

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS
CULTIVÁVEIS E DE ARQUÉIAS METANOGÊNICAS
NÃO CULTIVÁVEIS ENVOLVIDAS NA BIODIGESTÃO
ANAERÓBIA DO LIXO**

ORIENTADO: Juliana Cardinali Rezende
ORIENTADOR: Prof. (a) Andréa Maria Amaral Nascimento
CO-ORIENTADOR: Prof. Edmar Chartone de Souza

BELO HORIZONTE
Dezembro – 2007
Juliana Cardinali Rezende

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS
CULTIVÁVEIS E DE ARQUÉIAS METANOGÊNICAS NÃO
CULTIVÁVEIS ENVOLVIDAS NA BIODIGESTÃO
ANAERÓBIA DO LIXO**

Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado
em Genética do Departamento de
Biologia Geral do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito à
obtenção
do título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof. (a) Andréa Maria Amaral Nascimento

Co-Orientador: Prof. Edmar Chartone de Souza

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

2007

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus pais Sandra e Marcus Vinícius

Aos meus irmãos Rodrigo e Fabrício

Ao meu namorado Eduardo

As minhas cunhadas Ângela e Fernanda

A minha sobrinha Natália

Por acreditar em mim e me apoiar sempre!

Por me dar força para correr atrás dos meus sonhos!

Por estar sempre ao meu lado sorrindo, chorando, lutando e vivendo comigo
todos os momentos de alegrias, tristezas, angústias, certezas e incertezas.

Obrigada por fazerem parte da minha vida!!!!!!

Amo vocês!!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo dom da vida e principalmente por me dar saúde e força para correr atrás dos meus sonhos. Por iluminar o meu caminho!

Aos meus pais Marcus Vinícius e Sandra por tudo o que sou hoje, por toda paciência, dedicação e amor incondicional, por estarem sempre presentes em minha vida, ensinando-me a ser uma pessoa melhor. Por me apoiarem, me darem força e confiar em mim e no meu trabalho! Vocês são o um grande exemplo! Espero poder retribuir tudo o que fizeram por mim! Esta vitória é nossa!

Aos meus irmãos Rodrigo e Fabrício por todo cuidado, atenção, amizade, conselhos e conhecimentos passados. Pelo apoio e por todos os momentos de brincadeiras, alegrias!

Ao Eduardo, por todo o seu amor, amizade, carinho, paciência e compreensão, tornando especial cada momento da minha vida, lutando e sonhando comigo. Você está sempre nos meus pensamentos e no meu coração! Te amo muito!!!!

Ás minhas cunhadinhas lindas Ângela e Fernanda, grandes amigas e que a cada dia se tornam mais especiais em minha vida!

A minha sobrinha Natália que encanta os meus olhos e enche o meu dia de alegria!

Aos meus avós que não estão mais comigo, mas que deixaram muita saudade e que hoje são uma doce lembrança em meu coração. Em especial a vovó Itacira que sonhou comigo esta vitória! Saudades sempre !!!

Ao Felipe Colturato, por acreditar e confiar no meu trabalho. Por abrir várias portas durante a minha caminhada! Sempre terei muito que lhe agradecer.

Á professora Andréa Maria Amaral Nascimento pela brilhante orientação, amizade, carinho, paciência, dedicação e conhecimentos passados.

Ao professor Edmar Chartone pela dedicação, paciência e conhecimentos passados.

Ao professor Vasco Azevedo, com quem eu iniciei os estudos de genética.

Ao professor Anderson Miyoshi por me ensinar a dar os primeiros passos na pesquisa genética, por toda paciência, dedicação e amizade!

A professora Mônica Bucciarelli pelo carinho, amizade, conselhos e conhecimentos passados.

A professora Adlane Villas Boas pela amizade e conhecimentos passados.

Ao professor Eduardo Vieira Carneiro pela paciência, amizade e apoio.

Aos professores Evanguedes, Fabrício Rodrigues e Santuza Teixeira por me cederem os equipamentos e algumas vezes até o espaço em seus laboratórios para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao professor Ivanildo Evódio Marriel, Embrapa Milho e Sorgo, pelo apoio.

A Ana Maria e Renan pela amizade, paciência e por me ajudarem a desenvolver este trabalho.

A todos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Genética de Microrganismos pelo apoio e por todos os momentos de alegrias e tristezas compartilhados juntos!

A todos os amigos, colegas e professores que colaboraram e participaram do projeto de pesquisa: "Tratamento da fração sólida dos resíduos urbanos através da biometanização seca".

Às técnicas Andréa Reis, Paixão e em especial a Maria Rosa pela paciência, amizade, contribuições nos experimentos e na preparação de materiais.

A todos os amigos de MoC, de BH, da PUC, do LGCM, do LBEM, do NAGE, da especialização e do mestrado pela paciência, força, amizade, companheirismo e por todos os momentos de alegrias compartilhados juntos!

Aos coordenadores, professores e à secretária Marina do programa de Mestrado em Genética pela ajuda e dedicação.

A FAPEMIG, CAPES, CNPq e DEFLOR pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Destino do resíduo sólido coletado no Brasil em 2001.....	5
Figura 2 - Representação esquemática do processo de digestão anaeróbia.....	8
Figura 3 - Diversidade metabólica das comunidades bacterianas dos inóculos obtida por meio do Biolog EcoPlate.....	24
Figura 4 - Resposta metabólica média dos substratos utilizados pela comunidade bacteriana dos inóculos.....	25
Figura 5 - Produção de biogás no processo de biodigestão anaeróbia utilizando os diferentes inóculos.....	26
Figura 6 - Placa Biolog EcoPlate mostrando a formação da cor púrpura em alguns poços, devido à degradação do corante tetrazolium violeta pelas bactérias.....	27
Figura 7 - Morfotipos bacterianos crescidos em LB ágar a partir das amostras dos inóculos coletados nos poços das placas BiologEcoPlate.....	28
Figura 8 - Gel de agarose 1.5% representando os amplicons parciais dos genes de rRNAs 16S amplificados por PCR dos isolados bacterianos.....	28
Figura 9 - Àrvore filogenética das bactérias do inóculo lodo de reator UASB (LRU) construída a partir da amplificação do gene de rRNA 16S.....	30
Figura 10 - Àrvore filogenética das bactérias do inóculo lodo de lagoa anaeróbia (LLA) construída a partir da amplificação do gene de rRNA16S.....	31
Figura 11 - Àrvore filogenética das bactérias do inóculo conteúdo de rúmem bovino (RB) construído a partir da amplificação do gene de rRNA16S.....	32
Figura 12 - Àrvore filogenética das bactérias do inóculo fezes de suíno (SD) construído a partir da amplificação do gene de rRNA 16S.....	33
Figura 13 - Àrvore filogenética das bactérias do inóculo entrada de resíduo de suinocultura do biodigestor anaeróbio (ESD) construído a partir da amplificação do gene de rRNA 16S.....	34
Figura 14 - Àrvore filogenética das bactérias do inóculo saída de resíduo de suinocultura do biodigestor anaeróbio (SSSD) construído a partir da amplificação do gene de rRNA16S.....	35
Figura 15 - Ocorrência relativa dos gêneros bacterianos nos inóculos, baseada na análise do gene de rRNA 16S.....	37
Figura 16 - Gel de agarose 1,5% ilustrando a amplificação parcial dos genes de rRNA 16S e <i>mcr A</i> por PCR.....	44
Figura 17 - Gel de agarose 1,5% representando a amplificação parcial dos genes de rRNA 16S de bactéria (A) e arqueia (B) e o gene <i>mcr A</i> (C) dos clones.....	45
Figura 18 - Curvas de rarefação representando a diversidade observada dos clones	

sequenciados do gene <i>mcr A</i> das bibliotecas.....	46
Figura 19 - Distribuição dos clones do gene <i>mcr A</i> nas bibliotecas.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes de carbono presentes na placa Biolog EcoPlate categorizadas de acordo com Insan, 1997.....	18
Tabela 2 - Condições da PCR para amplificação do gene.....	20
Tabela 3 - Características fisiológicas das comunidades bacterianas presentes nos inóculos, pelo Biolog EcoPlate.....	23
Tabela 4 - Distribuição geral dos clones e OTUs das bibliotecas.....	46
Tabela 5 - Distribuição dos gêneros das arqueias metanogênicas observados nas Bibliotecas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

- DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
- FISH - Hibridização *in situ*, utilizando sondas fluorescentes
- DGGE - Eletroforese de Gel com Gradiente Desnaturante
- LRU - Lodo de reator UASB de esgoto sanitário
- UASB - Manta de limo anaeróbio de reator de fluxo contínuo
- LLA - Lodo da lagoa anaeróbia de efluente de matadouro
- RB - Excreta de rúmem bovino
- SD - Fezes de suíno
- ESD - Entrada de resíduos de suinocultura do biodigestor anaeróbio
- SSSD - Saída de resíduos de suinocultura do biodigestor anaeróbio
- DEFLOR - Empresa de Defesa Florestal
- WE - Índice de desenvolvimento de cor
- WA - Absorbância de cada poço
- W₀ - Absorbância do poço controle
- MD - Diversidade metabólica
- AMR - Resposta metabólica média
- L - Lixo domiciliar sólido a ser tratado
- LIXV - Lodo de reator UASB (lixiviado escolhido como melhor inóculo)
- LT - Lixo tratado por 40 dias (tratamento intermediário) nos biorreatores anaeróbios
- LF - Lixo final tratado por 90 dias (tratamento final) nos biorreatores anaeróbios
- OTU - Unidade Taxonômica Operacional

SUMÁRIO

Agradecimento Especial.....	I
Agradecimento.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
SUMÁRIO.....	VIII
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 - INTRODUÇÃO.....	3
1.1 - Considerações Iniciais.....	4
1.2 - Problema do lixo no Brasil.....	4
1.3 - Aplicações da digestão anaeróbia.....	6
1.4 - Microrganismos da digestão anaeróbia.....	7
1.5 - A metanogênese e o biogás.....	9
1.6 - Mecanismos bioquímicos e genéticos da metanogênese.....	10
1.7 - Identificação dos microrganismos e sua importância.....	12
2 - OBJETIVOS.....	15
2.1 - Objetivo Geral.....	15
2.2 - Objetivo Específico.....	15
2.2.1 - Capítulo I: Análise molecular e fisiológica de comunidades bacterianas de diversos inóculos para utilização em biorreatores anaeróbios.....	15
2.2.2 - Capítulo II: Identificação molecular das arqueias metanogênicas presentes no lixo domiciliar, antes, durante e após o tratamento em biodigestor anaeróbio.....	15
3 - Capítulo I: Análise molecular e fisiológica de comunidades bacterianas de diversos inóculos para utilização em biorreatores anaeróbios.....	16
3.1 - MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1.1 - Coleta das amostras.....	17
3.1.2 - Teste do perfil fisiológico da comunidade de bactéria presentes nos inóculos.....	17
3.1.3 - Cultivo das bactérias crescidas nas placas Biolog EcoPlate.....	19
3.1.4 - Contagem e análise morfológica das colônias bacterianas.....	19
3.1.5 - Coloração de Gram.....	19
3.1.6 - Extração do DNA.....	19
3.1.7 - Amplificação do gene de rRNA 16S.....	20
3.1.8 - Precipitação com polietilenoglicol (PEG) dos amplicons.....	20

3.1.9 - Sequenciamento dos amplicons do gene de rRNA16S.....	20
3.1.10 - Análise das sequências dos amplicons.....	21
3.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.2.1 - Características fisiológicas das comunidades bacterianas dos inóculos.....	22
3.2.2 - Cultivo das bactérias.....	27
3.2.3 - Identificação dos isolados bacterianos.....	28
3.3 - CONCLUSÕES.....	39
4 - Capítulo II: Identificação molecular das arqueias metanogênicas presentes no lixo domiciliar, antes, durante e após o tratamento em biodigestor anaeróbio.....	40
4.1 - MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1.1 - Coleta das amostras.....	41
4.1.2 - Extração do DNA total das amostras.....	41
4.1.3 - Amplificação do gene de rRNA 16S específicos para bactérias, arqueias e do gene <i>mcrA</i> das arqueias metanogênicas.....	41
4.1.4 - Construção da biblioteca dos genes de rRNA 16S de bactéria , arqueia e do gene <i>mcr A</i> de arqueias metanogênicas.....	42
4.1.5 - Extração do DNA plasmidiano.....	42
4.1.6 - Varredura das bibliotecas dos genes.....	42
4.1.7 - Sequenciamento dos amplicons do gene <i>mcr A</i>	42
4.1.8 - Análise das sequências dos amplicons.....	43
4.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.2.1 - Amplificação e construção das bibliotecas dos genes <i>mcr A</i> de arqueias metanogênicas e de rRNA 16S de arqueias e bactérias.	44
4.2.2 - Análise das bibliotecas do gene de <i>mcr A</i> das amostras.....	46
4.3 - CONCLUSÕES.....	52
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

O equacionamento do lixo se tornou uma meta comum nos países em desenvolvimento, sendo a utilização de biorreatores anaeróbios para o seu tratamento uma alternativa promissora. Entender os mecanismos de degradação da matéria orgânica é essencial para a otimização do processo sendo a escolha do inóculo a ser adicionado nos biorreatores importante para potencializar essa degradação e a produção do biogás. A análise fisiológica de seis inóculos foi realizada em placas Biolog Ecoplate sendo sua microbiota identificada a partir da sequência do rDNA 16S. O inóculo lodo de reator UASB (LRU) se mostrou como o melhor a ser utilizado em biodigestores anaeróbios devido a sua microbiota versátil, – maior diversidade metabólica e consumo médio das fontes de carbono em menor tempo, quando comparado com os outros inóculos. Estudos paralelos demonstraram também uma maior degradação do lixo e produção de biogás no biodigestor quando o inóculo LRU foi utilizado. As amostras dos poços das placas Biolog com a maior utilização do substrato foram utilizadas para o cultivo e isolamento de colônias. Assim, 182 isolados bacterianos foram identificados, onde 26% foram cocos, 26% bacilos, 5% diplococos e 4% cocobacilo Gram-negativos e 21% cocos, 15% bacilos, 2% diplococos e 1% cocobacilos Gram-positivos. A análise filogenética bacteriana dos inóculos do LRU, excreta de rúmem bovino (RB), lodo de lagoa anaeróbia (LLA) e entrada de resíduo de suinocultura (ESD) do biodigestor anaeróbio apresentou três filos: Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria. No inóculo fezes de suíno (SD), apenas os filos Proteobacteria e Firmicutes foram representados e no inóculo saída de resíduo de suinocultura (SSSD) do biodigestor anaeróbio apenas o filo Proteobacteria. A distribuição dos gêneros bacterianos diferiu consideravelmente nos seis inóculos, variando de seis a treze gêneros. Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* foram encontrados em cinco dos inóculos. A análise filogenética fortaleceu a escolha do inóculo LRU para ser utilizado, preferencialmente, nos biodigestores anaeróbios. A identificação das arqueias metanogênicas pela análise dos clones das bibliotecas do gene *mcr A* das amostras do lixo, inóculo LRU e do lixo tratado nos biorreatores anaeróbios a 35°C demonstrou a presença de seqüências pertencentes às ordens *Methanomicrobiales* e *Methanobacteriales*. Na amostra do lixo, o gênero *Methanobacterium* prevaleceu em relação ao gênero *Methanoculleus*. Em contraste com as amostras do lixo tratado e do inóculo LRU, onde o gênero *Methanoculleus* prevaleceu sobre o gênero *Methanobacterium*. Os gêneros *Methanosphaera* e *Methanothermobacter* também foram encontrados no inóculo LRU. Nas bibliotecas analisadas, todas as arqueias metanogênicas identificadas foram hidrogenotróficas, não sendo identificada arqueia metanogênica acetotrófica levando-se, então, a se supor que o biorreator anaeróbio estivesse passando por períodos de “stress” e/ou perturbação do processo.

ABSTRACT

Nowadays, the ecological treatment of garbage became a very common problem in the developing countries and the use of anaerobic bioreactors appears to be a promising alternative. The understanding of the mechanisms of degradation of organic matter is essential for the improvement of this process and the choice of inoculum to be added to the bioreactors. This study investigated six inoculums in Biolog Ecoplate plates and it identified the microbiota starting from analysis of sequence of rDNA 16S. The anaerobic sludge of UASB reactor inoculum (LRU) was shown as the best inoculum to be used in anaerobic bioreactors due to quite versatile microbiota, possessing the largest metabolic diversity and the largest medium consumption of sources of carbon in a shorter time than the other inoculums. Parallel studies demonstrated a larger degradation of the garbage and greenhouse production in the bioreactor when the anaerobic sludge of UASB reactor inoculum was used. The samples of the wells of Biolog plates with the largest use of substratum were used for cultivation and isolation of colonies. Altogether, 182 bacterial isolates were identified, where 26% were of Gram-negative cocci, 26% Gram-negative bacilli, 5% Gram-negative diplococci, 4% Gram-negative coccobacilli, 21% Gram-positive cocci, 15% Gram-positive bacilli, 2% Gram-positive diplococci and 1% Gram-positive coccobacilli. The phylogenetic bacterial analysis of inoculums of anaerobic sludge of UASB reactor, manure of bovine rumen (RB), sludge of anaerobic lagoon (LLA) and entrance of waste of swineculture from anaerobic bioreactor (ESD) presented three phyla: Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria. In the swine excrement inoculum (SD), just the phyla Proteobacteria and Firmicutes were represented and in the exit of waste of swineculture of anaerobic bioreactor inoculum (SSSD) just phylum Proteobacteria. The distribution of bacterial genera differed considerably in the six inoculums, varying from six to thirteen genera. The *Pseudomonas* and *Bacillus* genera were found in five inoculums. The phylogenetic analyses strengthened the choice of the anaerobic sludge of UASB reactor inoculum to be used in the anaerobic bioreactors. The identification of methanogenic archaea by the analysis of library clones of gene *mcr A* of garbage samples, anaerobic sludge of UASB reactor inoculums and of the treated garbage in the anaerobic bioreactors to 35°C demonstrated the presence of sequences belonging to *Methanomicrobiales* and *Methanobacteriales* orders. In the samples of garbage, the genus *Methanobacterium* prevailed in relation to the genus *Methanoculleus*. In the samples of the treated garbage and in the LRU inoculum, the genus *Methanoculleus* prevailed when compared to the genus *Methanobacterium*, however, in this last one, the *Methanosphaera* and *Methanothermobacter* genera were also found. In the analyzed libraries, all methanogenic archaea identified were hydrogenotrophic, and no acetotrophic methanogenic archaea were identified. It appears that the anaerobic bioreactor goes through periods of "stress" and/or disturbances during the process.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Considerações iniciais

Atualmente, o equacionamento do lixo se tornou uma meta muito comum nos países em desenvolvimento. No Brasil, estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de utilizar a digestão anaeróbia para o tratamento da matéria orgânica presente no lixo.

O processo de digestão anaeróbia é bastante complexo e envolve várias etapas de degradação da matéria orgânica que são desenvolvidas por diferentes espécies de microrganismos. O conhecimento de todo o processo da digestão anaeróbia e os fatores que interferem neste são fundamentais para que se possa aumentar a produção de metano, importante biogás que pode ser reutilizado nas plantas de tratamento de lixo como fonte de energia, assim como ser comercializado como crédito de carbono entre os países, devido ao seu alto valor agregado.

A última etapa da degradação da matéria orgânica – metanogênese – envolve as arqueias metanogênicas, anaeróbias estritas encontradas em vários ambientes e que utilizam diferentes substratos para a produção do metano, possuindo, portanto, características morfológicas e fisiológicas peculiares que as classificam em cinco ordens diferentes: *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales* e *Methanopyrales*.

A identificação de bactérias, arqueias e arqueias metanogênicas a partir da amplificação dos genes de rRNA 16S e *mcr A*, assim como o estudo desses microrganismos presentes em diferentes inóculos de biorreatores anaeróbios é importante para uma melhor compreensão do processo envolvido na degradação da matéria orgânica do lixo e otimização desse processo para o desenvolvimento de digestores mais modernos.

1.2 – Problema do lixo no Brasil

O crescimento populacional, aliado ao intenso desenvolvimento industrial e a rápida urbanização ocorrida nas últimas décadas, foi acompanhado pela produção de enormes quantidades de resíduos e da existência cada vez menor de áreas disponíveis para sua disposição. Portanto, um dos maiores desafios da sociedade contemporânea é o equacionamento do lixo urbano.

Segundo o IBGE (2004), no Brasil são produzidas 125 mil toneladas de resíduos sólidos domiciliares por dia, sendo a quantidade média produzida por pessoa em torno de 0,6 Kg. Esta quantidade varia de 0,4 Kg por habitante na região nordeste a 1,1 Kg por habitante na região sudeste. Deste total, cerca de 20% não são coletados regularmente, e dos 80% coletados – 100 mil toneladas – a maioria é disposta em lixões, sendo apenas 28 mil

toneladas destinadas de forma adequada a aterros sanitários e aterros controlados (Figura 1).

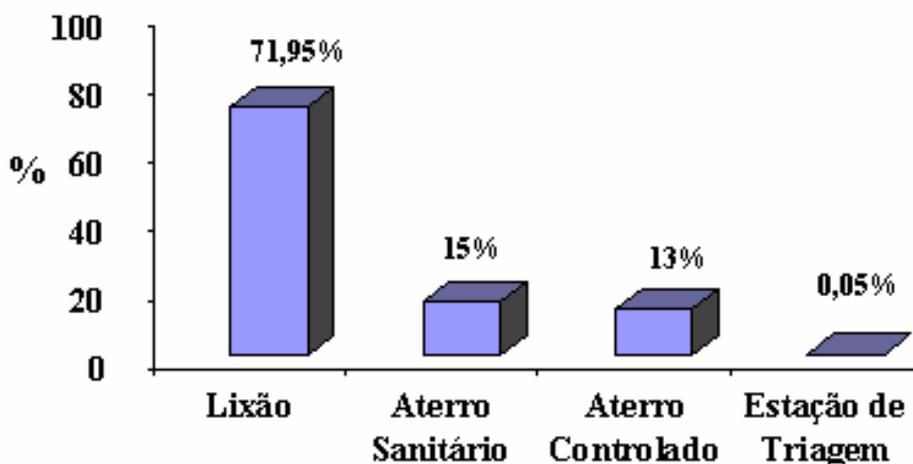


Figura1- Destino do resíduo sólido coletado no Brasil em 2001.

Fonte: IBGE, 2004.

Do total de resíduos sólidos domiciliares lançados em lixões, logradouros públicos, canais, margens de rios ou outro qualquer agente receptor, 50%, em média, correspondem à matéria orgânica putrescível – cascas de frutas, leguminosas, ossos, restos de comida, gramíneas entre outros. Nos lixões, essa matéria orgânica passa por processos aeróbios e anaeróbios efetuados pelos microrganismos encontrados no meio ambiente e no próprio lixo, gerando chorume (líquido lixiviado) com elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), ácidos graxos voláteis e em alguns casos, significativa concentração de metais pesados. Os lixões não dispõem de infra-estrutura básica, resultando em impactos ao ar, solo e lençóis freáticos, permitindo a proliferação de macro e micro vetores de microrganismos patogênicos, com conseqüências sociais e de saúde pública. Os gases dióxido de carbono e metano, emanados dos aterros sanitários, são causadores do efeito estufa, apesar destes possuírem sistemas de drenagem de gases (IPT/ CEMPRE, 2000).

Alternativas para o tratamento da matéria orgânica do lixo são cada vez mais requisitadas. No Brasil, tentativas como os processos aeróbios denominados compostagem têm sido desenvolvidos, porém, eles consomem alta energia, possuem baixa sustentabilidade e produzem odores, sendo quase sempre desativados. Um outro sistema de tratamento que pode ser utilizado é o processo biológico anaeróbio, denominado digestão anaeróbia. Diferentemente do processo aeróbio, no qual ocorre completa oxidação dos compostos orgânicos, a decomposição anaeróbia resulta em subprodutos orgânicos – como metano, sulfetos e amônia – ainda passíveis de posterior oxidação e

reutilização (Chynoweth *et al.*, 2002; Florêncio & Kato, 1999; Pavan *et al.*, 1998; Cecchi *et al.*, 1992).

1.3 – Aplicações da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é uma tecnologia que oferece proteção ao meio ambiente além da possibilidade de recuperação e utilização do gás metano como combustível, despertando por isso mais atenção (Chynoweth *et al.*, 2001; Foresti, 1997).

Em países como Dinamarca, Bélgica, Alemanha e Espanha a utilização de biodigestores anaeróbios para o tratamento de rejeitos orgânicos é crescente. A geração de energia, devido à elevada produção do biogás, faz da digestão anaeróbia uma alternativa bastante vantajosa para o tratamento de resíduos orgânicos – diferentemente do processo aeróbio que consome energia – levando a cada ano ao desenvolvimento de biodigestores mais modernos (Alves e Oliveira, 2004; Ahring *et al.*, 1995, 1992).

O processo de digestão anaeróbia também previne o acúmulo de material no meio ambiente e, conseqüentemente, a disseminação de doenças para a população, além de ser utilizado para a produção de adubo orgânico na agricultura (Taf Drup e Hjort-Gregersen, 1999).

O sucesso da digestão nos biorreatores aneróbios – grande produção de metano e degradação da matéria orgânica – está ligado a fatores ambientais e operacionais tais como: temperatura, pH, nível de amônia, taxa de carregamento, alimentação do biorreator, tipo e quantidade de inóculo (fonte adicional de microrganismos) utilizado para potencializar a digestão, modo operacional e tempo de retenção (McMahon *et al.*, 2001; Griffin *et al.*, 1998; Ahring *et al.*, 1995; Angelidaki e Ahring, 1994; Hobson *et al.*, 1993; Bhattacharya e Parkin, 1989).

A utilização do processo anaeróbio para tratamento de resíduos sólidos foi intensificada a partir da década de 60 e 70 (Peres *et al.*, 1991), ocorrendo também no Brasil, principalmente entre os suinocultores (Kunz *et al.*, 2004). Programas oficiais estimularam a implantação de muitos digestores focados principalmente na geração de energia, na produção de biofertilizantes e diminuição do impacto ambiental, mas, infelizmente, os resultados não foram os esperados e a maioria dos sistemas implantados foi desativada. Na década de 90, os sistemas de digestão anaeróbia foram replantados no Brasil com a finalidade de estabilizar a fração sólida de esgotos sanitários e de resíduos agrícolas.

1.4 – Microrganismos da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia ocorre a partir da interação de diversos grupos de microrganismos que trabalham em conjunto na conversão da matéria orgânica e na oxidação de compostos complexos em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico, amônia e outros produtos (Bell *et al.*, 2005; Curtis e Sloan, 2004; Loreau *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 1999).

Os microrganismos que participam do processo de decomposição anaeróbia são distribuídos em três importantes grupos, com comportamentos fisiológicos distintos: (1) bactérias fermentativas que transformam por hidrólise os polímeros em monômeros, e estes, em acetato, hidrogênio, CO₂, ácidos orgânicos de cadeia curta, aminoácidos e açúcares, (2) bactérias acetogênicas, que convertem os produtos gerados pelas bactérias fermentativas em acetato, hidrogênio e CO₂ e (3) arqueias metanogênicas, que utilizam os substratos produzidos pelas bactérias acetogênicas para a produção de metano e CO₂ (Foresti, 1997; Speece, 1996; Ferry, 1993).

A digestão anaeróbia é um processo no qual ocorrem trocas recíprocas de substratos entre diferentes grupos bacterianos e de arqueias presentes (Alves e Oliveira, 2004). A Figura 2 representa as etapas da degradação da matéria orgânica para a produção de metano.

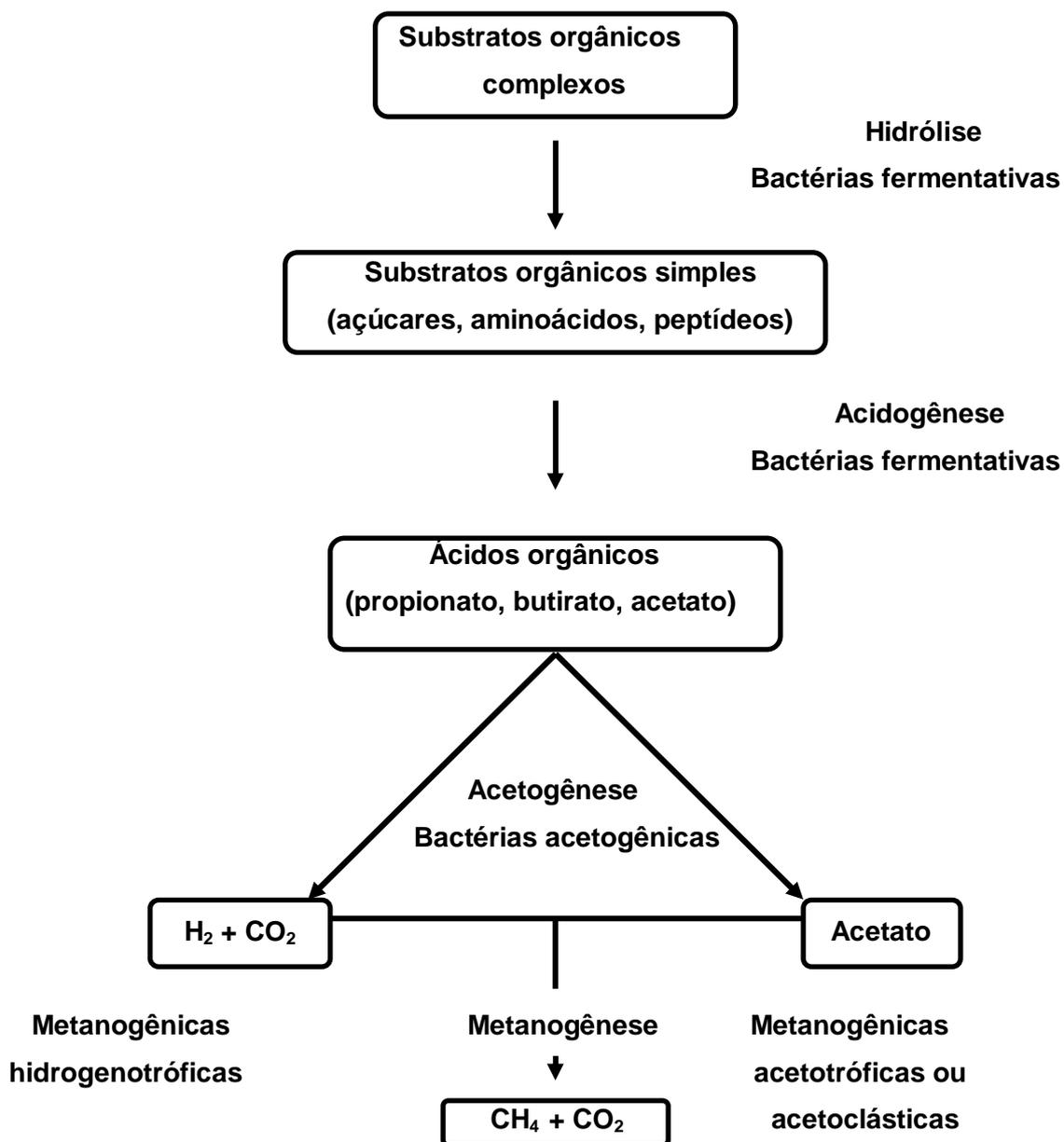


Figura 2 - Representação esquemática do processo de digestão anaeróbia.

Fonte: Chernicharo, 1997, modificado.

1.5 – A metanogênese e o biogás

A metanogênese é a última etapa no processo de degradação da matéria orgânica para a produção de metano e é comum em muitos ambientes anaeróbios tais como digestores (Raskin *et al.*, 1994), ruminantes (Miller *et al.*, 1986), arrozais (Joulian *et al.*, 1998), poços de petróleo (Olliver *et al.*, 1997), aterros (Fielding e Archer, 1988) e uma série de ambientes extremos (Garcia *et al.*, 2000).

Estritamente anaeróbias, as arquéias metanogênicas são responsáveis por toda a produção de metano, estimada em 5×10^8 ton./ano. Este processo metanogênico é fundamental para o ciclo do carbono (Rogers e Whitman, 1991).

O biogás produzido varia em qualidade de acordo com a composição e biodegradação da matéria orgânica, e em quantidade de acordo com a temperatura em que esta degradação ocorre. O biogás é incolor, insolúvel e de fraca densidade, sendo constituído por 70% de CH_4 , 29% de CO_2 e uma pequena fração de H_2S (Alves e Oliveira, 2004).

O metano obtido através do processo de tratamento da matéria orgânica dos resíduos domésticos, industriais e da agricultura é muito utilizado como fonte de energia alternativa (Wuebbles e Hayhoe, 2002), produzindo energia térmica através da queima direta em aquecedores, caldeiras, fogões, na propulsão de motores a combustão interna e na geração de energia elétrica. Geralmente, este é muito utilizado pela própria planta de tratamento da matéria orgânica, sendo o excedente comercializado. A média de produção de biogás é de 100 a 150 m^3 por tonelada de resíduo tratado com a digestão anaeróbia (Chynoweth *et al.*, 2001).

Além de ser uma fonte alternativa de energia, o biogás possui menos poluentes do que os combustíveis fósseis utilizados pelo homem – gasolina, diesel, gás natural e carvão mineral. Entretanto, um dos seus constituintes, o CH_4 , é considerado 20 vezes mais prejudicial do que o CO_2 , poluindo o meio ambiente e, conseqüentemente, agravando o efeito estufa, o que seria amenizado com a sua utilização industrial (Tilche e Malaspina, 1998).

O metano, por ser inflamável, é um gás do efeito estufa que pode ser utilizado como fonte de energia e comercializado através de “Reduções Certificadas de Emissões” ou “Créditos de Carbono”, de acordo com o Tratado de Kioto, assinado por 157 países e que entrou em vigor no ano de 2004. O principal objetivo deste é diminuir as emissões de gases do efeito estufa e levar à criação de possibilidades de investimentos em tecnologias que diminuam a geração ou “seqüestrem” gases do efeito estufa em países em desenvolvimento, o que seria de grande interesse (Yadvika *et al.*, 2004).

1.6 – Mecanismos bioquímicos e genéticos da metanogênese

As arqueias metanogênicas são membros do grupo *Archaea* caracterizados pela utilização do CO₂, H₂ e do acetato para a produção do metano. Com base no gene de rRNA 16S estas são divididas em cinco ordens: *Methanobacteriales*, *Methanopirales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales* (Boone *et al.*, 1993). O mecanismo bioquímico da metanogênese é bem estudado e o processo depende da participação de uma série de co-enzimas e aceptores de elétrons.

A metanogênese envolve um sistema metabólico onde a maior produção de metano está associada com a redução do grupo metil, do acetato, metanol e metilaminas. Do total de metano produzido pelas arqueias metanogênicas, dois terços são derivados da degradação do acetato, enquanto que um terço ocorre a partir da degradação do CO₂, utilizando elétrons derivados da oxidação do H₂ e do formiato (Welander e Metcalf, 2005).

Estudos bioquímicos extensivos têm levado a quatro vias para a metanogênese: (1) redução do CO₂ a metano – utilizando o hidrogênio como doador de elétrons, (2) redução do grupo metil em metano – que também utiliza o hidrogênio como doador de elétrons, porém, reduz o metanol em metano depois de transferir o grupo metil para a metil-coenzima M redutase – enzima presente em todas as arqueias metanogênicas, que cataliza a última etapa para a produção do metano, (3) redução do acetato para metano – o acetato é primeiramente ativado a acetil-CoA e o seu grupo carbonil é então oxidado para CO₂, seguindo a via de redução do CO₂, e o seu grupo metil é transferido para uma outra enzima tetrahidrometanopterina (H₄SPT) e subsequentemente, reduzido a metano, e (4) a via metilotrófica – envolvendo a redução do metanol e da metilamina em CO₂ e CH₄ (Welander e Metcalf, 2005).

A utilização do acetato como substrato para o crescimento e metanogênese é feita pelas arqueias metanogênicas pertencentes aos gêneros *Methanosarcina* e *Methanotherix*. As espécies pertencentes ao gênero *Methanosarcina* são as mais versáteis, uma vez que utilizam H₂, CO₂, CO, metanol, metilaminas e acetato como substratos para diferentes vias da metanogênese, enquanto que as outras arqueias metanogênicas são capazes de utilizar apenas um destes substratos (Ferry, 1993; Thauer *et al.*, 1993). A capacidade de utilizar mais de uma via para a metanogênese faz das arqueias pertencentes ao gênero *Methanosarcina* bastante atrativas para análise genética com o intuito de estudar os genes e as proteínas envolvidas no processo da metanogênese, como, por exemplo, as metil-coenzima M redutases I e II, que são essenciais para a produção do metano (Guss *et al.*, 2005; Pritchett e Metcalf, 2005).

Todas as arqueias metanogênicas expressam a metil-coenzima M redutase, que catalisa a etapa final da produção do metano e é dividida em metil-coenzima M redutase I e

metil-coenzima M redutase II (Thauer, 1998). As metil-coenzima M redutases I e II são compostas por diferentes subunidades – $\alpha_2 \beta_2 \gamma_2$ – codificadas, respectivamente, pelos genes *mcr A*, *mcr B* e *mcr G*, formando um hexâmero com massa molecular de aproximadamente 300 KDa (Galand, 2004; Galand, 2003). A estrutura do seu sítio ativo contém uma coenzima M e uma coenzima B, que compõem a holoenzima do gene *mcr A*, a partir da formação de ligações de heterodissulfeto entre a coenzima M e a coenzima B da metil-coenzima M e da coenzima B e subsequente liberação do metano (Galand, 2003; Luton *et al.*, 2002; Thauer, 1998).

Na metil-coenzima M redutase I, os genes *mcr A*, *mcr B* e *mcr G* estão localizados em uma única unidade transcricional denominada operon *mcr* BDCGA (5,0 Kb), onde também são encontrados os genes *mcr C* e *mcr D*, que não possuem função conhecida (Reeve, 1992; Weil *et al.*, 1988; Klein *et al.*, 1988).

A metil-coenzima M redutase II é encontrada apenas em alguns membros pertencentes às ordens *Methanobacteriales* e *Methanococcales*, sendo codificada por genes localizados no operon *mrt* BDGA (4,3 Kb), que difere do operon *mcr* apenas pela ausência do gene *mcr C*, sendo mesmo assim similar ao operon *mcr* quanto a sua função (Rospert *et al.*, 1990).

Contrastes na função desta atividade catalítica têm resultado em um alto grau de conservação na seqüência de aminoácidos das metil-coenzimas M redutases entre linhagens metanogênicas, e até mesmo entre aquelas filogeneticamente distantes. Esta estrutura primária conservada tem sido muito utilizada para o desenho de iniciadores mais específicos para a amplificação de fragmentos do gene *mcr A* (1,6 Kb) das arqueias metanogênicas encontradas na natureza, e subsequente classificação e construção de árvores filogenéticas (Hallam *et al.*, 2003; Grabarse, 1999). Atualmente a presença do gene *mcr A* é considerado um diagnóstico indicador de metanogênese no habitat estudado (Luton *et al.*, 2002; Lueders *et al.*, 2001; Ferry, 1999; Thauer, 1998; Reeve *et al.*, 1997). Entretanto, recentes investigações demonstraram a presença de genes *mcr A* também em arqueias anaeróbias que oxidam o metano – ANME – (Hallam *et al.*, 2003).

Todas arqueias metanogênicas conhecidas, inclusive aquelas que já possuem seu genoma completamente seqüenciado como, por exemplo, *Methanococcus jannaschii* (Ellermann *et al.*, 1988), *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Ermler *et al.*, 1997), *Methanosarcina acetivorans* (Ferry, 1992), *Methanopyrus kandleri* (Ferry, 1999) e *Methanococcus maripaludis* (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/>) possuem pelo menos um gene *mcr A* – conservado e informativo – que é utilizado em estudos filogenéticos (Ferry, 1992).

1.7 – Identificação dos microrganismos e sua importância

Antigamente a associação entre as populações microbianas da natureza e sua identificação era pouco explorada. Recentemente, a identificação de alguns microrganismos e a quantificação de suas populações que contribuem para o complexo sistema anaeróbio estão sendo alcançadas e se tornaram essenciais para se estabelecer uma ligação entre a estrutura destes e suas funções. A carência de estudos ocorria principalmente devido às limitações na identificação, utilizando ferramentas microbiológicas tradicionais (técnicas de enumeração, enriquecimento seletivo, pré-culturas para isolamento de microrganismos e contagem manual) que não podem ser utilizadas para o estudo dos microrganismos não cultiváveis, os quais compreendem a maioria das populações (Raskin *et al.*, 1994).

Atualmente, um dos métodos mais amplamente usados e dependentes de cultivo é o estudo do perfil fisiológico das comunidades de microrganismos a partir de sua utilização por diferentes fontes de carbono, o que tem sido permitido através do uso do Biolog EcoPlate. O sistema Biolog EcoPlate é baseado na utilização de 31 fontes diferentes de carbono, encontradas em triplicatas em placas de 96 poços. A utilização de cada substrato é determinada pela redução da fonte de carbono em conjunto com um corante chamado tetrazolium violeta, o qual resulta na formação de uma cor púrpura que pode ser detectada a partir de sua densidade óptica pelo espectrofotômetro (Garland e Mills, 1991). O perfil fisiológico das comunidades pode ser útil, para a avaliação de diversidade dos microrganismos de diversas amostras ambientais e sua combinação com métodos independentes de cultivo podem revelar as mais completas informações em torno das comunidades de microrganismos presentes nas amostras em estudo (Liesack *et al.*, 1997).

Uma das principais limitações para o estudo dos microrganismos não cultiváveis, como, por exemplo, as arqueias metanogênicas, é que apenas um número muito pequeno pode ser cultivado em laboratório e estudado utilizando técnicas da microbiologia tradicional. Atualmente, tentativas para o estudo das arqueias metanogênicas são feitas utilizando técnicas moleculares, uma vez que estas são muito fastidiosas e crescem de forma muito lenta exigindo condições extremamente anaeróbias, o que as tornam difíceis de serem cultivadas (Grosskopf *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 1997).

A partir do desenvolvimento de novas tecnologias, muitas ferramentas da biologia molecular estão sendo utilizadas para o estudo mais aprofundado das arqueias metanogênicas e de outros microrganismos não cultiváveis, como por exemplo, a utilização da técnica de FISH (fluorescent in situ hybridization) – hibridização *in situ*, utilizando sondas fluorescentes (Torsvik e Ovreas, 2002) e do DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) – eletroforese de gel com gradiente desnaturante (Silvey *et al.*, 2000), que podem ser utilizadas para o estudo da diversidade microbiana. Estas técnicas são muito apropriadas

para detectar mudanças na composição microbiana com o tempo ou para comparar a composição microbiana de diferentes biodigestores, como por exemplo, reatores funcionando sob temperatura mesofílica e termofílica (Calli *et al.*, 2006; Díasz *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2001).

O RNA ribossômico é frequentemente considerado a melhor ferramenta para inferir uma filogenia procariótica a um ser vivo, por ser conservado, ubíquo e informativo (Woese, 1987). Comparações entre sequências de diferentes microrganismos permitiram inferir uma relação evolucionária entre os organismos: quanto maior a similaridade ou diferença entre sequências de rRNAs, mais ou menos proximamente relacionados eles são. O nível de $\geq 97\%$ de similaridade entre sequências tem sido proposto para classificar um microrganismo no nível de espécie e de $\geq 95\%$ no nível de gênero (Drancourt *et al.*, 2000).

A utilização da PCR para a amplificação de seqüências muito conservadas como a dos genes de rRNA 16S (Levén *et al.*, 2007; Drancourt *et al.*, 2000; Godon *et al.*, 1997) e de genes funcionais codificando enzimas chaves de vias metabólicas características (denitrificação, fixação de nitrogênio, oxidação da amônia, oxidação do metano, metanogênese e redução de sulfato), como o gene *mcr A* responsável pela última etapa da produção de metano, também tem sido útil para a identificação de microrganismos não cultiváveis, pertencentes a diversos *habitats* como os ambientes extremos, onde as condições de crescimento não podem ser reproduzidas em laboratório, o que é o caso das arqueias metanogênicas (Kleikemper *et al.*, 2005; Philippot *et al.*, 2002; Luton *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002; Horz *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2001; Kowalchuck *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 1998; Groflokopf *et al.*, 1998; Ueda *et al.*, 1995). Uma das limitações dessas técnicas é não conseguir relacionar os microrganismos identificados à sua capacidade metabólica e fisiológica, o que pode ser complementado pelos métodos de cultivo (Kleikemper *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos têm focado a identificação dos microrganismos presentes nos biodigestores anaeróbios para o tratamento de vários tipos de resíduos como: resíduos sólidos municipais (Foster *et al.*, 2006), resíduos suínos (Padmasiri *et al.*, 2007), resíduos bovinos (Mladenovska *et al.*, 2003), esgoto municipal (Karakashev *et al.*, 2005), resíduos industriais de viniculturas (Godon *et al.*, 1997), substâncias tóxicas como 2,4 diclorofenol (Sponza e Cigal, 2006), metanol (Roeste *et al.*, 2005). Entretanto, poucos têm direcionado a identificação dos microrganismos presentes no lixo antes, durante e após o seu tratamento em biodigestores anaeróbios, assim como o estudo dos diferentes tipos de inóculos a serem utilizados nestes, para potencializar a degradação da matéria orgânica e acelerar produção de biogás. Foster-Carneiro *et al.* (2006) desenvolveram um trabalho sobre o tratamento em biorreatores anaeróbios de cinco diferentes resíduos municipais, utilizando como inóculo o

lodo proveniente de estações de tratamento de esgoto e excretas de suíno, porém não identificaram os microrganismos presentes nestes.

Conhecer a diversidade microbiana envolvida na degradação da matéria orgânica é de grande interesse para a biotecnologia ambiental, sendo o estudo destes microrganismos relevante, uma vez que a interação entre eles que dita o processo de digestão anaeróbia da matéria orgânica e a produção do metano.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Geral

Analisar e identificar por métodos moleculares e fisiológicos a diversidade da comunidade de procariotos presentes nos inóculos e no processo de digestão anaeróbia de lixo doméstico sólido tratado em biorreatores anaeróbios.

2.2 – Específico

2.2.1 – Capítulo I: Análise molecular e fisiológica de comunidades bacterianas de diversos inóculos para utilização em biorreatores anaeróbios

2.2.1.1 – Analisar o perfil fisiológico das comunidades de bactérias de diferentes inóculos.

2.2.1.2 – Identificar a partir da amplificação do gene de rRNA 16S as bactérias cultiváveis presentes nos inóculos: LRU – lodo de reator UASB (manta de limo anaeróbio de reator de fluxo contínuo) de esgoto sanitário; LLA – lodo da lagoa anaeróbia de efluente de matadouro; RB – excreta de rúmem bovino; SD – fezes de suíno; entrada (ESD) e saída (SSSD) de resíduos de suinocultura do biodigestor anaeróbio.

2.2.1.3 – Escolher o inóculo com maior potencial para ser utilizado no biodigestor anaeróbio.

2.2.2 – Capítulo II: Identificação molecular das arqueias metanogênicas presentes no lixo domiciliar, antes, durante e após o tratamento em biodigestor anaeróbio.

2.2.2.1 – Construir bibliotecas metagenômicas a partir da amplificação dos genes de rRNA 16S de bactérias, arqueias e do gene *mcr A* de arqueias metanogênicas.

2.2.2.2 - Sequenciar e analisar filogeneticamente o gene *mcr A*.

2.2.2.3 - Identificar arqueias metanogênicas presentes no lixo domiciliar sólido a ser tratado (L), no inóculo adicionado lodo de reator UASB (LIXV) – lixiviado escolhido como melhor inóculo – e lixo tratado por 40 dias (LT) – tratamento intermediário – nos biorreatores anaeróbios.

3 – Capítulo I

**Análise molecular e fisiológica de
comunidades bacterianas de diversos
inóculos para utilização em biorreatores
anaeróbios**

3.1 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 – Coleta das amostras

Os inóculos: LRU - lodo de reator UASB (manta de limo anaeróbio de reator de fluxo contínuo) – coletado na altura média de um reator UASB do Centro Experimental da UFMG (ETE Arrudas); LLA – lodo da lagoa anaeróbia – coletado na RM Frigorífico, Belo Horizonte (MG); RB – excreta de rúmem bovino – coletado na RM Frigorífico, Belo Horizonte (MG); SD – fezes de suíno; entrada (ESD) e saída (SSSD) de resíduo de suinocultura de biodigestor anaeróbio – coletado em Ponte Nova (MG), foram cedidos pelos responsáveis pelo funcionamento e monitoramento dos biodigestores anaeróbios do laboratório da empresa de Defesa Florestal (DEFLOR/Ltda), em Contagem, MG.

3.1.2 – Teste do perfil fisiológico da comunidade de bactéria presentes nos inóculos

Foram inoculados 5 ml de cada amostra líquida ou 5g de excreta de rúmem bovino em 50 ml de salina, que foram agitados por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 10 ml de cada suspensão foram centrifugados em tubos falcons de 15 ml e subsequentemente filtrados com filtros Millipore 5 µm. As amostras filtradas foram diluídas para 10^{-2} e 120 µl de cada amostra foram adicionados em cada poço da placa Biolog EcoPlate (Biolog Inc., 1993).

As placas Biolog EcoPlate continham triplicatas de 31 fontes de carbono diferentes (Tabela 1), três poços sem nenhuma fonte de carbono, apenas água (utilizados como controle negativo), e corante indicador tetrazolium de violeta. As seis placas, sendo uma para cada tipo de inóculo, foram conservadas a 28°C na ausência de luz para subseqüentes leituras da DO em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas no espectrofotômetro a uma absorbância de 590 nm.

Tabela 1: Fontes de carbono presentes na placa Biolog EcoPlate categorizadas de acordo com Insan, 1997

Categoria	Fontes de Carbono
Polímero	tween 40, tween 80, α -ciclodextrina e glicogênio.
Carboidrato	d-ácido-galactônico, γ -lactona, i-eritritol, d-celobiose, α -d-lactose b-metil-d-glucosídio, d-xilose, d-manitol, n-acetil-d-glicosamina.
Ácido carboxílico	ácido pirúvico, metil-ester, ácido-d-galacturônico, ácido-d-málico, ácido- α -ketobutírico, ácido- γ -hidroxibutírico, ácido-itacônico, ácido-d-glicosamínico, ácido-glycil-l-glutâmico.
Aminoácido	l-asparagina, l-arginina, l-fenilalanina, l-serina, l-treonina.
Fenólico	ácido-4-hidroxibenzóico, ácido-2-hidrobencóico.
Amina/Amida	fenilatilamina, putrecina
Miscelânea	d-l- α -glicerol-fosfato, glicose-l-fosfato

A utilização de cada fonte de carbono foi detectada pela redução do corante tetrazolium violeta dependente da respiração do microrganismo, o qual resulta na mudança para a cor púrpura, que foi quantificada e monitorada. Foram determinadas quais fontes de carbono foram utilizadas pela microbiota de cada tipo de inóculo quando o índice de desenvolvimento de cor (WE) foi maior do que 100, de acordo com Ibekwe & Kennedy (1998) sendo que:

$$WE = \frac{WA - W_0}{W_0} \times 100$$

Onde: WE – Índice de desenvolvimento de cor

WA – Absorbância de cada poço

W_0 – Absorbância do poço controle

A diversidade metabólica (MD) da microbiota dos seis inóculos foi calculada somando o número de respostas positivas (substratos consumidos) para cada placa Biolog EcoPlate e a resposta metabólica média (AMR) dos substratos utilizados pela microbiota de cada inóculo de acordo com a fórmula:

$$AMR = \frac{\sum(D.O. \text{ well} - D.O. \text{ neg})}{31}$$

31

Todos estes dados somados produziram um perfil fisiológico para cada tipo de inóculo de acordo com as instruções em Biolog Inc. (1993).

3.1.3 – Cultivo das bactérias crescidas nas placas Biolog EcoPlate

Os poços correspondentes a cada fonte de carbono das placas Biolog EcoPlate onde se observou maior intensidade de cor, foram analisados. Para isto, 100 µl da amostra de cada poço foram cultivados em 4 ml de meio TSB (Tryptic Soy Broth, Merck) líquido por 18 horas a 28°C. Após o cultivo, as amostras foram diluídas em salina até 10^{-7} e 100 µl de cada amostra foram semeadas com alça de Drigalski em placas contendo meio TSA (Tryptic Soy Agar). As placas foram incubadas por até quatro dias a 28°C.

3.1.4 – Contagem e análise morfológica das colônias bacterianas

As colônias que cresceram em cada placa foram contadas e analisadas quanto à sua morfologia: cor, textura, forma, presença ou não de halo e consistência. As colônias morfológicamente diferentes foram selecionadas e armazenadas a -70°C em meio TSB líquido com 8% de glicerol.

3.1.5 – Coloração de gram

A colônia bacteriana foi espalhada sobre uma lâmina contendo 5 µl de salina e flambada no fogo para sua fixação. Durante o processo de coloração cobriu-se toda a lâmina com a solução cristal de violeta. A lâmina ficou repousando por dois minutos e posteriormente foi lavada com água corrente. Adicionou-se a solução de lugol sobre a superfície da lâmina, após 2 minutos, enxaguou-se a lâmina retirando toda a solução e pingou-se sobre ela três gotas de éter acetona deixando-o agir por 30 segundos a 1 minuto. Posteriormente, a lâmina foi lavada cuidadosamente de forma que toda a sua superfície ficasse transparente. Adicionou-se a solução de safranina e deixou-a agindo por 5 segundos, lavando-a, posteriormente, com água corrente. A lâmina foi colocada para secar e seguiu-se a sua visualização ao microscópio óptico, para observar se as colônias eram Gram-positiva (cor roxa) ou Gram-negativa (cor rosa), e quanto a sua morfologia: cocos, bacilos, diplococcus, cocobacilo, espirilo, etc. As lâminas foram fotografadas.

3.1.6 – Extração do DNA

A extração do DNA de cada isolado bacteriano foi realizado utilizando-se o protocolo de extração de DNA modificado de Sambrook *et al.* (1989).

3.1.7 – Amplificação do gene de rRNA 16S

O gene de rRNA 16S utilizado para a identificação, foi amplificado por PCR, após a sua otimização, usando os iniciadores específicos para bactérias 8F 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' e 907R 5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3', (Lane, 1991, modificado).

Para a montagem da reação de PCR foi utilizando o Hot Star Taq Master Mix KIT e 25 ng do DNA de cada isolado. As condições do ciclo estão apresentadas na Tabela 2. As reações foram amplificadas em termociclador da marca Eppendorf. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

Tabela 2: Condições da PCR para amplificação do gene

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Observação
Desnaturação Inicial	95	15 minutos	
Desnaturação	94	60 segundos	
Anelamento dos iniciadores	55	60 segundos	Ciclo será repetido 1 vez A temperatura cairá 1°C a cada 2 ciclos de 55° C a 47° C. Ao chegar a 47° C o ciclo será repetido 11 vezes.
Extensão	72	3 minutos	
Extensão final	72	7 minutos	

3.1.8 – Precipitação com polietilenoglicol (PEG) dos amplicons

Os amplicons foram precipitados de acordo com o protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989).

3.1.9 – Sequenciamento dos amplicons do gene de rRNA16S

O protocolo de sequenciamento foi feito seguindo-se sugestões encontradas na literatura e recomendações do fabricante do seqüenciador MegaBace (Amersham Biosciences).

3.1.10 – Análise das sequências dos amplicons

As análises das seqüências rDNA 16S foram processadas usando-se o pacote que contém os programas Phred/ Phrap/ Consed, em sistema operacional Linux, para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20), alinhamento e edição das seqüências, para geração de uma seqüência consenso de alta qualidade para cada isolado (Ewing e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Em seguida, as sequências geradas foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank do National Center of Biotechnology Information (NCBI) e no Ribosomal Database Project II (RDP), para análise de similaridade. Para o alinhamento das seqüências obtidas foram usados os programas CLUSTAL W e MEGA 4,0 (Kumar *et al.*, 2004). Árvores filogenéticas foram construídas por neighbor-joining com o programa MEGA 4,0.

3.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 – Características fisiológicas das comunidades bacterianas dos inóculos

O estabelecimento de perfis fisiológicos de comunidades bacterianas a partir da utilização de diferentes fontes de carbono presentes nas placas Biolog EcoPlate, tem sido há muito tempo utilizada para o estudo de diferentes amostras: solo (Gomes *et al.*, 2004; Albiach *et al.*, 2000; Gorlenko e Kozhevin, 1994; Bossio e Scow, 1995; Vahjen *et al.*, 1995), rizosferas (Ellis *et al.*, 1995; Garland, 1996), adubo orgânico (Insam *et al.*, 1996) e biodigestores (Weber, 2006; Werker *et al.*, 2004; Grove, 2004; Victorio *et al.*, 1996; Garland e Mills, 1994).

Nos seis inóculos testados (LRU, LLA, RB, SD, ESD e SSSD) observou-se uma grande diversidade de perfis fisiológicos (Tabela 3). Isto era esperado, uma vez que estes eram oriundos de diferentes ou da mesma fonte, mas em diferentes etapas do processo, como ocorreu com os inóculos ESD e SSSD (Tabela 3).

Tabela 3: Características fisiológicas das comunidades bacterianas presentes nos inóculos, pelo Biolog EcoPlate.

Fontes de carbono	Inóculos					
	LRU	LLA	RB	SD	ESD	SSSD
B-metil-D-glucosídio	+	-	+	+	-	+
D-ácido galactônico – γ -lactona	+	-	+	-	+	-
L-arginina	+	-	+	+	-	+
Ácido pirúvico metil ester	+	-	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+
D-ácido galacturônico	+	-	+	+	+	+
L-aspargina	+	-	+	+	+	+
Tween 40	+	-	+	+	-	+
i-eritritol	+	-	+	+	-	+
2-Ácido hidroxibenzóico	-	-	+	-	-	-
L-fenilalanina	+	-	-	+	-	+
Tween 80	+	-	+	+	+	+
D-manitol	+	-	+	+	+	+
4-Ácido hidroxibenzóico	+	-	+	+	-	+
L-serina	+	-	+	+	+	+
A-ciclodextrina	-	-	+	+	+	+
N-acetil-D-glicosamina	+	-	+	+	+	+
Γ -ácido hidroxibutírico	+	-	+	+	+	+
L-treonina	+	-	-	-	-	-
Glicogênio	+	-	+	+	+	+
D-ácido glicosamínico	+	-	+	-	+	+
Ácido iltacônico	+	-	+	+	-	+
Ácido glycil-L-glutâmico	+	-	+	+	+	+
Celobiose	+	-	+	+	+	+
Glicose 1 fosfato	+	-	+	+	+	+
α Ácido ketobutírico	-	-	+	-	-	-
Fenilatilamina	-	-	+	+	+	+
α - D- lactose	+	-	+	+	+	+
D-L- α - glicerol fosfato	+	-	+	-	+	+
D-ácido málico	+	-	+	+	-	+
Putrecina	+	-	+	+	-	+

LRU – lodo de reator UASB; LLA – lodo da lagoa anaeróbia; RB – excreta de rúmem bovino; SD – fezes de suíno; entrada (ESD) e saída (SSSD) de resíduo de suinocultura de biodigestor anaeróbio

A maior diversidade metabólica (29 fontes de carbono consumidas) foi observada no inóculo RB, seguido pelos inóculos LRU e SSSD com 27 fontes de carbono consumidas (Figura 3). Em contraste, o inóculo LLA apresentou a menor diversidade metabólica, ou seja, uma pobre resposta fisiológica, pois utilizou uma única fonte de carbono, D-xilose. Alguns autores relatam que neste caso as bactérias não apresentam versatilidade metabólica – utilização de diferentes fontes de carbono – e poucas tem capacidade de crescer em alguns substratos (Haack *et al.*, 1995), além de requerem um tempo maior para se adaptar às

condições ambientais, devido às forças seletivas nos poços – pH, temperatura de incubação, fontes de carbono – diferentes do seu habitat original, ou a falta de interação dos microrganismos presentes (Ullrich *et al.*, 1996). Outra hipótese é que o corante tretazolium violeta tenha sido tóxico as bactérias ou ainda que a densidade celular necessária para a utilização dos substratos tenha sido inferior a 10^8 UFC/ml, como descrito por Haack *et al.* (1995). Sabe-se, que a baixa densidade celular resulta em menor consumo de fontes de carbono, uma vez que o seu consumo está diretamente ligado ao crescimento bacteriano (Garland,1996; Bossio e Scow, 1995). Estudos utilizando o Biolog EcoPlate para analisar o perfil fisiológico de comunidades microbianas do solo (DiGiovanni *et al.*,1997; Smalla *et al.*,1996) relataram que a diversidade de microrganismos crescidos nos poços foi bem menor do que aquela encontrada nas amostras originais e que forças de seleção diferenciais também ocorreram, o que também pode ter ocorrido com o inóculo LLA.

Alguns substratos, como L-treonina, foram utilizados apenas pelos microrganismos do inóculo LRU e o α -ácido-cetobutírico e 2-ácido-hidroxibenzóico consumidos exclusivamente pelo inóculo RB (Tabela 3). Deve-se ressaltar que entre 48 e 72 horas observou-se um aumento do consumo de diferentes fontes de carbono em cinco dos seis inóculos, sendo o inóculo LLA a exceção (Figura 3).

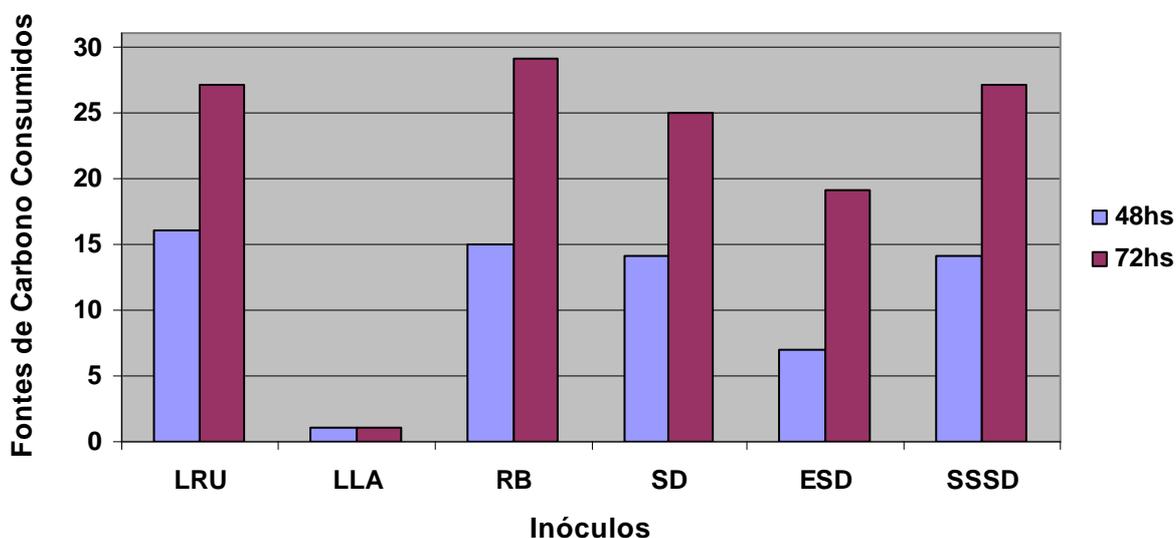


Figura 3 – Diversidade metabólica das comunidades bacterianas dos inóculos obtidos por meio do Biolog EcoPlate.

Considerando que a diversidade metabólica dos inóculos LRU, RB e SSD foi similar, conhecer a média de resposta metabólica, ou seja, o consumo médio das fontes de carbono de cada inóculo é importante para inferir qual dos inóculos apresentou a maior degradação em relação à quantidade de substrato consumido por sua microbiota (Figura 4).

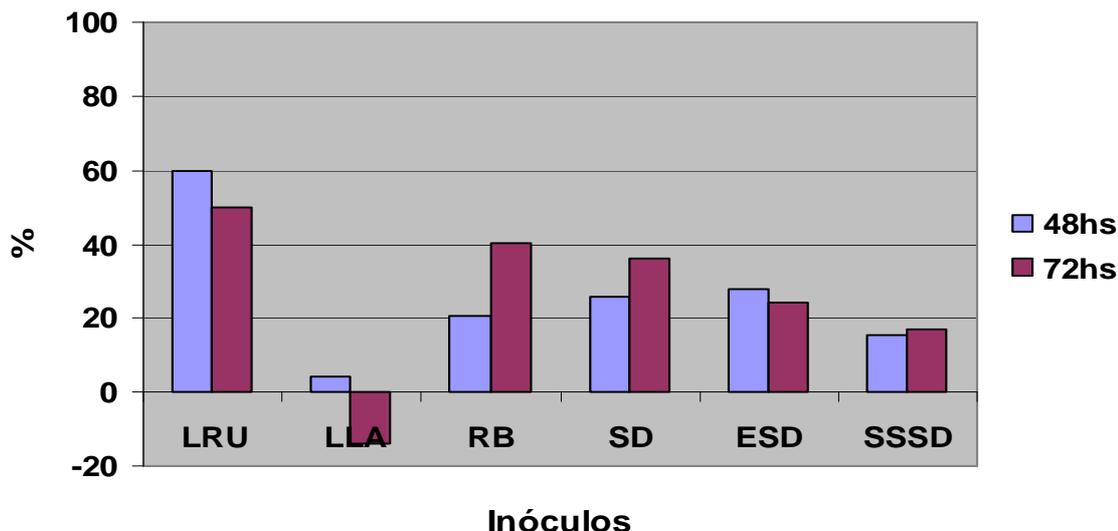


Figura 4 – Resposta metabólica média dos substratos utilizados pela microbiota dos seis inóculos.

Como se observa na Figura 4, a maior resposta metabólica média foi observada no inóculo LRU em 48 horas, ocorrendo uma redução de 10% em 72 horas, evidenciando assim uma rápida degradação das fontes de carbono pela microbiota desta amostra neste período de tempo. Nos inóculos ESD, RB, SD e SSSD a média de resposta metabólica foi bem inferior, quando comparado com o inóculo LRU. No inóculo ESD o consumo médio dos substratos foi de aproximadamente 25% em 48 horas, mas caiu em 72 horas. Já nos inóculos RB, SD e SSSD, foi observado a aceleração no consumo médio das fontes de carbono após 48 horas. Os resultados sugerem que a degradação dos substratos pelas comunidades bacterianas destes inóculos ocorreria em um tempo superior a 72 horas e que a leitura das placas Biolog EcoPlate, assim como do inóculo LLA, poderia ter sido feita em um período maior, como por exemplo, 96 e 120 horas.

A menor resposta metabólica média foi observada para o inóculo LLA, chegando a se tornar negativa no período de 72 horas, uma vez que esta foi calculada para apenas uma única fonte de carbono consumida dentre o total de fontes da placa Biolog EcoPlate.

De acordo com os resultados obtidos, o inóculo LRU se mostrou como o melhor inóculo a ser utilizado em biodigestores anaeróbios para potencializar a degradação da matéria orgânica dos resíduos, pois demonstrou possuir uma microbiota bastante versátil – com uma maior diversidade metabólica –, que foi responsável pelo maior consumo médio das fontes de carbono em menor tempo do que os outros inóculos, o que é um dos pré-requisitos para o bom rendimento dos biodigestores anaeróbios, pois reduzindo o tempo de retenção do resíduo a ser tratado, economiza-se gastos com mão de obra e energia.

Estudos visando encurtar a duração destes processos já vêm sendo estudados há alguns anos e, em decorrência, períodos menores de incubação das placas de Biolog EcoPlate (em torno de 12 horas) também já foram utilizados para detectar a dinâmica de lixiviados com potencial para serem utilizados como inóculo em biodigestores anaeróbios (Victoria *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos em experimentos desenvolvidos paralelamente a este, pelos engenheiros ambientais (do projeto que participamos: Tratamento da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos através da biometanização seca – FAPEMIG/PAPPE - EDT: 1866/04) responsáveis pelo monitoramento dos biodigestores anaeróbios na empresa DEFLOS/Ltda também indicaram o LRU como o melhor inóculo a ser utilizado em biodigestores anaeróbios.

Com o monitoramento da degradação da matéria orgânica do lixo e a produção de biogás utilizando os seis inóculos diferentes, sob as mesmas condições – quantidade de lixo e inóculo na proporção de 3:1 respectivamente, temperatura (mesofílica - 35°C) e pH – observou-se maior degradação do lixo (dados não apresentados) e maior produção de biogás (Figura 5) na biodigestão onde se utilizou a amostra LRU como inóculo.

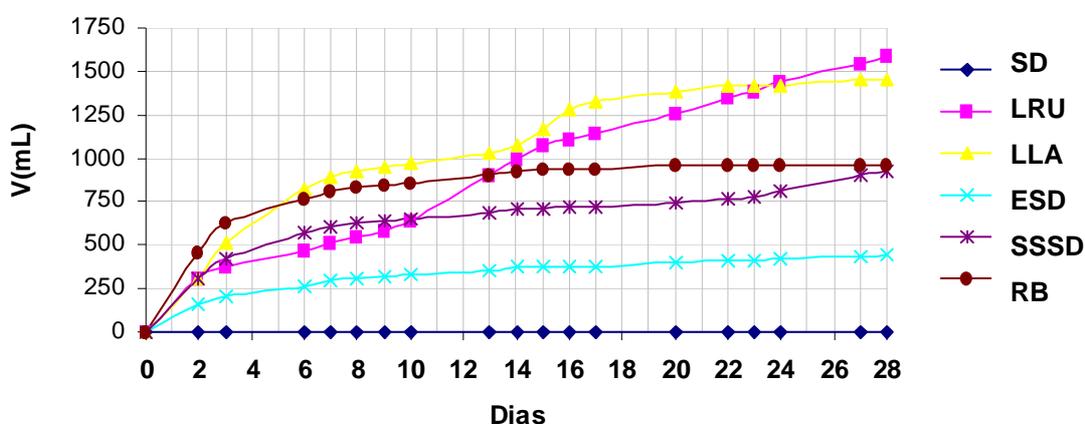


Figura 5 – Produção de biogás no processo de biodigestão anaeróbia utilizando os diferentes inóculos.

Dados gentilmente cedidos pelo professor Dr. Eduardo Carneiro.

A biodigestão com o inóculo LLA apresentou a segunda maior produção final de biogás. Porém, a partir 16º dia a produção de biogás estabilizou, ao contrário da biodigestão com o inóculo LRU em que a produção acumulada de biogás continuou crescendo. Assim, os dados da produção de biogás no processo de biodigestão anaeróbia estão em concordância com os resultados obtidos do Biolog EcoPlate, o qual também considerou o

inóculo LRU como o melhor a ser utilizado na partida dos biodigestores anaeróbios, no início do tratamento.

É bem conhecido que para uma maior degradação de resíduos e produção de biogás em biodigestores anaeróbios, a escolha do inóculo, a identificação dos microrganismos presentes, a qualidade e a quantidade do inóculo a ser adicionado são fatores importantes durante a partida dos biodigestores anaeróbios (Hobson e Wheatley, 1993). Portanto nos testes realizados, o inóculo LRU apresentou os melhores resultados nos testes realizados sendo considerado então o melhor inóculo a ser utilizado nos biodigestores anaeróbios para o tratamento do lixo.

3.2.2 – Cultivo das bactérias

Após a leitura de 72 horas das placas Biolog EcoPlate com os seis inóculos, as bactérias presentes nos poços, correspondentes às diferentes fontes de carbono, onde se formou a maior intensidade de cor (Figura 6), foram cultivadas.

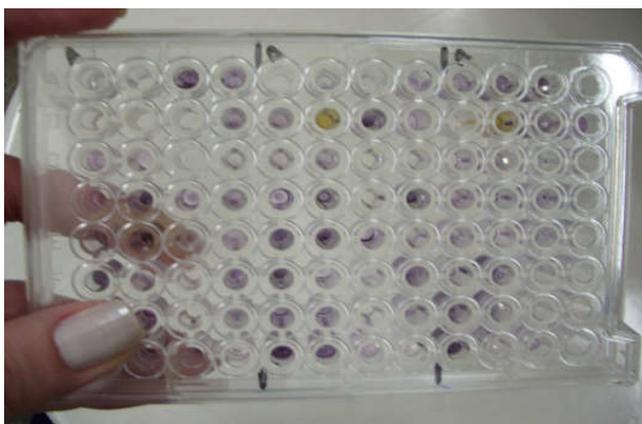


Figura 6 – Placa BIOLOG Ecoplate mostrando a formação da cor púrpura em alguns poços devido a degradação do corante tetrazolium violeta pelas bactérias.

As colônias bacterianas com diferentes morfotipos (Figura 7) foram selecionadas e classificadas quanto ao Gram e morfologia. Dos 182 isolados selecionados 26% foram cocos Gram-negativos, 26% bacilos Gram-negativo, 5% diplococos Gram-negativo, 4% cocobacilo Gram-negativo, 21% cocos Gram-positivo, 15% bacilos Gram-positivo, 2% diplococos Gram-positivo e 1% cocobacilos Gram-positivo.

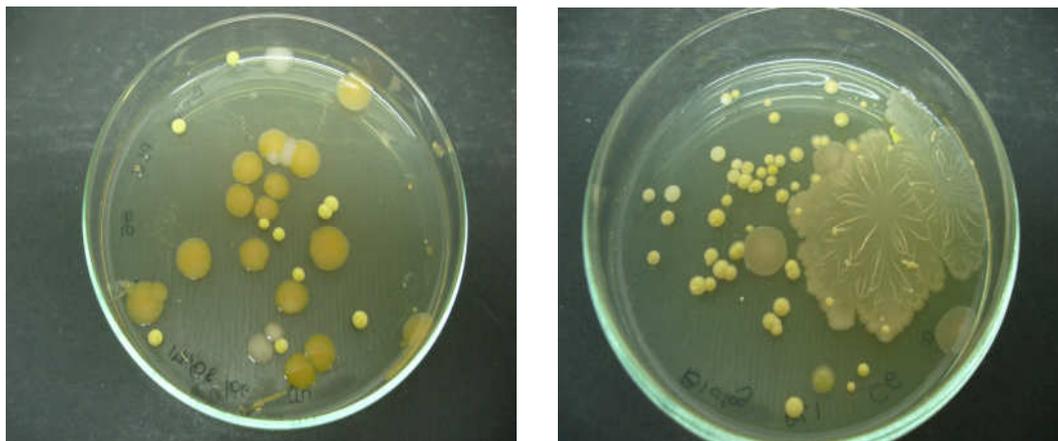


Figura 7 – Morfotipos bacterianos crescidos em TSA a partir das amostras dos inóculos coletadas nos poços das placas Biolog EcoPlate.

3.2.3 – Identificação dos isolados bacterianos

A extração do DNA total dos isolados bacterianos foi realizada e o gene de rRNA 16S foi amplificado parcialmente por PCR, produzindo amplicons de 950 pb visualizados no gel de agarose 1,5% com brometo de etídeo (Figura 8).

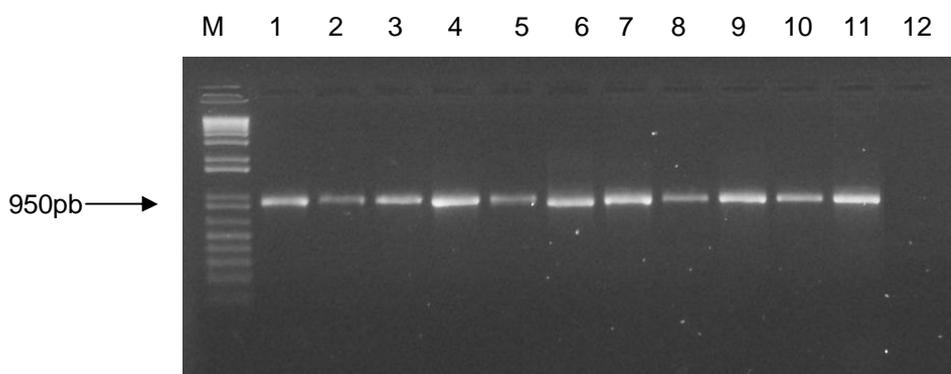


Figura 8 – Gel de agarose 1.5% representando os amplicons parciais dos genes de rRNA 16S amplificados por PCR dos isolados bacterianos. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen, EUA); 1-10: amplicons parciais dos genes de rRNA 16S dos isolados bacterianos; 11: Controle positivo – amplicon parcial do gene de rRNA 16S da bactéria *Escherichia coli* K12; 12: controle negativo.

A identificação dos isolados bacterianos foi realizada pelo sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S e análise da sequência. O tamanho das seqüências analisadas foi de 850 pb.

Um total de 182 isolados bacterianos foi analisado e identificado em nível de gênero. As árvores filogenéticas (Figuras 9 a 14) revelaram as relações filogenéticas entre os isolados.

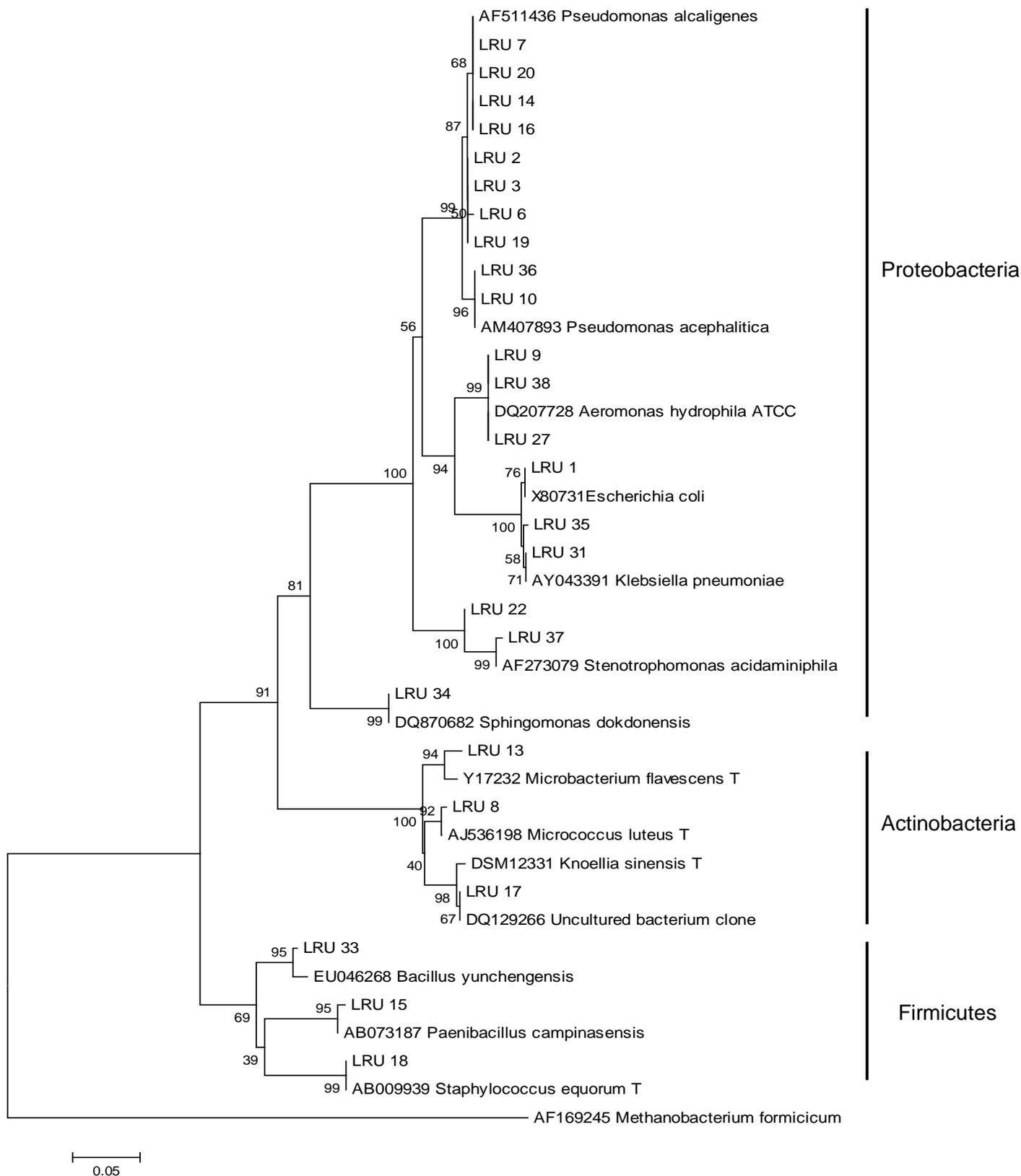


Figura 9 – Árvore filogenética das bactérias do inóculo lodo de reator UASB (LRU) construída a partir da amplificação do gene de rRNA 16S. Valores de bootstrap >50%. *Methanobacterium formicicum* foi usado como “outgroup”.

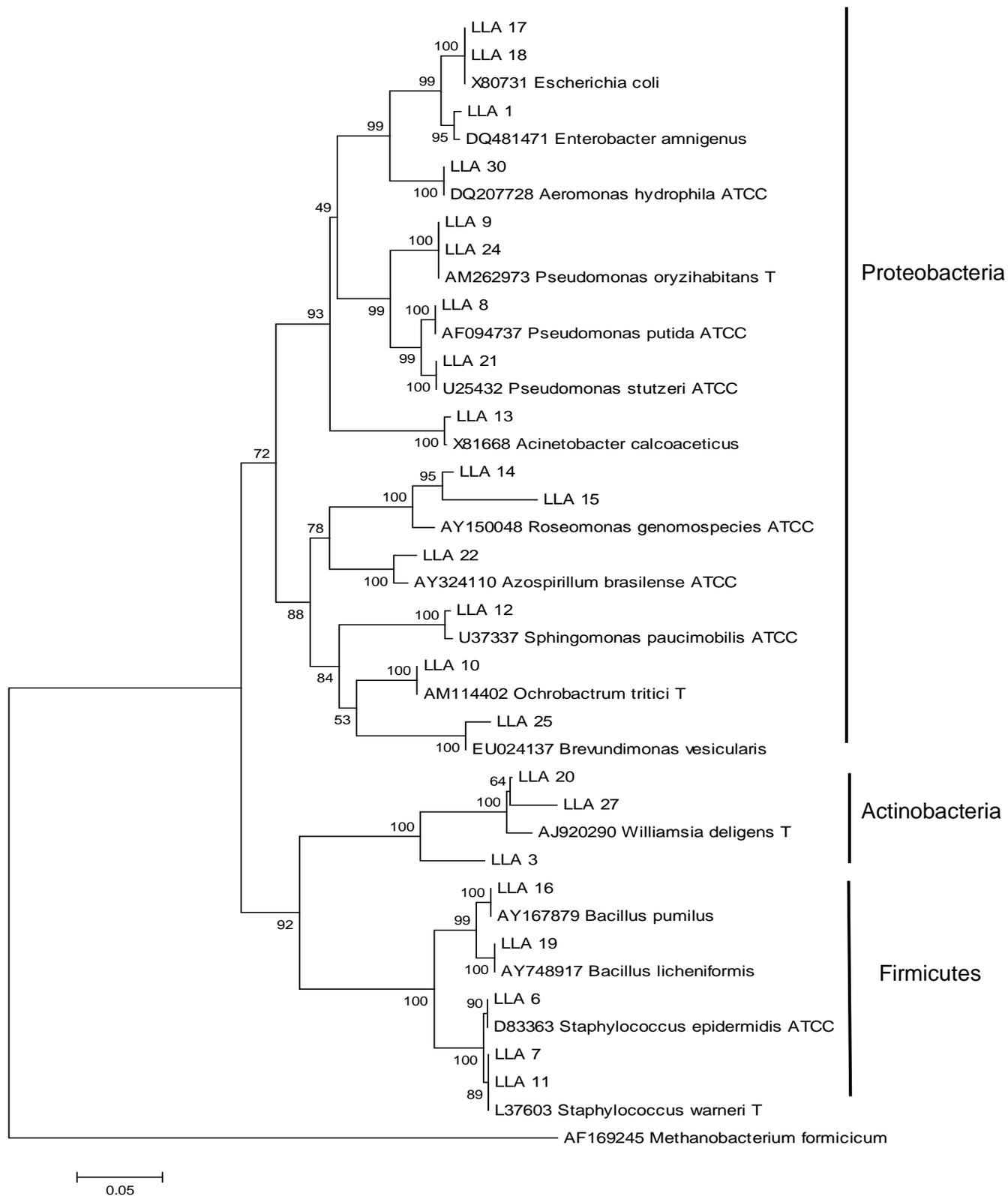


Figura 10 – Árvore filogenética das bactérias do inóculo lodo de lagoa anaeróbia (LLA) construída a partir da amplificação do gene de rRNA16S. Valores de bootstrap >50%. *Methanobacterium formicicum* foi usado como “outgroup”.

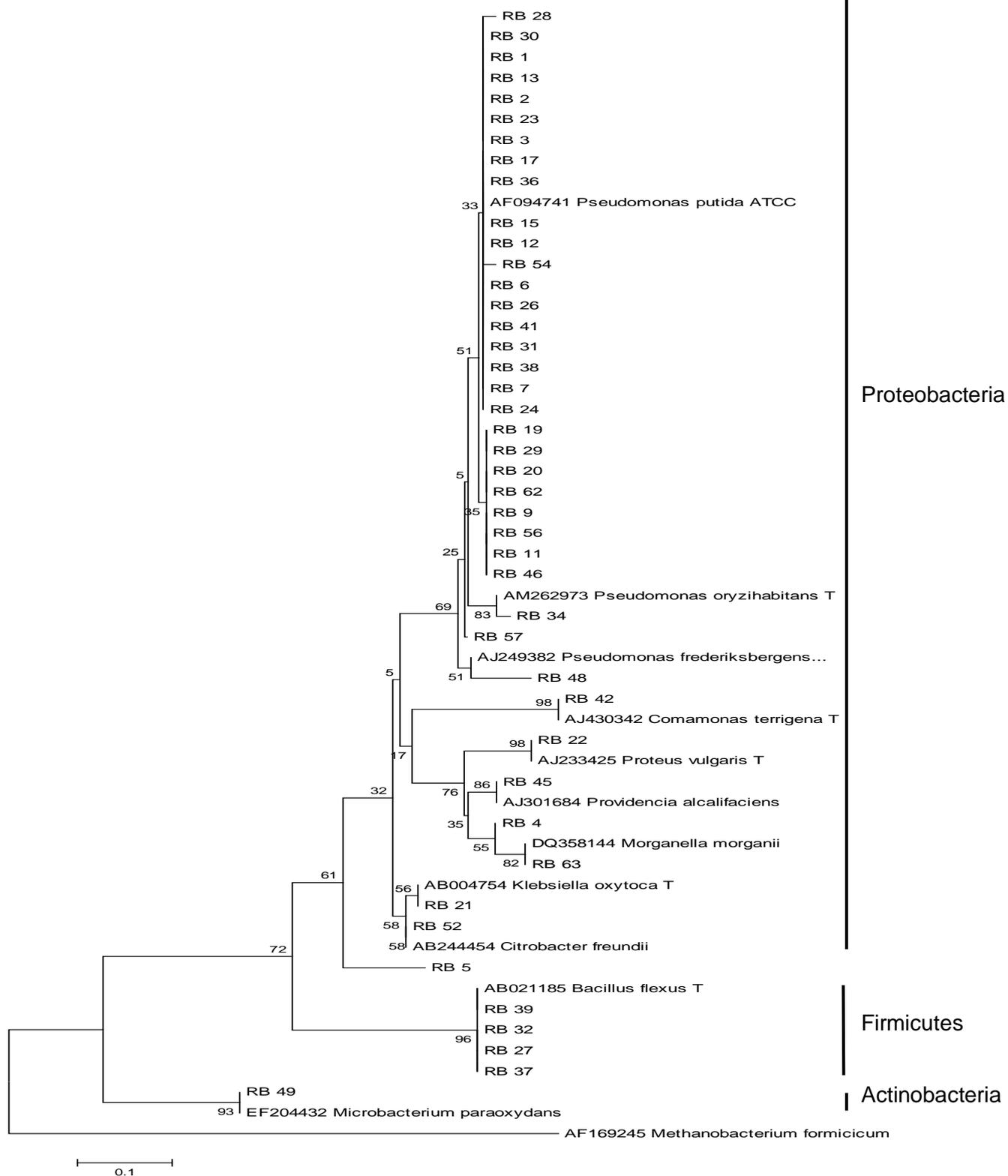


Figura 11 – Árvore filogenética das bactérias do inóculo excretas de rúmem bovino (RB) construído a partir da amplificação do gene de rRNA16S. Valores de bootstrap >50%. *Methanobacterium formicicum* foi usado como “outgroup”.

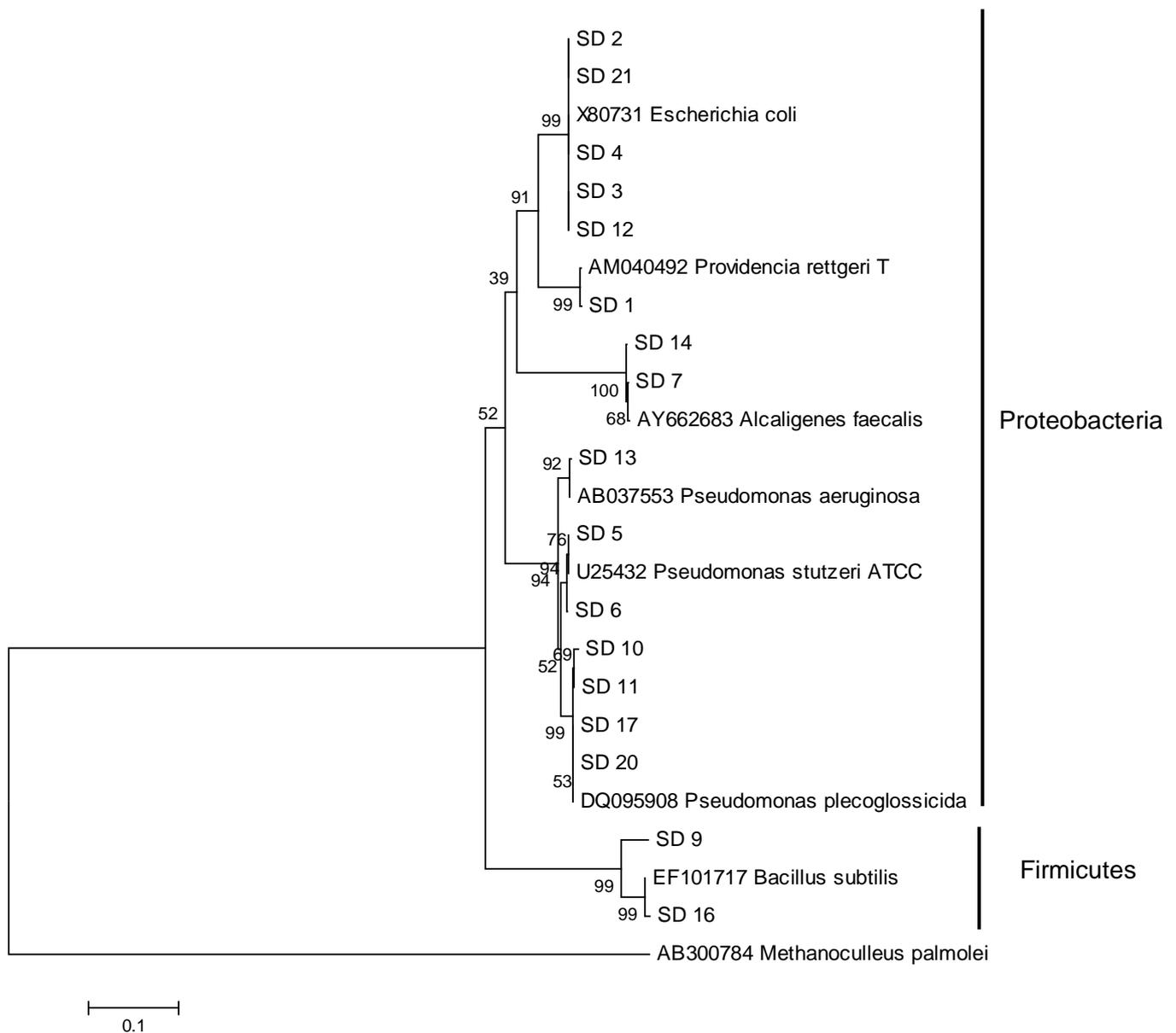


Figura 12 – Árvore filogenética das bactérias do inóculo fezes de suíno (SD) construído a partir da amplificação do gene de rRNA 16S. Valores de bootstrap >50%. *Methanoculleus palmolei* foi usado como “outgroup”.

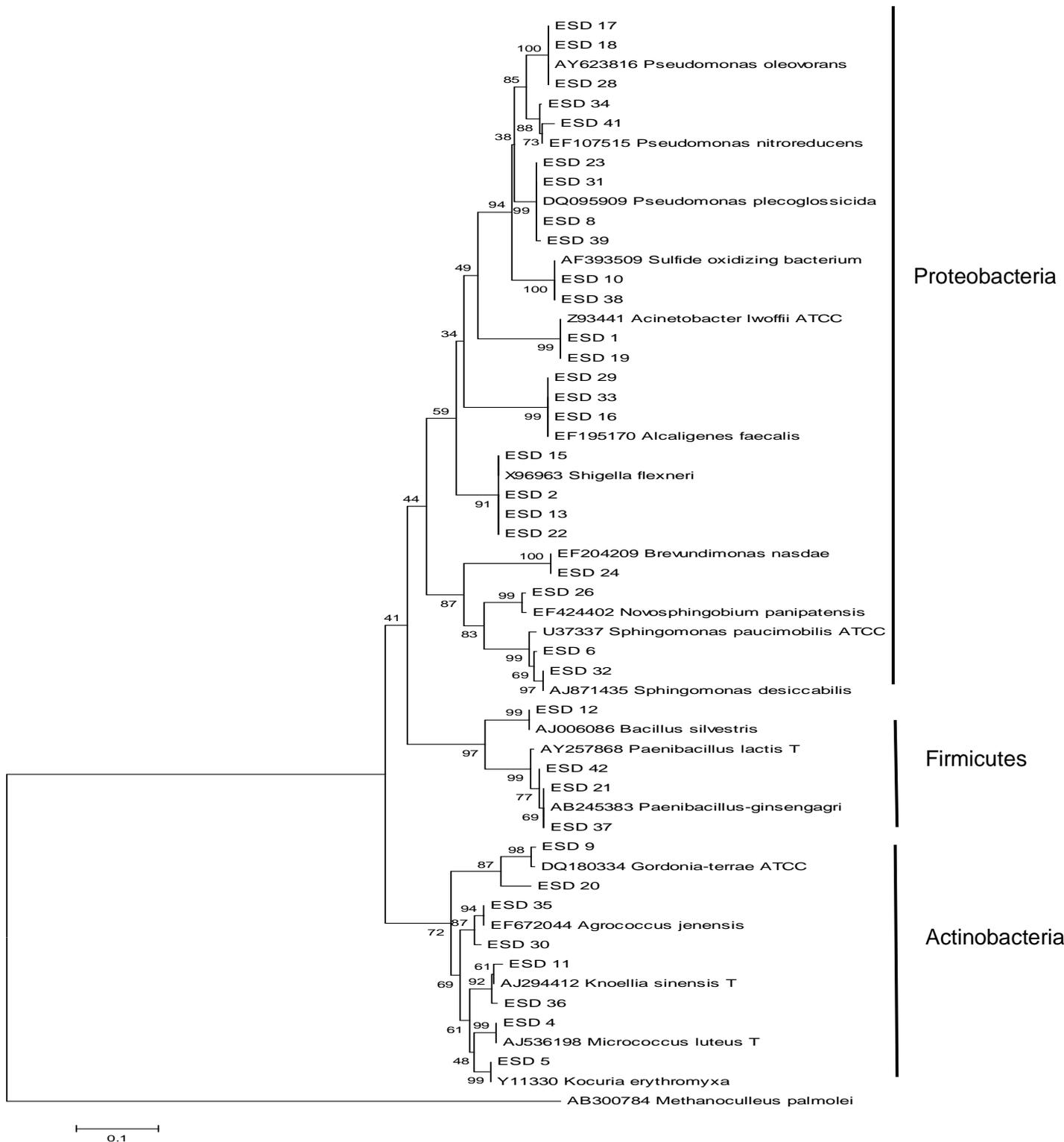


Figura 13 – Árvore filogenética das bactérias do inóculo entrada de resíduo de suinocultura do biodigestor anaeróbico (ESD) construído a partir da amplificação do gene de rRNA 16S. Valores de bootstrap >50%. *Methanoculleus palmolei* foi usado como “outgroup”.

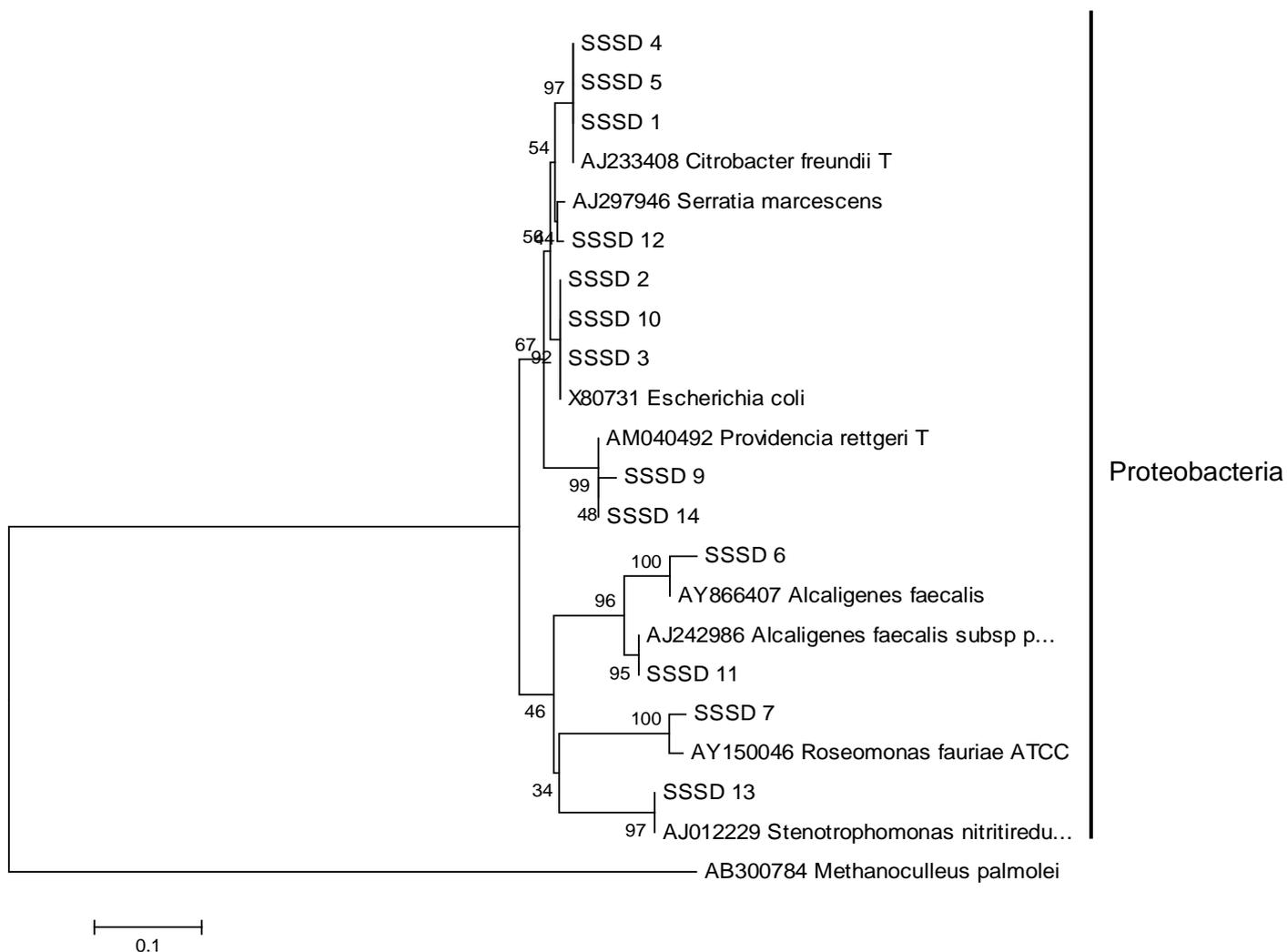


Figura 14 – Árvore filogenética das bactérias do inóculo saída de resíduo de suinocultura do biodigestor anaeróbio (SSSD) construído a partir da amplificação do gene de rRNA16S. Valores de bootstrap >50%. *Methanoculleus palmolei* foi usado como “outgroup”.

A análise filogenética dos inóculos LRU, LLA, RB, ESD (Figuras 9, 10, 11 e 13, respectivamente) apresentou três filios: Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria. A análise dos isolados revelou uma predominância de Proteobacteria (LRU, 76%; LLA, 68%; RB, 88% e ESD, 61%) que foi representado pelos gêneros: *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia* e *Klebsiella* (LRU), *Escherichia*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Roseomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Ochrobactrum* e *Azospirillum* (LLA), *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* e *Klebsiella* (RB) e *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Brevundimonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Shigella* e *Pseudomonas* (ESD). Os outros isolados bacterianos do LRU foram agrupados como Firmicutes (12%), representado pelos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e Actinobacteria (12%), representado pelos gêneros *Micrococcus*, *Microbacterium* e *Knoellia*. No inóculo LLA, o filo Firmicutes (23%) foi representado pelos gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* e Actinobacteria (9%) pelo gênero *Williamsia*. No inóculo RB, Firmicutes (9,5%) foi representado pelos gêneros *Bacillus* e Actinobacteria (2,5%) representado pelo gênero *Microbacterium*. Leser *et al.* (2003) e Tajima *et al.* (1999) relatam que na microbiota do rúmem bovino encontram-se espécies pertencentes aos filios Proteobacteria, Firmicutes e Bacterioidetes, porém este não foi identificado nesta pesquisa. No inóculo ESD o filo Actinobacteria (22%) foi representado pelos gêneros: *Micrococcus*, *Kocuria*, *Knoellia*, *Agrococcus* e *Gordonia* e Firmicutes (17%) representado pelos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*.

No inóculo SD (Figura 12), diferentemente dos outros inóculos, apenas dois filios foram representados: Proteobacteria (88%), com os gêneros *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Providencia*; e Firmicutes (12%) representado pelo gênero *Bacillus*, em concordância com Cotta *et al.* (2003). No inóculo SSSD (Figura 14), os isolados bacterianos se agruparam apenas no filo Proteobacteria, representado pelos gêneros *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Serratia* e *Roseomonas*.

A análise filogenética mostrou que os isolados bacterianos dos seis inóculos pertencem a um amplo número de grupos taxonômicos bacterianos e que Proteobacteria foi o filo predominante. Dados similares foram encontrados com o inóculo de lodo ativado, usado em biodigestores anaeróbios para o tratamento de águas residuárias (Lozada *et al.*, 2004; Thomsen *et al.*, 2004; Bramucci *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2002 e Snaidr *et al.*, 1997).

A distribuição dos gêneros bacterianos diferiu consideravelmente nos seis inóculos (Figura 15). Nos inóculos LLA e ESD foram encontrados o maior número de gêneros (13), seguido pelos inóculos LRU, RB, SSSD e SD, com 12, 9, 7 e 6 gêneros, respectivamente.

Dos 31 gêneros encontrados *Pseudomonas* e *Bacillus* foram encontrados em cinco dos seis inóculos (Figura 15). As bactérias são bem adaptadas a altas concentrações de

nutrientes e normalmente respondem bem a testes de perfis fisiológicos como o do Biolog EcoPlate (Garland, 1997). O gênero *Escherichia* foi encontrado nos inóculos LRU, LLA, SD e SSSD; *Providencia*, nos inóculos RB, SD e SSSD e *Alcaligenes*, encontrado nos inóculos SD, ESD e SSSD. Outros gêneros ocorreram exclusivamente em um único inóculo, como, por exemplo, *Agrococcus*, *Gordonia*, *Kocúria*, *Novosphingobium* e *Shigella* (ESD), *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum* e *Williamsia* (LLA) e *Camamonas*, *Morganella* e *Proteus* (RB).

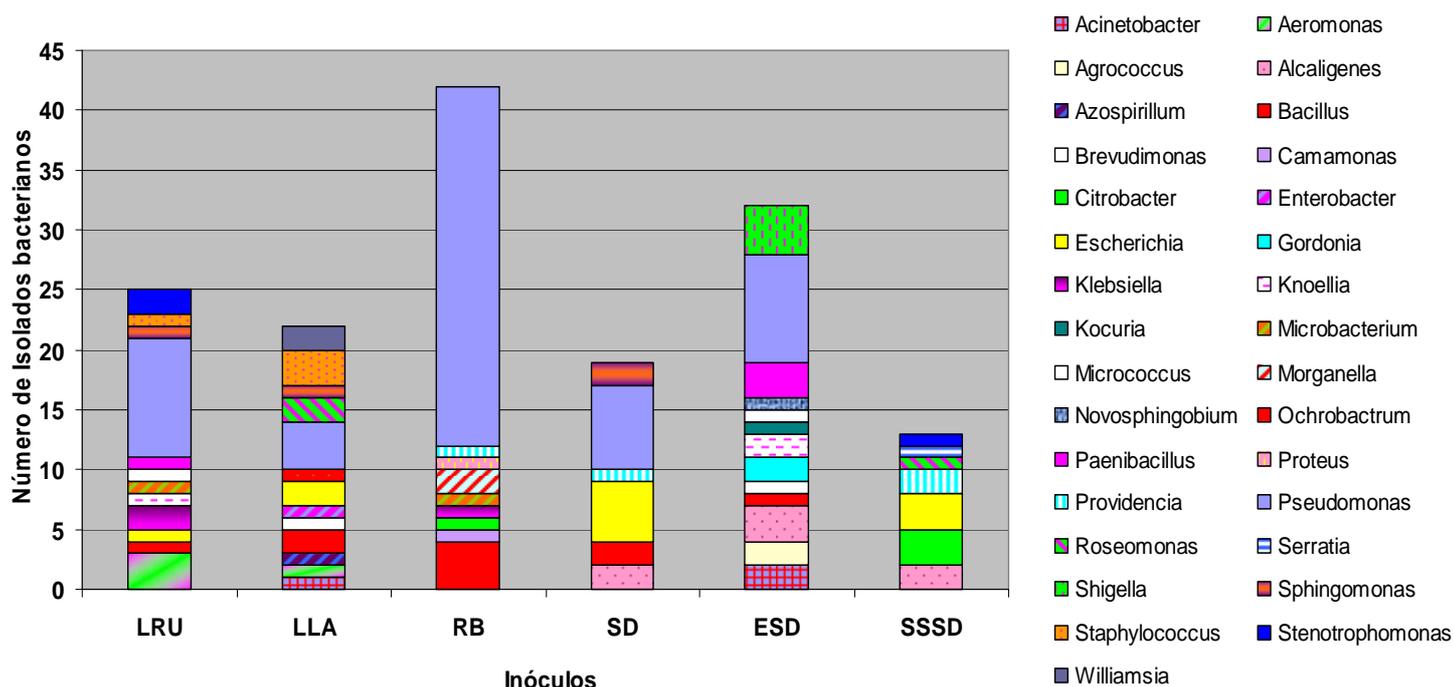


Figura 15 – Ocorrência relativa dos gêneros bacterianos nos inóculos baseada na análise do gene de rRNA 16S.

A análise filogenética das bactérias dos diferentes inóculos fortaleceu os resultados obtidos com os testes dos perfis fisiológicos e a escolha do inóculo LRU a ser utilizado preferencialmente nos biodigestores anaeróbios.

Os inóculos LLA e ESD apresentaram o maior número de gêneros entre os isolados identificados, o que poderia explicar a segunda maior produção de biogás observada para o inóculo LLA (Figura 5). Porém, este inóculo apresentou os piores resultados nos testes Biolog EcoPlate, o que pode ter ocorrido devido a baixa densidade de células ou mesmo às forças seletivas nos poços, por serem diferentes da sua amostra original.

As bactérias dos inóculos SD e SSSD embora apresentem boa diversidade metabólica (Figura 3), tiveram baixo consumo médio das fontes de carbono (Figura 4) e baixa produção de biogás (Figura 5), provavelmente consequência do menor número de gêneros encontrados nestas amostras (Figura 15). A microbiota intestinal de suínos é bastante vasta e são conhecidas 375 espécies (Abbott, 2004; Leser *et al.*, 2003), sendo que muitas raramente são detectadas (Moore *et al.*, 1995) por métodos tradicionais de cultivo e em aerobiose, o que poderia explicar a baixa diversidade encontrada na amostra de fezes de suíno.

A análise do perfil fisiológico mostrou que as bactérias do inóculo RB apresentaram a maior diversidade metabólica (Figura 3) sendo o segundo maior em consumo médio dos substratos (Figura 4), o que agora foi comprovado com a análise filogenética onde foi observada uma grande diversidade – nove gêneros identificados – (Figuras 11 e 15). Entretanto, este não foi escolhido como o melhor inóculo por não apresentar a maior produção de biogás, um dos principais pré-requisitos para utilização em biorreatores. O inóculo ESD apesar de possuir uma grande diversidade metabólica (Figura 3) e maior número de gêneros identificados (Figuras 13 e 15) não apresentou bons resultados em relação ao consumo médio das fontes de carbono (Figura 4) e nem em relação à produção de biogás (Figura 5), que foi muito baixa, sendo, portanto, descartado como inóculo a ser utilizado em biodigestor anaeróbico. Já o inóculo LRU foi o segundo maior em diversidade de gêneros identificados (12), devendo estar bem adaptados ao meio, o que explicaria o fato dele ter alcançado a segunda maior diversidade metabólica (Figura 3), o maior consumo médio das diferentes fontes de carbono nas placas Biolog EcoPlate e em menor tempo (Figura 4), assim como a maior produção de biogás (Figura 5), configurando-o como o melhor inóculo dentre os testados, para ser utilizado em biodigestores anaeróbios.

Atualmente, é reconhecido que o número de espécies diferentes encontradas em um ambiente e o papel que desempenham podem ter grande influência na comunidade em que se encontram (Bell *et al.*, 2005; Curtis e Sloan, 2004; Briones e Raskin, 2003; Fernandez *et al.*, 1999), como pode ter ocorrido com os inóculos testados.

O completo entendimento de todos os processos bioquímicos, fisiológicos e ecológicos que ocorrem em uma comunidade microbiana seria desejável, porém até o momento isto ainda não é possível, devido à sua complexidade e ao conhecimento atual, que é ainda parcial e fragmentado. A descrição e identificação da microbiota constituem apenas o ponto inicial para a elucidação dos vários fatores que operam nestas comunidades.

3.3 – CONCLUSÕES

Observou-se uma grande diversidade de perfis fisiológicos das comunidades bacterianas dos seis inóculos testados (LRU, LLA, RB, SD, ESD e SSSD), a partir da utilização de diferentes fontes de carbono presentes nas placas Biolog EcoPlate.

O inóculo LRU configurou-se como o de maior potencial dentre os testados para ser utilizado em biodigestores anaeróbios para otimização da degradação da matéria orgânica dos resíduos domiciliares, uma vez que este alcançou a segunda maior diversidade metabólica, o maior consumo médio das diferentes fontes de carbono nas placas Biolog EcoPlate e, em menor tempo, a maior produção de biogás quando testado, paralelamente, na DEFLOR/Ltda, e o segundo maior em diversidade de gêneros identificados.

4 – Capítulo II

**Identificação molecular das arqueias
metanogênicas presentes no lixo
domiciliar, antes, durante e após o
tratamento em biodigestor anaeróbio**

4.1– MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 – Coleta das amostras

As amostras: L – lixo domiciliar sólido a ser tratado (restos de comida, carne e frutas coletadas em restaurantes, supermercados e açougue), foi triturado, homogeneizado e filtrado em manta de bidim com o intuito de reduzir sua umidade antes de ser tratado nos biodigestores anaeróbios. LIXV – lodo de reator UASB (lixiviado – usado por ter apresentado o maior potencial dentre os inóculos) – coletado na altura média de um reator UASB do Centro Experimental da UFMG (ETE Arrudas); LT – lixo tratado por 40 dias (tratamento intermediário) nos biorreatores anaeróbios funcionando a 35°C e LF – lixo final tratado por 90 dias (tratamento final) nos biorreatores anaeróbios, foram cedidas pela empresa de Defesa Florestal (DEFLOR), Contagem, local onde foi realizado o tratamento do lixo nos biorreatores anaeróbios.

4.1.2 – Extração do DNA total das amostras

Para a extração do DNA total de cada amostra foi utilizado o Power Max™ Soil DNA Isolation KIT Sample (MO BIO Laboratories, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante.

4.1.3 – Amplificação do gene de rRNA 16S específicos para bactérias, arqueias e do gene *mcrA* das arqueias metanogênicas

O gene de rRNA 16S utilizado para a identificação, foi amplificado por PCR usando os iniciadores específicos para bactérias 8-F (5`-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3`) e 907-R (5`-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3`), (Lane, 1991, modificado), e os específicos para arqueias 21F (5`-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3`) e 958R (5`-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3`), (DeLong, 1992). O gene *mcrA*, específico para a identificação das arqueias metanogênicas, foi amplificado por PCR usando os iniciadores *mcrA-f* (5`-GGTGGTGMGGATTCACACARTAYGCWASCGC-3`) e *mcrA-r* 5`-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT- 3` (Luton *et al.*, 2002).

Para a montagem da reação de PCR foi utilizado a Hot Star Taq Master Mix KIT (QIAGEN, EUA) e 25 ng do DNA total. As condições do ciclo estão apresentadas na Tabela 2. As reações foram realizadas no termociclador da marca Eppendorf. Os amplicons foram identificados e visualizados em gel de agarose 1,5% e eluídos do gel utilizando o MinElute Gel Extraction KIT (QIAGEN, EUA).

4.1.4 – Construção da biblioteca dos genes de rRNA 16S de bactéria , arqueia e do gene *mcr A* de arqueias metanogênicas

Os amplicons do gene de rRNA 16S de bactérias e arqueias e o gene *mcr A*, específico para as arqueias metanogênicas, foram clonados no vetor pCR 4.0-TOPO (Invitrogen, EUA) utilizando-se o TOPO TA Subcloning KIT (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As bactérias (*E. coli* DH5 α) transformadas foram semeadas em placas contendo meio Luria Bertani-LB (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubada a 37°C por 24 horas. Identificou-se o crescimento apenas das colônias contendo os plasmídeos com os insertos de interesse uma vez que a presença do inserto levou a perda da função letal do gene. Essas colônias foram coletadas com palitos esterilizados e depositadas em microplacas com 96 poços, contendo 250 μL de meio LB suplementado ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e glicerol (15% v/v). As placas foram seladas, incubadas a 37°C por 24 horas, e posteriormente estocadas em ultrafreezer a - 80°C.

4.1.5 – Extração do DNA plasmidiano

O DNA plasmidiano foi isolado de acordo com o protocolo de minipreparação descrito por Sambrook *et al.* (1989), com a introdução do uso do filtro PVDF \pm 0,2 μm (Millipore, EUA) para purificação do material.

4.1.6 – Varredura das bibliotecas dos genes

Quinze clones de cada biblioteca foram analisados para a presença do inserto contendo os genes de rRNA16S e *mcr A*, de acordo com as instruções TOPO TA Subcloning KIT (Invitrogen, EUA). O DNA plasmidiano dos clones (50 ng) foi utilizado como molde em reações de PCR tendo como iniciadores M13-F e M13-R (iniciadores universais), que se anelam no vetor que flanqueia a região do inserto clonado. Os amplicons foram analisados em gel de agarose 1,5%, adicionado de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), visualizados sob luz ultra-violeta (UV) e fotodocumentados.

4.1.7 – Sequenciamento dos amplicons do gene *mcr A*

Foram seqüenciados em torno de 40 a 80 clones para as três bibliotecas (lixo antes do tratamento, lixiviado e lixo tratado) do gene *mcr A* das arqueias metanogênicas. Para a

reação de sequenciamento foi utilizado o DYEEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing KIT for MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences). O protocolo de sequenciamento foi padronizado seguindo-se sugestões encontradas na literatura e recomendações do fabricante do sequenciador MegaBace (Amersham Biosciences).

4.1.8 – Análise das sequências dos amplicons

A análise das seqüências parciais do gene *mcr A* foi processada usando-se o pacote que contém os programas Phred/ Phrap/ Consed, em sistema operacional Linux, para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20), alinhamento e edição das seqüências, para geração de uma seqüência consenso de alta qualidade para cada isolado (Ewing e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Em seguida, as seqüências parciais do gene *mcr A* geradas foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank do NCBI (National Center of Biotechnology Information), para análise de similaridade. Para o alinhamento das seqüências obtidas, foram usados os programas CLUSTAL W e MEGA 4,0 (Kumar *et al.*, 2004). As OTUs (Unidade Taxonômica Operacional) foram definidas a partir do programa DOTUR (Schloss e Handelsman, 2005), considerando o nível de distância genética de 0.03 ou 3%, uma vez que níveis $\geq 97\%$ de similaridade entre seqüências tem sido proposto para classificar um microrganismo no nível de espécie (Drancourt *et al.*, 2000). Gráficos representando o índice de diversidade de Shannon e curvas de rarefação foram construídas utilizando o programa DOTUR. A cobertura das bibliotecas foi calculada usando-se a equação $C = 1 - (n/N) \times 100$, onde n significa o número de OTUs e N o número de seqüências analisadas na biblioteca (Good, 1953).

4.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 – Amplificação e construção das bibliotecas dos genes *mcr A* de arqueias metanogênicas e de rRNA 16S de arqueias e bactérias

A construção de bibliotecas metagenômicas a partir da extração do DNA total de amostras ambientais e amplificação de genes de interesse vem sendo muito utilizada para a identificação e estudo das comunidades microbianas, principalmente devido ao fato de que a maioria dos microrganismos não é cultivável.

A amplificação parcial dos genes: *mcr A* específico das arqueias metanogênicas (amostras LIXV, L e LT), dos genes de rRNA 16S específico para bactérias (amostras LIXV, L, LT e LF) e arqueias (amostra LIXV) foram realizadas com sucesso e produziram amplicons de 490 pb e 950 pb, respectivamente (Figura 16).

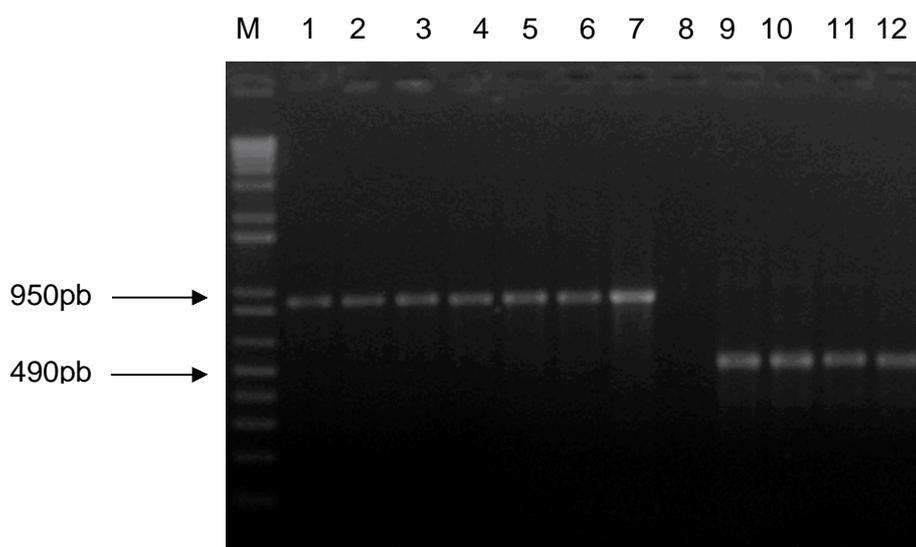


Figura 16 – Gel de agarose 1,5% ilustrando a amplificação parcial dos genes de rRNA 16S e *mcr A* por PCR. M: marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA); 1: amplicon do gene rRNA16S de arqueia do DNA total de LIXV; 2: controle positivo – amplicon parcial do gene de rRNA 16S da arqueia *Halobacterium salinarum* ATCC; 3-6: amplicons parciais do gene de rRNA 16S de bactérias do DNA total de LIXV, L, LT e LF, respectivamente; 7: controle positivo – amplicon parcial do gene de rRNA 16S da bactéria *Escherichia coli* K12; 8: controle negativo; 9-12: amplicons do gene *mcr A* das arqueias metanogênicas do DNA total de LIXV, L, LT e LF, respectivamente.

Deve-se destacar, que nenhuma amplificação para o gene de rRNA 16S específico de arqueias foi obtida para as amostras L, LT e LF utilizando os iniciadores 21f e 958r,

apesar das várias tentativas e diluições usadas. Entretanto não se pode afirmar que foi pela falta do DNA alvo nestas amostras e nem pela qualidade do DNA, uma vez que o mesmo foi usado com sucesso para amplificar o gene *mcr A* específico para as arqueias metanogênicas. Portanto, a causa da não amplificação destas amostras não está clara.

As bibliotecas dos genes *mcr A* (LIXV, L e LT), de rRNA 16S específico para bactérias (LIXV, L, LT e LF) e arqueias (LIXV) foram construídas e apresentaram cerca de 1.500 clones cada uma. As bibliotecas foram validadas a partir da amplificação dos insertos utilizando os iniciadores M13f e M13r que se anelam as extremidades do vetor Topo 4.0. Embora o gene *mcr A* tenha sido amplificado com sucesso para todas as amostras, não se conseguiu construir a biblioteca da amostra LF, apesar das várias tentativas. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1,5% (Figura 17).

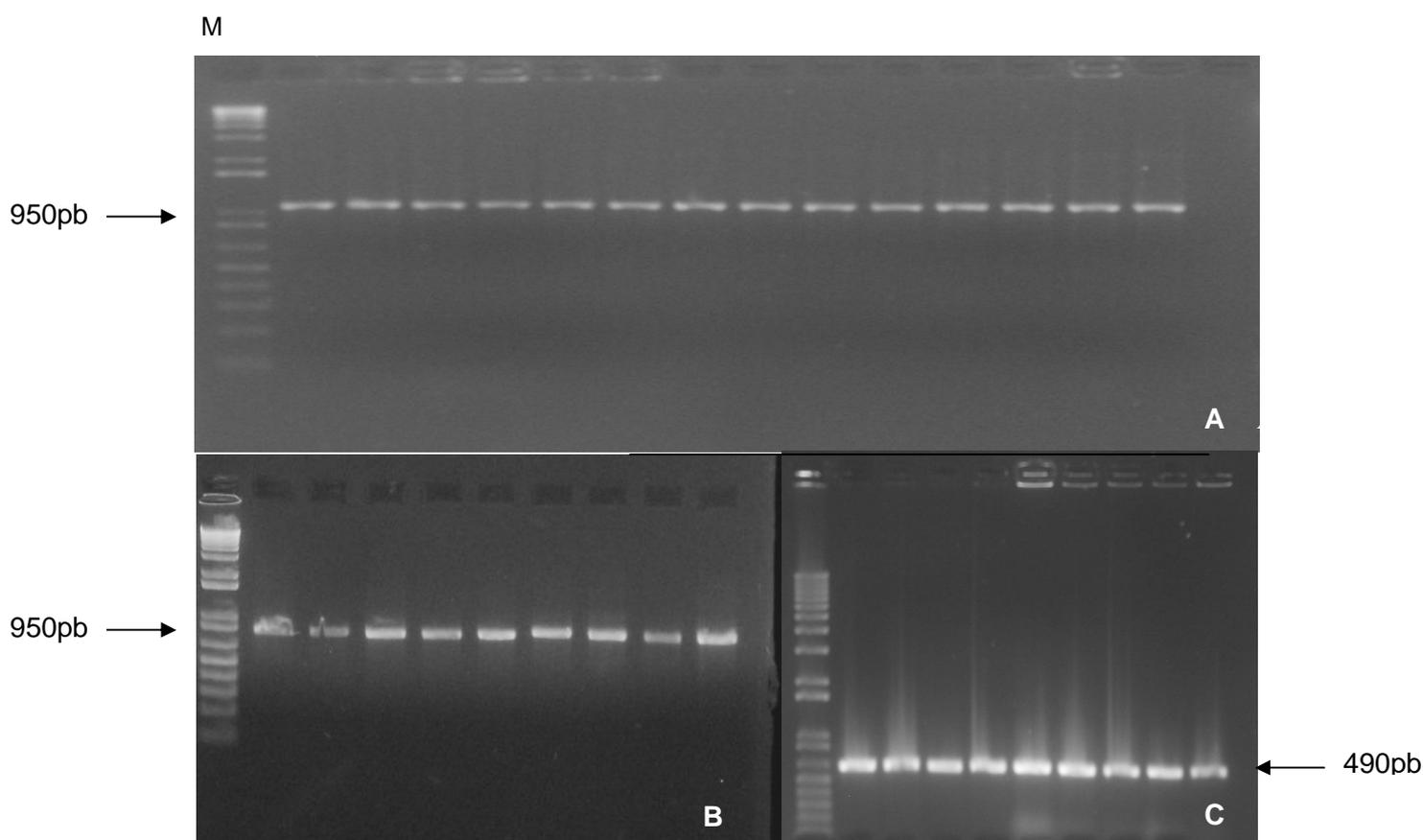


Figura 17 – Gel de agarose 1,5% representando a amplificação parcial dos genes de rRNA 16S de bactéria (A) e arqueia (B) e o gene *mcr A* (C) dos clones. M: marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen EUA).

4.2.2 – Análise das bibliotecas do gene de *mcr A* das amostras

Para a análise filogenética das arqueias metanogênicas das bibliotecas LIXV, L e LT foram selecionados, aleatoriamente, 171 clones. O maior número de OTUs foi encontrada na biblioteca do LIXV (Tabela 4). Constatou-se que o número de clones analisados para cada biblioteca cobriu a maioria das diferentes arqueias metanogênicas presentes em cada amostra.

Tabela 4: Distribuição geral dos clones e OTUs das bibliotecas

Amostras	Lixo (L)	Lixiviado (LIXV)	Lixo Tratado (LT)
Nº de clones	56	78	37
Nº de OTUS	7	14	8
Cobertura da biblioteca (%)	95	92,5	90
Índice de diversidade de Shannon	1,03	1,39	1,27

Curvas de rarefação das bibliotecas (Figura 18) obtidas plotando o número de OTUs encontradas para cada biblioteca em relação ao número de clones seqüenciados demonstraram uma tendência à estabilidade do número de OTUs detectadas, indicando que a maioria das arqueias metanogênicas presentes nestas amostras foi detectada, o que foi comprovado pelo cálculo de cobertura das bibliotecas (Tabela 4).

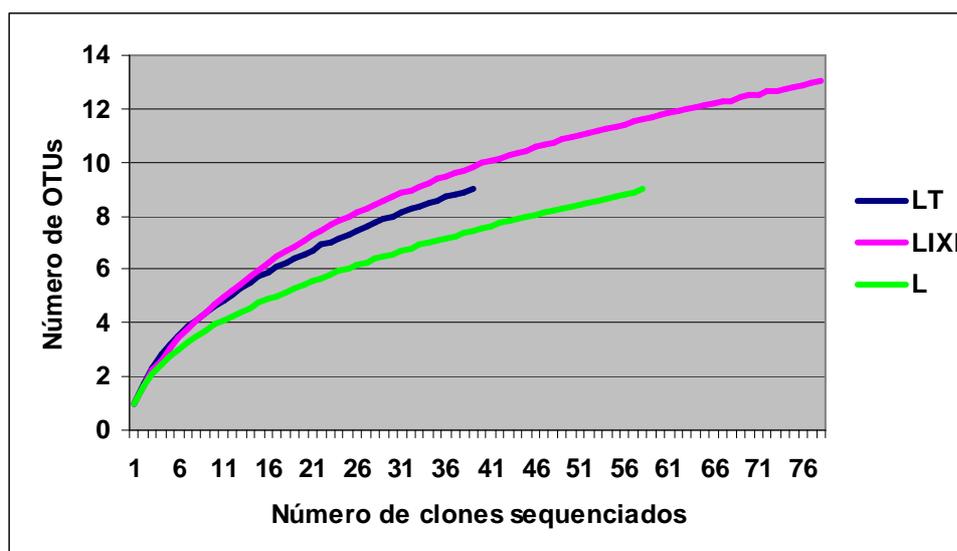


Figura 18 – Curvas de rarefação representando a diversidade observada dos clones seqüenciados do gene *mcr A* das bibliotecas.

Índices de diversidade são freqüentemente empregados como uma ferramenta numérica para comparar comunidades microbianas de diferentes amostras (Hill *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2001). O índice de diversidade de Shannon (Tabela 4) mostrou que a biblioteca LIXV apresentou a maior diversidade de arqueias metanogênicas (1,39) com 14 OTUs identificadas, possuindo a biblioteca LT a segunda maior diversidade (1,27), com 8 OTUs e a biblioteca L a menor diversidade (1,03), com 7 OTUs.

A análise filogenética do gene *mcr A* apresentou seqüências de arqueias metanogênicas pertencentes apenas às ordens *Methanomicrobiales* e *Methanobacteriales* (Tabela 5 e Figura 19). As arqueias metanogênicas identificadas nas bibliotecas foram todas mesofílicas e hidrogenotróficas – produzem metano a partir da redução do H₂ e CO₂ e algumas vezes da redução do formiato (Hendrickson *et al.*, 2007). Seqüências relacionadas às ordens *Methanococcales*, *Methanosarcinales* e *Methanopyrales* não foram identificadas nas bibliotecas construídas. Juottonen *et al.* (2006), comparando vários iniciadores para a amplificação do gene *mcr A*, demonstraram que o iniciador *mcr A* (Luton *et al.*, 2002) utilizado neste trabalho, é capaz de amplificar seqüências de arqueias metanogênicas pertencentes a todas as ordens.

Tabela 5: Distribuição dos gêneros das arqueias metanogênicas observados nas bibliotecas

Gênero	OTU	Nº clone	Sequências próximas/microrganismo	Nº de acesso GenBank	Identidade (%)
<i>Methanoculleus</i>	LIXV01	6	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300786	99
	LIXV02	43	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300787	99
	LIXV03	6	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AF414036	97
	LIXV04	7	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300787	97
	LIXV05	3	Uncultured Methanomicrobiaceae archaeon MRR-mcr56	AY125652	95
	LIXV06	1	Uncultured Methanomicrobiaceae archaeon MRR-mcr54	AY125650	96
	LIXV07	1	Uncultured Methanomicrobiaceae archaeon MRR-mcr57	AY125653	93
	LIXV08	2	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300787	99
<i>Methanobacterium</i>	LIXV09	1	Uncultures methanogenic archaeon clone MARMC492	DQ260579	95
	LIXV10	4	Uncultures methanogenic archaeon clone VAL17	EF628128	95
	LIXV11	1	Uncultures methanogenic archaeon clone GRANMCR4M3	AY937284	98
<i>Methanosphaera</i>	LIXV12	1	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	EU034643	92
	LIXV13	2	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	AJ584650	93
<i>Methanothermobacter</i>	LIXV14	1	Uncultured euryarchaeote clone mrr-mcr18	DQ662568	94
<i>Methanobacterium</i>	L01	35	Uncultured methanogenic archaeon clone VAL-17	EF628128	95
	L02	11	Uncultured methanogenic archaeon clone VAL-14	EF628125	98
	L03	2	Uncultured methanogenic archaeon clone CWL-22	EF628183	97
	L04	5	Uncultured methanogenic archaeon clone JPL-10	EF628155	85
	L07	1	Uncultured euryarchaeote clone MCR-HID-R0035	DQ662590	94
<i>Methanoculleus</i>	L06	1	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300787	98
	L05	1	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300786	99
<i>Methanoculleus</i>	LT01	18	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300787	98
	LT02	9	Uncultured Methanomicrobiaceae archaeon MRR-mcr56	AY125652	97
	LT03	4	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300786	96
	LT04	1	Uncultured Methanomicrobiaceae archaeon clone KM72	DQ085327	99
	LT05	1	Uncultured Methanomicrobiaceae archaeon MRR-mcr54	AY125650	93
	LT06	1	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300787	93
<i>Methanobacterium</i>	LT08	2	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	AB300787	98
	LT07	1	Uncultured Methanobacteriales archaeon	AB353252	92

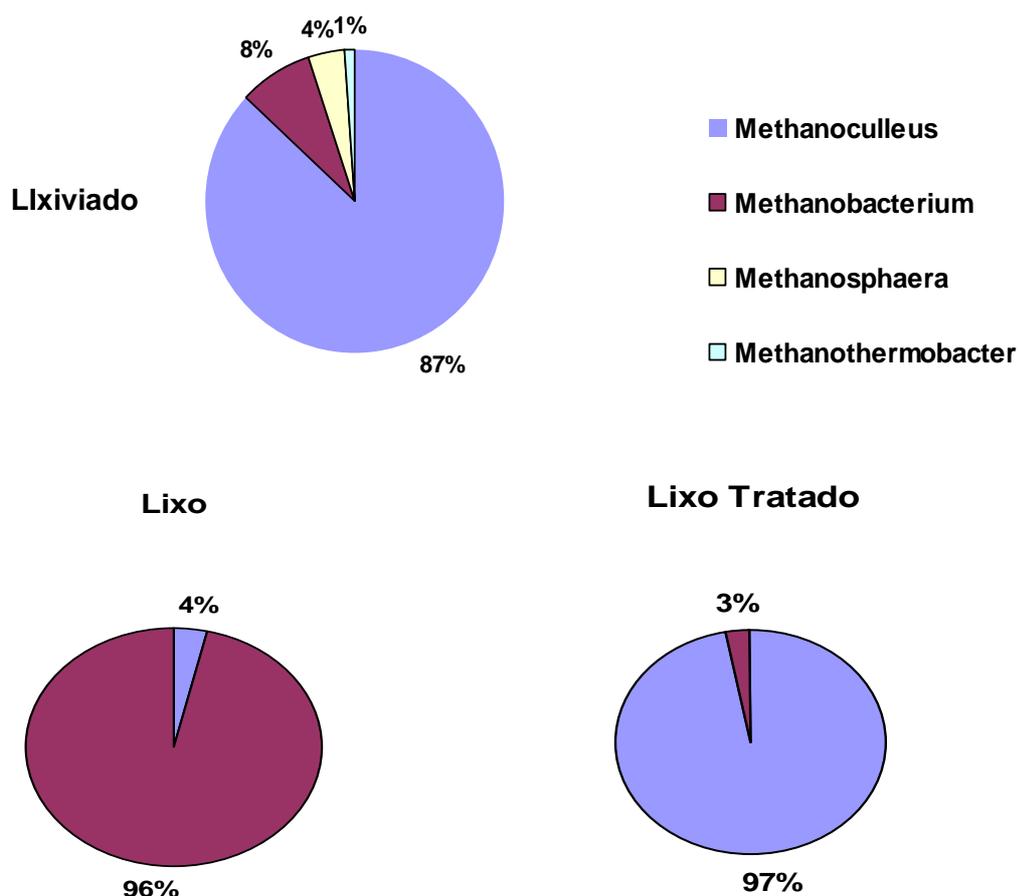


Figura 19 – Distribuição dos clones do gene *mcr A* nas bibliotecas

Representantes da ordem *Methanomicrobiales* foram encontradas em todas as bibliotecas – LIXV, 87%; L, 4% e LT, 97% –, (Tabela 5 e Figura 19) com seqüências similares ao gênero *Methanoculleus* (família *Methanomicrobiaceae*) e identidade >93% para a espécie *Methanoculleus bourgensis*. A presença desse gênero em biorreator anaeróbio tratando resíduo sólido municipal, também foi observado por Levén *et al.* (2007).

A ordem *Methanobacteriales* (Tabela 5 e Figura 19) também foi representada em todas as bibliotecas (LIXV, 13%; L, 96% e LT, 3%), possuindo seqüências pertencentes à família *Methanobacteriaceae*, representada pelos gêneros: *Methanobacterium*, *Methanosphaera* e *Methanothermobacter*. O gênero *Methanobacterium* foi representado por seqüências com identidades >89% para a espécie *Methanobacterium formicum* (LIXV, L e LT), frequentemente encontrada em biorreatores anaeróbios, principalmente sob temperaturas mesófilicas, como descrito por vários autores (Tange *et al.*, 2005 e 2004; McHugh *et al.*, 2003; Godon *et al.*, 1997). Observou-se também seqüências com identidades >90% para a espécie *Methanobacterium beijingense* (LIXV e L), anteriormente identificada

em biorreatores anaeróbios para o tratamento de resíduos de vinicultura e que foram inoculados com lodo de reator UASB (Lefebvre *et al.*, 2007). Os gêneros *Methanosphaera* e *Methanothermobacter* foram identificados apenas na biblioteca LIXV, com 30 e 10%, respectivamente, sendo representados por seqüências com identidades >93% para a espécie *Methanosphaera stadtmanae* e >82% para a espécie *Methanothermobacter thermoflexus*. Estas parecem não ter se adaptado às condições ambientais do biodigestor ou se encontravam em número muito pequeno em relação as arqueias metanogênicas identificadas no lixo tratado (Figura 19).

A alta frequência de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas presentes nos inóculos, como o lodo de reator UASB, é importante principalmente durante a fase inicial do tratamento do lixo em biorreatores anaeróbios (Montero *et al.*, 2007). Já para o lixo, a ocorrência de espécies das ordens *Methanomicrobiales* deve-se, provavelmente, ao fato deste ter sido triturado antes do seu tratamento no biorreator, levando, conseqüentemente, à rápida hidrólise e à alta produção de H₂ pelas bactérias sintróficas, através da conversão de outros produtos de fermentação e subsequente multiplicação das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, como também observado por Padmasiri *et al.* (2007).

Nas bibliotecas analisadas, todas as arqueias metanogênicas identificadas foram hidrogenotróficas, não sendo identificada nenhuma arqueia metanogênica acetotrófica – produz metano a partir da degradação do acetato. Isto também tem sido observado em alguns biorreatores anaeróbios UASB mesofílicos de resíduos industriais, durante períodos de stress e perturbação do processo (Schnurer *et al.*, 1999). Esta ocorrência pode ser devida à inibição de arqueias acetotróficas, posterior oxidação do acetato para H₂ e CO₂ e subsequente produção do metano por um mecanismo hidrogenotrófico menos sensível (Schnurer *et al.*, 1999).

A não identificação de arqueias acetotróficas em LT do biodigestor anaeróbio não significa a ausência de acetato nesta amostra. O acetato também é consumido por várias espécies hidrogenotróficas, inclusive por arqueias metanogênicas que utilizam formiato, como é o caso de espécies dos gêneros *Methanoculleus* e *Methanobacterium*, encontradas em abundância nas bibliotecas. Membros cultiváveis destes gêneros geralmente utilizam hidrogênio ou formiato, mas a maioria das linhagens exige acetato ou substratos orgânicos complexos, como fonte de carbono adicional, para a síntese de biomassa, apesar destas não catabolizarem o acetato em metano (Boone *et al.*, 2001).

As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas são essenciais nos biodigestores anaeróbios para a completa degradação da matéria orgânica do lixo. Estas, além de serem mais resistentes, são responsáveis pelo baixo nível de H₂ no meio, condição necessária para o bom funcionamento dos grupos tróficos intermediários, como o das bactérias sintróficas,

responsáveis por converter ácidos orgânicos e álcool em importantes precursores do metano produzido pelas arqueias metanogênicas (Kasting *et al.*, 2002; Paus *et al.*, 1990).

De acordo com Casserly e Erijman (2003) a alta diversidade de arqueias metanogênicas em um processo anaeróbio não está relacionada à alta produção de metano. A diversidade por si só não é mais importante para a degradação dos substratos do que a estrutura da comunidade, embora diferentes estruturas de comunidades possam resultar em uma similar produção de metano. Isto também tem sido mostrado por Haruta *et al.* (2002) que propuseram que um sistema estável pode ser mantido por uma baixa diversidade de microrganismos, uma vez que estes consigam se adaptar bem ao meio em que se encontram como é o caso das arqueias metanogênicas encontradas nos biorreatores anaeróbios.

4.3 – CONCLUSÕES

A análise filogenética do gene *mcr A* apresentou seqüências de arqueias metanogênicas pertencentes às ordens *Methanomicrobiales* e *Methanobacteriales* nas três amostras (LIXV, L e LT); a ordem *Methanomicrobiales* foi representada por seqüências pertencentes à família *Methanomicrobiacea* tendo o gênero *Methanoculleus* apresentado identidade >93% com a espécie *Methanoculleus bourgensis*; e a ordem *Methanobacteriales* representada por seqüências pertencentes à família *Methanobacteriaceae* e os gêneros *Methanobacterium*, *Methanosphaera* e *Methanothermobacter*. O gênero *Methanobacterium* foi representado pelas espécies *Methanobacterium formicum* (LIXV, L e LT) e *Methanobacterium beijingense* (LIXV e L), com identidade de >89% e >90%, respectivamente, e os gêneros *Methanosphaera* e *Methanothermobacter* encontrados apenas na biblioteca LIXV, foram representados por seqüências com identidade >93% com *Methanosphaera stadtmanae* e >82% com *Methanothermobacter thermoflexus*, respectivamente.

Todas as arqueias metanogênicas identificadas nas bibliotecas eram hidrogenotróficas, não sendo identificada arqueia metanogênica acetotrófica, levando-se, então, a se supor que o biorreator anaeróbio estivesse passando por períodos de “stress” e perturbação do processo.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, A. Gut reaction. *Nature*, v.427, n.6972, p.284-286, 2004.
- AHRING, B.K., ANGELIDAKI, I. AND JOHANSEN, K.1992. Anaerobic treatment of manure together with industrial waste. *Wat. Sci. Tech.*, 25(7), 311–318.
- AHRING, B.K., M. SANDBERG, AND ANGELIDAKI, I. 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 41:559-565.
- ALBIACH, R., CANET, R., POMARES, F., INGELMO, F., 2000. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Biores. Technol.* 75, 43–48.
- ALPHENAAR, P. A., SLEYSER, R. AND DE REUVER, P. 1993. Phosphorus requirement in high-rate anaerobic wastewater treatment. *Water Research* .749-756
- ALVES,A., OLIVEIRA. 2004. Importância da digestão anaeróbia na gestão integrada de resíduos. Centro de engenharia Biológica, Universidade do Monho.4710-057..
- ANGELIDAKI, I., AND AHRING, B.K.1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effects of temperature. *Water Res.* 28:727-731.
- ANGENENT,L.T., SUNG,S., RASKIN,L., 2002. Methanogenic population dynamic during start-up of a full scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res.* 36:4648-4654.
- BAKER,G.C., GAFAR,S.,COWAN,D.A., SUHARTO,A.R.2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbio.Lett.*200, 103-109.
- BELL,T., NEWMQN,J.A., SILVERMAN,B.W., TURNER,S.L., AND LILLEY,A.K. 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436:1157-1160.
- BHATTACHARYA,S.K. AND G.F. PARKIN. 1998. The effect of ammonia on methane fermentation process. *J. Water Pollut. Fed* 61:55-59.
- BIOLOG INC. 1993. Ecoplate . Instructions for use. Biolog Inc., Hayward, C.A.
- BOONE D.R., WHITMAN W.B.& ROUVIERE P. 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In *Methanogenesis* (Ferry JG,ed), pp35-80. Chapman & Hall, New York,NY.
- BOONE D.R., WHITMAN W.B.AND KOGA,Y. 2001.Methanomicrobiales,p.246-267. IN D.R.Boone and R.W.Castenholz (ed),*Bergeys manual os systematic bacteriology*,2nd ed., vol1. The archaea and the deeply and phototrophic bacteria. Springer,New York,N.Y.
- BOSSIO,D.F. AND SCOW,K.M. 1995 Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*61:4043-4050.

- BRAKER,G.,FESEFELDT,A., AND WITZEL,K.P. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64:3769-3775.
- BRAMUCCI,M., KANE,H., CHEN,M., AND NAGARAJAN,V. 2003. Bacterial diversity in a industrial wastewater bioreactor. *Appl. Microbiol Biotechnol* 62:594-600.
- BRIONES,A.,AND RASKIN L. 2003 Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr Opin Biotechnol.* 14:270-276
- CALLI, B., B. MERTOGLU, K. ROEST, AND B. INANC. 2006. Comparison of longterm performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. *Bioresour. Technol.* 97:641–647.
- CARSSERLY,C.ERIJMAN,L.2003. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. *Int Biodeter Biodeg* 52(1): 7-12.
- CECCHI,F.PAVAN,P., MATA-ALVAREZ,J., CECCHI,F;1992.Far digester start-up under mesophilic condicions using thermophilic inoculum. *Water Sci. Technol.* 25:391-398.
- CHAN, O. C., W. T. LIU, AND H. H. P. FANG. 2001. Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. *Water Sci. Technol.* 43(1):77–82.
- CHERNICHARO, C.A.L. *Reatores anaeróbios*. Belo Horizonte:SEGRAC, 1997.
- CHYNOWETH.D.P. OWENS,J.M. LEGRAND,R. 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass.*Renew. Energ.* 22: 1-8
- CHYNOWETH.D.,HALEY.P., OWENS.J.RICH,E., TOWNSEND,T. AND CHOI,H. 2002. Anaerobic composting for recovery of nutrients, compost, and energy from solids wasters during space missions. *Int. Conf. Environ.* 01:2341.
- COTTA, M.A., WHITEHEAD, T.R., AND ZELTWANGER, R.L. 2003. Isolation, characterisation and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environ. Microbiol.*, 5: 737-745.
- CURTIS,T.P. AND SLOAN,W.T. 2004. Prokariotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implication for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol* 7:221-226.
- DELONG, E. F.1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:5685-5689.
- DI´AZ, E., R. AMILS, AND J. L. SANZ. 2003. Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *Water Sci. Technol.* 48(6): 57–64.

- DIGIOVANNI,G.WIDMAR, F., SEIDLER,R.J. AND WATRUD,L.S. 1997. Molecular analysis of diversity represented by a metabolic culture assay of a soil microbial community. Abstract, 97th General Meeting of the American Society for Microbiology.
- DRANCOURT, M., BOLLET, C. CARLIOZ,A., MARTELIN, R. .GAYRAL,J-P AND RAOUL,.D. 2000. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. American Society for Microbiology. Journal of clinical Microbiol. 3623-3630
- EDELMANN ET AL, W., JOSS, A. AND ENGELI, H.1999. Two step anaerobic digestion of organic solid wastes. In: Proc II Int. Symp. Anaerobic Digestion of Solid Wastes, J. Mata-Alvarez, A. Tilche, F. Cecchi, Eds, vol 2, 150-153.
- ELLERMANN.J.,R. HEDDERICH,R. BOCHER, AND R.K. THAUER. 1988. The final step in methane formation. Investigations with highly purified methyl-CoM reductase (Component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Strain Marburg) Eur.J. Biochem. 172:669-677.
- FERNANDEZ,A., HUANG,S.Y., SESTON,S., XING J. HICHEY,R., CRIDDLE,C. AND TIEDJE,J. 1999. How stable is stable?Function versus community composition. Appl Environ Microbiol 65:3697-3704.
- FERRY, J. G. 1992. Methane from Acetate. Journal of Bacteriology, American Society for Microbiology. Copyring. p.5489-5495.
- FERRY, J. G. 1993. Methanogenesis. Ecology, physiology, biochemistry and genetics. Chapman & Hall, New York, N.Y.
- FERRY, J. G. 1999. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. FEMS Microbiol. Rev. 23:13-38.
- FIELDING,E.R.,D.B.ARCHER,E.C.DEMACARIO, AND A.J.L.MACARIO. 1988. Isolation and characterization of methanogenic bacteria from landfills. Appl.Environ.Microbiol. 64:4973-4982.
- FLORENCIO, M de L.; KATO, M. T.1999. Sistema de tratamento anaeróbio. Apostila do IV Curso de tratamento biológico de resíduos, FURB/UFSC, Florianópolis, p.24.
- FORESTI. E 1997. Sistemas de tratamento anaeróbio.In: III Curso de tratamento biológico de resíduos. Santa Catarina, Florianópolis: UFSC.
- FOSTER-CARNEIRO,T. ET AL., 2006Composting potencial of different inoculum sources in the modified SEBAC system treatment of municipal solid wastes. Bioresour. Technol. Doi: 10.1016/j.biortech.2006.10.024.
- GALAND, P.E., FRITZE, H. AND YRJALA, K. 2003. Microsite-dependent changes in methanogenic populations in a boreal oligotrophic fen. Environmental Microbiology 5: 1133-1143.

- GALAND, P.E., JUOTTONEN, H., FRITZE, H. AND YRJÄLÄ, K. 2004. Methanogen communities in a drained bog: effect of ash fertilization. *Microbial Ecology* (in Press).
- GALAGAN ET AL. 2002. The Genome of *M. acetivorans* Reveals Extensive Metabolic and Physiological Diversity. *Genome Research* 12: 532-542.
- GARCIA,J-L;PATEL,B.K.C.;OLLIVIER,B.2000.Taxonomic, Phylogenetic and Ecological diversity of Methanogenic Archaea.*Anaerobe*,6,205-226
- GARLAND,J.L..1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24:289-300
- GARLAND,J.L..1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol. Biochem.* 28:213-221.
- GARLAND,J.L.,MILLS,A.L. 1991.Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57,2351-2359
- GODON,J.,ZUMSTEIN,E. DABERT,P. HABOUZIT,F. AND MOLETA,R. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl and Environ Microbiol* 2802-2813.
- GOMEZ, E., GARLAND, J., CONTI, M., 2004. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl. Soil Ecol.* 26, 21–30.
- GOOD,I.J. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40:237-262.
- GRIFFIN, ME. MCMAHON, KD. MACKIE RI., RASKIN,L.1998. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids . *Bio technol Bioeng* 57 (3):342-355.
- GROFLKOPF, R., JANSSEN,P.H., LIESACK,W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S r RNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* 64,960-969.
- GROVE, J.A., RICHNER, G., ANDERSON,W.A., MOO-YOUNG, M., 2004. Assessment of changes in the bacterial community in a biofilter using functional and structural approaches. 2004 USC-CSC-TRG Conference on Biofiltration, Santa Monica, Oct. 20–22, 2004.
- GUSS AM, MUKHOPADHYAY B, ZHANG JK, METCALF WW. 2005. Genetic analyses of *mch* mutants in two *Methanosarcina* species demonstrates multiple roles for the methanopterin-dependent c-1 oxidation/reduction pathway and differences in H₂ metabolism between closely related species. *Mol Microbiol*, 55: 1671-1680.

- HAACKS,K., GARCHOW,H., KLUG, MJ., FORNEY,L.J., 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1458-1468.
- HALLAM., J.E. GIRGUIS., R.P. PRESTON,M.C. RICHARDSON,M.P., DELONG, F.E. 2003. Identification of Methyl Coenzyme M Reductase A(*mcrA*) Genes associated with Methane-Oxidizing Archaea.Vol.69.No.9, p.5483-5491
- HARUTA, S. KONDO, M., NAKAMURA, K.AIBA, H. UENO, S. ISHII, M. IGARASHI,Y. 2002. Microbial community changes during organic solid waste treatment analysed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:224-231.
- HENDROCKSON,L.E., HAYDOCK,K.A., MOORE,C.B., WHITMAN,B.W. AND LEIGH,J. 2007.Functionally distinct genes regulated by hydrogen limitation and growth rate in methanogenic archaea. *PNAS.vol.104.* 21:8930-8934.
- HILL,T.C.J., WALSH, K.A., HARRIS,B.F., MOFFETT,B.F.2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities.*FEMS Microbial. Ecol.* 43:1-11.
- HOBSON.P.N. WHEATLEY,A.D. 1993. Anaerobic digestion modern theory and practice. Elsevier Science Publishers,Ltd., Essex.U.K.
- HORZ,H.P. YIMGA,M.T., AND LIESACK,W. 2001. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl Environ Microbiol* 67:4177-4185.
- HUGHES,J.B., HELLMANN,J.J., RICKETTS,B.J., BOHANNAN,B.J. 2001. Counting the uncoultable:statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbial.* 67:4399-4406.
- IBEKWE, A.M., KENNEDY, A.C., 1998. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 26, 151–163. Ibekwe, A.M., Papiernik,
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso: 05/10/2007
- IPT/CEMPRE – Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT)/ Compromisso Empresarial para Reciclagem (CEMPRE). Lixo Municipal: manual de gerenciamento integrado. D’Almeida Maria Luiza O. e Vilhena, André. (coord.) São Paulo: IPT/CEMPRE, 2000.
- JOULIAN,C.,B.OLLIVIER,B.K.C.PATEL, ANDP.A.ROGER.1998.Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant unlturable methanogens isolated from field soils. *FEMSMicrobiol. Ecol.*25:135-145

- KARAKASHEV, D., BATSTONE, D.J. AND ANGELIDAKI, I. 2005 Influence of Environmental Conditions on Methanogenic Compositions in Anaerobic Biogas Reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 331-338.
- JUOTTONEN, H., GALANG, P.E., YRJALA, K. 2006. Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcr A* gene. *Research Microbiology.* 914-921.
- KASTING JF, SIEFERT JL .2002. *Science* 296:1066–1068.
- KLEIKEMPER, J., POMBO, A.S., SCHROTH, H. M., SIGLER, V. W., PESARO, M., ZEYER, J. 2005. Activity and Diversity of Methanogens in a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 149-158.
- KLEIN, A., R. ALLMANSBERGER, M. BOKRANZ, S. KNAUB, B. MÜLLER, AND E. MUTH. 1988. Comparative analysis of genes encoding methyl coenzyme M reductase in methanogenic bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 213:409–420.
- KOWALCHUK, G.A., STIENSTRA, A.W., HEILIG, G.H., STEPHEN, J.R., AND WOLDENDORP, J.W. 2000. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environ Microbiol* 2:99-110.
- KULIK, A. 1997. Anaerobic digestion gains ground in Europe. *World Wastes J.* 9-15.
- KUNZ ET AL (<http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2004/artigo-2004-n001.html;ano=2004>)
- LANE, D.J. 1991. 16S/23S rDNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). New York, USA: John Wiley & Sons, pp.115-148.
- LEFEBVRE, O., QUENTIN, M., TORRIHOS, M., GODON, J. 2007. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75:61-69.
- LESER T.D.; AMENUVOR, J.Z.; JENSEN, T.K. et al. 2003. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.2, p.673-690
- LEVEN, L., ANDERS, R., ERICKSSON, B. & SCHURER, A. 2007. Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiol Ecol.* 59:683-693.
- LIESACK, W., JANSEEN, P.H., RAINEY, F.A., WARD-RAINEY, N.L. STACKENBRANDT, E., 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: van Elsas, J.D., Trevs, J.T., Wellington, E.M.H., (Eds.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp.375-439.

- LOREAU, M., NAEEM, S. INCHAUSTI, P., BENGTSSON, J., GRIME, J. P.; HECTOR, A. ET AL 2001. Biodiversity and ecosystem functioning current knowledge and future challenges. *Science* 294:804-808.
- LOZADA, M. ITRIA, R. F., FIGUEROLA, E. L. M., BABAY, P. A., GETTAR, R. T. DE TULLIO, L. A. AND ENRIJMAN, L. 2004. Bacterial community shifts in nonylphenol polyethoxylates-enriched activated sludge. *Water Res* 38:2077-2086.
- LUEDERS, T., K. J. CHIN, R. CONRAD, AND M. FRIEDRICH (2001) Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol.* 3:194-204.
- LUTON, P. E., J. M. WAYNE, R. J. SHARP, AND P. W. RILEY. (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analyses of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148:3521-3530.
- MA, K., AND R. K. THAUER. Purification and properties of N⁵,N¹⁰-methylene tetrahydromethanopterin reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur. J. Biochem.* 191:187-193. 1990.
- MCMAHON, K. D. STROOT, P. G., MACKIE, R. I., RASKIN, L. (2001) Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions-II: microbial populations dynamics. *Water Res* 35 (7):1817-1827.
- MCHUGH, S., CARTON, M., MAHONY, T. & O'FLAHERTY, V. 2003 Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiol Lett* 219:297-304.
- MILLER, T. L., M. J. WOLIN, AND E. A. KUSEL. Isolation and characterization of methanogens from animal feces *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 8, pp. 234-238. 1986.
- MONTERO, B. ET AL., Evolution of microorganisms in thermophilic-dry anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* (2007), doi:10.1016/j.biortech.2007.05.063.
- MOORE, W. E. C.; MOORE, L. H. 1995. Intestinal floras of population that have a high risk of colon cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.9, p.3202-3207
- MOOSBRUGGER, R. E., WENTZEL, M. C., EKAMA, G. A. AND MARAIS, G. V. Weak acid/bases and pH control in anaerobic systems-A review. *Water SA*, ____ 1-10. 1993.
- NAKAGAWA, T., HANADA, S., MARUYAMA, A., MARUMO, K., URABE, T., AND FUKUI, M. (2002) Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan). *FEMS Microbiol Ecol* 41:199-209.
- NDON, U. J. AND DAGUE, R. R. (1997) Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic sequencing batch reactor treatment of low-strength wastewater. *Water Research*, ____ 2455-2466.

- NERCESSIAN,O., REYSENBACH,A.L., PRIEUR,D., AND JEANTHON,C.(2003) Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise(13N). *Environ Microbiol* 5:492-502.
- NYNS, E. J. Biomethanation Processes. In Schönborn, W. (ed.), *Microbial Degradations*, vol. 8. Wiley-VCH Weinheim, Berlin. p. 207-267. 1986.
- OLLIVIER,B.,J.L.CAYOL,B.K.C. PATEL,M.MAGOT,M.L.FARDEAU,E .L.GARCIA. *Methanoplanus petrolearius* sp.nov., a novel methanogenic bacterium from an oil-producing well.*FEMS Microbiol.*Lett.147:51-56. 1997.
- PADMASIRE S.I., ZHANG,J., FITCH,M., NORDDAHL,B., MORGENROTJ,E., RASKIN,L. 2007 Methanogenic population dynamics and performance of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water Research*. 41:134-144.
- PAVAN,P., BATTISTONI,P., TRAVERSO,P., MUSACCO,A., CECCHI,F.(1998) Effect of addition of anaerobic fermented OFMSW (organic fraction of municipal solids waste) on biological nutrient removal (BNR) process: preliminary results. *Water Sci. Technol*. 38: 327-334.
- PERES, C. S. ET AL. Anaerobic biodegradability of the organic components of municipal solid waste.São Paulo, Brasil. Paper preprints. VI International Symposium of Anaerobic Digestion, p. 12-16, 1991.
- PAUSS, A., SAMSON, R., GUIOT, S., BEAUCHEMIN, C., 1990. Continuous measurement of dissolved H₂ in an anaerobic reactor using a new hydrogen/air fuel cell detector. *Biotechnol. Bioeng*. 35, 492–501.
- PHILIPPOT,L., PIUTTI,S., MARTIN-LAURENT,F., HALLET,S., AND GERMON,J.C. (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl Environ Microbiol* 68:6121-6128.
- PRITCHETT MA, METCALF WW: Genetic, physiology and biochemical characterization of multiple methanol methyltransferases isozymas in *Methanosarcinas acetivorans* C2A. *Mol Microbiol* 2005, 56: 1183-1194.
- RASKIN, L., L. K. POULSEN, D. R. NOGUERA, B. E. RITTMANN, AND D. A. STAHL.Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by using oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol*. 60:1241-1248. 1994.
- REEVE, J. N. Molecular biology of methanogens. *Annu. Rev. Microbiol*. 46:165–191. 1992.
- REEVE, J. N.J. NOLLING, R.M. MORGAN, AND D.R. SMITH. (1997) Methanogenesis: genes, genomes and who's on first? *J.Bacteriol*. 179:5975-5986.
- RITCHIE, D.D., EDWARDS,C., MCDONOLD,I.R.,MURRELL,J.C. (1997) Detection of methanogens and methanotrophs in natural environments. *Global Change Biol* 3: 339-350.

- ROGERS, J.E. & WHITMAN, W.B., EDS. Microbial production and Consumption of greenhouse gases: Methano, Nitrofen Oxidiers and Halomethanes. Am. Soc. Microbiol, Washington, DC. 1991.
- RODRIGUES RCLB, FELIPE, MGA, ALMEIDA E SILVA, JB, Vitolo M, Gómez PV. F. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.18, p.299-311, 2001.
- ROSPERT, S., D. LINDER, J. ELLERMANN, AND R. K. THAUER. Two genetically distinct methyl-coenzyme M reductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain Marburg and DH. Eur. J. Biochem. 194:871–877. 1990.
- SCHNURER, A., ZELLNER, G., SVENSSON, B.H., 1999. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. FEMS Microbiol. Ecol. 29, 249–261.
- SHANNON, C.E., AND WEAVER, W. (1949) The mathematical theory of Communication. Urbana, IL: University of Illinois Press.
- SILVEY P. PULLAMMANAPPALLIL PC., BLACKALL LL., NICHOLS, P. (2000) Microbial ecology of the leach bed anaerobic digestion of unsorted municipal solid waste. Water Sei Technol 41:9 16.
- SLESAREV ET AL. The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. PNAS vol. 99 no. 7: 4644-4649. 2002.
- SMALLS, K., WACHTENDORF, U. AND HEUER, H. 1996 Community changes during BIOLOG incubation followed by TGGE or DGGE. Abstract. Meeting on Substrate use for Characterization of Microbiol Communities in Terrestrial Ecosystem, Innsbruck.
- SMITH ET AL. Complete Genome Sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Delta H: Functional Analysis and Comparative Genomics. Journal of Bacteriology vol. 179 no. 22: 7135-7155. 1997.
- SNAIDR, J. AMANN, R. HUBER, I., LUDWIG, W. AND SCHLEIFER, K.H. 1997 Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. Appl Environ Microbiol 63:2884-2896.
- SPEECE, R. 1996. Anaerobic /biothechnology for industrial wastewaters. Archae Press, Tennessee, USA.
- SPONZA, D.T., CIGAL, C. 2006. Relationship between anaerobic consortia and removal efficiencies in an UASB reactor degrading 2,4 dichlorophenol (DCP). Joun. Environ. Management. 2-14
- TAFDRUP, S. AND HJORT-GREGERSEN, K. Biogasfællesanlæg –produktion og økonomi. Dansk Bioenergi, Juni, 4–9. 1999.

- TAJIMA,K.R.I., AMINOV,T., NAGAMINE,K., OGATA,M., NAKAMURA,H., MATSUI AND Y., BENNO. 1999.Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries.FEMS Microbiol.Ecol.29:159-169.
- TANG,Y.Q.,SHIGEMATSU,T.,IKBAL,.MORIMURA,S. & KIDA,K. 2004The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in the thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. Water Res 38:2537-2550.
- TANG,Y.Q.,SHIGEMATSU,T.,IKBAL,.MORIMURA,S. & KIDA,K. 2005. Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation. J. Biosci. Bioeng. 99:150-164.
- THAUER RK. (1998) Biochemistry of methanogenesis a tribute to major Stenphenson1998 Marjory Stenphenson Prize Lecture. Microbiology 144:2377-2406.
- THAUER RK, HEDDERICH R, FISCHER R: Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂. In Methanogenesis. Edited by Ferry JG. Chapman & Hall; 1993: 253-303./
- THOMPSON, J.R. MARCELINO,L.A., AND POLZ,M.F. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by reconditioning PCR. Nucleic Acids Res 30:2083-2088.
- THOMSEN,T.R. NIELSEN,J.L.RAMSING,N.B. AND NIELSEN,P.H. 2004 Micromanipulation and further identification of FISH-labelled microcolonies of a dominant denitrifying bacterium in activated sludge. Environ Microbiol 6:470-179.
- TILCHE, A. E MALASPINA, F. Biogas production in Europe. Paper presented at 10th European Conference Biomass for Energy and Industry, Wurzburg, Germany, 8-11 June.1998.
- TOKURA M, CHAGAN I, USHIDA K, KOJIMA Y: Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. Curr Microbiol 1999, 39:123-128.
- TORSVIK,V., AND OVREAS,L. (2002)Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr Opin Microbiol 5:240-245.
- TSAO GT. Conversion of Cellulose. Part 1. *Structures of cellulosic materials and their hydrolysis by enzymes*. In: ALANI, D.I., MOO-YOUNG, M. Eds. Biotechnology and Applied Microbiology. New York: Elsevier Applied Science Publishers, p. 205-212, 1986.
- UEDA,T., SUGA,Y., YAHIRO,N., AND MATSUGUCHI,T. (1995) Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. J Bacteriol 177:1414-1417.
- ULLRICH,S., KARRASCH.B.HOPPE,H-G.,JESKULKE,K. AND MEHRENS,M. 1996. toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-3,3-dithio tetrazolium chloride. Appl.Environ. Microbiol. 62:4587-4593.

- VAN LIER, J. B., REBAC, S. AND LETTINGA, G. High-rate anaerobic wastewater treatment under psychrophilic and thermophilic conditions. In Proceedings of the IAWQ-NVA Int. conf. On advanced wastewater treatment, Amsterdam, 23-25 Sept.1996.
- YADVIKA,SANTOSH,SREEKRISHNAN,T.R.,KOHLI,S.,AND RANA,V. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques- a review. *Bioresource Technology* 95(1),1-10. 2004.
- WAGNER,M. LOY,A., NOGUEIRA,R., PURKHOLD,U., LEE,N., AND DAIMS,H. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:665-680.
- WEBER, K.P., 2006. Investigation of the Mechanisms and Fundamental Variables Affecting Acid Mine Drainage Treatment in Wetland Mesocosms. MSc Thesis, Department of Chemical Engineering, University of Waterloo. 122 pp.
- WEIL, C. F., D. S. CRAM, B. A. SHERF, AND J. N. REEVE. Structure and comparative analysis of the genes encoding component C of the methyl coenzyme M reductase in the extremely thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*. *J. Bacteriol.* 170:4718–4726.1988
- WERKER, A., DOUGHERTY, J., MCHENRY, J., VAN LOON, W., LEGGE, R., WARNER, B., 2004. Mesocosms applied for design, optimization, and benchmarking of wetland wastewater treatment. 9th International Conference on Wetland Systems, Avignon, France.
- WELANDER, V. P., METCALF, W. W. Loss of the *mtr* operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway.*PNAS*. vol. 102: 10664-10669. 2005.
- WUEBBLES,D.J., AND K.HAYHOE. Atmospheric methane and global change.*Earth-Sci.Rev.* 57:177-210.2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)