores restringiram-se à faixa 8 a 9, confirmando a elevada capacidade de tamponamento do lixiviado de aterro sanitário. Não houve diferença estatisticamente significativa para esta variável entre os reatores RC e RT (teste U de Mann-Whitney, $p= 0,462$). A Figura 4.12 apresenta a variação do pH durante o monitoramento do efluente dos reatores Controle e Teste ao longo dos 30 dias de operação.

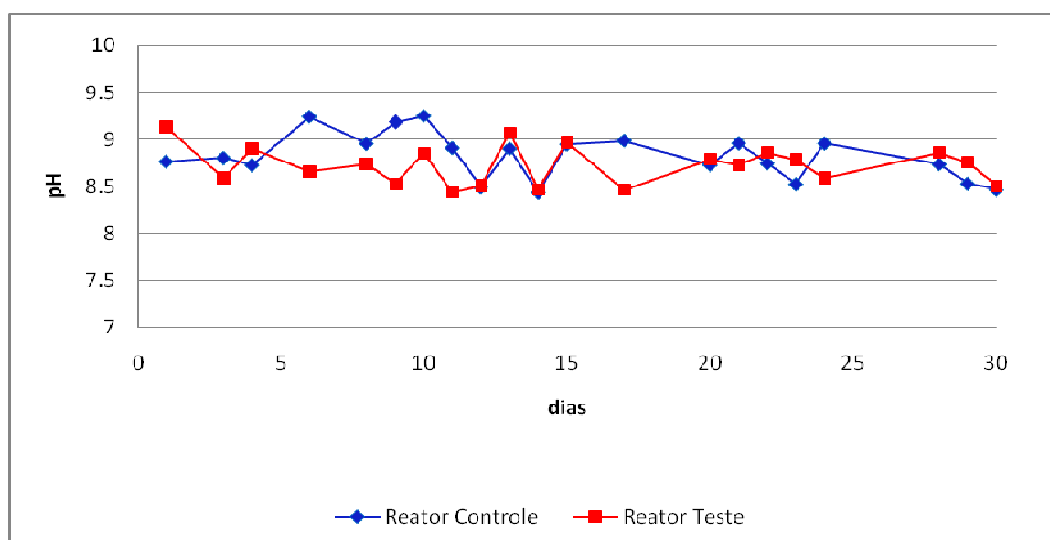


FIGURA 4.12 – VARIAÇÃO TEMPORAL DO PH PARA OS REATORES CONTROLE E TESTE

TABELA 4.3 – RESULTADOS DAS VARIÁVEIS MONITORADAS PARA AMOSTRAS DO EFLUENTE DOS REATORES
CONTROLE E TESTE

Variável	N	Valor médio* RC	Valor médio* RT	Máximo RC	Máximo RT	Mínimo RC	Mínimo RT	Remoção média RC**	Remoção média RT**
pH	27	8,8 (0,2)	8,7 (0,2)	9,2	9	8,4	8	-	-
Temperatura	27	23,4 (2,8)	23,5 (2,8)	28,2	28,1	17,3	17,5	-	-
DQO	21	5.498 (1369)	3.789 (1254)	8.333	6.547	3.373	1.587	41 (14)	60 (13)
COD	20	680 (116)	572 (89)	892	739	437	372	70 (5)	75 (4)
N-NH3	21	1.763 (683)	1.738 (655)	3.051	2.695	700	758	20 (31)	21 (30)
Alcalinidade Total	20	2.380 (589)	2.632 (483)	3.626	3.524	1.152	1.732	-	-
Alcalinidade como bicarbonato	20	2.168 (588)	2.413 (475)	3.469	3.241	1.055	1.625	-	-
Alcalinidade como ácidos voláteis	20	140 (46)	174 (69)	230	300	77	73	-	-
SST	20	1.800 (1422)	825 (384)	4.750	1.560	429	180	318 (330)	92 (89)
SSV	20	1.041 (721)	450 (294)	2.900	1.336	293	90	196 (204)	28 (83)
SSF	20	790 (811)	344 (1.027)	3.200	680	136	70	900 (1027)	336 (234)
SDT	20	10.403 (3.270)	10.298 (3.463)	16.800	16.930	4.550	5.400	17 (26)	18 (28)
SDV	20	3.495 (1161)	3.328(1.214)	5.610	5.600	1.600	1.070	4 (34)	1 (36)
SDF	20	6.813 (2.674)	6.953 (2.511)	11.500	11.300	2.150	3.350	25 (29)	24 (27)

Notas: N- número de amostras; RC- Reator Controle, RT- Reator Teste; SST- Sólidos Suspensos Totais; SSV- Sólidos Suspensos Voláteis; SSF- Sólidos Suspensos Fixos; SDT- Sólidos Dissolvidos Totais; SDV - Sólidos Dissolvidos Voláteis; SDF- Sólidos Dissolvidos Fixos

* valores em mg. L⁻¹, exceto pH e temperatura (°C); ** remoção (%) para as variáveis DQO, COD, N-NH3 e conjunto de sólidos; valores negativos em destaque (vermelho)

De acordo com Ross e Louw (1987), quanto maior a alcalinidade do meio, mais tamponado ele se encontra e o sistema deve estar apto para controlar possíveis variações de pH devido a produção ácida (alta relação alcalinidade total/acidez volátil).

A formação de sais de ácidos voláteis, principalmente acetato, pode elevar a alcalinidade total e ficou definida como alcalinidade dos ácidos voláteis. O acetato é a maior fonte de alcalinidade dos ácidos voláteis e é o ácido orgânico volátil em maior quantidade nas amostras de lixiviado, segundo Tajarudin (2006). Desta forma, as variáveis alcalinidade dos ácidos voláteis e acidez volátil foram consideradas iguais para este tipo de resíduo. A Figura 4.13 apresenta a variação da relação alcalinidade total/ acidez volátil, no decorrer dos dias monitorados, para os reatores Controle e Teste.

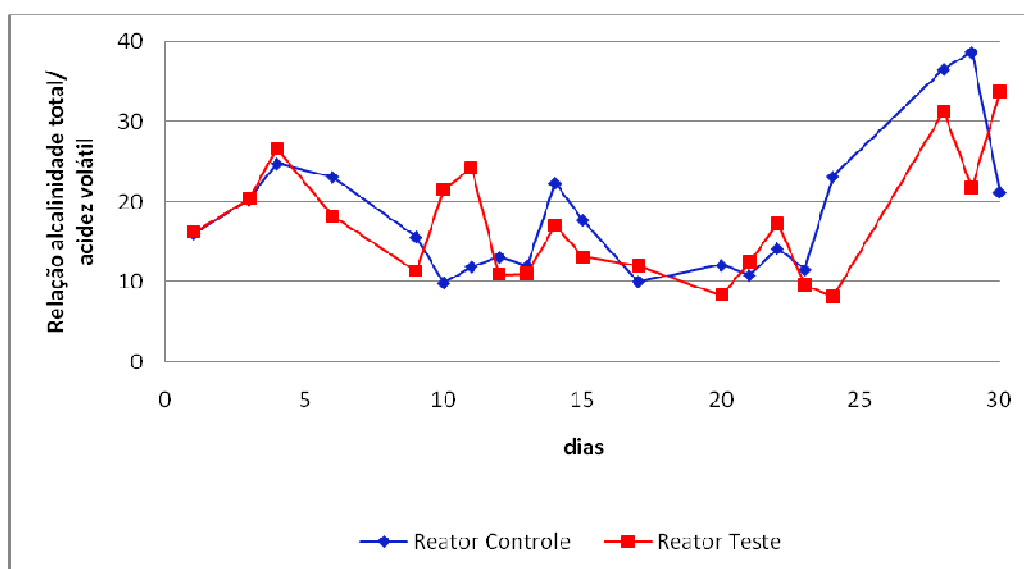


FIGURA 4.13 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA RELAÇÃO ALCALINIDADE TOTAL E ACIDEZ VOLÁTIL PARA OS REATORES CONTROLE (RC) E TESTE (RT)

Em geral, ambos os sistemas apresentaram valores de relação alcalinidade total/ acidez volátil acima de 10, mantendo-se com valores superiores a 20 após o 25º dia de operação. Estes resultados indicam que os reatores permaneceram estáveis, ou seja, não sofreram queda considerável de pH devido à produção ácida, ao se utilizar lixiviado de aterro sanitário como substrato.

A variação da concentração de ácidos voláteis no meio (Figura 4.14) não representou risco de colapso para os reatores, pois o aumento da produção de ácidos foi seguido pelo aumento da alcalinidade como bicarbonato, mantendo os sistemas em equilíbrio. Pôde-se notar, também, que o RT apresentou maior concentração de ácidos voláteis em relação ao RC durante todo o período. A Figura 4.15 (a-b) apresenta a variação da alcalinidade, como total, bicarbonato e ácido volátil, para os reatores Controle e Teste.

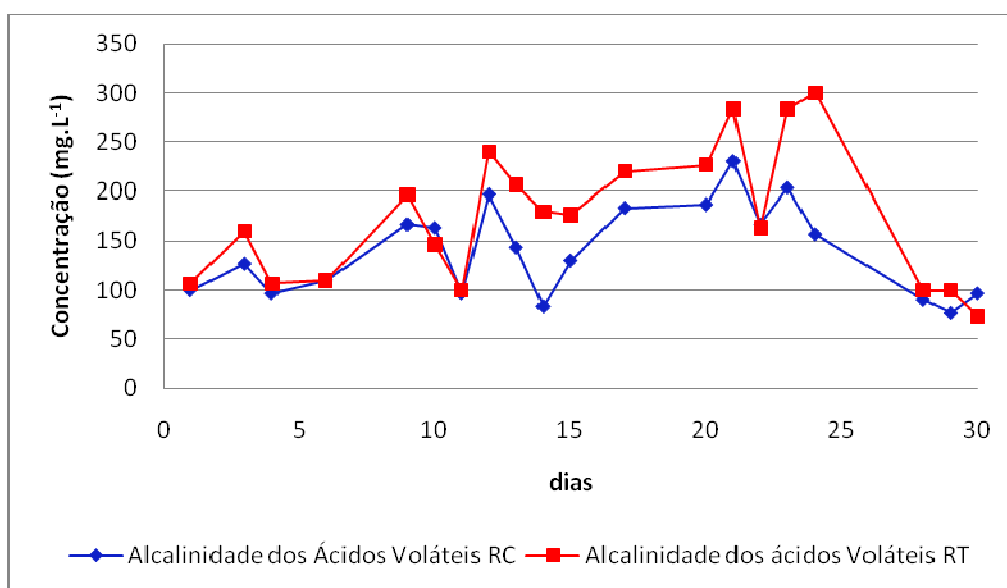


FIGURA 4.14 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS VOLÁTEIS NOS REATORES CONTROLE (RC) E TESTE (RT)

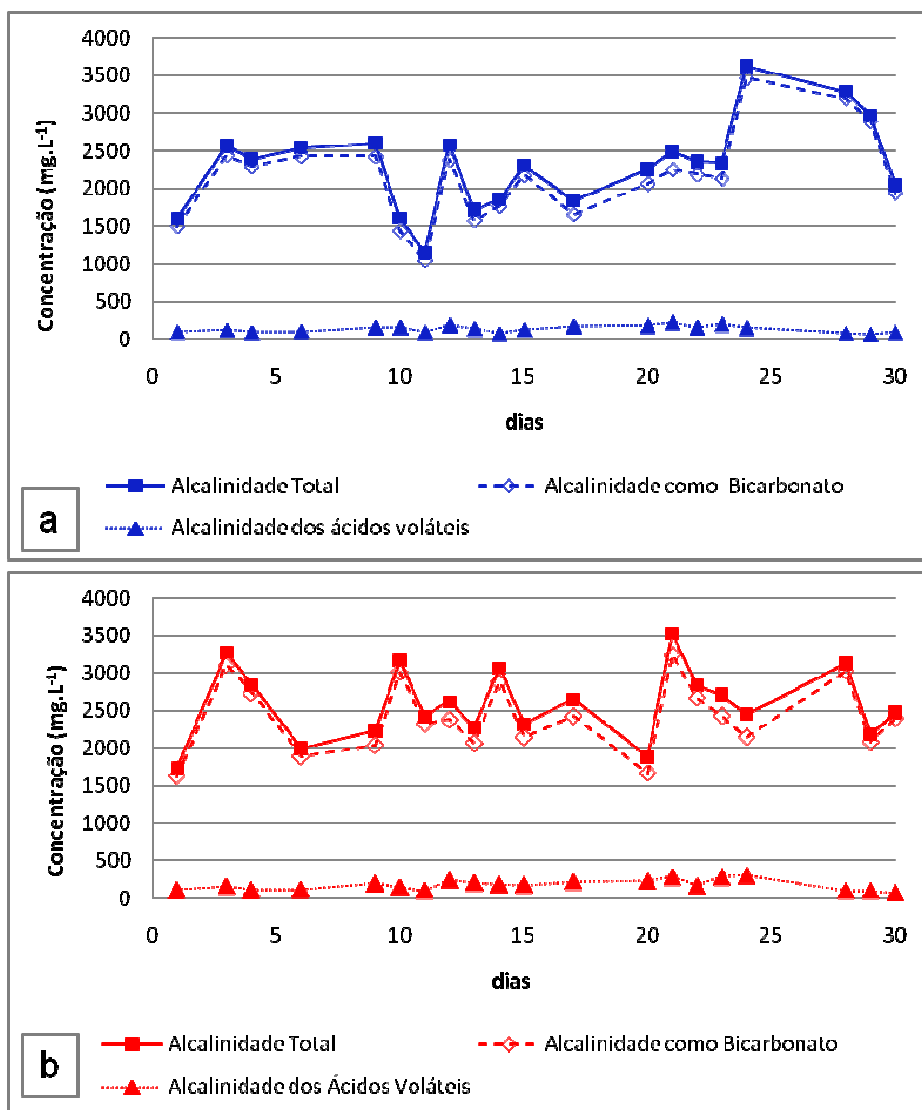


FIGURA 4.15 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA ALCALINIDADE NOS REATORES: a) REATOR CONTROLE, b) REATOR TESTE

A temperatura observada nos reatores variou de acordo com a temperatura ambiente e os valores observados encontraram-se entre 17°C e 28°C, sendo 23°C o valor médio, para ambos os reatores. A Figura 4.16 apresenta a variação gráfica da temperatura ao longo do período monitorado.

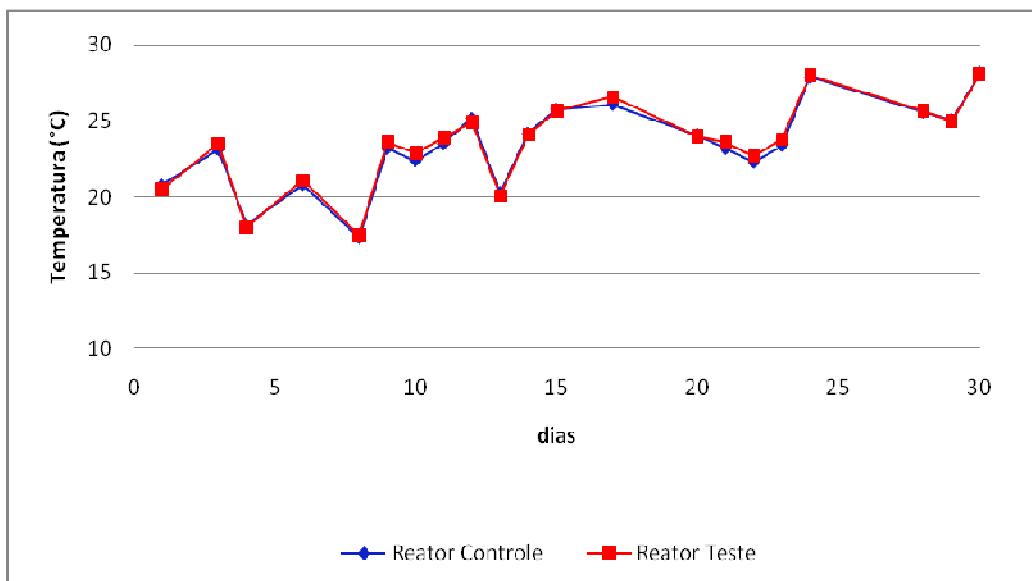


FIGURA 4.16 – VARIAÇÃO TEMPORAL DA TEMPERATURA PARA OS REATORES CONTROLE E TESTE

A Figura 4.17 apresenta as taxas de remoção de DQO para os reatores Controle e Teste.

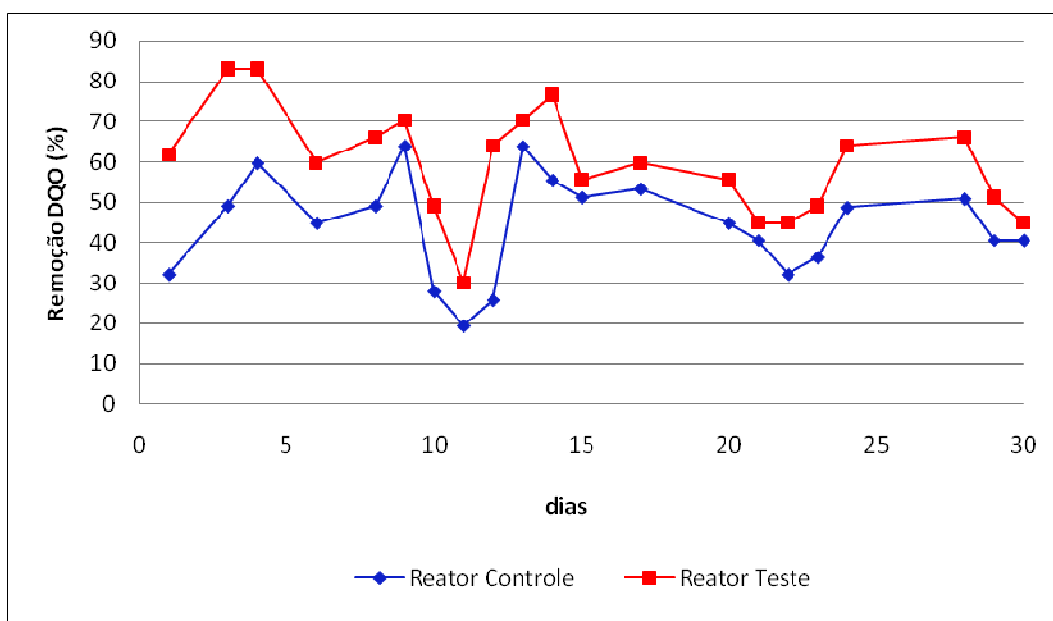


FIGURA 4.17 – REMOÇÃO DA DQO DO LIXIVIADO DURANTE A OPERAÇÃO DOS REATORES CONTROLE E TESTE

As baixas temperaturas observadas na primeira semana de operação como, por exemplo, 18°C, podem ter induzido à queda na remoção da DQO entre os dias 9 e 11. Entretanto, a recuperação do sistema foi rápida, atingindo valores de 64% (RC)

e 70% (RT) de remoção da DQO, apenas dois dias após a perturbação no sistema. De acordo com Dague e colaboradores (1992), reatores em batelada parecem apresentar um “efeito de compensação”, em que as baixas temperaturas que conduzem a redução da conversão do substrato, são rapidamente compensadas pelo aumento do número de microrganismos.

Em relação à eficiência na remoção da DQO, sob as condições fornecidas neste estudo, houve diferença significativa entre os reatores Controle e Teste (teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$). O reator Teste apresentou as maiores taxas de remoção da matéria orgânica do lixiviado como DQO, confirmando o aumento da atividade microbiológica no biofilme do reator inoculado com os microrganismos cultivados.

Os resultados obtidos para o carbono orgânico dissolvido (COD) foram coerentes com aqueles observados para a DQO (Figura 4.18). A média de remoção para o carbono dissolvido foi de 70% para o reator Controle e 75% para o reator Teste. Este, por sua vez, apresentou-se mais estável em relação a esta variável, não apresentando variações bruscas na concentração de carbono orgânico dissolvido no meio. A análise estatística confirmou a diferença como significativa entre os dois reatores para esta variável (teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

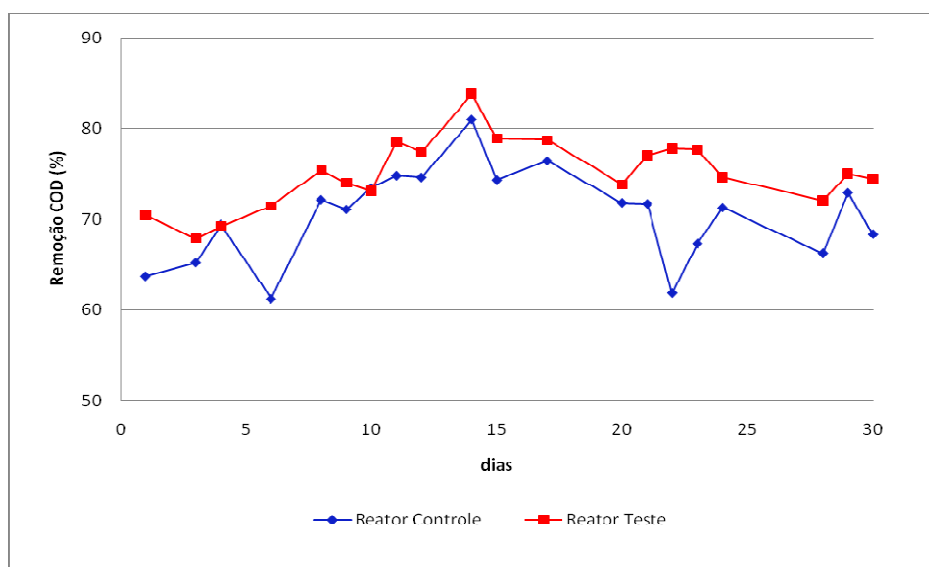


FIGURA 4.18 – REMOÇÃO DO COD DO LIXIVIADO DURANTE A OPERAÇÃO DOS REATORES CONTROLE E TESTE

A persistência do nitrogênio na forma amoniacal foi observada em ambos os reatores, de acordo com o esperado para lixiviado de aterro sanitário e descrito por

Ehrig (1983), Gallert e colaboradores (1998), Jarrel e Saunier (1988), Krumpelbeck e Ehrig (1999) e Vigneron e colaboradores (2005 e 2007). A Figura 4.19 apresenta a variação da taxa de remoção do nitrogênio amoniacal, em ambos os reatores, durante os 30 dias de monitoramento.

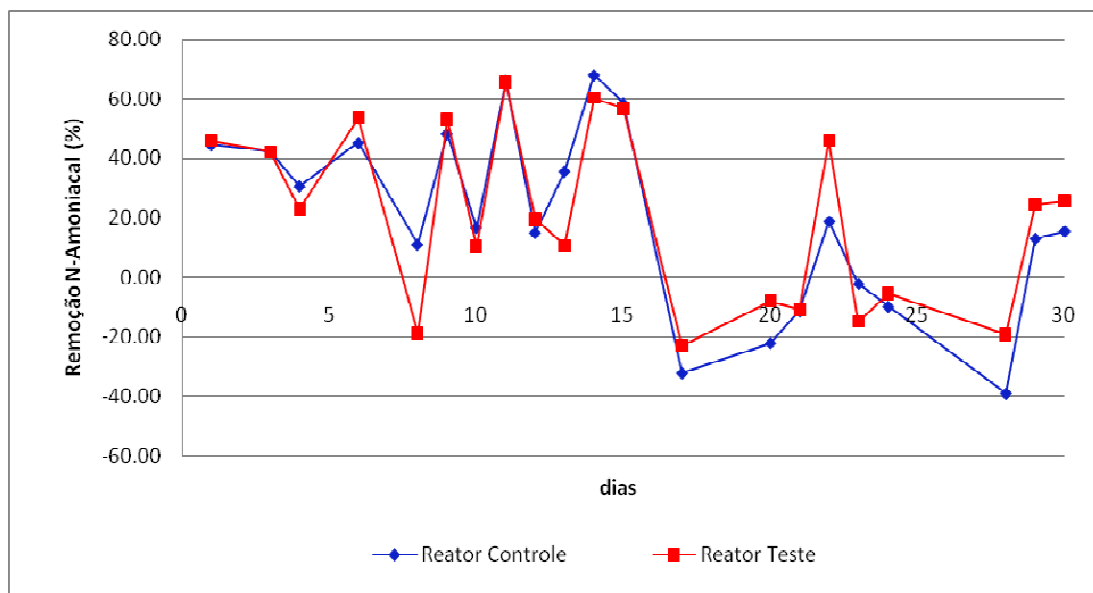


FIGURA 4.19 – REMOÇÃO DO NITROGÊNIO AMONIAICAL DO LIXIVIADO DURANTE A OPERAÇÃO DOS REATORES CONTROLE E TESTE

A variação de amônia no meio parece estar associada à atividade dos microrganismos do consórcio microbiano, principalmente em relação aos metanogênicos, conforme descrito por Sawayama e colaboradores (2004). Períodos de remoção da amônia podem estar vinculados ao consumo deste macronutriente por alguns grupos de microrganismos, entre eles os metanogênicos acetoclásticos e hidrogenotróficos.

Durante a operação dos reatores, períodos de remoção do nitrogênio amoniacal eram seguidos pelo aumento da quantidade deste macronutriente, formando ciclos contínuos. De acordo com os resultados gráficos apresentados na Figura 4.19, após a remoção da amônia no meio em até 60%, alguma via é induzida a aumentar, novamente, a concentração deste composto. Uma das vias de conversão final de substrato que pode gerar amônia como subproduto é a metilotrófica, conforme descrito por Vich (2010). Esta via utiliza metilaminas para a geração de metano e é conduzidas por algumas espécies do gênero *Methanosarcina* e pela espécie *Methanosphaera* sp., conforme descrito por Fricke e colaboradores (2006).

Durante o teste do substrato (seção 4.3.1) foram observadas grandes quantidades de microrganismos similares à *Methanosarcina* spp. e *Methanosphaera* sp. nos meios de cultivo em que foi adicionado metanol. A presença destes microrganismos, originados a partir do próprio lixiviado, indica o potencial deste resíduo em ser utilizado como substrato na via metilotrófica. Para ativar esta via são necessárias baixas concentrações do produto gerado pelos microrganismos metilotróficos, ou seja, amônia e metano. Se as vias acetogênica e hidrogenotrófica forem limitadas de alguma forma, como por exemplo, pela redução dos ácidos orgânicos voláteis no meio, a via metilotrófica é ativada e deverá produzir metano, e amônia como subproduto.

Uma forma de avaliar se houve limitação dos substratos para a metanogênese pelas vias metanogênicas e hidrogenotróficas é pela variação da concentração de sólidos dissolvidos voláteis presente no meio. Baixas concentrações ($<1 \text{ mg.L}^{-1}$) são indicativas do esgotamento temporário de potenciais fontes para a acetogênese e metanogênese, como os ácidos propiônico, butírico e acético. O consumo e a redução destes ácidos no meio também levam à redução de acetato e H_2 produzido pelas acetogênicas.

Os resultados obtidos para o conjunto de sólidos dissolvidos dos reatores Controle e Teste podem ser observados na Figura 4.20a-b. A concentração dos sólidos dissolvidos voláteis no meio foi reduzida pouco antes dos períodos de queda na remoção do nitrogênio amoniacal nos reatores, o que pode ter ativado a terceira via da metanogênese, a via metilotrófica. Estes resultados indicam a provável influência dos microrganismos metanogênicos metilotróficos na manutenção da amônia na digestão anaeróbia do lixiviado de aterro sanitário.

Apesar da produção da amônia no meio interferir com a remoção deste composto pelo processo da digestão anaeróbia, foram obtidas, em média, remoções de 20% e 21% para os reatores Controle e Teste, respectivamente. A análise estatística, entretanto, descarta a existência de diferença significativa entre os dois reatores (teste U de Mann-Whitney, $p=0,910$).

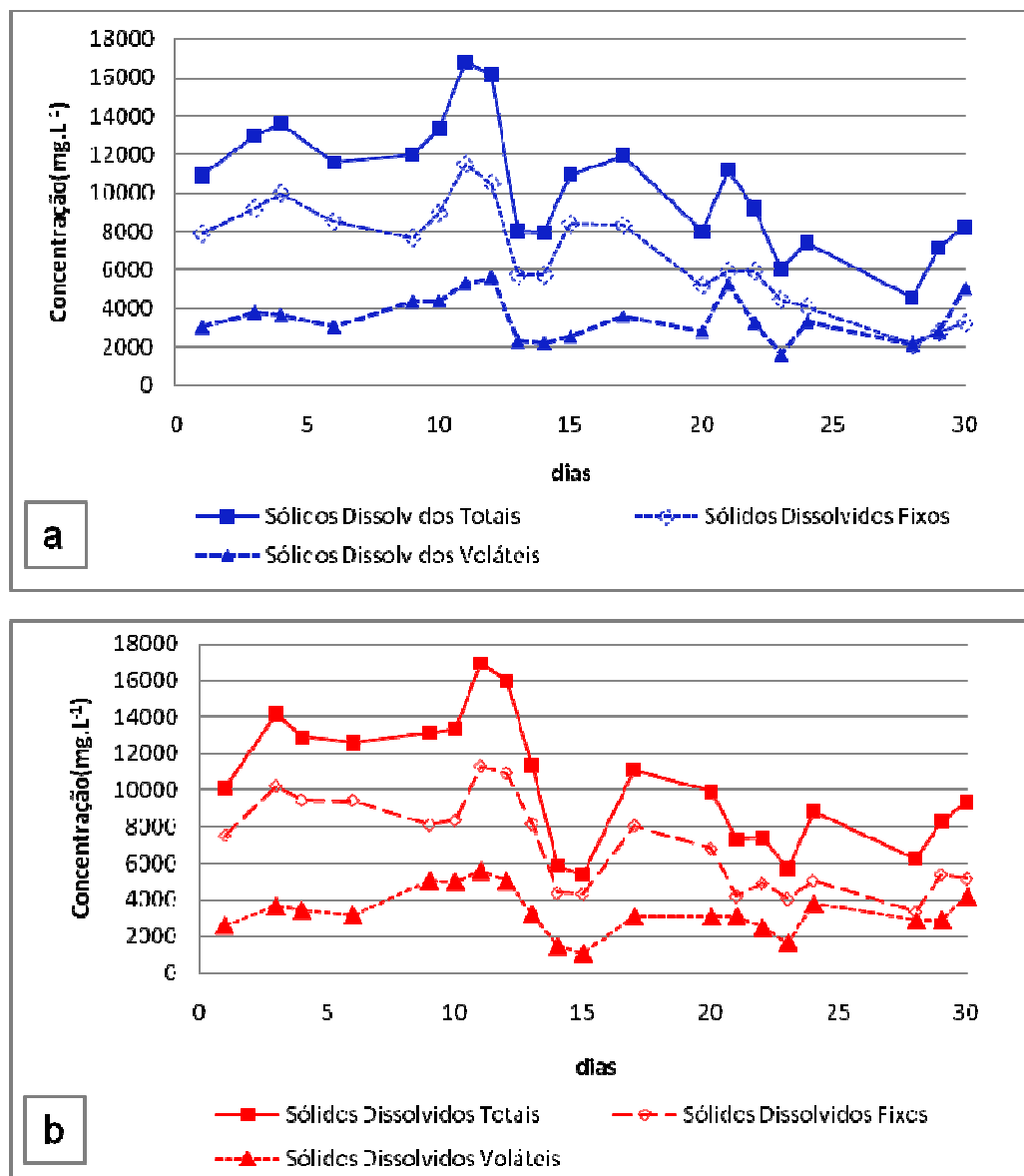


FIGURA 4.20 – VARIAÇÃO TEMPORAL DO CONJUNTO DE SÓLIDOS DISSOLVIDOS: (a) REATOR CONTROLE, (b) REATOR TESTE

Em relação ao conjunto de sólidos dissolvidos, houve redução dos sólidos dissolvidos fixos, com taxa de remoção de 25% e 24%, para RC e RT, respectivamente. Os sólidos dissolvidos voláteis apresentaram ora redução, ora aumento na sua concentração no meio, de acordo com o consumo e geração de compostos orgânicos nos reatores. Para os sólidos dissolvidos totais, a remoção atingiu os valores de 27% e 18%, para RC e RT, respectivamente. Os resultados não apresentaram diferença estatística para os dois reatores (teste U de Mann-Whitney, $p=0,965$).

Os resultados obtidos com os sólidos suspensos indicam aumento nas

concentrações deste conjunto de sólidos ao longo do tempo, para ambos os reatores (Figura 4.21 a-b).

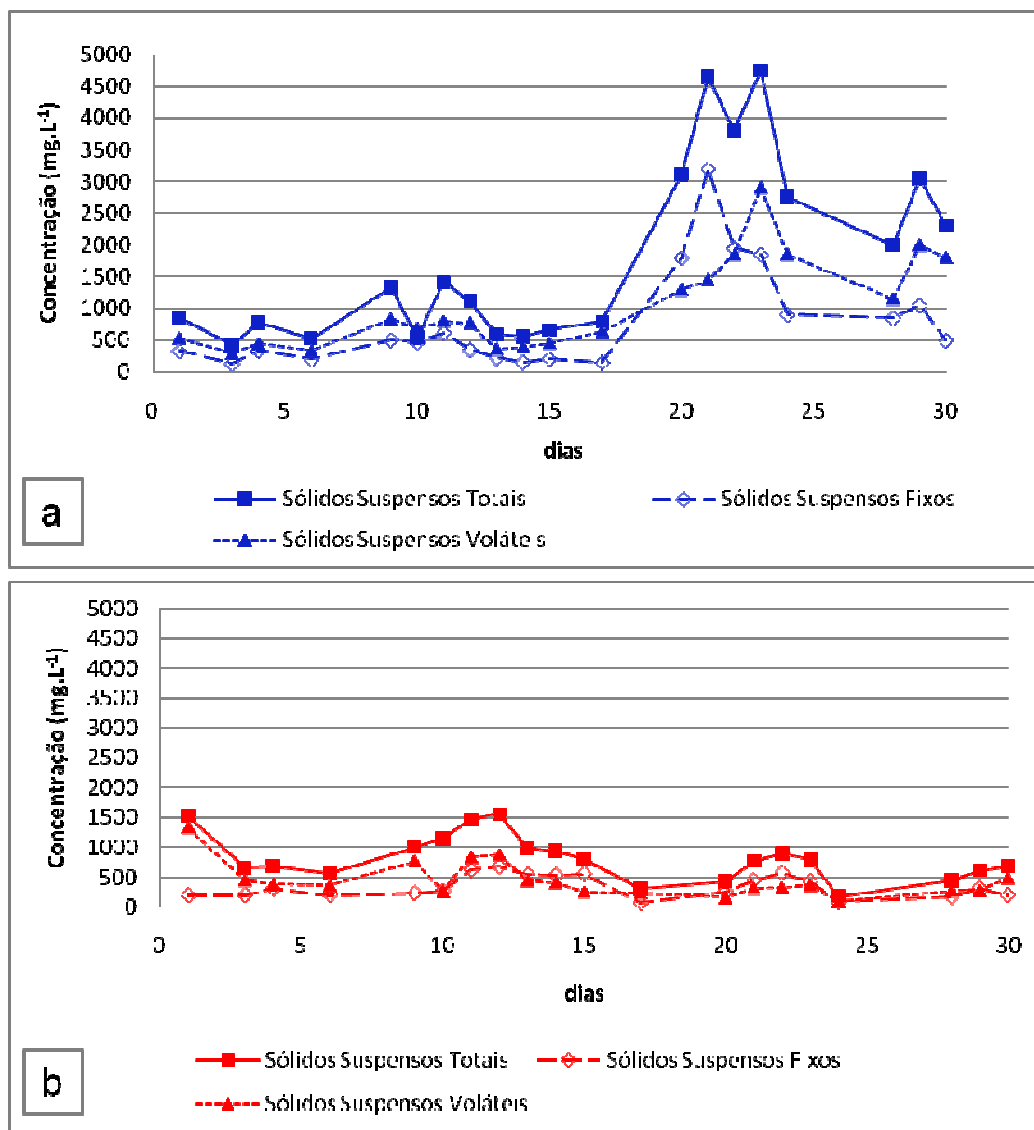


FIGURA 4.21 – VARIAÇÃO TEMPORAL DO CONJUNTO DE SÓLIDOS SUSPENSOS NO AFLUENTE: (A) REATOR CONTROLE, (B) REATOR TESTE

Para sólidos totais suspensos voláteis, a concentração presente no efluente foi maior no reator Controle; uma possível explicação é o aumento da capacidade do biofilme no reator Teste em agregar partículas (maior produção de EPS), o que reduz a quantidade de partículas floculadas, conforme já descrito por Fang e colaboradores (2000), Tolker-Nielsen e colaboradores (2000) e Fernández e colaboradores (2008).

Os sólidos suspensos fixos também sofreram menor redução no reator Controle. A geração de biogás no interior do reator pode ter gerado revolvimento dos sólidos suspensos fixos e o conseqüente aumento da sua concentração no efluente. Isto porque, a liberação do biogás era realizada apenas uma vez em ambos os reatores, imediatamente antes à etapa de alimentação. O arraste de sólidos no descarte de sistemas anaeróbios em bateladas sequenciais é um dos principais problemas para este tipo de sistema e já foi descrito por Contrera (2008). A diferença entre os reatores para esta variável (SSF) pode ser atribuída à maior estabilidade do reator Teste frente às perturbações do sistema, com biofilmes mais estáveis e bem aderidos a suportes sólidos originados a partir dos sólidos suspensos fixos.

A análise estatística realizada para o conjunto de sólidos voláteis conferiu diferença significativa para a resposta dos reatores Controle e Teste (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Este resultado pode ser atribuído ao bom desempenho dos microrganismos inoculados no reator Teste em estabelecer ou acelerar a formação de um biofilme resistente e estável.

4.4.2 Monitoramento do lodo anaeróbio

4.4.2.1 Conjunto de sólidos totais

Os valores obtidos para o conjunto de sólidos totais (fixos e voláteis) encontram-se na Tabela 4.4. Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores expressam a média obtida.

A concentração de sólidos totais foi inferior àquela do lodo bruto adicionado nos reatores. Isto, provavelmente, devido à sedimentação dos sólidos do lodo no interior dos sistemas e a permanência de um lodo mais clarificado na altura do amostrador de lodo dos reatores.

As amostras de lodo coletadas após 1, 20, 40 e 60 dias de operação, em ambos os reatores, apresentaram aumento na concentração de sólidos, com exceção do 60º dia de operação no reator Controle. A queda na concentração desta amostra pode estar associada à menor estabilidade observada, ao longo do tempo de operação, no biofilme do reator Controle; a maturação e a estabilidade observadas nos biofilmes dos reatores RC e RT são discutidas na próxima seção (4.4.2.2).

TABELA 4.4 – CONJUNTO DE SÓLIDOS TOTAIS (FIXOS E VOLÁTEIS) (g.L⁻¹) PARA OS REATORES RC E RT APÓS 1, 20, 40 E 60 DIAS DE OPERAÇÃO

Dias	Conjunto de sólidos totais*					
	RC			RT		
	STT	STV	STF	STT	STV	STF
1	28,6 (1,7)	10,8 (0,3)	17,8 (0,8)	34,4(0,3)	9,5 (0,5)	24,9 (0,8)
20	58,1 (0,9)	14,3 (0,6)	43,7 (1,3)	77,3(0,7)	16,1 (1,1)	61,2 (2,1)
40	85,7 (0,6)	18,7 (0,7)	67 (1,6)	110,7 (1,8)	19,3 (0,4)	91,4(1,4)
60	37,9 (1,2)	8,5 (0,5)	29,4 (1,1)	115,3(1,3)	20,1 (0,6)	95,2(1,1)

Notas: RC- Reator Controle, RT- Reator Teste; STT- Sólidos Totais Totais; STV- Sólidos Totais Voláteis; SSF- Sólidos Totais Fixos

* valores em g. L⁻¹

Comparando os valores da Tabela 4.4 para os reatores RC e RT foi possível observar que o reator Teste apresentou maior quantidade de sólidos durante todo o período monitorado. Esta diferença foi definida como estatisticamente significativa (teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

4.4.2.2 Biofilme anaeróbico

A visualização de grânulos do lodo coletado dos reatores permitiu acompanhar o desenvolvimento e maturação do biofilme anaeróbico. A evolução do biofilme na superfície do lodo coletado foi observada após os tempos de 1 e 20 dias (Figura 4.22 a-d) e 40 e 60 dias (Figura 4.23 a-d).

As micrografias obtidas em MEV permitiram identificar duas fases no desenvolvimento do biofilme anaeróbico: 1) crescimento do biofilme, com secreção abundante de polímero extracelular (EPS) e 2) maturação do biofilme e compactação da sua superfície. Estas fases foram similares ao que já havia sido observado por Fernández (2008).

A primeira fase de desenvolvimento dos biofilmes foi observada nos períodos monitorados de 1 e 20 dias de operação dos reatores. Após o 1º dia de operação em batelada, os lodos coletados dos reatores RC e RT já apresentaram algumas diferenças morfológicas. O biofilme formado no lodo RC apresentou regiões em sua superfície com crescimento microbiano escasso e baixa diversidade de microrganismos (Figura 4.22 a). O lodo do reator RT, ao contrário, apresentou maior diversidade de espécies, principalmente agrupamento de cocos, e início da secreção

de EPS na superfície do grânulo (Figura 4.22 b).

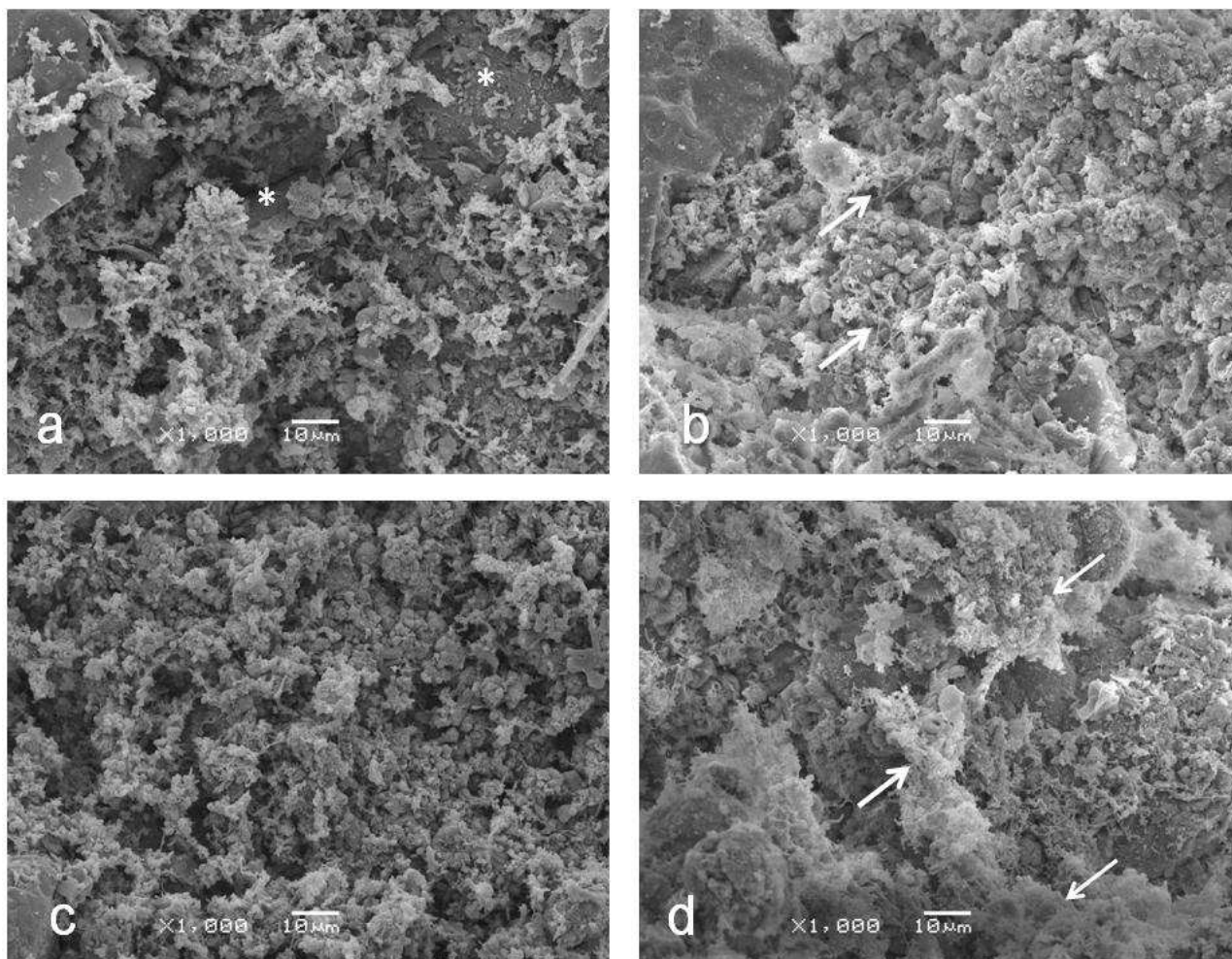


FIGURA 4.22 – BIOFILME ANAERÓBIO SOBRE A SUPERFÍCIE DOS GRÂNULOS DO LODO COLETADO. a) RC, 1º DIA DE OPERAÇÃO.; b) RT, 1º DIA DE OPERAÇÃO.; c) RC, 20º DIA DE OPERAÇÃO.; d) RT, 20º DIA DE OPERAÇÃO

Nota: (*) Indica espaço pouco colonizado pelos microrganismos sobre a superfície do grânulo; setas indicam polímero extracelular (EPS)

Após 20 dias, os biofilmes anaeróbios de ambos os reatores apresentaram-se mais uniformes e consistentes (Figura 4.22 c-d). Nesta fase destacou-se a secreção abundante de EPS, principalmente no lodo RT (Figura 4.22 d).

O período de maturação do biofilme teve início a partir do 40º dia de operação. Nesta fase, os lodos coletados nos reatores RC e RT apresentaram várias diferenças, principalmente em relação à compactação da sua superfície. No reator RC foi observado o crescimento desconexo do biofilme, com regiões mais

desenvolvidas que outras, formando “vales” entre as regiões de crescimento (Figura 4.23 a). Para o lodo do reator RT, o crescimento foi mais compacto e destacou-se a presença de inúmeros agregados de microrganismos similares a *Methanosarcina* sp (Figura 4.23 b).

Com 60 dias de operação, as diferenças nos biofilmes foram bastante perceptíveis. Enquanto o biofilme do reator RT apresentou-se fragmentado, com aspecto “quebrado” (Figura 4.23c), o reator RC atingiu uma compactação homogênea, com estruturas singulares na sua superfície (Figura 4.23d). Estas estruturas assemelharam-se a poros ou microcanais e sua presença na superfície compactada pode estar vinculada ao transporte de nutrientes e excreção de metabólitos.

As espécies de microrganismos que constituíram a microbiota anaeróbia dos reatores foram mais bem visualizadas durante os primeiros dias de atividade dos reatores ou fase de crescimento. A Figura 4.24a-b apresenta as espécies observadas logo após o 1º dia de operação dos sistemas.

A presença de metanogênicos similares a *Methanosarcina* sp. foi observada no lodo do reator RC (Figura 4.24a). Esta espécie é bastante versátil e pioneira nos processos de digestão anaeróbia e, de acordo com Zinder e colaboradores (1984) sua presença geralmente está associada à fase metanogênica inicial.

Na superfície do lodo coletado no reator RT, após o 1º dia de operação, foram encontrados vários microrganismos similares a *Methanosaeta* sp (Figura 4.24b). Ao contrário do que foi observado no reator RC, e também de acordo com Zinder e colaboradores (1984) *Methanosaeta* sp. é espécie sucessional e deve estar presente apenas nas fases mais avançadas da digestão anaeróbia. Além disso, estes microrganismos ocupam as camadas mais internas do biofilme e não a sua superfície, já descrito por MacLeod (1990). Desta forma, acredita-se que esta espécie tenha sido adicionada durante a inoculação do reator Teste e, mesmo com pouco tempo de operação, esta e outras espécies foram capazes de aderir adequadamente ao biofilme incipiente no reator inoculado.

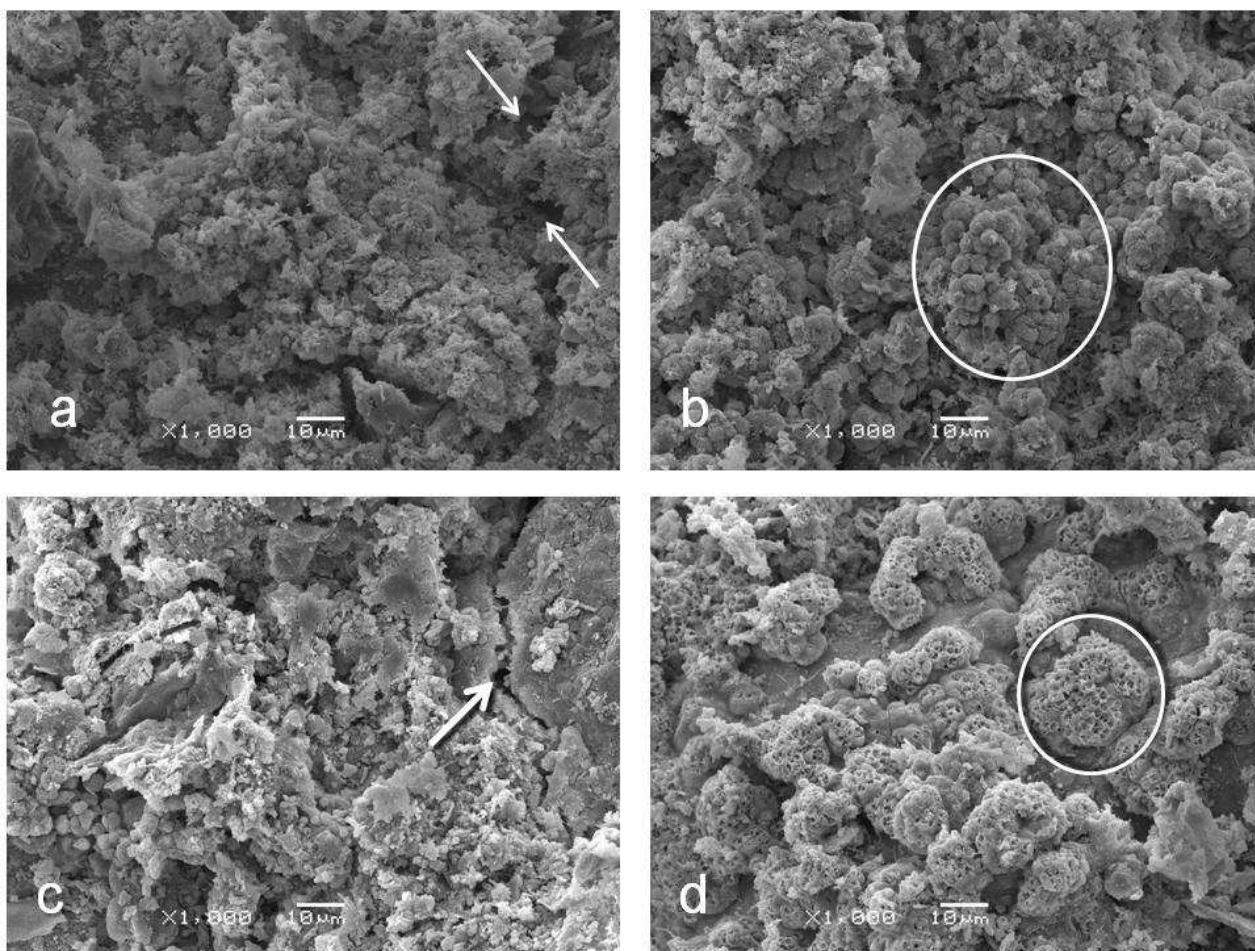


FIGURA 4.23 – BIOFILME ANAERÓBIO SOBRE A SUPERFÍCIE DOS GRÂNULOS DO LODO COLETADO. a) RC, 40º DIA DE OPERAÇÃO. SETAS INDICAM REGIÕES SEM CRESCIMENTO (“VALES”), b) RT, 40º DIA DE OPERAÇÃO. CÍRCULO INDICA *CLUSTER* SIMILAR A *METHANOSARCINA SP.*, c) RC, 60º DIA DE OPERAÇÃO. SETA INDICA QUEBRA DO BIOFILME; d) RT, 60º DIA DE OPERAÇÃO. CÍRCULO INDICA ESTRUTURA COM MICROCANAIS

FONTE: O autor (2011)

As diferenças observadas durante o desenvolvimento dos biofilmes nos reatores parecem estar relacionadas ao bioaumento realizado no reator Teste. O aumento do número de microrganismos no consórcio pode aumentar a quantidade de EPS secretada. Maiores quantidades de EPS podem originar biofilmes mais homogêneos e estáveis. Estes resultados estão de acordo com o que já foi relatado por Fang e colaboradores (2000), Tolker-Nielsen e colaboradores (2000) e Fernández e colaboradores (2008), em estudos anteriores.

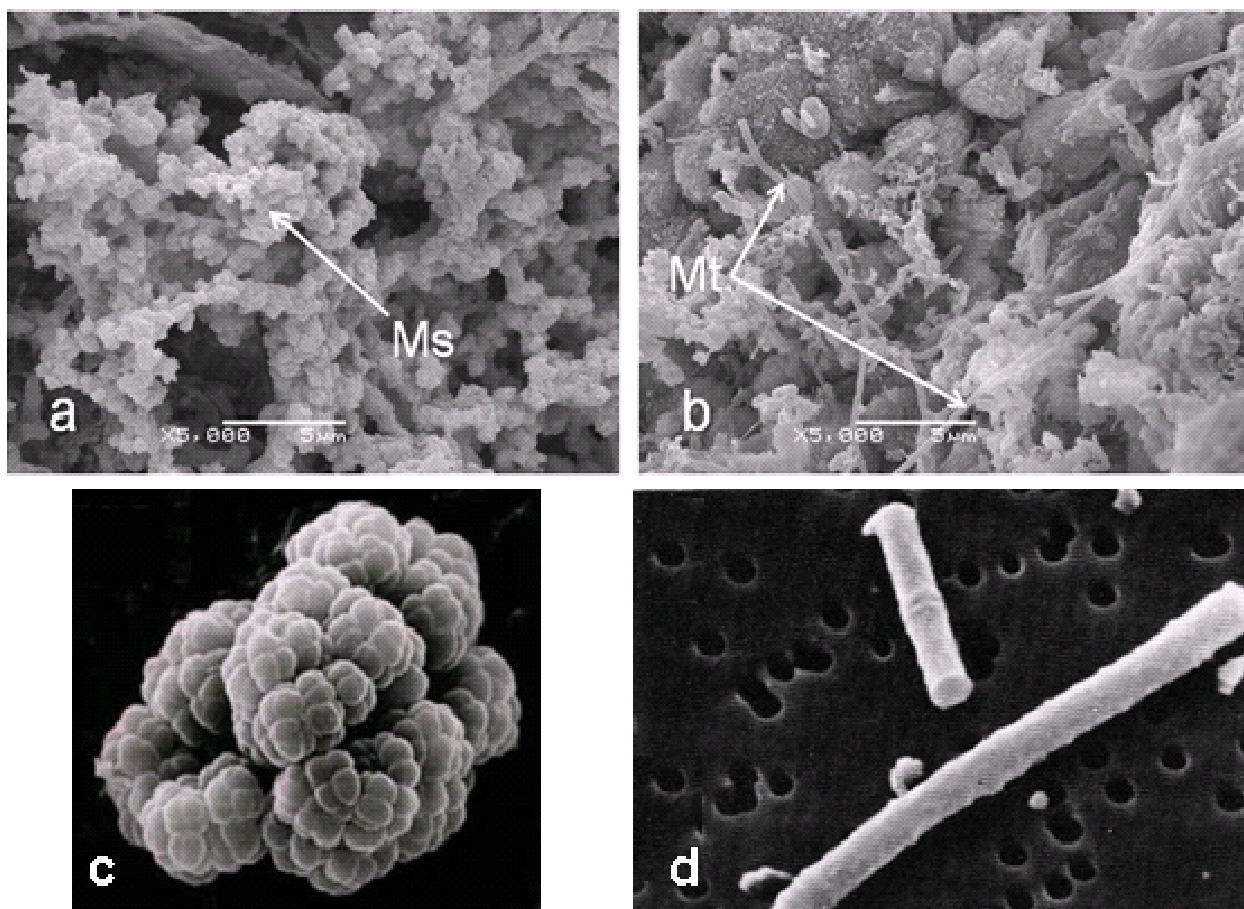


FIGURA 4.24 – ESPÉCIES SIMILARES A METANOGÊNICOS NA SUPERFÍCIE DO BIOFILME a) RC, 1º DIA. MS- METHANOSARCINA SP., B) RT, 1º DIA. MT-METHANOSAETA SP, C) IMAGEM DE REFERÊNCIA- METHANOSARCINA SP; D) IMAGEM DE REFERÊNCIA- METHANOSAETA SP

FONTES: Zehnder (1989), Broad Institute (2011), o autor (2011)

4.4.2.3 Caracterização molecular dos microrganismos cultivados e do lodo anaeróbio dos reatores RC e RT

Amostras do material genético extraído por metagenômica, do meio MB-cloranfenicol e das amostras de lodo bruto e coletadas nos períodos de 1, 20, 40 e 60 dias, foram submetidas à amplificação pela técnica da PCR. Os possíveis fragmentos amplificados foram avaliados em corrida de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Os resultados obtidos não possibilitaram visualizar uma única banda

(fragmento amplificado do tamanho esperado) e sim uma série de bandas, algumas fracamente amplificadas e outras, menores, com intensa amplificação. As Figuras 4.25 e 4.26 apresentam os resultados das corridas eletroforéticas.

As bandas visualizadas no gel de agarose assemelharam-se ao perfil de amplificação normalmente obtido pela técnica do RAPD, ou Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso. Na Figura 4.27 é apresentado, como exemplo, um gel de agarose corrido após uma amplificação utilizando o RAPD como marcador molecular.

A semelhança entre as Figuras 4.25 e 4.26, com a Figura 4.27 sugere que os primers utilizados para a PCR das amostras de DNA do cultivo e dos lodos podem ter amplificado, além das sequências alvo, outras sequências de DNA competitivas presentes na amostra, produzindo os padrões de bandas observados.

Todas as reações de amplificação realizadas, contendo amostras de DNA do cultivo ou do lodo, apresentaram fragmentos amplificados menores do que aqueles esperados como produtos.

De acordo com o *Protocols and Applications: Guide for Nucleic Acid Amplification* (PROMEGA, 2009), a amplificação não específica é um dos principais problemas enfrentados por pesquisadores durante a realização de ensaios da PCR. O problema é agravado quando são utilizados *primers* universais, como o 16S rRNA. Nestes casos, são aumentadas as chances de se encontrar sítios alternativos de reconhecimento que podem competir pelo anelamento dos *primers* e produzir amplicons de tamanhos diferentes.

Analisando as sequências dos *primers* universais para o domínio Archaea no algoritmo BLAST® (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foram encontrados valores variados de similaridade dentro do próprio domínio e também com grupos filogeneticamente mais distantes, como algumas espécies de protozoários. Esta similaridade entre sequências pode ter permitido a amplificação randômica das amostras, havendo, portanto, vários DNAs alvo para anelamento dos *primers*. Nestas condições, o material adicionado para a replicação do DNA se esgotaria rapidamente e seria improvável que houvesse a amplificação exponencial de um único fragmento.

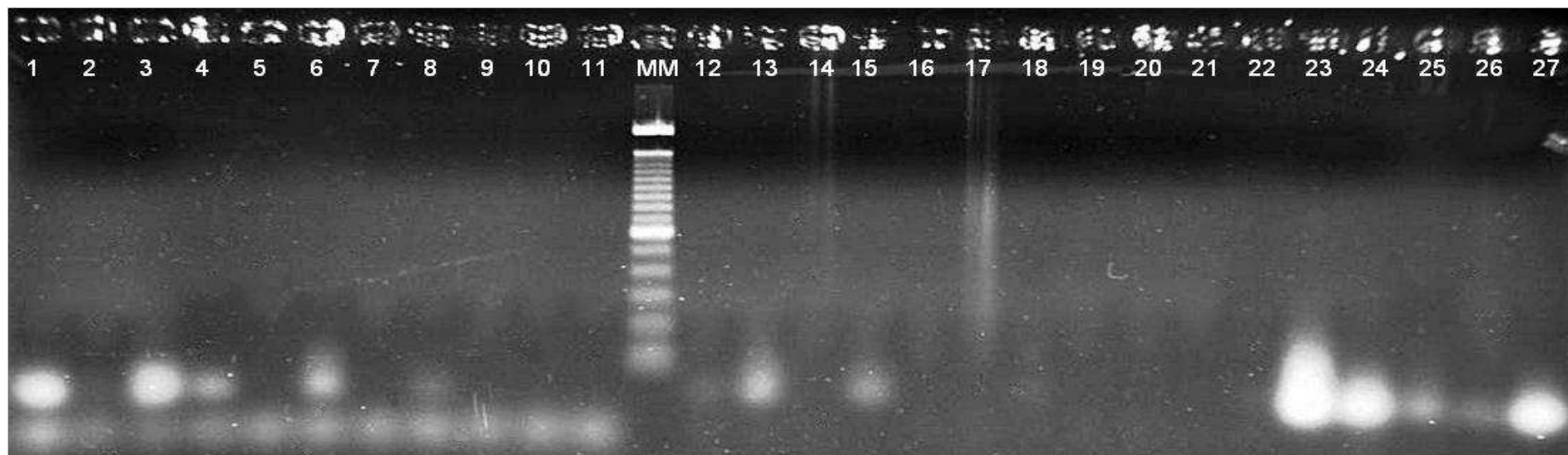


FIGURA 4.25 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE. PISTAS 1 A 11- PRIMERS DOMÍNIO BACTERIA, COM: 1) LODO BRUTO, 2) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 3) RC 1º DIA, 4) RT 1º DIA, 5) RC 20º DIA, 6) RT 20º DIA, 7) RC 40º DIA, 8) RT 40º DIA, 9) RC 60º DIA, 10) RT 60º DIA, 11) ÁGUA. MM- MARCADOR MOLECULAR 100pb. PISTAS 12 A 22- PRIMERS DOMÍNIO ARCHAEA, COM: 12) LODO BRUTO, 13) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 14) RC 1º DIA, 15) RT 1º DIA, 16) RC 20º DIA, 17) RT 20º DIA, 18) RC 40º DIA, 19) RT 40º DIA, 20) RC 60º DIA, 21) RT 60º DIA, 22) ÁGUA. PISTAS 23 A 27: PRIMERS ORDEM METHANOBACTERIALES, COM: 23) LODO BRUTO, 24) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 25) RC 1º DIA, 26) RT 1º DIA, 27) RC 20º DIA

FONTE: O autor (2011)

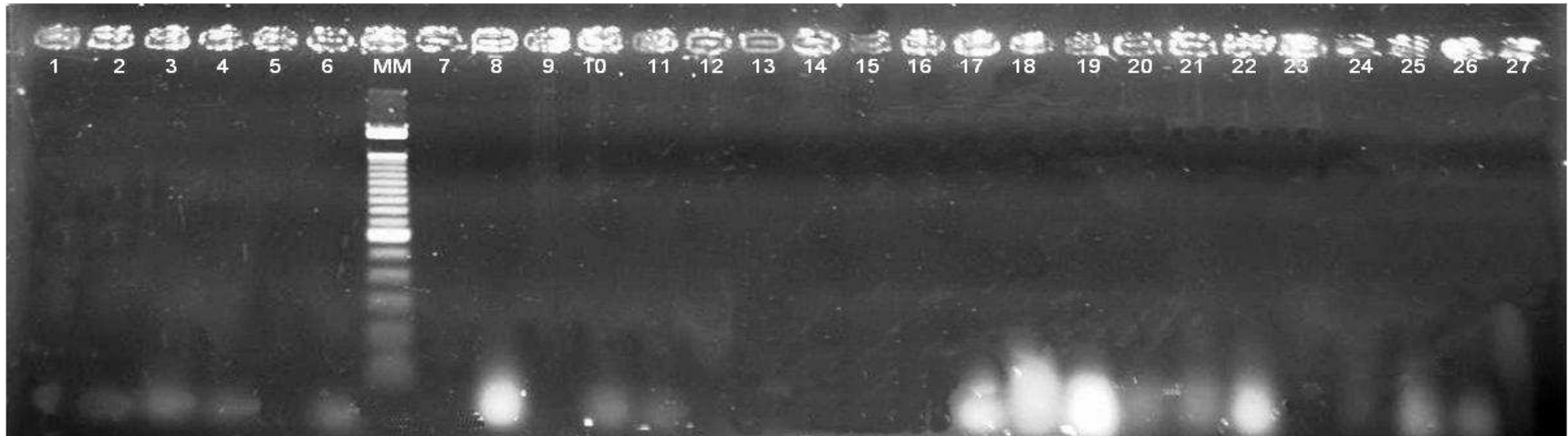


FIGURA 4.26 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE. PISTAS 1 A 6- PRIMERS ORDEM METHANOBACTERIALES, COM: 1) RT 20° DIA, 2) RC 40° DIA, 3) RT 40° DIA, 4) RC 60° DIA, 5) ÁGUA, 6) RT 60° DIA. MM- MARCADOR MOLECULAR 100pb. PISTAS 7 A 17- PRIMERS ORDEM METHANOMICROBIALES, COM: 7) ÁGUA, 8) LODO BRUTO, 9) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 10) RC 1° DIA, 11) RT 1° DIA, 12) RC 20° DIA, 13) RT 20° DIA, 14) RC 40° DIA, 15) RT 40° DIA, 16)RC 60° DIA, 17) RT 60° DIA. 22) ÁGUA. PISTAS 18 A 27: PRIMERS ORDEM METHANOSARCINALES, COM: 18) LODO BRUTO, 19) CULTIVO MB-CLORANFENICOL, 20) RC 1° DIA, 21) RT 1° DIA, 22) RC 20° DIA, 23) RT 20° DIA, 24) RC 40° DIA, 25) RT 40° DIA, 26) RC 60° DIA, 27) RT 60° DIA

FONTE: O autor (2011)

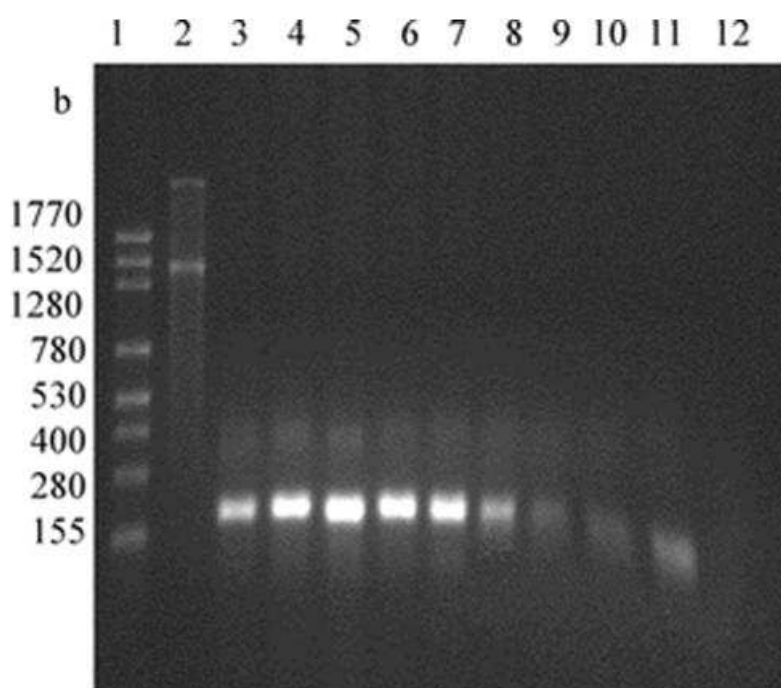


FIGURA 4.27 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE APÓS O USO DO MARCADOR MOLECULAR RAPD

FONTE: KAO E DURST (2010)

Apesar da possível amplificação inespecífica, os resultados permitiram comparar o desenvolvimento geral do biofilme nos reatores Controle e Teste e identificar os grupos metanogênicos mais abundantes em amostra de cultivo anaeróbico e do lodo anaeróbico da lagoa facultativa do Aterro Sanitário de Curitiba.

As amostras do lodo anaeróbico e do reator Controle após o 1º dia de operação apresentaram as maiores quantidades de bactérias entre as amostras (Figura 4.25, pistas 1 e 3). Entretanto, as condições de PCR para os *primers* deste domínio utilizaram baixa temperatura de anelamento (42°C) por um curto período de tempo (30 segundos), e se refletiram em anelamento inadequado dos *primers* nas amostras. Os *primers* não anelados podem ser observados como bandas no final das pistas 1 a 11.

Para o domínio Archaea, as amostras que apresentaram maior amplificação foram aquelas do meio MB-cloranfenicol e do reator Teste após o 1º dia de operação (Figura 4.25, pistas 13 e 15). Estes resultados demonstraram que as condições utilizadas durante o cultivo dos microrganismos do lixiviado de aterro sanitário foram eficientes para magnificar a população metanogênica antes da sua adição no reator Teste. Este, por sua vez, também apresentou quantidade significativa de arqueas no

período inicial de operação dos reatores devido ao bioaumento realizado.

A ordem Methanobacteriales apresentou bandas com intensa amplificação para as amostras de lodo anaeróbio, meio MB-cloranfenicol e Reator Controle após 20 dias de operação (Figura 4.25, pistas 23, 24 e 27). Mesmo em menor quantidade, todas as amostras amplificaram na forma de bandas para esta ordem metanogênica (Figura 4.25, pistas 25 e 26 e Figura 4.26, pistas 1,2,3,4 e 6). Este resultado comprovou a importância desta ordem na microbiota anaeróbia do lixiviado de aterro sanitário.

Para a ordem Methanomicrobales, as amostras de DNA com maior amplificação foram as do lodo anaeróbio e do reator Teste após 60 dias de operação (Figura 4.26, pistas 8 e 17).

A ordem Methanosarcinales foi identificada e amplificada em todas as amostras de DNA, com destaque para o lodo e o cultivo com cloranfenicol (Figura 4.26, pistas 18 e 19). O gênero Methanosarcina, pertencente a esta ordem, é bastante versátil na utilização de substratos e, provavelmente, deve ser encontrado em vários períodos de operação dos reatores.

4.4.2.3 Atividade Metanogênica específica (AME)

Os ensaios da AME foram realizados em triplicata e utilizaram o lodo retirado dos reatores RC e RT após 1, 20 e 40 dias de operação.

Os ensaios também foram realizados com as amostras coletadas após o 60º dia de operação, porém, ocorreram oscilações de temperatura dos sistemas da AME durante este período, causadas por quedas de energia, e estes resultados não foram considerados no estudo.

Nas Figuras 4.27 a-f são apresentados os gráficos do volume acumulado de metano *versus* tempo para os ensaios realizados.

O perfil de produção de metano foi muito similar, em ambos os reatores, entre os ensaios de um mesmo período. Os resultados, para cada ensaio, apresentaram consistência nas respostas, com base nas repetições realizadas.

Para os ensaios realizados com o lodo coletado após 20 dias de operação dos reatores foram observadas duas etapas de produção de metano, separadas por um período de estabilidade na produção (Figura 4.28 c-d). Estas duas etapas de produção podem estar vinculadas a duas fases distintas de crescimento dos microrganismos metanogênicos.

A etapa de produção inicial de metano, utilizando-se o lodo de 20 dias, foi devido ao consumo imediato dos ácidos orgânicos voláteis adicionados ao frasco reator dos sistemas e pode ser caracterizada pelo crescimento dos microrganismos acetoclásticos. Após a depleção destes compostos no sistema, ocorreu um período de estabilidade, que pode ser interpretado como um período de produção de acetato e hidrogênio pelos microrganismos acetogênicos presentes na biomassa inicial inoculada. De acordo com Lettinga (1996) e Chernicharo (2007), esta provável acetogênese é favorecida em baixas concentrações de acetato no meio.

Após a produção de acetato e hidrogênio no meio, teve início a segunda fase de crescimento metanogênico. Nela, os microrganismos acetoclásticos e, agora também, os hidrogenotróficos, induziram à produção de metano, que apresentou taxa de produção mais elevada do que aquela observada na primeira etapa. Isto porque houve o favorecimento ao crescimento das populações hidrogenotróficas até então latentes na biomassa inicial inoculada. Esta interpretação do resultado observado no período de 20 dias pode ser corroborada pelos resultados das análises moleculares, onde são observadas grandes quantidades de DNA amplificado pertencente ao gênero *Metanobrevibacter*, hidrogenotrófico, no lodo coletado após 20 dias de operação.

Os valores obtidos para a atividade metanogênica específica durante os ensaios realizados ($\text{mgDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSTV.d}$) são apresentados na Tabela 4.5. Para os ensaios com lodo coletado após 20 dias foi realizada uma média entre as duas etapas de produção de metano observadas. Os resultados obtidos permitem afirmar que não houve diferença significativa na produção de metano pela biomassa dos reatores RC e RT nos períodos considerados (teste U de Mann-Whitney, $p= 0,513$). Entretanto, o aumento da AME ao longo dos 40 dias de operação dos reatores pode ter representado a adaptação gradual dos microrganismos metanogênicos ao lixiviado de aterro sanitário e a maturação e estabilidade dos biofilmes.

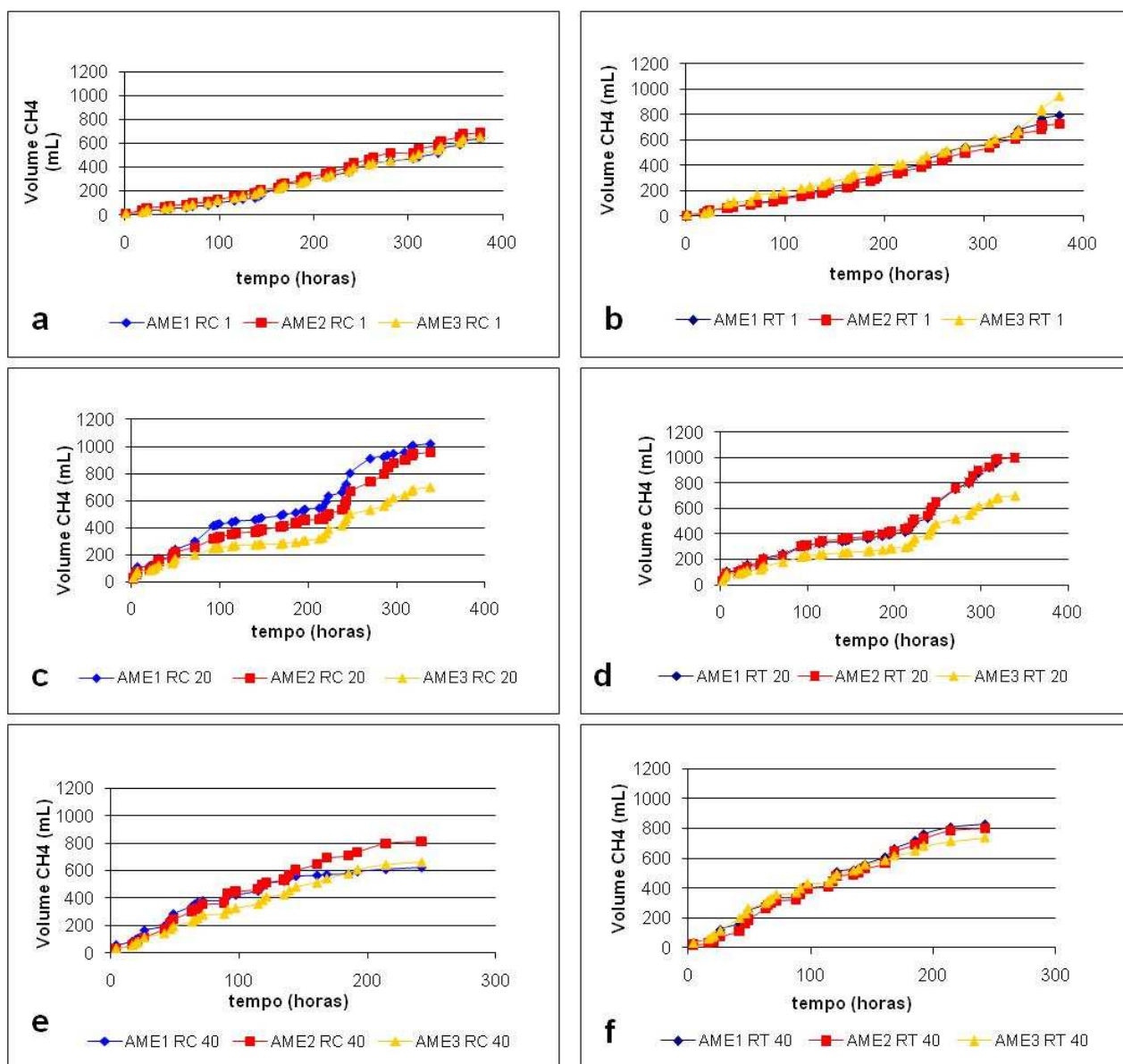


FIGURA 4.28 – VOLUME CUMULATIVO DE METANO VERSUS TEMPO. A) RC, LODO DO 1º DIA DE OPERAÇÃO. B) RT, LODO DO 1º DIA DE OPERAÇÃO. C) RC, LODO DO 20º DIA DE OPERAÇÃO. D) RT, LODO DO 20º DIA DE OPERAÇÃO. E) RC, LODO DO 40º DIA DE OPERAÇÃO. F) RT, LODO DO 40º DIA DE OPERAÇÃO

TABELA 4.5 – ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA (mgDQO_{ch4}/gSTV.d) PARA LODO COLETADO NOS REATORES CONTROLE E TESTE

DIAS	AME*	
	RC	RT
1	0.38 (0.01)	0.54 (0.07)
20	0.82 (0.28)	0.85 (0.27)
40	1.11 (0.21)	1.22 (0,04)

* valores em mgDQO/gSTV.d

4.4.3 Perfil de produção dos ácidos orgânicos voláteis nos reatores Controle e Teste

O perfil da concentração dos ácidos orgânicos voláteis (AGV) durante um tempo de ciclo completo (24h) permitiu acompanhar a produção e o consumo destes compostos nos reatores Controle e Teste e relacionar os períodos dentro do tempo de ciclo com a atividade dos microrganismos presentes na digestão anaeróbia.

Nas Figuras 4.29 (a-b) são apresentadas as variações das concentrações dos ácidos orgânicos acético, propiônico e butírico, durante 24 horas de monitoramento.

Analisando o perfil obtido para as concentrações dos AGV pode-se notar que as concentrações de ácido acético sofrem grande variação ao longo do processo da digestão anaeróbia. De acordo com McCarty (1964) o acetato é a principal fonte de carbono utilizada durante a metanogênese o que explica sua rápida geração e consumo em um tempo de ciclo dentro dos reatores.

Durante as primeiras cinco horas após a alimentação, os reatores apresentaram produção equivalente de ácidos acético, propiônico e butírico. Foi observado aumento na concentração de ácido butírico 30 minutos após a alimentação. Esta concentração foi novamente reduzida 1 hora após o aumento inicial observado deste composto. Simultaneamente ao decréscimo das concentrações de ácido butírico, ocorreram pequenos aumentos na concentração de ácido acético, em ambos os reatores. Este período, compreendido entre o final da etapa da alimentação e a sexta hora da etapa de reação, apresentou-se tipicamente como uma etapa acidogênica.

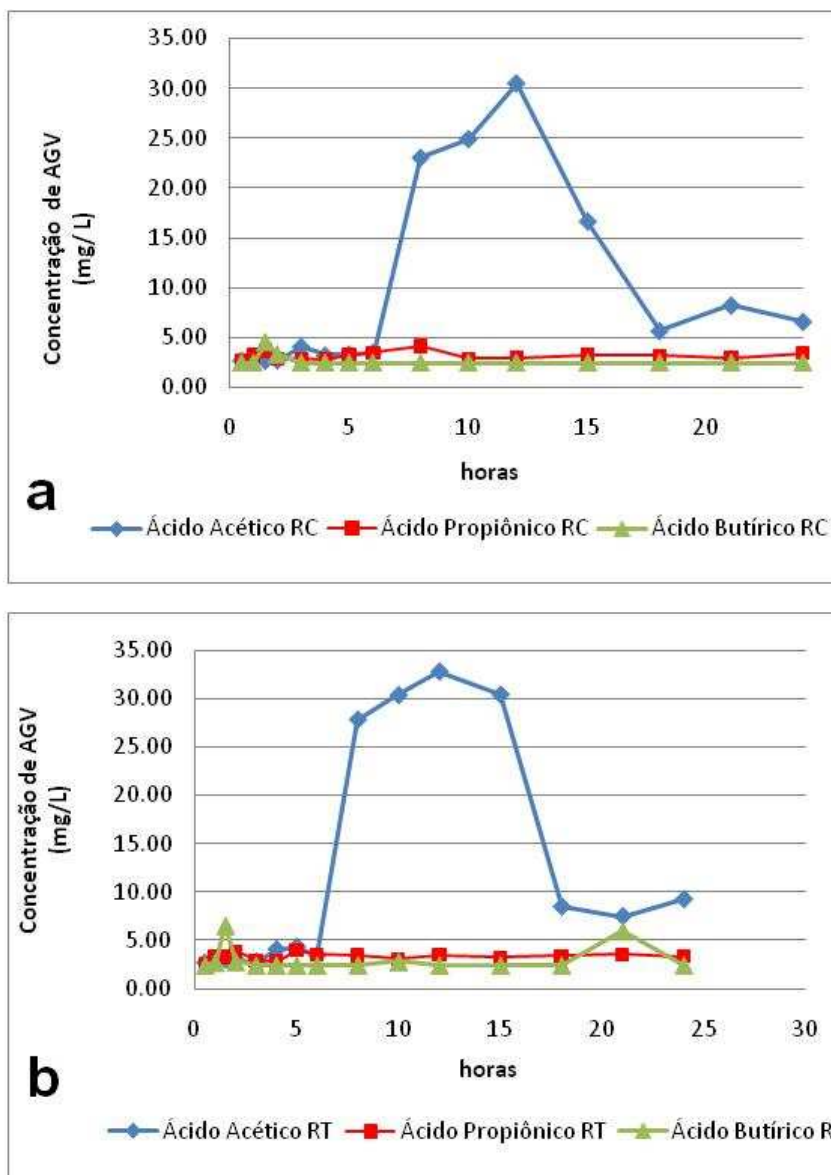


FIGURA 4.29 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DURANTE UM TEMPO DE CICLO (24 horas) NOS REATORES: a) CONTROLE. b) TESTE

O período compreendido entre 6 e 12 horas após a alimentação foi caracterizado pela geração de acetato, cuja concentração atingiu valores acima de 30 mg.L^{-1} . Os ácidos butírico e propiônico permaneceram com baixas concentrações durante este período. Esta fase, caracterizada principalmente pelo rápido aumento na concentração de acetato pode ser definida como a fase acetogênica da digestão anaeróbia.

O consumo do acetato gerado teve início 12 horas após a alimentação. O tempo de consumo foi de seis horas, após o qual, a concentração estabilizou-se.

Este período de consumo do acetato caracterizou a atividade metanogênica acetoclástica. Entre 12h e 15h, o consumo líquido do acetato, ou seja, a diferença entre o acetato produzido e o consumido, foi mais lento no reator Teste. Após as quinze horas, o reator Teste aumentou a taxa de consumo deste composto, mas estabilizou em uma concentração mais elevada do que o reator Controle.

Uma possível explicação para este perfil é a presença de maior quantidade de arqueas hidrogenotróficas no reator Teste. O consumo do H_2 , que foi gerado pelas acetogênicas, por este grupo, minimiza a limitação termodinâmica do sistema em relação às acetogênicas. Ou seja, a produção de acetato é mais acentuada no reator Teste, devido ao maior consumo de H_2 pelas hidrogenotróficas, o que desloca o equilíbrio das reações acetogênicas no sentido dos produtos, acetato e hidrogênio.

Perto do final do tempo de ciclo (21h), houve novo aumento da concentração de ácido butírico no reator Teste. O bioaumento do reator Teste parece ter induzido à maior produção de ácido butírico no sistema, provavelmente devido à presença de algumas populações acidogênicas no inóculo utilizado.

4.4.1 Monitoramento do efluente dos reatores - Fase II

Após o término do monitoramento do lodo (60 dias), os reatores foram alimentados com lixiviado corrigido para a concentração de fosfato.

Nas Figuras 4.30-4.32 são apresentadas as variações das concentrações de carbono orgânico dissolvido, nitrogênio amoniacal e fosfato para os reatores Controle e Teste durante 20 dias de monitoramento da Fase II.

As concentrações observadas para as variáveis COD, $N-NH_3$ e PO_4^{-3} não apresentaram diferença significativa entre os reatores (teste U de Mann-Whitney, respectivamente, $p=0,917$, $p=0,821$ e $p=0,627$).

As concentrações observadas para as variáveis COD, $N-NH_3$ e PO_4^{-3} não apresentaram diferença significativa entre os reatores (teste U de Mann-Whitney, respectivamente, $p=0,917$, $p=0,821$ e $p=0,627$).

Não foi possível observar correlação entre as concentrações de COD e NH_3 com as concentrações de fosfato, em ambos os reatores. Os resultados para o teste da Correlação de Spearman forneceram, respectivamente, para as relações COD *versus* PO_4^{-3} e $N-NH_3$ *versus* PO_4^{-3} , $p=0,489$ e $p=0,349$ para o reator Controle e $p=0,451$ e $p=0,343$ para reator Teste.

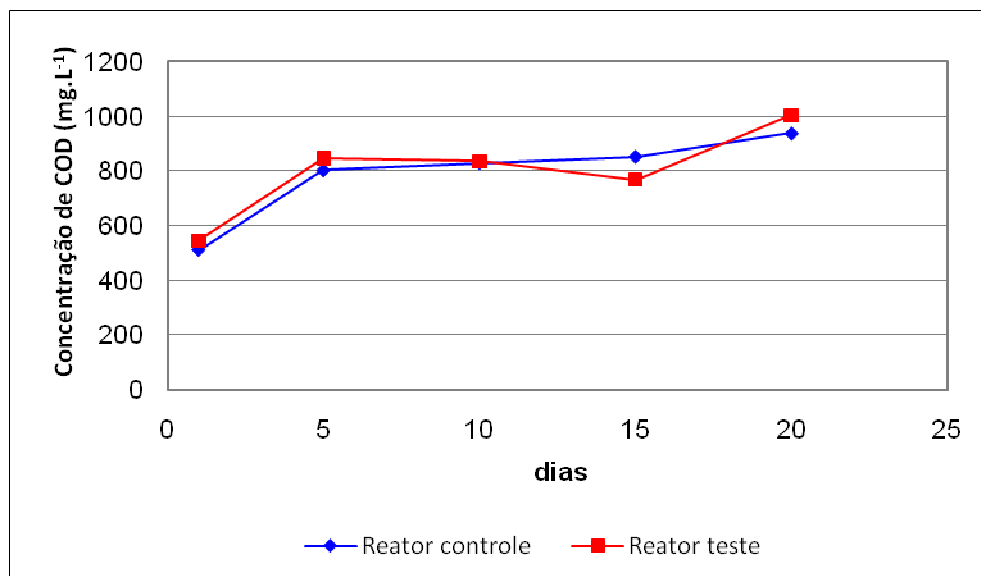


FIGURA 4.30 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COD NOS REATORES CONTROLE E TESTE- FASE II

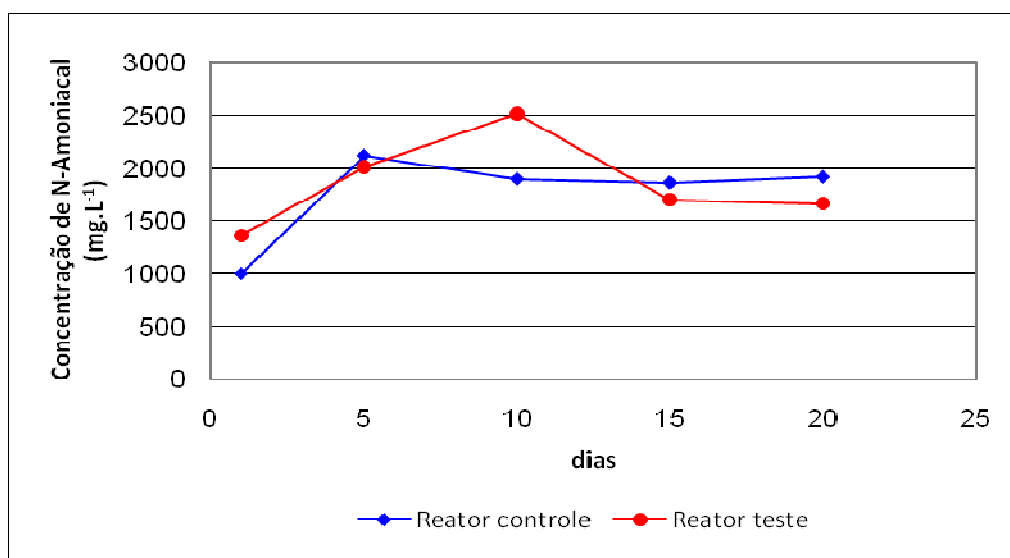


FIGURA 4.31 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIAICAL (N-NH₃) NOS REATORES CONTROLE E TESTE- FASE II

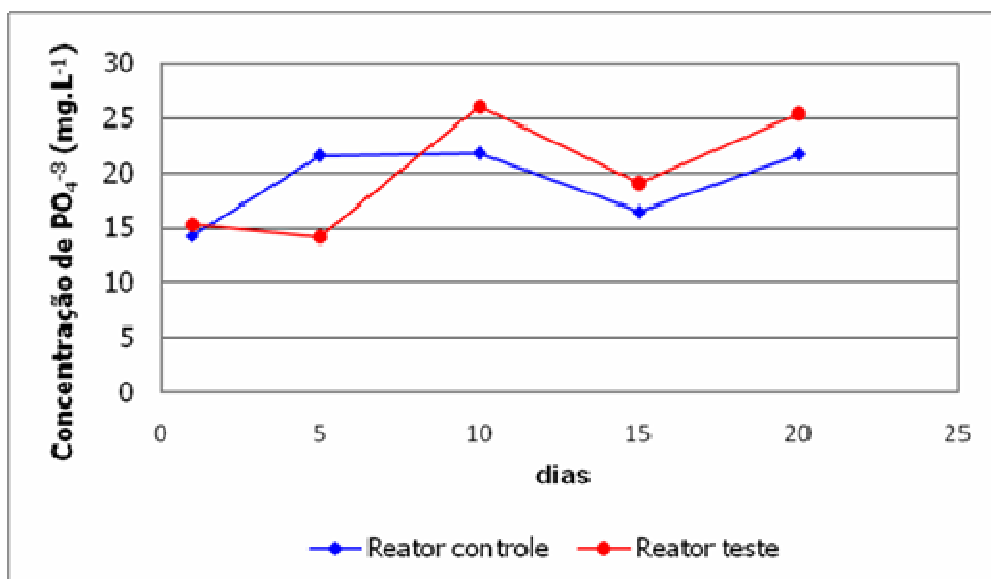


FIGURA 4.32 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PO_4^{3-} NOS REATORES CONTROLE E TESTE- FASE II

Comparando os valores das variáveis COD e N-NH_3 obtidas durante as Fases I e II, somente foi encontrada diferença significativa para os valores da concentração do COD no reator Teste (teste U de Mann-Whitmann, $p < 0,05$). Após a adição de fosfato no lixiviado, a concentração média de COD do reator Teste ficou mais elevada. Uma possível explicação é que o aumento de fosfato nos sistemas pode ter induzido ao crescimento celular, gerando mais carbono dissolvido, amônia e o próprio fosfato no meio, devido à quantidade de material celular gerado.

Com base nos resultados observados não foi possível afirmar que o fósforo, como macronutriente, seja limitante no uso do nitrogênio amoniacal como fonte de N ou na remoção da matéria orgânica (COD). Entretanto, o baixo número de amostras ensaiadas ($n=5$) pode ter influenciado no resultado final, apesar de terem sido utilizados testes estatísticos não-paramétricos. Para confirmar ou refutar estes resultados seria interessante prolongar o período de monitoramento, com um número maior de amostras coletadas dos reatores.

5. CONCLUSÕES

A avaliação metabólica dos microrganismos presentes no lixiviado de aterro sanitário durante o teste do substrato confirmou o potencial uso das três vias de produção de metano (hidrogenotrófica, acetoclástica e metilotrófica) na digestão anaeróbia do lixiviado de aterro sanitário, por microrganismos metanogênicos adaptados e naturalmente presentes neste tipo de resíduo. Também foi possível avaliar as relações de competição ou de cooperação entre metanogênicos e grupos bacterianos, principalmente acetogênicos. A inibição do crescimento de bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio pelo uso do antibiótico cloranfenicol induziu ao aumento do número e riqueza das espécies metanogênicas, observado sob MEV.

A adição de inóculo no reator Teste obteve eficiência de remoção de DQO e de COD, de 60% e 75 %, respectivamente. Estes valores alcançados estão acima do que foi encontrado na literatura para um sistema em batelada com biomassa autoimobilizada e sem agitação. A adição de inóculo adaptado resultou em diferença significativa entre os reatores Controle e Teste para estas variáveis. Entretanto, o reator Controle também obteve eficiências consideráveis na remoção destas variáveis (40% e 70%).

Outra variável que apresentou diferença significativa nas concentrações observadas para reator Teste e Controle foi o conjunto de sólidos suspensos. A adição do inóculo pareceu minimizar o efeito de arraste de sólidos, comum em sistemas em batelada. O aumento na produção de material extracelular (EPS) no meio inoculado parece ter aumentado a estabilidade do biofilme presente no reator Teste. A maior concentração de polímeros e a uniformidade do biofilme do reator Teste foram confirmadas por MEV. Ao contrário do reator Teste, o biofilme do reator Controle apresentou-se com crescimento irregular e regiões fragmentadas. Esta instabilidade do biofilme, associada à geração e circulação de biogás nos sistemas parece ser a causa da maior concentração de sólidos voláteis no efluente do reator Controle.

O uso do inóculo foi indiferente à remoção da amônia. Ambos os reatores apresentaram oscilações entre remoção e geração deste composto. A existência de outras vias de geração de amônia deve ser considerada; a via metanogênica

metilotrófica, por exemplo, poderia estar relacionada com os períodos de geração de amônia no meio sempre que as concentrações de ácidos orgânicos voláteis e hidrogênio sofrerem redução.

Em relação à diversidade microbiana existente no lixiviado, foram observadas grandes quantidade de microrganismos similares à *Methanobrevibacter* sp., *Methanosphaera* sp., *Methanosarcina* sp. e, em menor quantidade, *Methanosaeta* sp. Estes microrganismos metanogênicos pertencem às ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales cuja presença foi bastante expressiva sob análise molecular, principalmente nas amostras de cultivo, lodo bruto da lagoa e lodo removido nos dias 1 e 20 de operação dos reatores. Ainda em relação à análise molecular, o uso de primers 16S rRNA não se mostrou adequado para a amplificação das amostras de DNA extraídas por metagenômica, devido ao grande potencial destas amostras ambientais em fornecerem sequências-alvo competitivas. A aplicação de técnicas como a *Nested-PCR* ou o uso de *primers* para anelamento com regiões codificadoras que coordenem funções metabólicas comuns apenas ao grupo de metanogênicos (e.g. enzima MCR) pode ser a solução para obter-se ampliações de DNA mais específicas.

A atividade metanogênica específica (AME) não apresentou diferença significativa entre os reatores, entretanto, ao longo de 40 dias, ambos os reatores apresentaram aumento na AME, indicando a maturação e adaptação dos biofilmes ao lixiviado de aterro sanitário. Outra consideração importante sobre este ensaio diz respeito à produção de metano após 20 dias de operação dos reatores. As diferentes fases de crescimento dos metanogênicos que puderam ser observadas neste ensaio podem, futuramente, ser estudadas em relação à influência da variação de carga, ou presença de compostos tóxicos sobre a atividade metanogênica de acetoclásticos e hidrogenotróficos, separadamente.

Durante a operação dos reatores, com adição de fósforo no lixiviado, foi observado aumento nas concentrações de matéria orgânica (COD) e nitrogênio amoniacal. Ao contrário do que se esperava a concentração de fosfato também se elevou durante o período. Com base nestes resultados, não foi possível atribuir ao fósforo a condição de nutriente limitante do processo de digestão anaeróbia do lixiviado de aterro sanitário.

6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para complementação dos resultados obtidos neste estudo, seguem algumas recomendações de trabalhos futuros:

- avaliar o efeito do bioaumento em reator anaeróbio em bateladas sequenciais sob temperaturas mesófilas controladas (32°C-35°C);
- quantificar concentrações de metilaminas no lixiviado de aterro sanitário, visando confirmar o potencial da via metilotrófica neste tipo de resíduo;
- utilizar primers de genes funcionais específicos para a metanogênese, como por exemplo o MCR, que codifica para a enzima metil-coenzima M redutase, visando a caracterização molecular de metanogênicos em biofilmes anaeróbios;
- aplicar técnicas biotecnológicas para aumentar a assimilação do nitrogênio amoniacal pelos microrganismos metanogênicos, superexpressando genes como o AmtB que codifica para transportadores de amônio neste grupo;
- avaliar o efeito da adição de fósforo no lixiviado de aterro sanitário para digestão anaeróbia deste resíduo em períodos maiores de tempo.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERSW, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment/search tool. **Journal of molecular Biology**. v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AMARAL, M. C. S., FERREIRA, C. F. A., LANGE, L. C.; AQUINO, S. F. Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de lixiviados de aterros sanitários. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 38-45, 2008.
- APHA- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standart Methods for the examination of water and wastewater**, ed. 20, 1368 p. Washington: Hardcover, 1998.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; FLORÊNCIO L.; MONTEGGIA, L.O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192-201, abr./jun. 2007.
- ARAUJO, J. C.; BRUCHA, G.; CAMPOS, J. R.; VAZOLLER, R. F. Monitoring the development os anaerobic biofilms using fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 12, p. 69-77, 2000.
- ARTIOLA-FORTUNY, J.; FULLER, W. H. Humic substances in landfill leachates: I. Humic acid extraction and identification. **Journal of Environmental Quality**, v.11, p. 663, 1982.
- BAERE, L.; MEENEN, P. V.; DEBOOSERE, S.; VERSTRAETE, W. Anaerobic fermentation of refuse. **Resources and Conservation**, v. 14, p. 295-308, 1984.
- BALCH, W., E.; FOX, G. E.; MAGRUM, L. J.; WOESE, C.R.; WOLFE, R.S. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 260-296, 1979.
- BARLAZ, M. A. and HAM, R. K. Leachate and gas generation. In: DANIEL, D.E. (Ed.). **Geotechnical Practice for Waste Disposal**. London: Chapman and Hall, 1993. p. 113.
- BERGMAN, I.; SVENSSON, B. H.; NILSSON, M. Regulation of methane production in a Swedish acid mire by pH, temperature and substrate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 729-741, 1998.
- BERRUETA, J.; GUTIÉRREZ, A.; FUEYO, G. Anaerobic treatment of leachate in a

pilot-scale UASB: Strategy of start-up. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 67, p. 303-314, 1996.

BERTAZZOLI, R.; PELEGRINI, R. Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do processo fotoeletroquímico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 477-482, 2002.

BIDONE, R. F.; HARTMAN, F.; ROSA, A. L.; SOUTO, G. D. B.; POVINELLI, J. Filtros anaeróbios aplicados ao tratamento de lixiviado de aterro sanitário. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...** Belo Horizonte, 2007.

BOHDZIEWICZ, J.; NECZAJ, E.; KWARCIAK, A. Landfill leachate treatment by means of anaerobic membrane bioreactor. **Desalination**, v. 221, n. 1-3, p. 559-565, 2008.

BONIN, A.S.; BOONE, D. R. The order Methanobacteriales. In: DWORKIN, M. *et al.* (Ed.). **Prokaryotes**, v. 3, 3. ed. Minneapolis: Springer, 2006. p. 231-243.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*. In: GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, 2. ed, New York: Springer, 2001, 721 p.

BORGES, E. S. M. **Tratamento térmico de lodo anaeróbio a partir da queima do biogás produzido em reator UASB objetivando a higienização e a melhoria da biodisponibilidade e biodegradabilidade da fração orgânica**. 254 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

BORJA, R.; SANCHEZ, E.; WEILAND, P. Influence of ammonia concentration on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure in upflow anaerobic sludge blanket(UASB) reactors. **Process Biochemistry**, v.31, n.5, p. 477-483, 1996.

BRAMBILLA, E.; DJAO, O. D. N.; DALIGAULT, H.; *et al.* Complete genome sequence of *Methanoplanus pretolearius* type strain. **Standards in Genomic Science**, v. 3, n. 2, p. 203-211, 2010.

BROAD INSTITUTE, Methanosarcina Project Information. Disponível em <www.broadinstitute.org/annotation/microbes/methanosarcina/background.html> Acessado em: fevereiro, 2011.

BRUMMELER, E.; KOSTER, I. W.; ZEEVALKINK, J. A. Biogas production from the organic fraction of municipal solid waste by anaerobic digestion. In: 3th International Symposium- MER 3- Materials and Energy from Refuse. **Proceedings...** Belgica, 1986.

BURGRAFF, S.; MAYER, T.; AMANN, R.; SCHADHAUSER, S.; WOESE, C.R.; STETTER, K.O. Identifying members of the domain Archaea with rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3112-3119, 1994.

CALLI, B., MERTOGLU, B., TAS, N., INANC, B., YENIGUN, Q., OZTURK, I. Investigation of variation in microbial diversity in anaerobic reactors treating landfill leachate. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 105-112, 2003.

CALLI, B.; MERTOGLU, B.; ROEST, K.; INANC, B. Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 641-647, 2006.

CERQUEIRA, M. B. R.; DIAS, A. N.; CALDAS, S. S.; SANTANA, F. B.; DÓCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 156-159, 2010.

CHERNICHARO, C. A. L.; BORGES, A. M.; MESQUITA, L. C. P.; DIAS, A. M. A. Desenvolvimento de um respirômetro automatizado para avaliação da atividade microbiana anaeróbia. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.2, n. 3-4 p. 2-12, 1997.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 5, 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2007.

CHIAN, E.S.K.; DEWALLE, F.B. Characterization of soluble organic matter in leachate. **Environmental Science and Technology**, n. 11, p. 158, 1977.

CHRISTENSEN, T.H.; KJELDSEN, P. Basic biochemical processes in landfills. In:_____. **Sanitary Landfilling: Process, Technology and Environmental Impact**. London: Academic Press, 1989.

CHRISTENSEN, T. H.; KJELDSEN, P.; ALBRECHTSEN, H. J.; HERON, G.; NIELSEN, P.H.; BJERG, P.L.; HOLM, P.E. Attenuation of landfill leachate pollutants in aquifers. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 119, 1994.

CHRISTENSEN, J.B.; JENSEN, D.L.; FILIP Z., GRØN C.; CHRISTENSEN T.H. Characterization of the dissolved organic carbon in landfill polluted groundwater. **Water Research**, v. 32, n. 1, p. 125, 1998.

CHRISTENSEN, T.H., KJELDSEN, P., BJERG, P.L., JENSEN, D.L.,CHRISTENSEN, J.B., BAUN, A., ALBRECHTSEN, H. J.; HERON, G. Biogeochemistry of landfill leachate plumes, **Applied Geochemistry**, v.16, n. 7, 8, p. 659–718, 2001.

CONRAD, R.; KLOSE, M.; NOLL, M. Functional and structural response of the methanogenic microbial community in rice field soil to temperature change. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1844-1853, 2009.

CONTRERA, R. C. **Tratamento de lixiviados de aterros sanitários em sistema de reatores anaeróbio e aeróbio operados em batelada seqüencial**. 748 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTEWER, P. Metagenomic gene discovery fast, present and future. **Trends in Biotechnology**, 23 (6). 321 – 329, 2005.

COSTERTON, J.W.; LLEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER D.; JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2137-2142, 1994.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p.1318-1322, 1999.

CUBAS, S. A. **Influência do tamanho da biopartícula e da agitação no desempenho de reatores anaeróbios em bateladas seqüenciais, contendo biomassa imobilizada, para tratamento de águas residuárias**. 129f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2004.

DAGUE, R. R.; HABBEN, C. E.; PIDAPARTI, S. R. Initial studies on teh anaerobic sequencing batch reactor. **Water Science and Technology**, v. 26, p. 2429-2432, 1992.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. O. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DEBAERE, L. A.; DEVOCHT, M.; VANASSCHE, P.; VERSTRAETE, W. Influence of high NaCl and NH₄ salt levels on methanogenic associations. **Water Research**, v. 18, n. 5, p. 543-548, 1984.

DEPPENMEIER, U.; JOHANN, A.; HARTSCH, T.; *et al.* The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 453-461, 2002.

DEVLIN, J. F. Field Evidence for the effect of acetate on leachate alkalinity. **Groundwater**, v. 28, n. 6, 1990.

DÍAZ, E. E.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 6, p.57–64, 2003.

DOLFING, J. **Microbiological aspects of granular methanogenic sludge**. PhD. Thesis. Agricultural University Wageningen, Holanda, 1987.

DOLFING, J.; BLOEMEN, G. B. M. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, n.1, p. 1-12, 1985.

DORÉ J; SGHIR, A.; HANNEQUART-GRAMET, G.; CORTIER, G.; POCHART, P.

Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantification of human faecal Bacteroides populations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, p. 65–71, 1998.

EDUARDO, J. **Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas do lixiviado (chorume) no processo de tratamento do aterro metropolitano de Gramacho (RJ-Brasil)**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

EDWARDS, T.; MCBRIDE, B. C. New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. **Applied Microbiology**, v. 29, p. 540-545, 1975.

EARL, J.; HALL, G.; PICKUP, R. W.; RITCHIE, D. A.; EDWARDS, C. Analysis of methanogen diversity in a hypereutrophic lake using PCR-RFLP analysis of mcr sequences. **Microbial Ecology**, v. 46, p. 270-278, 2003.

EHRIG, H.J., Quality and quantity of sanitary landfill leachate. **Waste Management and Research**, v.1, n. 53, 1983.

ERKEL, C.; KUBE, M.; REINGARDT, R.; LIESACK, W. Genome of rice cluster in Archaea the key methane produces in the rice rizosphere. **Science**, v. 313: 370 – 372, 2006.

FANG, H. H. P.; CHAN, K. Y.; XU, L. C. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). **Journal of Microbiology Methodology**, v. 40, n. 1, p. 89-97, 2000.

FERNANDÉZ, N; DÍAZ E. E.; AMILS, R.; SANZ, J. L. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 1, p.121-132, 2008.

FERRY, J. G. **Methanogenesis: Ecology, Phsiology, Biochemistry, and Genetics**. New York: Chapman & Hall, 1993.

FEY, A.; CHIN, K. J.; CONRAD, R. Thermophilic methanogens in rice field soil. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 295-303, 2001.

FIELD, J. A.; LETTINGA, G.; GEURTS, M. The Methanogenic Toxicity and Anaerobic Degradability of Potato Starch Wastewater Phenolic Amino Acids. **Biological Wastes**, v. 21, n. 1, p. 37-54, 1987.

FINKE, N.; HOEHLER, T. M.; JØRGENSEN, B. B. Methanogenesis from methylamine and methanol at changing hydrogen concentrations. **Terramare**, n.12, p. 50-51, 2003.

FORTERRE, P. Archaea: what can we learn from their sequences? **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 7, n. 6, p. 764-770, 1997.

FRICKE, W. F.; SEEDORF, H.; HENNE, A. *et al.* The genome sequence of *Methanosphaera stadmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted

to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 642-658, 2006.

FRIMMEL, F.H.; WEIS, M. Ageing effects of high molecular weight organic acids which can be isolated from landfill leachates. **Water Science and Technology**, v. 23, p. 419, 1991.

GALLERT, C.; BAUER, S.; WINTER, J. Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 495-501, 1998.

GARCIA, J-L.; OLLIVIER, B.; WHITMAN, W. B. The order Methanomicrobiales. In: DWORKIN, M. *et al.* (Ed.). **Prokaryotes**, v. 3, 3. ed. Minneapolis: Springer, 2006. p. 208-230.

GHALY, A.E. A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two-stage reactor. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 61-72, 1996.

GHOSH, S.; CONRAD, J. R.; KLASS, D. C. Anaerobic acidogenesis of wastewater sludge. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 47, n.1, p. 30-47, 1975.

GILLER, K. E.; WITTER, E. and MCGRATH, S. P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agriculture soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1389-1414, 1998.

GOMES, L. A. **Desempenho de um reator anaeróbio em bateladas sequenciais no tratamento de lixiviado proveniente da degradação de resíduo sólidos urbanos**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos). Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, 2008.

GONÇALVES, R. F.; NASCIMENTO, C. G.; FERRARI, G. F.; MULLER, P. S. G. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...** Rio de Janeiro, 1997.

GOOGLE EARTH. **Bairro Caximba: foto aérea**. Curitiba, 2010. Sem Escala.

GRIFFIN, M. E.; MCMAHON, K. D.; MACKIE, R. I.; RASKIN, L. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 3, p. 342-355, 1998.

GROTEHUIS, J. T. C.; SMIT, M.; PLUGGE, C. M.; XU, Y.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1942-1949, 1991.

GUJER, W.; ZEHNDER, J. B. Conversion process in anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 247-259, 1983.

GULSEN, H.; TURAN, M. Anaerobic treatability of sanitary landfill leachate in a fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 28, p. 297-305, 2004.

HAMADA, J. e MATSUNAGA, I. **Concepção do Sistema de Tratamento de Chorume para o Aterro Sanitário de Ilhéus-BA**. Trabalho apresentado no IX Congresso Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Seguro, 2000.

HARMSSEN, J., Identification of organic compounds in leachate from a waste tip. **Water Research**, v. 17, n. 6, p. 699, 1983.

HARMSSEN, H.J.M.; KENGEN, H.M.P.; AKKERMANS, A. D. L.; STAMS, A. J. M.; DE VOS, W. M. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1656–1663, 1996.

HOLLOPETER, J.A.; DAGUE, R. R. Anaerobic sequencing batch reactor treatment of landfill leachate. In: 49th Purdue Industrial Waste Conference. **Proceedings...** Chelsea, 1994.

HUANG, L. N.; ZHOU, H.; CHEN, Y. Q.; LUO, S.; LAN, C. Y.; QU, L. H. Diversity and structure of the archaeal community in the leachate of a full-scale recirculating landfill as examined by direct 16S rRNA gene sequence retrieval. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, n. 2, p. 235-240, 2002.

HULSHOFF-POL, L. W.; CASTRO LOPES, S. I.; LETTINGA, G.; LENS, P.N.L. Anaerobic sludge granulation. **Water Research**, v. 38, p. 1376-1389, 2004.

HWANG, K; SEUNG, G. S.; JAAI, I.; SEOKHWAN, H. Methanogenic profiles by denaturing gradient gel electrophoresis using order-specific primers in anaerobic sludge digestion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 269–276, 2008.

IM, J. H.; WOO, H. J., CHOI, M. W.; HAN, K. B.; KIM, C. W. Simultaneous organic and nitrogen removal from municipal landfill leachate using anaerobic-aerobic system. **Water Research**, v. 35, n. 10, p. 2403- 2410, 2001.

JARRELL, K.; SAULNIER, M. Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 551-554, 1988.

JERIS, J. S.; MCCARTY, P. L. The biochemistry of methane fermentation using C¹⁴ tracers. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 37, n. 2, p. 178-192, 1965.

JETTEN, M. S. M., STAMS, A. J. M., ZEHNDER, A. J. B. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxobryconium* and *Methanosarcina* spp. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 88, p.181–198, 1992.

KAO, M.C.; DURST, R. A. Detection of *Escherichia coli* using nucleic acid sequence-based amplification and oligonucleotide probes for 16S ribosomal RNA. **Analytical Letters**, v. 43, n. 10, p. 1756-1769, 2010.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137, 1965.

KENDALL, M. M.; BOONE, D. R. The order Methanosarcinales. In: DWORKIN, M. *et al.* (Ed.). **Prokaryotes**, v. 3, 3. ed. Minneapolis: Springer, 2006. p. 244-256.

KINGSLEY, D. H.; RICHARDS, G. P. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4152-4157, 2001.

KENNEDY, K. J.; LENTZ, E. M. Treatment of landfill leachate using sequencing batch and continuous flow upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. **Water Research**, v. 34, n. 14, p. 3640-3656, 2000.

KJELDTSEN, P.; BARLAZ, M. A.; ROOKER, A. P.; BAUN, A.; LEDIN, A.; CHRISTENSEN, T. H. Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 297-336, 2002.

KLET, N.; EDIL, T. B.; BENSON, C. H. Evaluation of Volatile Organic Compounds in Wisconsin Landfill Leachate and Lysimeter Samples. **Final Report to the University of Wisconsin System Groundwater Research Program**. Department of Civil and Environmental Engineering, of University Wisconsin, Madison, Wisconsin, 2005.

KOGA, Y.; MORII, H.; AKAGAWA-MATSUSHITA, M.; OHGA, M. Correlation of polar lipid composition with 16S rRNA phylogeny in methanogens: Further analysis of lipid component parts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 2, p. 230-236, 1998.

KOORNNEEF, E.; MACARIO, A. J. L.; GROTEHUIS, J. T. C.; DE MACARIO, E. C. Methanogens revealed immunologically in granules from five upflow anaerobic sludge blanket (UASB) bioreactors grown on different substrates. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, p. 225-230, 1990.

KRUEMPELBECK, I.; EHRIG, H.J. Long-term behavior of municipal solid waste landfills in Germany. In: Seventh International Waste Management and Landfill Symposium, v.1, Margherita di Pula, Cagliari. **Proceedings...Sardinia**, October 4-8, 1999.

KUGELMAN, I. J.; MCCARTY, P. L. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. Sludge feed studies. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 37, n. 1, p. 97-116, 1965.

LAHIRI, D. K.; NUREMBERG Jr, J. I. A rapid non enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**. v.

19, p. 5444, 1991.

LAPA, K. R. **Avaliação de desempenho do reator anaeróbio em batelada seqüencial (ASBR) contendo biomassa imobilizada em pedra pome para tratamento de esgoto sanitário.** Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.

LAY, J. J., LI, Y. Y., NOIKE, T., ENDO, J., ISHIMOTO, S. Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solids organic waste. **Water Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 493-500, 1997.

LAY, J. J.; LI, Y. Y.; NOIKE, T. The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion processes. **Water Environment Research**, v.70, n.5, p. 1075-1082, 1998.

LETTINGA, G. ; HULSHOFF POL, L. W. ; KOSTER, I. W.; WIEGANT, W. M.; DE ZEEUW, W. J.; RINZEMA A.; GRIN, P. C.; ROERSMA, R. E. HOBMA, S. W. High-rate anaerobic waste-water treatment using the uasb reactor under a wide range of temperatures conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 2, p. 253-284, 1984.

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

LIESACK, W., JANSSEN, P.G., RAINEY, F.A., WARD-RAINEY, N.L. and STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil : the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: VAN ELSAS, J. D. et al. (Ed.). **Modern Soil Microbiology.** New York: Marcel Dekker, 1997, p. 375- 439.

LIU, Y.; TAY, J. H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. **Water Research**, v. 36, n. 7, p. 1653-1665, 2002.

LIU, Y., TAY, J.H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 533-563, 2004.

MAHVI, A.H. Sequencing Batch Reactor: A Promising Technology in Wastewater Treatment. Iranian **Journal of Environmental Health, Science and Engineering**, v. 5, n. 2, p.79-90, 2008.

MANZ, W.; WENDT-POTTHOFFK, K.; NEW, T.R.; SZEWZYK, V.; LAWRENCE, J.R. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. **Microbial Ecology**, v. 37, p. 225-237, 1999.

MACLEOD, F. A.; GUIOT, S. R.; COSTERTON, J. W. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1598-1607, 1990

MARCHESI, J.R., WEIGHTMAN, A.J., CRAGG, B.A., PARKES, R.J.; FRY, J.C. Methanogenic and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, n. 3, p. 221-228, 2001.

MCCARTY, P. L.; MCKINNEY, R. E. Volatile acids toxicity in anaerobic digestion. Salt toxicity and anaerobic digestion. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 33, n. 3, p. 399, 1961.

MCCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals. **Public Works-** Parts 1, 2, 3 and 4. v. 95, n. 9, p. 107-112; n. 10, p. 123-126; n. 11, p. 91-94; n. 12, p. 95-99, 1964.

MCCARTY, P. L. Kinetics of waste assimilation in anaerobic treatment. **American Institute of Biology Science Developments in Industrial Microbiology**, v. 7, p. 144-145, 1966.

MCHUGH, S.; CARTON, M.; MAHONY, T.; O'FLAHERTY, V. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, p. 297-304, 2003.

MEYER, S. A. S.; MELO, T. O.; XAVIER, C. R. Efeito de compostos lignícos de efluentes de celulose Kraft sobre a atividade da biomassa de sistemas de tratamento aeróbico e anaeróbico. In: XIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. **Anais...Pato Branco**, novembro, 2008.

MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. Oxidation of hydrogen and reduction of methanol to methane is the sole energy source for a methanogen isolated from human feces. **Journal of Bacteriology**, v. 153, p. 1051-1055, 1983.

MING, L.; XUYA, P.; YOUCAI, Z.; HWASWAI, D.; GUOTAO, L.; ZHENGSONG, W. Microbial inoculums with leachate recirculated cultivation for the enhancement of MSW composting. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, n. 1-2, p. 885-891, 2008.

MIQUELETO, A. P. **Comportamento de reator anaeróbico operado em batelada seqüencial contendo biomassa imobilizada e submetido a aumento progressivo de substrato de fácil degradação**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.

MIZUKAMI, S.; TAKEDA, K.; AKADA, S.; FUJITA, T. Isolation and characteristics of Methanosaeta in paddy field soils. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 828-835, 2006.

MONTEGGIA, L. O. **The use of specific methanogenic activity for controlling anaerobic reactors**. Ph.D. Thesis. University of Newcastle upon Tyne, UK, 1991.

MONTENEGRO, M. A. P.; ARAUJO, J. C.; VAZOLLER, R. F. Microbial Community evaluation of anaerobic granular sludge from a hybrid reactor treating

pentachlorophenol by using fluorescence in situ hybridization. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 65-73, 2003.

MORAIS, J. L.; ZAMORA, P. P. Use of advanced oxidation processes to improve the biodegradability of mature landfill leachates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 123, p. 181-186, 2005.

MORVAN, B.; FONTY, G. Competition for hydrogen between acetogenic bacteria and methanogenic archaea. **Annales de Zootechnie**, v. 45, p. 353, 1996.

MÜLLER, V.; BLAUT, M.; GOTTSCHALK, G. Utilization of methanol plus hydrogen by *Methanosarcina barkeri* for methanogenesis and growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 269-274, 1986.

MUSSATI, M.; THOMPSON, C.; FUENTES, M.; AGUIRRE, P.; SCENNA, N. Characteristics of a methanogenic biofilm on sand particles in a fluidized bed reactor. **Latin American Applied Research**, v. 35, n. 4, p. 265-272, 2005.

NIEZAJ, E., OKONIEWSKA, E., KACPRZAK. Treatment of landfill leachate by sequencing batch reactor. **Desalination**, v. 185, p. 257-362, 2005.

OMIL, F.; MENDEZ, R.; LEMA, J. M. Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulphide and ammonia content. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 3, p. 269-278, 1995.

PATEL, G. B.; SPROTT, G. D. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("*Methanotrix concilii*") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 79-82, 1990.

PAVLOSTATHIS S. G.; GIRALDO-GOMEZ, E. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. **Critical Review in Environmental Control**. v. 21, n.5-6, p. 411-490, 1991.

PECHMAN, K. J.; WOESE, C. R. Characterization of the primary structural homology between the 16S ribosomal RNAs of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium* by oligomer cataloging. **Journal of Molecular Evolution**, v. 1, n. 3, p. 230-240, 1972.

PEREBOOM, J. H. F. Size distribution model for methanogenic granules from full scale UASB and IC reactors. **Water Science and Technology**, v.30, n.12, p.211-221, 1994.

PROMEGA. **Protocols and application guide**: nucleic acid amplification. rev. 12/2009.

PUROHIT, H. J., KAPLEY, A., MOHARIKAR, A. A., NARDE, G. A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 3, p. 315-323, 2003.

QASING, S. R.; CHIANG, W. **Sanitary Landfill Leachate**: generation, control and

treatment. Technomic, 1994, 339p.

QUIU, Z.; LIU, Y.; YANG, L.; WU, M.; WANG, Y. Treatment of landfill leachate by effective microorganism. **International Journal of Environment and Pollution**. v. 38, n. 1-2, 2009.

RASKIN, L.; STROMLEY, J. M.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. A. Group-specific 16S RNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1232-1240, 1994.

RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; CAMARGO, E. F. M.; ZAIAT, M.; BORZANI, W. Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 127-132, 2000.

RENOU, S.; GIVAUDAN, J. G.; POULAIN, S.; DIRASSOUYAN, F. and MOLIN,, P. Landfill leachate treatment: review and opportunity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, n. 3, p. 468- 493, 2008.

REYSENBACH, A. L.; GIVER, L. J.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. Differential amplification of RNA genes by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3417-3418, 1992.

RITA, F.; PINTO, R. O.; MATHIAS, W. G.; BELLI FILHO, P.; SOARES, H. M. Desempenho de um reator UASB em escala piloto para o tratamento de chorume de resíduos sólidos urbanos. In: Taller y Simposio Latino Americano sobre Digestión Anaerobia. **Proceedings...**v. 1, p. 162-165, México, 2002.

ROBINSON, R. W. Life cycles in the methanogenic archaeobacterium *Methanosarcina mazei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n.1, p. 17-27, 1986.

ROSS, W. R.; LOUW, J. M. Monitoring and control of anaerobic digestion. **Water SA**, v. 13, n.4, p. 193, 1987.

SAM-SOON, P.A.L.N.S.; LOEWENTHAL, R.E., DOLD, P.L.; MARAIS, G.R. Hypothesis for pelletisation in the upflow anaerobic sludge bed reactor. **Water SA**, V.13, N. 2, P 69-80, 1987.

SAWAYAMA, S.; TSUKAHARA, K.; YAGISHITA, T. Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 1, p. 69-76, 2006.

SAKAI, S.; IMASHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster Rice Cluster I. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 13, p. 4326 - 4331, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Molecular cloning: a laboratory manual. v. 1-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. **Microbiology and molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 262-280, 1997.

SCHLÜTER, A.; BEKEL, T.; DIAZ, N. N.; *et al.* The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. **Journal of Biotechnology**, v. 136, n. 1-2, p. 77-90, 2008.

SPSS Inc. **SPSS® 13.0 Command Syntax Reference**. Chicago, 2004.

SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K.; OHASHI, A.; HARADA, H. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotide reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1280-1288, 1999.

SELLAMI, I., TRABELSI, I., SAYADI, S.; *et al.* Characterization and anaerobic batch reactor treatment of Jebel Chakir Landfill leachate. **Desalination**, v. 248, p. 96-103, 2009.

SHIMADZU CORPORATION. Analytical measuring instruments division. **TOC-UV-CPH/ CPN Total Organic Carbon Analyser**. User's manual, Kyoto, Japão, 2003.

SOGIN, S. J.; SOGIN, M. L.; WOESE, C. R. Phylogenetic measurements in prokaryotes by primary structural characterization. *Journal of Molecular Evolution*, v. 1, n. 1, p. 173-184, 1972.

SOWERS, K. R.; BARON, S. F.; FERRY, J. G. *Methanosarcina acetivorans*, p. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 971-978, 1984.

SPROTT, G. D.; PATEL, G. B. Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 7, n. 2-3, p. 358-363, 1986.

SUNG, S., DAGUE, R. R. Laboratory studies on the anaerobic sequencing batch reactor. **Water Environment Research**, v. 67, n. 3, p. 294-301, 1995.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 625-630, 1996.

SMITH, K. S.; INGRAM-SMITH, C. Methanosaeta, the forgotten methanogen? **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 150-155, 2007.

TAJARUDIN, H. A.; ASAARI, F. A. H.; ISA, M. H. In : 1st Civil Engineering Colloquium. **Proceedings...** Penang, Malaysia, 2008

TEN, L. N.; IM, W-T; KIM, M-K; KANG, M-S; LEE, S-T. Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**,

v. 56, p. 357-382, 2004.

TOLKER-NIELSEN, T.; BRINCH, U. C.; RAGAS, P. C., ANDERSEN, J. B.; JACOBSEN, C. S.; MOLIN, S. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6482-6489.

UPTON, M.; HILL, B.; EDWARDS, C.; SAUNDERS, J. R.; RITCHIE, D. A.; LLOYD, D. Combined molecular ecological and confocal laser scanning microscopic analysis of peat bog methanogen populations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, n. 2, p. 275-281, 2000.

WANG, B.; SHEN, Y. Performance of an anaerobic baffled reactor as a hydrolysis-acidogenesis unit in treating landfill leachate mixed with municipal sewage. **Journal of Water Science and Technology**, v. 42, n. 12, p. 115-121, 2000.

WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WEISBURG, W. G., BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHITMAN, W. B.; BOWEN, T. L.; BOONE, D. R. The methanogenic bacteria. In: DWORKIN, M. *et al.* (Ed.). **Prokaryotes**, v. 3, 3. ed. Minneapolis: Springer, 2006. p. 165-207.

WIEGANT, W. M.; ZEEMAN, G. The mechanism of ammonia inhibition in the thermophilic digestion of livestock waste. **Agriculture wastes**, v. 16, n. 4, p. 243-253, 1986.

WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 5, p. 661-671, 2006.

WILLIAMS, J. G. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 971-974, 1967.

WENS, P., VERCAUTEREN, T.; DE WINDT, W.; VERSTRAETE, W. Factor inhibiting anaerobic degradation in a landfill. In: International Waste Management and Landfill Symposium. **Proceedings...Sardinia**, 2001.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domains: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, n. 11, p. 5088-5099, 1977.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. . **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

WOLFE, R. S. The formation of methane from biomass ecology, biochemistry and applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 38, n. 2, 198 – 201, 1982.

VANGULK, J. F.; ROWE, R.K. Influence of landfill leachate suspended solids on clog (biorock) formation. **Waste Management**., v. 24, n. 7, p. 723-738, 2004.

VAZOLLER, R. F.; GOMES, L. P.; BALDOCHI, V. M. Z.; VILLAS-BÔAS, D. M. F.; BADRA, R. J.; POLVINELLI, J. Biodegradability potential of two experimental landfills in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 87-92, 2001.

VELA, F. J. **Tratamento de esgoto sanitário em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais e periodicamente aerado**. 159f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

VICH, D. V. **Atividade metanogênica e comunidade microbiana envolvidas na degradação da metilamina**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

VIGNERON, V.; MAZÉAS, L.; BARINA, G.; AUDIC, J. M.; VASEL, J. L.; BERNET, N.; BOUCHEZ, T. Anaerobic digestion of municipal solid waste: a mass balance analysis. Tenth International Waste Management and Landfill Symposium, Margherita di Pula, Cagliari. **Proceedings...Sardinia**, October 3-7, 2005.

VIGNERON, V.; BUREAU, C.; BERNET, N.; BOUCHEZ; T. Effect of ammonia on the methanogenic diversity and activity in simulated MSW bioreactor landfills. Eleventh International Waste Management and Landfill Symposium, Margherita di Pula, Cagliari. **Proceedings...Sardinia**, October 1-5, 2007.

YANG, Y.; TADA, C.; MIAH, M. S.; TSUKAHARA, K.; YAGISHITA, T. and SAWAYAMA, S. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. **Materials Science and Engineering**, v. 24, n. 3, p. 413-419, 2004.

YU, Y.; LEE, C.; KIM, J.; HWANG, S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 670-679, 2005.

ZINDER, S. H.; CARDWELL, S. C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotrix sp.* as a important acetoclastic methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 4796-4807, 1984.

ZUMSTEIN, E.; MOLETTA, R.; GODON, J. J. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 69-70, 2000.

