

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**ENRIQUECIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS
METANOTRÓFICOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL DE OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DE
METANO A PARTIR DE LODO DE REATOR
UASB**

Luciene Alves Batista Siniscalchi

**Belo Horizonte
2015**

**ENRIQUECIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS
METANOTRÓFICOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL DE OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DE
METANO A PARTIR DE LODO DE REATOR
UASB**

Luciene Alves Batista Siniscalchi

Luciene Alves Batista Siniscalchi

**ENRIQUECIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS
METANOTRÓFICOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL DE OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DE
METANO A PARTIR DE LODO DE REATOR
UASB**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientadora: Juliana Calabria de Araújo

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2015

Página com as assinaturas dos membros da banca examinadora, fornecida pelo Colegiado do Programa

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela vida, presença e amor que me fortalecem e proporcionam Fé.

Aos meus pais e à minha avó por aceitarem os momentos de ausência. Em especial à minha mãe Helena, meu exemplo de vida. Obrigada pela confiança, apoio e amor incondicional.

À minha filha Júlia, meu maior presente de DEUS e ao e meu marido Giuliano, pelo companheirismo, confiança, paciência e amor.

Aos meus amigos, Daniela e Elton, que sempre estiveram presentes, mesmo de longe, sempre tão perto, ajudando, apoiando, incentivando sempre com carinho e bom humor. Vocês são muito especiais!

À Rosana, minha querida chefinha, pela amizade construída e pelo incentivo em realizar o doutorado.

À querida Dr^a Juliana, pela oportunidade, orientação e incentivo.

Aos professores Dr. Carlos e Dr. Cláudio pelo conhecimento compartilhado ao longo de reuniões e/ou disciplinas.

À professora Sílvia, que sempre com muito carinho e cordialidade se dispôs a me ajudar nas análises estatísticas. Agradeço também à sua tutoria no REUNI e oportunidade de sempre aprender nas aulas ministradas.

À professora Sonaly Cristina e ao professor Léo Heller pelas considerações na banca de seminários.

Às professoras externas ao programa de pós-graduação do DESA, Cláudia e Silvana que estiveram presentes na minha qualificação contribuindo imensamente para a elaboração desse trabalho.

À professora Mônica e Donati pelo incentivo em dar seguimento à pós-graduação e carinho.

À Isabel, Jéssica, Sarinha e Marcos, pela competência, compromisso e amizade.

Aos novos companheiros, colegas e amigos que o laboratório de micro me proporcionou: Alyne, Ana Maria, Alessandra, Aracelle, Cíntia, Érika, Emanuel, Grazi, Guilherme, Júlia, Karol, Marcela, Marcela Prado, Renata, Victor e Thaís. Em especial à Alyne, Ana Maria, Cíntia, Érika, Grazi e Renata pela amizade, ajuda nas técnicas de biomol e com o reator, idéias, discussões e companheirismo constantes. Os meus dias se tornaram mais leves, agradáveis e bem humorados com vocês.

Aos funcionários do DESA, Iara e Júlio pela atenção.

À CAPES pela bolsa REUNI concedida.

À UFMG e ao DESA pela oportunidade.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado, enquanto a imaginação abraça o mundo inteiro, estimulando o progresso, dando luz à evolução. Ela é, rigorosamente falando, um fator real na pesquisa científica.”

Albert Einstein

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust

RESUMO

O metano é um dos principais gases relacionados ao efeito estufa e, conseqüentemente, aquecimento global. Em sistemas anaeróbios é produzido no interior do sistema, formando o biogás, que é capturado pelo separador trifásico. No entanto, também pode ser despreendido com o efluente final, contribuindo para o agravamento do efeito estufa, representando perdas ambientais e econômicas. Sabe-se que micro-organismos oxidadores de metano estão contidos nesses sistemas. Não obstante, poucos trabalhos retratam sobre o cultivo e seleção desse grupo e do potencial de oxidação anaeróbia de metano, ou seja, da atividade metanotrófica que pode ocorrer em lodo de reator UASB. Nesse sentido, esse estudo objetivou cultivar micro-organismos metanotróficos a partir de lodo proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico, em reator em bateladas sequenciais (RBS) com meio autotrófico acrescido de nitrito e nitrato. As eficiências médias de remoção de nitrito e nitrato foram de 72% (mediana = 57%) e 50% (mediana = 47%), respectivamente, a partir das concentrações de 100mg.L^{-1} e 25mg.L^{-1} , ao longo de 417 dias de cultivo, provavelmente devido à atividade heterotrófica desnitrificante ocorrida no período inicial de cultivo. A composição e estrutura da comunidade microbiana analisada por sequenciamento de nova geração (SNG) e PCR-DGGE demonstraram que a comunidade selecionada no reator foi diferente daquela originalmente presente no inóculo. Os filos dominantes no inóculo foram *Synergistetes*, *Firmicutes* e *Euryarchaeota*, ao passo que na biomassa enriquecida *Proteobacteria* e *Chloroflexi* predominaram. As condições de cultivo selecionaram bactérias metanotróficas do gênero *Methylocaldum* e *Methylosinus* que apresentaram, respectivamente, abundância relativa de 8,9% e 2,3% após 241 dias de cultivo. A atividade metanotrófica anaeróbia da biomassa cultivada, apresentou valores medianos correspondentes a $17,3\text{mLCH}_4.\text{gSTV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $15,4\text{ mLCH}_4.\text{gSTV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (para 191 e 241 dias), e depois decaiu para $12\text{mLCH}_4.\text{gSTV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (no final do cultivo, após 400 dias). Esses valores foram superiores à atividade metanotrófica no lodo proveniente do reator UASB, que correspondeu à $6\text{ mLCH}_4.\text{gSTV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Esses resultados sugerem que a atividade metanotrófica dentro de um reator UASB, seja responsável pelo consumo de 29% do metano produzido no reator, demonstrando a importância dos micro-organismos metanotróficos para o balanço de metano nesses sistemas e a possibilidade em se utilizar esses microrganismos no pós-tratamento de forma a reduzir passivos ambientais como o metano dissolvido em efluentes advindos de reatores anaeróbios.

ABSTRACT

Methane is a major greenhouse gas related and thus global warming. In anaerobic systems is produced within the system to form the biogas, which is captured by the three-phase separator. However, it can also be detached to the final effluent, contributing to the greenhouse effect, representing environmental and economic losses. It is known that methane oxidizers micro-organisms are contained in these systems. Nevertheless, few studies about the cultivation and selection of this group and oxidative capacity, and methanotrophic activity that can occur from UASB sludge were performed. Thus, this study aimed to cultivate microorganisms methanotrophic from sludge from UASB reactor treating domestic wastewater in sequencing batch reactor (SBR) with autotrophic medium supplemented with nitrite and nitrate. The average efficiencies of removal of nitrite and nitrate were 72% (median = 57%) and 50% (median = 47%), respectively, from the concentrations of 25mg.L⁻¹ and 100mg.L⁻¹ along 417 days of cultivation, probably due to the heterotrophic denitrifying activity that occurred in the initial period of operation of the RBS. The composition and structure of the microbial community analyzed by next generation sequencing (NGS) and DGGE showed that the selected community in the reactor was different from that originally present in the inoculum. The dominant phyla in the inoculum were *Synergistetes*, *Firmicutes* and *Euryarchaeota*, whereas biomass enriched *Proteobacteria* and *Chloroflexi* predominated. Growing conditions selected the methanotrophic genres *Methylocaldum* and *Methylosinus*, respectively, with relative abundances of 8.9% and 2.3% after 241 days of cultivation. The methanotrophic activity was also assessed in cultured biomass, with median values corresponding to 17,3mLCH₄.gVST⁻¹.day⁻¹ and 15.4 mLCH₄.gVST⁻¹.day⁻¹ (191 and 241 days), and then declined for 12mLCH₄.gVST⁻¹.day⁻¹ (at the end of cultivation, after 400 days). These values were higher than the methanotrophic activity observed in the sludge from UASB reactor, which corresponded to 6 mLCH₄.gVST⁻¹.day⁻¹. From the results obtained, it suggests that the methanotrophic activity is responsible for consuming 29% of the methane inside the UASB reactor, demonstrating the importance of methanotrophic microorganisms to methane balance these systems and the possibility of using these microorganisms in the post-treatment to reduce environmental impacts as methane dissolved in effluents from the anaerobic reactors.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
ESTRUTURAÇÃO DA TESE	3
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 OBJETIVO GERAL	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3 HIPÓTESES.....	7
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	9
4.1 PROCESSO DE FORMAÇÃO DO METANO	9
4.2 FONTES E SUMIDOUROS DO METANO ATMOSFÉRICO.....	12
<i>A produção e o consumo de metano em diferentes ecossistemas.....</i>	<i>13</i>
4.3 A OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DO METANO	18
4.3.1 <i>A Oxidação Aeróbia do Metano</i>	<i>18</i>
4.3.2 <i>Oxidação Anaeróbia do Metano.....</i>	<i>28</i>
4.4 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MICRO-ORGANISMOS METANOTRÓFICOS	35
<i>Oxidação anaeróbia do metano dependente do nitrito.....</i>	<i>36</i>
4.5 POTENCIAL DE OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DO METANO - ATIVIDADE METANOTRÓFICA....	41
4.6 MÉTODOS PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE MICROBIANA.....	43
4.6.1 <i>PCR-DGGE.....</i>	<i>44</i>
4.6.2 <i>Sequenciamento de nova geração.....</i>	<i>46</i>
5 DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS METANOTRÓFICOS EM AMOSTRAS DE LODO E SEDIMENTO PROVENIENTES DE SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO	51
5.1 RESUMO.....	51
5.2 ABSTRACT	51
5.3 INTRODUÇÃO	52
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
5.4.1 <i>Locais de amostragem.....</i>	<i>54</i>
5.4.2 <i>Processamento e Preservação das amostras.....</i>	<i>55</i>
5.4.3 <i>Extração de DNA/PCR.....</i>	<i>57</i>
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
<i>Deteção de micro-organismos metanotróficos.....</i>	<i>59</i>
5.6 CONCLUSÕES	60
6 ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METANOTRÓFICA ANAERÓBIA DE LODO PROVENIENTE DE REATOR UASB	61
6.1 RESUMO.....	61
6.2 ABSTRACT	61
6.3 INTRODUÇÃO	62
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
6.4.1 <i>Ensaio do Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano</i>	<i>65</i>
6.4.2 <i>Padronização das condições experimentais para a determinação do Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano</i>	<i>66</i>
6.4.3 <i>Metodologia analítica para análise do decaimento de metano através da cromatografia gasosa.....</i>	<i>68</i>
6.4.4 <i>Estudo da dinâmica microbiana por PCR-DGGE.....</i>	<i>69</i>
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
6.5.1 <i>Padronização das condições experimentais para os ensaios de PoAnM (Ensaio 1 a 3).....</i>	<i>70</i>
<i>Determinação da atividade metanotrófica em lodo de UASB (Ensaio IV a VII).....</i>	<i>76</i>

6.5.2	<i>Estimativa da contribuição da atividade metanotrófica anaeróbia para o balanço de CH₄</i>	77
6.5.3	<i>Análise microbiológica por PCR-DGGE</i>	79
6.6	CONCLUSÕES	82
7	ENRIQUECIMENTO E ATIVIDADE DE MICRO-ORGANISMOS METANOTRÓFICOS A PARTIR DE LODO DE SISTEMA DE TRATAMENTO DE ESGOTO MUNICIPAL	83
7.1	RESUMO.....	83
7.2	ABSTRACT	84
7.3	INTRODUÇÃO	84
7.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	87
7.4.1	<i>Lodo de Inóculo e aparato experimental</i>	87
7.4.2	<i>Procedimentos Analíticos</i>	88
7.4.3	<i>Análise da comunidade microbiana presente no inóculo e na biomassa do RBS</i>	89
7.4.4	<i>Ensaio do Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano e determinação da atividade metanotrófica</i>	90
7.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
7.5.1	<i>Enriquecimento em reator em bateladas sequenciais</i>	92
7.5.2	<i>Análise da comunidade microbiana do inóculo e enriquecida no reator</i>	95
7.5.3	<i>Composição da comunidade microbiana por pirosequenciamento 454</i>	96
7.5.4	<i>Determinação da taxa de consumo de metano e atividade metanotrófica</i>	104
7.6	CONCLUSÕES	106
8	ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA EM REATOR USADO NO CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS OXIDADORES DE METANO	107
8.1	RESUMO.....	107
8.2	ABSTRACT	107
8.3	INTRODUÇÃO	108
8.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	110
8.4.1	<i>Aparato experimental</i>	110
8.4.2	<i>Descrição do Inóculo</i>	110
8.4.3	<i>Meio de Cultura</i>	111
8.4.4	<i>Análises físico-químicas</i>	111
8.4.5	<i>Análise da comunidade microbiana selecionada no RBS</i>	113
8.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	115
8.5.1	<i>Monitoramento das concentrações de nitrito e nitrato no RBS</i>	115
8.5.2	<i>Caracterização da estrutura e diversidade bacteriana por PCR-DGGE</i>	119
8.5.3	<i>Análise da composição comunidade microbiana pelo sequenciamento de nova geração (SNG)</i>	124
8.5.4	<i>Considerações finais</i>	136
8.6	CONCLUSÕES	144
9	CONCLUSÕES GERAIS	145
10	RECOMENDAÇÕES	147
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
12	APÊNDICE	166
12.1	RESULTADOS COMPLEMENTARES – CAPÍTULO 6	166
12.2	RESULTADOS COMPLEMENTARES – CAPÍTULO 8	172

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1. Organograma contendo todas as etapas experimentais da tese.....	5
Figura 4-1 - Digestão anaeróbia da matéria orgânica carbonácea.....	10
Figura 4-2. Fluxograma resumindo as possibilidades de destinação para o gás metano.....	12
Figura 4-3 - Via metabólica do metano e assimilação de formaldeído.....	19
Figura 4-4. Árvore filogenética mostrando as espécies de metanotróficas conhecidas com base nas sequências do gene RNAr 16S.....	27
Figura 4-5. Árvore filogenética mostrando as espécies de metanotróficas conhecidas com base nas sequências do gene funcional <i>pmoA</i>	28
Figura 4-6. Oxidação anaeróbia do metano associada à redução de sulfato.....	29
Figura 4-7 - Árvore filogenética mostrando sequências de ANME.....	30
Figura 4-8. Microscopia de Epifluorescência de diferentes células individuais e/ou agregadas de ANME visualizadas por FISH.....	32
Figura 4-9. Processo de oxidação do metano dependente do nitrito realizado pela bactéria <i>Candidatus Methylopirabilis oxyfera</i> - ciclos do carbono e nitrogênio associados.....	34
Figura 4-10. Desenho esquemático mostrando o pirosequenciamento 454.....	48
Figura 5-1. Sistemas de tratamento de esgotos investigados, com os pontos de coleta destacados.....	56
Figura 6-1 - Volume de metano medido durante o ensaio para determinar o volume de metano consumido.....	70
Figura 6-2 - Volume de metano medido durante o ensaio para determinar o volume de metano consumido.....	72
Figura 6-3 - Volume de metano medido durante o ensaio para determinar o volume de metano consumido pelas metanotróficas.....	74
Figura 6-4 - Volume de metano consumido nos ensaios com lodo de UASB.....	76
Figura 6-5 - Gel de DGGE corado com Sybr-Gold contendo fragmento de DNA ribossomal 16S amplificado com primers universais para Bacteria.....	79
Figura 6-6. Dendrograma baseado no perfil de bandas do DGGE.....	81
Figura 7-1. Concentração de Nitrito e Nitrato afluente e efluente e eficiência de remoção durante a operação do RBS (subdividido nos períodos P1, P2 e P3).....	92
Figura 7-2. Box-plot da remoção de eficiência de nitrito (a) e nitrato (b) nos períodos de operação do RBS (P1 a P3).....	94
Figura 7-3. Detecção por PCR com os primers ANME-F e 907R para o RNAr 16S de arqueias metanotróficas. (1) Padrão de peso molecular (Ladder Express); (2) inóculo; (3) biomassa do RBS durante o período P1; (4) biomassa do RBS durante o período P2; (5) controle negativo.....	95
Figura 7-4. Histograma de distribuição do comprimento das sequências obtido através do pirosequenciamento.....	96
Figura 7-5. Composição da Comunidade Microbiana presente no inóculo e RBS (100 dias de operação) em nível de filo. A abundância relativa é apresentada como a porcentagem dos diferentes filós em relação ao número total de filós presentes nas amostras.....	97

Figura 7-6. Composição da comunidade microbiana presente no inóculo e após 100 dias de operação. (a) Nível taxonômico de ordem (b) Nível taxonômico de gênero. As OTUs com abundância relativa inferior a 1% estão representadas como outros (ordens ou gêneros) ...	99
Figura 7-7. Árvore filogenética das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) relacionadas às sequências de bactérias metanotróficas. As sequências foram obtidas por pirosequenciamento 454. O número de sequências recuperadas dentro de cada UTO estão indicadas entre parênteses.....	103
Figura 8-1. Eficiência de Remoção de Nitrito e nitrato nos períodos P1 a P4.	116
Figura 8-2 - Gel de DGGE corado com Sybr-Gold contendo fragmento de DNA ribossomal 16S amplificado com primers universais para Bacteria	119
Figura 8-3. Dendrograma baseado no perfil de bandas do DGGE.	120
Figura 8-4 - Composição da comunidade microbiana presente em 191, 241 e 417 dias de operação do RBS em nível de filo (abundância relativa).....	125
Figura 8-5. Ordens e gêneros de bactérias relacionadas à oxidação do metano.	132
Figura 8-6. Ordens e gêneros de arqueias relacionadas à oxidação do metano.	133
Figura 8-7. Filos mais abundantes (1%) no RBS ao longo do período operacional. Figura 8.7a: Dados obtidos pela plataforma Miseq Illumina. Figura 8.7b: Dados obtidos pelo Pirosequenciamento 454.....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 4-1. Contribuição de produção e consumo de metano nas prováveis fontes.....	14
Tabela 4-2. Características dos gêneros de metanotróficas pertencentes à Classe <i>Gammaproteobacteria</i>	21
Tabela 4-3. Características dos gêneros de metanotróficas pertencentes à Classe <i>Alphaproteobacteria</i>	21
Tabela 4-4. Características gerais dos metanotróficos do filo <i>Verrucomicrobia</i>	24
Tabela 4-5. Comparação das famílias de metanotróficas aeróbias descritas.....	25
Tabela 4-6. Resumo dos principais táxons de metanotróficas descritos na literatura.....	35
Tabela 4-7. Resumo dos principais trabalhos de seleção e cultivo de micro-organismos metanotróficos encontrados na literatura.....	39
Tabela 4-8. Taxa de oxidação do metano à luz da literatura.....	43
Tabela 5-1. Tabela contendo as principais características e condições operacionais dos sistemas de tratamento de esgoto investigados.....	55
Tabela 5-2 - Pares de primers empregados na detecção por PCR das amostras de esgoto doméstico proveniente do CEPTs/COPASA.....	58
Tabela 5-3 – Resultados da detecção de metanotróficas nas amostras do CePTs/COPASA e Sistema de Lodos Ativados/COPASA.....	60
Tabela 6-1 - Condições gerais dos ensaios de POAnM I a III.....	66
Tabela 6-2 - Mediana da taxa de consumo de metano e Atividade Metanotrófica das amostras (Ensaio I a III).....	74
Tabela 6-3 - Estatística Descritiva dos ensaios IV a VII de Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano a partir de lodo de UASB.....	77
Tabela 6-4 - Mediana da taxa de consumo de metano e Atividade Metanotrófica das amostras de lodo de UASB.....	77
Tabela 6-5. Alinhamentos das sequências obtidas das bandas com os programas RDP Classifier e Blast.....	80
Tabela 7-1. Análise da diversidade das amostras do inóculo e RBS (100 dias de operação) por meio de índices de Shannon e Equitabilidade.....	98
Tabela 7-2. Mediana da taxa de consumo de metano e Atividade Metanotrófica das amostras.....	105
Tabela 8-1 - Parâmetros de análise, métodos e frequência das análises do RBS.....	112
Tabela 8-2. Estatística descritiva para os períodos de consumo de nitrito e nitrato.....	117
Tabela 8-3 - Bandas de DGGE (gel mostrado na Figura 8.2) associadas ao gene RNAr 16S.....	122
Tabela 8-4. Diversidade e riqueza calculada para as amostras do RBS nos dias 191, 241 e 417 de operação.....	127
Tabela 8-5. Ordens com abundância igual ou superior a 1% ao longo dos períodos amostrados.....	129
Tabela 8-6. Atividade metanotrófica e grupo de micro-organismos metanotróficos encontradas ao longo da operação do reator de acordo com as técnicas ¹ adotadas.....	138

x

Tabela 8-7. Atividade metanotrófica encontrada nos ensaios realizados comparados à literatura.	139
Tabela 8-8. Comparação entre os índices de diversidade encontrados no RBS ao longo de todo o período de operação.....	140
Tabela 8-9. Grupos fisiológicos presentes no interior do RBS ao longo da operação.....	143
Tabela 12-1. Abundância relativa de todos os filos encontrados no interior do RBS ao longo de toda a operação do reator.	172
Tabela 12-2. Ordens obtidas através da plataforma Miseq Illumina nos dias 191, 241 e 417 amostrados do RBS. (Continua).....	173
Tabela 12-3. Gêneros obtidos através da plataforma Miseq Illumina nos dias 191, 241 e 417 amostrados do RBS. (Continua).....	176
Tabela 12-4. Grupos fisiológicos e porcentagem de cada <i>read</i> que compõe os grupos.....	180
Tabela 12-5. Número de reads apresentado pelas OTUs mais abundantes	182

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANME	<i>Anaerobic Methanotrophs</i> ou Metanotróficas anaeróbias
OAM	<i>Anaerobic Oxidation of Methane</i> ou Oxidação Anaeróbia do Metano.
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
CEPTs	Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento
CO ₂	Dióxido de Carbono
CH ₄	Metano
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
DAPI	4',6-diamidino-2-Fenil indol
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> ou Eletroforese em Gel de Gradiente
Desnaturante	
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	etilenodiaminotetraacetato de sódio diidratado
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i> ou Hibridação in situ Fluorescente
INDEAR	Instituto de Agrobiologia Rosario
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
MMO	Metano- Mono-Oxigenase
mg	Miligrama
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
NC10	Filo Candidato NC10
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
N-DAMO	<i>Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation</i> ou Oxidação Anaeróbia do Metano dependente de nitrito
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato

OD	Oxigênio Dissolvido
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i> ou Unidade taxonômica Operacional (UTO)
pb	Par de base
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> ou tampão fosfato salino
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
POAnM	Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano
RBS	Reator em Batelada Sequencial
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossomal
Rpm	Rotações por Minuto
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNG	Sequenciamento de Nova Geração
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
TAE	Tris acetato EDTA
Taq	<i>Thermoaquaticus</i>
TEMED	tetrametil etileno diamina
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> ou Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages</i>
UV	Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

Os principais gases relacionados ao efeito estufa são o gás carbônico (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), clorofluorcarbonos (CFCs), o ozônio (O₃) e o vapor d'água (IPCC, 2007). Devido à sua maior emissão, o CO₂ é o gás que mais contribui para o efeito estufa no planeta, em decorrência, principalmente, do crescimento urbano e industrial. Entretanto, outro gás que merece destaque nesse cenário é o metano. Apesar de sua baixa concentração na atmosfera, cerca de aproximadamente 1,7 ppbv⁻¹, seu potencial de acumular e reemitir calor é vinte e cinco vezes maior que o do CO₂ (KNITTEL e BOETIUS, 2009; ARAUJO, 2010), fazendo com que o metano seja responsável por cerca de 25% do efeito estufa observado atualmente.

As emissões significativas de CH₄ vêm sendo relacionadas às fontes antrópicas, como o uso do solo para a pecuária, agricultura, e à emissão por processos de tratamento e armazenamento de resíduos sólidos e efluentes líquidos, como aterros sanitários e reatores anaeróbios (REEBURGH, 2007; KNITTEL e BOETIUS, 2009).

Dentre as fontes acima, destaca-se o tratamento anaeróbio de esgoto doméstico através de Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e de Manta de Lodo (do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* - UASB) que, no Brasil, é uma tecnologia bem estabelecida (CHERNICHARO, 2007). A comunidade microbiana presente no reator UASB converte a matéria orgânica, na ausência de oxigênio, em produtos como gás carbônico, gás sulfídrico e metano. Na fase gasosa, o metano pode ser coletado e usado como fonte de energia, mas, é difícil de ser recuperado, quando dissolvido no efluente, principalmente sob baixas temperaturas (LUESKEN, 2011). A liberação de metano dissolvido no efluente também pode contribuir para o efeito estufa, e, conseqüentemente, aquecimento global (CAKIR e STENSTROM, 2005; BOGNER *et al.*, 2008; LUESKEN, 2011; SOUZA e CHERNICHARO, 2011).

Em pesquisa realizada por Souza e colaboradores (2011), a partir de um reator UASB tratando esgotos domésticos, relatou-se que menos de 60% do metano produzido no reator foi eficazmente recuperado como biogás no interior do sistema pelo separador trifásico. Dessa forma, cerca de 36-41% do metano restante era eliminado dissolvido no efluente final, indicando que as perdas de metano dissolvido são consideravelmente altas (SOUZA *et al.*,

2011). A fim de se evitar e/ou minimizar as perdas de metano dissolvido em efluentes anaeróbios, algumas alternativas tais como ressalto hidráulico, agitação e aeração física ("*stripping*"), podem ser implementadas (GREENFIELD e BATSTONE, 2004). No entanto, estas soluções são mecanizadas e requerem custos enquanto a oxidação biológica do metano pode ser realizada por micro-organismos presentes no interior do reator, podendo assim, colaborar para a redução de metano dissolvido no efluente.

Nesse sentido, a investigação a respeito do potencial de oxidação biológica do metano e enriquecimento e seleção de micro-organismos metanotróficos, que poderiam ser utilizados no pós-tratamento do efluente anaeróbio, torna o trabalho relevante, sendo desejável ambientalmente e do ponto de vista econômico.

Alguns trabalhos detectaram micro-organismos metanotróficos em amostras de água doce, oceanos, pastagens, arrozais (HANSON e HANSON, 1996) sob condições aeróbias, e sedimentos de lagos de água doce, lodos de digestores de uma ETE localizada em Brisbane na Austrália e zonas marinhas anóxicas sob condições anaeróbias (ETTWIG *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2009; KNITTEL e BOETIUS, 2009; LUESKEN *et al.*, 2011a).

A oxidação aeróbia do metano é realizada por bactérias metanotróficas das classes α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* e filo *Verrucomicrobia* (BOWMAN *et al.*, 1995; HANSON e HANSON, 1996; DUNFIELD *et al.*, 2007; LIEBNER e WAGNER, 2007). A oxidação anaeróbia do metano (OAM) é um mecanismo que pode ser mediado por arqueias anaeróbias, ANME, subgrupos ANME-1, ANME-2 e ANME-3 (KNITTEL e BOETIUS, 2009; MEULEPAS *et al.*, 2010) ou, ainda, por bactérias pertencentes ao filo NC10 que realizam um processo designado como N-DAMO (*Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation*), no qual a oxidação anaeróbia do metano é acoplada à desnitrificação a partir do nitrito, resultando na produção de CO₂ e gás nitrogênio (N₂) (ETTWIG *et al.*, 2009; LUESKEN *et al.*, 2011a).

No Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento da UFMG/COPASA (CEPTs), GARCIA (2009) verificou a presença de bactérias e arqueias metanotróficas a partir de amostras de espuma e lodo, respectivamente, de diferentes reatores UASB tratando esgoto doméstico. Não obstante, a identificação e enriquecimento desses micro-organismos não foram realizados, tampouco foram feitos ensaios para comprovar o potencial de oxidação

aeróbio e anaeróbio de metano, por parte das amostras investigadas, de forma a verificar a importância dessas bactérias no consumo de metano dentro desses sistemas.

Diante disso e da escassez de trabalhos a respeito da seleção de micro-organismos metanotróficos e atividade metanotrófica desse grupo em reatores UASB tratando esgoto doméstico, o presente trabalho teve como objetivo determinar o potencial de oxidação anaeróbia do metano por meio da seleção e enriquecimento de micro-organismos metanotróficos em um reator em bateladas sequenciais (RBS) e através de uma série de ensaios em batelada, utilizando-se lodo anaeróbio proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico como inóculo.

Estruturação da tese

Esse trabalho foi elaborado em doze capítulos, conforme descrito a seguir:

- Capítulo 1: Introdução;
- Capítulo 2: Objetivos;
- Capítulo 3: Hipóteses;
- Capítulo 4: Revisão da Literatura;
Nesse capítulo é apresentada a revisão literária e análise crítica, que objetivou dar suporte e embasamento teórico à pesquisa e aos capítulos subsequentes relacionados à elaboração e discussão dos resultados.
- Capítulos 5 a 8: Os capítulos de cinco a oito foram confeccionados em formato de artigo científico e cada capítulo visou atender a um e/ou mais objetivos específicos da tese como é detalhado adiante:
- Capítulo 5: Detecção de micro-organismos metanotróficos em amostras de lodo e sedimento provenientes de sistemas de tratamento de esgoto doméstico;
- Capítulo 6: Estabelecimento de protocolo padrão para determinação da atividade metanotrófica anaeróbia de lodo proveniente de reator UASB;
- Capítulo 7: Enriquecimento e atividade de micro-organismos metanotróficos a partir de lodo de sistema de tratamento de esgoto municipal;
Esse capítulo traz o estudo da comunidade microbiana ao longo de 100 dias de operação do reator em batelada sequencial (RBS) determinada através do

pirosequenciamento pela plataforma 454 da Roche bem como a determinação da taxa de oxidação do metano utilizando-se a biomassa selecionada no RBS como inóculo (dados publicados em SINISCALCHI *et al.* (2015).

- Capítulo 8: Estrutura e composição da comunidade microbiana em reator usado no cultivo de micro-organismos oxidadores de metano.

O capítulo 8 apresenta a determinação da diversidade microbiana cultivada no RBS após 100 dias de operação e até o final do experimento, 417 dias, pela plataforma Illumina/MiSeq e através da técnica de DGGE. Nesse sentido, os capítulos sete e oito trataram sobre o cultivo e seleção de micro-organismos metanotróficos em um fermentador operado sob a forma de bateladas sequenciais. No entanto, os dados do capítulo 7 (dados já publicados) são parciais (mostram a composição da comunidade microbiana do início da operação do reator ao dia 100) e não apresentam todo o período de operação do reator, o que será retratado e discutido, portanto, no capítulo 8, tornando-o essencial para avaliação da comunidade microbiana e micro-organismos metanotróficos cultivados ao longo dos 417 dias de operação do RBS.

- Capítulo 9: Conclusões Gerais;

O capítulo 9 traz as conclusões gerais para cada um dos objetivos delineados nessa tese.

- Capítulo 10: Recomendações;

Esse capítulo aponta sugestões e possibilidades de trabalhos futuros nessa linha de pesquisa sobre micro-organismos oxidadores de metano.

- Capítulo 11: Referências bibliográficas;

- Capítulo 12: Apêndices;

Esse capítulo constitui o apêndice e traz dados suplementares não mostrados ao longo dos capítulos, mas que podem ser relevantes para melhor compreensão da metodologia e/ou interpretação dos resultados.

O organograma a seguir (figura 1.1) traz um resumo das etapas realizadas na presente tese.

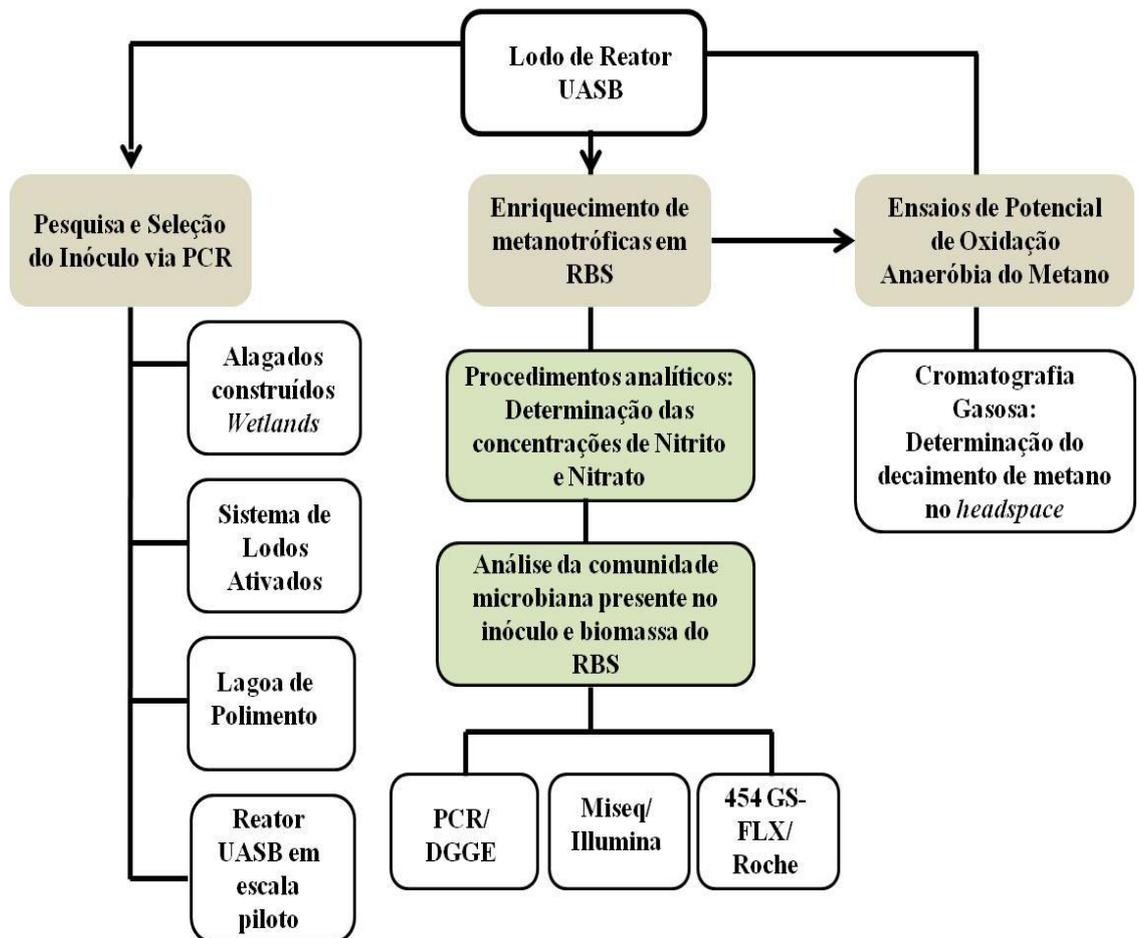


Figura 1-1. Organograma contendo todas as etapas experimentais da tese.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Cultivar e selecionar micro-organismos metanotróficos e determinar o potencial de oxidação anaeróbia do metano por esses micro-organismos em lodo proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico.

2.2 *Objetivos específicos*

1. Investigar a presença de bactérias e arqueias metanotróficas em amostras de lodo e sedimentos provenientes de Sistemas de Lodos Ativados, Reatores UASB, Alagados Construídos e Lagoa de Polimento, de modo a selecionar o melhor inóculo para o experimento de cultivo (resultados apresentados no Capítulo 5);
2. Testar e definir as melhores condições para realização do ensaio de atividade metanotrófica anaeróbia em lodo de reator UASB coletado em diferentes tempos e determinar a atividade metanotrófica desse lodo a partir das condições selecionadas (resultados apresentados no Capítulo 6);
3. Cultivar e selecionar micro-organismos oxidadores de metano a partir de lodo de reator UASB e determinar a atividade metanotrófica anaeróbia a partir da biomassa enriquecida no RBS (resultados apresentados no Capítulo 7);
4. Determinar a diversidade, estrutura e composição da comunidade microbiana selecionada no RBS ao longo dos 417 dias de cultivo (resultados apresentados no Capítulo 8).

3 HIPÓTESES

Para a elaboração e embasamento desta tese, as seguintes hipóteses foram consideradas:

1. Micro-organismos metanotróficos aeróbios e anaeróbios estão presentes em lodo e sedimentos de sistemas de tratamento de esgotos.

Premissa: alguns estudos realizados anteriormente detectaram a presença de micro-organismos metanotróficos em lodo de biodigestores e lodo proveniente de sistemas de tratamento de efluentes industriais. Uma vez que as condições são favoráveis à produção de metano, um local que abriga uma fonte de produção também conterá micro-organismos consumidores de metano.

2. Micro-organismos metanotróficos anaeróbios presentes no lodo de um reator UASB em escala piloto tem potencial para oxidar biologicamente o metano, e, portanto, consumir parte do metano produzido no reator.

Premissa: os micro-organismos metanotróficos são capazes de oxidar o metano, entretanto, a atividade metanotrófica e o potencial de oxidação anaeróbia do metano por parte do lodo proveniente de reator UASB ainda não foi determinado.

3. É possível cultivar e selecionar micro-organismos metanotróficos em reator em bateladas sequenciais a partir de lodo de reator UASB como inóculo utilizando-se nitrito e nitrato como aceptores de elétrons.

Premissa: uma vez que micro-organismos metanotróficos foram detectados em lodo de reator UASB, indicando presença dos mesmos, eles poderão ser selecionados e cultivados utilizando-se condições favoráveis ao seu cultivo.

4. Alterações na composição e estrutura da comunidade microbiana ocorrem ao longo do período de operação do reator em batelada sequencial, uma vez que as condições utilizadas objetivam favorecer a seleção de micro-organismos metanotróficos.

Premissa: as condições de cultivo e enriquecimento, tais como, presença de nitrito e nitrato, temperatura e metano (como única fonte de carbono adicionada), exercerão pressão seletiva

na comunidade microbiana inicial (inóculo) alterando sua composição e estrutura, como diversidade, abundância e riqueza ao longo do tempo, de forma a selecionar favoravelmente a presença de micro-organismos metanotróficos, ainda que presentes em baixa abundância na comunidade inicial (inóculo).

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Processo de formação do metano

O metano é o produto final da digestão anaeróbia de compostos orgânicos. Esse processo converte a matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, gás sulfídrico e água, além de novas células bacterianas. O processo de digestão anaeróbia possui várias fases podendo ser resumido como a seguir (GUJER e ZEHNDER, 1983; VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994):

1- Hidrólise: é a primeira fase da digestão anaeróbia, na qual os materiais particulados complexos (polímeros) são hidrolisados em moléculas mais simples (monômeros), os quais podem atravessar a parede celular das bactérias fermentativas. Os gêneros *Clostridium*, *Micrococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium*, *Proteus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Eubacterium* representam os principais gêneros de bactérias hidrolíticas.

2- Acidogênese: As moléculas orgânicas de cadeia mais simples (glicose, ácidos graxos, aminoácidos) advindas da etapa de hidrólise, são fermentadas a ácidos orgânicos (tais como acético, butírico, propiônico), álcool, dióxido de carbono e hidrogênio, além de material celular. Os gêneros mais usuais de bactérias fermentativas acidogênicas em reatores anaeróbios são: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus* e *Escherichia*.

3- Acetogênese: as bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação de compostos intermediários, como propionato e butirato, provenientes da acidogênese, em substratos apropriados para os micro-organismos metanogênicos como acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. As bactérias responsáveis pela acetogênese são denominadas sintróficas porque a existência delas depende da atividade de micro-organismos consumidores de hidrogênio. Alguns exemplos de bactérias sintróficas presentes em digestores anaeróbios são: *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas*.

4- Metanogênese: a etapa final do processo de conversão anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono é efetuada pelos micro-organismos metanogênicos pertencentes ao domínio *Archaea*. As arqueias metanogênicas são pertencentes às ordens: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* e *Methanopyrales* (LIU, 2010). As bactérias metanogênicas se subdividem em dois grupos fisiológicos, um primeiro grupo no qual o metano é originado a partir do acetato como fonte

de carbono e energia (denominado metanogênicas acetoclásticas) e um segundo grupo no qual o metano formado é proveniente do gás carbônico como fonte de carbono e o hidrogênio como fonte de energia (denominado metanogênicas hidrogenotróficas). A figura 4.1 apresentada abaixo demonstra a rota da digestão anaeróbia da matéria orgânica e, conseqüentemente, a produção de metano (CHERNICHARO, 2007).

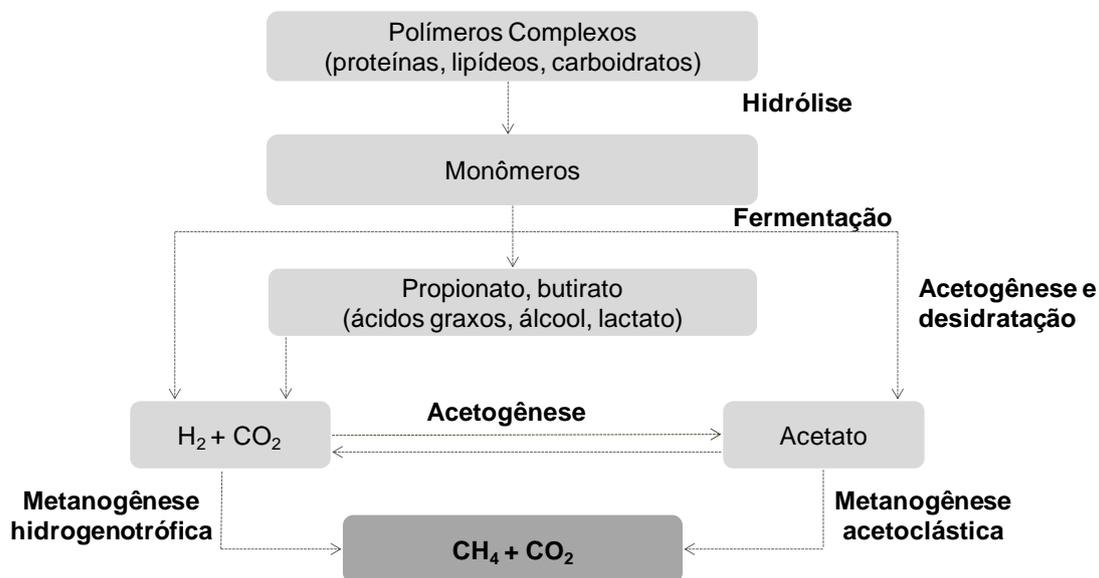


Figura 4-1 - Digestão anaeróbia da matéria orgânica carbonácea.

Fonte: Adaptado de CHERNICHARO, 2007, p. 33.

Em suma, a remoção da matéria orgânica carbonácea através da digestão anaeróbia ocorre por meio de diversas reações bioquímicas e origina como um dos subprodutos, o biogás, composto por gás carbônico, gás sulfídrico, o gás metano e outros (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994; GERARDI, 2006; CHERNICHARO, 2007). De acordo com NOYOLA *et al.* (2006) citado por SOUZA (2010), o biogás formado em reatores anaeróbios tratando esgotos domésticos, a citar os reatores UASB, possui em sua composição, 70 a 80% de metano, 10 a 25% de nitrogênio e 5 a 10% de gás carbônico. As concentrações de gás sulfídrico no biogás são relativamente baixas, variando de 0,11% a 0,39% (AGRAWAL *et al.*, 1997; SOUZA, 2010). O biogás gerado, através do fluxo ascendente é direcionado e coletado no separador trifásico instalado na parte superior do reator UASB. Entretanto, devido às propriedades relacionadas à solubilidade dos gases no líquido (nesse caso, o efluente), uma parcela significativa dos gases gerados no tratamento de efluentes pode permanecer dissolvida na fase líquida, o que acarreta, portanto, em sua liberação juntamente com a água residuária

tratada (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994; NOYOLA *et al.*, 2006; SOUZA, 2010).

O gás metano, à temperatura ambiente (25°C) apresenta a constante de Henry (Kh) igual a 21, e a 30°C, temperatura utilizada nos ensaios nesta pesquisa, apresenta Kh= 19,8. De acordo com a Lei de Henry, a quantidade de um gás que se dissolve em um dado volume de líquido, em temperatura constante, é diretamente proporcional à pressão que o gás exerce acima do líquido, como demonstrado na equação: $C_{\text{equil}} = K_h \cdot P_{\text{gás}}$, onde:

- C_{equil} é a concentração do gás dissolvido no líquido (mg.L^{-1}),
- $P_{\text{gás}}$ é a pressão parcial do gás acima do líquido (atm);
- K_h é a constante da lei de Henry para um gás em uma dada temperatura ($\text{mg.L}^{-1} \cdot \text{atm}$)

Não obstante, ainda que o metano apresente baixa solubilidade no líquido, SOUZA *et al.* (2011), reportaram a possibilidade da ocorrência de perdas, relativamente altas, de metano dissolvido no efluente final.

Em sua pesquisa, SOUZA (2010) ao medir a concentração de metano dissolvido em efluentes de reatores UASB tratando esgoto doméstico, em diferentes escalas (piloto, demonstração e real), obteve concentrações variando de 17 a 22 mg.L^{-1} . Outros trabalhos, como os de SINGH e VIRARAGHAVAN (1998) e SEGHEZZO (2004), segundo SOUZA (2010), quantificaram, respectivamente, as perdas de metano em 28 a 39%. Os valores obtidos para a perda de metano dissolvido no efluente de reatores UASB, embora bastante variáveis, mostram que essa parcela é significativa.

Adicionalmente, medições efetuadas por SOUZA e CHERNICHARO (2011) indicaram que, de todo o metano produzido em reatores UASB tratando esgotos domésticos, a parcela dissolvida no efluente variou de 36 a 40%, enquanto a parcela emitida na superfície dos decantadores para a atmosfera foi da ordem de 4%, vindo a constituir os gases residuais. As perdas de metano dissolvido no efluente ou no gás residual representam uma perda do potencial de energia e, portanto, precisam ser consideradas nos balanços de massa de DQO (LOBATO, 2011).

Nesse sentido, de forma a minimizar tais perdas, uma vez que o metano dissolvido também pode contribuir para o efeito estufa, além de significar perdas econômicas, SOUZA (2010) fez uma síntese das possibilidades, sendo estas:

De acordo com GREENFIELD e BATSTONE (2004), o gás metano pode ser submetido a uma câmara de ar (*air stripping*) após o reator anaeróbio. KELLER e HARTLEY (2003) propõem como medidas gerar energia a partir da captura do gás metano no efluente. A captura poderia ser feita através do *air stripping*; CAKIR e STENSTROM (2005) sugerem que uma nova possibilidade para a remoção do metano dissolvido no efluente anaeróbio seria um pós-tratamento realizado por micro-organismos, que poderiam, portanto, oxidar biologicamente o gás metano (SOUZA, 2010, p. 27).

Dessa forma, a última alternativa, oxidação biológica do metano, será neste trabalho investigada através da determinação do potencial de oxidação anaeróbia do metano, ou seja, atividade metanotrófica, por meio de ensaios em batelada e seleção e cultivo de micro-organismos metanotróficos. A possibilidade em se utilizar o cultivo desses micro-organismos no pós tratamento de efluentes contendo metano dissolvido poderia ser uma alternativa em potencial de ser aplicada quando se trata principalmente de sistemas de tratamento em pequena escala, onde a recuperação pode se tornar inviável do ponto de vista econômico.

A figura 4.2 apresenta um fluxograma com as diferentes possibilidades a serem utilizadas referentes ao gás metano

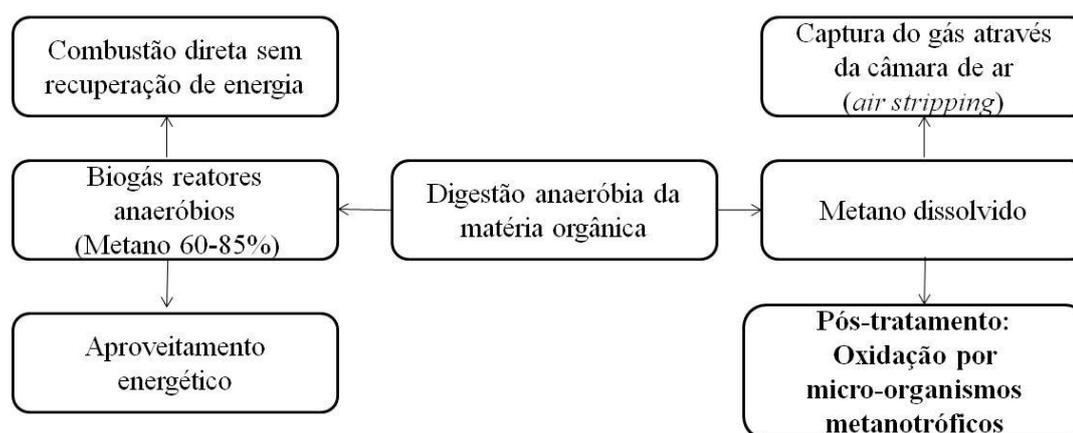


Figura 4-2. Fluxograma resumindo as possibilidades de destinação para o gás metano.

4.2 Fontes e sumidouros do metano atmosférico

A maioria do metano produzido na Terra é formado pelo processo biológico da metanogênese, etapa final da fermentação da matéria orgânica, que ocorre em arrozais, intestinos de animais, solos, *wetlands* - sistemas alagados, aterros sanitários, sedimentos de água doce e marinhos. Estima-se que cerca de 10 a 20% da matéria orgânica presente nos solos e sedimentos é convertida em metano (REEBURGH, 2007). Nos oceanos, que cobrem

70% da superfície terrestre, estima-se uma taxa anual de metanogênese de 85 a 300 Tg (teragrama) de CH_4 ano⁻¹, onde mais de 90% é consumido pela oxidação anaeróbia do metano (OAM) (REEBURGH, 2007; KNITTEL e BOETIUS, 2009). Dessa forma, a OAM controla eficientemente o metano que é produzido nos oceanos e é liberado para a atmosfera. Essa taxa representa menos de 2% do fluxo global, pois quase todo o metano produzido em sedimentos oceânicos é, portanto, consumido pelos micro-organismos anaeróbios oxidadores de metano (KNITTEL e BOETIUS, 2009).

Segundo dados do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas - IPCC (2007), a maior parte do CH_4 existente hoje é advindo de atividades antrópicas, como a agricultura, utilização de combustíveis fósseis e digestão anaeróbia de resíduos. Quando comparada à era pré-industrial, observa-se que as concentrações desse gás aumentaram 157% desde o ano de 1750. De acordo com a EPA (Agência de Proteção Ambiental Americana, <http://www.epa.gov/methane>), o metano é o segundo maior contribuinte para o aquecimento global, uma vez que cada molécula de metano tem um potencial 25 vezes maior de absorver energia na forma de calor do que uma molécula de gás carbônico. De acordo com CONRAD (2009), a taxa global de metano é de 500 a 600 Tg de CH_4 ano⁻¹. Acredita-se que os processos microbianos contribuam com aproximadamente 70% da produção do gás. No que se refere ao consumo de metano, estima-se que a oxidação biológica seja responsável pelo consumo de 60% do metano liberado para o ambiente (REEBURGH, 2007; BORREL *et al.*, 2011).

A produção e o consumo de metano em diferentes ecossistemas

De acordo com CHOWDHURY e DICK (2013), cerca de 70 a 80% de todo o metano produzido é de origem biológica. Dessa forma, o fluxo líquido de CH_4 no ambiente é dado pelo equilíbrio entre dois processos opostos: a produção de metano por micro-organismos metanogênicos e a oxidação de metano por micro-organismos metanotróficos. Os dados de produção e consumo de metano mencionados anteriormente encontram-se sistematizados na tabela 4.1, a seguir.

Tabela 4-1. Contribuição de produção e consumo de metano nas prováveis fontes

Fontes de Produção	Média Anual (Tg de CH₄ ano⁻¹)	Sumidouros	Média Anual (Tg de CH₄ ano⁻¹)
Wetlands	145	Oxidação troposférica	507
Cultivo de arroz	60	Reação estratosférica	40
Animais ruminantes	93	Solos	30
Queima de biomassa	45		
Geração de energia	95		
Aterros sanitários	50		
Oceanos	10		
Lagos de água doce	5		
Total	503	Total	577

Fonte: CHOWDHURY e DICK (2013), p. 10 (Adaptado).

4.2.1.1 Wetlands ou Alagados naturais

Wetlands são caracterizados como ambientes que durante todo (ou quase todo) o ano permanecem alagados. Essas áreas estão concentradas no hemisfério norte (a 50° N) onde as taxas de precipitação são elevadas. A ocorrência de áreas úmidas é em grande parte devido aos solos *permafrost* (solos permanentemente congelados), que impedem uma drenagem adequada (HANSON e HANSON, 1996). Esses ecossistemas são considerados a maior fonte natural de metano atmosférico, cerca de 145 Tg ano⁻¹. As zonas úmidas, por causa da sua grande área superficial e condições extremamente redutoras são uma importante fonte de CH₄ com estimativas de 25% das emissões anuais. Se somados aos arrozais, constituem aproximadamente 38% da média total da produção global de CH₄ (CHOWDHURY e DICK, 2013).

A profundidade do nível de água, umidade do solo, tipo de vegetação, temperatura e outras características, podem afetar a produção e oxidação do metano em *wetlands* (HANSON e HANSON, 1996). Nesse ambiente, os micro-organismos metanotróficos ocorrem na zona de interface água-sedimento e alguns estudos sugerem também que os micro-organismos metanotróficos estão associados aos tecidos de raízes de plantas, rizosfera, e que as superfícies de plantas poderiam ter papel importante na oxidação do metano em sedimentos e na água. (HANSON e HANSON, 1996; CHOWDHURY e DICK, 2013).

4.2.1.2 Arrozais

HANSON e HANSON (1996) estimaram a produção de metano em arrozais como sendo de aproximadamente 575 Tg ano⁻¹, mas inferiram que a quantidade realmente liberada para a atmosfera fosse de cerca de 100 Tg ano⁻¹. Medidas realizadas em campos de arroz alagados indicaram que aproximadamente 80% do metano produzido é oxidado na superfície do solo

não sendo liberado para a atmosfera. Uma revisão mais recente sobre o tema, realizada por CHOWDHURY e DICK (2013), estimaram que a faixa de metano que escapa para a atmosfera varia entre 40 a 100 Tg ano⁻¹, apresentando uma média anual de 60Tg ano⁻¹ conforme mencionado na tabela 4.1.

4.2.1.3 Lagos de água doce

Os lagos de água doce representam apenas uma pequena parcela (5 Tg ano⁻¹) do metano atmosférico produzido. Os rios são considerados uma fonte insignificante do gás. Nos lagos de água doce, como em vários outros sistemas naturais, a oxidação do metano é mais ativa nas interfaces entre as zonas óxicas e anóxicas. O metano produzido pode se difundir da zona anóxica para a zona óxica e por meio desse mecanismo fornecem às metanotróficas aeróbias fonte de carbono e energia (SCRANTON e MCSHANE., 1991; HANSON e HANSON, 1996; BORREL *et al.*, 2011).

Em lagos eutróficos estratificados, a oxidação do metano ocorre próxima ao fundo, onde o oxigênio dissolvido apresenta níveis relativamente baixos em comparação aos níveis do epilimnio, durante a estratificação no verão. Em lagos rasos, a oxidação do metano ocorre principalmente na superfície dos sedimentos, e, portanto, há pouco escape para a atmosfera (HANSON e HANSON, 1996).

De acordo com DOWNING *et al.* (2006) citado por BORREL *et al.* (2011), os lagos cobrem apenas 0,9% da superfície da terra, mas podem ser responsáveis por cerca de 6 a 16% das emissões naturais de CH₄. No entanto, segundo CHOWDHURY e DICK (2013) e HANSON e HANSON (1996), os lagos de água doce representam cerca de 5% da contribuição de metano na atmosfera.

4.2.1.4 Oceanos e lagoas hipersalinas

Atualmente, estima-se que a produção de metano nos oceanos seja de cerca 10 a 20Tg de CH₄ ao ano (RHEE *et al.*, 2009; CHOWDHURY e DICK, 2013). No entanto, trabalhos anteriores subestimaram esse valor, afirmando que a produção era de somente 0,4 Tg ao ano (HANSON e HANSON, 1996).

É provável que nichos no intestino de peixes, fezes e plâncton em decomposição sejam fontes de emissão marinha de metano. A emissão para a atmosfera é controlada pelos processos de oxidação do metano conforme já relatado (HANSON e HANSON, 1996).

Uma das razões que pode explicar a baixa taxa de produção do metano em sedimentos marinhos pode ser a distribuição do oxigênio em sedimentos, baixa fertilidade (consequentemente, baixa produtividade primária) e a oxidação aeróbia do carbono orgânico antes que esse possa atingir os sedimentos no fundo dos oceanos (HANSON e HANSON, 1996).

4.2.1.5 Vulcões e Solos geotérmicos

Outra fonte de emissão de metano são erupções vulcânicas e fontes geotérmicas que emanam gases provenientes da degaseificação dos solos. Recentemente, foi demonstrado que fontes geotérmicas não são apenas fonte de emissão de metano, sendo também fontes importantes de consumo de metano, abrigando, portanto, metanotróficos capazes de consumir de 10-40 Tg de CH_4 .ano⁻¹ (GAGLIANO *et al.*, 2014).

GAGLIANO *et al.* (2014), estudaram uma fonte geotérmica ativa da Pantelleria (Itália), e reportaram a ocorrência de consumo biológico de metano nessa área. As amostras de solo foram incubadas em frascos de vidro selados com batoque de borracha e mantidas em laboratório para a realização dos experimentos. A estimativa do consumo de metano foi de 59,2 nmol de metano por grama de peso seco de solo.

DUNFIELD *et al.* (2007), isolaram algumas espécies de metanotróficas a partir de fontes geotérmicas. Tais espécies são capazes de crescer a pH extremamente baixo (0,8) e a temperaturas elevadas (60°C), podendo consumir de 10% a 90% do metano proveniente dos solos.

4.2.1.6 Aterros Sanitários

Estima-se que os aterros sanitários possam produzir de 30 a 70 Tg de metano para a atmosfera por ano. De acordo com CHOWDHURY e DICK (2013), a média é de cerca de 50Tg de metano anualmente. Entretanto, WHALEN *et al.* (1990) estimaram que a oxidação do metano consumiu aproximadamente 50% da produção de metano (35 Tg ano⁻¹) em aterros nos Estados Unidos através de camadas superficiais de solo de aterro. KIGHTLEY *et al.* (1995)

observaram que, microcosmos de solo arenoso de aterros sanitários permeados com metano oxidaram, durante seis meses, $10,4 \text{ mol de CH}_4 \text{ m}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

No Brasil, a emissão de metano advinda de aterros sanitários representou cerca de 6% da contribuição dentre as diversas fontes de emissão desse gás no ano de 2005 (BRASIL, 2010; LOBATO, 2011).

4.2.1.7 Reatores UASB

O tratamento anaeróbio de águas residuárias por meio de reatores UASB são amplamente utilizados, uma vez que oferecem vantagens como consumir quantidades relativamente pequenas de energia, baixa produção de lodo, e possibilitar a utilização de metano para a geração de energia. Em sistemas anaeróbios, de 50% a 80% de toda a matéria orgânica que entra no sistema é convertida em biogás (CHERNICHARO, 2007). Entretanto, a tecnologia anaeróbia apresenta algumas desvantagens, tais como a qualidade do efluente tratado para atingir as exigências da legislação ambiental vigente, Deliberação Normativa COPAM 01/2008, e, portanto, necessidade de pós-tratamento, além de baixa na remoção de patógenos, ausência de remoção de nutrientes e o lançamento de metano dissolvido (SEGHEZZO *et al.*, 1998).

Segundo BRASIL (2010) citado por LOBATO (2011), as emissões provenientes do setor de tratamento de resíduos (tratamento de efluentes e aterros sanitários), em 2005, representaram 9% do total das emissões de CH_4 , sendo o tratamento de efluentes responsável por cerca de 32% desse valor. Os demais 68%, representam a disposição de resíduos sólidos em aterros sanitários.

Segundo EL-FADEL e MASSOUD (2001), as emissões de CH_4 originadas do tratamento de esgoto doméstico e efluentes industriais correspondem a cerca de 5% da emissão global de CH_4 . Nos EUA, em 2007, o tratamento de esgoto foi responsável por aproximadamente 4,2% do total das emissões de CH_4 (LOBATO, 2011).

De acordo com EL-FADEL e MASSOUD (2001) citado por LOBATO (2011), o fator de emissão, ou seja, a produção teórica de metano é de 0,21 a 0,25 $\text{gCH}_4.\text{gDQO removida}^{-1}$. No entanto, a estimativa teórica inclui apenas a conversão de toda a matéria orgânica em metano e gás carbônico, desconsiderando, portanto, outros elementos como a limitação de nutrientes,

processos de inibição biológica, dentre outros. SOUZA *et al.* (2010b) obtiveram valores próximos àqueles mencionados anteriormente por EL-FADEL e MASSOUD (2001), ou seja, cerca de 0,19 gCH₄.gDQO removida⁻¹ a partir de reatores UASB tratando esgotos domésticos. Para o metano dissolvido, mensurado também no trabalho em questão, os resultados para o fator de emissão foram de 0,06 gCH₄.gDQO removida⁻¹.

Por fim, segundo dados do IPCC, estima-se que no Brasil, anualmente, seja emitido cerca de 50 Gg de CH₄ proveniente de sistemas de tratamento de efluentes anaeróbios. Não obstante, as estimativas do IPCC não consideram a parcela de metano dissolvido perdida no efluente, que seriam de grande importância para o balanço de massa em reatores UASB (SALOMON e LORA, 2009; LOBATO, 2011).

4.3 A oxidação biológica do metano

A oxidação biológica do metano consiste na transformação da molécula de metano a gás carbônico por micro-organismos. O processo pode ocorrer sob condições aeróbias ou anaeróbias. A oxidação aeróbia é realizada por um grupo de bactérias (metanotróficas) e a oxidação anaeróbia, feita por um grupo de bactérias (associadas à desnitrificação) e arqueias (Arqueias Anaeróbias Metanotróficas, do inglês, *Anaerobic Methanotrophic Archaea* - ANME). A oxidação aeróbia é importante para manter as concentrações de metano em equilíbrio em sedimentos de água doce e solos, enquanto a oxidação anaeróbia é o principal processo que ocorre em condições anóxicas em sedimentos marinhos (CHISTOSERDOVA *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2012).

4.3.1 A Oxidação Aeróbia do Metano

A oxidação aeróbia do metano é mediada pela enzima Metano Mono-Oxigenase (MMO). Duas formas de MMO têm sido encontradas em bactérias metanotróficas: uma acoplada à membrana plasmática da bactéria, que está presente em quase todos os metanotróficos isolados até hoje (Metano Mono-Oxigenase particulada - pMMO), e outra forma solúvel (Metano Mono-Oxigenase solúvel - sMMO), que tem sido encontrada em apenas alguns metanotróficos como *Methylosinus* e *Methylococcus* (CHISTOSERDOVA *et al.*, 1998).

As MMOs catalisam a oxidação de metano rompendo a ligação O-O da molécula de O₂ e, enquanto um dos átomos de oxigênio é reduzido para formar água, o outro é incorporado na

molécula de metano para formar o metanol. A oxidação do metano e do metanol pelos organismos metanotróficos leva à formação de formaldeídos que serão, então, assimilados por essas bactérias e utilizados na biossíntese de material celular (LINHARES, 2012). A figura 4.3 ilustra a rota metabólica central para a oxidação aeróbia do metano.

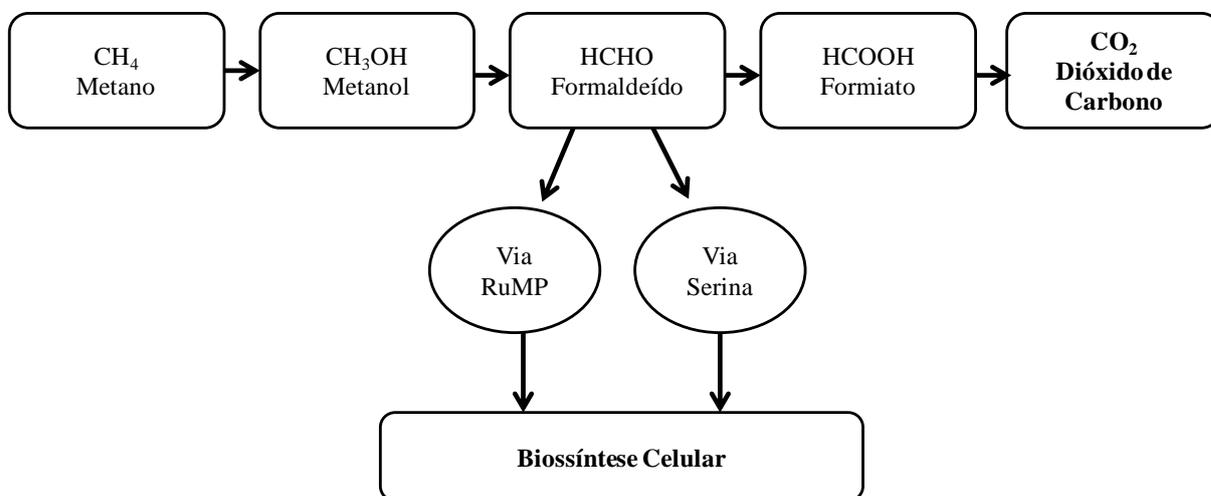


Figura 4-3 - Via metabólica do metano e assimilação de formaldeído

Fonte: LINHARES, 2012, p. 26; baseado em Hanson e Hanson (1996) (Adaptado).

O grupo de micro-organismos responsáveis pela oxidação do metano foi denominado metanotróficos e sua designação se dá por meio do prefixo “-methylo”. Até o momento, dezoito gêneros de metanotróficas aeróbias foram identificadas e estão distribuídos nos filos *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (SEMRAU *et al.*, 2010). No entanto, *Proteobacteria* abriga quase todas as metanotróficas descritas conhecidas atualmente.

Historicamente, a metanotrofia foi considerada como uma característica obrigatória a todos os metanotróficos. Não havia provas fundamentadas de metanotróficos que fossem capazes de crescer em substratos contendo ligações de mais de um carbono. Entretanto, recentemente, o gênero *Methylocella*, foi descoberto e caracterizado como uma bactéria metanotrófica facultativa, capaz de utilizar compostos de vários carbonos, tais como o etanol, como fonte de energia, além do CH₄. Porém, muito pouco se sabe sobre esse gênero. Além de *Methylocella*, outros metanotróficos facultativos foram também reportados, tais como: *Methylocapsa* e *Methylocystis* (pertencentes à ordem *Rhizobiales*) (THEISEN *et al.*, 2005).

Segundo THEISEN *et al.* (2005), os metanotróficos facultativos podem ser ainda mais valiosos do que os metanotróficos obrigatórios, uma vez que possuem essa versatilidade metabólica e podem, portanto, atuar em campos de biorremediação e degradação de poluentes da água e solo em uma ampla gama de ambientes.

4.3.1.1 *Proteobacteria*

Dentro do filo *Proteobacteria*, as bactérias metanotróficas estão inseridas nas classes γ -*Proteobacteria*, ordem *Methylococcales*, família *Methylococcaceae* e classe α -*Proteobacteria*, ordem *Rhizobiales*, famílias *Methylocystaceae* e *Beijerinckiaceae* (WHITTENBURY e KRIEG, 1984; BOWMAN *et al.*, 1995; HANSON e HANSON, 1996; LIEBNER e WAGNER, 2007). Além destas famílias, HIRAYAMA *et al.* (2014), propôs uma nova família, *Methylothermaceae* fam. nov., dentro da ordem *Methylococcales*, para acomodar os gêneros *Methylothermus*, *Methylohalobius* e *Methylomarinovum*. Os gêneros *Methylothermus* e *Methylohalobius* foram reconhecidos como sendo distintos dos outros gêneros de metanotróficas incluídas na família *Methylococcaceae*. Esses gêneros, como base na sequência do RNAr 16S, formam uma linhagem monofilética dentro da ordem *Methylococcales*. Entretanto, as características fisiológicas são distintas, onde *Methylothermus* inclui as espécies termófilas e *Methylohalobius* inclui as espécies halofílicas. Por último, o gênero *Methylomarinovum*, abriga uma espécie que foi isolada de sistemas hidrotermais submarinos de um recife de corais no Japão (HIRAYAMA *et al.*, 2014).

Além disso, metanotróficos filamentosos foram descobertos dentro dos gêneros *Clonothrix* e *Crenothrix*. Estes são considerados subconjuntos filogenéticas da família *Methylococcaceae*, sendo, portanto, considerados como metanotróficos tipo I (OP DEN CAMP *et al.*, 2009b; HIRAYAMA *et al.*, 2014).

As principais características e principais gêneros das metanotróficas pertencentes à classe *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* estão exibidas nas tabelas 4.2 e 4.3, logo abaixo.

Tabela 4-2. Características dos gêneros de metanotróficas pertencentes à Classe *Gammaproteobacteria*

Características	<i>Methylobacter</i>	<i>Methylococcus</i>	<i>Methylocaldum</i>	<i>Methylohalobius</i>	<i>Methylomicrobium</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Methylosphaera</i>	<i>Methylosarcina</i>	<i>Methylotermus</i>
Família	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylothermaceae</i>	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylothermaceae</i>
Morfologia celular	Cocos	Cocos; bacilos	Cocos; bacilos	Cocos	Bacilos	Bacilos	Cocos; bacilos	Cocos; bacilos	Cocobacilos
Formação de exósporos	+	+	+	-		+	-	+	-
pMMO	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sMMO	-	+	-	-	-	-	-	-	-
pH de crescimento	5,5-9,5	Não há informações	6-8,5	6,5-7,5	6-9	5,5-8,5	N	4-9,0	6,5- 7,5
Temperatura de crescimento (°C)	0-40	25-65	20-62	15-42	10-30	10-42	0-21	4-35	37-72
Conteúdo G+C no DNA	48-55	62-65	57-59	59	48-60	50-59	43-46	53-54	62,5

Tabela 4-3. Características dos gêneros de metanotróficas pertencentes à Classe *Alphaproteobacteria*

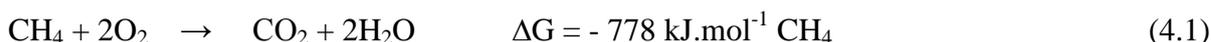
Características	<i>Methylocystis</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Methylocapsa</i>	<i>Methylocella</i>
Família	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Beijerinckaceae</i>	<i>Beijerinckaceae</i>
Morfologia celular	Vibriões	Reniformes	Cocos	Cocos ou vibriões
Formação de exósporos	Variável	-	+	-
pMMO	+	+	+	-
sMMO	Variável	+	-	+
Conteúdo G+C no DNA	62-67	62-68	61	60-63

Fonte: SEMRAU *et al.*, 2010, p. 499 e 500.

Os gêneros de metanotróficas, além das características morfológicas que as distinguem (tabelas 4.2 e 4.3), também estão subdivididos pela rota bioquímica que utilizam para a assimilação do formaldeído para a síntese de biomassa. As metanotróficas tipo I (classe *Gammaproteobacteria*), representadas pelos gêneros *Methylococcus*, *Methylobacter*, *Methylomonas* e *Methylocaldum*, assimilam formaldeído pela via da Ribulose Monofosfato (RuMP), ao passo que as metanotróficas tipo II (*Classe Alphaproteobacteria*), englobam os gêneros *Methylocystis* e *Methylosinus*, assimilam o formaldeído pela via chamada serina (HANSON e HANSON, 1996; LEE *et al.*, 2012; LINHARES, 2012), conforme apresentado na figura 4.2.

Sabe-se que uma maior expressão da enzima pMMO (principalmente em metanotróficas do tipo I), pode levar a uma maior taxa de crescimento. Portanto, as bactérias metanotróficas do tipo I podem ser consideradas mais específicas na assimilação do CH₄ do que as bactérias metanotróficas do tipo II, que possuem maior expressão da enzima sMMO (NIKIEMA *et al.*, 2007). Em ambientes com baixas concentrações de CH₄ (< 1.000ppmv⁻¹) espera-se maior crescimento de bactérias metanotróficas do tipo I (HENKEL *et al.*, 2000). Por outro lado, em ambientes com baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de CH₄, espera-se um maior crescimento de bactérias metanotróficas do tipo II (NIKIEMA *et al.*, 2007).

A reação global para a oxidação aeróbia do metano está representada na equação 4.1 (HANSON e HANSON, 1996):



4.3.1.2 *Verrucomicrobia*

Estudos com isótopos de carbono marcado, utilizando ¹³CH₄, identificaram membros de *Verrucomicrobia* como micro-organismos relacionados à oxidação do metano em ambientes extremos, tais como, solos ácidos e sedimentos alcalinos. Entretanto, sugere-se que os membros desse filo sejam um grupo taxonomicamente diverso com diferentes tolerâncias ambientais (KRIEG *et al.*, 2010).

Segundo GALPERIN (2008), o filo *Verrucomicrobia* pertence ao denominado Superfilo PVC, que é constituído por *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, e *Chlamydia* juntamente com o *Lentisphaera*, *Poribacteria* e o filo candidato OP3. De acordo com LEE *et al.* (2009), a

relação entre *Verrucomicrobia* e *Planctomycetes* também é reforçada pela compartimentalização celular semelhantes.

O filo *Verrucomicrobia*, classificado através de análise filogenética de sequências do gene RNAr 16S, também abriga micro-organismos metanotróficos. Esses micro-organismos estão classificados dentro do subfilo 6, predominantemente recuperado de ambientes onde há emissão de metano, apresentando, portanto, evidências da oxidação do metano (KRIEG *et al.*, 2010).

Recentemente, três espécies pertencentes ao filo *Verrucomicrobia* foram isolados de lavas vulcânicas e foram provisoriamente nomeados: *Methylacidiphilum infernorum* (DUNFIELD *et al.*, 2007), *Methylacidiphilum kamchatkensis* (ISLAM *et al.*, 2008), e *Acidimethylosilex fumarolicum* (POL *et al.*, 2007).

As espécies *Methylacidiphilum infernorum*, *Methylacidiphilum kamchatkensis* e *Acidimethylosilex fumarolicum* foram isoladas respectivamente de Hell's Gate, Nova Zelândia; Uzon Caldera, Rússia; e Pozzouli, Itália. Os dois primeiros têm características similares de crescimento, possuindo pH ótimo de 3,5, mas com capacidade de crescimento descrita de 0,8-5,8. A temperatura de crescimento varia de 40-65 °C, sendo considerada ótima a temperatura de 55°C. *Methylacidiphilum kamchatkensis* parece ser capaz de fixar N₂ atmosférico e apresenta crescimento em uma faixa de pH de 1,0 a 6,0, com pH ótimo em 2,5 e temperatura de 60°C (KRIEG *et al.*, 2010).

Esses três micro-organismos possuem *operons* que codificam os diferentes componentes da enzima pMMO e possuem estruturas de membranas intracelulares descritas como tubulares ou poliédricas que aumentam a área superficial da membrana da pMMO, uma vez que as estruturas típicas de um conjunto de membranas empilhadas de metilotróficas não estão presentes (DUNFIELD *et al.*, 2007).

A análise através da técnica de pirosequenciamento de *Acidimethylosilex fumarolicum* e estudo do genoma completo de *Methylacidiphilum infernorum* mostraram vias metanotróficas simples com regiões homólogas de metanotróficas pertencentes ao filo *Proteobacteria* (POL *et al.*, 2007). Esses trabalhos sugerem que os genes para o metabolismo da oxidação de metano podem ter sido obtidos através da transferência horizontal de genes de *Proteobacteria*

para os micro-organismos do filo *Verrucomicrobia*. Ademais, o genoma de *Methylacidiphilum inferorum*, por exemplo, possui tamanho bem inferior ao de metanotróficos pertencentes à *Proteobacteria* (KRIEG *et al.*, 2010).

Um resumo das características dos metanotróficos pertencentes ao filo *Verrucomicrobia* está apresentado na tabela 4.4, logo abaixo. Sobre a via de oxidação do metano por esses micro-organismos, até o momento, pouco se sabe devido à sua recente descoberta. Pela reconstrução das vias de assimilação de carbono na espécie *Methylacidiphilum inferorum*, verificou-se que várias das enzimas chave para assimilação do formaldeído via Ribulose Monofosfato, tais como fosfato-hexulose, hexulose-6-fosfato, não estão presentes, indicando, portanto que esta não é a via de assimilação de carbono pela biomassa. Em contrapartida, duas enzimas da via serina foram identificadas a partir do genoma de *Methylacidiphilum inferorum*.

Tabela 4-4. Características gerais dos metanotróficos do filo *Verrucomicrobia*

Características	
Família	<i>Methylacidiphilaceae</i>
Fixação de Nitrogênio	+
Via RuMP	-
Via Serina	+
Formação de exósporos	-
pMMO	+
sMMO	-
Temperatura crescimento (°C)	37-65
pH crescimento (pH)	0,8-6,0
Facultativos	-
Conteúdo G+C no DNA	40,8 - 45,5

Fonte: (DUNFIELD *et al.*, 2007; OP DEN CAMP *et al.*, 2009b; SEMRAU *et al.*, 2010).

Por fim, a tabela 4.5 apresenta um resumo comparativo de todas as famílias de metanotróficas aeróbias conhecidas.

Tabela 4-5. Comparação das famílias de metanotróficas aeróbias descritas

Características	<i>Filo Proteobacteria</i>			<i>Filo Verrucomicrobia</i>
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	
Família	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Beijenrickaceae</i>	<i>Methylacidiphilaceae</i>
Gêneros	<i>Methylobacter</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Methylocaldum</i> , <i>Methylohalobius</i> , <i>Methylomicrobium</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylosoma</i> , <i>Methylosarcina</i> , <i>Methylosphaera</i> , <i>Methylotermus</i> , <i>Crenothrix</i> , <i>Clonothrix</i>	<i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i>	<i>Methylocapsa</i> , <i>Methylocella</i>	<i>Methylacidiphilum</i>
Assimilação formaldeído via RuMP	+	-	-	-
Assimilação formaldeído via Serina	-	+	+	+
pMMO	+	+	Variável entre as espécies	+
sMMO	Variável entre as espécies	Variável entre as espécies	Variável entre as espécies	-
Células em estado de repouso (resting cells)	Cistos ou nenhuma	Cistos, esporos ou nenhuma	Cistos ou esporos	Nenhuma
Conteúdo G+C no DNA (%mol)	43-65	62-67	60-63	41-46
Facultativos	-	-	Variável entre as espécies	-

Fonte: SEMRAU *et al.*, 2010, p.501.

4.3.1.3 Taxonomia e filogenia das metanotróficas aeróbias

A descoberta do primeiro micro-organismo metanotrófico ocorreu há mais de um século. Em 1906, Söhgen sugeriu que as baixas concentrações de metano atmosféricas se deviam à sua oxidação por micróbios, considerando-se as mais diversas fontes de produção desse gás para o ambiente. Em suas pesquisas, o cientista isolou o primeiro organismo capaz de oxidar o metano e denominou-o *Methanicus bacillus*, atualmente conhecido como *Methanomonas methanica* (HANSON e HANSON, 1996).

Embora o primeiro metanotrófico tenha sido isolado em 1906, a base para a classificação dessas bactérias só foi estabelecida por meio de Whittenbury e seus colaboradores em 1970, que isolaram e caracterizaram aproximadamente cem novas bactérias que utilizam o metano. Esses investigadores propuseram a separação das bactérias que utilizam o metano em cinco gêneros, baseados em diferenças morfológicas, formação de estruturas de latência (exósporos), estruturas da membrana citoplasmática e algumas características fisiológicas. Os gêneros propostos por Whittenbury *et al.* foram: *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, e *Methylosinus* (WHITTENBURY e KRIEG, 1984). Esses gêneros são semelhantes aos atualmente aceitos, exceto pela adição de aproximadamente mais quinze gêneros.

Dentro da classe *α -Proteobacteria*, o gênero *Sphingopyxis sp.* MD2 foi relacionado à remoção simultânea de metano e compostos sulfurosos voláteis como H₂S, methanoliol e Dimetil Sulfeto (DMS). No caso da linhagem MD2, a cultura desse micro-organismo poderia ser uma valiosa ferramenta biológica para mitigar a emissão de metano em aterros, ou ainda para ser utilizado como inóculo em reatores como forma de pós-tratamento de efluentes anaeróbios contendo metano e sulfeto dissolvido (LEE *et al.*, 2012).

Essa bactéria foi isolada a partir de um consórcio microbiano enriquecido com metano e DMS a partir de um meio nutritivo R2A. O micro-organismo é pertencente à ordem *Sphingomonadales*, cujos membros não têm mostrado atividade metanotrófica. Além disso, são filogeneticamente distintos das ordens de metanotróficas conhecidas. Entretanto, a presença da enzima pMMO nesse micro-organismo foi confirmada (LEE *et al.*, 2012).

Uma árvore filogenética atual contendo os gêneros de metanotróficas conhecidas, com base no RNAr 16S, e a ampla distribuição dos gêneros dentro dos grupos *Alphaproteobacteria*,

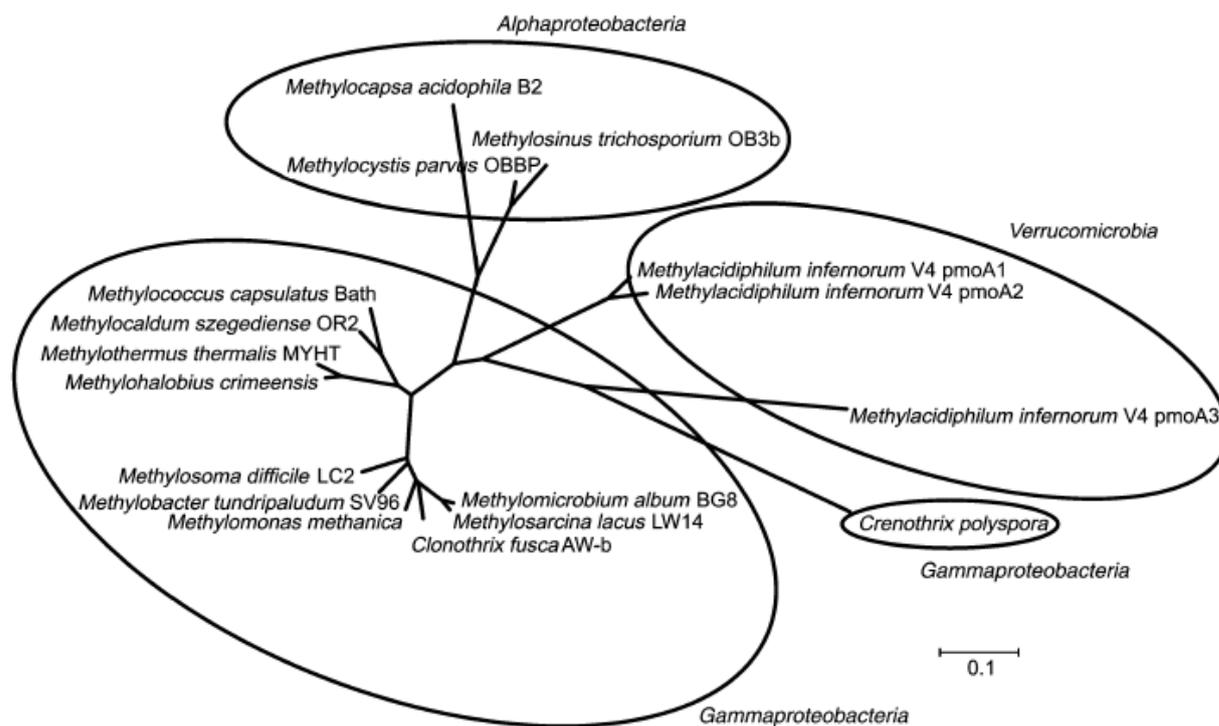


Figura 4-5. Árvore filogenética mostrando as espécies de metanotróficas conhecidas com base nas sequências do gene funcional *pmoA*.

Fonte: Semrau *et al.*, 2010, p. 502.

Conforme mostrado na figura 4.5, a sequência do gene *pmoA* do gênero *Crenothrix* difere dos outros metanotróficos da classe *Gammaproteobacteria*, bem como as sequências de *pmoA* existentes nos metanotróficos do filo *Verrucomicrobia*. Tal fato indica que a presença do gene *pmoA* em *Methylacidiphilum* e *Crenothrix* não são devido a uma transferência horizontal recente do gene, mas que estas células divergiram dos metanotróficos há muitos anos atrás.

4.3.2 Oxidação Anaeróbia do Metano

A oxidação anaeróbia do metano pode estar associada à redução do sulfato ou à redução de nitrito conforme descrito nos itens a seguir.

4.3.2.1 Oxidação anaeróbia do metano acoplada à redução de sulfato

O primeiro indício da remoção de metano em condições anaeróbias se deu a partir de observações geoquímicas de sedimentos marinhos que mostraram que o metano produzido nos sedimentos se difundia e desaparecia juntamente com o sulfato antes mesmo de entrar em

contato com o oxigênio presente em camadas superiores ao longo da coluna d'água (KNITTEL e BOETIUS, 2009).

ZEHNDER e BROCK (1979) realizaram um experimento através da incubação *in vitro* de arqueias metanogênicas, onde detectaram, nessas amostras, evidências da degradação de uma pequena porcentagem do metano produzido. As amostras foram incubadas com marcadores radioativos, que mostraram que a oxidação do metano coincidiu com o aumento da redução de sulfato. A partir disso, os autores inferiram a presença de um mecanismo acoplado, em que ambos, arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (BRS), poderiam ser beneficiadas com a oxidação anaeróbica do metano (REEBURGH, 2007; JAGERSMA *et al.*, 2009). Posteriormente, verificou-se que não se tratava apenas de arqueias metanogênicas, mas também que essas arqueias realizavam a metanogênese reversa, sendo capazes de consumir o metano (arqueias metanotróficas) e que este era um processo sintrófico, no qual arqueias metanotróficas produzem transportadores de elétrons, que são subsequentemente utilizados por bactérias sulfato redutoras (figura 4.6).

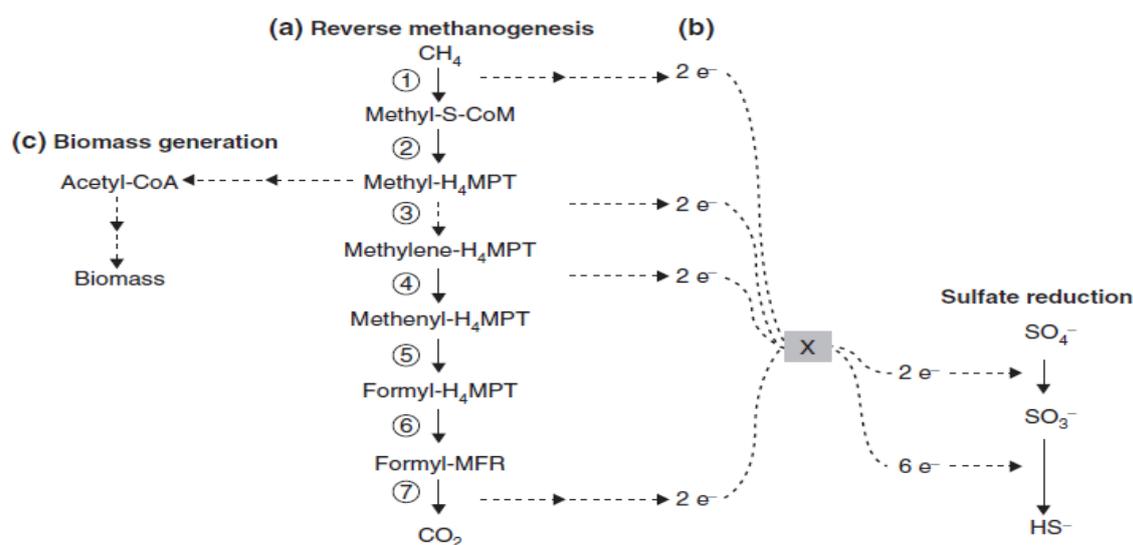


Figura 4-6. Oxidação anaeróbica do metano associada à redução de sulfato.

A via proposta para a oxidação anaeróbica do metano envolvendo o homólogo de metil coenzima M-redutase e um novo composto metileno-tetrahidrometanopterin redutase (H_4MPT), e sua conexão com a via de redução de sulfato. **(a)** A via de metanogênese reversa. A seta com tracejado na via da metanogênese reversa indica uma enzima descoberta recentemente, a metileno H_4MPT redutase. Enzimas que executam as etapas de 1 a 7: 1, Metil coenzima M-redutase; 2, Metil H_4MPT :coenzima M metiltransferase; 3, Metileno- H_4MPT redutase; 4, Metenil- H_4MPT ciclohidrolase; 5, Formil-MFR: H_4MPT formiltransferase; 6, Formil-MFR desidrogenase; 7, CO_2 . **(b)** A metanogênese reversa é conectada a redução de sulfato por um intermediário desconhecido (X). e^- representam um elétron. **(c)** O methyl- H_4MPT produzido é convertido à biomassa através da via da serina ou é oxidado a CO_2 .

Fonte: CHISTOSERDOVA *et al.*, 2005, p.2.

4.3.2.2 Taxonomia e filogenia

A análise filogenética da OAM em sedimentos por meio do gene RNAr 16S identificou três grupos de arqueias filogeneticamente distintas, ANME-1, ANME-2 e ANME-3 (HINRICHS *et al.*, 1999; VALENTINE, 2002; NAUHAUS *et al.*, 2005). Os grupos são intimamente relacionados com as ordens *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* e *Methanomicrobiales*, que compreendem grande parte das metanogênicas cultiváveis (Figura 4.7).

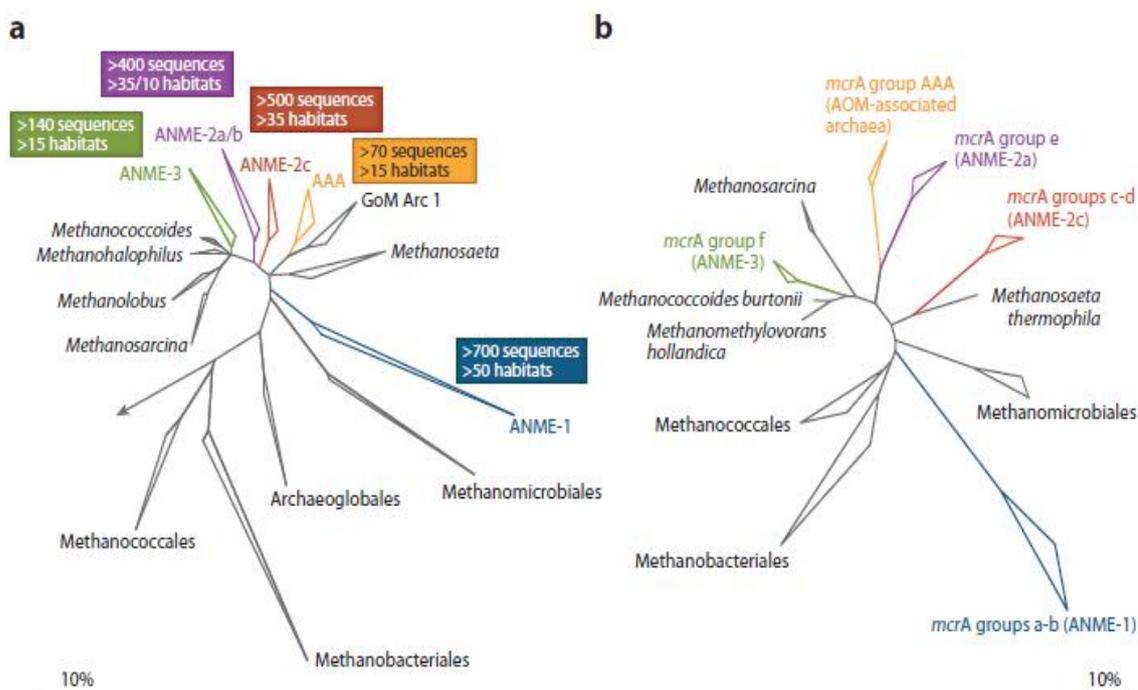


Figura 4-7 - Árvore filogenética mostrando seqüências de ANME.

a) Seqüências de genes RNAr 16S de ANME relacionadas ao domínio *Archaea*.

b) Seqüências de genes que codificam para a subunidade alfa da enzima metil-coenzima m redutase (*mcrA*) selecionadas do domínio *Archaea*.

Dados em caixas coloridas trazem as informações sobre a distribuição e abundância das seqüências recuperadas (publicadas e não publicadas).

Fonte: KNITTEL e BOETIUS, 2009, p. 317.

Nos últimos anos, a diversidade de populações de ANME tem sido constantemente estudada. A maioria das investigações baseou-se no gene RNAr 16S ou em filogenias do gene que codifica a enzima metil-coenzima m-redutase (*mcrA*). De acordo com a filogenia do gene RNAr 16S, os grupos ANME não são monofiléticos, e a distância entre os três grupos é grande, com similaridade de 75 a 92%. A semelhança de subgrupos de ANME-2 (2a, 2b e 2c) também é considerada baixa. Assim, os membros de ANME-1, ANME-2 e ANME-3, certamente, pertencem a diferentes ordens ou famílias. Contudo, podem ser agrupados pela

capacidade de mediar a OAM em uma vasta gama de ambientes (BOETIUS *et al.*, 2000; KNITTEL e BOETIUS, 2009).

Um novo grupo intimamente relacionado à ANME-2 tem sido descrito como um quarto subgrupo, designado como ANME-2D. Seu papel, entretanto, ainda não está claro e não foi comprovado que o grupo media a OAM. Além desses, outro grupo intimamente relacionado à ANME-2 foi recuperado de um biorreator desnitrificante (RAGHOEBARSING *et al.*, 2006).

As células de ANME-1 têm morfologia retangular típica e são autofluorescentes sob luz UV, uma característica típica das arqueias metanogênicas que contêm a coenzima F420. As células de ANME-1 ocorrem mais frequentemente como células individuais ou em cadeias de duas a quatro células. No entanto, já foram observadas cadeias longas multicelulares com tamanho superior a 100 µm. Análises por microscopia eletrônica relevaram bainhas externas em células de ANME-1 que parecem ser constituídas de um biopolímero resistente. No mar negro, associações de ANME-1 e BRS foram reportadas (RAGHOEBARSING *et al.*, 2006).

Muito frequentemente, cocos de ANME-2 são encontrados em consórcio com BRS. As populações de ANME-2A e ANME-2C podem ser distintas pela sua morfologia de agregação, ou seja, a forma com que as células se encontram agregadas. Em geral, células de ANME-2A e células de *Desulfosarcina* (DSS) são encontradas completamente mescladas formando um biofilme de formato variável. Em contrapartida, ANME-2C e DSS se agregam em um formato típico bem conhecido formando uma concha com um núcleo de ANME-2C que é parcial ou completamente rodeado por uma camada típica de BRS (KNITTEL e BOETIUS, 2009).

Além de serem encontradas em consórcio com BRS, células de ANME-2 também foram encontradas como células individuais. A Figura 4.8 apresenta o consórcio de ANME descrita por KNITTEL e BOETIUS (2009):

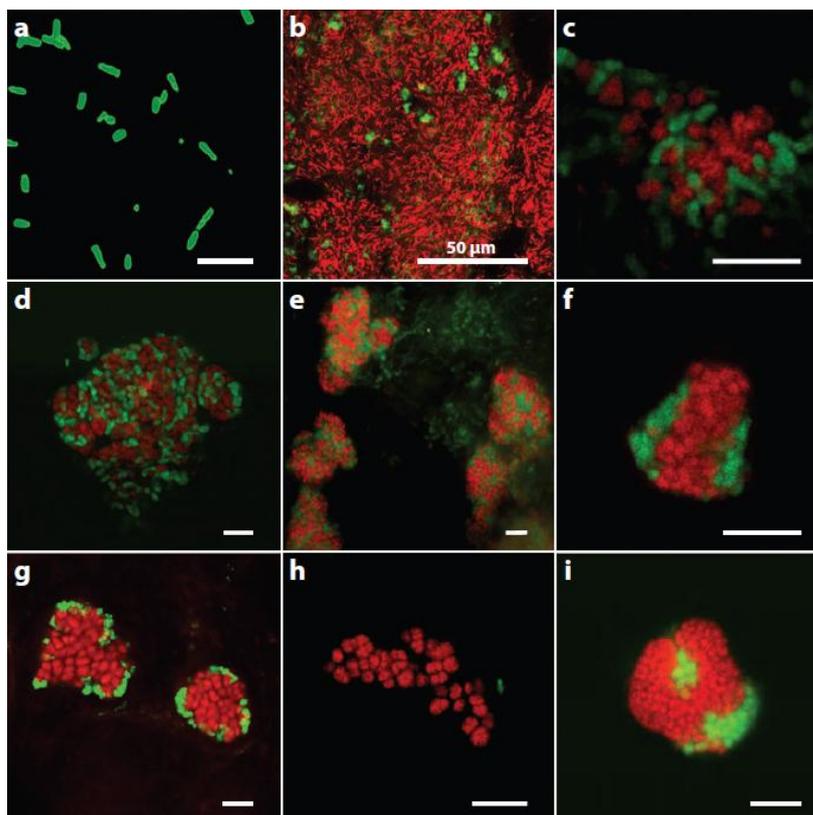


Figura 4-8. Microscopia de Epifluorescência de diferentes células individuais e/ou agregadas de ANME visualizadas por FISH.

- a - Células individuais de ANME-1 presentes no mar Negro
- b - Consórcio de ANME-1 (vermelho) e células de DSS (verde)
- c, d, e - Consórcio misto de ANME-2A (vermelho) e DSS (verde).
- f, g - Consórcio de ANME-2C (vermelho) e DSS (verde).
- h - Células individuais de ANME-2C.
- i - Consórcio de ANME-3 e *Desulfobulbus*.

Fonte: KNITTEL e BOETIUS, 2009, p. 319.

O grupo ANME-3 pode ser encontrado, em sua quase totalidade, associado à *Desulfobulbus*, um gênero de BRS. Entretanto, esse grupo também tem sido detectado juntamente com DSS em subsuperfície de sedimentos. Em alguns locais, ANME-3 ocorre como células únicas.

Estudos indicam uma distribuição global de ANME-1 e ANME-2, enquanto a presença de ANME-3 parece ser principalmente restrita aos ambientes aquáticos profundos, lamas vulcânicas, sendo encontrado apenas esporadicamente em outros tipos de sedimentos (KNITTEL e BOETIUS, 2009).

O primeiro experimento *in vitro*, utilizando sedimentos naturalmente enriquecidos com ANME, demonstrou com sucesso a oxidação anaeróbia do metano. A prova direta de metanotrofia anaeróbia foi fornecida por espectrometria de massa de íons com microsonda confirmando o esgotamento extremo de C¹³ da biomassa total (JAGERSMA *et al.*, 2009; KNITTEL e BOETIUS, 2009).

A oxidação do metano acoplada à redução do sulfato produz quantidade relativamente pequena de energia, principalmente quando comparada com a oxidação aeróbia ou anóxica do metano. A equação 4.2 representa a reação global da oxidação anaeróbia de metano acoplada à redução de sulfato (BARNES e GOLDBERG, 1976; MEULEPAS *et al.*, 2010):



4.3.2.3 Oxidação anaeróbia do metano dependente de nitrito (N-DAMO)

Recentemente, algumas pesquisas na Holanda têm destacado a possibilidade da oxidação do metano sob concentrações limitantes de oxigênio. Tal processo foi designado como oxidação anaeróbia do metano dependente de nitrito (do inglês - *Nitrite-dependent anaerobic methane oxidation* - N-DAMO). Nessa reação, o metano é parcialmente oxidado resultando em compostos orgânicos como metanol ou acetato que são subsequentemente usados para desnitrificação produzindo dióxido de carbono (CO₂) e gás nitrogênio (N₂) (ETTWIG, 2010) conforme reação a seguir (equação 4.3):



O genoma da bactéria responsável pela N-DAMO foi isolado de uma cultura enriquecida de sedimentos de água doce, canal hidroviário e esta foi identificada como *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (ETTWIG, 2010). Esse genoma contém genes de vias metabólicas anaeróbias e, curiosamente, genes de vias metabólicas aeróbias. O micro-organismo possuiu, transcreveu e expressou a via completa aeróbia para oxidar o metano, englobando o *operon* que codifica a enzima MMO, que catalisa o primeiro passo na oxidação aeróbia do metano. A subunidade A da enzima metano-monoxigenase particulada (*pmoA*) é uma das subunidades da MMO que é utilizada como um marcador funcional bem conhecido para detectar bactérias metanotróficas (MCDONAL *et al.*, 2008; LUESKEN *et al.*, 2011b). Os primers *pmoA* fornecem uma ferramenta muito útil para a detecção de bactérias metanotróficas no ambiente.

De acordo com ETTWIG (2010), estudos de isótopos estáveis foram realizados e sugeriram que esses organismos poderiam fabricar seu próprio oxigênio molecular retirando-o do óxido nitroso proveniente da redução do nitrito. Sendo assim, o oxigênio produzido seria utilizado para oxidar metano por uma via aeróbia em um ambiente anaeróbio. A Figura 4.9 apresenta o ciclo do carbono e nitrogênio incluindo o processo de oxidação dependente do nitrito realizado pela bactéria *M. oxyfera* (ETTWIG, 2010). As biotransformações mediadas por *M. oxyfera* estão destacadas em vermelho.

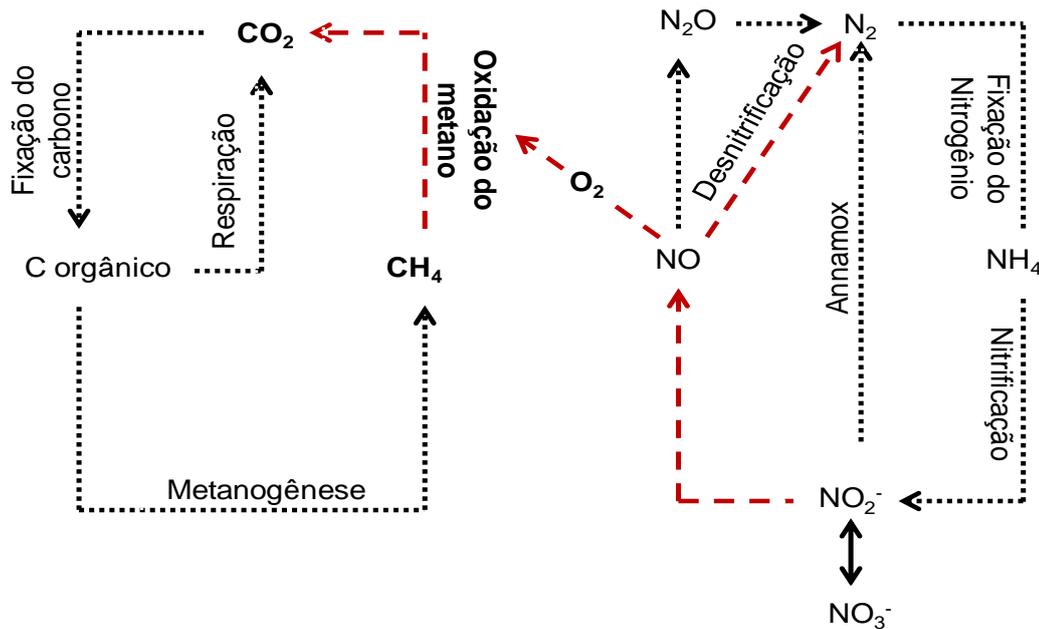


Figura 4-9. Processo de oxidação do metano dependente do nitrito realizado pela bactéria *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* - ciclos do carbono e nitrogênio associados.

Fonte: ETTWIG, 2010, p. 15.

A tabela 4.6 apresenta um resumo dos principais táxons de metanotróficos descritos na literatura.

Tabela 4-6. Resumo dos principais táxons de metanotróficas descritos na literatura.

Metanotróficas	Táxons	Referências
Bactérias aeróbias	<i>Methanicus bacillus</i> ; Famílias: <i>Methylococcaceae</i> (Classe Gammaproteobacteria); <i>Methylocystaceae</i> e <i>Beijerinckiaceae</i> (Classe Alphaproteobacteria); Alguns gêneros: <i>Methylomonas</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Methylocaldum</i> , <i>Methylocystis</i> e <i>Methylosinus</i>	(Söhgen, 1906); (Whittenbury e Krieg, 1984); (Bowman <i>et al.</i> , 1995); (Hanson e Hanson, 1996); (Liebner e Wagner, 2007); (Semrau <i>et al.</i> , 2010); (Dunfield <i>et al.</i> , 2007); <i>Ca. Methyacidiphillum</i> (Filo Verrucomicrobia); (Lee <i>et al.</i> , 2012).
Arquéias anaeróbias	<i>Sphingopyxis sp.</i> MD2 ANME - <i>Methanomicrobium</i> , <i>Methanosarcina</i>	(Zehnder e Brock, 1979); (Hinrichs <i>et al.</i> , 1999); Knittel e Boetius, 2009).
Bactérias anaeróbias	 <i>Ca. Methyloirabilis oxyfera</i>	(Raghoebarsing <i>et al.</i> , 2006); Luesken <i>et al.</i> , 2009).

4.4 Aplicações biotecnológicas de micro-organismos metanotróficos

As bactérias oxidantes de metano, devido à presença da enzima MMO, foram relatadas pela capacidade de degradar poluentes, tais como fármacos, aditivos químicos, pesticidas, dentre outros (BENNER *et al.*, 2014).

As enzimas pMMO e sMMO encontradas em metanotróficas se diferem na afinidade e especificidade de substratos. A sMMO é considerada menos específica, ou seja, podendo oxidar tanto alcanos com até oito átomos de carbono, bem como compostos aromáticos (SEMRAU *et al.*, 2010).

Em estudo realizado por BENNER *et al.* (2014), micro-organismos oxidantes de metano de cinco diferentes culturas, foram selecionados para serem utilizados para codegradação metabólica de micropoluentes. Em uma primeira triagem, 18 diferentes compostos foram testados quanto à degradação com o uso das culturas, bem como quatro linhagens puras de bactérias oxidantes de metano. Dentre os compostos testados no trabalho, estavam produtos farmacêuticos, aditivos químicos e pesticidas. Todas as culturas enriquecidas foram bem sucedidas na degradação de pelo menos quatro diferentes poluentes, mas os compostos mais frequentemente degradados foram sulfametoxazol (SMX) e benzotriazol (BTZ). As culturas

puras apresentaram menor potencial de degradação, mas três das quatro linhagens testadas, também foram capazes de degradar SMX e BTZ (BENNER *et al.*, 2014).

Oxidação anaeróbia do metano dependente do nitrito

Nas últimas décadas, a utilização de fertilizantes na agricultura têm se intensificado aumentando a carga de nitrogênio que pode ser lançada em corpos d'água receptores. Sabe-se que o lançamento de efluentes contendo excesso de nutrientes é a principal causa da eutrofização artificial. Sendo assim, de forma a prevenir a poluição por nitrogênio, os efluentes necessitam ser tratados reduzindo a carga de nitrogênio antes de serem lançados nos corpos d'água evitando assim a deterioração dos mananciais (VON SPERLING, 2005; LUESKEN, 2011).

Convencionalmente, a remoção de cargas de nitrogênio em um sistema de tratamento de águas residuárias, faz-se através de dois processos: nitrificação bacteriana (processo aeróbio) que oxida a amônia (NH_4^+) em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Subsequentemente, no processo anaeróbio (ou anóxico), compostos orgânicos são necessários como suplemento para a redução de nitrato (NO_3^-) ou nitrito (NO_2^-) para gás nitrogênio (N_2) por micro-organismos desnitrificantes.

A fim de suprir a necessidade de compostos orgânicos, doadores de elétrons como o metanol ou o ácido acético frequentemente têm sido utilizados. Entretanto, a introdução desses compostos resulta em aumento dos custos do tratamento. Devido a essa desvantagem, é de grande relevância científica a busca por doadores de elétrons alternativos ou sistemas inteiramente novos (LUESKEN, 2011).

Nesse sentido, a investigação de micro-organismos e o enriquecimento de culturas responsáveis pelo processo N-DAMO, em biomassa proveniente de sistemas de tratamento de esgotos, faz-se de suma relevância.

Em 2006, um consórcio de bactérias pertencente à divisão candidato NC10 e arqueias foi identificado em cultura enriquecida proveniente de sedimento de canal hidroviário Twentekannal, na Holanda (RAGHOEBARSING *et al.*, 2006). HU *et al.* (2009) e ETTWIG *et al.* (2008), postularam que arqueias realizavam a metanogênese reversa acoplada à desnitrificação. No entanto, após um tempo, as arqueias desapareceram da cultura enquanto

bactérias NC10 permaneceram. Sendo assim, o mecanismo N-DAMO era mediado por bactérias do filo NC10. A bactéria *M. oxyfera* está incluída nesse filo. As características desse micro-organismo fazem com que ele se torne uma espécie interessante para ser aplicada em processos de tratamento de águas residuárias. Se o metano puder ser usado para a desnitrificação em um processo N-DAMO, isso poderia contornar a necessidade de doadores de elétrons caros (como metanol) para remoção de nitrogênio. Um sistema dessa forma poderia oferecer grande número de vantagens comparado à remoção convencional de nitrogênio, incluindo baixos custos, baixa produção de biossólidos e baixo consumo de energia (HU *et al.*, 2009; ETTWIG, 2010; LUESKEN *et al.*, 2011a; LUESKEN *et al.*, 2011b).

Em 2009, uma cultura selecionada de N-DAMO foi obtida a partir de sedimentos de drenos abertos de terras agrícolas na Holanda (ETTWIG, 2010). De forma similar, KAMPMAN *et al.* (2012), também enriqueceram em biorreatores bactérias pertencentes ao filo NC10. Em ambos os trabalhos, arqueias oxidadoras de metano não foram relatadas. Por outro lado, um estudo na Austrália realizado por HU *et al.* (2009) relatou a seleção de um consórcio microbiano contendo bactérias NC10 e arqueias metanotróficas a partir de inóculo misto proveniente de lodos ativados de um sistema de tratamento de efluentes municipais, sedimentos de água doce e lodo de digestores em um reator operado sob a forma de bateladas sequenciais (RBS). De acordo com STROUS *et al.* (1998), biorreatores operados sob a forma de bateladas sequenciais apresentam retenção de biomassa mais eficiente. A biomassa enriquecida poderia ser usada posteriormente para dar início à operação de reatores aplicados no pós-tratamento de efluentes anaeróbios.

De acordo com HU *et al.* (2009), é possível que arqueias metanotróficas possam ser capazes de reduzir o nitrato e/ou possuam maior afinidade ao nitrato do que ao nitrito. Dessa forma, pode ser que requeiram bactérias na cultura de forma a remover nitrito, o qual é um inibidor de vários tipos de micro-organismos.

Devido ao limitado número de trabalhos contendo cultivo de metanotróficas desnitrificantes (N-DAMO), os avanços nessa área ainda são lentos, sendo requeridos maiores estudos (RAGHOEBARSING *et al.*, 2006; KAMPMAN *et al.*, 2012). Além disso, o tempo de duplicação desses micro-organismos (de aproximadamente uma a duas semanas) também dificulta os estudos, pois, para cultivá-los, são necessários, em sua maioria, longos períodos de enriquecimento (ETTWIG *et al.*, 2008). Entretanto, quando comparado aos processos

aeróbios de oxidação do metano, N-DAMO poderia oferecer uma série de vantagens, pois não há requerimento de oxigênio livre e, portanto, representaria economia, além do uso eficiente do metano de forma energética associada à remoção de nitrogênio em sistemas de tratamentos anaeróbios.

A tabela 4.7 apresenta um resumo dos principais trabalhos relacionados ao enriquecimento de micro-organismos metanotróficos, incluindo arqueias e metanotróficas desnitrificantes.

Tabela 4-7. Resumo dos principais trabalhos de seleção e cultivo de micro-organismos metanotróficos encontrados na literatura.

(continua)

Inóculo	Reator e modo de operação	Temperatura (°C)	Formas de Nitrogênio	Presença de arqueias metanotróficas	Presença de bactérias filo NC10	Período mínimo de enriquecimento	Referência
Sedimentos de um canal de água doce (Holanda)	Bateladas sequenciais	25°C	Nitrito e Nitrato	Sim: 10%	Sim: 80%	16 meses	Ragoebarsing <i>et al.</i> (2006)
Biomassa selecionada no trabalho de Ragoebarsing <i>et al.</i> (2006) (Holanda)	Tanque de agitação contínua	30°C	Nitrito e Nitrato	Não	Sim: 70%	22 meses	Ettwig <i>et al.</i> (2008)
Sedimentos de drenagens agrícolas (Holanda)	Tanque de agitação contínua	30°C	Nitrito e Nitrato	Não	Sim: 70%	5 meses	Ettwig <i>et al.</i> (2009)
Mistura de: sedimento de lago de água doce, lodo de digestor e lodo de retorno de sistema de lodos ativados (Austrália)	Bateladas Sequenciais	22°C	Nitrato	Não	Sim: 15%	9 meses	Hu <i>et al.</i> (2009)
Mistura de: sedimento de lago de água doce, lodo de digestor e lodo de retorno de sistema de lodos ativados (Austrália)	Bateladas Sequenciais	35°C	Nitrato	Sim: 40%	Sim: 30%	8 meses	Hu <i>et al.</i> (2009)
Sedimentos da baía Eckernförde (Mar Báltico, Alemanha) e lodo anaeróbico granulado	Biorreator anaeróbico de membrana submersa - fluxo contínuo	15 e 30°C	-	Sim: ANME 2a	Não	29 meses	Meulepas <i>et al.</i> (2009)

Tabela 4-6. Resumo dos principais trabalhos de enriquecimento de micro-organismos metanotróficos encontrados na literatura.

Inóculo	Reator e modo de operação	Temperatura (°C)	Formas de Nitrogênio	Presença de arqueias metanotróficas	Presença de bactérias filo NC10	Período mínimo de enriquecimento	Referência
Sedimentos da baía Eckernförde (Mar Báltico, Alemanha)	Biorreator anaeróbio de membrana submersa - fluxo contínuo	15 °C	-	Sim: ANME-2a; 90% das <i>Archaea</i>	Não	28 meses	Jagersma <i>et al.</i> (2009)
Lodo proveniente de Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (Lieshout, Holanda)	Bateladas Sequenciais	20-23 °C	Nitrito e Nitrato	Não	Sim	11 meses	Luesken <i>et al.</i> (2011)
Sedimentos de drenagens agrícolas (Holanda)	Bateladas sequenciais	30± 1 °C	Nitrito	Não	Sim: 70-80%	13 meses	Kampman <i>et al.</i> (2012)

4.5 POTENCIAL DE OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DO METANO - ATIVIDADE METANOTRÓFICA

Em 2000, um trabalho realizado por CHAN e PARKIN (2000), avaliou os gases inibidores da oxidação do metano bem como da metanogênese em amostras de solos de um aterro sanitário municipal. Uma variedade de compostos incluindo acetileno, etileno, etano, cloreto de metila e fluoreto de metila foram avaliados. Os experimentos consistiram na utilização de solos esterilizados, tal como solos não tratados submetidos a diferentes concentrações desses gases. Apenas o cloreto de metila apresentou um resultado satisfatório, sendo capaz de inibir em 89% a metanogênese, ao passo que a oxidação do metano não foi significativamente afetada. Entretanto, o trabalho não traz informações sobre o potencial de oxidação anaeróbia do metano, como taxa de consumo atribuída aos micro-organismos metanotróficos.

Posteriormente, em pesquisa feita por KNIEF *et al.* (2003), amostras coletadas do horizonte superficial do solo (5 a 20 cm da superfície do solo) na Alemanha, Itália e Holanda foram incubadas a 25°C em frascos de 120 mL lacrados com batoque de borracha. As amostras foram incubadas sob atmosfera de metano (100 a 400ppmv) e o decaimento do metano no *headspace* foi mensurado por meio de um cromatógrafo com detector por ionização de chama. As taxas de oxidação do metano foram estimadas por regressão linear. O tempo de incubação variou de acordo com a atividade das amostras e incluíram de 3 a 12 pontos para elevadas concentrações de metano. As taxas máximas de oxidação de metano variaram de 0,01 a 3,11nmol CH₄.g⁻¹.h⁻¹.

Pesquisas realizadas por ETTWIG *et al.* (2009), com uma cultura enriquecida a partir de sedimentos de valas agrícolas e sedimentos de água doce, investigou a oxidação do metano através de experimentos em batelada utilizando-se toda a cultura enriquecida a partir do dia 146. Os dados obtidos mostraram uma taxa de atividade de consumo de metano de aproximadamente 0,18nmol de CH₄. min⁻¹ mg protein⁻¹. Nesse trabalho, o metano foi adicionado a uma concentração que variou de 2,5% a 10% de metano no *headspace* dos frascos e incubado a 30°C. A concentração de metano foi medida via cromatografia.

A partir de projeto conduzido por MARTINEAU *et al.* (2010), amostras do solo do ártico canadense (*permafrost*) foram incubadas em um meio contendo sais minerais ou adicionadas diretamente em frascos de vidro de 120mL (sem o tratamento com meio mineral). O meio mineral (NMS) é um meio de crescimento utilizado para enriquecimento e isolamento de bactérias metanotróficas e este foi adicionado para estimular a degradação de metano no solo.

Os frascos foram selados com batoque de borracha e 1mL de $^{13}\text{CH}_4$ foi injetado no headspace de cada microcosmo. As amostras foram incubadas a 4°C ou à temperatura ambiente sob agitação de 160rpm. Amostras autoclavadas também foram utilizadas como controle negativo para a degradação do metano. O headspace foi monitorado por cromatografia gasosa e quando mais de 90% do metano foi consumido, o microcosmos foi lavado com ar estéril para evitar a acumulação de CO_2 e injetou-se novamente 1mL ou 5mL de $^{13}\text{CH}_4$ ou $^{12}\text{CH}_4$. Os resultados mostraram que os solos apresentam a capacidade para oxidar o metano tanto a 4°C como à temperatura ambiente, mas que as taxas de oxidação foram maiores à temperatura ambiente, bem quando a solução nutriente foi adicionada, mostrando que estas condições podem favorecer a oxidação biológica do metano. Os valores para a oxidação do metano sem a adição do meio mineral variaram de 2,5 a 7,5 $\text{nmol CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (4°C) e 7,5 a 11,5 $\text{nmol CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (a 25°C). Já quando se adicionou o meio mineral as taxas de oxidação a 4°C foram aproximadamente de 100 $\text{nmol CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ao passo que as taxas para oxidação a 25°C, variaram de 300 nmol a 550 $\text{nmol CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

De acordo com os autores, a falta de nutrientes pode ser um fator importante que limita a atividade de bactérias metanotróficas em solos do Ártico. Com efeito, quando as amostras de solo foram incubadas com sais minerais, um meio de crescimento que foi projetado para o enriquecimento e isolamento de bactérias metanotróficas, as taxas de oxidação do metano foram de 15 a 100 vezes maior do que para as amostras de solo correspondentes incubadas sem meio mineral (MARTINEAU *et al.*, 2010).

Ainda em 2010, um trabalho feito por MEULEPAS *et al.* (2010) investigou a oxidação do metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$), a partir de amostras de lodo granular obtidos de três reatores UASB em escala real, sendo estes: um reator metanogênico tratando água residuária proveniente de uma indústria de papel, outro reator metanogênico tratando água de indústria de destilaria e o terceiro, um reator redução de sulfato alimentado com etanol. A amostra composta foi incubada e a taxa de oxidação apresentada foi de 11,4 $\mu\text{mol de CH}_4 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

Uma pesquisa realizada por HO *et al.* (2013), investigou o potencial de oxidação de metano a partir de amostras de lodo provenientes de diferentes ETEs, que representam diferentes processos de tratamento de águas residuárias. As amostras de lodo foram provenientes de um sistema de lodos ativados, lodo proveniente de digestores de lodo e por último, lodo proveniente de um sistema designado como OLAND (do inglês - *Oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification*), que é um reator biológico autotrófico limitado em oxigênio que

permite a nitrificação/desnitrificação e utilizado, portanto, para tratar águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio. Tipicamente, esses reatores contém uma comunidade micro-organismos aeróbios e anaeróbios oxidadores de amônia (VLAEMINCK *et al.*, 2010). Cerca de 8mL de amostras de lodo foram incubadas em frascos de 120mL sob atmosfera de metano de aproximadamente 25% a 28°C. As amostras foram mantidas sob agitação a 120rpm. Os resultados mostraram que o total de metano consumido foi de 160, 32 ($\pm 17,79$) mmol CH₄.gSSV⁻¹ para o lodo anóxico do sistema de lodos ativados (LA) e de 34,66 ($\pm 0,94$) mmol CH₄.gSSV⁻¹ para o lodo de retorno de LA. Para o lodo de digestores anaeróbios, o total de metano consumido foi de 22,09 ($\pm 1,02$) mmol CH₄.gSSV⁻¹. E por fim, para o sistema OLAND em escala de laboratório, o resultado foi de 85,16 ($\pm 2,69$) mmol CH₄.gSSV⁻¹, ao passo que para uma escala de OLAND industrial, os valores foram bastante inferiores, sendo igual a 35,19 ($\pm 5,71$) mmol CH₄.gSSV⁻¹. A tabela 4.8 resume os trabalhos descritos na literatura bem como as taxas de oxidação do metano encontradas.

Tabela 4-8. Taxa de oxidação do metano à luz da literatura.

Amostras	Atividade metanotrófica	Referência
Amostras de solo	0,01-3,11nmolCH ₄ .g ⁻¹ .h ⁻¹	KNIEF <i>et al.</i> , 2010
Sedimentos de valas agrícolas e de água doce	0,18 nmolCH ₄ .min ⁻¹ .mg de proteína ¹	ETTWIG <i>et al.</i> , 2009
Solo do ártico	2,5-7,5nmol CH ₄ .g ⁻¹ .d ⁻¹	MARTINEAU <i>et al.</i> , 2010
Solo do ártico	7,5 – 11,5 nmol CH ₄ .g ⁻¹ .d ⁻¹	MARTINEAU <i>et al.</i> , 2010
Solo do ártico	100 nmol CH ₄ .g ⁻¹ .d ⁻¹	MARTINEAU <i>et al.</i> , 2010
Solo do ártico	300-550 nmol CH ₄ .g ⁻¹ .d ⁻¹	MARTINEAU <i>et al.</i> , 2010
Lodo granular de UASB tratando efluente industrial	11,4 μmol CH ₄ .gSTV.dia ⁻¹	MEULEPAS <i>et al.</i> , 2010
Lodo anóxico de sistema de lodos ativados	160 mmol.gSSV ⁻¹	HO <i>et al.</i> (2013)
Sistema ORLAND	85 mmol.gSSV ⁻¹	HO <i>et al.</i> (2013)
Lodo de retorno de LA	34 mmol.gSSV ⁻¹	HO <i>et al.</i> (2013)
Lodo de digestores anaeróbios	22 mmol.gSSV ⁻¹	HO <i>et al.</i> (2013)

4.6 MÉTODOS PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE MICROBIANA

O campo da ecologia microbiana foi transformado com o desenvolvimento de métodos que conseguem recuperar e analisar os ácidos nucleicos a partir de amostras ambientais. Tais técnicas, independentes de cultivo, combinadas com a análise filogenética revelaram uma grande diversidade microbiana em comparação com o número limitado de espécies, que

podem ser estudadas com mão de obra intensiva, através dos métodos microbiológicos tradicionais, como o cultivo de micro-organismos (EVERSHED *et al.*, 2006; CHOWDHURY e DICK, 2013).

Grande número de ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas e utilizadas para estudo de micro-organismos metanotróficos. Essas ferramentas incluem técnicas baseadas na reação em cadeia da Polimerase (PCR), como a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) bem como a técnica de sequenciamento de nova geração como o Pirosequenciamento e Illumina (que recuperam grande número de seqüências das amostras). Para os estudos moleculares, pode-se utilizar o gene RNAr 16S bem como os genes funcionais de metanotróficas. Os genes funcionais de methanotróficas são aqueles que codificam para a enzima MMO (pMMO e sMMO). Os dois genes, *pmoA* e *mmoX*, em particular, têm sido amplamente utilizados para estudos de ecologia molecular microbiana para a detecção das metanotróficas. Os genes *pmoA* foram sequenciados a partir de um número de metanotróficos em diferentes estudos ambientais e conduzem a um grande conjunto de dados no GenBank. Ambos *pmoA* e *mmoX* produzem filogenias congruentes com o gene RNAr 16S do mesmo organismo (CHOWDHURY e DICK, 2013).

4.6.1 PCR-DGGE

A DGGE é uma técnica usada para separar fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas de diferentes seqüências de pares de bases. Pelos fragmentos de RNAr 16S amplificados, diferentes perfis de banda podem ser visualizados representando a diversidade filogenética de uma comunidade (TUOVINEN *et al.*, 2006).

A técnica separa produtos da PCR. A PCR aplicada a um extrato de DNA total proveniente de um ambiente natural pode gerar moldes de diferentes seqüências de DNA que representam muitos dos micro-organismos dominantes naquele hábitat. No entanto, quando produtos de PCR de uma dada reação são de mesmo tamanho (mesmo número de pares de base - pb) uma separação convencional por eletroforese em gel de agarose resulta somente em uma única banda que é na maioria das vezes não-descritiva. A DGGE vem resolver esta limitação por separação dos produtos de PCR baseado nas diferenças da seqüência do DNA que resultam em perfis de desnaturação distintos. Com um gel contendo uma concentração mínima de gradiente desnaturante, a dupla-fita do produto de PCR do domínio mais “fraco” começa a se desnaturar e então o tempo de migração diminui significativamente. Diferentes seqüências de DNA, de diferentes espécies de bactérias, desnaturam a diferentes concentrações de uréia e

formamida, resultando em padrões de bandas distintos. Teoricamente, cada banda representa uma população distinta presente em uma comunidade. A técnica explora, dentre outros fatores, a diferença em estabilidade do pareamento GC. Em geral, fragmentos ricos em sequência GC podem ser mais estáveis e permanecem com a dupla-fita até altas concentrações desnaturantes. A análise por DGGE requer quantidade significativa de DNA e, por isso, a necessidade de uma amplificação por PCR antes da técnica. Esta é extremamente sensível aos problemas das reações de amplificação e, portanto, especial atenção deve ser dada durante a realização da PCR (CASAMAYOR *et al.*, 2000; CASAMAYOR *et al.*, 2001; DEMERGASSO *et al.*, 2005).

A DGGE tem sido usada para caracterizar populações microbianas complexas em ambientes naturais (MUYZER, 1999), bem como avaliar a dinâmica da comunidade em diferentes sistemas como reatores tratando águas residuárias (VAN ELSAS e BOERSMA, 2011; PEREIRA, 2013; MAC CONELL, 2014).

Embora organismos raros dificilmente sejam detectados através do DGGE, a técnica permite uma comparação rápida entre diversas amostras e é bastante utilizada no estudo da diversidade microbiana (VAN ELSAS e BOERSMA, 2011). Após a realização do DGGE, é possível analisar a imagem do gel em programas específicos, como o *software* BioNumerics 2.5 (*Applied Maths*), que permite, por exemplo, a comparação entre as amostras com base no perfil das bandas. Também é possível excisar as bandas para posterior sequenciamento (determinação da sequência de nucleotídeos –A,G,T,C –em uma molécula de DNA) e análise das sequências obtidas por meio de bancos de dados de nucleotídeos como o Gen Bank (NCBI - *National Center of Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Apesar de permitir um diagnóstico rápido, este método apresenta limitações no que se refere ao seu poder de resolução sendo claramente limitado aos membros dominantes (com um limiar de aproximadamente 0,1% do total) da comunidade microbiana alvo (VAN ELSAS e BOERSMA, 2011). Apesar desses relatos, muitos pesquisadores utilizam esta técnica para a identificação de todos os membros importantes da comunidade e de organismos dominantes em comunidades de biorreatores. Ademais, usando DGGE pode-se obter informações qualitativas sobre a diversidade presente nas amostras. Entretanto, tal método não fornece dados quantitativos, informação chave para a ecologia microbiana. Para isso, pode-se utilizar o sequenciamento de alto rendimento, que possibilita o estudo da abundância relativa dos micro-organismos presentes, além da identificação dos táxons presentes nas amostras.

4.6.2 Sequenciamento de nova geração

Nos últimos quinze anos, o sequenciamento do genoma permitiu um grande avanço na ciência, incluindo o estudo de organismos patogênicos, genoma humano, amostras ambientais, dentre outras. Mais recentemente, o sequenciamento de alto rendimento (ou nova geração) chegou ao mercado e promoveu uma grande mudança na capacidade de sequenciamento gênomico, seja humano ou bacteriano (LOMAN *et al.*, 2012).

O sequenciamento de DNA de nova geração – SNG, do inglês, *Next Generation Sequencing-NGS*, são processos de sequenciamento que permitem o processamento massivo de fragmentos de DNA, possibilitando a leitura de milhares de fragmentos ao mesmo tempo.

Devido ao alto rendimento do sequenciamento, as plataformas de sequenciamento estão em constante aperfeiçoamento e evolução, tendo sido adaptadas para aplicações em larga escala, e também na busca pela redução dos custos (LOMAN *et al.*, 2012).

Atualmente, novas plataformas como a 454FLX da empresa *Roche*, MiSeq da empresa *Illumina*, dentre outros. A elevada cobertura de comunidades autóctones fornecidas pelo SNG tornou possível, por exemplo, quantificar comunidades planctônicas marinhas (LUO *et al.*, 2012).

O SNG produz milhões de sequências curtas, que podem variar em dezenas de pares de base (pb) a por exemplo, 800 pb (LUO *et al.*, 2012). Segundo DELFORNO (2014), a utilização do sequenciamento massivo para estudos de diversidade microbiana apresenta bons resultados quando parâmetros como tamanho do fragmento, cobertura da amostragem (rendimento da corrida), acurácia (precisão na medição) e custos são avaliados. No que se refere aos custos, segundo LOMAN *et al.* (2012), a plataforma 454GS Junior é a que apresenta maior custo por corrida (\$1.100) e por megabase (Mb) (\$31), quando comparada à MiSeq que apresenta custo de corrida de aproximadamente \$750 e \$0,5 por Mb. A plataforma MiSeq é a que apresenta maior cobertura, entretanto, os fragmentos são menores.

O tamanho do fragmento pode afetar o estudo filogenético e limitar a identificação dos microorganismos em níveis taxonômicos (LIU *et al.*, 2012; DELFORNO, 2014). Uma vez que não é possível o sequenciamento completo do gene RNAr 16S através do sequenciamento massivo, é necessário a escolha de regiões desse gene, que apresenta 9 regiões variáveis, V1-a V9 (NEEFS *et al.*, 1993). De acordo com LIU *et al.* (2007), citado por DELFORNO (2014), a

região do 16S a ser estudada deve ser cuidadosamente selecionada para que permita a identificação taxonômica e estudo da comunidade microbiana presente em um ambiente. As principais regiões utilizadas para estudos filogenéticos do 16S são a V2 e V4 (LIU *et al.*, 2007).

4.6.2.1 Pirosequenciamento (Plataforma Roche 454 FLX)

O pirosequenciamento é um método relativamente recente, que realiza o sequenciamento baseado na detecção do pirofosfato durante a síntese de DNA (RONAGHI, 2001; MARGULIES *et al.*, 2005) A leitura das sequências é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se iniciam com a liberação de um pirofosfato, proveniente da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Logo após, esse pirofosfato é convertido a ATP, pela enzima ATP sulfurilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz que é capturado por uma câmera acoplada ao sistema (RONAGHI, 2001).

O método, embora recente, tem sido frequentemente utilizado em pesquisas de amostras ambientais e nos mais diversos habitats, incluindo sistemas de tratamento de águas e esgotos (WANG *et al.*, 2012; MAC CONELL, 2014).

Para estudo de comunidades microbianas, é necessária a realização de uma PCR com iniciadores de interesse, no qual um dos iniciadores é marcado com um *barcode*. O *barcode* é uma sequência de aproximadamente 10 nucleotídeos, específica para cada amostra, que permitirá a identificação da origem das sequências amplificadas. Dessa forma, cada fragmento de DNA é ligado às microesferas através do pareamento com sequências curtas complementares presentes na superfície da microesfera. Somente um único tipo de fragmento se liga a uma determinada microesfera em uma PCR em emulsão, que permitirá no final do processo, milhares de cópias idênticas ao fragmento alvo de DNA. Posteriormente, as microesferas ligadas às sequências de DNA alvo de fita simples são depositadas em poços de uma placa de fibra óptica contendo mais de um milhão de poços. É válido ressaltar que para cada poço, uma única esfera poderá ser comportada. O pirosequenciamento 454 envolve a síntese de uma cadeia de DNA complementar através da enzima DNA polimerase. Os nucleotídeos Adenina, Timina, Guanina e Citosina são aplicados sobre a placa e as reações de sequenciamento ocorrem simultaneamente na placa inteira. Sendo assim, conforme mencionado inicialmente, toda vez que um nucleotídeo é incorporado à fita complementar, há a liberação de uma molécula de pirofosfato, que fornece a energia necessária para liberação de

luz pela enzima luciferase, também adicionada ao sistema. Cada pulso de luz sinaliza que a sequência em análise incorporou uma base complementar àquela presente no sítio de inserção da fita de DNA, permitindo a identificação dos nucleotídeos (MADIGAN *et al.*, 2010; MAC CONELL, 2014). A figura 4.10 apresenta um desenho esquemático sobre o método de pirosequenciamento.

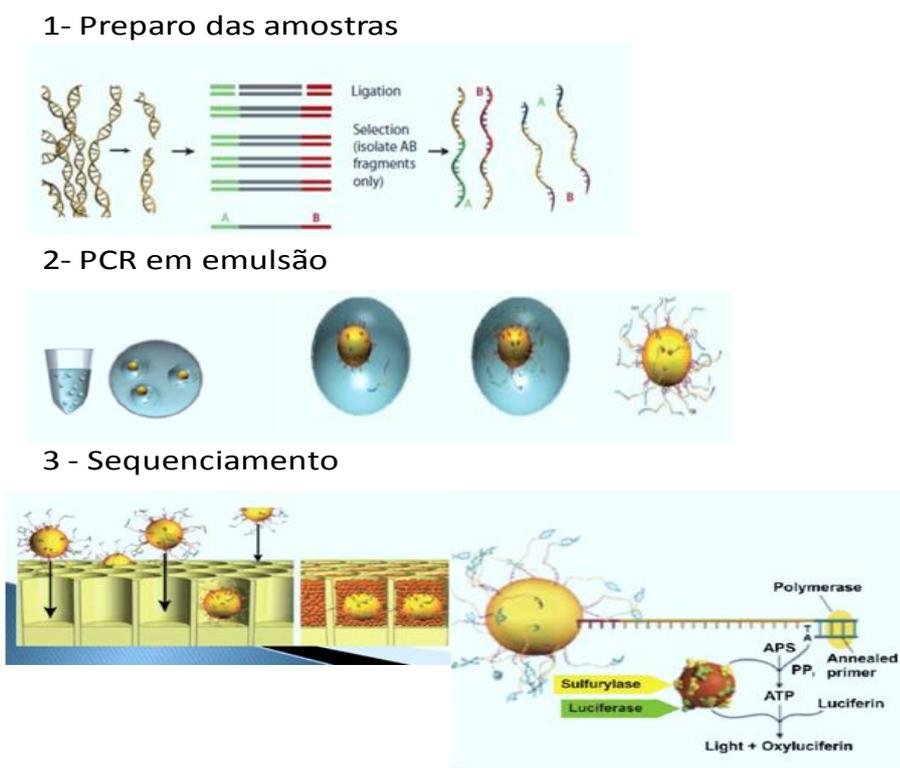


Figura 4-10. Desenho esquemático mostrando o pirosequenciamento 454¹

¹ Disponível em: <<http://www.scilog.de/chemisches-allerlei/dna-sequenzierung-kleine-bersicht>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

4.6.2.2 Plataforma MiSeq/Illumina

O método de sequenciamento químico da plataforma MiSeq (*empresa Illumina*) é denominado sequenciamento por síntese. No lugar de se colocar o DNA em um gel, o sequenciamento por síntese, requer que o DNA seja colocado em uma superfície dentro de uma célula de fluxo. O instrumento MiSeq adiciona as bases e adquire a imagem de cada ciclo. Um ciclo consiste na adição e na leitura de cada base. Os pontos coloridos para cada ciclo formam os grupos que são compostos de sequências curtas, ou seja, pequenas regiões do fragmento de DNA amplificado (LOMAN *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2012).

As informações abaixo foram extraídas do site da empresa *Illumina*² e descrevem o método realizado pela plataforma MiSeq.

O sequenciamento químico da plataforma MiSeq pode ser dividido em duas partes: A primeira parte consiste na preparação da amostra, onde as moléculas de DNA de fita simples são aderidas aos adaptadores (pequenos fragmentos sintetizados de DNA). Logo em seguida, as amostras são colocadas na célula de fluxo do sistema MiSeq. A célula de fluxo é coberta com oligonucleotídeos complementares, o qual permite a adesão das amostras à célula de fluxo.

Dessa forma, as amostras de DNA se ligam aos oligonucleotídeos complementares na superfície da célula de fluxo numa etapa conhecida como hibridação. Após a hibridação, o MiSeq amplifica muitas cópias do modelo de DNA hibridado na célula de fluxo.

Posteriormente, dá-se o alinhamento dos primers. Os primers do sequenciamento são adicionados (pequenos fragmentos de DNA complementares à sequência dos adaptadores) e logo após, os nucleotídeos Adenina, Citosina, Timina e Guanina marcados com um corante fluorescente são adicionados. Cada nucleotídeo é marcado com um corante fluorescente diferente. Somente um nucleotídeo é adicionado por vez, permitindo a detecção da fluorescência.

A detecção de uma base, mediante fluorescência, significa que a cadeia de DNA tem o par de bases complementares nessa posição (por exemplo, se uma Citosina é detectada, sabe-se que a

²Disponível em: <http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq>. Acesso em: 12 mar. 2015.

cadeia de DNA da amostra tem uma Guanina nessa posição). Após a incorporação da primeira base, adiciona-se mais nucleotídeos marcados e, em continuidade, procede-se a leitura da sequência do DNA alvo.

Ao final do processo, as sequências lidas são alinhadas com um genoma de referência presente em uma biblioteca. O alinhamento possibilita a determinação da localização do DNA no genoma. Os resultados finais podem ser visualizados na plataforma MiSeq.

5 DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS METANOTRÓFICOS EM AMOSTRAS DE LODO E SEDIMENTO PROVENIENTES DE SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO

Objetivo Específico 1

5.1 *Resumo*

O presente trabalho teve como objetivo detectar através da PCR a presença de diferentes grupos de micro-organismos metanotróficos, incluindo arqueias metanotróficas do grupo ANME, bactérias metanotróficas aeróbias e bactérias do filo NC10 (*Candidatus Methylomirabilis oxyfera*) em amostras de quatro diferentes sistemas de tratamento de esgoto doméstico, incluindo o sistema de lodos ativados da COPASA, alagados construídos, reator UASB e uma lagoa de polimento instalados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CEPTs), UFMG/COPASA, localizado junto à Estação de Tratamento de Esgotos do Arrudas - COPASA, em Belo Horizonte, MG. Os resultados mostraram a presença de arqueias metanotróficas (ANME) para as amostras de lodo de reator UASB, lodo de recirculação do sistema de lodos ativados, sedimentos da *wetland* e lagoa de polimento. Metanotróficas aeróbias foram detectadas somente nas amostras provenientes da lagoa de polimento, enquanto metanotróficas desnitrificantes do gênero *M. oxyfera* não foram detectadas em nenhuma das amostras testadas. Além da investigação e detecção dos diferentes grupos de metanotróficas nesses sistemas de tratamento, este trabalho forneceu o suporte necessário para pesquisa posterior, na qual amostra de um desses sistemas foi selecionada para ser usada como inóculo em experimentos do potencial de oxidação anaeróbia do metano e cultivo de micro-organismos metanotróficos.

5.2 *Abstract*

In this study, the presence of various groups of methanotrophic microorganisms was investigated, including methanotrophic archaea from the ANME group, aerobic methanotrophic bacteria and bacteria of the phylum NC10 (*Candidatus Methylomirabilis oxyfera*) through the PCR technique with specific primers for the *pmoA* gene from the aerobic methanotrophic, *pmoA* gene from the *M. Oxyfera* methanotrophic denitrifying (NC10 phylum) and for the anaerobic methanotrophic archaea 16S rRNA gene (ANME-I and ANME-II). The survey was conducted from the sludge and sediment samples from different domestic sewage treatment systems installed at Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CEPTs) at UFMG, located along the Estação de Tratamento de Esgotos do

Arrudas - COPASA, in Belo Horizonte, MG. The results showed the presence of methanotrophic archaea (ANME) for the UASB sludge samples, the recirculation sludge from the activated sludge system, sediment from the wetland and polishing pond. Aerobic methanotrophic were detected only in the polishing pond samples while methanotrophic denitrifying of the *M. oxyfera* genre were not detected in any of the tested samples. Besides the investigation and detection of different groups of methanotrophic in these treatment systems, this study provided the necessary support for further study in which sample of these systems was selected to be used as inoculum for methane anaerobic oxidation potential experiments and enrichment of methanotrophic microorganisms.

Palavras-chave: Detecção, metanotróficas, gene *pmoA*, ANME, PCR, sistemas de tratamento de esgotos.

Keywords: Detection, methanotrophic, *pmoA* gene, ANME, PCR, wastewater treatment.

5.3 Introdução

A oxidação biológica do metano é um processo benéfico, que pode controlar os fluxos de metano no meio ambiente. O fluxo de metano é dado pelo balanço entre a produção por arqueias metanogênicas e a oxidação do metano realizada por bactérias (aeróbias e/ou anaeróbias) e arqueias anaeróbias metanotróficas (CHOWDHURY e DICK, 2013).

A oxidação aeróbia do metano é mediada por vários grupos de bactérias amplamente distribuídas no ambiente, tais como bactérias das classes α -*Proteobacteria* e γ -*Proteobacteria* (BOWMAN *et al.*, 1995; HANSON e HANSON, 1996; LIEBNER e WAGNER, 2007) e bactérias do filo *Verrucomicrobia* (OP DEN CAMP *et al.*, 2009a) A primeira etapa da oxidação aeróbia do metano é a conversão do metano a metanol catalisado pela enzima Metano Mono-Oxigenase (MMO), que pode estar presente na forma solúvel (Metano Mono-Oxigenase solúvel - sMMO) ou particulada (Metano Mono-Oxigenase particulada - pMMO) (CHISTOSERDOVA *et al.*, 1998). A subunidade alfa da pMMO, que codifica o gene *pmoA*, é altamente conservada e frequentemente utilizada como um marcador funcional para a análise de micro-organismos metanotróficos no ambiente (MCDONALD *et al.*, 2008).

Os primers mais amplamente utilizados para o gene *pmoA* são A189 e A682 (MCDONALD *et al.*, 2008). O gene *pmoA* é um gene funcional, e por este fato, os primers para MMO são uma ferramenta que pode trazer dados sobre função e taxonomia de micro-organismos metanotróficos aeróbios no ambiente (KIP *et al.*, 2010; LUESKEN *et al.*, 2011b). Outros

pares de primers para metanotróficos aeróbios tais como A189F/Mb601R e II223F/II646R também podem ser empregados (KOLB *et al.*, 2003).

Recentemente, bactérias relacionados ao filo NC10, também foram descritas como sendo capazes de realizar a oxidação do metano acoplada à redução do nitrito, um processo designado como N-DAMO, *Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation*. Essas bactérias oxidam o metano em ambiente anaeróbio produzindo seu próprio oxigênio molecular a partir do óxido nitroso, um composto intermediário da desnitrificação, resultando na produção de CO₂ e gás nitrogênio (N₂) (ETTWIG *et al.*, 2009; LUESKEN *et al.*, 2011a). Dentro desse filo, uma espécie candidata nomeada “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”. Essa espécie, embora em um ambiente anaeróbio, é capaz de oxidar aerobicamente o metano via pMMO. Entretanto, não pode ser amplificada via PCR com os primers usuais para metanotróficas aeróbias A189 e A682. Através do alinhamento dos primers usuais para *pmoA* com a sequência de *M. oxyfera*, observou-se várias falhas, principalmente, com os *primers* reversos, o que poderia explicar os problemas de detecção de produtos de PCR.

Dessa forma, LUESKEN *et al.* (2011b), desenvolveram o primer degenerado A189_b (modificando um nucleotídeo do primer *forward* A189F), correspondendo dessa forma à maioria dos metanotróficos presente na base de dados com exceção do gênero *Methylacidiphilum*. O primer A682 também diferiu em oito nucleotídeos quando comparado à sequência de *M. oxyfera*. Assim, desenvolveu-se o *primer* cmo682, específico para esta bactéria. Outro conjunto de iniciadores nomeados cmo182 e cmo568 foram desenhados também para *M. oxyfera* e utilizados para um PCR *nested* após a amplificação com os primers A189_b e cmo682.

De acordo com LUESKEN *et al.* (2011b), o primeiro conjunto de primers produzia múltiplas bandas no PCR, onde o PCR *nested* com os *primers* cmo182 e cmo568 resultou na produção de uma única banda com o tamanho correto (389pb).

A oxidação anaeróbia do metano, além de ser realizada por bactérias do filo NC10, também é mediada por arqueias anaeróbias, ANME, subgrupos ANME-1, ANME-2 e ANME-3 (KNITTEL e BOETIUS, 2009; MEULEPAS *et al.*, 2010). Os estudos de investigação sobre a diversidade de ANME geralmente baseiam-se no gene RNAr 16S ou em filogenias do gene que codifica a enzima metil-coenzima m-redutase (*mcrA*) (BOETIUS *et al.*, 2000; KNITTEL e BOETIUS, 2009). Um par de primers amplamente utilizados para a detecção de ANME,

baseado no gene RNAr 16S, são os primers ANMEF/907R que permitem a detecção dos grupos ANME I e ANME II (THOMSEN *et al.*, 2001).

Micro-organismos metanotróficos já foram detectados em ambientes naturais, tais como arrozais, *wetlands*, intestino de animais ruminantes e também em amostras de lodo proveniente de digestores, lodos ativados e amostras de lodo proveniente de uma ETE na Holanda composta de três reatores UASB e um sistema Carrossel (HANSON e HANSON, 1996; REEBURGH, 2007; ETTWIG *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2009; LUESKEN *et al.*, 2011a). Ainda assim, pouco se sabe, sobre a presença e/ou coexistência dos vários grupos de micro-organismos metanotróficos, tais como bactérias aeróbias, bactérias anaeróbias do filo NC10 (relacionados ao processo N-DAMO) e arqueias metanotróficas do grupo ANME em um mesmo sistema tratando esgoto doméstico. O presente trabalho teve como objetivo detectar através da PCR a presença desses grupos em amostras de quatro diferentes sistemas de tratamento de esgotos domésticos, incluindo sistema de lodos ativados, alagados construídos, reator UASB e uma lagoa de polimento. Os resultados forneceram suporte para a seleção do melhor inóculo a ser usado em estudo posterior, visando o cultivo de micro-organismos metanotróficos.

5.4 Material e Métodos

5.4.1 Locais de amostragem

As amostras de lodo e/ou sedimento foram coletadas em quatro diferentes sistemas de tratamento de esgoto doméstico, localizado junto à Estação de Tratamento de Esgotos do Arrudas (ETE Arrudas), COPASA, em Belo Horizonte, MG.

Os sistemas de tratamento foram: reator UASB, lagoa de polimento, sistema de alagados construídos em fluxo vertical (*wetlands*) e um reator de lodo ativado (a coleta foi realizada na linha de recirculação do sistema). Os três primeiros sistemas operam em escala piloto e estão instalados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CEPTs) da UFMG, localizado junto à COPASA. O quarto sistema, Lodos Ativados, compõe o tratamento secundário de esgotos da ETE Arrudas.

Todos os sistemas são alimentados com esgoto bruto da cidade de Belo Horizonte, com exceção da lagoa de Polimento, que recebe o efluente tratado proveniente do Reator UASB. A tabela 5.1 abaixo apresenta uma caracterização dos diversos sistemas de tratamento de esgoto investigados nessa pesquisa.

Tabela 5-1. Tabela contendo as principais características e condições operacionais dos sistemas de tratamento de esgoto investigados.

Sistemas de tratamento (*)	Características principais	Dados operacionais	Referência	Pontos de amostragem
Reator UASB	Diâmetro = 0,30m Altura = 4,0m Volume = 340L	TDH=7h $Q=48,6L.h^{-1}$ Sistema anaeróbio	(SOUZA <i>et al.</i> , 2010a)	20 cm, 70 cm e 120 cm do compartimento de digestão
Lagoa de Polimento	Largura = 5,25 m Comprimento = 25 m Altura = 1 a 0,6 m Volume = 125 m ³	TDH= 4,9 dias $Q= 29m^3.d^{-1}$ $\Theta_c = >10$ anos Sistema facultativo	(NASCIMENTO, 2014)	Sedimento do fundo da lagoa
Alagados construídos de fluxo vertical	Largura = 3,1 m Comprimento = 9,4 m Parede Lateral = 1,0 m Área = 29,1 m ²	Taxa de aplicação hidráulica: $0,60m^3/m^2.dia$ $Q = 11,3 m^3.d^{-1}$ Sistema anaeróbio	(LANNA, 2013)	Alturas 10 cm e 30 cm da superfície dos leitos plantados e não plantados.
Lodos Ativados	25m; altura: 6m; altura: 115m. Dessa forma, o reator tem volume de $17.250m^3$ e área de $2875m^2$.	TDH= 5,4h $Q = 2,25 m^3.s^{-1}$ Taxa de aplicação hidráulica= $3,3m^3/m^2.h$ $\Theta_c = 5,8$ dias Sistema aeróbio	COPASA, MG.	Linha de recirculação que sai do decantador secundário e volta para o tanque de aeração.

(*) Todos os sistemas de tratamento são alimentados com esgoto sanitário da cidade de Belo Horizonte.

5.4.2 Processamento e Preservação das amostras

1- Reator UASB em escala piloto: para a formação de uma amostra composta, coletou-se 1 litro de lodo em cada altura do reator (20 cm, 70 cm e 1,20 m), totalizando três litros. O lodo foi depositado em um balde para facilitar a homogeneização da amostra. Posteriormente, transferiu-se 100 mL de lodo para frascos de polietileno previamente limpos.

2- Lagoa de Polimento: amostrou-se em um frasco de 1 litro o sedimento da primeira lagoa da série no ponto de saída do efluente tratado, que foi homogeneizado e transferido para um frasco de 100 mL.

3- Sistema de Lodos Ativados: aproximadamente 2 litros de lodo foram coletados na linha de recirculação do Sistema de Lodos Ativados através de um coletor de polietileno presente no local. A linha de recirculação recebe o lodo de retorno proveniente dos decantadores secundários. Do total amostrado, 100 mL foram acondicionados em frascos e transportados até o laboratório.

4- Alagados construídos de Fluxo Vertical - *Wetlands* Plantadas e Não Plantadas:

amostras de brita, material suporte dos leitos construídos, foram coletadas em diferentes alturas (10 cm e 30 cm) da superfície de cada leito (plantado e não plantado). Para a formação de uma amostra composta, amostraram-se três pontos aleatórios de cada leito. Para marcar os pontos de coleta, utilizou-se um quadrado de 1 metro. A brita coletada foi depositada em frascos de 500 mL. Para a extração de DNA do biofilme aderido ao meio suporte (brita), foi necessário o desprendimento do biofilme, que foi realizado de acordo com a metodologia de LANNA (2013) descrita a seguir:

- mediu-se a brita em béqueres de 1 L, a qual foi transferida para um balde;
- adicionaram-se 2 L de tampão PBS 1X para a lavagem da brita misturando-se bem, a fim de garantir o desprendimento do biofilme;
- o procedimento ocorreu repetidas vezes até que a brita estivesse visualmente clara e sem a presença de sólidos;
- o líquido foi transferido para frascos de 500 mL e centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos;
- o *pellet* foi transferido para microtubos do tipo *ependorfs* (2 mL) e congelados a -20 °C para posterior extração de DNA/PCR.

A figura 5.1 apresenta os pontos utilizados para a coleta das amostras.



Figura 5-1. Sistemas de tratamento de esgotos investigados, com os pontos de coleta destacados.

- (a) Reator UASB em escala piloto. Alturas coletadas: 0,2m, 0,7m e 1,2m.
- (b) Lagoa de Polimento;
- (c) Lodo de retorno do sistema de lodos ativados da ETE Arrudas;
- (d) Alagados construídos de fluxo vertical (*wetlands*).

Todas as amostras foram identificadas (data, local) e acondicionadas em caixas de isopor com gelo para preservação e transportadas ao laboratório de microbiologia de esgotos do DESA/UFMG.

No laboratório, o material foi centrifugado em tubos falcons de 50 mL a 4000 rpm durante 15 minutos para a remoção do líquido intersticial. O sobrenadante foi descartado e o lodo e/ou sedimento foram ressuspensos em 50 mL de tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline* - PBS 1X: 7,59g.L⁻¹ de NaCl; 0,94g.L⁻¹ de Na₂HPO₄; 0,41g.L⁻¹ de NaH₂PO₄; pH=7,2) autoclavado.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas (em vórtex) e novamente centrifugadas para remoção de ácidos nucléicos extracelulares. Repetiu-se o procedimento. Posteriormente, transferiu-se o *pellet* para microtubos de 2mL e congelou-se para análises moleculares posteriores.

5.4.3 Extração de DNA/PCR

A extração de DNA das amostras acima descritas foi realizada de acordo com EGLI *et al.* (2003b), com algumas modificações (apêndice). Posterior à extração, alíquotas de 2 µL das amostras contendo o DNA extraído foram submetidas à técnica de Eletroforese em Gel de Agarose 1% para verificar a integridade do DNA. Como solução tampão, utilizou-se o TAE 0,5X (TAE 0,5X: 2,42 de Tris base; 0,57 de ácido acético glacial; 1 mL de EDTA 0,5M pH=8,0, ajustar o pH para 7,5 e completar o volume com água Milli-Q para 1000mL). Para verificação do tamanho dos ácidos nucleicos extraídos, o marcador de peso molecular GeneRuler Express DNA Ladder (Thermo *Scientific*) contendo 100 a 5000 pb foi utilizado. A corrida eletroforética foi programada para 30 minutos a uma corrente elétrica de 100 volts e, após tal corrida, os fragmentos de DNA foram corados com GelRed e visualizados através de transiluminador. O DNA total extraído foi mantido a -20 °C. O DNA total obtido foi submetido à PCR utilizando-se iniciadores específicos para arqueias metanotróficas dos grupos ANME I e ANME-II. Oligonucleotídeos específicos para o gene *pmoA* de bactérias metanotróficas aeróbias também foram empregados para a detecção de bactérias aeróbias nas amostras coletadas.

Para detectar metanotróficas desnitrificantes, utilizou-se a metodologia descrita por ETTWIG *et al.* (2009), usando iniciadores para o gene *pmoA* de *Ca. Methyloirabilis Oxyfera*. Alíquotas do primeiro ciclo de PCR utilizando-se os primers A189bF e Cmo682R foram

utilizadas (PCR nested) como molde na segunda amplificação por PCR utilizando-se os primers cmo182F e cmo568R.

O perfil de temperatura consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94 °C, anelamento dos primers durante 1 minuto e extensão durante 1,5 minutos a 72 °C. Para finalizar, uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. A temperatura de anelamento seguiu as especificações de cada *primer*. A tabela 5.2 apresenta os primers utilizados para todas as amostras de lodo e sedimento coletadas.

Tabela 5-2 - Pares de primers empregados na detecção por PCR das amostras de esgoto doméstico proveniente do CEPTs/COPASA

Par de primer	Sequências (5' -> 3')	Grupo Alvo	Tamanho do fragmento	Referências
A189BF Cmo682R	GGNGACTGGGACCTTYTG TCGTTCTTYGCCGGRITTT	Gene <i>pmoA</i> de <i>M.oxylfera</i>	500pb	LUESKEN <i>et al.</i> (2011b)
Cmo182F Cmo568R	TCACGTTGACGCCGATCC GATGGGATGGAGTATGTGC	Gene <i>pmoA</i> de <i>M.oxylfera</i>	389pb	LUESKEN <i>et al.</i> (2011b)
A189F A682R	GGnGACTGGGACTTCTGG GAAsGCnGAGAAGAAsGC	Gene <i>pmoA</i> de Metanotróficas aeróbias	500pb	HOLMES <i>et al.</i> (1995)
ANMEF 907R	GGCUCAGUAACACGUGGA CCGTCAATTCCCTTTRAGTTT	(ANME-I e ANME-II) Gene RNAr 16S de Arquéias metanotróficas anaeróbias	817pb	THOMSEN <i>et al.</i> (2001)
A189F MB601R	GGnGACTGGGACTTCTGG ACRTAGTGGTAACCTTGyAA	Gêneros <i>Methylobacter</i> e <i>Methylosarcina</i>	432pb	KOLB <i>et al.</i> (2003)

Os volumes, tais como, a concentração dos reagentes utilizados para uma reação de 50µL, foram, respectivamente: 10µL de tampão de PCR 5X contendo MgCl₂ (*Phoneutria*); 0,4µL de dNTP a 25mM cada (Fermentas); 0,5µL de cada iniciador a 30pmol/µL (Fermentas); 0,25µL de Taq Polimerase a 5U/µL (*Phoneutria*); 3µL de BSA a 5 ng/µL (*Sigma*); 32,35µL de água ultra pura estéril e 3µL de DNA à concentração em torno de 10 a 30ng/µL. Ressalta-se que, para todas as reações, um controle negativo (contendo apenas os reagentes da PCR e água ultrapura) foi utilizado.

5.5 Resultados e Discussão

Detecção de micro-organismos metanotróficos

Os resultados da PCR com diferentes primers para a detecção de metanotróficas aeróbias e anaeróbias nas diferentes amostras de lodo e sedimentos dos sistemas de tratamento de esgoto doméstico investigados estão resumidos na Tabela 5.3. Pode-se verificar que arqueias metanotróficas, ANME, foram detectadas em todas as amostras avaliadas, indicando, portanto, a presença desse grupo.

Estudos indicam uma distribuição global de ANME-1 e ANME-2, enquanto a presença de ANME-3 parece ser principalmente restrita aos ambientes aquáticos profundos, lamas vulcânicas, sendo encontrado apenas esporadicamente em outros tipos de sedimentos (KNITTEL e BOETIUS, 2009). Este último grupo ANME-3, pode ser encontrado, em sua quase totalidade, associado à *Desulfobulbus*, um gênero de bactéria sulfato redutora. A análise filogenética da OAM em sedimentos por meio do gene RNAr 16S identificou que os grupos de ANME são intimamente relacionados com as ordens *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* e *Methanomicrobiales*, que compreendem grande parte das metanogênicas cultiváveis (HINRICHS *et al.*, 1999; VALENTINE, 2002; NAUHAUS *et al.*, 2005).

Metanotróficas aeróbias foram detectadas apenas na amostra de sedimento da lagoa de polimento. A oxidação aeróbia é importante para manter as concentrações de metano em equilíbrio em sedimentos de água doce e solos, enquanto a oxidação anaeróbia é o principal processo que ocorre em condições anóxicas em sedimentos marinhos (CHISTOSERDOVA *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2012).

Os testes da PCR nas diferentes amostras não detectou a presença de metanotróficas desnitrificantes. LUESKEN *et al.* (2011a) detectou micro-organismos metanotróficos desnitrificantes em nove Estações de Tratamento de Efluentes na Holanda. As estações, no entanto, possuem como sistema de tratamento uma planta de pré-desnitrificação em combinação com um sistema de lodos ativados. Ademais, duas das estações recebiam efluentes de curtume que para o tratamento, combinavam nitrificação parcial e oxidação anaeróbia da amônia (anammox). Ressalta-se que, todas elas recebiam efluentes domésticos e industriais, com exceção de apenas uma que recebia exclusivamente efluentes industriais.

Tabela 5-3 – Resultados da detecção de metanotróficas nas amostras do CePTs/COPASA e Sistema de Lodos Ativados/COPASA

Sistemas de Tratamento de Efluentes /CePTs/COPASA	Gene <i>pmoA</i> de Metanotróficas Desnitrificante (A189BF-Cmo682R)	Gene <i>pmoA</i> de Metanotróficas Desnitrificante (Cmo182F – Cmo568R)	Gene <i>pmoA</i> de Metanotróficas aeróbias (A189F-A682R)	Gêneros <i>Methylobacter</i> e <i>Methylosarcina</i> (A198-MB601R)	Gene RNAr 16S de Arquéias metanotróficas anaeróbias (ANMEF – 907R)
Lodo de reator UASB	-	-	-	-	+
Lodo de Recirculação do Sistema de Lodos Ativados	-	-	-	-	+
Sedimento da Lagoa de Polimento	-	-	+	+	+
Sedimento de <i>wetlands</i>	-	-	-	-	+

Os símbolos (+) e (-) indicam respectivamente, resultados positivos e negativos para a detecção via PCR dos grupos acima relatados. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1% sob luz ultravioleta.

5.6 Conclusões

Micro-organismos metanotróficos foram identificados a partir de amostras de lodo e/ou sedimentos provenientes de diferentes sistemas de tratamento de esgoto doméstico. Para todas as amostras avaliadas, arqueias do grupo ANME I e II foram detectadas. Esses micro-organismos realizam a metanogênese reversa utilizando o sulfato como acceptor de elétrons. Apenas no sedimento da lagoa de polimento, verificou-se a presença de bactérias metanotróficas aeróbias. Não obstante, metanotróficas desnitrificantes do gênero *Ca. Methyloirabilis oxyfera* (relacionados ao filo NC10) não foram detectadas pelo uso dos primers empregados. Nesse sentido, uma vez que o lodo de reator UASB tratando esgoto doméstico ainda não havia sido utilizado como inóculo único (segundo revisão de literatura) para o experimento de cultivo de metanotróficas, este inóculo foi escolhido para enriquecer e selecionar microrganismos oxidadores de metano.

6 ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METANOTRÓFICA ANAERÓBIA DE LODO PROVENIENTE DE REATOR UASB

Objetivo Específico 2

6.1 *Resumo*

Nessa pesquisa, o potencial de oxidação anaeróbia do metano utilizando-se o lodo proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico foi avaliado através de sete ensaios em batelada. Os três primeiros ensaios objetivaram estabelecer as condições ótimas de cultivo e incubação de micro-organismos metanotróficos e, dessa forma, medir as taxas de consumo do metano na atmosfera vazia dos frascos quando submetido à diferentes condições, tais como agitação, adição de meio de cultura, sais de nitrito e nitrato e diferentes volumes de metano. A partir desses ensaios, as condições ótimas para a determinação da taxa de consumo de metano e atividade metanotrófica anaeróbia foram estabelecidas e mais quatro ensaios foram realizados. Nos sete ensaios, amostras de lodo de um mesmo reator UASB (escala piloto) tratando esgoto doméstico municipal, foram coletadas. Os resultados mostraram que a atividade metanotrófica foi de $240\mu\text{molCH}_4.\text{gSTV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, sugerindo que os micro-organismos metanotróficos desempenham um papel fundamental no interior dos reatores UASB, uma vez que fazem parte da microbiota que compõe a biomassa do lodo e, são capazes de consumir parte do metano gerado no interior desse reator minimizando, portanto, possíveis perdas de metano atmosférico e/ou dissolvido no efluente tratado. A comunidade bacteriana selecionada nesses ensaios em batelada foi avaliada por PCR-DGGE e duas sequências de DNA relacionadas à *Methylocystis* sp. (93% de identidade) e *Methylocaldum* sp. (98% de identidade) foram identificadas. Uma vez que o gás metano não recuperado contribui para o efeito estufa e representa perdas ambientais, investigar o potencial de oxidação anaeróbia do metano e a microbiota contida nos sistemas de tratamento de esgoto é de suma importância. A atividade metanotrófica do lodo do reator UASB avaliado foi responsável pela oxidação de 29% do metano produzido no interior do reator, representando, portanto, grande contribuição para o balanço de massa do metano no interior do sistema.

6.2 *Abstract*

In this research, the potential of anaerobic methane oxidation using the sludge from a UASB reactor was evaluated by seven batch bioassays. The first three bioassays aimed to establish the optimum conditions for growing and incubating methanotrophic microorganisms and thereby measuring methane consumption rates in headspace of the bottles when subjected to

different conditions, such as stirring, addition of culture medium, nitrite and nitrate salts and different volumes of methane. From these experiments, the optimum protocol to determine the anaerobic methane consumption rate and methanotrophic activity in UASB sludge was established and after four more tests were performed. In all the seven bioassays, sludge samples from the same UASB reactor (pilot scale) treating municipal wastewater were collected. The results showed that the methanotrophic activity was $240\mu\text{molCH}_4.\text{gVST}^{-1}.\text{day}^{-1}$, indicating that methanotrophic microorganisms play a key role within the UASB reactor, since they are part of the microbiota of the sludge and, are able to consume some of the methane produced inside the reactor. Therefore, these microorganisms can reduce possible methane losses, either atmospheric and / or dissolved in the treated effluent. The bacterial community was investigated by PCR-DGGE and two DNA sequences related to methanotrophic bacteria, *Methylocystis* sp. (93% identity) and *Methylocaldum* sp. (98% identity) were detected. Once the unrecovered methane contributes to the greenhouse effect and represents environmental losses, it is of great importance to investigate the potential of anaerobic methane oxidation and the microbiota in sewage treatment systems. The methanotrophic from the sludge of a pilot scale UASB reactor represents an anaerobic oxidation of 29% of the activity determined methane produced inside the reactor, therefore, it is a great contribution to the methane mass balance of the system.

Palavras-chave: metano, atividade metanotrófica anaeróbia, lodo de reator UASB.

Keywords: methane, anaerobic methanotrophic activity, UASB sludge.

6.3 Introdução

O metano é formado através do processo da metanogênese, que é a etapa final de fermentação da matéria orgânica. Esse processo ocorre em uma série de ambientes anóxicos como arrozais, intestinos de animais, solos, pântanos, sedimentos marinhos, sedimentos de água doce e em processos de tratamento de resíduos e efluentes como aterros sanitários e sistemas anaeróbios tratando esgotos domésticos ou efluentes industriais (REEBURGH, 2007; KNITTEL e BOETIUS, 2009).

Segundo dados do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas - IPCC (2007), a maior parte do CH_4 existente hoje é advindo de atividades antrópicas, como a agricultura, utilização de combustíveis fósseis e digestão de resíduos. Quando comparada à era pré-industrial, observou-se que as concentrações desse gás aumentaram 157% desde o ano de 1750.

Atualmente, estima-se uma taxa global de metano de 500 a 600 Tg de CH₄ ano⁻¹ (CONRAD, 2009). Acredita-se que os processos microbianos contribuam com aproximadamente 70% da produção do gás. No que se refere ao consumo de metano, estima-se que a oxidação biológica seja responsável pelo consumo de 60% do metano que é liberado para o ambiente (REEBURGH, 2007; BORREL *et al.*, 2011). No Brasil, de acordo com o IPCC, estima-se anualmente a emissão em cerca de 50 Gg de CH₄ proveniente de sistemas de tratamento de efluentes anaeróbios (SALOMON e LORA, 2009; LOBATO, 2011).

Em sistemas de tratamento de efluentes domésticos, tais como os Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e Manta de lodo (UASB, do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), o biogás gerado, através do fluxo ascendente é direcionado e coletado no separador trifásico instalado na parte superior do reator. No entanto, devido às propriedades relacionadas à solubilidade dos gases no efluente, uma parcela significativa dos gases gerados no tratamento de efluentes pode permanecer dissolvida na fase líquida, o que acarreta, portanto, em seu despejo com o efluente tratado (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994; NOYOLA *et al.*, 2006; SOUZA, 2010).

Uma vez que o metano dissolvido também pode contribuir para o efeito estufa, é necessário avaliar quanto de metano pode estar sendo despreendido com o efluente final. SOUZA (2010), ao medir a concentração de metano dissolvido em efluentes de reatores UASB tratando esgoto doméstico, em escalas piloto, demonstração e real, obteve concentrações variando de 17 a 22 mg.L⁻¹. Adicionalmente, medições efetuadas por SOUZA e CHERNICHARO (2011) indicaram que, de todo o metano produzido em reatores UASB tratando esgotos domésticos, a parcela dissolvida no efluente variou de 36 a 40%.

A perda de metano dissolvido seja no efluente ou no gás residual também representa uma perda do potencial de energia e, portanto, métodos para reduzir essas perdas são de grande valia. Nesse sentido, CAKIR e STENSTROM (2005) sugerem que uma nova possibilidade para a remoção do metano dissolvido no efluente anaeróbio seria um pós tratamento realizado por micro-organismos, que poderiam, portanto, oxidar biologicamente o gás metano.

A oxidação biológica pode ocorrer sob condições aeróbias ou anaeróbias e é realizada por um grupo de micro-organismos denominados metanotróficos. A oxidação aeróbia é realizada por bactérias metanotróficas ao passo que a oxidação anaeróbia pode ser feita tanto por bactérias

anaeróbias (associadas à desnitrificação) como arqueias (Arqueias Anaeróbias Metanotróficas, do inglês, *Anaerobic Methanotrophic Archaea* - ANME).

Esses micro-organismos, apresentam um potencial de oxidação do metano praticamente inexplorado. Poucos trabalhos investigaram a oxidação do metano até o momento, principalmente, quando o foco não são ambientes naturais como sedimentos de lagos de água doce e/ou marinhos. MEULEPAS *et al.* (2010) avaliaram a oxidação do metano em uma amostra composta de lodo granular proveniente de três reatores UASB tratando efluentes industriais provenientes de indústria de papel, destilaria e um reator sulfato redutor alimentado com etanol. A amostra composta apresentou taxa de oxidação de $11,4 \mu\text{mol de CH}_4 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. HO *et al.* (2013), também avaliou o papel da oxidação do metano em amostras de lodo advindas de diferentes ETEs. As amostras de lodo foram provenientes de um sistema de lodos ativados, digestores de lodo e de um sistema biológico autotrófico limitado em oxigênio que permite a nitrificação/desnitrificação e utilizado para tratar águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio. Esse reator foi nomeado OLAND (do inglês - *Oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification*) e contém uma comunidade micro-organismos aeróbios e anaeróbios oxidadores de amônia. O maior potencial de oxidação pôde ser verificado no lodo oriundo do sistema de lodos ativados, que apresentou taxa de oxidação de $160,32 (\pm 17,79) \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{gSSV}^{-1}$. Os outros sistemas apresentaram resultados bem inferiores ao obtido pelo lodo proveniente do sistema de lodos ativados. De qualquer forma, pouco pode-se atribuir diante dos valores acima apresentados, uma vez que poucos trabalhos foram realizados. Ressalta-se também que não foram encontrados trabalhos que investiguem o potencial de oxidação do metano em reatores UASB tratando domésticos.

O estudo da atividade metanotrófica e/ou potencial de oxidação biológica do metano no lodo proveniente de reatores UASB é relevante, uma vez que poderá auxiliar na determinação da quantidade de metano que é consumida via oxidação biológica nesses reatores possibilitando determinar o balanço entre produção e consumo de metano no interior desses sistemas.

Nesse sentido, esse trabalho teve dois objetivos, que foram: padronizar e estabelecer condições ótimas para determinação da taxa de consumo de metano a partir do procedimento operacional padrão elaborado por GARCIA e ARAÚJO (2011) e aplicá-las na investigação da atividade metanotrófica anaeróbia em lodo proveniente de reator UASB (em escala piloto) tratando esgoto doméstico.

6.4 Material e Métodos

6.4.1 Ensaios do Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano

Para avaliar o potencial de oxidação anaeróbia do metano (POAnM) em amostras de lodo de UASB, experimentos em batelada, utilizando-se frascos de antibióticos de 110 mL foram realizados.

Como referência para a condução dos ensaios, utilizou-se o Procedimento Operacional Padrão da Rede PROSAB Microbiologia (GARCIA e ARAÚJO, 2011). Entretanto, alguns parâmetros foram adaptados ao longo de três ensaios realizados previamente a fim de se estabelecer condições ótimas, de forma a potencializar a atividade microbológica.

A análise de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) do lodo utilizado como inóculo seguiu a metodologia do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). As análises foram realizadas em triplicata e considerou-se como resultado final a média entre as triplicatas.

A tabela 6.1 apresenta a estruturação, de forma resumida, dos ensaios de PoAnM. Os ensaios de 1 a 3 foram realizados para a padronização das condições experimentais, e, a partir da padronização, outros quatro ensaios foram realizados para determinação do potencial de oxidação anaeróbia do metano.

Tabela 6-1 - Condições gerais dos ensaios de POAnM I a III

Ensaios	Amostras	Agitação (250 rpm)	Meio de Cultura (Luesken <i>et al.</i> , 2011)	Nitrito (NO ₂ ⁻)	Nitrato (NO ₃ ⁻)	Nitrito (NO ₂ ⁻) e Nitrato (NO ₃ ⁻)	Volume de metano no <i>headspace</i> (mL)
Ensaio I			-				
	Lavado c/agit ^a	+	-	-	-	-	20
	Lavado s/agit ^a	-	-	-	-	-	20
	UASB ^b	+	-	-	-	-	20
	Autoclavado	+	-	-	-	-	20
Ensaio II	Lodo + Sais	+	+	-	-	-	20
	Lodo + Sais + Nitrito	+	+	+	-	-	20
	Lodo + Sais + Nitrato	+	+	-	+	-	20
	Autoclavado	+	+	-	-	-	20
Ensaio III	Lodo + Meio + N ^c + 10mL CH ₄	+	+	-	-	+	10
	Lodo + Meio + N ^c + 20mL CH ₄	+	+	-	-	+	20
	Lodo + Meio +N ^c + 40mL CH ₄	+	+	-	-	+	40
	Autoclavado	+	+	-	-	+	20

Os sinais + e - indicam a presença e ausência respectivamente das condições acima apresentadas.

^a Lavado c/agit: Indica a condição de lodo de reator UASB coletado, lavado uma vez com PBS 1X e acondicionado em agitador orbital a 250 rpm. Ao passo que lavado s/agit, indica o lodo de reator UASB também lavado com PBS mas mantido em estufa sem condições de agitação dos frascos.

^b UASB: Indica que o lodo de UASB coletado foi utilizado em suas condições naturais, ou seja, na ausência da etapa de lavagem com o tampão PBS.

^c Lodo + Sais + N – Indica que o lodo de UASB lavado 1X com tampão PBS foi acondicionado com meio de cultura e nitrito e nitrato. O N indica a presença dos dois compostos, nitrito e nitrato nos frascos.

6.4.2 Padronização das condições experimentais para a determinação do Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano

6.4.2.1 Ensaio de Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano I - POAnM I

O ensaio I objetivou comparar as condições de lodo de UASB previamente lavado com tampão fosfato salino (PBS 1X: 120mM de Na₂HPO₄; pH 8,0), a fim de retirar matéria orgânica presente no líquido intersticial do lodo e, conseqüentemente minimizar a atividade metanogênica no interior dos frascos, com as condições reais do lodo quando coletado do reator, ou seja, amostras de lodo de UASB não lavadas.

Para este experimento, 20 mL de *pellet* do lodo centrifugado previamente durante 10 minutos a 4000 rpm foram introduzidos em frascos de antibiótico de 110 mL autoclavados.

Todos os ensaios foram realizados em triplicada e utilizaram amostras de lodo autoclavado como controle para garantir que havia decaimento de metano no headspace dos frascos e não ocorriam perdas pelo batoque de borracha.

6.4.2.2 Ensaio de Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano II - POAnM II

A partir dos resultados do ensaio POAnM I, estabeleceu-se trabalhar com a condição de lodo previamente lavado, uma vez que a condição de lodo lavado reduziu a atividade metanogênica do lodo. Além disso, como o ensaio 1 não continha meio de cultura adicionado, a carga de sólidos foi superior aos demais ensaios, uma vez que utilizou-se 20mL de *pellet* (provenientes de um volume de cerca de 70mL de lodo por amostra).

Nesse ensaio, utilizou-se o meio de cultura descrito por LUESKEN *et al.* (2011a). Além desse meio, foram utilizados sais de nitrito ou nitrato em concentração de 25mg.L⁻¹ para nitrato e 100mg.L⁻¹ para nitrito.

Para este 2º ensaio, 20mL de lodo foram centrifugados e o *pellet* foi utilizado sendo acrescentado do meio de cultura descrito por LUESKEN *et al.* (2011a), completando um volume de 20mL de líquido no interior dos frascos. Nitrito e nitrato foram testados nas concentrações acima determinadas separadamente a fim de verificar o seu potencial em elevar a taxa de oxidação do metano pelo uso desses aceptores de elétrons, uma vez que micro-organismos metanotróficos podem utilizar tais compostos.

6.4.2.3 Ensaio de Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano III - POAnM III

O terceiro ensaio reuniu as condições ótimas para a oxidação do metano dos ensaios anteriores (I e II), além de avaliar diferentes volumes de metano na atmosfera de 90mL dos frascos. As condições são apresentadas a seguir:

- ❑ Utilização do lodo de UASB previamente lavado a uma concentração de STV=5g.L⁻¹. De acordo com CHERNICHARO (2007), recomenda-se uma faixa de STV de 2 a 5g.L⁻¹ para o teste de Atividade Metanogênica (AME).
- ❑ Meio de cultura contendo nitrito e nitrato, uma vez que existem micro-organismos que possuem maior afinidade para o nitrito ao nitrato (metanotróficas desnitrificantes) e, outros, o nitrato ao nitrito (arqueias metanotróficas) como aceptores de elétrons.
- ❑ Adição de diferentes volumes de metano na atmosfera dos frascos, sendo os volumes igual a 10, 20 e 40 mL de CH₄, o que representou, respectivamente, atmosfera de 11%, 22% e 44% de metano no interior dos frascos.

6.4.3 Metodologia analítica para análise do decaimento de metano através da cromatografia gasosa

Após a alimentação com lodo e meio de cultura, os frascos de antibióticos de 110mL foram vedados com batoques de borracha (butila) e lacres de alumínio. Posteriormente, para o estabelecimento de condições anaeróbias no interior dos frascos, a atmosfera de cada frasco foi “lavada” com gás inerte (N_2 - 99,9%), através da introdução de uma agulha de entrada de gás e outra de saída no meio do batoque de borracha, durante 2 minutos. Os frascos foram incubados a 30°C em agitadora orbital a 250 rpm.

Em cada frasco, adicionou-se 20 mL de metano (99,9%), ou seja, atmosfera de 22%, por meio de uma seringa esmerilhada de vidro. Entretanto, destaca-se que a adição do gás ocorreu apenas no instante em que se observou, através das coletas de biogás e análises cromatográficas, o declínio constante do volume de metano no headspace, o que possivelmente, poderia indicar o fim e/ou redução da atividade metanogênica. Apenas a partir da injeção de metano, os resultados dessas amostras serão apresentados nesse trabalho.

Realizou-se amostragem de 1 mL de gás contido no *headspace* duas vezes por semana a fim de verificar a queda da porcentagem de metano nos ensaios. O gás coletado foi injetado em cromatógrafo gasoso (Perkin Helmer Auto System equipado com detector de condutividade térmica - TCD).

As análises cromatográficas ocorreram utilizando-se o gás He como gás de arraste e temperatura da coluna em 220 graus. Cada corrida teve o tempo de duração total de 4,5 minutos, sendo que o tempo de retenção do metano ocorreu por volta de 2,75 min.

Para análise, injetou-se, três vezes o gás padrão para cálculo da média da área do pico de metano. O gás padrão é uma mistura gasosa composta por 47,1% de CH_4 , 25% de CO_2 , 2% de H_2 , 5% de CO e 20,9% de N_2 . Após três injeções de gás padrão, calcula-se a média da área do pico de metano obtido nas três leituras. Dessa forma, tem-se, portanto, um pico de metano cuja área é conhecida e nesta sabe-se que a porcentagem de metano é de 47,1%.

Assim, comparam-se as áreas obtidas multiplicando-se o valor da área (obtida do frasco do ensaio) por 47,1, correspondente ao padrão conhecido. Após a multiplicação, o resultado é dividido pelo valor obtido da área do pico do gás padrão, resultando, portanto, na porcentagem de metano presente em 1 mL. Em seguida, multiplica-se a porcentagem de

metano encontrada pelo volume do *headspace* do frasco do ensaio para posterior obtenção do volume de metano presente no espaço vazio dos frascos (GARCIA e ARAÚJO, 2011).

6.4.4 Estudo da dinâmica microbiana por PCR-DGGE

Amostras de lodo utilizados como inóculo do ensaio PoAnM 6, foram coletadas juntamente com a biomassa contida nos frascos ao final do experimento (após 35 dias de incubação). Esse ensaio foi selecionado para investigação da comunidade microbiana, uma vez que apresentou a maior taxa de oxidação de metano quando comparado aos outros ensaios. Para análise microbiológica, o DNA foi extraído segundo método de EGLI *et al.* (2003) e amplificado por meio da PCR com os primers 1055F (5'ATGGCTGTCGTCAGCT 3') e 1392R-GC (5'ACGGGCGGTGTGTAC 3'), para a região V8 do RNAr 16S do domínio Bacteria (FERRIS *et al.*, 1996). Para confirmar a presença dos amplicons, 2µl de cada foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, com solução de GelRed (*Biotium*), tampão 10x (*Phonutria*) e marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder (Invitrogen)*, como padrão de referência para a quantificação do DNA. O programa *ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, <http://imagej.nih.gov/ij/>)* foi utilizado para análise da fotografia do gel e para estimar a quantidade de DNA presente.

Os amplicons contendo 400 ng de DNA das amostras do inóculo e final do ensaio de oxidação foram submetidos à eletroforese a 60°C em TAE 0,5, durante 17 horas a 80V em um aparato *Bio-Rad DCode Universal Mutation Detection System (Hercules, CA, USA)*, utilizando-se um gel de poliacrilamida a 8% e um gradiente desnaturante de 45 a 75%. Os géis corados com solução de *Sybr-Gold (Life Technologies)* por 30 minutos foram visualizados sob luz ultravioleta e as bandas contidas, excisadas dos géis e eluídas em 50µL de TE permanecendo a 4°C por 48 horas. O DNA eluído foi reamplificado com os iniciadores 1055-1392 (sem o grampo GC). Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento unidirecional (primer 1055F) na empresa MacroGen Inc (Coréia do Sul) por um sequenciador 3730XL. A partir da sequência direta obtida (*forward*), a sequência reversa (*reverse complement*) foi também obtida através do programa *Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html)* (STOTHARD, 2000). As sequências diretas e reservas (*forward* e *reverse*) foram alinhadas através do programa FASTA (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=select&pgm=fad), Universidade da Virgínia, EUA. As sequências alinhadas foram utilizadas para comparação através das bases de dados *Ribosomal Database Project* através do programa *RDP Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)* e do NCBI (*National Center of*

Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

6.5 Resultados e Discussão

6.5.1 Padronização das condições experimentais para os ensaios de PoAnM (Ensaio 1 a 3)

6.5.1.1 Ensaio de Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano 1 – POAnM I

Durante o ensaio 1, avaliou-se as condições experimentais da utilização para os ensaios de lodo lavado com solução tampão (PBS 1X) e lodo não lavado. Além disso, a condição de manutenção das amostras sob agitação e na ausência de agitação também foram avaliadas. Os resultados de cada condição experimental estão apresentados na figura 6.1, sendo designado como (a) para o lodo lavado sob condições de agitação, (b) lodo não lavado (designado apenas como UASB) e (c), o lodo lavado incubado na ausência de condição de agitação (lavado s/agit).

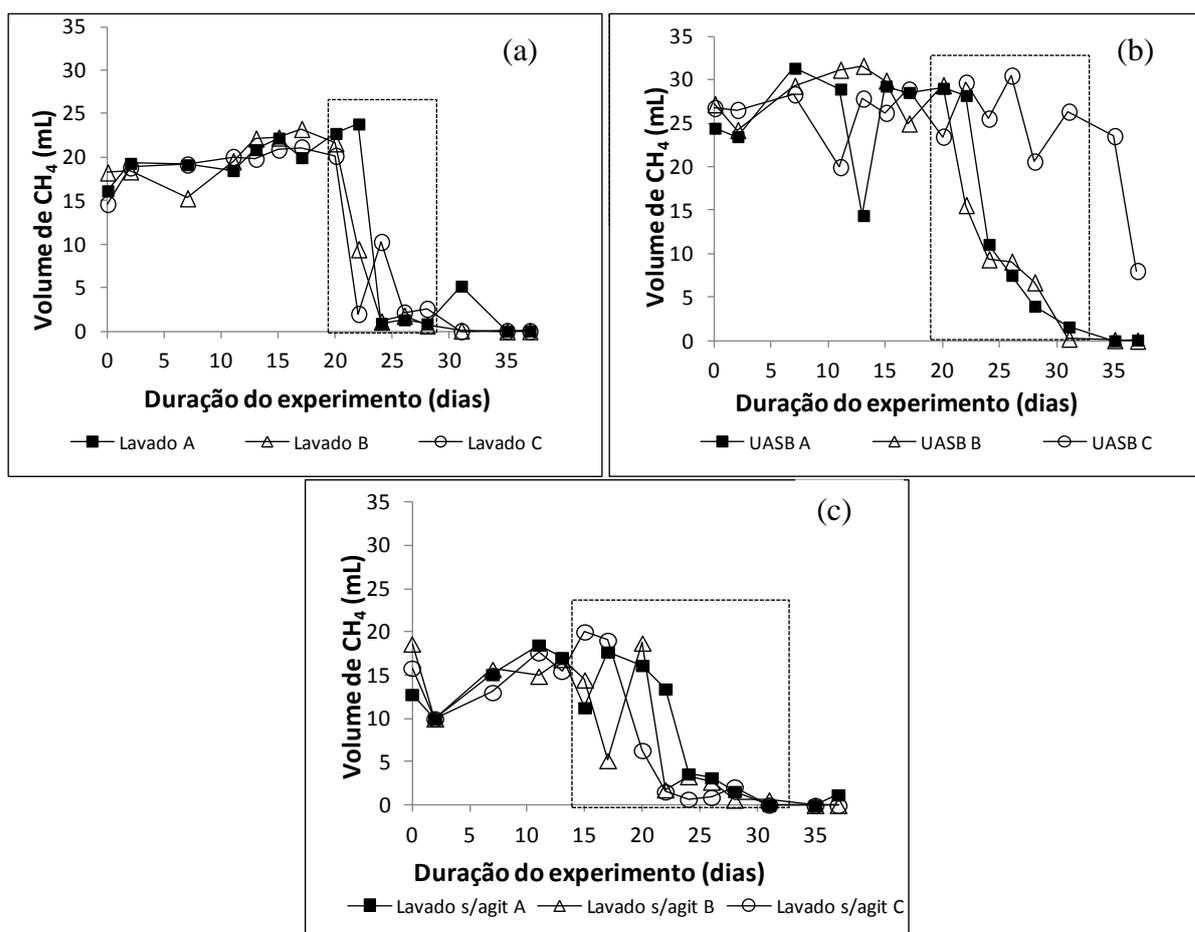


Figura 6-1 - Volume de metano medido durante o ensaio para determinar o volume de metano consumido

- (a) Lodo de UASB lavado mantido sob condições de agitação;
- (b) Lodo de UASB não lavado sob condições de agitação;

(c) Lodo de UASB lavado mantido na ausência de agitação.

Os valores apresentados na figura representam os testes de cada unicata.

A faixa de dados selecionada representa os pontos utilizados para cálculo da taxa de decaimento do volume de metano

A área selecionada no gráfico corresponde aos dados experimentais que foram utilizados para a construção de novos gráficos, os quais representaram os pontos de decaimento de metano. Cada gráfico proveniente da triplicata do ensaio foi construído individualmente para que um ajuste polinomial de 2ª ordem fosse realizado para cada unicata do ensaio (dados suplementares no apêndice 12.1). A partir do ajuste polinomial, gerou-se um valor de R^2 (coeficiente de determinação) elevado (próximo a 1) demonstrando que, o modelo matemático escolhido, é um modelo que, estatisticamente, consegue explicar a maioria dos valores observados e que, portanto, se ajusta bem aos ensaios. Em continuidade, calculou-se a taxa de metano consumida em cada ponto, pela derivada obtida a partir da equação do gráfico. Assim, em cada ponto, pode-se obter o valor de decaimento de metano ao longo do experimento. Os dados foram analisados através da estatística descritiva e, os valores adotados como taxa de consumo de metano são os apresentados pela mediana dos dados (tabela 6.2).

Pela visualização gráfica (figura 6.1), pode-se observar que o decaimento no lodo lavado e lodo não lavado nas triplicatas ocorreu, principalmente, próximo do dia 20. Ressalta-se que os gráficos aqui apresentados já incluem a adição de metano (99,9%) representado como o dia 0 nos ensaios. As condições de lodo lavado e não lavado (UASB) apresentam valores de mediana muito próximos (3,7 e 3,4 para o lodo lavado e lodo de UASB, respectivamente). Dessa forma, a condição de lodo lavado com PBS 1X foi determinada e utilizada nos ensaios seguintes. Além disso, essa condição visa diminuir a metanogênese e lavando-se e centrifugando-se o lodo, a concentração de sólidos orgânicos em suspensão provavelmente pôde ser reduzida, o que, possivelmente, diminuiu o tempo da atividade metanogênica do lodo. Pela comparação entre os gráficos 6.1(a), 6.1(b) e 6.1(c), o volume de metano (mL) do lodo de UASB não lavado é visualmente superior ao lodo lavado, o que indica que a atividade metanogênica desse lodo permaneceu superior uma vez que o lodo não foi lavado. A taxa de decaimento de metano no lodo lavado sem agitação apresentou valor da mediana igual a 2,2, sendo, portanto, inferior ao lodo lavado mantido sob agitação. Assim sendo, essa condição não foi adotada nos ensaios posteriores.

6.5.1.2 Ensaio de Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano 2 – POAnM II

Para o ensaio de PoAnM II, partiu-se da condição de lodo lavado, determinada a partir do ensaio anterior. Nesse ensaio, as condições de lodo com sais (meio de cultura) acrescido de

nitrito ou nitrato foram avaliadas. O período entre os dias 12 e 25 foram selecionados para estudo do consumo de CH_4 no interior dos frascos, uma vez que apresentaram um número maior de pontos em decaimento para cada unicata. Para o lodo acrescido de sais, a faixa selecionada correspondeu aos dias entre 13 e 26. Nesse caso, embora as triplicatas tenham apresentado valores diferentes, o comportamento do experimento foi aparentemente semelhante, uma vez que os pontos selecionados para cada unicata apresentou-se em decaimento conforme observado na figura 6.2(a). A figura 6.2 (b) demonstra o resultado do lodo contendo além dos sais, a presença do nitrito como acceptor de elétrons. A faixa de dias selecionadas também foi próxima do dia 13 ao 26. Entretanto, os resultados das triplicatas, assim como visualizado nos ensaios de lodo contendo sais e nitrato (figura 6.2c), demonstrou resultados muito distintos entre os frascos apresentando maiores volumes de decaimento de metano. Para a condição de lodo com a presença de sais mais nitrato como fonte de nitrogênio, figura 6.2(c), os pontos de decaimento, também ocorreram entre os dias 13 e 26. A figura 6.2 apresenta os resultados para cada condição descrita.

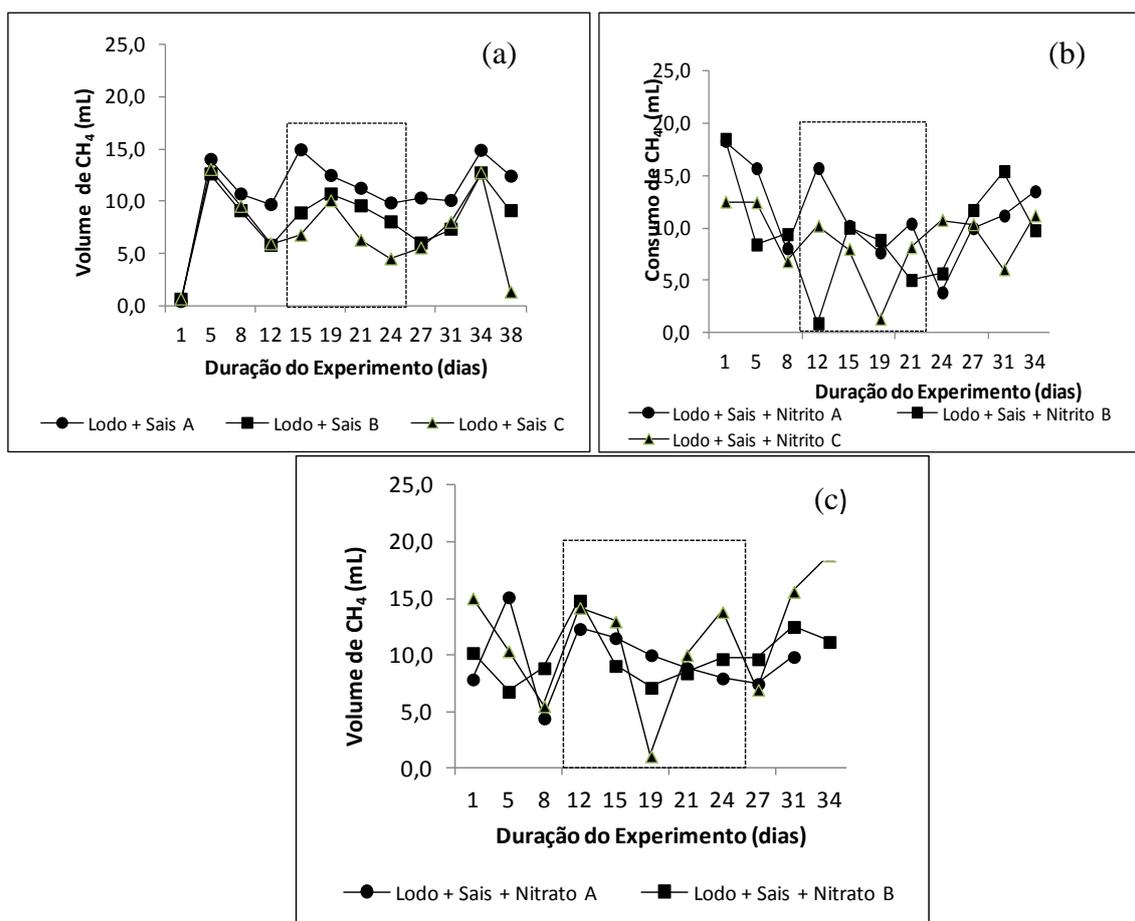


Figura 6-2 - Volume de metano medido durante o ensaio para determinar o volume de metano consumido

- (a) Lodo de UASB lavado com a adição de sais;
- (b) Lodo de UASB lavado com a adição de sais e nitrito;
- (c) Lodo de UASB lavado com a adição de sais e nitrato.

O ensaio de POAnM II, comparado ao I, apresentou valores de taxa de consumo de metano inferiores. Entre as condições do ensaio, entretanto, os valores foram próximos, tendo-se obtido um maior valor para a condição de lodo na presença de meio de cultura e nitrito. Embora os valores tenham sido baixos, apenas um teste com tal condição foi realizada e ainda que tenha apresentado taxa de consumo inferior ao ensaio 1, a condição de lodo lavado na presença de sais de nitrito e nitrato foi selecionada para favorecer o crescimento de metanotróficas. Quando apenas as condições do teste 2 são comparadas entre si, a condição de lodo contendo nitrito é que apresentou maior taxa de consumo de metano. De acordo com HU *et al.* (2009) e ETTWIG *et al.* (2009), a presença de nitrito poderá favorecer o enriquecimento de metanotróficas desnitrificantes. ETTWIG (2010), em seu trabalho, enriqueceu microorganismos N-DAMO utilizando-se nitrito e nitrato em conjunto, a partir de lodo de digestores, lodo de retorno de sistema de lodos ativados e sedimentos de água doce. De acordo com HU *et al.* (2009), a presença de nitrato pode ser preferencialmente requerida por arqueias metanotróficas, o que também poderia favorecer a sua presença nos frascos. Ressalta-se que, arqueias do grupo ANME I e II foram detectados nesse lodo em pesquisa anterior. Nesse sentido, esse grupo pode estar utilizando, portanto, o nitrato como acceptor de elétrons na oxidação biológica do metano.

6.5.1.3 Ensaio de Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano 3 – POAnM III

O ensaio de POAnM III, avaliou diferentes volumes de metano adicionados na atmosfera dos frascos. Os volumes testados foram 10mL, 20mL e 40mL de CH₄. Além disso, estabeleceu-se uma concentração de sólidos de 5g.L⁻¹. Para os testes de Atividade Metanogênica Específica (AME), que estuda a capacidade máxima de produção de metano em lodos anaeróbios, CHERNICHARO (2007), recomenda uma concentração de STV entre 2,0 a 5g.L⁻¹ no lodo de inóculo. Os resultados do ensaio III estão elucidados na figura 6.3. A figura 6.3 (a) representa a triplicata contendo 10mL de metano, ao passo que a figura 6.3 (b) e 6.3 (c) representam, respectivamente, as triplicatas com 20mL e 40mL de CH₄.

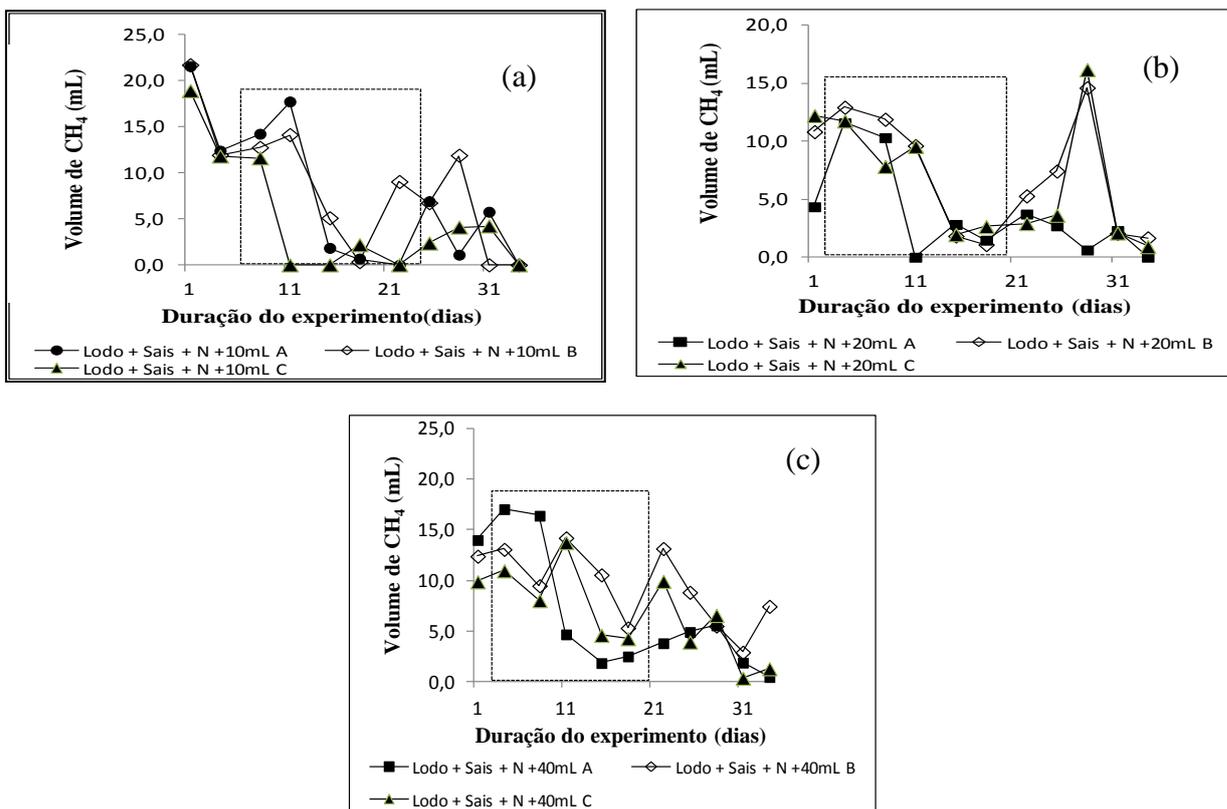


Figura 6-3 - Volume de metano medido durante o ensaio para determinar o volume de metano consumido pelas metanotróficas

(a) Lodo contendo sais, nitrito e nitrato e 10mL de metano;

(b) Lodo contendo sais, nitrito e nitrato e 20mL de metano;

(c) Lodo contendo sais, nitrito e nitrato e 40mL de metano;

Os valores apresentados na figura representam os testes de cada unicata.

Para o cálculo da atividade metanotrófica específica, o valor obtido pela mediana da taxa de consumo de metano foi dividido pela biomassa de sólidos presente no lodo dos ensaios, dada em grama de STV. Os valores da atividade metanotrófica estão resumidos na tabela 6.2 abaixo.

Tabela 6-2 - Mediana da taxa de consumo de metano e Atividade Metanotrófica das amostras (Ensaio I a III)

Amostra		g.STV (biomassa)	Atividade Metanotrófica (mL.CH ₄ /g.STV.dia ⁻¹)
Ensaio I	Lavado c/agit	0,43	8,6
	Lavado s/agit	0,43	5,1
	Não lavado c/agit	0,43	7,9
Ensaio II	Lodo + Sais	0,17	2,9
	Lodo + Sais + Nitrito	0,17	4,7
	Lodo + Sais + Nitrato	0,17	2,3
Ensaio III	Lodo + Sais + N+ 10mL CH ₄	0,1	5,0
	Lodo + Sais + N+ 20mL CH ₄	0,1	7,0
	Lodo + Sais + N+ 40mL CH ₄	0,1	9,0

*Os cálculos da taxa de consumo estão detalhados na metodologia.

A partir da análise da tabela é possível verificar que, para o ensaio I, a amostra de lodo lavado em condições de agitação a 250rpm apresentou uma maior taxa de consumo de metano comparando-o às demais condições. Entretanto, é necessário esclarecer que, como o ensaio I foi o primeiro ensaio, algumas variáveis não estavam estabelecidas. Sendo assim, o volume de lodo utilizado foi 3,5 vezes superior ao volume dos demais ensaios, pois utilizou-se 20mL de *pellet* e não, 20mL de lodo (como nos demais ensaios) que foram centrifugados e acrescidos de meio de cultura. Dessa forma, a biomassa no primeiro ensaio é superior à dos demais ensaios, o que justifica sua maior atividade.

Quando compara-se os resultados dos ensaios II e III, observa-se que a condição lodo acrescido de sais mais nitrito e nitrato e 40 mL de CH₄ (ensaio III) é a que apresenta maior taxa de oxidação do metano. Entretanto, embora a taxa mais elevada de consumo de metano tenha ocorrido quando 40mL de metano foram adicionados ao *headspace*, a utilização de 20mL de metano será preservada, uma vez que tal condição já havia sido utilizada nos outros ensaios e esse volume de CH₄ representa cerca de 22% da atmosfera dos frascos de metano. Em trabalho anterior realizado por ETTWIG (2010) para medir o consumo simultâneo de nitrito e nitrato por metanotróficas desnitrificantes, cerca de 20% de metano foi adicionado aos ensaios. Nesse sentido, a condição usada no presente estudo (20mL de metano) é a que mais se aproxima daquela descrita na literatura supracitada.

Embora exista uma fragilidade do teste, uma vez que o consumo de metano ocorre de forma simultânea com a metanogênese, ainda que esta última já esteja presente em taxa reduzida, pode-se sugerir que os resultados do teste são reprodutíveis.

A partir dos resultados dos ensaios I a III, selecionaram-se as condições ótimas a serem utilizadas nesses ensaios e em ensaios futuros, sendo, portanto:

- meio de cultura (ETTWIG *et al.*, 2011) + Nitrito e Nitrato;
- temperatura: 30 °C;
- agitação a 250 rpm;
- volume de metano = 20 mL;
- Atmosfera dos frascos de 90mL
- STV=5g.L⁻¹ para lodo de UASB;

Determinação da atividade metanotrófica em lodo de UASB (Ensaio IV a VII).

A partir das condições previamente padronizadas nos ensaios anteriores, calculou-se a atividade metanotrófica para as amostras de lodo proveniente de reator UASB como inóculo. A partir dessa determinação, estimou-se o consumo de metano que deve ocorrer no interior de um reator UASB a partir de uma nova coleta, conhecendo-se as características do lodo.

Os ensaios também foram realizados em triplicata, e, como os valores das mesmas não foram similares entre si, valores da mediana foram usados, uma vez que a mediana é uma medida de tendência central mais robusta que a média e não afetada por observações atípicas a partir de um conjunto de dados.

Para o cálculo da taxa de decaimento de metano, gráficos de dispersão foram plotados e realizou-se o ajuste matemático polinomial, conforme já descrito nos ensaios I a III. A figura 6.4 representa os ensaios IV a VII.

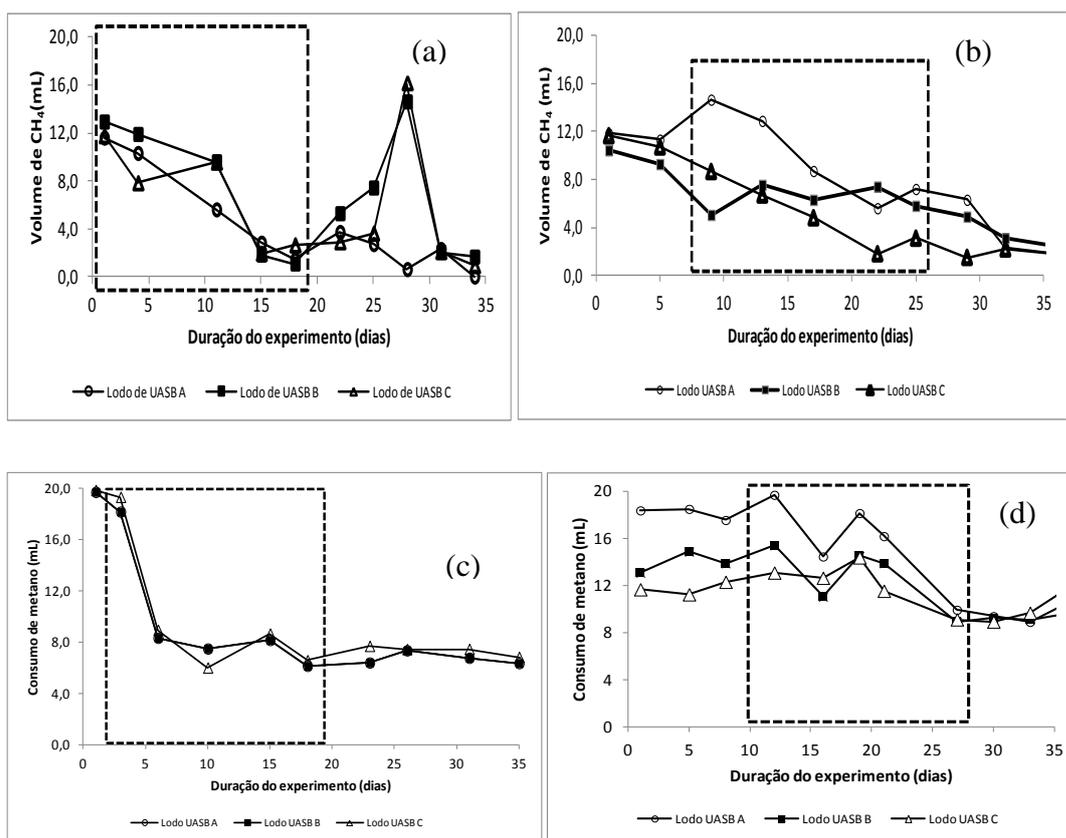


Figura 6-4 - Volume de metano consumido nos ensaios com lodo de UASB

- (a) Potencial de oxidação anaeróbia – ensaio IV
- (b) Potencial de oxidação anaeróbia – ensaio V
- (c) Potencial de oxidação anaeróbia – ensaio VI
- (d) Potencial de oxidação anaeróbia – ensaio VII

As medidas de tendência central e percentis foram calculadas para cada ensaio (Tabela 6.3).

Tabela 6-3 - Estatística Descritiva dos ensaios IV a VII de Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano a partir de lodo de UASB

Estatística Descritiva/Ensaio	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7
Média Aritmética	0,6	0,8	0,7	0,5
Média geométrica	0,6	0,5	0,6	0,4
Mínimo	0,1	0,0	0,1	0,1
Percentil 10%	0,3	0,1	0,3	0,2
Percentil 25%	0,6	0,3	0,5	0,3
Mediana	0,6	0,6	0,7	0,5
Percentil 75%	0,7	1,5	0,9	0,6
Percentil 90%	1,0	1,5	1,0	0,8
Máximo	1,4	1,5	1,1	1,0

A tabela 6.4 mostra os valores da mediana de metano consumido por dia. Os valores da taxa de consumo de metano foram: 0,6mL.CH₄.dia⁻¹ (para os ensaios IV e V), 0,7 mL.CH₄.dia⁻¹ (para o ensaio VI) e 0,5mL.CH₄.dia⁻¹ (para o ensaio VII). Observou-se, portanto, uma taxa de consumo de metano próxima para todas as repetições dos ensaios (de 0,5 a 0,7 mL.CH₄.dia⁻¹), confirmando a hipótese de que, ainda que existam limitações do teste (como a metanogênese), os resultados foram reprodutíveis em diferentes eventos (com diferentes amostras de lodo de UASB retiradas do mesmo reator).

A atividade metanotrófica para as amostras de lodo de UASB foi calculada e é apresentada na Tabela 6.4.

Tabela 6-4 - Mediana da taxa de consumo de metano e Atividade Metanotrófica das amostras de lodo de UASB

Amostra	Taxa de consumo CH ₄ (mLCH ₄)	STV (g.L ⁻¹)	Volume (mL)	g.STV (biomassa)	Atividade Metanotrófica (mLCH ₄ /gSTV.dia ⁻¹)
Ensaio 4	0,6	5	20	0,1	6
Ensaio 5	0,6	5	20	0,1	6
Ensaio 6	0,7	5	20	0,1	7
Ensaio 7	0,5	5	20	0,1	5

6.5.2 Estimativa da contribuição da atividade metanotrófica anaeróbia para o balanço de CH₄

Verificou-se que a atividade metanotrófica do lodo de UASB deve ser levada em consideração, uma vez que faz parte do balanço de metano do reator. Uma vez que a atividade metanotrófica por parte do lodo foi de 6mLCH₄.gSTV⁻¹.dia⁻¹ (240µmolCH₄.gSTV⁻¹.dia⁻¹), então, considerando-se que o reator apresentou uma média de 3709,32g.STV no referido período e que produziu cerca de 76,4L.dia⁻¹ de metano (a média da produção total do biogás é

de 112,7 L.dia⁻¹) (MELO³, 2015), a partir de DQO afluente média de 908,7mg.L⁻¹, estima-se que o consumo teórico de metano a partir da biomassa contida no lodo do reator UASB seja de 22L.dia⁻¹ de CH₄. Dessa forma, a atividade metanotrófica seria responsável pelo consumo de cerca de 29% do metano produzido no interior do reator contribuindo de forma considerável no balanço entre produção e consumo nesses sistemas de tratamento, minimizando perdas ambientais em decorrência da emissão de metano.

De acordo com MELO³ (2015), estima-se que a concentração de metano dissolvido no reator UASB utilizado como referência e ponto de coleta nesse trabalho seja de 20mg.L⁻¹. Assim, considerando-se a atividade metanotrófica de 6mLCH₄.gSTV⁻¹.dia⁻¹ e convertendo-se esses valores para carga, tem-se que a atividade é correspondente à 4,3mgCH₄.g.STV⁻¹.dia⁻¹. Dessa forma, considerando-se a vazão do UASB que corresponde à 1200L.dia⁻¹ e a concentração de metano dissolvido efluente de 20mg.L⁻¹, tem-se que a carga de metano dissolvido corresponde à 24.000mgCH₄.dia⁻¹. Assim, a massa de metanotróficas necessária para oxidar o CH₄ seria de 5,6Kg de STV. Para se obter uma massa correspondente à citada, considerando-se uma concentração de sólidos de no mínimo 30g.L⁻¹ do reator, seria necessário um reator de volume igual a 186L, ou ainda, um compartimento do reator que possibilitasse o enriquecimento desses micro-organismos *in loco* com esse volume total. A oxidação do metano dissolvido no reator ou em um compartimento desse seria uma forma de pós tratamento do efluente reduzindo-se as perdas do metano dissolvido e impacto ambiental pelo despreendimento do gás quando o efluente é lançado em corpos d'água receptores.

Ao se tratar de reatores de menor escala, como o acima citado, essa possibilidade se torna interessante do ponto de vista ambiental e econômico. Entretanto, é válido ressaltar que em se tratando de grande escala, o metano dissolvido representaria perda energética, uma vez que o metano poderia ser utilizado para geração de eletricidade na própria estação de tratamento ou ainda para uso local e/ou junto à concessionária (LOBATO, 2011). Em reatores anaeróbios, estima-se que a composição de metano seja de 60-85%. O potencial energético está relacionado à quantidade de metano contida na composição do biogás. O poder calorífico do metano é 35,9 MJ.Nm⁻³ e o do biogás com 60% de metano é 21,5 MJ.Nm⁻³, correspondendo a 67% do poder calorífico do gás natural (AGRAWAL *et al.*, 1997; LOBATO, 2011). De

³ MELO, D. F. Estudo da variabilidade quantitativa e qualitativa do biogás gerado em reatores UASB tratando esgoto doméstico. 2015 (Mestrado). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Dissertação em fase de elaboração.

acordo com ZANETTE (2009) citado por LOBATO (2011), no Brasil, o potencial de produção de metano nas estações de tratamento pode chegar a até 7,3 milhões de $\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$, o que seria relevante ambientalmente e do ponto de vista socioeconômico.

Segundo CAKIR e STENSTROM citado por LOBATO (2011), o impacto ao efeito estufa pelo metano dissolvido proveniente de sistemas de tratamento de esgotos pode ser tão elevada quanto ao impacto ocasionado pelas emissões advindas do metano recuperado no biogás, principalmente em se tratando de baixas concentrações afluentes de DQO, onde não há possibilidades econômicas de implantar formas para a recuperação de energia pelo uso do biogás.

Nesse sentido, salienta-se novamente a possibilidade em se utilizar a oxidação biológica como forma de minimizar o metano dissolvido proveniente de sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos, a citar os reatores UASB, minimizando os passivos ambientais desses sistemas que são uma tendência, principalmente no Brasil, uma vez que se trata de tecnologia simplificada, vantajosa economicamente e aplicável tanto à pequenas como grandes comunidades.

6.5.3 Análise microbiológica por PCR-DGGE

A comunidade microbiana presente no inóculo e ao final do ensaio de oxidação anaeróbia do metano (ensaio 6) foi avaliada por meio da técnica da PCR-DGGE. A figura 6.5 apresenta o gel da DGGE.

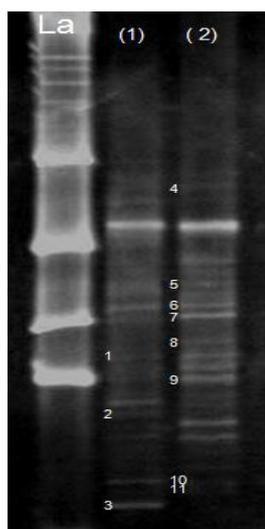


Figura 6-5 - Gel de DGGE corado com Sybr-Gold contendo fragmento de DNA ribossomal 16S amplificado com primers universais para Bacteria

(La) Marcador de peso molecular (Ladder Express); (1) Lodo de UASB utilizado como inóculo para o ensaio de oxidação anaeróbia do metano; (2) amostra do lodo no final do ensaio de oxidação anaeróbia do metano (35 dias de incubação).

Embora um número elevado de bandas tenha sido obtido a partir das duas amostras analisadas, apenas as sequências das bandas enumeradas no gel foram recuperadas. A canaleta 1 correspondeu à amostra do inóculo do ensaio (lodo de UASB), ao passo que a canaleta 2 continha a biomassa após o período de 35 dias do ensaio. A maioria das bandas apresentaram alta similaridade com clone de bactérias não cultivadas provenientes de amostras ambientais (tabela 6.5).

Tabela 6-5. Alinhamentos das sequências obtidas das bandas com os programas RDP Classifier e Blast.

Número da banda	RDP Classifier	Blast	Número de Acesso no GenBank	Similaridade (%)
1	Classe <i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylocystis</i> sp.	EU647258.1	93
2	Domínio Bacteria	Clone de <i>Mycobacterium</i> sp. não cultivado	EU631845.1	87
3	Família <i>Synergistaceae</i>	<i>Synergistetes</i> não cultivado	AB908684.1	98
4	Domínio Bacteria	<i>Acidobacteriaceae</i> não cultivado	KP717505.1	98
5	Domínio Bacteria	<i>Desulfuromonadaceae</i> não cultivado	KC009900.1	77
6	Domínio Bacteria	<i>Acidovorax</i> sp.	KP126996.1	86
7	Gênero <i>Methylocaldum</i>	<i>Methylocaldum</i> sp. não cultivado⁴	HF565149.1	98
8	Domínio Bacteria	Clone de <i>Planctomycetales</i> não cultivado	FJ710625.1	95
9	Gênero <i>Solirubrobacter</i>	<i>Solirubrobacter</i> sp. não cultivado	HQ213036.1	99
10	Filo <i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexi</i> não cultivado	AY921707.1	98
11	Domínio Bacteria	<i>Armatimonadetes</i> não cultivado	KJ600041.1	95

Foi observada a presença de micro-organismos metanotróficos nas bandas 1 e 7. A banda 1 apresentou 93% de similaridade com o gênero *Methylocystis* sp (classe *Alphaproteobacteria*), e a banda 7 apresentou 98% de similaridade com sequencia de *Methylocaldum* sp., classe *Gammaproteobacteria*. Metanotróficas do gênero *Methylocystis* sp. apresentam-se em geral na forma de bastonetes e arranjos simples (BRENNER *et al.*, 2005b). São aeróbias ou microaerofílicas, mesofílicas, neutrófilas e utilizam somente metano e metanol como fonte de carbono e energia. Fixam o formaldeído para formação celular pela via metabólica da serina, o que as caracteriza como metanotróficas do tipo II (HANSON e HANSON, 1996). Foram relatadas em ambientes como arrozais, esgotos e sedimentos de água doce (BRENNER *et al.*, 2005b). *Methylocaldum* sp. são metanotróficas aeróbias, mas que também já foram relatadas em ambientes anóxicos, como sedimentos de lagos e marinhos, bem como em lodo de reator UASB e fermentadores (CVEJIC *et al.*, 2000; SCHUBERT *et al.*, 2006; FERRER *et al.*, 2011; SINISCALCHI *et al.*, 2015).

As bandas 2 e 6 foram classificadas em nível de domínio pelo *RDP Classifier*, apresentando baixa similaridade com os gêneros *Mycobacterium* e *Acidovorax*, respectivamente. O gênero

Mycobacterium (filo *Actinobacteria*) é composto por inúmeras bactérias patogênicas, relatadas em amostras de lodo anaeróbio granular e lodos ativados (KIM *et al.*, 2006). *Acidovorax*, também já foi descrita em amostras de lodo de esgoto doméstico e solos, incluindo solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SINGLETON *et al.*, 2009). Já a banda 9 foi classificada em nível de gênero com 99% de similaridade com *Solirubrobacter* (filo *Actinobacteria*). Membros desse gênero são quimiorganotróficos, crescem à temperatura de 19 a 38°C e já foram isolados de solos contendo culturas agrícolas (SINGLETON *et al.*, 2003).

As bandas 3, 10 e 11 foram classificadas em nível de filo, sendo que a banda 3 apresentou identidade com *Synergistetes*, a banda 10 com o filo *Chloroflexi* e a 11 com o filo *Armatimonadetes* (anteriormente classificado como OP10). Os três filios são compostos por micro-organismos que contém representantes anaeróbios e também foram mencionados como presentes em sistemas de tratamento de esgotos (GANESAN *et al.*, 2008; MAC CONELL, 2014).

As bandas 4 e 8 foram identificadas como *Acidobacteriaceae* e *Planctomycetales*, respectivamente. A família *Acidobacteriaceae* é composta por micro-organismos quimiorganotróficos, encontrados em solos, sedimentos, águas residuárias, sistemas de distribuição de água, drenagem ácida de mina, fontes hidrotermais, dentre outras. Por fim, membros da ordem *Planctomycetales* também foram descritos em águas residuárias (KRIEG *et al.*, 2010; STAUFFERT *et al.*, 2013).

O perfil de bandas do DGGE foi comparado através do programa BioNumerics (versão 7.1), que indicou o coeficiente de similaridade entre a amostra inicial (inóculo) e após 35 dias de incubação (ensaio de oxidação anaeróbia do metano) pela análise da presença/ausência de bandas semelhantes. A figura 6.6 apresenta o dendrograma baseado no perfil de bandas.



Figura 6-6. Dendrograma baseado no perfil de bandas do DGGE.

Utilizando-se o coeficiente Dice, verificou-se uma similaridade de 69% entre as amostras, indicando que houve uma ligeira alteração da comunidade microbiana no interior dos frascos, em virtude das condições do ensaio, tais como adição de metano e meio de cultura. Portanto, a incubação da amostra por 35 dias levou a uma seleção e enriquecimento de metanotróficas relacionadas ao gênero *Methylocaldum*.

A diversidade também foi calculada através do índice de Shannon (H'). O índice H' mostrou praticamente a mesma diversidade para ambas as amostras ($H'= 2,4$ para o inóculo e $H'=2,6$ para 35 dias de ensaio), sugerindo que o tempo de incubação foi curto para revelar diferença na diversidade e possível seleção da comunidade, mas suficiente para realização do ensaio de oxidação anaeróbia do metano e conseqüentemente, cálculo da atividade metanotrófica por parte do lodo de reator UASB.

6.6 Conclusões

As condições mais adequadas para o teste de determinação do potencial de oxidação anaeróbia de metano foram estabelecidas. As melhores condições foram: lodo de UASB lavado, incubado com meio de cultura contendo nitrito e nitrato sob condições de agitação (250 rpm) a 30°C, e, adição de 20mL de metano na atmosfera do frasco. A concentração de STV foi estabelecida para 5g.L⁻¹ para que os ensaios a partir de lodos coletados de diferentes tempos fossem comparáveis. A atividade metanotrófica a partir de lodo de UASB foi determinada, por meio de quatro repetições, sendo o valor médio obtido de 6 mLCH₄.g.STV⁻¹.dia⁻¹. No UASB em escala piloto utilizado, a oxidação do metano é responsável pelo consumo de 29% do metano presente no interior do sistema, mostrando que grande parcela do metano é oxidado biologicamente pelos micro-organismos metanotróficos e sua importância nesses sistemas.

7 ENRIQUECIMENTO E ATIVIDADE DE MICRO-ORGANISMOS METANOTRÓFICOS A PARTIR DE LODO DE SISTEMA DE TRATAMENTO DE ESGOTO MUNICIPAL

Objetivo Específico 3

Enrichment and activity of methanotrophic microorganisms from municipal wastewater sludge⁴

7.1 *Resumo*

Nesse estudo, micro-organismos metanotróficos foram enriquecidos a partir de lodo proveniente de um reator UASB tratando esgotos domésticos em reator em batelada sequencial (RBS) com meio autotrófico contendo nitrito e nitrato. As eficiências médias de remoção de nitrito e nitrato foram de 68% e 53%, respectivamente, provavelmente devido à atividade heterotrófica desnitrificante. A detecção de arqueias dos grupos ANME-I e ANME-II foram realizadas por PCR durante todo período de cultivo avaliado. A estrutura da comunidade microbiana presente no inóculo e enriquecida no RBS após 100 dias de operação foi estudada por pirosequenciamento. Os resultados das análises demonstraram que a comunidade enriquecida no reator foi diferente à inoculada. Os filos dominantes no inóculo foram *Synergistetes*, *Firmicutes* e *Euryarchaeota*, ao passo que na biomassa enriquecida *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* e *Proteobacteria* predominaram. As condições de cultivo do RBS reduziram a abundância de *Methanobacterium* (8% para 1%) e selecionaram bactérias metanotróficas como *Methylocaldum*, *Methylocystis* e *Methylosinus*. As sequências de *Methylocaldum* sp. apresentaram abundância relativa de 2,5%. A presença e elevada predominância do filo *Verrucomicrobia* na biomassa enriquecida do RBS sugere que outras espécies de metanotróficas, ainda pouco conhecidas, relacionadas a este filo podem estar presentes no reator. O potencial de oxidação anaeróbia do metano foi determinado para ambas amostras e revelaram que a atividade metanotrófica da biomassa foi aproximadamente três vezes maior que a do inóculo. Em suma, estes resultados sugerem que o inóculo usado e as condições de cultivo aplicadas foram adequados para o enriquecimento de metanotróficas.

⁴ SINISCALCHI, L. A. B.; VALE, I. C.; DELL'ISOLA, J.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C. Enrichment and activity of methanotrophic microorganisms from municipal wastewater sludge. *Environmental Technology*, v. 36, n. 12, p. 1-13, 2015.

7.2 Abstract

In this study, methanotrophic microorganisms were enriched from sludge derived from a UASB reactor treating domestic sewage. The enrichment was performed in a sequencing batch reactor (RBS) with an autotrophic medium containing nitrite and nitrate. The nitrite and nitrate removal efficiencies were 68% and 53%, respectively, probably due to heterotrophic denitrification. Archaeal cells of the ANME-I and ANME-II groups were detected by PCR throughout the whole cultivation period. The microbial community composition of the biomass present in the inoculum and enriched in RBS after 100 days of operation was investigated and compared with the help of data obtained from pyrosequencing analyses. Pyrosequencing analysis demonstrated that the community enriched in the reactor had differing composition from the inoculum. The dominant phyla detected in the inoculum were *Synergistetes*, *Firmicutes* and *Euryarchaeota* while in the enriched biomass *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* and *Proteobacteria* predominated. The cultivation conditions applied decreased the abundance of *Methanobacterium* (from 8 to 1%) and selected for methanotrophic bacteria such as *Methylocaldum*, *Methylocystis* and *Methylosinus*. Sequences of *Methylocaldum* sp. accounted for 2.5% of the total reads. The presence and high predominance of *Verrucomicrobia* in the enriched biomass suggest that other unknown methanotrophic species related to this phylum might also have occurred in the reactor. The potential for anaerobic oxidation of methane was determined for both samples and revealed that the methanotrophic activity of the enriched biomass was almost three times greater than in the inoculum. Taken together these results indicated that the inoculum used and the cultivation conditions applied were adequate for the methanotrophic enrichment.

Palavras Chave: micro-organismos metanotróficos, atividade metanotrófica, reator em bateladas sequenciais, pirosequenciamento, lodo de UASB.

Keywords: methanotrophic microorganisms, methanotrophic activity, sequencing batch reactor, pyrosequencing, UASB reactor sludge.

7.3 Introdução

Atualmente, as emissões significativas do gás metano (CH₄) vem sendo relacionadas às fontes antrópicas, como o uso do solo para a pecuária, agricultura e emissão por processos de tratamento e armazenamento de resíduos sólidos e efluentes líquidos, como aterros sanitários e reatores anaeróbios (REEBURGH, 2007; KNITTEL e BOETIUS, 2009).

Dentre as fontes acima, destaca-se o tratamento anaeróbico de esgoto doméstico através de Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e de Manta de Lodo (do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* - UASB), que no Brasil, é uma tecnologia bem estabelecida para o tratamento de esgoto doméstico (CHERNICHARO, 2007). A comunidade microbiana presente no reator UASB degrada a matéria orgânica na ausência de oxigênio em produtos como gás carbônico, gás sulfídrico e metano. Na fase gasosa, o metano pode ser coletado e usado como fonte de energia, mas dissolvido no efluente é difícil para ser recuperado, principalmente sob baixas temperaturas (LUESKEN, 2011). A liberação de metano dissolvido no efluente também pode contribuir para o efeito estufa (CAKIR e STENSTROM, 2005; BOGNER *et al.*, 2008; LUESKEN, 2011; SOUZA e CHERNICHARO, 2011). Em um recente estudo, conduzido em um reator UASB tratando esgotos domésticos, SOUZA *et al.* (2011) reportaram que menos que 60% do metano produzido era efetivamente recuperado como biogás dentro do separador trifásico do reator, enquanto cerca de 36-41% do metano permanecia dissolvido no efluente, indicando que as perdas de metano dissolvido são consideravelmente altas (SOUZA *et al.*, 2011). Para minimizar as perdas de metano no esgoto, bombas hidráulicas, agitação física e aeração ("*stripping*"), podem ser alternativas para reduzir as concentrações desses gases em sistemas anaeróbios (GREENFIELD e BATSTONE, 2004). No entanto, estas são soluções mecanizadas. Dessa forma, a oxidação biológica do metano, onde os micro-organismos contidos no efluente podem promover a oxidação do gás, também entra como uma nova alternativa. Assim, a investigação do potencial de oxidação biológica do metano é de grande relevância, uma vez que parece ser um processo economicamente e ambientalmente interessante.

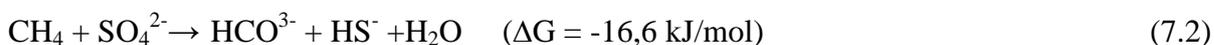
Alguns trabalhos detectaram micro-organismos metanotróficos, em amostras de água doce, oceanos, pastagens, arrozais (HANSON e HANSON, 1996) sob condições aeróbias e sedimentos de lagos de água doce, lodos de digestores, zonas marinhas anóxicas sob condições anaeróbias (ETTWIG *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2009; KNITTEL e BOETIUS, 2009; LUESKEN *et al.*, 2011b).

A oxidação aeróbia do metano é realizada por bactérias metanotróficas da classe γ -Proteobacteria, família Methylococcaceae (Tipo I) e classe α -Proteobacteria, famílias Methylocystaceae e Beijerinckiaceae (Tipo II) (WHITTENBURY e KRIEG, 1984; BOWMAN *et al.*, 1995; HANSON e HANSON, 1996; LIEBNER e WAGNER, 2007). A reação global para a oxidação aeróbia do metano está representada na equação 7.1 (HANSON e HANSON, 1996):



Dentro de *α-Proteobacteria*, o gênero *Sphingopyxis sp.* MD2, isolado de um cultivo microbiano foi relacionado à remoção simultânea de metano e compostos sulfurosos voláteis (como H₂S, methanethiol e dimetil sulfeto) utilizando o oxigênio como aceptor de elétrons para ambos compostos. O metano é oxidado a CO₂, ao passo que os compostos sulfurosos são oxidados a sulfato via H₂S (LEE *et al.*, 2012). Além do filo *Proteobacteria*, algumas bactérias acidófilas pertencentes ao filo *Verrucomicrobia* também foram relatadas por DUNFIELD *et al.* (2007) como oxidadoras de metano.

A oxidação anaeróbia do metano (OAM) é um mecanismo que pode ser mediado por arqueias anaeróbias (ANME) subgrupos ANME-1, ANME-2 (relacionadas à *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*) (BOETIUS *et al.*, 2000; ORPHAN *et al.*, 2002) e ANME-3 (relacionada à *Methanococoides spp* (KNITTEL e BOETIUS, 2009) ou ainda por bactérias pertencentes ao filo NC10 (HINRICHS *et al.*, 1999; VALENTINE, 2002; NAUHAUS *et al.*, 2005; ETTWIG *et al.*, 2009; ETTWIG, 2010). A OAM realizada por ANME é usualmente acoplada à redução do sulfato ou à redução de nitrato. Quando acoplada à redução de sulfato, a OAM produz quantidades relativamente baixas de energia que pode ser visualizada na equação 7.2 (BARNES e GOLDBERG, 1976; MEULEPAS *et al.*, 2010; SMEMO e YAVITT, 2011):



A oxidação realizada por bactérias do filo NC10 é um processo designado como N-DAMO, *Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation* (ETTWIG *et al.*, 2009). Nessa reação, o metano é parcialmente oxidado resultando em compostos orgânicos como metanol ou acetato, que são subsequentemente usados para desnitrificação produzindo dióxido de carbono (CO₂) e gás nitrogênio (N₂) (ETTWIG *et al.*, 2009; LUESKEN, 2011). De acordo com ETTWIG (2010), estudos de isótopos estáveis sugeriram que micro-organismos relacionados ao filo NC10 poderiam fabricar seu próprio oxigênio molecular retirando-o do óxido nitroso proveniente da redução do nitrito. Sendo assim, o oxigênio produzido seria utilizado para oxidar metano por uma via aeróbia em um ambiente anaeróbio conforme reação 7.3:



Pesquisas anteriores demonstraram o enriquecimento de micro-organismos desnitrificantes a partir de sedimentos de valas agrícolas (ETTWIG *et al.*, 2008; ETTWIG *et al.*, 2009).

RAGHOEBARSING *et al.* (2006), enriqueceu N-DAMO utilizando como inóculo sedimentos de água doce. HU *et al.* (2009) também enriqueceu este grupo de micro-organismos a partir de um inóculo misto contendo sedimentos de água doce, lodo de digestores e lodo de retorno do sistema de lodos ativados em um RBS. De acordo com STROUS *et al.* (1998), biorreatores operados na forma de batelada sequencial, apresentam maior eficiência de retenção da biomassa.

No Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento da UFMG/COPASA (CEPTs), GARCIA (2009) detectou bactérias e arqueias metanotróficas na espuma e no lodo, respectivamente, em diferentes reatores UASB tratando esgotos domésticos. Não obstante, a identificação e enriquecimento desses micro-organismos não foi realizada, tampouco foram feitos ensaios para comprovar o potencial de oxidação aeróbio e anaeróbio de metano, por parte das amostras investigadas.

Diante disso e da escassez de trabalhos a respeito desse grupo de micro-organismos em amostras de lodo proveniente exclusivamente de reatores UASB tratando esgoto doméstico, o presente trabalho teve como objetivo enriquecer micro-organismos metanotróficos, incluindo metanotróficos relacionados ao processo N-DAMO, em um reator em batelada sequencial (RBS), a partir de lodo anaeróbio proveniente de um reator UASB. Pretendeu-se ainda verificar a atividade metanotrófica do inóculo e da biomassa enriquecida para estabelecer o potencial de oxidação anaeróbia do metano por esses micro-organismos.

7.4 Material e Métodos

7.4.1 Lodo de Inóculo e aparato experimental

O lodo proveniente de um reator UASB tratando esgotos domésticos de Belo Horizonte foi utilizado como inóculo para enriquecer micro-organismos metanotróficos devido a estudos prévios realizado por GARCIA (2009) e SINISCALCHI (2015) (capítulo 5 da tese – dados não publicados) que detectaram arqueias metanotróficas por PCR nessas amostras com os pares de primers ANME-F e 907R (THOMSEN *et al.*, 2001) sugerindo, portanto, que eles poderiam estar presentes. Para o enriquecimento desses micro-organismos, um fermentador de vidro em escala de bancada de 1,3L (BioFlo110®, New Brunswick Scientific Co., Enfield, CT, USA) foi utilizado. O equipamento possui controle automático de temperatura (manta aquecedora), eletrodo de pH, agitação, sensor de oxigênio dissolvido (OD) e sensores de nível para controlar o afluente e efluente do interior do RBS.

A temperatura foi mantida a 35°C (HU *et al.*, 2009) e o pH permaneceu no intervalo de 6,8 a 7,5 (LUESKEN *et al.*, 2011a). As condições de anaerobiose foram mantidas injetando-se gás N₂ (99,99%) no meio líquido e na atmosfera livre do frasco de alimentação. Na atmosfera do reator, adicionava-se diariamente gás metano (99,9%) a uma vazão de 100 mL. min⁻¹ durante 3 minutos.

O reator foi alimentado com o meio autotrófico com composição similar à previamente descrita por LUESKEN *et al.* (2011a). A concentração final de nitrito e nitrato no meio foram 100mg.L⁻¹ e 25mg.L⁻¹, respectivamente. 1L de lodo de UASB foi utilizado como inóculo a uma concentração de 16g.L⁻¹ de STV.

O fermentador foi monitorado durante um período de 241 dias sob a forma de RBS e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 47 horas, compreendendo dois ciclos de operação de 23,5 horas cada, que incluíram três fases: (i) fase de alimentação (3 horas), na qual 500 mL de meio de cultura eram adicionados ao reator (sob contínua agitação) e permaneciam reagindo com a biomassa por cerca de 20 horas; (ii) fase de sedimentação da biomassa (30 minutos), na qual a agitação era desligada permitindo a decantação da biomassa; (iii) fase de retirada do meio (30 minutos), na qual 500 mL de efluente eram retirados. Os ciclos de operação foram estabelecidos de acordo com um estudo prévio realizado por LUESKEN *et al.* (2011a).

7.4.2 Procedimentos Analíticos

As concentrações de nitrito e nitrato afluente e efluente foram monitoradas três vezes por semana. A concentração de NO₂-N foi determinada colorimetricamente, de acordo com o método 4500 NO₂-B (APHA, 2005). Através do método, obteve-se nitrogênio na forma de nitrito (N-NO₂⁻) que foi convertido à concentração de NO₂⁻ para análises gráficas dos resultados. Sólidos totais voláteis também foram determinados de acordo com APHA (2005).

A concentração de nitrato foi analisada via cromatógrafo iônico (Metrohm, Herisau, Switzerland) com supressão química e detector de condutividade, através do método 4110B (APHA, 2005).

Análises estatísticas utilizando-se o programa Statistica 8.0 foram realizadas para comparar a eficiência de remoção de nitrito e nitrato ao longo dos diferentes períodos de operação do RBS. Para esta análise, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$). Comparações entre as

concentrações afluentes e efluentes de nitrito e nitrato em cada período também foram avaliadas através do teste de Mann-Whitney ($\alpha = 5\%$).

7.4.3 Análise da comunidade microbiana presente no inóculo e na biomassa do RBS

7.4.3.1 Detecção através da PCR

A biomassa do RBS foi amostrada nos dias 0 (inóculo), 100 e 191 dias de operação. O RBS foi subdividido em 3 períodos operacionais, classificados como período 1 (dias 1-100), período 2 (dias 101 a 191), período 3 (dias 192 a 241). Ressalta-se, portanto, que a subdivisão em períodos foi determinada em função das coletas de biomassa para os ensaios de oxidação do metano e análises moleculares.

Para análises moleculares, 10mL das amostras do inóculo e da biomassa do reator foram coletadas, centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e o *pellet* foi usado para os estudos. O DNA foi extraído usando o protocolo descrito por EGLI *et al.* (2003a). As concentrações de DNA total foram estimadas através de um espectrofotômetro NanoDrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). A partir do DNA obtido, fragmentos da subunidade 16S do gene do RNA ribossomal foram amplificados utilizando-se primers específicos para micro-organismos metanotróficos. Para detectar arqueias metanotróficas utilizaram-se os primers ANME-F e 907R (THOMSEN *et al.*, 2001).

Para a detecção de metanotróficas desnitrificantes, foi realizada uma PCR direta com os primers A189_b (LUESKEN *et al.*, 2011b) e o 682R (HOLMES *et al.*, 1995), de acordo com metodologia descrita por ETTWIG *et al.* (2009). Para a detecção de *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (bactéria pertencente ao filo NC10), foi realizada uma PCR *nested* com os primers A189_b e cmo682 (LUESKEN *et al.*, 2011b). O produto desta reação foi utilizado em um segundo PCR com os primers cmo182 e cmo568 (LUESKEN *et al.*, 2011b). A presença e o tamanho dos fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, através da aplicação de uma alíquota de 2 μ L do produto da PCR.

7.4.3.2 Pirosequenciamento 454

A técnica do pirosequenciamento foi utilizada para análise da comunidade microbiana das amostras do inóculo e 100 dias de operação do RBS. O DNA genômico foi extraído de acordo com EGLI *et al.* (2003) e purificado usando-se o kit de purificação Wizard® Genomic DNA

Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). O DNA total foi estimado utilizando o Espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies®, Wilmington, DE, USA).

O DNA foi precipitado em etanol 95% e seco à 50°C. As amostras desidratadas foram enviadas para o Instituto de Agrobiotecnologia de Rosario (INDEAR, Santa Fe, Argentina) onde o pirosequenciamento foi realizado usando um equipamento 454 GS-FLX (Life Sciences, Roche). Barcodes com 10 pb foram incluídos para cada amostra. Os genes RNAr 16S foram amplificados com primers para a região v4: 515F (5'-CACGACGTTGTAAAACGACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'), no qual uma sequência adaptadora (tag) foi incluído e 806R (5'-CAGGAAACAGCTATGACCGGACTACVSGGGTATCTAAT-3'). As sequências foram analisadas utilizando-se o software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) (CAPORASO *et al.*, 2010). Todas as sequências obtidas foram depositadas na base de dados *Sequence Read Archive* (SRA) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob o número de acesso SRP049924. As sequências com comprimento inferior a 200pb, coeficiente de qualidade menor que 25, homopolímeros de tamanho maior que 6 e bases ambíguas foram removidas. Para a definição das unidades taxonômicas operacionais (OTUs), utilizou-se o algoritmo UCLUST (EDGAR, 2010) adotando-se similaridades de 97%. As sequências foram classificadas usando-se a ferramenta *Ribomossal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

Os índices de diversidade alfa Shannon-Wiener (H'), Equitabilidade de Pielou (J') e diversidade beta (Bray-Curtis) de cada amostra foram calculados através do software Past (versão 3.0). As OTUs classificadas como diferentes gêneros de metanotróficas foram selecionadas e usadas para a construção de uma árvore filogenética por meio do software MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007) por meio do método neighbor-joining. Realizou-se o teste de Bootstrap para 1000 recombinações para realizar uma estimativa de confiança da árvore.

7.4.4 Ensaio do Potencial de Oxidação Anaeróbia do Metano e determinação da atividade metanotrófica

Para a realização dos ensaios, utilizou-se o Procedimento Operacional Padrão da Rede PROSAB Microbiologia (GARCIA, 2009) modificado de MCDONALD *et al.* (1999). A atividade metanotrófica inicial e nos dias 191 e 241 foram realizadas com lodo de inóculo do

reator UASB e lodo coletado do RBS após 191 e 241 dias de operação, respectivamente (período P2 e P3).

Cerca de 20mL de lodo e/ou biomassa do reator foram previamente lavadas com tampão fosfato salino (PBS 1X: 130mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 3 mM NaH₂PO₄.H₂O; pH 7,2) centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. O pellet foi ressuspensionado em 20mL de meio de cultura (LUESKEN *et al.*, 2011a), homogeneizado e as alíquotas distribuídas em frascos de antibiótico de 110mL previamente autoclavados. Após a distribuição, os frascos foram vedados com batoques de borracha (butila) e lacres de alumínio. Posteriormente, para o estabelecimento de condições anaeróbicas no interior dos frascos, a atmosfera de cada frasco foi “lavada” com gás inerte (N₂, 99,99%), através da introdução de uma agulha de entrada de gás e outra de saída no meio do batoque de borracha, durante 2 minutos.

Na atmosfera vazia de cada frasco, adicionou-se 20mL de metano (99,9%) por meio de uma seringa esmerilhada. Entretanto, no caso dos frascos contendo lodo de inóculo (oriundo de reator UASB) como este apresentava produção de metano, a adição do gás metano bem como a determinação do consumo deste composto, só foram realizadas após a diminuição da atividade metanogênica. Esse declínio do volume de metano no *headspace* dos frascos foi monitorado duas vezes por semana através das coletas de biogás e análises cromatográficas.

Para a o lodo de inóculo (UASB), os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se uma triplicata de lodo autoclavado como controle. Para os ensaios com a biomassa enriquecida, realizou-se os ensaios em duplicata, uma vez que a retirada excessiva de biomassa do reator poderia prejudicar o experimento de enriquecimento. As amostras foram incubadas em agitador orbital a 250 rpm a uma temperatura de 30°C.

Realizou-se amostragem de 1mL de gás contido no headspace duas vezes por semana a fim de verificar a queda da porcentagem de metano nos ensaios. O gás coletado foi injetado em cromatógrafo gasoso (Perkin Helmer Auto System equipado com detector de condutividade térmica - TCD). As análises cromatográficas ocorreram utilizando-se o gás He como gás de arraste e temperatura da coluna em 220°C. Cada corrida teve o tempo de duração total de 4,5 minutos, sendo que o tempo de retenção do metano ocorreu por volta de 2,75 min.

O volume de metano foi calculado a partir da porcentagem de metano encontrada, pelo volume do headspace do frasco. O valor resultante foi dividido por 100, para obter-se o volume de metano contido nas amostras. A porcentagem de metano foi obtida utilizando-se o

gás padrão (47,1% de CH₄, 25% de CO₂, 2% de H₂, 5% CO e 20,9% N₂) de composição e área conhecidas.

Gráficos de séries temporais foram plotados e, as taxas de consumo de metano foram calculadas a partir da derivada do volume em função do tempo (dV/dt) nos pontos correspondente aos dias analisados. Como resultados, utilizou-se o valor da mediana das taxas. O valor da mediana das taxas calculado foi dividido pela massa de lodo inoculada (g.STV) pra obtenção da atividade metanotrófica dos ensaios.

7.5 Resultados e discussão

7.5.1 Enriquecimento em reator em bateladas sequenciais

A Figura 7.1 apresenta as concentrações de nitrito e nitrato (afluente e efluente) e eficiência de remoção ao longo dos 241 dias de operação do reator, divididos em 3 períodos (P1, P2 e P3). O periodo 1 (P1) teve duração de 100 dias e correspondeu à fase inicial de operação do reator. Esta foi marcada, inicialmente, pelo consumo intenso de nitrito, o qual, por volta do 50º dia, diminuiu. Para o nitrato, o consumo mais intenso ocorreu nos 100 primeiros dias.

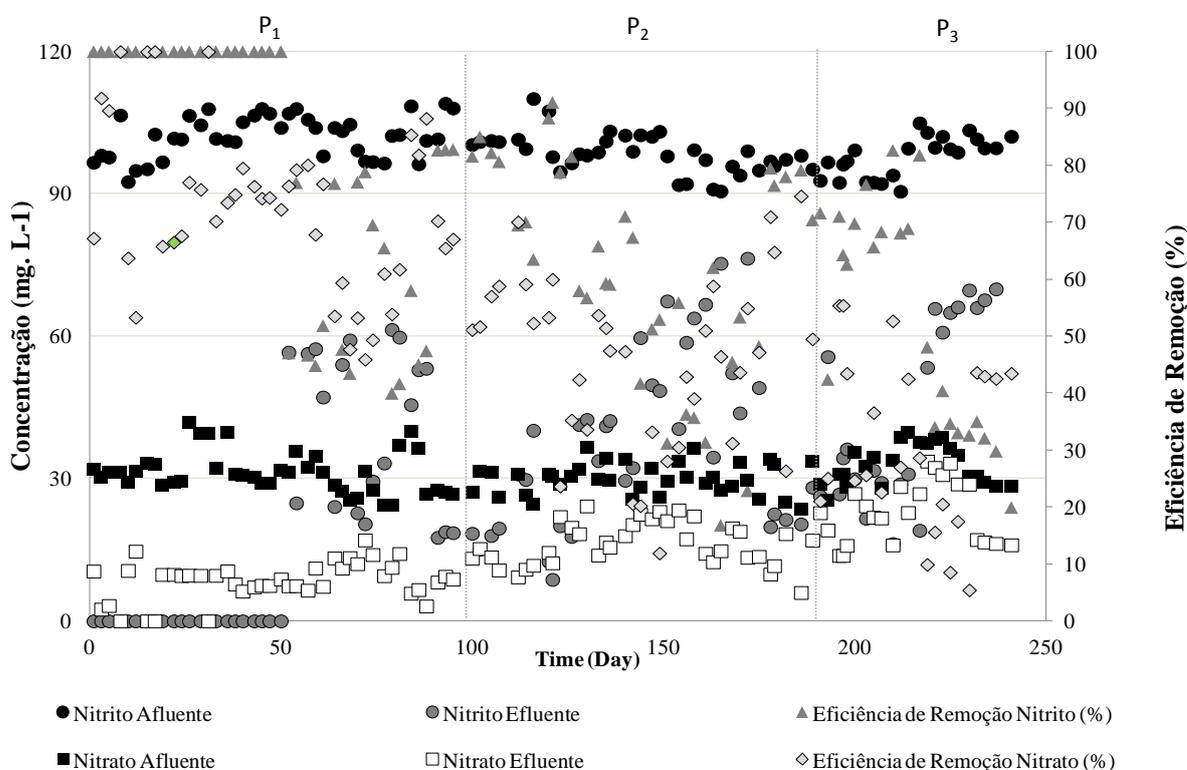


Figura 7-1. Concentração de Nitrito e Nitrato afluente e efluente e eficiência de remoção durante a operação do RBS (subdividido nos períodos P1, P2 e P3).

Durante P1, possivelmente a desnitrificação heterotrófica foi o processo predominante. A atmosfera anaeróbia e a presença de nitrito e nitrato permitiram a estabilização da matéria orgânica oriunda do inóculo e da própria biomassa. Após o consumo da matéria orgânica prontamente disponível, teve início o processo de respiração endógena das bactérias heterotróficas desnitrificantes, uma vez que o meio de cultura era autotrófico e não poderia garantir suplementação necessária a estas bactérias.

O período 2 (P2) caracterizou-se pela continuidade no decaimento do consumo de nitrato e nitrito e durou aproximadamente 90 dias. Nessa etapa, supõe-se que exauriu-se qualquer fonte externa de substratos orgânicos, o que resultou em significativa redução da atividade desnitrificante. As concentrações de nitrito e nitrato efluente oscilaram, em alguns momentos foram altas (próximas às concentrações afluentes), e em outros, baixas, não sendo possível estabelecer uma tendência nítida de consumo. Não obstante, foi observada diferença significativa entre as concentrações afluentes e efluentes de nitrito e nitrato durante o período (Mann-Whitney, $p = 0$ para nitrito e nitrato, $\alpha = 5\%$), indicando que ambos aceptores foram consumidos.

O período 3 (P3) foi marcado por uma redução ainda mais elevada no consumo de nitrito e nitrato (Mann-Whitney, $p = 0$ para nitrito e $p = 0,00001$ para nitrato, $\alpha = 5\%$).

Para verificar a existência de diferenças significativas para a eficiência de remoção de nitrito e nitrato entre os períodos amostrados (P1 a P3), a análise de variância não paramétrica Kruskal Wallis foi utilizada ($\alpha = 5\%$).

A eficiência de remoção de nitrito no período P1 apresentou diferença significativa em relação aos demais períodos (valor de $p = 0,0020$ e $0,0001$ respectivamente para P2 e P3). Os períodos P2 e P3, entretanto, não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si ($p = 0,6721$). Ao que tudo indica, o período P2 parece ser um período de transição entre as fases 2 e 3, e tal fato poderia justificar a ausência de diferença estatística entre estes períodos.

Para os dados de nitrato, observou-se a mesma tendência, anteriormente apresentada para nitrito, apontando diferença significativa de P1 com os demais períodos ($p = 0$ para P2 e P3). De acordo com a análise estatística, não houve diferença entre os períodos 2 e 3 ($p = 0,1176$).

Para melhor compreensão dos dados, gráficos do tipo Box-plot foram construídos com dados referentes às eficiências de remoção de nitrito e nitrato ao longo dos períodos. A figura 7.2 apresenta os dados obtidos.

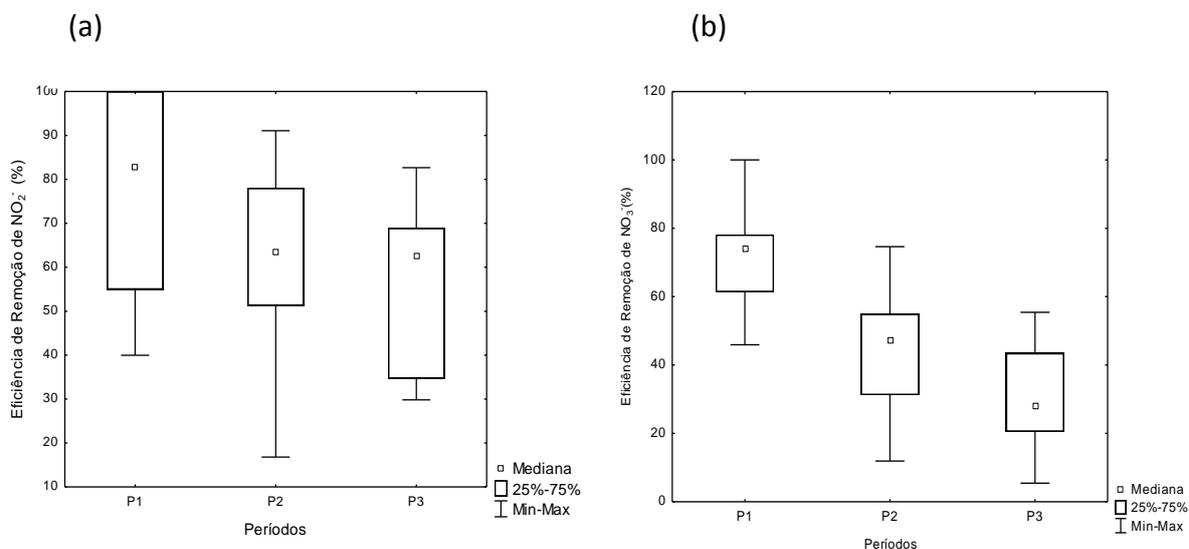


Figura 7-2. Box-plot da remoção de eficiência de nitrito (a) e nitrato (b) nos períodos de operação do RBS (P1 a P3).

Os resultados de eficiência de remoção de nitrito e nitrato no interior do reator para todo o período avaliado (241 dias) apresentaram média para nitrito de 68 % (\pm 24%) (mediana = 70%) e média para nitrato de 53% (\pm 22%) (mediana = 53%).

A partir das análises gráficas bem como das análises estatísticas pode-se verificar que o período 1 e 3 apresentaram, respectivamente, o maior e menor consumo para ambos os aceptores de elétrons. A presença de arqueias metanotróficas e BRS no interior do reator poderia justificar o consumo do nitrato, que, assim como reportado na literatura (ETTWIG *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2009) é preferencialmente consumido pelas arqueias na oxidação do metano. O nitrito disponível é consumido pelas bactérias metanotróficas desnitrificantes (filo NC10) (ETTWIG *et al.*, 2009). Entretanto, dados preliminares de detecção via PCR não identificaram bactérias do filo NC10 nas amostras da biomassa do RBS.

Nesse sentido, o consumo simultâneo de nitrito e nitrato pode indicar o crescimento de grupos microbianos distintos discutidos no próximo item.

7.5.2 Análise da comunidade microbiana do inóculo e enriquecida no reator

7.5.2.1 Detecção por PCR com primers específicos para metanotróficas

Arquéias metanotróficas do grupo ANME foram detectadas através da PCR com primers específicos (ANME-F/ 907R), nas amostras do inóculo bem como na biomassa do reator nos períodos P1 (1-100) e P2 (101-191) conforme apresentado na figura 7.3.

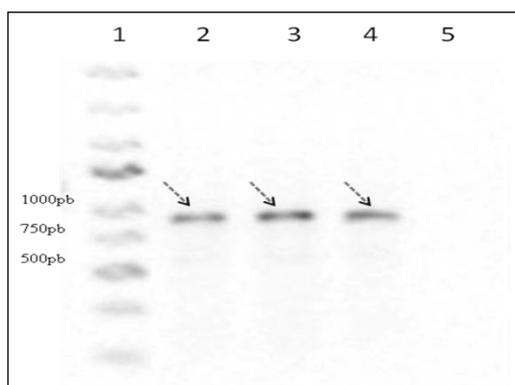


Figura 7-3. Detecção por PCR com os primers ANME-F e 907R para o RNAr 16S de arqueias metanotróficas. (1) Padrão de peso molecular (Ladder Express); (2) inóculo; (3) biomassa do RBS durante o período P1; (4) biomassa do RBS durante o período P2; (5) controle negativo.

Os micro-organismos do grupo ANME pertencem ao filo *Euryarchaeota* e estão relacionados às arqueias metanogênicas, que, dentro de alguns grupos, são capazes de realizar a metanogênese reversa. De acordo com estudos do gene RNAr 16S, os grupos ANME -1, ANME-2 e ANME-3 não são monofiléticos e a distância filogenética entre estes é grande podendo apresentar uma similaridade que varia de 75-92% (KNITTEL e BOETIUS, 2009). ORPHAN *et al.* (2002) mostraram que as células de ANME-I e ANME-II assimilam o carbono do metano durante a OAM. Além da identificação através do gene RNAr 16S, as populações de ANME têm sido identificadas pelo uso de biomarcadores específicos lipídicos e pelo uso de isótopos de carbono estáveis (KNITTEL e BOETIUS, 2009).

Metanotróficas desnitrificantes pertencentes ao filo NC10, tal como o gênero *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*, não foram detectadas por PCR usando os primers descritos por ETTWIG *et al.* (2009).

7.5.3 Composição da comunidade microbiana por pirosequenciamento 454

O pirosequenciamento das amostras do inóculo e da biomassa enriquecida após 100 dias de operação do reator (P1), gerou 4843 e 8838 sequências de alta qualidade, respectivamente, totalizando 13681 sequências recuperadas. A maioria das sequências possuía 250pb e foram agrupadas em 407 unidades taxonômicas operacionais (OTU). Para processamento dos resultados, avaliou-se apenas as OTUs que apresentaram 97% de similaridade. De acordo com GEVERS *et al.* (2005), citado por PEREIRA (2013), às sequências com similaridade igual ou superior a 97%, sugere-se que sejam à mesma espécie. Entre o total de OTUs analisadas, apenas 2,7% foram comuns às duas amostras. A figura 7.4 mostra um histograma contendo o comprimento das sequências obtidas.

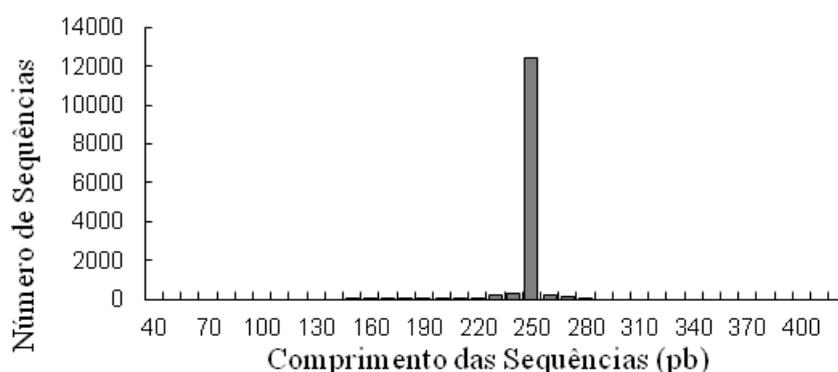


Figura 7-4. Histograma de distribuição do comprimento das sequências obtido através do pirosequenciamento

A composição da comunidade microbiana em nível de filo, para as duas amostras analisadas, é apresentada na Figura 7.5. Os filios mais abundantes, em ambas as amostras foram *Synergistetes* ($53 \pm 37\%$), *Planctomycetes* ($21 \pm 14\%$), *Verrucomicrobia* ($18 \pm 13\%$), *Firmicutes* ($13 \pm 3\%$), *Chloroflexi* ($12 \pm 8\%$), *Proteobacteria* ($11 \pm 8\%$), *Euryarchaeota* ($8 \pm 5\%$), *Acidobacteria* ($6 \pm 4\%$), *Actinobacteria* ($2 \pm 2\%$), *Bacteroidetes* ($2 \pm 1\%$), *Nitrospira* (1%), *OPI0* (1%), *BRC* (1%). Outros filios, tais como *Gemmatimonadetes*, *Spirochaetes* e *WS3* estiveram presentes em baixa abundância ($\leq 0,2\%$). Para as amostras do inóculo, os filios mais abundantes foram *Synergistetes* (53%), *Firmicutes* (13%) e *Euryarchaeota* (8%), ao passo que, para a amostra enriquecida após 100 dias de cultivo, predominaram os filios *Planctomycetes* (21%), seguidos do *Verrucomicrobia* (18%) e *Chloroflexi* (12%).

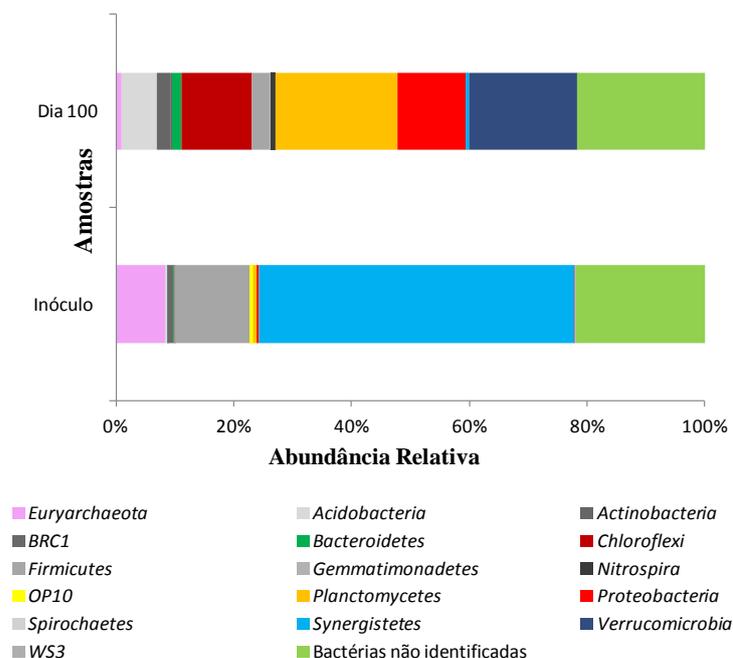


Figura 7-5. Composição da Comunidade Microbiana presente no inóculo e RBS (100 dias de operação) em nível de filo. A abundância relativa é apresentada como a porcentagem dos diferentes filos em relação ao número total de filos presentes nas amostras.

7.5.3.1 Índice de Similaridade

As duas amostras analisadas apresentaram diferenças na comunidade microbiana quando o índice de similaridade de Bray Curtis foi calculado. O índice apresentou valor baixo (0,01) evidenciando baixa similaridade entre as amostras, indicando que as comunidades são bem diferentes em relação à composição e abundância das OTUs. Portanto, sugere-se que o meio de cultura utilizado, bem como as condições operacionais do reator, exerceram forte pressão seletiva modificando a comunidade microbiana ao longo dos 100 dias de cultivo, inibindo o crescimento de *Synergistetes*, diminuindo sua pressão competitiva, e com isto, o crescimento das outras espécies menos competidoras foi favorecido, aumentando assim suas abundâncias e equitabilidade da comunidade. O grupo *Firmicutes* também teve sua abundância reduzida no reator ao longo do cultivo (figura 7.6), indicando que as condições do reator (meio autotrófico) não eram favoráveis para o desenvolvimento destas bactérias que em sua maioria são fermentadoras e geralmente estão presentes em sistemas anaeróbios com alta concentração de matéria orgânica.

Os índices de Shannon (H') e Equitabilidade de Pielou (J') foram analisados e também mostraram que houve diferença entre as comunidades presentes no inóculo e após 100 dias de operação do reator (7.1). Para o índice de Shannon, os resultados indicaram grande diversidade entre as duas comunidades microbianas analisadas. Dessa forma, o índice de

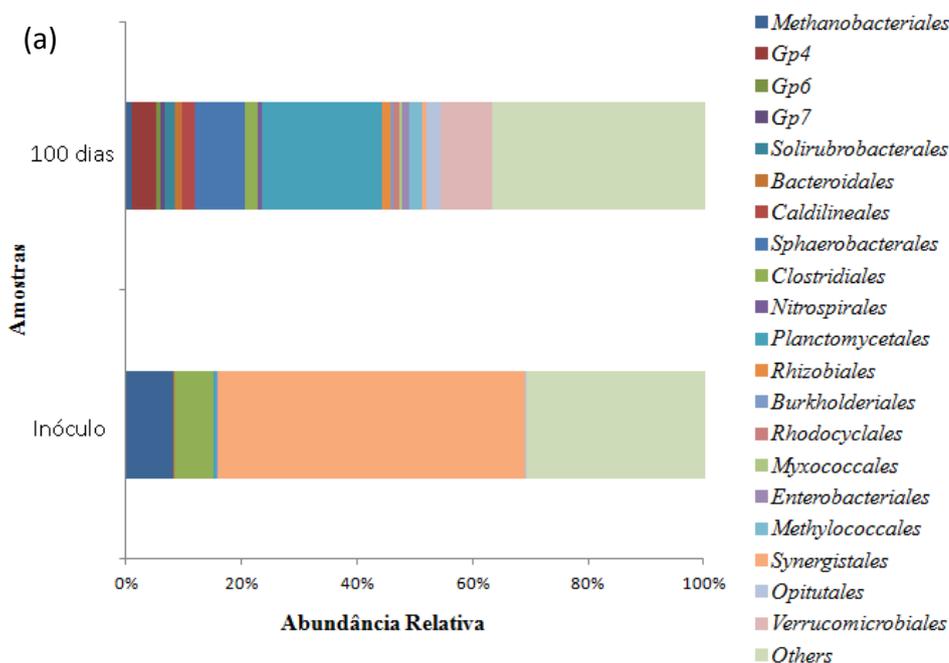
Equitabilidade (J') apresentou valores inferiores a 1, sugerindo heterogeneidade de espécies para ambas amostras. Não obstante, um pequeno aumento entre as amostras do inóculo e biomassa do reator foram observadas podendo indicar uma tendência à uniformidade da comunidade ao longo do período de cultivo e operação do reator.

Tabela 7-1. Análise da diversidade das amostras do inóculo e RBS (100 dias de operação) por meio de índices de Shannon e Equitabilidade.

	Inóculo	RBS – 100 dias
Número de Sequências lidas	4843	8838
Riqueza	201 OTUs	221 OTUs
Shannon (H')	3,11 ($\pm 0,3$)	3,51 ($\pm 0,3$)
Equitabilidade de Pielou (J')	0,58 ($\pm 0,04$)	0,65 ($\pm 0,04$)

7.5.3.2 Comparação dos grupos taxonômicos mais abundantes

Para a construção dos gráficos dos táxons mais abundantes, considerou-se as ordens e os gêneros presentes em abundância relativa igual ou acima de 1% (WANG *et al.*, 2012). Do total de 407 OTUs obtidas a partir do pirosequenciamento, 62,16% foram classificadas em nível de ordem e 36,1% foram classificadas em nível de gênero. A figura 7.6a e 7.6b, apresentam, respectivamente, as ordens e os gêneros iguais ou acima de 1% presentes nas amostras.



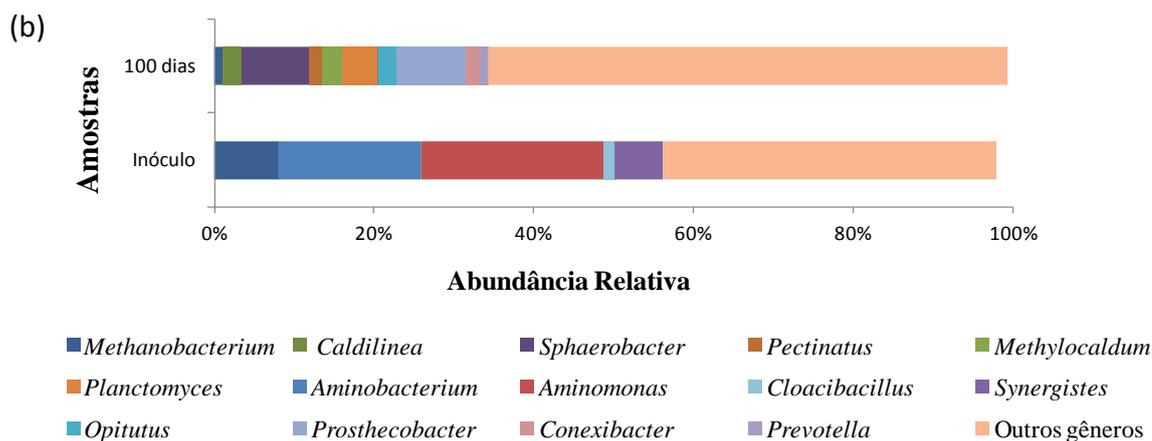


Figura 7-6. Composição da comunidade microbiana presente no inóculo e após 100 dias de operação. (a) Nível taxonômico de ordem (b) Nível taxonômico de gênero. As OTUs com abundância relativa inferior a 1% estão representadas como outros (ordens ou gêneros)

7.5.3.3 Micro-organismos predominantes no lodo do inóculo

No lodo de UASB utilizado como inóculo do RBS, foram predominantes os gêneros da ordem *Synergistales* (*Synergistetes*): *Aminobacterium* (18%), *Aminomonas* (23%), *Synergistes* (6%) e *Cloacibacillus* (1%) (Figura 7.6b). Esses micro-organismos são anaeróbios estritos, fermentadores de aminoácidos e foram relatadas em trabalhos anteriores em sistemas de tratamento de esgotos (GANESAN *et al.*, 2008; MAC CONELL, 2014). Esses micro-organismos disponibilizam ácidos graxos de cadeia curta para as arqueias metanogênicas, presentes em elevada abundância (8%) nesse sistema (SILVA, 2012; COSTA *et al.*, 2014). Bactérias pertencentes à ordem *Clostridiales* também foram encontradas no inóculo e depois tiveram sua abundância relativa reduzida ao longo do enriquecimento e cultivo. Essas bactérias são fermentadoras e geralmente encontradas em sistemas anaeróbios (CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2013).

Outro gênero predominante no inóculo foi o *Methanobacterium* (8%), pertencente ao filo *Euryarchaeota*. Os micro-organismos do gênero *Methanobacterium* são arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (LECLERC *et al.*, 2001; LECLERC *et al.*, 2004). LECLERC *et al.* (2004) também detectaram em um digestor anaeróbio, a dominância de *Methanobacterium*. Segundo o autor, o gênero supracitado, juntamente com *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanoculleus* e *Methanocorpusculum* são os gêneros de hidrogenotróficas mais frequentemente isolados em reatores anaeróbios. *Methanobrevibacter*, e *Methanospirillum* estiveram presentes no lodo de inóculo, porém, em baixa abundância (inferior a 0,2%). O gênero *Methanosaeta*, formado por bactérias

acetoclásticas, também foi detectado no inóculo em baixa abundância (cerca de 0,2%). RASKIN *et al.* (1994) utilizando sondas de oligonucleotídeos complementares ao RNAr 16S, identificou em amostras de digestores anaeróbios de lodo de esgoto, os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* como os mais abundantes na amostra.

Além dos gêneros relatados, verificou-se a presença da família *Veillonellaceae*, filo *Firmicutes*, em 5% de abundância no inóculo. CARDINALI-REZENDE *et al.* (2013) relataram a predominância deste filo em amostras de lodo de reator UASB. O pirosequenciamento não permitiu a classificação destas sequências em nível de gênero. Membros da família *Veillonellaceae* são gram-positivos, quimiorganotróficos, anaeróbios e morfologicamente diversos, apresentando formas de bacilos, cocos e vibriões (VOS *et al.*, 2009).

Sequências de bactérias do filo BRC1 (1%) e OP10 (0,5%) foram detectadas. O filo BRC1 foi descrito na literatura sendo representativo de arrozais, mas além destes ambientes, já foram detectados em sedimentos anóxicos marinhos (DONACHIE *et al.*, 2004) e em reator Anammox (PEREIRA *et al.*, 2014). TESSARO (2012) através de um experimento de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$, identificou, além de micro-organismos metanotróficos (gênero *Methylocaldum*), micro-organismos do filo OP10, o qual o metano marcado havia sido incorporado. Este fato sugere a importância desse filo junto à oxidação do metano, embora seu papel permaneça desconhecido na literatura.

Bactérias redutoras de sulfato relacionadas à OAM em ambientes marinhos, tais como *Desufosarcina*, *Desulfococcus* e *Desulfobulbus* não foram detectadas no inóculo, tampouco após 100 dias de cultivo. Entretanto, outros gêneros de redutoras de sulfato, tais como *Desufobacter*, *Desulfovibrio* e *Desulfohabdus* foram encontradas em baixa abundância (< 0,1%), sendo os dois primeiros gêneros no inóculo e o último presente na amostra após 100 dias de enriquecimento. Alguns estudos relataram o efeito inibitório/toxicidade de nitrito e nitrato no RBS (NIEMANN *et al.*, 2006; CRUZ-MARTINEZ *et al.*, 2009; KRIEG *et al.*, 2010). Concentrações de nitrito como 40, 80 e 120 mgN.L^{-1} e longo tempo de exposição podem ser inibitórias às sulfato-redutoras, com inibição mais elevada à concentrações em torno de 100 mgN.L^{-1} e/ou longo tempo de exposição ao nitrito (24 h) (CRUZ-MARTINEZ *et al.*, 2009). Uma vez que, no presente estudo, as concentrações de nitrito no interior do reator variaram de 30 a 60 mg.L^{-1} , e as concentrações de nitrato variaram de 15 a 30 mg.L^{-1} , alguma inibição sobre o metabolismo das bactérias redutoras de sulfato pode ter ocorrido.

Além disso, a baixa abundância dessas bactérias (observado a partir dos resultados do pirosequenciamento) também pode ser devido à ausência de matéria orgânica no reator em conjunto com a baixa concentração de sulfato no meio afluente (que era de 70 mg.L⁻¹).

7.5.3.4 Gêneros predominantes no reator após 100 dias de enriquecimento e cultivo

Grande diversidade de níveis taxonômicos foi encontrada na biomassa do reator após 100 dias de cultivo (fase P1). Os micro-organismos presentes em maior abundância, envolvidos na oxidação do metano e consumo de nitrato e nitrito serão descritos.

□ *Planctomycetes*

Este filo foi detectado em maior abundância (21%) (Figura 7.7). Bactérias pertencentes ao filo *Planctomycetes*, possuem grande número de características distintas e não usuais, como parede celular sem peptidoglicano, compartimentalização interna, além de características moleculares únicas em seus genes RNAr. São aeróbias facultativas, quimiorganotróficas com exceção dos micro-organismos responsáveis pela oxidação anaeróbia da amônia (Anammox), gram-negativas (em sua maioria) e de crescimento lento. Algumas espécies pertencentes ao gênero *Planctomyces* são capazes de crescer em meio anaeróbio e reduzir nitrato a nitrito. Além disso, já foram relatadas em sistemas de tratamento de efluentes e lixiviados de aterros sanitários (KRIEG *et al.*, 2010).

Dentro deste filo, predominou a família *Planctomycetaceae* (16%), composta por micro-organismos aeróbios, comumente descritos em águas oligotróficas, eutróficas e também no solo (KRIEG *et al.*, 2010). O gênero *Planctomyces* esteve presente em abundância relativa de 5%. Membros desse gênero crescem em temperatura a 35°C, temperatura de operação do reator, são aeróbios ou anaeróbios facultativos, de crescimento lento, quimiorganotróficos e são encontrados principalmente em águas poluídas (KRIEG *et al.*, 2010).

□ *Verrucomicrobia*

O filo *Verrucomicrobia* abriga micro-organismos gram-negativos, quimiorganotróficos (maioria) e presentes em vários ambientes, incluindo solos, lixiviados, etc. Recentemente, isolaram-se membros metanotróficos termoacidófilos (DUNFIELD *et al.*, 2007).

Dois subfilos são de grande importância, o subfilo 3 obtido de análise do gene RNAr 16S em amostras provenientes de solo e ambientes marinhos (CRUZ-MARTINEZ *et al.*, 2009;

KRIEG *et al.*, 2010) e o subfilo 6, predominantemente recuperado de ambientes onde ocorre a emissão de metano mostrando, portanto, evidências do consumo de metano (NIEMANN *et al.*, 2006).

Dentro do filo *Verrucomicrobia*, os gêneros mais abundantes identificados foram *Prostecobacter* e *Opitutus*. Os dois gêneros são formados por micro-organismos gram-negativos, quimiorganotróficos e anaeróbios (KRIEG *et al.*, 2010).

❑ *Euryarchaeota*

Dentro deste filo, o gênero *Methanobacterium* foi identificado com abundância relativa de 8% no inóculo, mas foi detectado com 1% de abundância após 100 dias de operação. Portanto, evidenciando que as condições de seleção e cultivo em meio autotrófico não foram favoráveis às arqueias metanogênicas. Não obstante, segundo BOETIUS *et al.* (2000), diferentes linhagens associadas com *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* (ANME 1, ANME 2) ou *Methanococcoides* (ANME 3) são responsáveis pela oxidação anaeróbia do metano (através do processo de metanogênese reversa). Portanto, a presença de arqueias metanogênicas no reator (ainda que em baixa abundância) pode indicar que estas estariam envolvidas na oxidação anaeróbia do metano (BOETIUS *et al.*, 2000).

❑ *Proteobacteria*

Dentro deste filo, identificou-se uma diversidade de micro-organismos pertencentes às classes alfa, beta, gama e delta *Proteobacteria*, porém, apenas os micro-organismos relacionados às metanotróficas foram descritos. Das 407 OTUs obtidas, 5 foram afiliadas à família *Methylococcaceae* (OTUs 79, 186, 251, 371, 366) e 3 estiveram relacionadas à *Methylocystaceae* (OTUs 94, 98 e 286). As três últimas OTUs não foram incluídas na árvore, uma vez que foram representadas por número de sequências (*reads*) inferior à três. A árvore filogenética afiliada ao grupo de metanotróficas está representada na figura 7.7.

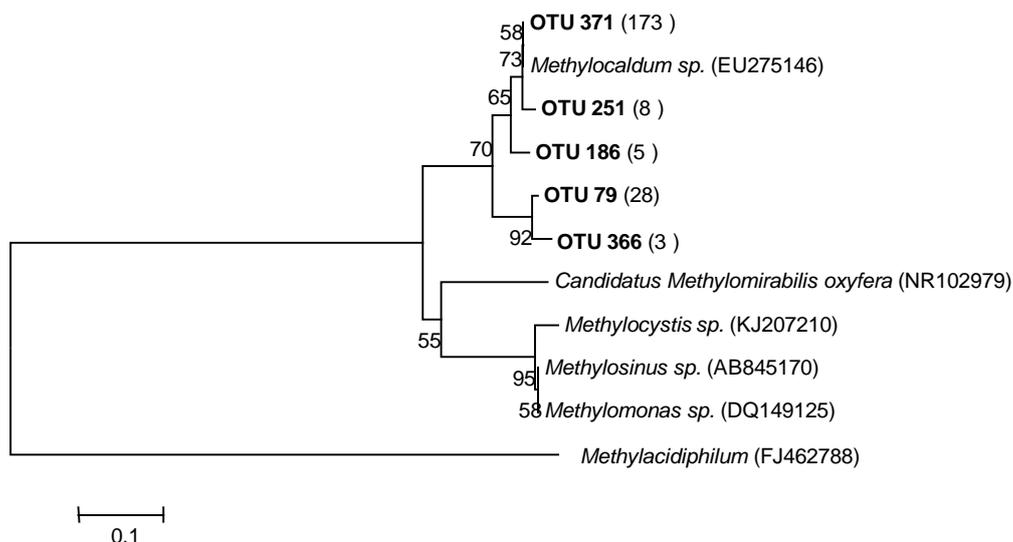


Figura 7-7. Árvore filogenética das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) relacionadas às sequências de bactérias metanotróficas. As sequências foram obtidas por pirosequenciamento 454. O número de sequências recuperadas dentro de cada UTO estão indicadas entre parênteses.

A presença de metanotróficas aeróbias em ambientes anóxicos (ou anaeróbios) como foi o caso do reator do presente estudo, foi relatada anteriormente. FERRER *et al.* (2011) identificaram sequências de *Methylocaldum* sp. e *Methylococcus* em sedimentos anóxicos de um lago raso (Laguna de Carrizo, Madri, Espanha) através da análise do RNAr 16S da comunidade microbiana presente nesse sedimento. SCHUBERT *et al.* (2006) também detectaram a ocorrência de células de metanotróficos tipo I em zonas anóxicas do Mar Negro. Além destes, CVEJIC *et al.* (2000) cultivaram metanotróficos *Methylocaldum tepidum* e *Methylocaldum szegediense* em um fermentador com fluxo contínuo de metano e com concentração de oxigênio dissolvido abaixo de 5%.

Dentro da família *Methylococcaceae*, o gênero *Methylocaldum* foi detectado. Esse é formado por bactérias gram-negativas, em forma de cocos ou bacilos, arranjos simples ou diploides, moderadamente termofílicas, que crescem a temperatura até 40°C, o que justificaria seu crescimento no reator operado a 35°C. Estas bactérias utilizam apenas metano ou compostos de C1 como fonte de carbono e energia e assimilam carboidrato via Ribulose Monofosfato (LIEBERMAN e ROSENZWEIG, 2004). A outra família *Methylocystaceae* é composta de micro-organismos em formato de pequenos bastonetes a reniformes, que utilizam metano como fonte de carbono e energia e a via serina para fixação de carbono. Dentro desta família, identificou-se o gênero *Methylocystis*, que crescem em meio contendo sais de nitrato. Este gênero pode ser enriquecido e isolado a partir de sedimentos microaerofílicos e aeróbios de água doce, solo e amostras de esgoto (BRENNER *et al.*, 2005a).

7.5.3.5 Consumo biológico de Nitrito e Nitrato no interior do RBS

O consumo de nitrito e nitrato é justificado principalmente pela presença de micro-organismos heterotróficos desnitrificantes no interior do RBS. Dentro deste grupo, estão os micro-organismos dos gêneros *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Acidovorax*, *Variovorax* assim como vários outros gêneros das famílias *Bradyrhizobiaceae*, *Comamonadaceae*, *Acetobacteraceae*, *Rhodocyclaceae* e ordens *Burkholderiales*, *Rhodocyclales*, *Rhodospirillales*, *Clostridiales* e *Rhizobiales*. Nessa pesquisa, as sequências afiliadas às ordens abrigando gêneros com capacidade de desnitrificação, representaram apenas um total de 5% dos *reads*. A maioria das bactérias desnitrificantes são anaeróbias facultativas e quimiorganotróficas. Em estudos anteriores, micro-organismos desnitrificantes foram detectados em reatores anammox alimentados com meio autotrófico (COSTA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014), sugerindo que podem sobreviver utilizando produtos microbianos derivados da lise celular.

Conforme já mencionado, a presença de arqueias também poderia contribuir para o consumo de nitrato. Além desses, a presença de micro-organismos facultativos como *Thermomonas* (redução de nitrato a nitrito) e *Pseudoxanthomonas* (redução de nitrito a óxido nitroso) também foram identificados. O gênero *Nitrospira*, que compreende bactérias aeróbias autotróficas responsáveis pela oxidação de nitrito a nitrato, também foi detectado. Em estudos anteriores, *Nitrospira*, foi detectada em reatores anammox, portanto, sob condições anaeróbias (COSTA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014).

7.5.4 Determinação da taxa de consumo de metano e atividade metanotrófica

A taxa de consumo de metano para as amostras do inóculo e amostras do reator, após 191 e 241 dias de cultivo, foi determinada conforme descrito na metodologia. Pode-se observar que, para as amostras do inóculo e biomassa do reator (dias 191 e 241), os valores da taxa de consumo de metano foram, respectivamente, $0,6 \text{ mL} \cdot \text{CH}_4 \cdot \text{dia}^{-1}$ e $0,8 \text{ mL} \cdot \text{CH}_4 \cdot \text{dia}^{-1}$ (Tabela 7.2). A atividade metanotrófica para ambas as amostras também foi calculada e é apresentada na Tabela 7.2. Verificou-se que a atividade metanotrófica da amostra retirada do reator foi quase que três vezes maior quando comparada com a atividade metanotrófica do inóculo, sugerindo que houve seleção e enriquecimento de biomassa oxidadora de metano no reator a partir das condições de cultivo fornecidas, e, portanto maior atividade metanotrófica foi medida na amostra do reator.

Para calcular a atividade metanotrófica, os valores de metano obtidos para as taxas de consumo de metano (valores diários) foram divididos pelos valores da concentração da biomassa (g.STV) presentes no lodo de inóculo ou biomassa cultivada. A atividade metanotrófica para o cultivo de 191 dias foi quase três vezes maior, quanto comparado à atividade do inóculo, ao passo que para a biomassa a 241 dias de cultivo, foi quase 2,5 vezes maior do que o inóculo. Dessa forma, os resultados sugerem que bactérias oxidadoras de metano foram selecionadas e enriquecidas no RBS com base nas condições prévias de cultivo e, por conseguinte, a biomassa cultivada apresentou atividade de oxidação de metano mais elevada.

Tabela 7-2. Mediana da taxa de consumo de metano e Atividade Metanotrófica das amostras.

Amostra	Taxa de consumo CH ₄ ^a (mL.CH ₄ .dia ⁻¹)	STV (g.L ⁻¹)	Volume (mL)	g.STV ^b (Biomassa)	Mediana da atividade metanotrófica ^c (mLCH ₄ /gSTV.dia ⁻¹)
Inóculo	0,6	5,0	20	0,1	6,0
Biomassa RBS ^d	0,8	2,3	20	0,046	17,3
Biomassa RBS ^e	0,8	2,6	20	0,052	15,4

^aOs cálculos da taxa de consumo estão descritos na metodologia.

^bQuantidade de biomassa (em gramas de STV) presente em 20mL de lodo utilizado nos frascos.

^cPara calcular a atividade metanotrófica, os valores da mediana obtidos para a taxa de consumo de metano no headspace, foram divididos pelo valor da biomassa (g.STV) presente no lodo do inóculo e biomassa cultivada no RBS.

^dBiomassa cultivada no RBS com 191 dias de operação.

^eBiomassa cultivada no RBS com 241 dias de operação.

7.6 Conclusões

O cultivo de micro-organismos metanotróficos a partir de lodo de UASB como inóculo em RBS foi realizado com sucesso. A fase inicial de enriquecimento e cultivo (100 primeiros dias) foi distinta dos demais períodos de operação do reator e foi marcada pelo consumo intenso de nitrito e nitrato evidenciando atividade de desnitrificação heterotrófica. A presença de ANME foi confirmada para os períodos P1 e P2 de operação do reator. Os filos mais abundantes identificados nas amostras a partir do pirosequenciamento 454 foram *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* e *Proteobacteria*. Gêneros relacionados à arqueias (*Methanobacterium*) e bactérias metanotróficas (*Methylocaldum*, *Methylocystis* e *Methylosinus*) foram identificados na biomassa do reator após 100 dias de operação, indicando que as condições de cultivo foram seletivas, favorecendo esses grupos. A atividade metanotrófica da biomassa do reator após 191 e 241 dias de cultivo foi quase três vezes maior que a atividade metanotrófica do lodo de inóculo. Portanto, esses resultados indicam que o inóculo utilizado (lodo de UASB) bem como as condições de cultivo empregadas foram adequadas para promover a seleção e enriquecimento de micro-organismos metanotróficos, porém, metanotróficos desnitrificantes (relacionados ao filo NC10) ainda não foram detectados.

8 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA EM REATOR USADO NO CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS OXIDADORES DE METANO

Objetivo Específico 4

8.1 *Resumo*

Neste estudo, a dinâmica e composição da comunidade microbiana desenvolvida em um reator usado no cultivo de micro-organismos oxidadores de metano foi investigada pelas técnicas de PCR-DGGE e sequenciamento de nova geração (SNG) pela plataforma Miseq/Illumina. Estudo anterior mostrou dados da seleção e cultivo de micro-organismos no interior desse sistema até 100 dias de cultivo. O presente estudo complementou a pesquisa anterior agregando informações sobre a comunidade presente no reator, após 100 e até 417 dias de cultivo. Os resultados permitiram compreender a estrutura da comunidade microbiana desenvolvida no reator e verificar que, tanto metanotróficas aeróbias como anaeróbias estiveram presentes. Após 241 de operação do RBS, metanotróficas dos gêneros *Methylocaldum*, *Methylosinus* e *Methylomonas* foram encontradas, com abundância relativa de 8,2%, 2,3% e 0,02%, respectivamente. Arquéias metanotróficas do grupo ANME (*Methanosarcinales*) também foram encontradas, mas com abundância relativamente baixa, inferior a 0,3% no final da operação do reator (417 dias). Membros do filo NC10 relacionado à oxidação anaeróbia do metano dependente de nitrito também foram detectados após 241 dias de operação, mas em baixíssima proporção, cerca de 0,01%. Outros gêneros de metanotróficos também foram detectados, mas em porcentagem inferior a 0,01%. Uma vez que a maioria das demais espécies de metanotróficas apresentaram-se como raras no RBS, é possível sugerir que as condições foram seletivas para *Methylocaldum* permitindo o cultivo desses micro-organismos no interior do sistema.

8.2 *Abstract*

In this study, the dynamics and composition of the microbial community developed in a reactor used in the cultivation of methane oxidizers microorganisms was investigated by PCR-DGGE techniques and next generation sequencing (NGS) through Miseq/Illumina platform. A previous study showed data of the selection and cultivation of microorganisms within this system up to 100 days of cultivation. This study added to the previous research by adding information about this community in the reactor after 100 to 417 days of cultivation. The results allow to understand the structure of the microbial community developed in the reactor and verify that both aerobic methanotrophic as anaerobic were present. After 241 days

RBS operation, methanotrophic of the *Methylocaldum* genus, *Methylosinus* and *Methylomonas* were found with relative abundance of 8.2%, 2.3% and 0.02%, respectively. Methanotrophic Archaea from the ANME group (*Methanosarcinales*) were also found, but with relatively low abundance, less than 0.3% at the end of the reactor operation (417 days). The phyla NC10 members related to the nitrite-dependent methane anaerobic oxidation were also detected after 241 days of operation, but at a very low proportion, about 0.01%. Other methanotrophic genera were also detected, but in a percentage lower than 0.01%. Once most of the other methanotrophic species were presented rare at the RBS, it is possible to suggest that the conditions were selective for the *Methylocaldum* allowing the cultivation of these microorganisms within the system.

8.3 Introdução

O metano é um importante gás natural usado como fonte de energia. Esse gás, assim como o CO₂, é um gás de efeito estufa que desempenha um relevante papel no aquecimento atmosférico (SELA-ADLER *et al.*, 2015). Apresenta um potencial de acumular e reemitir calor vinte e uma vezes maior que o do CO₂ (KNITTEL e BOETIUS, 2009; ARAUJO, 2010). Nos últimos anos, sua concentração se elevou bastante desde a época pré-industrial, para valores próximos de 1800 ppbv⁻¹ (OSUDAR *et al.*, 2015).

O metano é naturalmente produzido por três processos: reações abióticas que ocorrem a elevadas pressões e temperaturas via H₂ e CO₂; decomposição térmica da matéria orgânica (REEBURGH, 2007) e pela atividade de microorganismos estritamente anaeróbios, conhecidos como arqueias metanogênicas (MURRELL e JETTEN, 2009; OSUDAR *et al.*, 2015; SELA-ADLER *et al.*, 2015). As duas primeiras fontes estão confinadas a camadas de sedimentos profundos com contato restrito à atmosfera, tal como áreas vulcânicas e sedimentos oceânicos (ETTWIG, 2010; OSUDAR *et al.*, 2015). Para as emissões atmosféricas, a produção biológica do metano por micro-organismos metanogênicos é a mais importante, com muitas fontes de emissão, tais como *wetlands*, intestino de animais ruminantes, arrozais e sistemas de tratamento de resíduos, etc.

Como consequência da atividade metanogênica, a quantidade de metano no ambiente pode se elevar a cada ano. Se essas emissões não foram controladas pelo processo de oxidação do metano, a tendência é de um aumento global desse gás estufa, o qual poderia corroborar para um rápido aquecimento global (MURRELL e JETTEN, 2009).

Aproximadamente metade do metano produzido em ambientes anóxicos é oxidado por micro-organismos oxidadores de metano (metanotróficos) antes de escapar para a atmosfera. A oxidação microbiana é denominada metanotrofia. Os micro-organismos metanotróficos usam o metano como fonte de carbono e energia, embora algumas espécies sejam facultativas e usem, além do metano, outros compostos (ETTWIG *et al.*, 2008; CHOWDHURY e DICK, 2013; SELA-ADLER *et al.*, 2015). Em ambientes aeróbios, bactérias metanotróficas usam o O₂ como acceptor de elétrons para a oxidação do metano. As metanotróficas aeróbicas são encontradas em dois filos, *Proteobacteria* (HANSON e HANSON, 1996) e *Verrucomicrobia* (DUNFIELD *et al.*, 2007; KALYUZHNYAYA *et al.*, 2015). Em meio anaeróbio, bactérias e arqueias usam o sulfato e/ou nitrito e nitrato como acceptor de elétrons para a oxidação do metano. Em sedimentos marinhos, por exemplo, tem-se a oxidação anaeróbica de metano (OAM), acoplada à redução de sulfato, impedindo assim a sua liberação a partir desse enorme reservatório para a atmosfera (VALENTINE, 2002). A OAM envolve tipicamente um grupo de arqueias que são afiliadas à metanogênese, conhecidas como metanotróficas aneróbias (ANME, do inglês, *Anaerobic Methanotrophs*) (SELA-ADLER *et al.*, 2015). Outro grupo envolvido na OAM são bactérias pertencentes ao filo NC10, que realizam um processo denominado oxidação anaeróbia do metano dependente de nitrito (do inglês - *Nitrite-dependent anaerobic methane oxidation* - N-DAMO). Nessa reação, o metano é parcialmente oxidado resultando em compostos orgânicos como metanol ou acetato que são usados para desnitrificação produzindo dióxido de carbono (CO₂) e gás nitrogênio (N₂) (ETTWIG *et al.*, 2009; ETTWIG, 2010; LUESKEN *et al.*, 2011a).

Nos últimos anos, alguns trabalhos detectaram micro-organismos metanotróficos em amostras de água doce, oceanos, pastagens, arrozais (HANSON e HANSON, 1996) sob condições aeróbias, e sedimentos de lagos de água doce, lodos de digestores de uma ETE localizada em Brisbane na Austrália e zonas marinhas anóxicas sob condições anaeróbias (ETTWIG *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2009; KNITTEL e BOETIUS, 2009; LUESKEN *et al.*, 2011a). No entanto, o estudo e enriquecimento de metanotróficos utilizando-se o lodo de UASB proveniente de tratamento de efluentes domésticos como inóculo único ainda não foi realizado. Em geral, as pesquisas relataram o uso de amostras compostas, contendo lodo e/ou sedimentos a partir de vários locais, não sendo possível, portanto, até o presente momento, determinar a comunidade de micro-organismos metanotróficos que poderia ser enriquecida a partir do lodo de reator UASB tratando efluentes exclusivamente domésticos. Ademais, sabe-se que, as condições do reator UASB devido à metanogênese seriam favoráveis ao abrigo de micro-organismos metanotróficos.

Nesse sentido, esse trabalho investigou a composição da comunidade microbiana desenvolvida em um RBS operado sob condições seletivas para micro-organismos metanotróficos anaeróbios. A atividade metanotrófica também foi avaliada após 400 dias de funcionamento do sistema. Os parâmetros físico-químicos foram monitorados *in situ* e/ou através da cromatografia iônica e colorimetria, ao passo que a estrutura e composição da comunidade foram analisadas por métodos independentes de cultivo, através da técnica da PCR-DGGE e do sequenciamento de nova geração, pela plataforma Miseq da Illumina.

8.4 Material e Métodos

8.4.1 Aparato experimental

Para o enriquecimento de micro-organismos metanotróficos, utilizou-se um fermentador de vidro em escala de bancada (BioFlo110®, *New Brunswick Scientific Co.*, Enfield, CT, USA), com volume total de 1,3 litros e volume útil de 1 litro. A temperatura do fermentador foi controlada e mantida a 35°C (HU *et al.*; 2009) e o pH na faixa de 6,8-7,5 (LUESKEN, 2011). Para manter condições de anaerobiose do sistema, adicionava-se diariamente gás nitrogênio (99,9%) no meio líquido e na atmosfera livre do frasco de alimentação. Na atmosfera livre do reator, injetava-se diariamente o gás metano (99,9%) a uma vazão de 100 mL min⁻¹. Dos dias 1 a 191 (correspondente aos períodos classificados como P1 e P2), o tempo de adição de metano foi correspondente a 3 minutos. Em contrapartida, dos dias 192 a 241 (P3), injetou-se o metano durante 6 minutos. No período final (P4), o volume de metano foi novamente reduzido e o tempo de adição de metano foi de 4 minutos.

O fermentador foi operado durante o período de 417 dias sob a forma de reator em bateladas sequenciais (RBS) e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 47 horas, compreendendo dois ciclos de operação de 23,5 horas cada, que incluíam as fases de alimentação por cerca de 3 horas (500mL de meio de cultura eram adicionados), fase de reação por aproximadamente 20 horas; fase de sedimentação da biomassa (30 minutos) e fase de retirada do meio (30 minutos), na qual 500 mL de efluente eram retirados diariamente.

8.4.2 Descrição do Inóculo

O lodo utilizado como inóculo para a seleção e cultivo de bactérias e arqueias metanotróficas foi proveniente de reator UASB em escala piloto tratando esgoto doméstico, instalado no CEPTs. Do material coletado, 1L de lodo com concentração de sólidos totais voláteis (STV) de 16,25 g.L⁻¹ foram centrifugados a 4.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado

e o sedimento remanescente foi adicionado a um frasco tipo *Schott* contendo 1L do meio de cultura, que foram, portanto, inoculados no reator.

Para a seleção do inóculo, realizou-se previamente teste de detecção de metanotróficas em lodos e sedimentos de diferentes sistemas tratando esgoto doméstico (capítulo 5), além de estudo anterior realizado por GARCIA (2009) que também detectou metanotróficas através da PCR em amostras de lodo de UASB.

8.4.3 Meio de Cultura

Para o enriquecimento e cultivo de bactérias e arqueias metanotróficas, utilizou-se meio de cultura mineral descrito por LUESKEN *et al.* (2011a) que continha os seguintes componentes por litro (g.L^{-1}): KHCO_3 - 0,5 a 1g; KH_2PO_4 - 0,05g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,3g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2g; NaNO_3 - 0,035 a 0,213g (0,5 a 3mM); NaNO_2 - 0,0069 a 0,41g (0,1 a 6mM); 0,5 mL de uma solução ácida de elementos traço e 0,2 mL de uma solução alcalina de elementos traço. A solução ácida (100mM HCl) contém os seguintes componentes por litro: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,085g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,068g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,12g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,5g; CuSO_4 - 0,32g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,095g; H_3BO_3 - 0,014g. A solução de elementos traço alcalina contém (g.L^{-1}): SeO_2 - 0,067g; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,05g; Na_2MoO_4 - 0,242g. Todas as soluções foram autoclavadas antes do uso. As concentrações de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) do meio de cultura adotadas neste estudo foram, respectivamente, 100 mg.L^{-1} e 25 mg.L^{-1} .

8.4.4 Análises físico-químicas

As concentrações de nitrito e nitrato afluentes e efluentes foram monitoradas três vezes por semana. O nitrito foi determinado de acordo com o método 4500 NO_2^- - B (APHA, 2005) e o nitrato (NO_3^-) pelo método 4110B (APHA, 2005) utilizando-se cromatógrafo de íons (Metrohm, Herisau, Switzerland), com supressão química do efluente e detector de condutividade. A frequência das análises bem como outros parâmetros físico-químicos monitorados encontra-se resumidos na tabela 8.1.

Tabela 8-1 - Parâmetros de análise, métodos e frequência das análises do RBS

Parâmetros	Método	Frequência	Ponto de Amostragem	Referência
Série de sólidos ST, STV	Gravimétrico	Inóculo, dias 191, 241, 417	Inóculo, biomassa do reator	APHA <i>et al.</i> (2005)
pH	Sensor de pH	Diariamente	Interior RBS, Afluente, Efluente	
Oxigênio Dissolvido	Sensor de OD	Diariamente	Interior RBS	
Temperatura	Sensor de Temperatura	Diariamente	Interior RBS	
Nitrito	Colorimetricamente	Três vezes por semana	Afluente; efluente	APHA <i>et al.</i> (2005)
Nitrato	Cromatografia Iônica	Três vezes por semana	Afluente; efluente	APHA <i>et al.</i> (2005)

8.4.4.1 Análises estatísticas

Análises estatísticas utilizando-se o software Past 3.07 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) foram realizadas para comparar a eficiência de remoção de nitrito e nitrato ao longo dos diferentes períodos de operação do RBS, e assim, compreender sua possível influência sobre a diversidade de OTUs encontradas nas amostras. Primeiro realizou-se a estatística descritiva dos dados, com cálculo de medidas de tendência central (média e mediana), medidas de dispersão (variância e desvio-padrão) e cálculo dos percentis para a eficiência de remoção de nitrito e nitrato ao longo do tempo. Posteriormente, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de aderência Qui-Quadrado com um $\alpha = 0,05$. Refutada a hipótese de uma distribuição normal e/ou lognormal para a eficiência de remoção de nitrito e nitrato (uma vez que o valor de p apresentou-se inferior ao valor de $\alpha - 0,05$), o teste estatístico não paramétrico Shapiro Wilk W, foi utilizado, confirmando a distribuição assimétrica dos dados.

Em seguida, foram realizadas as análises de variância não-paramétricas, teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$), seguido pelo teste de comparações múltiplas entre medianas ($\alpha = 5\%$) para avaliar se houve variação significativa entre os períodos de operação do RBS.

8.4.4.2 Atividade metanotrófica

A atividade metanotrófica foi calculada com a biomassa coletada no dia 417, data final da operação do RBS de acordo com a metodologia descrita em SINISCALCHI *et al.* (2015) e detalhada no capítulo 6.

8.4.5 Análise da comunidade microbiana selecionada no RBS

O RBS foi subdividido em 4 períodos, classificados como período 1 (dias 1-100), período 2 (dias 101 a 191), período 3 (dias 192 a 241), período 4 (dias 242 a 417). A subdivisão nesses períodos havia sido determinada anteriormente em função das coletas da biomassa para análises moleculares e ensaios de oxidação do metano (capítulo 7). As coletas de biomassa ocorreram, portanto, nos dias 0 (inóculo), 100, 191, 241 e 417 dias de operação. Dados sobre a análise da comunidade microbiana presente no inóculo e após 100 dias de operação do RBS não serão detalhados, apenas citados a título de comparação, pois foram publicados em SINISCALCHI *et al.* (2015) e estão retratados no capítulo 7 da presente tese.

8.4.5.1 Análise da diversidade da comunidade pela técnica da PCR-DGGE

Para análise da diversidade da comunidade microbiana desenvolvida no reator (e para comparação do perfil de bandas obtido a partir das diferentes amostras), a técnica da PCR-DGGE foi realizada (MUYZER *et al.*, 1993). Para tal, a biomassa do inóculo, 191, 241 e 417 dias de operação do reator, foi amostrada. Amostras de 5mL a 10mL foram coletadas, centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos e o *pellet* foi utilizado para os estudos. O DNA foi extraído de acordo com EGLI *et al.* (2003).

Os primers utilizados para a técnica da PCR foram: 1055F (5'ATGGCTGTCGTCAGCT 3') e 1392R (5'ACGGGCGGTGTGTAC 3'), que correspondem a região V8 do gene RNAr 16S, e neste o primer reverso continha a cauda GC (5' CCG CCG CGC GGC GGC CGG GGC GGC GGC ACG GGC 3'), conforme descrito por FERRIS *et al.* (1996).

A PCR consistiu em 4 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 56°C e extensão a 72°C, cada um por 1 minuto. Ao final, realizou-se uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. As concentrações dos reagentes utilizados, para uma reação de PCR, com volume final de 50µL, foram: 18µL de água ultrapura; 25µL de pré-mix 2X (*Phonutria*); 3µL de albumina de soro bovino (*Sigma*) a 100ng/µL; 0,5µL de cada iniciador (1055 e 1392-GC) a 30pmol/µL (*Invitrogen*); 3µL de DNA.

Posterior à PCR, 2µL de cada amplicon foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, com solução de GelRed (*Biotium*), tampão 10x (*Phonutria*) e marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (*Invitrogen*), como padrão de referência para quantificação da massa

e/ou concentração de DNA que foi realizada através do programa ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Para a corrida eletroforética da DGGE, utilizou-se 400ng de DNA por amostra em cada canaleta. Os amplicons foram submetidos à eletroforese a 60 °C em TAE 0,5, durante 17 horas a 80V em um aparato *Bio-Rad DCode Universal Mutation Detection System (Hercules, CA, USA)*, utilizando-se um gel de poliacrilamida a 8% e um gradiente desnaturante de 45 a 75%. Os géis foram corados com solução de *Sybr-Gold (Life Technologies)* por 30 minutos e visualizados em um transiluminador sob luz ultravioleta. As bandas foram excisadas dos géis através de um cortador, eluídas em 50µL de TE e mantidas a 4°C durante 48 horas. O DNA eluído foi reamplificado com os iniciadores 1055-1392 (sem o grampo GC), purificados com etanol e o produto ressuspendido em 20µL de água ultrapura.

Os produtos da PCR purificados foram enviados para sequenciamento na empresa *Macrogen Inc* (Coréia do Sul) por um sequenciador 3730XL. As sequências foram comparadas com sequências do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e RDP (*Ribosomal Database Project*) através do RDP Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

O perfil de bandas obtido através do DGGE foi analisado através do programa Bionumerics 7.1 (Applied Maths, Bélgica). O perfil das bandas permitiu comparar o índice de similaridade, coeficiente Dice, entre as amostras e construir o dendograma utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group with mathematical Averages*). Ademais, o índice de diversidade alfa Shannon-Wiener (H') foi calculado.

8.4.5.2 Sequenciamento de nova geração pela plataforma MiSeq (*Illumina*)

A composição da comunidade microbiana presente no reator nos dias 191, 241 e 417 dias foi analisada por meio do sequenciamento de nova geração (SNG) MiSeq (*Illumina*). Cerca de 5 a 10mL de biomassa foram coletadas nesses dias e as amostras de DNA total extraído de acordo com EGLI *et al.* (2003b), foram purificadas com o kit *Wizard DNA Clean System* (Promega, EUA) e enviadas para a empresa *Macrogen Inc.* para o sequenciamento e construção das bibliotecas genômicas. A empresa utilizou os primers 515F (5' GTGNCAGCMGCCGCGGTAA 3') e 926R (5'CCGYCAATTYMTTTRAGTTT 3'), que delimitam a região V4 e uma parte da região V5 da subunidade 16S do RNAr de Archaea e Bacteria (QUINCE, 2011).

A análise das sequências obtidas foram realizadas no Centro de Excelência em Bioinformática (CEBio) do Instituto de Pesquisa René Rachou (Fundação Oswaldo Cruz) através do software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Inicialmente, as sequências forward e reverse de cada amostra foram unidas, gerando sequências consenso que, a partir daí, foram então processadas e agrupadas em OTUs (*Operational taxonomic unit*) em relação à base de dados do *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>), com limite de 97% de similaridade.

Medidas de diversidade e riqueza foram avaliadas pelo software Past 3.07 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

8.5 Resultados e Discussão

8.5.1 Monitoramento das concentrações de nitrito e nitrato no RBS

Os parâmetros relacionados à concentração de nitrito e nitrato afluente e efluente, tal como a eficiência de remoção desses aceptores, ao longo dos 417 dias de operação (representando os 4 períodos de operação do RBS) são apresentadas na figura 8.1 (8.1a – concentração de nitrito e 8.1c – concentração de nitrato). Gráficos do tipo Box-plot apresentando o valor da mediana e percentis para a eficiência de remoção de nitrito (8.1b) e nitrato (8.1d) são apresentados abaixo. Dados como temperatura, oxigênio dissolvido e pH não serão mencionados, uma vez que foram controlados e mantidos de acordo com as especificações descritas na metodologia.

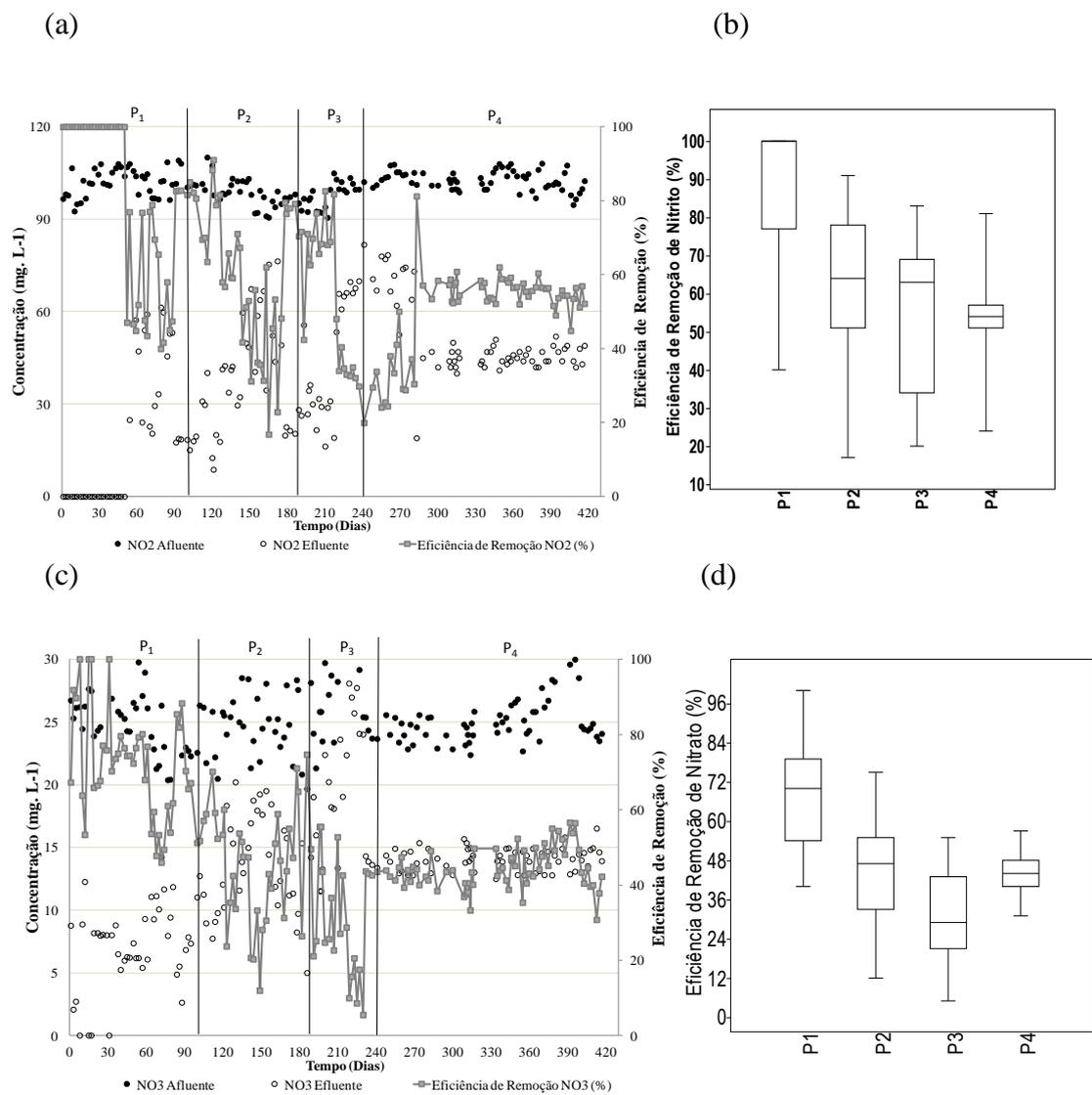


Figura 8-1. Eficiência de Remoção de Nitrito e nitrato nos períodos P1 a P4.

- (a) Concentração Afluente, Efluente e Eficiência de Remoção de Nitrito;
- (b) Box-Plot da Eficiência de Remoção de Nitrito;
- (c) Concentração Afluente, Efluente e Eficiência de Remoção de Nitrito;
- (d) Box-Plot da Eficiência de Remoção de Nitrito.

Pela análise do gráfico 8.2 (a) e (b), verificou-se que a eficiência de remoção de nitrito oscilou bastante, não sendo possível observar uma tendência nítida em cada período. Através da análise estatística descritiva dos dados, uma maior eficiência de remoção de nitrito em P1 (dias 1 a 100), média igual a 81% (mediana =100%) foi detectada. Em P2 (dias 101 a 191), um decaimento em relação à P1, média igual a 61% (mediana = 64%), foi verificado. Em continuidade, a eficiência de remoção de nitrito em P3 foi igual a 53% (mediana =55%). Para o P4, os valores de eficiência média, 51% (mediana =54%), permaneceram bem próximos ao do obtido em P3. A média de consumo total para o nitrito, ao longo de todo o período operacional foi igual a 62% (mediana igual a 57%).

Para o nitrato, observou-se o maior consumo também em P1, média igual a 72% (mediana =72%), seguido pelo decaimento em P2, média igual a 45% (mediana =47%), e um decréscimo ainda maior em P3, média de 31% (mediana =28%), assim como observado para o nitrito. P4, através da visualização gráfica (8.2c), parece apresentar menor oscilação dos valores de eficiência de remoção e apresentou média de remoção de nitrato igual a 44% (mediana = 44%). A média de consumo total para o nitrato foi igual a 50% (mediana = 47%). A tabela 8.2 apresenta a estatística descritiva dos dados para cada período de operação do reator (P1 a P4).

Tabela 8-2. Estatística descritiva para os períodos de consumo de nitrito e nitrato

Estadística Descritiva/Períodos	P1	P2	P3	P4	Total (417)	P1	P2	P3	P4	Total (417)
Medidas de Tendência Central	Eficiência de Remoção de NO ₂ ⁻					Eficiência de Remoção de NO ₃ ⁻				
Número de Dados	43	37	22	62	164	43	37	22	62	164
Média Aritmética	81	61	53	51	62	72	45	31	44	50
Média Geométrica	77	58	49	50	58	70	42	27	44	46
Mediana	100	64	55	54	57	72	47	28	44	47
Mínimo	40	17	20	24	17	46	12	5	44	50
Máximo	100	91	83	81	100	100	75	55	57	100
Desvio Padrão	23	19	20	11	21	15	16	15	6	18
Percentil 10%	45	5	3	31	34	53	23	10	38	27
Percentil 25%	62	9	5	51	48	63	33	21	40	40
Percentil 75%	100	14	10	57	77	79	55	43	48	59
Percentil 90%	100	15	14	59	100	91	62	52	52	76

Para avaliar se os dados amostrais apresentam uma distribuição Normal, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado. De acordo com LEOTTI *et al.* (2005), Shapiro-Wilk W teste é o teste mais sensível para verificação da Normalidade. Nesse sentido, a hipótese nula (H₀) foi rejeitada,

uma vez que o valor de prova (p-value) foram inferiores a 0,05, tanto para o nitrito, $p=0,00001068$, como para nitrato, $p=0,0007346$. Assim, o teste *Kruskall Wallis* para a análise de variância não paramétrica foi realizada ($\alpha = 5\%$) para verificar a existência de diferenças significativas para a eficiência de remoção de nitrito e nitrato entre os períodos amostrados (P1 a P4).

A eficiência de remoção de nitrito no período P1 apresentou diferença significativa em relação aos demais períodos (valor de $p = 0,00011$, $0,000008088$ e $0,0009031$ respectivamente para P2, P3 e P4). O período P2 apresentou diferença significativa entre P1 ($p=0,000001832$) e P4 ($p=0,001$), não apresentando diferença significativa com relação à P3 ($p=0,1224$). Para o período P3, diferença foi observada apenas para o P1 ($p=0,0000001126$), sendo que, P2 ($p=0,7347$) e P4 ($p=0,4093$) não apresentaram diferença significativa quanto à P3 para a eficiência de remoção de nitrito. Por último, P4 apresentou diferença significativa entre os períodos 1 e 2 (valor de $p = 6,1 \times 10^{-12}$ e $p=0,006$ respectivamente para P1 e P2). Não houve diferença entre P3 e P4 ($p=1$). Ao que tudo indica, o período P3 parece ser um período de transição entre as fases 2 e 4, e tal fato poderia justificar a ausência de diferença estatística entre esses períodos. Para os dados de nitrato, observou-se a mesma tendência, anteriormente apresentada para nitrito, apontando diferença significativa de P1 com os demais períodos ($p=0$ para P2, P3 e P4). A elevada desnitrificação que ocorreu no período inicial, poderia justificar o elevado consumo de nitrato nessa fase. De acordo com a análise estatística, não houve diferença entre os períodos 2 e 4 ($p=0,3212$).

Nesse sentido, é possível sugerir que a desnitrificação foi mais intensa no período inicial P1 que em P4. Pelos dados moleculares alcançados, possivelmente o nitrito e nitrato contido no meio de cultura deveria estar sendo consumido pelas desnitrificantes heterotróficas presentes no meio. Salienta-se que, embora o meio não apresentasse carbono orgânico, essas bactérias poderiam estar consumindo matéria orgânica oriunda da lise e morte celular das próprias bactérias heterotróficas devido à falta de fontes orgânicas de carbono.

8.5.1.1 Atividade metanotrófica anaeróbia

A atividade metanotrófica, para o período P4 no dia 417, calculada a partir da taxa de consumo de metano ($0,6 \text{ mL} \cdot \text{CH}_4 \cdot \text{dia}^{-1}$) foi igual a $12 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSTV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. Esse resultado foi inferior aos anteriormente alcançados pela biomassa coletada nos dias 191 e 241 do RBS (que foi de $17,3 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSTV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ e $15,4 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gSTV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ (SINISCALCHI *et al.*, 2015), mostrando que, conforme os dados moleculares retratam a seguir, os micro-organismos

metanotróficos apresentaram menor abundância relativa no interior do sistema no dia 417, refletindo, possivelmente, na atividade metanotrófica.

8.5.2 Caracterização da estrutura e diversidade bacteriana por PCR-DGGE

O perfil da comunidade microbiana das amostras do inóculo e da biomassa do reator coletada após 191, 241 e 417 dias de cultivo no RBS foram avaliadas por meio da técnica de PCR-DGGE (figura 8.2).

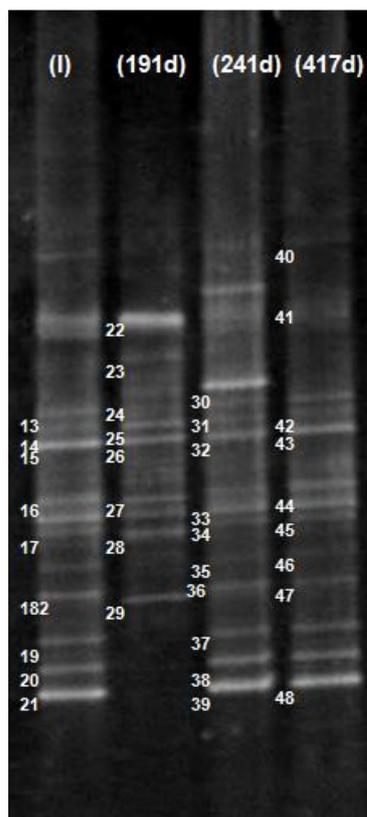


Figura 8-2 - Gel de DGGE corado com Sybr-Gold contendo fragmento de DNA ribossomal 16S amplificado com primers universais para Bacteria

(I) Lodo de inóculo; (191d) amostra do RBS após 191 dias de cultivo; (241d) amostra do RBS após 241 dias de operação; (417d) amostra do RBS após 417 dias de cultivo. As bandas enumeradas correspondem às bandas recortadas do gel de DGGE para sequenciamento e identificação dos grupos.

Através do perfil de bandas obtidos pelo DGGE, observa-se um elevado número de espécies em cada amostra, uma vez que, de acordo com a técnica, cada banda pode representar uma população.

O perfil de bandas obtido no gel da DGGE para cada período amostrado, foi comparado utilizando-se o programa BioNumerics (versão 7.1). O programa gerou os coeficientes de similaridade entre os perfis obtidos. A análise do agrupamento separou cada período amostrado em grupos que compartilharam perfis de conjuntos de bandas semelhantes, a partir

de uma matriz de similaridade gerada com presença e ausência das bandas obtidas. A figura 8.3 apresenta o dendrograma baseado no perfil de bandas do DGGE.

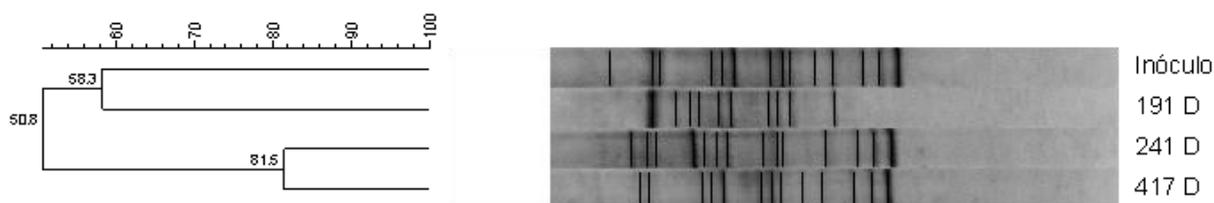


Figura 8-3. Dendrograma baseado no perfil de bandas do DGGE.

Pelo dendrograma, observa-se que a comunidade variou ao longo do tempo de seleção e cultivo no RBS apresentando dois agrupamentos bem distintos, sendo o primeiro: inóculo e amostra com 191 dias e o segundo, amostras dos dias 241 e 417 de operação. Para o primeiro agrupamento (inóculo e dia 191), verificou-se que as amostras são diferentes entre si, apresentando 58,3% de similaridade. Para o segundo agrupamento (dias 241 e 417), verificou-se maior similaridade entre as amostras (81,5% de similaridade). As amostras do inóculo e 191 dias, apresentaram 50,8% de similaridade em comparação às demais amostras, mostrando a dissimilaridade destas em relação às outras. Esses dados indicam que ao longo do enriquecimento houve uma seleção da comunidade microbiana e a estrutura da comunidade microbiana tornou-se bem distinta com relação ao inóculo e também ao tempo de 191 dias. Porém, nos dias 241 e 417 elas foram mais similares entre si, indicando uma maior estabilidade da comunidade microbiana nessas fases. Após o dia 191, aumentou-se o tempo de adição de metano para 6 minutos (a uma vazão de 100mL.CH₄.min), totalizando um volume aproximado de 600mL do gás no headspace do reator durante o período P3 (192-241d). Tal fato poderia justificar a alteração na composição da comunidade após 191 dias de operação, mostrando que o aumento no volume de metano poderia ter favorecido o surgimento de alguns grupos que se mantiveram nos períodos P3 (192-241d) e P4 (242-417d) como visualizado no dendrograma. Ainda assim, algumas populações visualizadas no dia 241 desapareceram no período final de operação do reator, 417 dias. No período P4 houve novamente uma redução no volume de metano acrescido ao reator, passando de 600mL para 400mL, uma vez que a pressão interna do reator parece ter aumentado consideravelmente levando a perda de sólidos.

Para o perfil de bandas em cada um desses períodos amostrados, o índice de Shannon (H') foi calculado. O índice H' mostrou uma maior diversidade para as amostras do inóculo e uma

menor diversidade para o dia 191, seguido pelo dia 417 de operação, indicando que, a comunidade foi selecionada nesses períodos.

A análise da similaridade das bandas excisadas foi realizada, entretanto, muitas sequências apresentaram baixa identidade (menor que 90%), com as sequências inseridas no *GenBank* e não foram classificadas pelo *RDP Classifier*. Dessa forma, estas sequências não serão apresentadas nessa discussão uma vez que não foi possível classificá-las nos diferentes níveis taxonômicos, tampouco fazer inferências sobre a fisiologia desses micro-organismos. De acordo com SCHLOSS e HANDELSMAN (2004), os valores de identidade igual a 97% diferenciam os organismos em nível de espécie, ao passo que 95% permitem classificar em nível de gênero, 90% em nível de família/classe e 80% em nível de filo.

A maioria das bandas apresentaram sequências relacionadas com clones de bactérias não cultivadas provenientes de amostras ambientais (tabela 8.3). Entretanto, destaca-se que, a análise permitiu identificar um perfil de banda predominante em todas as amostras que esta proximamente relacionado à metanotrófica do gênero *Methylocaldum* (sequências correspondentes às bandas 14, 15, 26 e 43). Além destas, a banda de número 27, apresentou 98% de similaridade com metanotrófica do tipo I (*Gammaproteobacteria*), que provavelmente também poderia estar relacionado ao gênero *Methylocaldum*. Entretanto, para esta última, não foi possível a identificação em nível de gênero. O gênero *Methylocaldum* é composto por metanotróficas do tipo I, que assimilam formaldeído para a formação celular pela via Ribulose Monofosfato. Essas bactérias são aeróbias, mas seu crescimento também já foi relatado em locais onde a concentração de oxigênio dissolvido é baixa, como sedimentos de água doce e oceanos, fermentadores e lodo de reator UASB (CVEJIC *et al.*, 2000; SCHUBERT *et al.*, 2006; FERRER *et al.*, 2011; SINISCALCHI *et al.*, 2015). A tabela 8.3 resume a similaridade do gene RNAr 16S das bandas obtidas no gel acima com sequências de micro-organismos inseridas no *GenBank* e *RDP Classifier*.

Tabela 8-3 - Bandas de DGGE (gel mostrado na Figura 8.2) associadas ao gene RNAr 16S

Número da banda	RDP Classifier	Número de Acesso no GenBank	Blast	Similaridade (%)
14	Domínio Bacteria	HF565149.1	<i>Methylocaldum</i> não cultivado	91
15	Gênero <i>Methylocaldum</i>	HF565149.1	<i>Methylocaldum</i> não cultivado	98
16	Filo <i>Proteobacteria</i>	JF683696.1	<i>Burkholderia</i> sp.	91
18	Filo <i>Chloroflexi</i>	AY921879.1	<i>Chloroflexi</i> não cultivado	97
19	Filo <i>Chloroflexi</i>	HQ061974.1	Uncultured <i>Anaerolinaceae</i>	96
20	Filo <i>Chloroflexi</i>	AY921913.1	<i>Chloroflexi</i> não cultivado	99
21	Filo <i>Chloroflexi</i>	HQ640641.1	Bactéria não cultivada	99
26	Gênero <i>Methylocaldum</i>	HF565149.1	<i>Methylocaldum</i> sp. não cultivado	98
27	Classe <i>Gammaproteobacteria</i>	AB669155.1	Metanotrófica tipo I	98
28	Domínio Bacteria	CU925340.1	<i>Acidobacteria</i> não cultivado	97
29	Ordem <i>Solirubrobacterales</i>	HQ213036.1	<i>Solirubrobacter</i> sp. não cultivado	99
30	Família <i>Pseudomonadaceae</i>	KM376217.1	<i>Pseudomonas putida</i>	99
31	Domínio Bacteria	JN791039.1	<i>Firmicutes</i> não cultivado	100
35	Domínio Bacteria	FJ551881.1	<i>Gemmatimonas</i> sp.	90
38	Filo <i>Chloroflexi</i>	AY921707.1	<i>Chloroflexi</i> não cultivada	98
39	Filo <i>Chloroflexi</i>	AY921913.1	<i>Chloroflexi</i> não cultivada	97
40	Domínio Bacteria	AB500053.1	<i>Acidobacteria</i> não cultivada	98
43	Gênero <i>Methylocaldum</i>	HF565149.1	<i>Methylocaldum</i> sp. não cultivada	98
44	Domínio Bacteria	JX559107.1	<i>Novosphingobium</i> sp. não cultivada	100
45	Domínio Bacteria	FJ710638.1	<i>Planctomycetales</i> não cultivada	91

As bandas em negrito representam os gêneros de metanotróficas identificados nas amostras coletadas.

Outros filios, ordens, famílias e/ou gêneros não relacionados à metanotróficas foram identificados.

As bandas de número 18, 19, 20, 21, 38 e 39, conforme elucidado na tabela 8.3 apontaram similaridade com o filo *Chloroflexi*, filo este que engloba bactérias conhecidas como bactérias verdes não sulfurosas. Esses micro-organismos apresentam ampla diversidade metabólica, sendo alguns anaeróbios, fototróficos, mesofílicos ou moderadamente termofílicos, filamentosos e estão presentes em habitats com ocorrência de enxofre como fontes termais, sedimentos de lagos e rios. Além desses ambientes naturais, também foram relatados em sistemas de tratamento de esgotos, sendo usuais em lodos ativados (KRAGELUND *et al.*, 2011). O filo *Chloroflexi* apresentou abundância relativa alta (12%), quando detectado por pirosequenciamento, no reator com 100 dias de operação (SINISCALCHI *et al.*, 2015).

A banda 44 foi correlacionada ao gênero *Novosphingobium* que pertence à classe *Alphaproteobacteria*, família *Sphingomonadaceae* e inclui bactérias desnitrificantes, o que, provavelmente, seria um dos contribuintes para o consumo de nitrato no interior do reator. Outras desnitrificantes possivelmente presentes estão na família *Rhodocyclaceae* detectada (banda 23), que inclui também bactérias púrpuras não sulfurosas (FURUHATA *et al.*, 2008). Além destas, a banda 30, apresentou similaridade com *Pseudomonas putida*, que é uma bactéria heterotrófica capaz de oxidar o íon amônia a nitrito. Esses micro-organismos também estão relacionados à degradação de hidrocarbonetos (BRENNER *et al.*, 2005a). De acordo com HAYATSU *et al.* (2008) citado por MAC CONELL (2014), os micro-organismos heterótrofos contribuem na nitrificação em solos ácidos e/ou com condições desfavoráveis à proliferação de bactérias nitrificantes autotróficas.

A banda 31 apresentou 100% de similaridade com o filo Firmicutes. Esse grupo é composto por micro-organismos quimiorganotróficos, aeróbios, facultativos ou anaeróbios estritos que inclui representantes como os gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Clostridium* (VOS *et al.*, 2009). LEE *et al.* (2012) relataram elevada abundância desse filo em digestores anaeróbios mesofílicos e termofílicos.

As bandas 28 e 40 apresentaram respectivamente, 97% e 98% de identidade com o filo *Acidobacteria* que é formado por micro-organismos heterotróficos e abundantes em solos e outros ambientes, tais como habitats extremos e solos poluídos. Pouco se sabe sobre o filo, mas para o cultivo de membros do grupo, sabe-se que são necessários longos períodos de incubação (KRIEG *et al.*, 2010).

A banda 29 foi classificada como pertencente ao gênero *Solirubrobacter* (filo *Actinobacteria*) de acordo com a análise do gene RNAr 16S. Membros desse gênero são quimiorganotróficos, crescem à temperatura que varia de 19 a 38°C e já foram isolados de solos contendo culturas agrícolas (SINGLETON *et al.*, 2003).

A banda 45 identificou-se com o filo *Planctomycetes*, constituído por micro-organismos aeróbios facultativos ou anaeróbios relatados em uma ampla variedade de ambientes, tais como solos, água doce, sedimentos oceânicos, além de sistemas de tratamento de esgotos e aterros sanitários (KRIEG *et al.*, 2010). Quanto aos sistemas de tratamento, esse filo foi detectado em filtros biológicos percoladores usados no pós-tratamento de esgoto doméstico e em reatores de leito fixo com meio suporte usados no cultivo de bactérias relacionadas ao

processo *Anammox* (oxidação anaeróbia da amônia) (COSTA *et al.*, 2014; MAC CONELL, 2014).

8.5.3 Análise da composição comunidade microbiana pelo sequenciamento de nova geração (SNG)

O sequenciamento do fragmento do gene do RNAr 16S pelo programa Illumina Pipeline (casava v.1.8.2), realizado na plataforma MiSeq, gerou uma média de 1.809.555 sequências (*reads*) por amostra. Após o processamento destas sequências, esse número reduziu-se, apresentando 112.839 sequências para 191 dias, 62.669 sequências para 241 dias e 19.849 sequências para 417 dias de operação do RBS, totalizando 195.357 sequências de alta qualidade recuperadas com comprimento médio de 240 pares de base (pb).

As sequências foram agrupadas em 107 unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Para a confecção dos gráficos, considerou-se apenas os táxons mais abundantes, devido ao elevado número de táxons, tendo sido incluídos os filos, ordens e gêneros com abundância relativa igual ou acima de 1% (LUESKEN, 2011; WANG *et al.*, 2012). No entanto, ressalta-se que os táxons referentes a micro-organismos metanotróficos ou associados à oxidação do metano, ainda que com abundância inferior a 1%, serão discutidos, uma vez que são de suma importância para o presente trabalho. Nesse sentido, os grupos com abundância inferior a 1% foram incluídos nos gráficos como outros.

A composição da comunidade microbiana em nível de filo, para as três amostras analisadas, é apresentada na Figura 8.4 Os filos mais abundantes nas amostras foram *Proteobacteria* ($40 \pm 20\%$), *Chloroflexi* ($23 \pm 12\%$), *Firmicutes* ($5 \pm 4\%$), *GN04* ($4 \pm 6\%$), *Armatimonadetes* ($4 \pm 3\%$), *Actinobacteria* (4%), *Planctomycetes* ($3 \pm 3\%$), *Acidobacteria* ($2 \pm 1\%$), *Bacteroidetes* ($1 \pm 1\%$), *BRC1* ($1 \pm 1\%$), *Chlorobi* ($1 \pm 1\%$) e *Verrucomicrobia* ($1 \pm 1\%$). A tabela 12.1 contida no apêndice apresenta todos os filos recuperados. Filos de interesse, tais como *Euryarchaeota* e *NC10*, que inclui metanotróficas, estiveram presentes em baixa abundância (cerca de 0,2% e 0,01%, respectivamente). O gráfico 8.5 apresenta os filos mais abundantes.

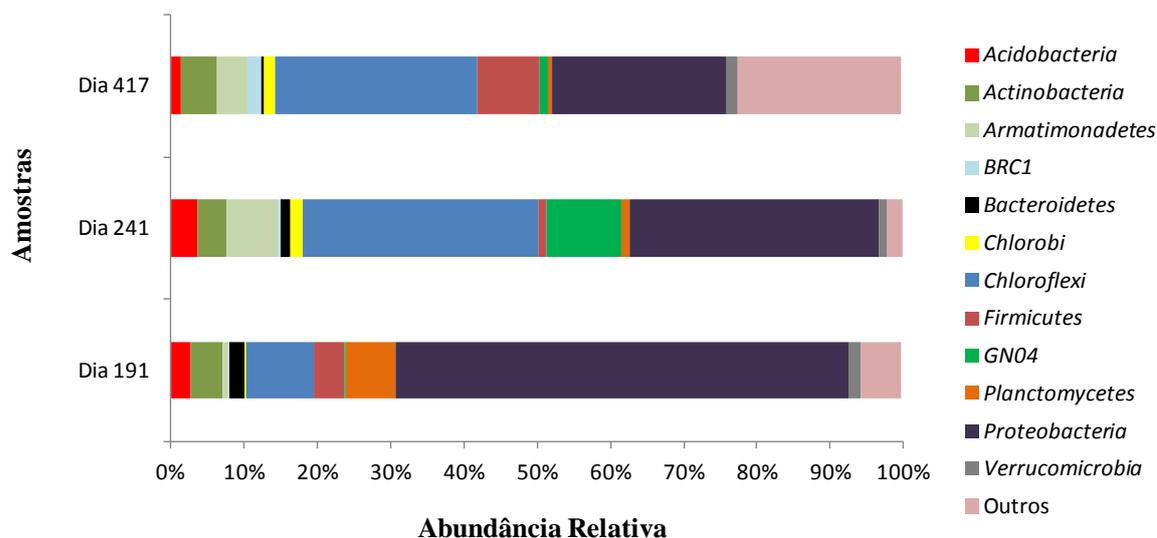


Figura 8-4 - Composição da comunidade microbiana presente em 191, 241 e 417 dias de operação do RBS em nível de filo (abundância relativa⁵).

Para as amostras do dia 191, os filos predominantes foram *Proteobacteria* (62%), *Chloroflexi* (9%) e *Planctomycetes* (7%), ao passo que no dia 241, os filos dominantes também foram *Proteobacteria* (34%) e *Chloroflexi* (32%), seguidos pelos filos *GN04* (10%) e *Armatimonadetes* (7%). No final da operação do reator, como filos dominantes permaneceram *Proteobacteria* (24%) e *Chloroflexi* (28%), que dominaram durante todo período de cultivo avaliado, seguido pelo filo *Firmicutes* que apresentou abundância relativa igual a 8%.

Ao longo do cultivo, observou-se no período correspondente ao dia 241, uma diminuição do filo *Proteobacteria* de 62% para 34%. Não se sabe ao certo o que pode ter ocasionado tal redução, mas supõe-se que a redução do filo *Proteobacteria* possa estar relacionada ao aumento do volume de metano. No entanto, ainda que a abundância do filo *Proteobacteria* tenha sido reduzida, a abundância relativa da metanotrófica do gênero *Methylocaldum* se manteve elevada em cerca de 8,2%.

O filo *Chloroflexi* apresentou um aumento na abundância relativa de 9% para 32% do dia 191 para o dia 241. Uma vez que nesse período ocorreu uma elevação no volume de metano no interior do reator, pode-se sugerir que o aumento de micro-organismos pertencentes a este filo ocorreu em função do volume de metano que pode ter causado a morte de vários outros microrganismos. Assim, as bactérias desse filo responsáveis pelo consumo de produtos

⁵A abundância relativa é apresentada como a porcentagem dos diferentes filos presentes em relação ao número total de filos presentes nas amostras

celulares solúveis (SMP, do inglês, *soluble microbial products*), aminoácidos e carboidratos oriundas de outras células, proliferaram em número uma vez que a concentração de SMP pode ter se elevado consideravelmente. Esses micro-organismos têm sido detectados em vários ambientes anóxicos, incluindo sistemas de tratamento de esgotos. Segundo MAC CONELL (2014), membros desse filo como a classe *Anaerolineae* são importantes para a formação de grânulos em sistemas de tratamento. PEREIRA *et al.* (2014) e COSTA *et al.* (2014) também relataram a presença deste filo em reatores de cultivo de bactérias anammox.

O filo *Chloroflexi* também inclui bactérias verdes não-sulfurosas que são micro-organismos anaeróbios filamentosos encontrados em ambientes naturais contendo elevado teor de enxofre, como fontes termais, sedimentos de rios e também abundantes em lodos provenientes de sistemas de tratamento de esgotos com remoção biológica de nutrientes (BJÖRNSSON *et al.*, 2002). Portanto a seleção deste filo em abundância elevada no RBS usado para o cultivo de micro-organismos metanotróficos indica que o sistema estava anóxico.

Outro filo que apresentou elevada abundância relativa foi *Armatimonadetes* (previamente conhecido como filo candidato OP10). No dia 191, esse filo apresentava apenas 1% de abundância relativa, ao passo que no dia 241 este parece ter sido favorecido apresentando uma abundância relativa igual a 7%. No final da operação do reator (417 dias), este filo desapareceu novamente. De acordo com LEE *et al.* (2013), *Armatimonadetes* é um filo pouco conhecido. Sequências do RNAr 16S relacionadas a este filo foram recuperadas de amostras ambientais. Os representantes conhecidos são aeróbios, mesofílicos ou termofílicos. TESSARO (2012), em um estudo sobre a comunidade de metanotróficas em solos da Amazônia relatou a presença dos filos *Methylocystaceae* e *Methylococcaceae* juntamente com o filo *Armatimonadetes*, cujo papel no ciclo do metano ainda é desconhecido. Sequências do gene RNAr de representantes do grupo foram relatadas em ambientes vulcânicos, locais hipersalinos, solos, sedimentos de água doce e marinhos, fontes geotérmicas e biorreator anaeróbio utilizado para a biorremediação de triclorobenzeno e biorreator para a remoção de fosfato (WINTZINGERODE *et al.*, 1999; PORTILLO e GONZALEZ, 2008).

O filo candidato *GN04* apresentou 10% de abundância relativa no dia 241 e não foi detectado nos outros períodos. Sabe-se que sequências relacionadas a esse filo foram recuperadas a partir de amostras ambientais. Entretanto, informações sobre fisiologia e/ou morfologia dos micro-organismos associados ao filo são praticamente ausentes na literatura (COSTA, 2013).

O filo *Firmicutes* apresentou no final da operação do reator, abundância relativa de 8% (8.4). Comparado aos outros períodos, com exceção do inóculo que apresentava abundância elevada desse filo (13%) (SINISCALCHI *et al.*, 2015), esse período foi o que possuiu maior abundância do grupo, uma vez que nos períodos anteriores a proporção variou entre 1 a 4%. O aumento na abundância deste filo pode estar associada à concentração de matéria orgânica que, possivelmente, se elevou devido à lise celular dos micro-organismos ocorrida após o aumento do volume de metano. A maioria das bactérias desse filo são anaeróbias, mas algumas são aerotolerantes, fermentadoras de aminoácidos e carboidratos e estão presentes em sistemas anaeróbios com elevada concentração de matéria orgânica (VOS *et al.*, 2009). Segundo MA *et al.* (2013) citado por MAC CONELL (2014), pesquisas apontam que esse filo é predominante em esgotos brutos e estão envolvidos na digestão anaeróbia do lodo.

8.5.3.1 Índices de diversidade

As três amostras analisadas apresentaram diferenças na comunidade microbiana quando o índice de similaridade de *Jaccard* e *Dice* foram calculados. Pelos índices, as amostras do dia 191 e 417 apresentaram maior similaridade entre si (*Jaccard*=0,92 e *Dice*=0,96) e maior dissimilaridade foi obtida para o período compreendido entre os dias 241 e 417 (*Jaccard*=0,82 e *Dice*=0,90), diferente do resultado obtido anteriormente pelo DGGE visualizado com o índice de *Dice* que mostrou maior similaridade para as amostras desse período. Entretanto, quando o índice *Morisita*, que leva em consideração a abundância das espécies (nesse caso, das OTUs) é calculado, verificou-se que as amostras dos dias 241 e 417 são mais similares entre si (*Morisita* = 0,83), obtendo-se nesse caso o mesmo resultado visualizado pelo DGGE no tópico anterior.

A comunidade microbiana existente no reator ao longo do experimento foi analisada segundo alguns índices de diversidade a fim de identificar o efeito do meio de cultura contendo nitrato e nitrito e a adição de metano sob a biodiversidade local (tabela 8.4).

Tabela 8-4. Diversidade e riqueza calculada para as amostras do RBS nos dias 191, 241 e 417 de operação.

	RBS – 191 dias	RBS – 241 dias	RBS – 417 dias
Número de Sequências lidas	112839	62669	19849
Número de OTUs	95 OTUs	107 OTUs	88 OTUs
Shannon (<i>H'</i>)	1,75 (± 0,4)	1,85 (± 0,4)	2,58 (± 0,4)
Dominância (D)	0,28 (±0,09)	0,32 (±0,09)	0,15 (±0,09)
Simpson (1/D)	0,71(± 0,08)	0,67 (± 0,08)	0,84 (± 0,08)
Chao 1	105	115	118

Para as análises de riqueza, diversidade e dominância foi utilizada a OTU, como menor unidade taxonômica, que o *software Past* considerou como uma espécie nessas análises, ao passo que o número de sequências amostradas foi considerado como abundância.

A diversidade de espécies refere-se à variabilidade dessas na comunidade e é composta pela riqueza (número de espécies) e a uniformidade com que estas são distribuídas. O índice de Shannon é o mais utilizado em estudos de diversidade biológica. É sensível à presença de espécies raras, o que não é considerado pelo índice de Simpson. Assim, H' considera que as espécies raras podem ser determinantes para a manutenção da estrutura da comunidade, atribuindo, portanto, maior peso a essas espécies. A diversidade biológica é um parâmetro de fundamental importância na ecologia de comunidades possibilitando estimar através de expressões matemáticas, a diversidade em um ecossistema (MAGURRAN, 2004). Já o índice de dominância mede a probabilidade de 2 ou mais indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencerem à mesma espécie (BROWER e ZAR, 1984).

Pelos índices, é possível observar que a abundância foi decrescendo ao longo do período amostral, enquanto a riqueza (número de OTUs) variou entre os dias de amostragem, sendo maior no dia 241. Neste dia, a dominância também foi superior aos demais, indicando que algumas espécies dominaram a comunidade neste período possivelmente devido ao aumento do volume de metano que parece ter selecionado alguns gêneros de metanotróficas, como *Methylocaldum* e *Methylosinus*. Após esse dia, diminuiu-se a concentração de metano no interior do reator, o que, possivelmente resultou numa redução da dominância dos gêneros de metanotróficas e aumento da diversidade observada no dia 417.

Nesse sentido, é possível verificar a ação do metano na comunidade microbiana, uma vez que ele parece ter influenciado a dominância das espécies de metanotróficas. A diminuição da concentração do metano promoveu o restabelecimento da biodiversidade da comunidade.

8.5.3.2 Ordens e gêneros de interesse

A tabela 8.5 apresenta as ordens mais abundantes (igual ou superior a 1%) presentes no RBS. Dados suplementares contendo todas as ordens e gêneros encontrados está presente na tabela 12.2 e 12.3 no apêndice.

Tabela 8-5. Ordens com abundância igual ou superior a 1% ao longo dos períodos amostrados.

Ordem	Filo	Dia 191	Dia 241	Dia 400
<i>Solibacterales</i>	<i>Acidobacteria</i>	1,3%	0,2%	0,0%
<i>RB41</i>		0,7%	1,9%	0,3%
<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Actinobacteria</i>	0,2%	1,6%	0,7%
<i>Actinomycetales</i>		3,7%	0,2%	3,7%
<i>Solirubrobacterales</i>		0,2%	2,0%	0,5%
<i>Fimbriimonadales</i>	<i>Armatimonadetes</i>	0,5%	6,6%	0,5%
<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidetes</i>	0,2%	1,3%	0,2%
<i>Flavobacteriales</i>		1,9%	0,0%	0,1%
<i>SBR1031</i>	<i>Chloroflexi</i>	1,4%	4,5%	2,4%
<i>envOPS12</i>		6,7%	25,0%	23,7%
<i>Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>	4,1%	1,1%	8,4%
<i>Pirellulales</i>	<i>Planctomycetes</i>	5,9%	0,4%	0,1%
<i>Rhizobiales</i>⁶	<i>Alphaproteobacteria</i>	13,9%	3,7%	1,2%
<i>Rhodospirillales</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	2,0%	1,7%	0,3%
<i>Burkholderiales</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	0,1%	0,7%	7,0%
<i>Rhodocyclales</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	7,3%	9,7%	4,6%
<i>SC-I-84</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	1,5%	1,1%	0,4%
<i>Myxococcales</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	2,4%	0,1%	0,0%
<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	21,9%	2,5%	0,6%
<i>Methylococcales</i>⁷	<i>Gammaproteobacteria</i>	8,9%	8,2%	7,0%
<i>Xanthomonadales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	2,8%	5,0%	0,4%
<i>Opiritales</i>	<i>Verrucomicrobia</i>	1,3%	0,2%	0,1%
Outras ordens	-	11,2%	22,2%	37,8%

Das ordens apresentadas, apenas *Methylococcales* e *Rhizobiales* apresentam espécies de metanotróficas inseridas. A ordem *Methylococcales*, embora tenha sido detectada em proporção de 7% no dia 241, quando as sequências foram analisadas em nível de gênero, apenas membros do gênero *Methylocaldum* e *Methylomonas* foram detectados.

O gênero *Methylocaldum*, moderadamente termofílico, foi detectado em elevada abundância com relação aos outros gêneros de metanotróficas recuperados. No período compreendido entre os dias 100 a 191 (P2) verificou-se um maior desenvolvimento de *Methylocaldum* (abundância relativa igual a 8,9%). De acordo com NIKIEMA *et al.* (2007), uma maior expressão da enzima pMMO em metanotróficas do tipo I, pode ocasionar maior taxa de crescimento. Segundo VEILLETTE *et al.* (2012) isso ocorre devido à especificidade da enzima pelo substrato, no qual a enzima pMMO têm maior especificidade pelo CH₄ do que a

⁶ Inclui metanotróficas da classe Alphaproteobacteria, famílias Methylocystaceae e Methylobacteriaceae.

⁷ Inclui metanotróficas da classe Gammaproteobacteria, família Methylococcaceae.

sMMO, que pode utilizar uma variedade de outros compostos além do CH₄, como hidrocarbonetos e compostos aromáticos (NIKIEMA *et al.*, 2007). Outro fator que poderia ter ocasionado maior enriquecimento de *Methylocaldum* em P2 pode estar relacionado ao volume de metano, que foi inferior aos períodos P3 (dias 192-241) e P4 (242-417). De acordo com HENKEL *et al.* (2000), em ambientes com baixas concentrações de CH₄ (< 1.000ppmv⁻¹) espera-se maior crescimento de bactérias metanotróficas do tipo I. Em contrapartida, em ambientes com baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de CH₄, espera-se um maior crescimento de bactérias metanotróficas do tipo II (NIKIEMA *et al.*, 2007), o que poderia justificar o aumento da metanotrófica tipo II *Methylosinus* no dia 241 (abundância relativa igual a 2,3%) e decaimento da metanotrófica do tipo I *Methylocaldum* de 8,9% para 8,2% e, mais adiante, em P4, para apenas 1,7% (Figura 8.5.b). De acordo com VEILLETTE *et al.* (2012) existem dois modelos fundamentais de cinética de oxidação do metano. O primeiro modelo é o de “alta afinidade”, aplicável a ambientes onde a concentração de metano é baixa e próxima a presente na atmosfera (<12 ppmv⁻¹). Os metanotróficos presentes nesse ambiente possuem baixo Km (constante de Michaelis-Menten), e, portanto alta afinidade pelo metano. Porém, suportam concentrações menores do gás como reportado acima. O segundo modelo, conhecido como “baixa afinidade” descreve ambientes como solos e aterros sanitários onde a concentração de CH₄ é superior a 40 ppmv. Esses metanotróficos apresentam elevado Km e, portanto, baixa afinidade pelo metano. Os micro-organismos comumente isolados nesses ambientes são metanotróficos do tipo I e II (VEILLETTE *et al.*, 2012).

A presença de metanotróficas aeróbias em ambientes anóxicos (ou anaeróbios) conforme ocorrido no presente trabalho foi anteriormente relatado por FERRER *et al.* (2011) que identificaram sequências de *Methylocaldum* sp. e *Methylococcus* em sedimentos anóxicos de um lago raso (Laguna de Carrizo, Madri, Espanha) através da análise do RNAr 16S da comunidade microbiana presente nesse sedimento. SCHUBERT *et al.* (2006) também detectaram a ocorrência de bactérias metanotróficas do tipo I em zonas anóxicas do Mar Negro. Adicionalmente, CVEJIC *et al.* (2000) cultivaram as espécies de metanotróficas *Methylocaldum tepidum* e *Methylocaldum szegediense* em um fermentador com fluxo contínuo de metano e concentração de oxigênio dissolvido abaixo de 5%.

Membros de *Methylocaldum* são gram-negativos, com arranjos de cocos ou bacilos simples ou diplóides. Como mencionado, uma vez que crescem a temperaturas até 40°C, sua presença poderia ser justificada considerando que o reator permaneceu a 35°C durante a etapa experimental (LIEBERMAN e ROSENZWEIG, 2004).

Outro gênero relacionado à ordem *Methylococcales* identificado nessa pesquisa foi *Methylomonas*, detectado em proporção de 0,02% no dia 241 e 0,33% no dia 417. Micro-organismos desse gênero são mesófilos, crescem entre 10-40° C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 25-30° C e utilizam o metano ou metanol como fonte de carbono e energia (BRENNER *et al.*, 2005a). Esses organismos foram isolados de sedimentos de lagos de água doce e rios, solos pantanosos, efluente de lodos ativados e águas residuárias provenientes de uma mina de carvão (BRENNER *et al.*, 2005a; SEMRAU *et al.*, 2010).

Uma vez que várias sequências não foram classificadas em nível de gênero e a abundância da ordem *Methylococcales* foi elevada, pode-se sugerir que outros gêneros não identificados pelo SNG poderiam estar presentes na amostra. Na ordem *Methylococcales* estão outros gêneros de metanotróficas como *Methylobacter*, *Methylosphaera* e *Methylosarcina* (SEMRAU *et al.*, 2010).

A ordem *Rhizobiales*, também identificada no RBS como mostrada na tabela 8.5 e figura 8.5(a), apresentou um decaimento ao longo da operação do reator de 13,9% no dia 191 para 1,2% no período final. A ordem abriga um grande número de gêneros de bactérias desnitrificantes (BRENNER *et al.*, 2005b). Assim, a redução do filo era esperada uma vez que o meio de cultura era autotrófico e, portanto, não continha fonte de carbono orgânico para as desnitrificantes heterotróficas. Dentro desta ordem, as famílias de bactérias metanotróficas *Methylocystaceae* e *Methylobacteriaceae* foram encontradas.

O gênero *Methylosinus*, inserido na família *Methylocystaceae* apresentou abundância de 2,3% no dia 241, mais elevada que nos dias 191 e 417 que foram de apenas 0,76% e 0,16% respectivamente. O gênero *Methylosinus* inclui micro-organismos oxidadores de metano aeróbios provenientes de amostras de solo, sedimentos de água doce e de águas subterrâneas. Utilizam apenas o metano e metanol como fonte de carbono e energia. Algumas linhagens desse gênero podem co-metabolizar uma vasta gama de compostos alifáticos clorados, incluindo os principais poluentes das águas subterrâneas tais como tricloroetileno, clorofórmio e tetracloroetileno (BRENNER *et al.*, 2005b; GAGLIANO *et al.*, 2014).

A figura 8.5 apresenta as ordens e gêneros de bactérias metanotróficas dos filós *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* encontradas.

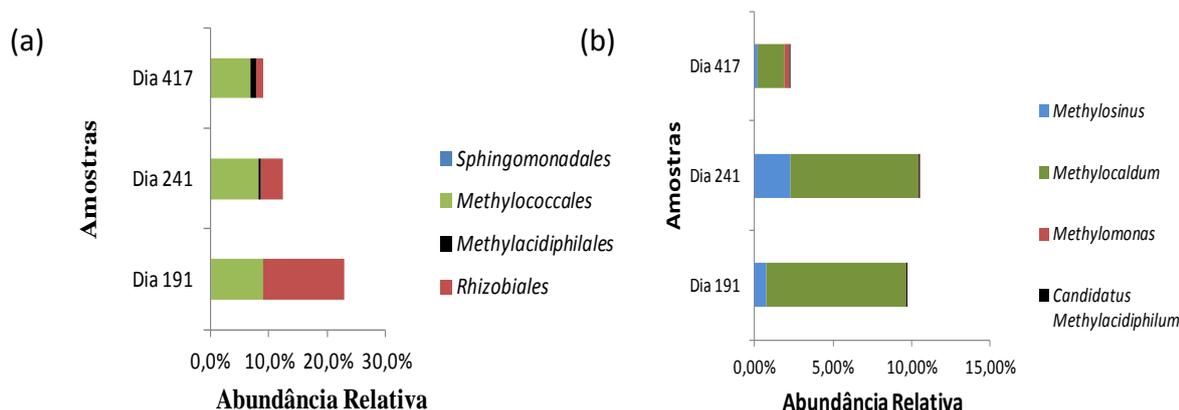


Figura 8-5. Ordens e gêneros de bactérias relacionadas à oxidação do metano.

- (a) Ordens relacionadas à metanotróficas do filo *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*;
 (b) Gêneros relacionados à bactérias metanotróficas do filo *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*.

Pela figura 8.5(a) pode-se verificar que, além das ordens *Methylococcales* e *Rhizobiales*, pertencentes à classe gammaproteobacteria e alphaproteobacteria, respectivamente, a ordem *Sphingomonadales* também foi incluída no gráfico. Isso porque, recentemente LEE *et al.* (2012), isolaram o micro-organismo *Sphingopyxis sp.* MD2 dentro desta ordem, o qual está relacionado à oxidação do metano e compostos de enxofre como o gás sulfídrico. Entretanto, como pôde ser visto, o gênero não foi encontrado no interior do RBS.

Domínio *Bacteria* – Filo *Verrucomicrobia*

Além de metanotróficas do filo *Proteobacteria*, o gênero *Candidatus Methylacidiphilum* pertencente ao filo *Verrucomicrobia* e ordem *Methylacidiphilales* foi detectado (em baixa proporção de 0,005%) pelo SNG. Esse gênero é composto de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, mesofílicas ou termofílicas, quimiotróficas e gram-negativas (POL *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2008). As espécies de metanotróficas do filo *Verrucomicrobia* haviam sido descritas em ambientes geotérmicos caracterizados por elevadas temperaturas e valores de pH baixos (OP DEN CAMP *et al.*, 2009a; VAN TEESELING *et al.*, 2014). No entanto, verificou-se recentemente que esses micro-organismos podem estar presentes em locais de condições ambientais variadas. VAN TEESELING *et al.* (2014), descreveu o isolamento de três micro-organismos mesofílicos a partir de solos vulcânicos na Itália. O crescimento ótimo desses micro-organismos é de 35° a 44°C, o que justifica a presença do filo no interior do reator. No entanto, esses micro-organismos ainda não foram descritos em reatores tratando esgotos domésticos. A descoberta destas três novas espécies nomeadas *Methylacidimicrobium fagopyrum*, *Methylacidimicrobium tartarophylax* e

Methylacidimicrobium cyclophantes expandem a diversidade de metanotróficas conhecidas e mostra que elas estão presentes em mais ecossistemas do que os previamente relatados (VAN TEESELING *et al.*, 2014).

Domínio Archaea – Filo Euryarchaeota

Além de metanotróficas aeróbias, arqueias metanogênicas das ordens *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* e *Methanomicrobiales* também foram identificadas (figura 8.5a). Esses micro-organismos são arqueias metanogênicas capazes de realizar a metanogênese reversa e, por isso são classificadas dentro do grupo ANME (*Anaerobic Methanotroph*) (JAGERSMA *et al.*, 2009; MEULEPAS *et al.*, 2010; DONG *et al.*, 2015). O grupo ANME-I está mais próximo filogeneticamente das ordens *Methanosarcinales* e *Methanomicrobiales* acima supracitadas, ao passo que ANME-II está associado à ordem *Methanosarcinales* apenas (KNITTEL e BOETIUS, 2009; DONG *et al.*, 2015). O sequenciamento massivo permitiu a identificação de vários gêneros de metanogênicas associadas à metanogênese reversa que estão representadas no gráfico 8.6(b).

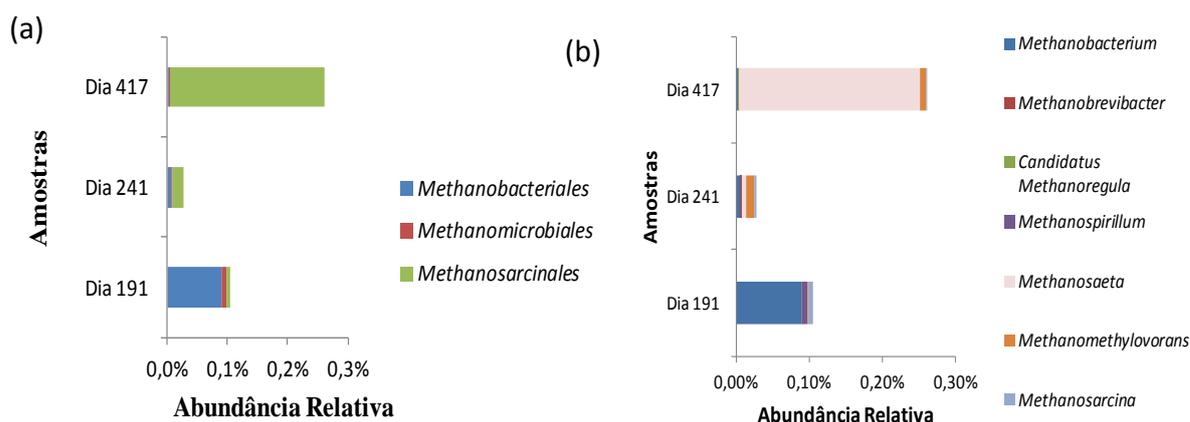


Figura 8-6. Ordens e gêneros de arqueias relacionadas à oxidação do metano.

- (a) Ordens relacionadas à arqueias metanotróficas do grupo ANME;
 (b) Gêneros relacionados à metanotróficas do grupo ANME.

A OAM ocorre em ambientes anóxicos como sedimentos profundos de oceanos e água doce e também já foi identificado em biorreatores inoculados com sedimentos do mar Báltico (JAGERSMA *et al.*, 2009). Os gêneros *Methanosarcina* e *Methanobacterium* foram identificados em aterros sanitários. A OAM, realizada pelo grupo ANME pode estar associada com a redução do sulfato. O grupo ANME-I, por exemplo, pode apresentar-se em simbiose com *Desulfosarcina* e/ou *Desulfococcus* enquanto ANME-II pode se associar com os mesmos gêneros e ainda *Desulfobulbus* (DONG *et al.*, 2015). *Desulfosarcina* não foi detectada no reator. Os outros gêneros *Desulfococcus* e *Desulfobulbus* foram detectadas em baixa porcentagem no reator. *Desulfococcus* foram detectados a 0,25% e 0,03% nos dias 191 e 241

ao passo que *Desulfobulbus* foi identificada apenas no dia 241 com proporção de 0,01%. Segundo KNITTEL e BOETIUS (2009), existem evidências de que células de ANME podem estar associadas aos gêneros *Sphingomonas* spp e *Burkholderia* spp., pertencentes à alphaproteobacteria e betaproteobacteria, respectivamente. O gênero *Sphingomonas* foi identificado no biorreator, porém em proporção menor que 0,01%. Outras BRS, tais como *Desulfomicrobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonile* e *Syntrophus* foram detectadas totalizando uma abundância relativa igual a 0,59% no dia 191 e 0,61% no dia 241, quando somados com os outros dois gêneros citados (dados suplementares no apêndice tabela 12.2 e 12.3).

Os resultados do gráfico 8.7(b) sugerem que o gênero *Methanosaeta* foi favorecido ao longo do cultivo, ao passo que o gênero *Methanosarcina* praticamente desapareceu do sistema. O gênero *Methanosaeta* foi isolado a partir de digestores anaeróbios mesofílicos ou termofílicos tratando efluentes domésticos e outros tipos de sistemas anaeróbios relacionados ao tratamento de resíduos. *Methanosaeta* foi relatado em sedimentos anóxicos de rios e ambientes termofílicos como fontes termais, além de sistemas de tratamento de esgotos. Membros do gênero *Methanosarcina* podem ser isolado a partir de ambientes de água doce e marinhos. Além desses, digestores anaeróbios também podem abrigar esses micro-organismos, além do rúmen de animais (GARRITY e HOLT, 2001).

Os outros gêneros identificados, tais como *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanospirillum* são micro-organismos metanogênicos que podem ser encontrados em ambientes metanogênicos como sedimentos de água doce, sedimentos oceânicos, solos pantanosos, trato gastrointestinal de animais e lodos provenientes de sistemas de tratamento de esgoto doméstico. O hidrogênio ou gás carbônico é usado como substrato metanogênico, mesmo em ambientes em que as concentrações de hidrogênio são muito baixas (GARRITY e HOLT, 2001; KNITTEL e BOETIUS, 2009). O gênero *Methanoregula*, pertence à ordem *Methanomicrobiales* e foi identificado a partir de amostras de pântanos nos EUA. Ressalta-se que, não foram encontrados dados na literatura até o presente momento inferindo que especificamente os gêneros *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum* e *Candidatus Methanoregula* são metanotróficos. No entanto, como são arqueias metanogênicas, inseridas nas ordens citadas como ANME, estes estão aqui representados pelo gráfico da figura 8.6b.

A coexistência de metanotróficas aeróbias e anaeróbias no sistema sugere que, embora o reator tenha sido mantido sob condições controladas, como sensor de oxigênio e adição de nitrogênio no meio de cultura e headspace para garantir condições anaeróbias, ao que tudo indica, o reator se apresentou como anóxico, formando microhábitats em seu interior que

possibilitou o cultivo de ambos grupos de metanotróficas. Possivelmente, as condições de agitação, mantidas a 50 rpm ao longo de todo o período de cultivo possibilitaram a formação desses habitats, onde parte da biomassa pode ter permanecido depositada no fundo do reator e portanto, mantendo-se em anaerobiose, enquanto os micro-organismos em agitação eram mantidos sob condições de baixa concentração de oxigênio. Essa seria uma hipótese, uma vez que o sistema foi mantido fechado durante todo o período de cultivo e o eletrodo de oxigênio dissolvido (OD) indicou concentração de $0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de OD no meio líquido.

Salienta-se que, embora as condições de cultivo, tais como o meio de cultura empregado nessa pesquisa tenha sido igual ao reportado por LUESKEN *et al.* (2011a) para a seleção e cultivo de metanotróficas desnitrificantes (filo NC10), nesse trabalho, a porcentagem deste filo foi de apenas 0,01%. LUESKEN *et al.* (2011a) utilizando lodo de uma estação de tratamento de efluentes industrial (Lieshout, Holanda) constituída por três reatores UASB em paralelo seguido por um sistema Carrossel para nitrificação e desnitrificação, enriqueceu metanotróficas do gênero *Candidatus Methyloirabylis oxyfera*, que apresentaram abundância relativa de cerca de 60-70% da comunidade microbiana inserida no biorreator. Em pesquisas anteriores, culturas de *M.oxyfera* também haviam sido obtidas de amostra mista composta por sedimentos de água doce, lodo anaeróbio e lodo de retorno do sistema de lodos ativados (HU *et al.*, 2009), além de sedimentos de água doce da Holanda (RAGHOEBARSING *et al.*, 2006; ETTWIG *et al.*, 2009). Nesse sentido, como é possível verificar, o inóculo utilizado nas pesquisas que permitiram o enriquecimento de metanotróficas desnitrificantes, foram bem distintos e apresentavam condições para o desenvolvimento de bactérias desse filo, que, além do metano, necessitam de nitrito para a redução e retirada do oxigênio molecular do óxido nitroso. Assim, como no presente trabalho utilizou-se unicamente lodo de reator UASB proveniente de sistema de tratamento de esgoto doméstico, com quantidade quase nula de nitrito no interior da amostra, não foi possível o enriquecimento de bactérias do filo NC10. Além disso, as condições de operação do reator, conforme comentado anteriormente, ainda que controladas para manter anaerobiose, parecem ter resultado em condições anóxicas.

LUESKEN *et al.* (2011), avaliou a capacidade de *M.oxyfera* ser mantido sob condições microaerófilas (2 a 8% de oxigênio) e como resultado viu-se o efeito deletério ao metabolismo desse micro-organismo, sugerindo que condições anaeróbias estritas devem ser mantidas.

8.5.4 Considerações finais

Embora três técnicas distintas, PCR-DGGE, MiSeq/Illumina e Pirosequenciamento 454 tenham sido adotadas para análise da comunidade microbiana desenvolvida no RBS, algumas considerações podem ser feitas através da comparação das mesmas. Inicialmente, observou-se que, conforme esperado e devido às limitações da técnica, a PCR-DGGE recuperou baixo número de sequências, uma vez que depende da PCR e também da amplificação do DNA proveniente das bandas. O DGGE permite a separação de diferentes populações, mas sabe-se que devido à corrida eletroforética, gradiente desnaturante, algumas populações podem não ser bem separadas e isto poderia subestimar o número de populações quando o perfil da comunidade é avaliado através de programas de bioinformática, como o bionumerics. No que se refere ao sequenciamento de nova geração, ambas as técnicas MiSeq Illumina e Pirosequenciamento 454 recuperaram elevado número de sequências. Ressalta-se, porém que, o pirosequenciamento recuperou 13.681 sequências, ao passo que pelo MiSeq obteve-se 195.356 *reads*, confirmando o alto rendimento da última.

A utilização da PCR gera diferentes números de cópias do gene em cada reação, o que também é um fator limitante para se comparar a diversidade de espécies e/ou táxons recuperados pelas técnicas, uma vez que são necessárias várias amplificações. Nesse sentido, inclusive, uma mesma DGGE e/ou SNG com a mesma amostra de DNA, pode apresentar perfis de bandas diferentes, no caso da DGGE e diferentes OTUs, no caso do SNG.

Nessa pesquisa, os primers utilizados no DGGE, 1055-1392, amplificaram a região V8 do Domínio *Bacteria*, ao passo que os primers da técnica MiSeq Illumina, 515F e 926R, delimitaram a região V4-V5 da subunidade 16S do gene do RNA ribossomal de *Archaea* e *Bacteria*. Já os primers da técnica de Pirosequenciamento 454, 515F e 806R amplificaram a região V4 do RNAr 16S. Dessa forma, uma vez que cada iniciador apresenta especificidade distinta pelo DNAr 16S da amostra, era esperado que os resultados apresentassem diferenças entre si.

Ainda assim, verificou-se, que na maioria das amostras, independentes da técnica, a presença de metanotróficas foi observada. Pela DGGE, verificou-se nas amostras do inóculo, 191 dias e 417 dias de operação, a presença de metanotróficas (98% de similaridade com o gênero *Methylocaldum*). Por essa técnica, na amostra após 241 dias de cultivo, não foi possível detectar esse grupo. No entanto, pelo perfil de bandas, observou-se uma banda em posição similar àquela encontrada nas amostras anteriores e relacionada ao gênero *Methylocaldum*. No

entanto, quando o SNG Miseq Illumina foi adotado para a amostra do dia 241, recuperou-se elevado número de reads para *Methylocaldum* (8,2% de abundância), confirmando o alto poder de cobertura do SNG em comparação com a técnica de DGGE (que detecta somente os organismos mais dominantes). Pela plataforma MiSeq Illumina, os três períodos apresentaram a presença deste gênero e a amostra do dia 191 foi a que apresentou maior abundância (8,9%). Com 100 dias de cultivo, também observou-se pela técnica do pirosequenciamento, cerca de 2,5% de *Methylocaldum*. O pirosequenciamento avaliou as amostras do inóculo e 100 dias de operação, mas por esta técnica esse gênero não foi detectado na amostra do inóculo, o que poderia estar relacionado ao primer e ao PCR, conforme discutido anteriormente. A tabela 8.6 apresenta um resumo dos grupos de metanotróficas encontrados de acordo com as técnicas empregadas ao longo da operação completa do reator. A partir dos resultados apresentados na tabela 8.6 pode-se concluir que o objetivo de selecionar e cultivar microrganismos metanotróficos a partir de lodo de UASB foi alcançado, e que são necessários pelo menos de 6 a 8 meses para se obter elevada atividade metanotrófica e maior abundância desses microrganismos.

Tabela 8-6. Atividade metanotrófica e grupo de micro-organismos metanotróficos encontradas ao longo da operação do reator de acordo com as técnicas¹ adotadas.

Amostra/ técnica	Atividade Metanotrófica (mL.CH ₄ .gSTV ⁻¹ .dia ⁻¹)	DGGE	Pirosequenciamento	Miseq/Illumina
Inóculo	6	<i>Methylocaldum</i>	ANME (8,1%)	Não realizado
100 dias	-	Não realizado	<i>Methylocaldum</i> (2,5%) <i>Methylocystis</i> (0,2%) ANME (1,0%)	Não realizado
191 dias	17,3	<i>Methylocaldum</i>	Não realizado	<i>Methylocaldum</i> (8,9%) <i>Methylosinus</i> (0,76%) ANME (0,1%)
241 dias	15,4	-	Não realizado	<i>Methylocaldum</i> (8,2%) <i>Methylosinus</i> (2,3%) <i>Methylomonas</i> (0,02%) Filo NC10 (0,01%) ANME (0,01%)
417 dias	12	<i>Methylocaldum</i>	Não realizado	<i>Methylocaldum</i> (1,7%) <i>Methylosinus</i> (0,16%) <i>Methylomonas</i> (0,33%) <i>Methylococcales</i> (7%) <i>Methylacidiphilales</i> (0,8%); ^e

¹ A técnica da PCR também foi realizada para todos os dias amostrados com o primer para o grupo ANME. No entanto, apenas para o inóculo, dia 100 e 191, o grupo foi detectado, corroborando com os resultados obtidos pelo SNG.

Bactérias metanotróficas^a: *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylococcales* e *Methylacidiphilales*;

A tabela 8.7 apresenta os dados de atividade metanotrófica em molaridade comparados com as referências de ensaios de oxidação de metano encontrados na literatura.

Tabela 8-7. Atividade metanotrófica encontrada nos ensaios realizados comparados à literatura.

Amostras	Atividade metanotrófica	Condição descrita na literatura	Referência
Lodo de UASB - trabalho	240 $\mu\text{mol CH}_4.\text{gSTV}.\text{dia}^{-1}$		SINISCALCHI, 2015
Biomassa RBS – 191 dias	692 $\mu\text{mol CH}_4.\text{gSTV}.\text{dia}^{-1}$		SINISCALCHI, 2015
Biomassa RBS – 241 dias	616 $\mu\text{mol CH}_4.\text{gSTV}.\text{dia}^{-1}$		SINISCALCHI, 2015
Biomassa RBS – 417 dias	480 $\mu\text{mol CH}_4.\text{gSTV}.\text{dia}^{-1}$		SINISCALCHI, 2015
Amostras de solo	$1,0 \times 10^{-5}$ -0,00311 $\mu\text{mol CH}_4.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$	100-400ppm de CH_4 no headspace	KNIEF <i>et al.</i> , 2010
Sedimentos de valas agrícolas e de água doce	0,00018 $\mu\text{mol CH}_4.\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína ¹	2,5 a 10% de CH_4 a 30°C	ETTWIG <i>et al.</i> , 2009
Solo do ártico	0,0025-0,0075 $\mu\text{mol CH}_4.\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$	¹³ CH_4 sem meio mineral a 4°C	MARTINEAU <i>et al.</i> , 2010
Solo do ártico	0,0075 – 0,00115 $\mu\text{mol CH}_4.\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$	¹³ CH_4 sem meio mineral a 25°C	MARTINEAU <i>et al.</i> , 2010
Solo do ártico	0,1 $\mu\text{mol CH}_4.\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$	¹³ CH_4 com meio mineral a 4°C	MARTINEAU <i>et al.</i> , 2010
Solo do ártico	0,3-0,55 $\mu\text{mol CH}_4.\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$	¹³ CH_4 com meio mineral a 25°C	MARTINEAU <i>et al.</i> , 2010
Lodo granular de UASB tratando efluente industrial	11,4 $\mu\text{mol CH}_4.\text{gSTV}.\text{dia}^{-1}$	¹³ CH_4	MEULEPAS <i>et al.</i> , 2010
Lodo anóxico de sistema de lodos ativados Sistema OLAND	160000 $\mu\text{mol}.\text{gSSV}^{-1}$	25 a 28°C	HO <i>et al.</i> (2013)
	85000 $\mu\text{mol}.\text{gSSV}^{-1}$	25 a 28°C	HO <i>et al.</i> (2013)
Lodo de retorno de LA	34000 $\mu\text{mol}.\text{gSSV}^{-1}$	25 a 28°C	HO <i>et al.</i> (2013)
Lodo de digestores anaeróbios	22000 $\mu\text{mol}.\text{gSSV}^{-1}$	25 a 28°C	HO <i>et al.</i> (2013)

Pelos dados acima referenciados é possível verificar que a atividade metanotrófica encontrada se difere às demais. Mas comparando com o trabalho de Meuleupas *et al.* (2010), verifica-se que a atividade metanotrófica do lodo de reator UASB tratando esgoto doméstico (determinada no presente trabalho) foi 24 vezes maior em relação a atividade determinada para o lodo de reator UASB tratando efluente industrial. A atividade metanotrófica da biomassa enriquecida no experimento de cultivo foi cerca de 60 vezes maior em relação à atividade do lodo granular usado por Meuleupas, confirmando que de fato o cultivo selecionou microrganismos metanotróficos.

Os índices de diversidade analisados mostraram uma elevada diversidade em todas as amostras. No entanto, uma vez que a técnica do DGGE possui limitações como a migração não ideal das bandas, a análise da diversidade foi baseada nos resultados do MiSeq, que possibilitaram melhor cobertura da comunidade microbiana presente nas amostras.

Apesar das técnicas de sequenciamento massivo usarem plataformas diferentes (pirosequenciamento 454 e Miseq Illumina), foi possível observar que as amostras do inóculo e após 100 dias de cultivo (tabela 8.8), apresentaram maior riqueza e diversidade em relação às demais amostras, no entanto a abundância e a dominância foram inferiores. Neste primeiro momento havia uma comunidade rica em espécies e com uniformidade na distribuição dos indivíduos. Após 191 dias, observa-se um aumento na abundância e queda na riqueza, em comparação ao período anterior. Considerando a segunda fase do experimento (dias 191, 241 e 417), foi possível observar que a abundância foi decrescendo ao longo do período amostral, enquanto a riqueza oscilou entre os dias de amostragem, sendo maior no dia 241.

Tabela 8-8. Comparação entre os índices de diversidade encontrados no RBS ao longo de todo o período de operação.

	Pirosequenciamento		Miseq Illumina		
	Inóculo	RBS – 100 dias	RBS – 191 dias	RBS – 241 dias	RBS – 417 dias
Número de Sequências lidas	4843	8838	112839	62669	19849
Riqueza	201 OTUs	221 OTUs	95 OTUs	107 OTUs	88 OTUs
Shannon (H')	3,11 ($\pm 0,3$)	3,51($\pm 0,3$)	1,75 ($\pm 0,4$)	1,85 ($\pm 0,4$)	2,58 ($\pm 0,4$)
Simpson (1/D)	0,90 ($\pm 0,02$)	0,93 ($\pm 0,02$)	0,71($\pm 0,08$)	0,67 ($\pm 0,08$)	0,84 ($\pm 0,08$)
Chao 1	314	286	105	115	118

A sucessão ecológica ocorrida no reator em todos os períodos amostrados (inóculo, 100 dias, 191 dias, 241 dias e 417 dias) é apresentada na figura 8.7.

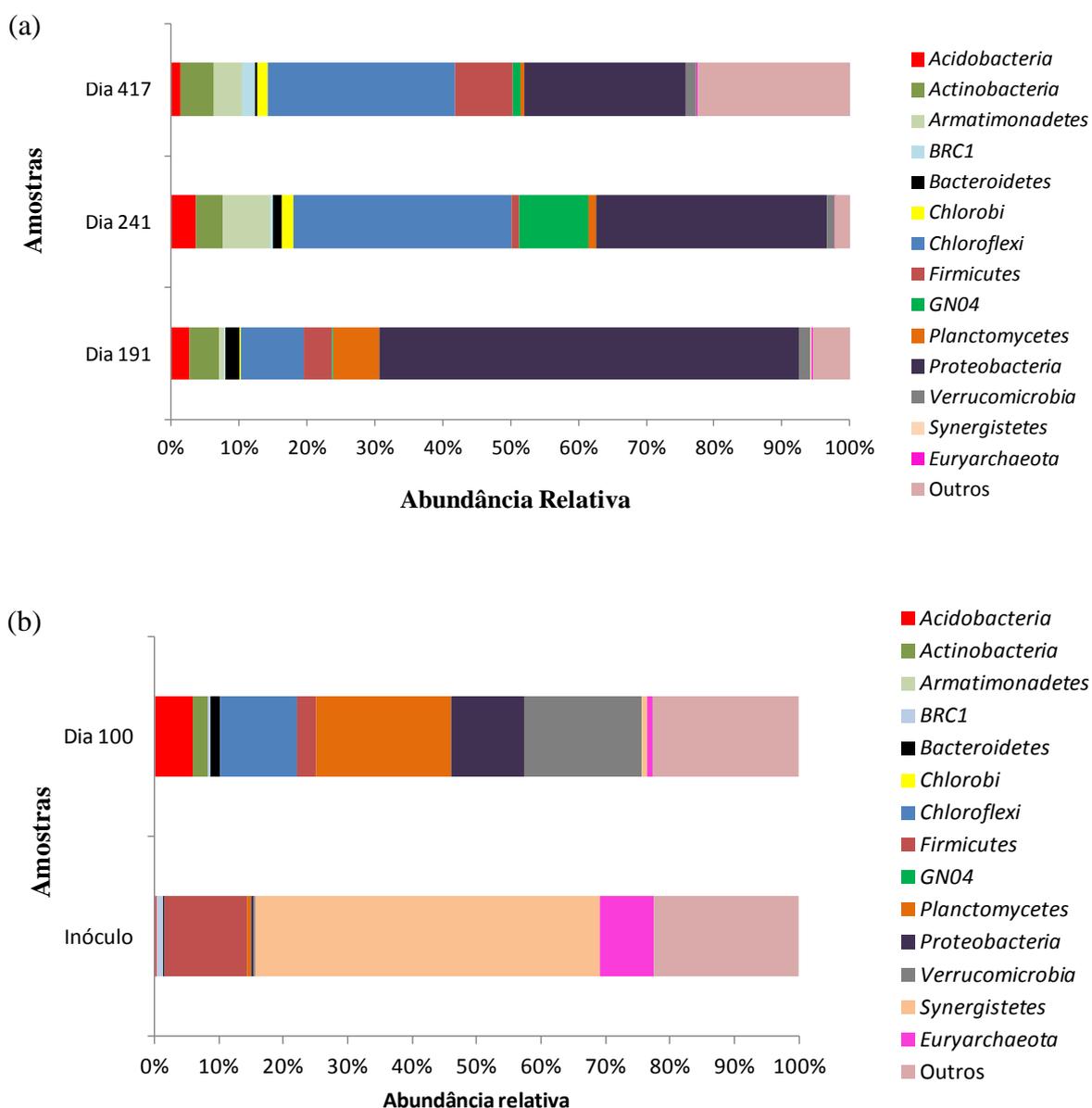


Figura 8-7. Filos mais abundantes (1%) no RBS ao longo do período operacional. Figura 8.7a: Dados obtidos pela plataforma Miseq Illumina. Figura 8.7b: Dados obtidos pelo Pirosequenciamento 454.

Ressalta-se, que os resultados obtidos serão aqui discutidos, mas como as técnicas utilizadas para verificar abundância nos diferentes períodos foram distintas, as abundâncias relativas não serão comparadas entre si. A composição da comunidade microbiana foi semelhante a trabalhos anteriores onde amostras de lodo de esgoto foram utilizadas. No inóculo usado no presente trabalho, lodo de reator UASB tratando esgoto doméstico, os filos dominantes foram *Synergistetes* e *Firmicutes*. Após 100 dias de cultivo, os filos predominantes passaram a ser *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia*. Apenas nesse último filo, há relatos de micro-organismos metanotróficos, conhecidos por habitarem ambientes extremos, tais como lavas vulcânicas. O gênero *Candidatus Methylocidiphillum* também foi detectado, porém em abundância menor

que 0,01% no período compreendido entre os dias 191 a 417 dias de cultivo no reator. O filo NC10 foi encontrado em baixa abundância (0,01%) após 191 dias de cultivo. Nos dias 191, 241 e 417, os filotaxas *Proteobacteria* e *Chloroflexi* foram dominantes, sendo que o filo *Proteobacteria* abriga os metanotróficos aeróbios detectados nesse trabalho como *Methylosinus*, *Methylomonas* e *Methylocaldum*, sendo o último dominante dentre os gêneros de metanotróficas. As OTUs relacionadas à arqueias metanotróficas, gêneros *Methanobacterium* e *Methanosaeta*, foram detectadas no inóculo. No entanto, após 417 dias de operação as abundâncias relativas desses gêneros foram reduzidas, sendo que a população de *Methanobacterium* desapareceu e a de *Methanosaeta* apresentou baixa abundância (0,25%). Tal fato poderia ser explicado pelas condições de operação do reator que, embora tenha sido controlada para anaerobiose, não manteve-se dessa forma e parece ter criado nichos microaerofílicos e anóxicos em seu interior, uma vez que possibilitou o enriquecimento de *Methylocaldum*, uma metanotrófica aeróbia e ainda manteve arqueias metanogênicas relacionadas ao grupo ANME. Após a coleta do dia 241 de operação, a vazão de metano foi aumentada e parece não ter sido favorável ao gênero *Methylocaldum*, uma vez que a abundância foi reduzida consideravelmente de 8,2% para 1,7%. Nesse sentido, conclui-se que as condições de operação do reator foram favoráveis à seleção de metanotróficas da classe *Gammaproteobacteria*, dentro dessa, o gênero *Methylocaldum* pôde ser encontrado em elevada abundância relativa, principalmente nos dias 191 e 241 de operação do reator, onde apresentaram-se com 8,9 e 8,2% de abundância. O período compreendido pelo dia 241 parece ter sido o mais favorável ao cultivo de metanotróficas, uma vez que também apresentou a maior taxa de oxidação anaeróbia do metano (SINISCALCHI *et al.*, 2015), além de outros filotaxas relacionados à metanotróficas, como o NC10, *Verrucomicrobia* com o gênero *C. Methylacidiphillum* e o gênero de arqueias metanogênicas relacionada à OAM, *Methanobacterium*.

A tabela 8.9 apresenta os diferentes grupos fisiológicos contidos no interior do reator e o somatório dos *reads* representantes de cada grupo. O detalhamento sobre a porcentagem de cada *read* é apresentada na tabela 12.4 (apêndice). A tabela 12.5 contida no apêndice complementa os dados e traz as OTUs com maior número de *reads* (abundância $\geq 1\%$)

Pela tabela 8.9, pode-se verificar a predominância de bactérias hidrolíticas e fermentadoras, seguido de arqueias metanogênicas no inóculo. Tal resultado é esperado, uma vez que são micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia da matéria orgânica que ocorre em lodos anaeróbios. Após 100 dias, a abundância dessas reduziu-se, uma vez que o meio não continha

fonte de carbono orgânico. Observa-se também, elevação da porcentagem de bactérias heterotróficas desnitrificantes. A abundância de metanotróficas nesse dia também começou a se elevar. No dia 191, verificou-se uma seleção de metanotróficas no interior do reator, onde o gênero dominante foi *Methylocaldum*. As condições parecem ter sido favoráveis às metanotróficas e desfavoráveis a outros grupos, o que poderia explicar a elevada abundância de bactérias heterotróficas e também de não sulfurosas no dia 191. Provavelmente neste período (dia 191) ainda tinha matéria orgânica no reator oriunda da morte e lise de células (SMP) e esses compostos deveriam estar sendo usados pelas BRS e heterotróficas desnitrificantes, visto que a abundância desses grupos foi elevada neste tempo. Bactérias púrpuras não sulfurosas podem consumir ácidos graxos de cadeia curta conforme descrito por OKUBO *et al.* (2006). É importante salientar que a biomassa do reator não apresentava-se com coloração rosada, apesar da presença dessas bactérias, pois o reator era coberto por uma manta aquecedora, sendo, portanto, protegido da luz natural. Após 241 dias, a abundância relativa de metanotróficas apresentou-se mais elevada, comparada aos demais períodos, decaindo um pouco no período final, após 417 dias de cultivo.

Tabela 8-9. Grupos fisiológicos presentes no interior do RBS ao longo da operação.

Abundância de micro-organismos (%)	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 417
Bactérias metanotróficas^a	0,00	2,69	9,67	10,95	7,95
Arquéias metanogênicas ^b	8,40	1,01	0,11	0,03	0,26
Bactérias redutoras de sulfato ^c	0,28	0,22	22,34	3,15	0,95
Bactérias hidrolíticas/fermentadoras ^d	54,86	9,50	4,16	1,78	13,23
Bactérias sintróficas acetogênicas ^e	0,02	0,01	0,31	0,02	0,02
Desnitrificantes heterotróficas ^f	0,04	4,98	12,41	2,66	1,43
Bactérias sulfurosas ^g	0,02	0,20	0,08	0,39	0,05
Bactérias não sulfurosas ^h	0,00	0,02	4,47	0,63	0,14

Os *reads* correspondentes às ordens, famílias e/ou gêneros abaixo especificados foram somados e a porcentagem total de cada grupo funcional é apresentada na tabela acima.

O grupo de metanotróficas, em negrito, representa o grupo de interesse nesse trabalho.

Bactérias metanotróficas^a: *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylococcales* e *Methylacidiphilales*;

Arquéias metanogênicas^b: *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Candidatus Methanoregula*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta*, *Methanomethylovorans* e *Methanosarcina*;

Bactérias redutoras de sulfato^c: *Desulfarculales*, *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales*, *Desulfuromonadales*, *Syntrophorhabdaceae* e *Syntrophobacterales*;

Bactérias hidrolíticas/fermentadoras^d: *Clostridiales*, *Flavobacterium*, *Schlesneria*, *Singulisphaera*, *Achromobacter*, *Comamonadaceae*, *Aminobacterium*, *Aminomonas*, *Synergistes*, *Cloacibacillus*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Prevotella*, *Caldilinea*, *Aminiphilus*, *Opitutus* e *Lactobacillus*;

Bactérias sintróficas acetogênicas^e: *Syntrophomonas*, *Smithella*, *Syntrophobacter*, *Syntrophus*;

Desnitrificantes heterotróficas^f e redutoras de nitrato¹ e nitrito²: *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Bradyrhizobium*, *Pseudoxanthomonas*, *Acidovorax*, *Variovorax*, *Thermomonas*, *Paracoccus*, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azospira*, *Dechloromonas*, *Planctomyces*¹, *Hyphomicrobium*¹ e *Pseudoxanthomonas*²;

Bactérias sulfurosas^g: *Cromatiales*, *Thiobacillus*, *Thiobacterales*, *Halothiobacillus*, *Chlorobiales*, *Thiotrichales* e *Sulfuricurvum*;

Bactérias não sulfurosas^h: *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Blastochloris*, *Rhodoplanes* e *Rhodopseudomonas*.

8.6 Conclusões

Os resultados desse estudo permitiram compreender a diversidade e dinâmica da comunidade microbiana presente no reator e verificar que, tanto metanotróficos aeróbios como anaeróbios foram enriquecidos. Os filos mais abundantes identificados nas amostras a partir do sequenciamento de nova geração pela plataforma MiSeq foram *Proteobacteria* (40%), *Chloroflexi* (23%), *Firmicutes* (54%), *GN04* (4%), *Armatimonadetes* (3%), *Actinobacteria* (4%), *Planctomycetes* (3%), *Acidobacteria* (2%), *Bacteroidetes* (1%), *BRC1* (1%), *Chlorobi* (1%) e *Verrucomicrobia* (1%). Os filos que abrigam metanotróficas anaeróbias, tais como *Euryarchaeota* e *NC10*, estiveram presentes em baixa abundância (cerca de 0,2% e 0,01%). Dentro do filo *Proteobacteria*, os gêneros (previamente conhecidos) de metanotróficas aeróbias (*Methylocaldum*, *Methylosinus* e *Methylomonas*), foram identificados na biomassa do reator após 191 dias de cultivo, indicando que as condições foram seletivas, favorecendo esses grupos. *Methylocaldum* apresentou abundância relativa de 8,9% e 8,2% nos dias 191 e 241 de operação do reator, respectivamente, sugerindo que as condições de cultivo foram seletivas para este gênero e que o inóculo utilizado, lodo de reator UASB, foram adequados para a seleção de micro-organismos oxidadores de metano. A técnica da PCR-DGGE também recuperou bandas de elevada similaridade com o gênero *Methylocaldum*, nos períodos avaliados, confirmando os dados obtidos pelo SNG. A detecção de elevada abundância de sequências relacionadas ao filo *Chloroflexi*, que cada vez mais tem sido reportados em reatores anaeróbios e autotróficos, indica que o reator estava em condições anóxicas. Portanto, apesar das condições usadas no presente estudo terem sido específicas para organismos metanotróficos desnitrificantes, esses organismos não foram selecionados a partir do inóculo usado, mas sim bactérias metanotróficas conhecidos como aeróbias.

9 CONCLUSÕES GERAIS

As conclusões de acordo com cada objetivo específico serão aqui resumidas:

- ✓ **Objetivo 1** - Bactérias e arqueias metanotróficas foram encontradas nas amostras de lodo e/ou sedimentos provenientes de diferentes sistemas de tratamento de esgoto doméstico (reator UASB, *wetlands*, lagoas de polimento e lodo de recirculação de sistema de lodos ativados), indicando presença desses micro-organismos nas respectivas amostras. A partir dos resultados, o lodo de UASB foi escolhido para ser o inóculo usado no experimento de seleção e cultivo de micro-organismos metanotróficos anaeróbios.
- ✓ **Objetivo 2** - As condições mais adequadas para o teste de determinação do potencial de oxidação anaeróbia de metano foram estabelecidas. As melhores condições foram: lodo de UASB lavado, incubado com meio de cultura contendo nitrito e nitrato sob condições de agitação (250 rpm) a 30°C, e, adição de 20mL de metano na atmosfera do frasco. A concentração de STV foi estabelecida para 5g.L⁻¹ para que os ensaios a partir de lodos coletados de diferentes tempos fossem comparáveis. A atividade metanotrófica a partir de lodo de UASB foi determinada, sendo o valor médio obtido de 6 mLCH₄.g.STV⁻¹.dia⁻¹. No UASB em escala piloto utilizado, a oxidação do metano é responsável pelo consumo de 29% do metano presente no interior do sistema, mostrando que grande parcela do metano é oxidado biologicamente pelos micro-organismos metanotróficos e sua importância nesses sistemas.
- ✓ **Objetivo 3** - O cultivo de micro-organismos metanotróficos a partir de lodo de UASB como inóculo em RBS foi realizado e apresentou como filos dominantes após 100 dias de cultivo, *Planctomycetes* (21%), *Verrucomicrobia* (18%), *Chloroflexi* (12%) e *Proteobacteria* (11%). O gênero relacionado à arqueias ANME, *Methanobacterium* estiveram presentes em abundância relativa de 1%, além das bactérias metanotróficas *Methylocaldum*, *Methylocystis* e *Methylosinus*, que apresentaram proporção de 2,5%, 0,2% e 0,01%, respectivamente. Assim, é possível sugerir que as condições de cultivo foram seletivas para a biomassa de metanotróficas, favorecendo o enriquecimento desses grupos. A atividade metanotrófica anaeróbia da biomassa cultivada após 191 e 241 dias foi quase 2,5 vezes maior que a atividade metanotrófica do lodo de inóculo.
- ✓ **Objetivo 4** - Os resultados desse estudo permitiram compreender a dinâmica e composição da comunidade microbiana que se desenvolveu no reator ao longo de 13 meses de cultivo e verificar que, tanto metanotróficos aeróbios como anaeróbios estiveram presentes no reator. Ampla variabilidade de filos pôde ser observada ao

longo de todo o período de cultivo, sendo predominantes, ao final da operação, os filos *Chloroflexi* e *Proteobacteria*. Os gêneros *Methylocaldum*, *Methylosinus* e *Methylomonas* foram identificados na biomassa do reator após 6 e 8 meses de cultivo, indicando que as condições usadas foram seletivas a esses gêneros. Após 8 meses de cultivo a biomassa enriquecida apresentou cerca de 11% de bactérias metanotróficas, indicando o sucesso do enriquecimento e do lodo escolhido.

10 RECOMENDAÇÕES

A partir dessa pesquisa, propõe-se os seguintes trabalhos:

- ❑ Seleção e cultivo de micro-organismos metanotróficos utilizando-se como inóculo o lodo proveniente do sistema de lodos ativados, uma vez que ocorre a nitrificação e desnitrificação nesse sistema. A partir desse inóculo, seria favorável, o enriquecimento de metanotróficas desnitrificantes (filo NC10), o que não foi possível no presente estudo.
- ❑ A utilização de sedimentos de lagoas de polimento, que poderia ser um inóculo único, ou um composto, juntamente com o lodo de recirculação do sistema de lodos ativados. Em todos esses sistemas foram detectadas metanotróficas do grupo ANME através de PCR no presente estudo.
- ❑ Uma vez que PEREIRA *et al.* (2014) relataram a presença de metanotróficas desnitrificantes do filo NC10 em baixíssima abundância no interior de um reator *Anammox*, inoculado com amostra proveniente de lodos ativados, seria relevante avaliar a possibilidade de associar as condições da oxidação anaeróbia da amônia e a oxidação do metano dependente do nitrito (processo N-DAMO) em um mesmo reator utilizando-se amostra de lodos ativados a fim de selecionar micro-organismos relacionados ao processo *Anammox* e N-DAMO contribuindo, portanto, para a redução das perdas de amônia, nitrito e metano em efluentes. LUESKEN *et al.* (2011a) enriqueceram bactérias *Anammox* a partir de cultura de *M. oxyfera* que continha apenas parcela insignificante de bactérias *Anammox*. No entanto, a co-cultura foi proveniente de um inóculo misto composto de valas de drenagem de terras agrícolas, planícies de inundação e sistemas de tratamento de esgotos. Nesse sentido, a proposta de utilização desse lodo, que poderia ser coletando-se amostras nos tanques de lodos ativados e na linha de recirculação do lodo, seria relevante do ponto de vista do saneamento ambiental.
- ❑ Cultivar metanotróficas em condições aeróbias e implementar e validar um método para avaliar o potencial de oxidação aeróbia do lodo e espuma provenientes de reatores UASB tratando esgoto doméstico a fim de determinar o potencial de oxidação do metano em todo o sistema.
- ❑ Através da utilização de $^{13}\text{CH}_4$ e da técnica do DNA-SIP, realizar um estudo sobre os micro-organismos metabolicamente ativos relacionados ao processo de oxidação anaeróbia do metano presentes em lodo de reator UASB e outros sistemas de tratamento de esgoto doméstico.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, L. K.; HARADA, H.; OKUI, H. Treatment of dilute wastewater in a UASB reactor at a moderate temperature: Performance aspects. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 83, n. 2, p. 179-184, // 1997. ISSN 0922-338X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0922338X97835799> >.

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 21 ed. Washington, DC, USA, : 2005.

ARAÚJO, A. C. V. *Diversidade molecular de arqueias em sedimentos de rios da Amazônia e caracterização de espécies metanogênicas cultivadas*. . 2010. 124 (Doutorado). Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP, São Paulo.

BARNES, R. O.; GOLDBERG, E. D. Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology* v. 4, n. 5, p. 297-300, 1976. ISSN 0091-7613.

BENNER, J.; DE SMET, D.; HO, A.; KERCKHOF, F.-M.; VANHAECKE, L.; HEYLEN, K.; N., B. Exploring methane-oxidizing communities for the co-metabolic degradation of organic micropollutants. *Applied Microbiology Technology*, 2014.

BJÖRNSSON, L.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W.; BLACKALL, L. L. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*, v. 148, n. 8, p. 2309-2318, 2002.

BOETIUS, A.; RAVENSCHLAG, K.; SCHUBERT, C. J.; RICKERT, D.; WIDDEL, F.; GIESEKE, A.; AMANN, R.; JORGENSEN, B. B.; WITTE, U.; PFANNKUCHE, O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, v. 407, n. 6804, p. 623-626, 2000. ISSN 0028-0836.

BOGNER, J.; PIIPATTI, R.; HASHIMOTO, S.; DIAZ, C.; MARECKOVA, K.; DIAZ, L.; KJELDSSEN, P.; MONNI, S.; FAALJ, A.; GAO, Q.; ZHANG, T.; AHMED, M. A.; SUTAMIHARDJA, R. T.; GREGORY, R. Mitigation of global greenhouse gas emissions from waste: conclusions and strategies from the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Fourth Assessment Report. Working Group III (Mitigation). *Waste Management & Research*, v. 26, p. 11-32, 2008.

BORREL, G.; JE´ZE´QUEL, D.; BIDERRE-PETIT, C.; MOREL-DESROSIERS, N.; MOREL, J. P.; PEYRET, P.; FONTY, G.; LEHOURS, A. C. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology*, v. 162, p. 832 - 847, 2011.

BOWMAN, J. P.; SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic position of the family Methylococcaceae. . *Internacional Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology*, v. 45, p. 182-185, 1995.

BRASIL. *Inventário de emissões e remoções antrópicas de gases de efeito estufa não controlados pelo Protocolo de Montreal: Segunda Comunicação Nacional do Brasil à Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança de Clima.* . Brasília: 2010. 518p.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STAKEY, J. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. Two. The Proteobacteria – Part B: Gammaproteobacteria* USA: Springer, 2005a. 1102.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. Two. The Proteobacteria – Part C: The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria.* Second Edition. USA: Springer, 2005b.

BROWER, J. E.; ZAR, J. H. *Field & laboratory methods for general ecology.* Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown 1984. 226p.

CAKIR, F. Y.; STENSTROM, M. K. Greenhouse gas production: A comparison between aerobic and anaerobic wastewater treatment technology. *Water Research*, v. 39, p. 4197-4203, 2005.

CAPORASO, G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.; COSTELLO, E.; FIERER, N.; PENA, A.; GOODRICH, J.; GORDON, J.; HUTTLEY, Y. G.; KELLEY, S.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.; LEY, R.; LOZUPONE, C.; MC DONALD, D.; MUEGGE, B.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.; TURNBAUGH, P.; WALTERS, W.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, v. 7, p. 335–336, 2010.

CARDINALI-REZENDE, J.; ARAÚJO, J. C.; ALMEIDA, P. G. S.; CHERNICHARO, C. A. L.; SANZ, J. L.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Organic loading rate and food-to-microorganism ratio shape prokaryotic diversity in a demo-scale up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating domestic wastewater. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 104, n. 6, p. 993-1003, 2013.

CASAMAYOR, E. O.; MUYZER, G.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and sequencing. *Aquatic microbial ecology*, v. 25, p. 237-246, 2001.

CASAMAYOR, E. O.; SCHAFFER, H.; BANERAS, L.; PEDROS-ALIO, C.; MUYZER, G. *Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.* 66: 499-508 p. 2000.

CHAN, A. S. K.; PARKIN, T. B. Evaluation of potential inhibitors of methanogenesis and methane oxidation in a landfill cover soil. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 32, p. 1581-1590, 2000.

CHERNICHARO, C. A. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores anaeróbios*. 2 edição. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA/UFMG, Belo Horizonte: Editora UFMG, 2007. 380p.

CHISTOSERDOVA, L.; VORHOLT, J. A.; THAUER, R. K.; LIDSTROM, M. E. C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea. *Science (New York, N.Y.)*, v. 281, n. 5373, p. 99, 1998. ISSN 0036-8075.

CHOWDHURY, T. R.; DICK, R. P. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. *Applied Soil Ecology*, v. 65, p. 8-22, 2013.

CONRAD, R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology*, v. 1, p. 285–292 2009.

COSTA, M. C.; CARVALHO, L.; LEAL, C. D.; DIAS, M. F.; MARTINS, K. L.; GARCIA, G. B.; MANCUELO, I. D.; HIPÓLITO, T.; MAC CONELL, E. F. A.; OKADA, D.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C. A.; ARAÚJO, J. C. Impact of inocula and operating conditions on the microbial community structure of two anammox reactors. *Environmental Technology*, v. 35, p. 1-12, 2014.

COSTA, M. C. M. S. *IMPACTO DO TIPO DE INÓCULO E DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS SOBRE A ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA E DESEMPENHO DO PROCESSO ANAMMOX EM BIOFILTROS USANDO ESPUMA DE POLIURETANO COMO MEIO SUPORTE DOS MICRORGANISMOS*. 2013. 107f (Doutorado). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CRUZ-MARTINEZ, K.; SUTTLE, K. B.; BRODIE, E. L.; POWER, M. E.; ANDERSEN, G. L.; BANFIELD, J. F. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. *ISME J.*, v. 3, p. 738-744, 2009.

CVEJIC, J. H.; BODROSSY, L.; KOVÁCS, K. L.; ROHMER, M. Bacterial triterpenoids of the hopane series from the methanotrophic bacteria *Methylocaldum* spp.: phylogenetic implications and first evidence for an unsaturated aminobacteriohopanepolyol. *FEMS Microbiology Letters* v. 182, p. 361-365, 2000.

DELFORNO, T. P. *Degradação de surfactante aniônico em reator EGSB sob condição metanogênica e ferro redutora com água residuária de lavanderia comercial*. 2014. 204 (Doutorado). Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.

DEMERGASSO, C. S.; GALLEGUILLOS P, P. A.; ESCUDERO G, L. V.; ZEPEDA A, V. J.; CASTILLO, D.; CASAMAYOR, E. O. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*, v. 80, n. 4, p. 241-253, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VBT-4HG6B0V-1/2/46adaf4cb78f0b16627f7e05814bb721> >.

DONACHIE, S. P.; HOU, S.; LEE, K. S. The Hawaiian archipelago: a microbial diversity hotspot. *Microbial Ecology*, v. 48, p. 509-520, 2004.

DONG, J.; DING, L.; WANG, X.; CHI, Z.; LEI, J. Vertical Profiles of Community Abundance and Diversity of Anaerobic Methanotrophic Archaea (ANME) and Bacteria in a Simple Waste Landfill in North China. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 175, p. 2729–2740, 2015.

DOWNING, J. A., Y. T. ; PRAIRIE, J. J.; COLE, C. M.; DUARTE, L. J.; TRANVIK, R. G.; STRIEGL, W. H.; MCDOWELL, P.; KORTELAJINEN, N. F.; CARACO, J. M.; MIDDELBURG, J. The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnology and Oceanography*, v. 51, p. 2388-2397, 2006.

DUNFIELD, P. F.; YURYEV, A.; SENIN, P.; SMIRNOVA, A. V.; STOTT, M. B.; HOU, S.; LY, B.; SAW, J. H.; ZHOU, Z.; REN, Y.; WANG, J.; MOUNTAIN, B. W.; CROWE, M. A.; WEATHERBY, T. M.; BODELIER, P. L.; LIESACK, W.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature*, v. 450, p. 879-882, 2007.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, v. 26, p. 2460-2461, 2010.

EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H.-R.; ZEHNDER, A. J. B.; WAGNER, M.; VAN DER MEER, J. R. Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start- Up of Nitrification Reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3213-3222, 2003a.

EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H.-R.; ZEHNDER, A. J. B.; WAGNER, M.; VAN DER MEER, J. R. Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start-Up of Nitrification Reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3213-3222, 2003b.

EL-FADEL, M.; MASSOUD, M. Methane emissions from wastewater management *Environmental Pollution*, v. 114, p. 177-185, 2001.

ETTWIG, K. F. *Nitrite-dependent methane oxidation*. 2010. 120 (Doctoral). Radboud University Nijmegen, Netherlands.

ETTWIG, K. F.; SHIMA, S.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; KAHNT, J.; MEDEMA, M. H.; OP DEN CAMP, H. J.; JETTEN, M. S.; STROUS, M. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environ Microbiol*, v. 10, n. 11, p. 3164-3173, Nov 2008. ISSN 1462-2920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721142>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2008.01724.x/abstract> >.

ETTWIG, K. F.; VAN ALEN, T.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; JETTEN, M. S.; STROUS, M. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 11, p. 3656-62, Jun 2009. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329658>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2687271/pdf/0067-09.pdf> >.

EVERSHED, R. P.; CROSSMAN, Z. M.; BULL, I. D.; MOTTRAM, H.; DUNGAIT, J. A. J.; MAXFIELD, P. J.; BRENNAND, E. L. ¹³C-Labeling of lipids to investigate microbial communities in the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17, p. 72–82, 2006.

FERRER, M.; GUAZZARONI, M.-E.; RICHTER, M.; GARCÍA-SALAMANCA, A.; YARZA, P.; SUÁREZ-SUÁREZ, A.; SOLANO, J.; ALCAIDE, M.; DILLEWIJN, P. V.; MOLINA-HENARES, M. A.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; AL-RAMAHI, Y.; GUERRERO, C.; ACOSTA, A.; EUGENIO, L. I. D.; MARTÍNEZ, V.; MARQUES, S.; ROJO, F.; SANTERO, E.; GENILLOU, O.; PÉREZ-PÉREZ, J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; RAMOS, J. L. Taxonomic and Functional Metagenomic Profiling of the Microbial Community in the Anoxic Sediment of a Sub-saline Shallow Lake (Laguna de Carrizo, Central Spain). *Microbial Ecology*, v. 62, n. 4, p. 824-837, 2011.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16 rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied Environmental Microbiology*, v. 62, p. 340-346, 1996.

FURUHATA, K.; MIYAMOTO, H.; GOTO, K.; KATO, Y.; HARA, M.; FUKUYAMA, M. *Roseomonas stagni* sp. nov., isolated from pond water in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 54, p. 167-171, 2008.

GAGLIANO, A. L.; D’ALESSANDRO, W.; TAGLIAVIA, M.; PARELLO, F.; QUATRINI, P. Methanotrophic activity and diversity of methanotrophs in volcanic geothermal soils at Pantelleria (Italy). *Biogeosciences*, v. 11, p. 5865–5875, 2014.

GALPERIN, M. Y. New feel for new phyla. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 1927-1933, 2008.

GANESAN, A.; CHAUSSONNERIE, S.; TARRADE, A.; DAUGA, C.; BOUCHEZ, T.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; SGHIR, A. *Cloacibacillus evryensis* gen. nov., sp. nov., a

novel asaccharolytic, mesophilic, amino-acid-degrading bacterium within the phylum 'Synergistetes', isolated from an anaerobic sludge digester. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 2003-2012, 2008.

GARCIA, G. P. P.; ARAÚJO, J. C. *Relatório de Validação do Protocolo para determinação do potencial de oxidação anaeróbia de metano. Protocolo da Rede PROSAB Microbiologia para o Saneamento Básico*. . Belo Horizonte: 14 p. 2011 (disponível em <http://www.prosabmicrobiologia.org.br/rede/protocolos>).

GARCIA, P. P. G. *Caracterização dos microrganismos oxidadores de sulfeto e metano em reator UASB*. 2009. 75 (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, DESA, UFMG, Belo Horizonte.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. *Phylum All. Euryarchaeota phy. nov.* In: (Ed.). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York: Springer 2001. p.211-355.

GERARDI, M. H. *Wastewater bacteria*. United States: 2006.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 733-739, 2005.

GREENFIELD, P. F.; BATSTONE, D. J. Anaerobic digestion: impact of future GHG mitigation policies on methane generation and usage. *ANAEROBIC DIGESTION*, 2004, Montreal. NRC & IWA. p.593-601.

GUJER, W.; ZEHNDER, A. J. B. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science Technology*, v. 65, p. 2030, 1983.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 60, n. 2, p. 439-471, 1996. ISSN 1092-2172 10922172.

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 54, p. 33-45, 2008.

HENKEL, T.; JACKEL, U.; SCHNELL, S.; CONRAD, R. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1801-1808, 2000.

HINRICHS, K. U.; HAYES, J. M.; SYLVA, S. P.; BREWER, P. G.; DELONG, E. F. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*, v. 398, n. 6730, p. 802-805, 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/19751> >.

HIRAYAMA, H.; ABE, M.; MIYAZAKI, M.; NUNOURA, T.; FURUSHIMA, Y.; YATAMOTO, H.; TAKAI, K. *Methylomarinovum caldicuralii* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a shallow submarine hydrothermal system, and proposal of the family Methylothermaceae fam. nov.

. *Int J Syst Evol Microbiology*, v. 3, p. 989-999, 2014

HO, A.; VLAEMINCK, S. E.; ETTWIG, K. F.; SCHNEIDER, B.; FRENZEL, P.; BOON, N. Revisiting Methanotrophic Communities in Sewage Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 8, p. 2841-2846, 2013.

HOLMES, A. J.; COSTELLO, A.; LINDSTROM, M. E.; MURRELL, J. C. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionary related. *FEMS Microbiol Letters*, v. 132, p. 203-208, 1995.

HU, S.; ZENG, R. J.; BUROW, L. C.; LANT, P.; KELLER, J.; YUAN, Z. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms. *Environ Microbiol Rep*, v. 1, n. 5, p. 377-84, Oct 2009. ISSN 1758-2229. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00083.x> >.

IPCC, I. P. O. C. C. The Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the IPCC. 2007.

ISLAM, T.; JENSEN, S.; REIGSTAD, L. J.; LARSEN, Ø.; BIRKELAND, N.-K. Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, p. 300-304, 2008.

JAGERSMA, G. C.; MEULEPAS, R. J. W.; HEIKAMP-DE JONG, I.; GIETELING, J.; KLIMIUK, A.; SCHOUTEN, S.; DAMSTE, J. S. S.; LENS, P. N. L.; STAMS, A. J. M. Microbial diversity and community structure of a highly active anaerobic methane-oxidizing sulfate-reducing enrichment. *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 12, p. 3223-3232, Dec 2009. ISSN 1462-2912. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273182500025

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2009.02036.x/abstract> >.

KALYUZHAYAYA, M. G.; PURI, A. W.; LIDSTROM, M. E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metabolic Engineering*, v. 29, p. 142-152, 2015.

KAMPMAN, C.; HENDRICKX, T. L. G.; LUESKEN, F. A.; VAN ALEN, T. A.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M.; ZEEMAN, G.; BUISMAN, C. J. N.; TEMMINK, H.;

VAN ALEN, T. A.; OP DEN CAMP, H. J. M. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low- temperature anaerobic sewage treatment. *Journal of hazardous materials*, v. 227-228, p. 164, 2012.

KELLER, J.; HARTLEY, K. Greenhouse gas production in wastewater treatment: process selection is the major factor. *Water Sci Technol*, v. 47, n. 12, p. 43-8, 2003. ISSN 0273-1223 (Print)0273-1223. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KIGHTLEY, D.; NEDWELL, D. B.; COOPER, M. Capacity for Methane Oxidation in Landfill Cover Soils Measured in Laboratory-Scale Soil Microcosms. *Appl Environ Microbiol*, v. 61, n. 2, p. 592-601, Feb 1995. ISSN 0099-2240 (Print)1098-5336 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/>

<http://aem.asm.org/content/61/2/592.full.pdf> >.

KIM, Y. H.; KANG, I.; BERGERON, H.; LAU, P. C. K.; ENGESSER, K. H.; KIM, S. J. Physiological, biochemical, and genetic characterization of an alicyclic amine-degrading Mycobacterium sp. strain THO100 isolated from a morpholine-containing culture of activated sewage sludge. *Archives of microbiology*, v. 186, p. 425–434, 2006.

KIP, N.; VAN WINDEN, J. F.; PAN, Y.; BODROSSY, L.; KEICHAART, G. S.; SMOLDERS, A. J. P. E. A. Global prevalence of methane oxidation by symbiotic bacteria in peatmoss ecosystems. *Nature Geoscience*, v. 3, p. 617-621, 2010.

KNIEF, C.; LIPSKI, A.; DUNFIELD, P. F. Diversity and Activity of Methanotrophic Bacteria in Different Upland Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 11, p. 6703-6714, 2003.

KNITTEL, K.; BOETIUS, A. Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annual Review of Microbiology*, v. 63, p. 311-334, 2009-09-08 2009. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.61.080706.093130> >.

KOLB, S.; KNIEF, C.; STUBNER, S.; CONRAD, R. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA – targeted real-time PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 5, p. 2423–2429, 2003.

KRAGELUND, C.; THOMSEN, T. R.; MIELCZAREK, A. T.; NIELSEN, P. H. Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 76, p. 451-462, 2011.

KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; BROWN, D. R.; HEDLUND, B. P.; PASTER, B. J.; WARD, N. L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. Four. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae and Planctomycetes*. Second. United States: Springer, 2010.

LANNA, L. C. O. *REMOÇÃO DE POLUENTES EM UM SISTEMA ALAGADO CONSTRUÍDO DE ESCOAMENTO VERTICAL COM ALIMENTAÇÃO EM PULSO*. 2013. (Mestrado). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LECLERC, M.; CÉLINE, D.; RENÉ, M.; JEAN-JACQUES, G. Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 34, n. 3, p. 213-220, 2001.

LECLERC, M.; DELGÈNES, J. P.; GODON, J. J. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 8, p. 809-819, 2004.

LEE, J. H.; KIM, T. G.; CHO, K. S. Isolation and characterization of a facultative methanotroph degrading malodor-causing volatile sulfur compounds. *Jornal of Hazardous Materials*, v. 15, n. 235-236, p. 224-229, 2012.

LEE, K. C.; WEBB, R. I.; JANSSEN, P. H.; SANGWAN, P.; ROMEO, T.; STALEY, J. T.; FUERST, J. A. Phylum Verrucomicrobia representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum Planctomycetes. *BMC Microbiology*, v. 8, n. 9, p. 5, 2009.

LEE, K. C. Y.; HERBOLD, C. W.; DUNFIELD, P. F.; MORGAN, X. C.; MCDONALD, I. R.; STOTTA, M. B. Phylogenetic Delineation of the Novel Phylum Armatimonadetes (Former Candidate Division OP10) and Definition of Two Novel Candidate Divisions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 7, p. 2484–2487, 2013.

LEOTTI, V. B.; BIRCK, A. R.; RIBOLDI, J. *Comparação dos Testes de Aderência à Normalidade Kolmogorov-smirnov, AndersonDarling, Cramer–Von Mises e Shapiro-Wilk por Simulação*. 11º Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agronômica e a 50ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria (RBRAS) Londrina, PR, Brasil 2005.

LIEBERMAN, R. L.; ROSENZWEIG, A. C. Biological Methane Oxidation: Regulation, Biochemistry, and Active Site Structure of Particulate Methane Monooxygenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 39, p. 147–164, 2004.

LIEBNER, S.; WAGNER, D. Abundance, Distribution and Potential Activity of Methane Oxidising Bacteria in Permafrost Soils from the Lena Delta, Siberia. *Environmental Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 107-117, 2007. Disponível em: < <http://epic.awi.de/13889/> >.

LINHARES, D. C. *Estudo da comunidade metanotrófica em amostras de manguezal de Bertioga, Estado de São Paulo, através da técnica de marcação de ácido nucleicos com isótopos estáveis (SIP-DNA)*. 2012. 91 (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology*, v. 2012, p. 1-11, 2012.

LIU, Y. *Methanopyrales*. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p.605-607.

LIU, Z.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F. D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 18, p. 1-10, 2007.

LOBATO, L. C. S. *APROVEITAMENTO ENERGÉTICO DE BIOGÁS GERADO EM REATORES UASB TRATANDO ESGOTO DOMÉSTICO*. 2011. 184f. (Doutorado). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LOMAN, N. J.; MISRA, R. V.; J., D. T.; CONSTANTINIDOU, C.; GHARBIA, S. E.; WAIN, J.; PALLEN, M. J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature biotechnology*, v. 30, p. 434-439, 2012.

LUESKEN, F. A. *Applied aspects of nitrite-dependent methane oxidation*. 2011. 124p. (PhD Thesis). Radboud University Nijmegen, Netherlands.

LUESKEN, F. A.; SÁNCHEZ, J.; VAN ALEN, T. A.; SANABRIA, J.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M.; KARTAL, B. Simultaneous Nitrite-Dependent Anaerobic Methane and Ammonium Oxidation Processes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 19, p. 6802-6807, 2011a.

LUESKEN, F. A.; VAN ALEN, T. A.; VAN DER BIEZEN, E.; FRIJTERS, C.; TOONEN, G.; KAMPMAN, C.; HENDRICKX, T. L.; ZEEMAN, G.; TEMMINK, H.; STROUS, M.; OP DEN CAMP, H. J.; JETTEN, M. S. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, n. 4, p. 845-854, 2011a.

LUESKEN, F. A.; WU, M. L.; OP DEN CAMP, H. J. M.; KELTJENS, J. T.; STUNNENBERG, H.; FRANCOIJS, K. J.; STROUS, M.; JETTEN, M. S. M. Effect of oxygen on the anaerobic methanotroph 'Candidatus Methyloirabialis oxyfera': kinetic and transcriptional analysis. *Environmental Microbiology*, v. 14, n. 4, p. 1024-1034, 2011b.

LUESKEN, F. A.; ZHU, B.; ALEN, T.; BUTLER, M. K.; DIAZ, M. R.; SONG, B.; OP DEN CAMP, H. J.; JETTEN, M. S.; ETTWIG, K. F. pmoA Primers for Detection of Anaerobic Methanotrophs. *Appl Environ Microbiol*, v. 77, p. 3877-3880, 2011b. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/77/11/3877>>

<http://aem.asm.org/content/77/11/3877.full.pdf> >.

LUO, C.; TSEMENTZI, D.; KYRPIDES, N.; READ, T.; KONSTANTINIDIS, K. T. Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. *PLoS ONE* v. 7, n. 2, p. 1-12, 2012.

MA, J.; WANG, Z.; YANG, Y.; MEI, X.; WU, Z. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput pyrosequencing. *Water Research*, v. 47, p. 859-869, 2013.

MAC CONELL, É. F. A. *Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbio*. 2014. 141 (Doutorado). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

MAGURRAN, A. E. *Measuring biological diversity*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. 256.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L. I.; JARVIER, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J. B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, v. 437, n. 15, p. 376-380, 2005.

MARTINEAU, C.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. Stable Isotope Probing Analysis of the Diversity and Activity of Methanotrophic Bacteria in Soils from the Canadian High Arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 17, p. 5773-5784, 2010.

MCDONALD, I. R.; BODROSSY, L.; CHEN, Y.; MURREL, J. C. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 5, p. 1305-1315, 2008.

MCDONALD, I. R.; BODROSSY, L.; CHEN, Y.; MURREL, J. C. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 1305-1315, 2008.

MCDONALD, I. R.; UPTON, M.; HALL, G.; PICKUP, R. W.; EDWARDS, C.; SAUNDERS, J. R.; RITCHIE, D. A.; MURREL, J. C. Molecular ecological analysis of methanogens and methanotrophs in blanket bog peat. *Microbial Ecology*, v. 38, n. 3, p. 225-233, 1999.

MEULEPAS, R. J. W.; JAGERSMA, C. G.; ZHANG, Y.; PETRILLO, M.; CAI, H. Z.; BUISMAN, C. J. N.; STAMS, A. J. M.; LENS, P. N. L. Trace methane oxidation and the methane dependency of sulfate reduction in anaerobic granular sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 72, n. 2, p. 261-271, 2010. ISSN 0168-6496. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1574-6941.2010.00849.x/asset/j.1574-6941.2010.00849.x.pdf?v=1&t=hxme9hw2&s=4d0d1b8d66823ded56af63572de976bd1171a387>>.

MURRELL, J., C.; JETTEN, M. S. M. The microbial methane cycle. *Environmental Microbiology Reports*, v. 1, n. 5, p. 279-284, 2009.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, p. 317-322, 1999.

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

NASCIMENTO, T. E. P. F. *LODO EM LAGOAS DE POLIMENTO: ACÚMULO E IMPLICAÇÕES NO COMPORTAMENTO HIDRODINÂMICO E NO DESEMPENHO DO SISTEMA*. 2014. 116f (Mestrado (Dissertação)). Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NAUHAUS, K.; TREUDE, T.; BOETIUS, A.; KRUGER, M. Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environ Microbiol*, v. 7, n. 1, p. 98-106, Jan 2005. ISSN 1462-2912 (Print)1462-2912. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00669.x>>.

NEEFS, J. M.; Y VAN DE PEER; P DE RIJK; CHAPELLE, S.; WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research*, v. 21, n. 13, p. 3025-3049, 1993.

NIEMANN, H.; T. LOSEKANN; D. DE BEER; M. ELVERT; T. NADALIG; K. KNITTEL; R. AMANN; E.J. SAUTER; M. SCHLUTER; M. KLAGES; J.P. FOUCHER; BOETIUS., A. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature*, v. 443, p. 854-858, 2006.

NIKIEMA, J.; BRZEZINSKI, R.; HEITZ, M. Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 6, n. 4, p. 261-284, 2007.

NOYOLA, A.; SAGASTUME, J. M. M.; HERNANDEZ, J. E. L. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy/resource recovery. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 5, p. 93-114, 2006.

OKUBO, Y.; FUTAMATA, H.; HIRAISHI, A. Characterization of phototrophic purple nonsulfur bacteria forming colored microbial mats in a swine wastewater ditch. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, p. 6225-6233, 2006.

OP DEN CAMP, H. J. M.; ISLAM, T.; STOTT, M. B.; HARHANGI, H. R.; HYNES, A.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M. S. M.; BIRKELAND, N.-K.; POL, A.; DUNFIELD, P. F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environmental Microbiology Reports*, v. 1, n. 5, p. 293-306, 2009a. ISSN 1758-2229. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x> >.

OP DEN CAMP, H. J. M.; ISLAM, T.; STOTT, M. B.; HARHANGI, H. R.; HYNES, A.; SCHOUTEN, S.; M., J. M. S.; K., B. N.; A., P.; F., D. P. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environmental Microbiology Reports*, v. 1, p. 293–306, 2009b.

ORPHAN, V. J.; HOUSE, C. H.; HINRICHS, K. U.; MCKEENGANS, K. D.; DELONG, E. F. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Microbiology*, v. 99, n. 11, p. 7663–7668, 2002.

OSUDAR, R.; MATOU, A.; ALAWI, M.; WAGNER, D.; BUSSMANN, I. Environmental factors affecting methane distribution and bacterial methane oxidation in the German Bight (North Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 160, p. 10-21, 2015.

PEREIRA, A. D. *CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA E AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FENOL EM UM REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL COM ATIVIDADE ANAMMOX*. 2013. 128 (Mestrado). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PEREIRA, A. D.; LEAL, C. D.; DIAS, M. F.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C. Effect of phenol on the nitrogen removal performance and microbial community structure and composition of an anammox reactor. *Bioresource Technology*, v. 166, p. 103-111, 2014.

POL, A.; HEIJMANS, K.; HARHANGI, H. R.; TEDESCO, D.; JETTEN, M. S. M.; OP DEN CAMP, J. M. Methanotrophy below pH1 by a new Verrucomicrobia species. *Environmental Microbiology*, v. 450, p. 874-878, 2007.

PORTILLO, M. C.; GONZALEZ, J. M. Members of the Candidate Division OP10 are spread in a variety of environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 347-353, 2008.

QUINCE, C. E. A. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC bioinformatics*, v. 12, n. 1, p. 38, 2011.

RAGHOEBARSING, A. A.; POL, A.; PAS-SCHOONEN, K. T. V. D.; SMOLDERS, A. J. P.; ETTWIG, K. F.; RIJPSTRA, W. I. C.; SCHOUTEN, S.; DAMST, J. S. S.; CAMP, H. J. M. O. D.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, v. 440, n. 7086, p. 918-921, 2006-04-13 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
<http://www.nature.com/nature/journal/v440/n7086/abs/nature04617.html> >.

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

REEBURGH, W. S. Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev*, v. 107, n. 2, p. 486-513, Feb 2007. ISSN 0009-2665 (Print)0009-2665. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1021/cr050362v>
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr050362v> >.

RHEE, T. S.; KETTLE, A. J.; ANDREAE, M. O. Methane and nitrous oxide emissions from the ocean: A reassessment using basin-wide observations in the Atlantic
JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH, v. 114, p. 1-20, 2009.

RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*, v. 11, p. 3-11, 2001.

SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 1101-1107, 2009.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Status of the Microbial Census. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, v. 68, n. 4, p. 686-691, 2004.

SCHUBERT, C. J.; COOLEN, M. J. L.; NERETIN, J., N.; SCHIPPERS, A.; ABBAS, B.; DURISCH-KAISER, E.; WEHRLI, B.; HOPMANS, E. C.; DAMSTÉ, J. S. S.; WAKEHAM, J.; KUYPERS, M. M. M. Aerobic and anaerobic methanotrophs in the Black Sea water column. *Environmental Microbiology*, v. 8, n. 10, p. 1844-1856, 2006.

SCRANTON, M. I.; MCSHANE., K. Methane fluxes in the Southern North Sea: the role of European rivers. *Continental Shelf Research*, v. 11, p. 37-52, 1991.

SEGHEZZO, L. *Anaerobic Treatment of domestic wastewater in subtropical regions*. 2004. 172 (Doutorado). Wageningen University, The Netherlands.

SEGHEZZO, L.; ZEEMAN, G.; VAN LIER, J. B.; HAMELERS, H. V. M.; LETTINGA, G. A. Review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, v. 65, p. 190-215, 1998.

SELA-ADLER, M.; HERUT, B.; BAR-OR, I.; ANTLER, G.; E., E.-R.; E., L.; MAKOVSKY, Y.; SIVAN, O. Geochemical evidence for biogenic methane production and consumption in the shallow sediments of the SE Mediterranean shelf (Israel). *Continental Shelf Research*, v. 101, p. 117–124, 2015.

SEMRAU, J. D.; DISPIRITO, A. A.; SUKHWAN, Y. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiology Review*, v. 34, p. 496-531, 2010.

SILVA, M. R. L. *Caracterização da comunidade microbiana de biofilme anaeróbio em presença de bifenilas policloradas*. 2012. 107 (Mestrado). Programa de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SINGH, K. S.; VIRARAGHAVAN, T. Start-up and Operation of UASB Reactors at 20° C for Municipal Wastewater Treatment. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 85, n. 6, p. 609-614, 1998.

SINGLETON, D. R.; FURLONG, M. A.; PEACOCK, A. D.; WHITE, D. C.; COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W. B. *Solirubrobacter pauli* gen. nov., sp. nov., a mesophilic bacterium within the Rubrobacteridae related to common soil clones. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 485–490, 2003.

SINGLETON, D. R.; RAMIREZ, L. G.; AITKEN, M. D. Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation Gene Cluster in a Phenanthrene-Degrading Acidovorax Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 9, p. 2613-2620, 2009.

SINISCALCHI, L. A. B.; VALE, I. C.; DELL'ISOLA, J.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C. Enrichment and activity of methanotrophic microorganisms from municipal wastewater sludge. *Environmental Technology*, v. 36, n. 12, p. 1-13, 2015.

SMEMO, K. A.; YAVITT, J. B. Anaerobic oxidation of methane: an underappreciated aspect of methane cycling in peatland ecosystems? *Biogeosciences*, v. 8, p. 779-793, 2011.

SOUZA, C. L. *Estudo das rotas de formação, transporte e consumo dos gases metano e sulfeto de hidrogênio resultantes do tratamento de esgoto doméstico em reatores UASB*. 2010. 127 (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A.; AQUINO, S. F. Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. *Water Science Technology*, v. 64, n. 11, p. 2259-2264, 2011.

SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A. L. *Methane losses in UASB reactors treating domestic wastewater: mass balance and possible improvements*. Proc. 10th IWA specialist conference on small water and wastewater treatment systems. Venice, Italia 2011.

SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A. L.; AQUINO, S. F. *Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions*. 12th IWA specialist conference on anaerobic digestion. Mexico 2010a.

SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A. L.; MELO, G. C. M. *Methane and hydrogen sulfide emissions in UASB reactors treating domestic wastewater*. Guadalajara, Jalisco – México: In: 12th WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION 2010b.

STAUFFERT, M.; CRAVO-LAUREAU, C.; JE´ZE´QUEL, R.; BARANTAL, S.; CUNY, P. Impact of Oil on Bacterial Community Structure in Bioturbated Sediments. *PLoS ONE* v. 8, n. 6, p. 1-15, 2013.

STOTHARD, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, v. 28, p. 1102-1104 2000.

STROUS, M.; HEIJNEN, J. J.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 50, p. 589-596, 1998.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* , v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TESSARO, S. *Estudo da comunidade de bactérias metanotróficas em uma cronossequência de solos da Amazônia*. 2012. (Master of Science). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

THEISEN, A. R.; ALI, M. H.; RADAJEWSKI, S.; DUMONT, M. G.; DUNFIELD, P. F.; MCDONALD, I. R.; DEDYSH, S. N.; MIGUEZ, C. B.; MURRELL, J. C. Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Molecular*

Microbiology, v. 58, n. 3, p. 682-692, 2005. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04861.x> >.

THOMSEN, T. R.; FINSTER, K.; RAMSING, N. B. Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 1646-1656, 2001.

TUOVINEN, H. O.; NICOMRATA., D.; DICKB., W. A. Microbial Populations Identified by Fluorescence In Situ Hybridization in a Constructed Wetland Treating Acid Coal Mine Drainage. *Journal of Environmental Quality*, v. 35 p. 1329-1337, 2006.

VALENTINE, D. L. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, n. 1-4, p. 271-282, 2002. ISSN 1572-9699. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1020587206351>

<http://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1020587206351.pdf>

<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1020587206351> >.

VAN ELSAS, J. D.; BOERSMA, F. G. H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, v. 47, n. 2, p. 77 - 87, 2011.

VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. *Tratamento Anaeróbio de Esgotos: Um Manual para Regiões de Clima Quente*. Campina Grande: Epgraf, 1994. 240p.

VAN TEESELING, M. C. F.; HARRY, R. A. P.; VAN DER ZWART, H. S.; JETTEN, M. S. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; VAN NIFTRIK, L. Expanding the Verrucomicrobial Methanotrophic World: Description of Three Novel Species of *Methylacidimicrobium* gen. nov. . *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 21, p. 6782– 6791, 2014.

VEILLETTE, M.; GIRARD, M.; VIENS, P.; BRZEZINSKI, R.; M., H. Function and limits of biofilters for the removal of methane in exhaust gases from the pig industry. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 94, p. 601-611, 2012.

VLAEMINCK, S. E.; TERADA, A.; SMETS, B. F.; DE CLIPPELEIR, H.; SCHAUBROECK, T.; BOLCA, S.; DEMEESTERE, L.; MAST, J.; BOON, N.; CARBALLA, M.; VERSTRAETE, W. Aggregate size and architecture determine microbial activity balance for one-stage partial nitrification and anammox. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 900–909, 2010.

VON SPERLING, M. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Belo Horizonte: 2005. 452.

VOS, P. D.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. Three. The Firmicutes. Second edition, Springer, USA.* 2009. 1422

WANG, X.; HU, M.; XIA, Y.; WEN, X.; DING, K. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 19, p. 7042-7047, 2012.

WHALEN, S. C.; REEBURGH, W. S.; SANDBECK, K. A. Rapid Methane Oxidation in a Landfill Cover Soil †. *Appl Environ Microbiol*, v. 56, n. 11, p. 3405-11, Nov 1990. ISSN 0099-2240 (Print)1098-5336 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/>

<http://aem.asm.org/content/56/11/3405.full.pdf> >.

WHITTENBURY, R.; KRIEG, N. R. *Methylococcacea fam. nov.*, In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: 1984.

WINTZINGERODE, F. V.; SELENT, B.; HEGEMANN, W.; GOBEL, U. B. Phylogenetic Analysis of an Anaerobic, Trichlorobenzene Transforming Microbial Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 1, p. 283-286, 1999.

ZANETTE, A. L. *Potencial de aproveitamento energético do biogás no Brasil*. 2009. 97p (Mestrado). Mestrado em Ciências em Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio De Janeiro.

ZEHNDER, A. J.; BROCK, T. D. Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J Bacteriol*, v. 137, n. 1, p. 420-32, Jan 1979. ISSN 0021-9193 (Print)1098-5530 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/>

<http://jb.asm.org/content/137/1/420.full.pdf> >.

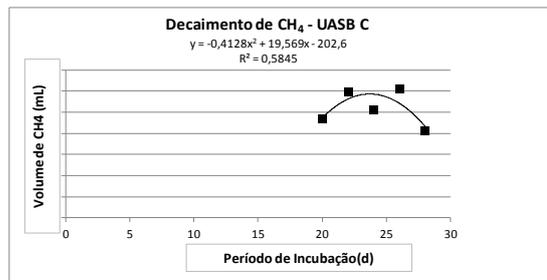
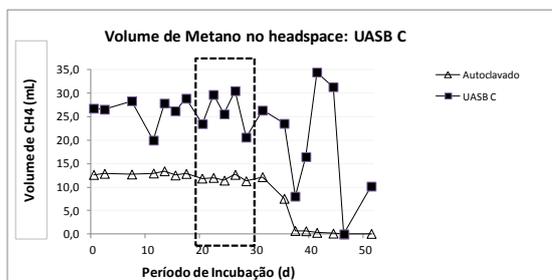
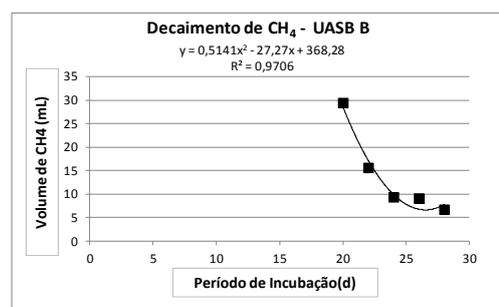
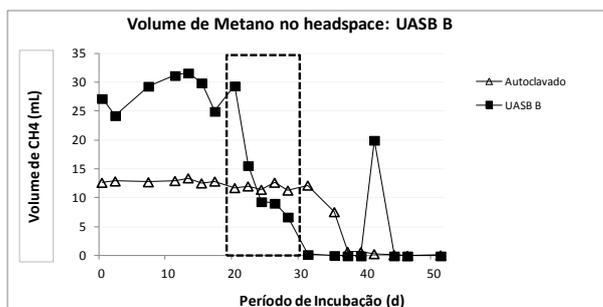
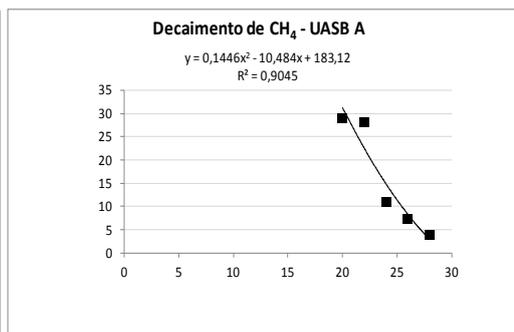
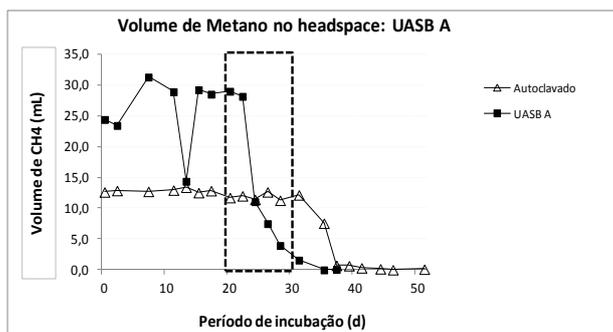
12 APÊNDICE

12.1 Resultados complementares – Capítulo 6

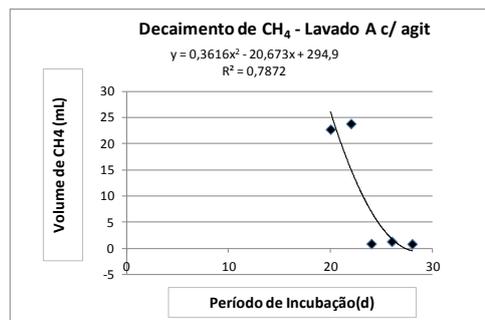
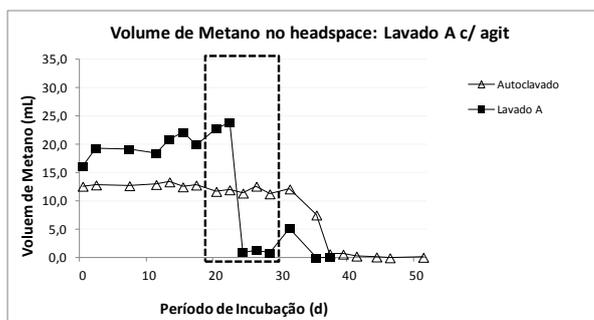
Gráficos de cada unicata dos Ensaio de Oxidação do Metano representando os pontos de decaimento e o ajuste dos pontos de decaimento como polinômio de ordem 2.

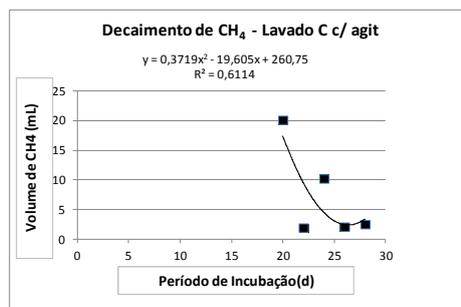
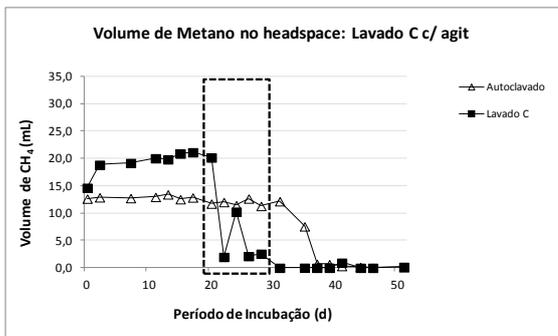
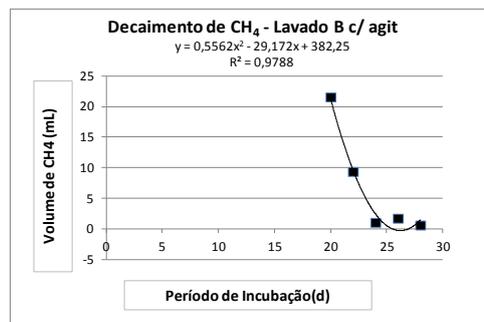
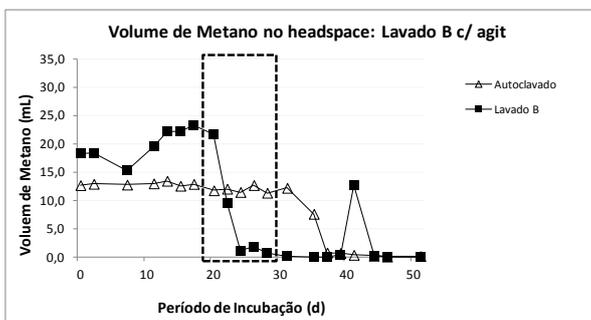
ENSAIO DE POTENCIAL DE OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DO METANO I – POAnM I

Lodo UASB não lavado A, B, C

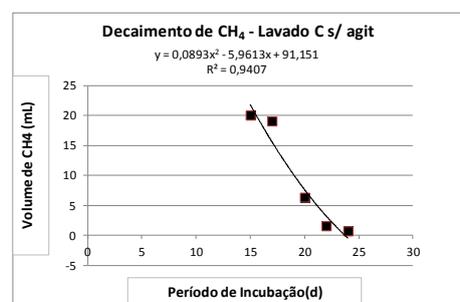
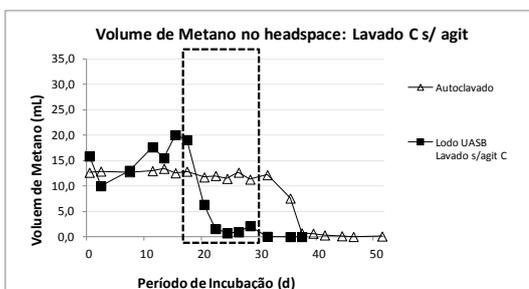
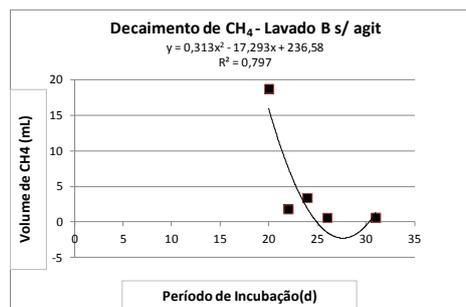
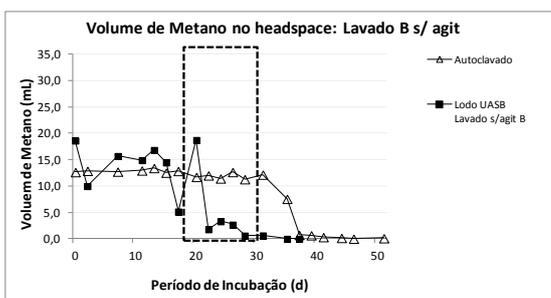
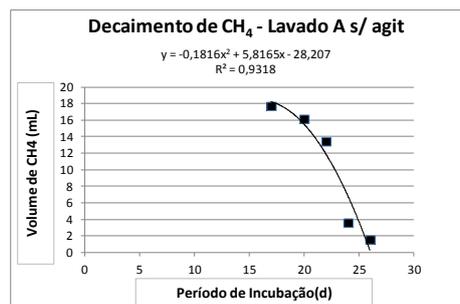
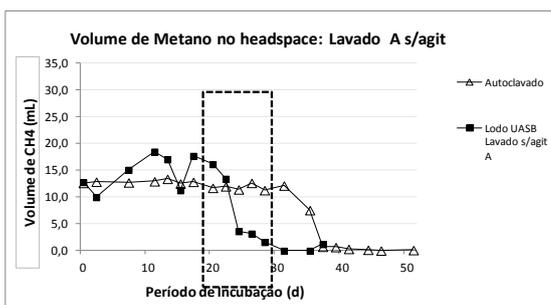


Lodo Lavado c/PBS sob condições de agitação A, B e C (250 rpm)



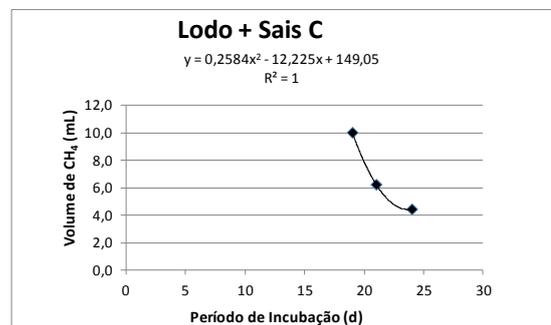
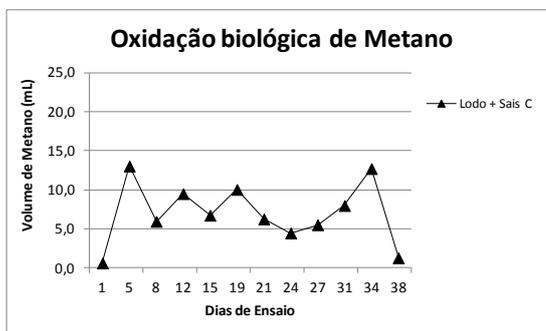
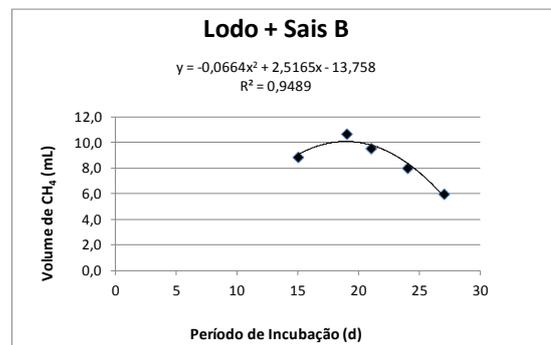
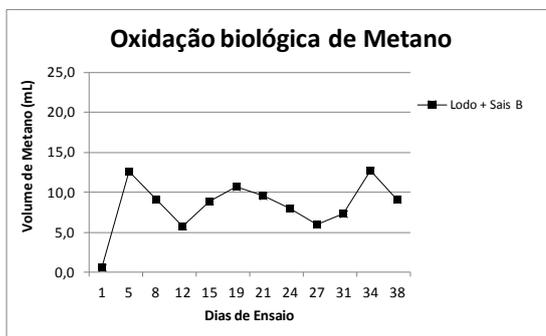
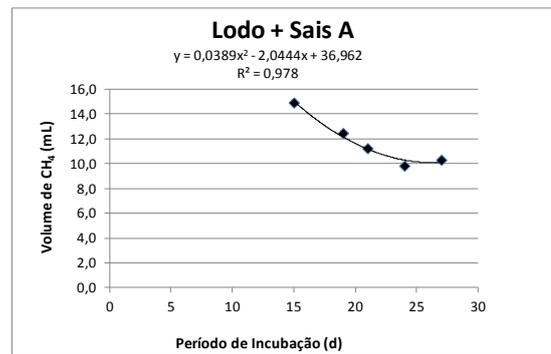
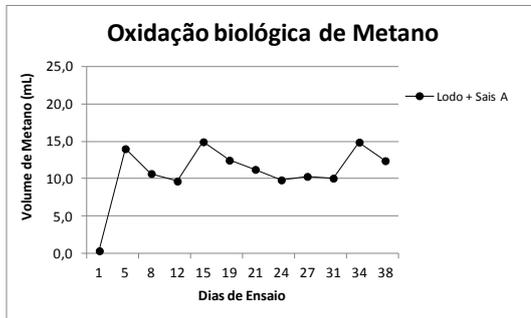


Lodo Lavado c/PBS sem agitação A, B e C

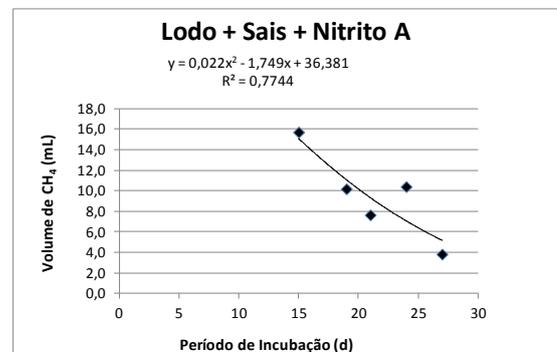
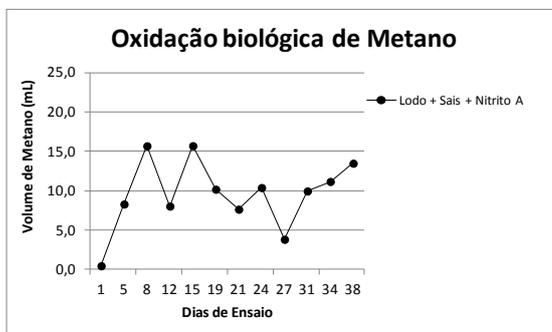


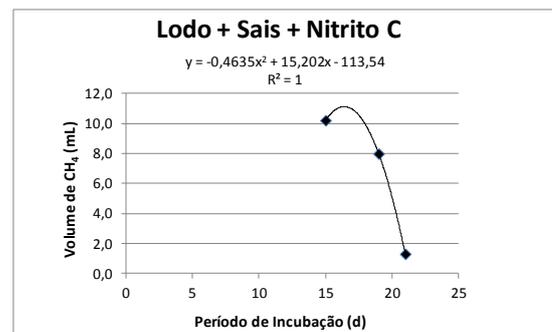
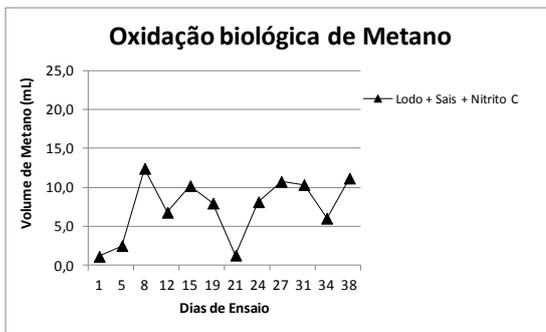
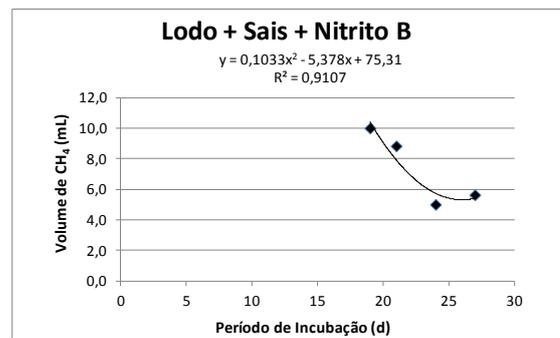
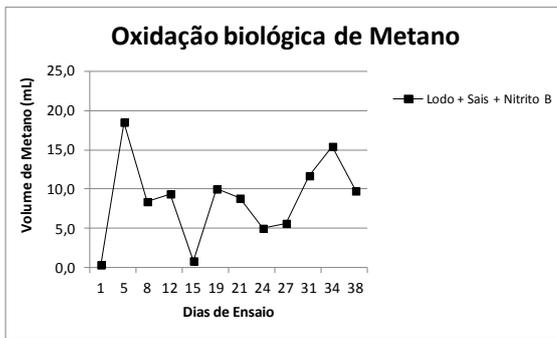
ENSAIO DE POTENCIAL DE OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DO METANO II – POAnM II

Lodo + Sais A, B e C

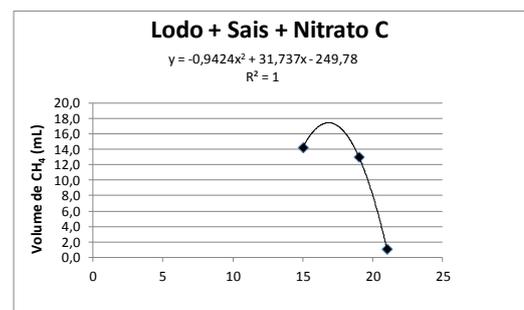
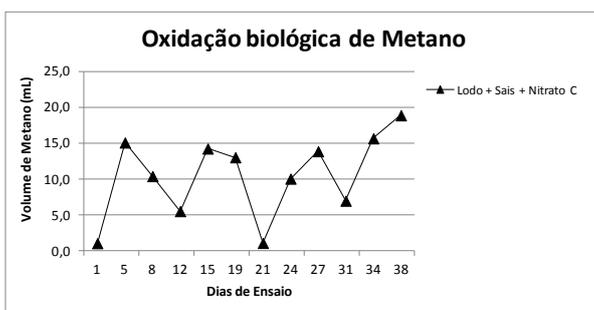
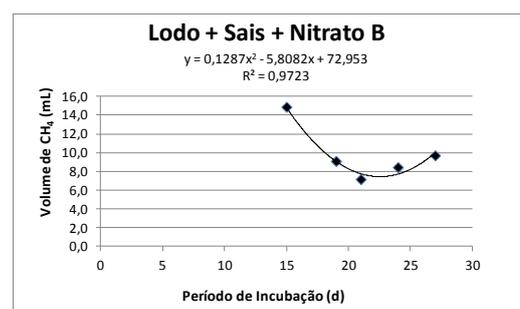
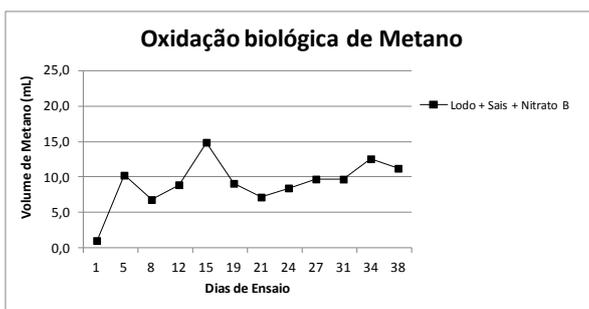
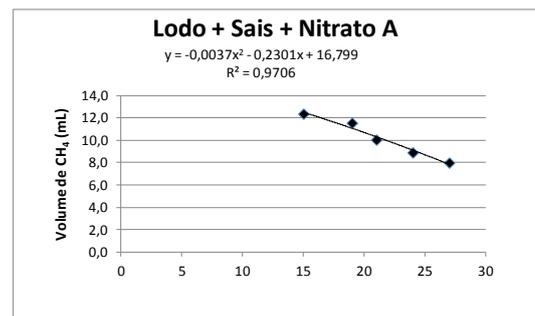
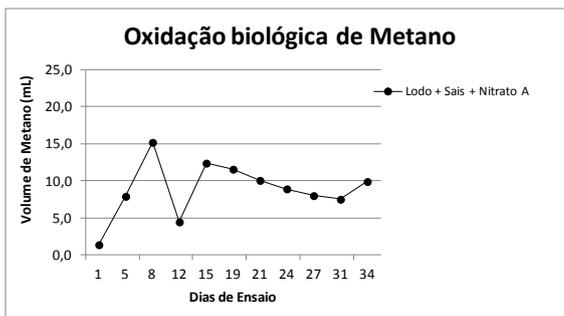


Lodo + Sais + Nitrito A, B e C



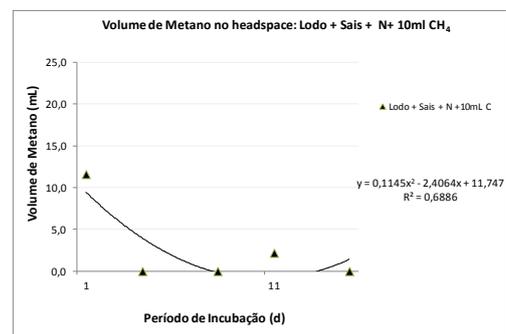
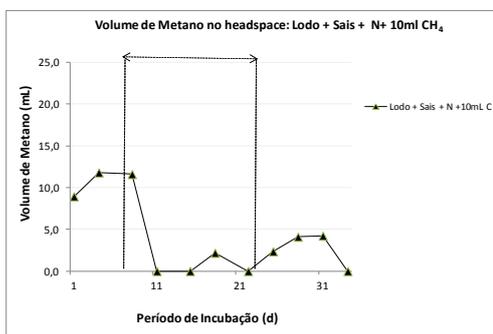
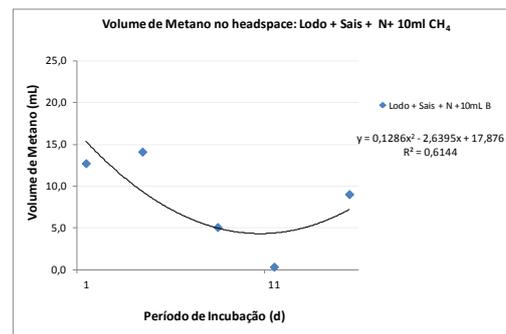
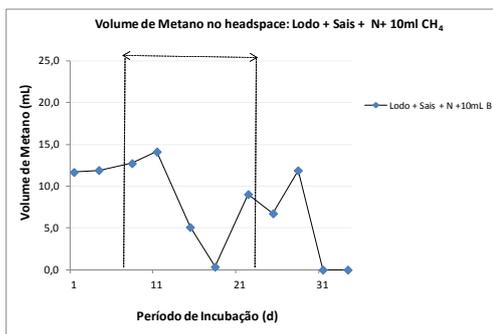
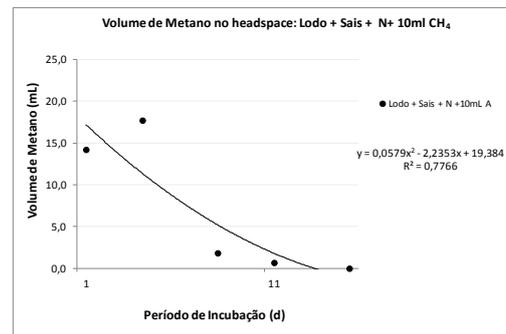
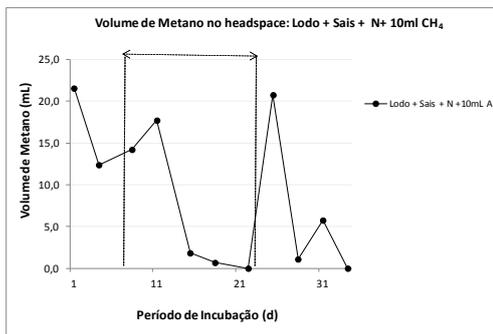


Lodo + Sais + Nitrato A, B e C

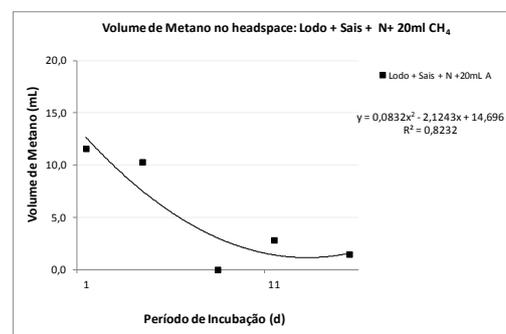
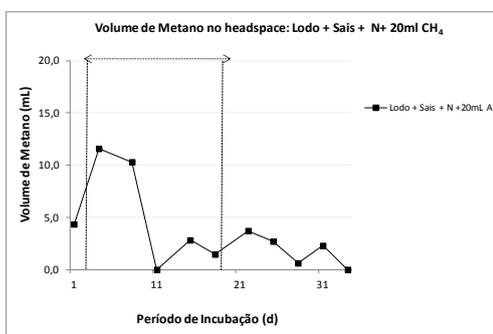


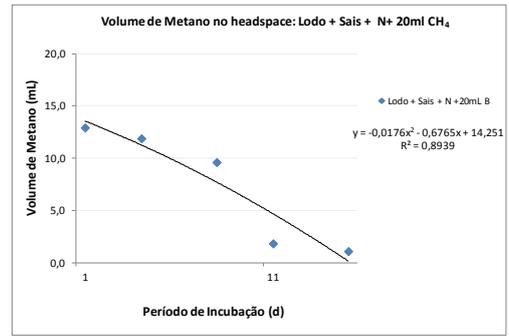
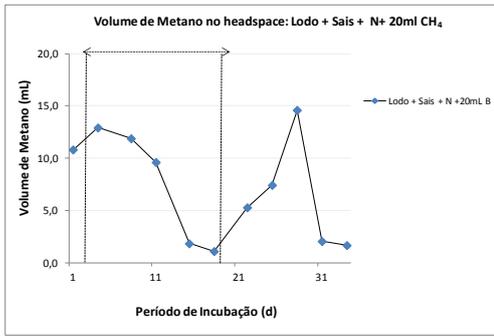
ENSAIO DE POTENCIAL DE OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DO METANO III – POAnM III

Lodo + Sais + N+ 10mL CH₄

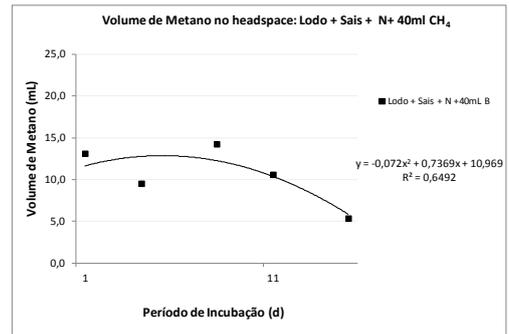
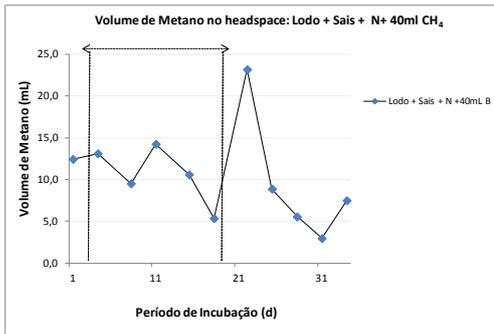
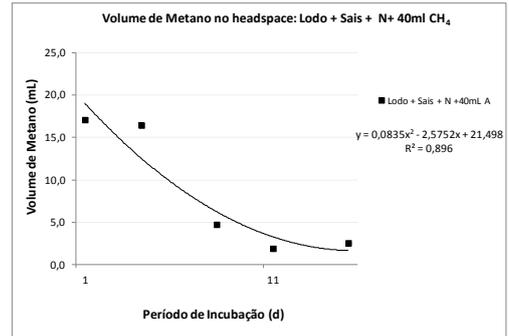
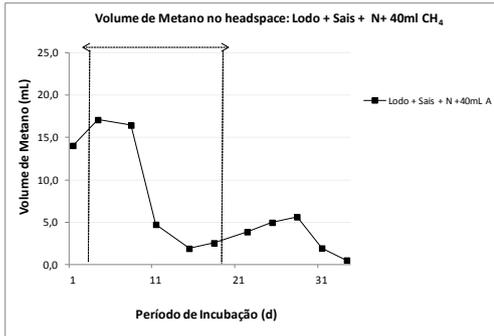


Lodo + Sais + N+ 20mL CH₄





Lodo + Sais + N+ 40mL CH₄



12.2 Resultados complementares – Capítulo 8

Tabela 12-1. Abundância relativa de todos os filós encontrados no interior do RBS ao longo de toda a operação do reator⁸.

Filo	Dia 191	Dia 241	Dia 417 ¹⁰
<i>Crenarchaeota</i>	0,00%	0,02%	0,00%
<i>Euryarchaeota</i>	0,11%	0,03%	0,26%
<i>Acidobacteria</i>	2,68%	3,53%	1,29%
<i>Actinobacteria</i>	4,39%	4,12%	4,98%
<i>Armatimonadetes</i>	0,61%	6,98%	4,07%
<i>BRC1</i>	0,20%	0,28%	1,93%
<i>Bacteroidetes</i>	2,15%	1,39%	0,38%
<i>Caldiserica</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Chlorobi</i>	0,28%	1,64%	1,52%
<i>Chloroflexi</i>	9,26%	32,18%	27,73%
<i>Cyanobacteria</i>	0,05%	0,15%	0,21%
<i>Deferribacteres</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Elusimicrobia</i>	0,01%	0,04%	0,00%
<i>FBP</i>	0,00%	0,07%	0,00%
<i>Firmicutes</i>	4,15%	1,21%	8,45%
<i>GN04</i>	0,17%	10,15%	1,02%
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,07%	0,57%	0,31%
<i>KSB3</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>NC10</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>NKB19</i>	0,05%	0,16%	0,01%
<i>Nitrospirae</i>	0,58%	0,18%	0,06%
<i>OP11</i>	0,00%	0,14%	0,01%
<i>OP3</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>OP8</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>OP9</i>	0,00%	0,00%	0,62%
<i>Armatimonadetes</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Planctomycetes</i>	6,82%	1,23%	0,73%
<i>Proteobacteria</i>	61,76%	33,92%	23,67%
<i>SBR1093</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Spirochaetes</i>	0,07%	0,04%	0,00%
<i>Synergistetes</i>	0,19%	0,02%	0,00%
<i>TM6</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>TPD-58</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Tenericutes</i>	0,66%	0,00%	0,00%
<i>Thermotogae</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Verrucomicrobia</i>	1,73%	1,17%	1,54%
<i>WPS-2</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>WS3</i>	0,01%	0,03%	0,00%
<i>WS6</i>	0,00%	0,00%	0,00%
Não classificados	3,99%	0,73%	21,19%

⁸ Resultado obtido pela plataforma Miseq do Illumina.

Tabela 12-2. Ordens obtidas através da plataforma Miseq Illumina nos dias 191, 241 e 417 amostrados do RBS. (Continua)

Ordem	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Methanobacteriales</i>	0,09%	0,01%	0,00%
<i>Methanomicrobiales</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Methanosarcinales</i>	0,01%	0,02%	0,26%
<i>E2</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>CCU21</i>	0,55%	0,92%	0,94%
<i>iii1-15</i>	0,01%	0,03%	0,01%
<i>Acidobacteriales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>MVS-40</i>	0,02%	0,04%	0,00%
<i>Holophagales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Solibacterales</i>	1,33%	0,19%	0,03%
<i>RB41</i>	0,69%	1,89%	0,27%
<i>SJA-36</i>	0,09%	0,46%	0,02%
<i>Acidimicrobiales</i>	0,19%	1,59%	0,68%
<i>Actinomycetales</i>	3,71%	0,22%	3,69%
<i>Coriobacteriales</i>	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Gaiellales</i>	0,33%	0,25%	0,07%
<i>Solirubrobacterales</i>	0,16%	2,04%	0,50%
<i>TP122</i>	0,01%	0,09%	0,02%
<i>Fimbriimonadales</i>	0,48%	6,62%	0,46%
<i>Bacteroidales</i>	0,22%	1,31%	0,24%
<i>Cytophagales</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Flavobacteriales</i>	1,88%	0,03%	0,13%
<i>Saprospirales</i>	0,05%	0,03%	0,01%
<i>Caldisericales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>WCHB1-02</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Chlorobiales</i>	0,01%	0,14%	0,03%
<i>Ignavibacteriales</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Anaerolineales</i>	0,84%	0,61%	0,74%
<i>Caldilineales</i>	0,10%	0,82%	0,08%
<i>S0208</i>	0,00%	0,01%	0,01%
<i>SBR1031</i>	1,41%	4,49%	2,44%
<i>envOPS12</i>	6,68%	25,04%	23,69%
<i>Dehalococcoidales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>AKYG885</i>	0,01%	0,02%	0,00%
<i>mle1-48</i>	0,01%	0,40%	0,04%
<i>MLE1-12</i>	0,04%	0,10%	0,01%
<i>Chlorophyta</i>	0,01%	0,05%	0,20%
<i>Euglenozoa</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Nostocales</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Chroococcales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Deferribacteriales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Elusimicrobiales</i>	0,00%	0,00%	0,00%

<i>Ordem</i>	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>MVP-88</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacillales</i>	0,00%	0,01%	0,01%
<i>Lactobacillales</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Turicibacterales</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Clostridiales</i>	4,06%	1,06%	8,41%
<i>MBA08</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Natranaerobiales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>OPB54</i>	0,06%	0,11%	0,01%
<i>SHA-98</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Thermoanaerobacterales</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Erysipelotrichales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>JH-WHS47</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Nitrospirales</i>	0,58%	0,18%	0,06%
<i>GIF10</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>OPB72</i>	0,00%	0,00%	0,62%
<i>Ucm1571</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>T8-B82</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>CL500-15</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>AKAU3564</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>MSBL9</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Phycisphaerales</i>	0,00%	0,02%	0,00%
<i>Pla1</i>	0,05%	0,17%	0,00%
<i>S-70</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>WD2101</i>	0,07%	0,10%	0,00%
<i>mle1-8</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Gemmatales</i>	0,01%	0,12%	0,02%
<i>Pirellulales</i>	5,90%	0,38%	0,09%
<i>Planctomycetales</i>	0,01%	0,17%	0,04%
<i>Brocadiales</i>	0,000%	0,001%	0,000%
<i>DH61</i>	0,00%	0,05%	0,00%
<i>BD7-3</i>	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Caulobacterales</i>	0,01%	0,05%	0,04%
<i>Kiloniellales</i>	0,01%	0,05%	0,01%
<i>Rhizobiales</i>	13,89%	3,71%	1,19%
<i>Rhodobacterales</i>	0,11%	0,02%	0,00%
<i>Rhodospirillales</i>	1,96%	1,65%	0,29%
<i>Rickettsiales</i>	0,00%	0,07%	0,01%
<i>Sphingomonadales</i>	0,07%	0,02%	0,01%
<i>ASSO-13</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Burkholderiales</i>	0,08%	0,72%	6,98%
<i>Hydrogenophilales</i>	0,00%	0,02%	0,01%
<i>Methylophilales</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Nitrosomonadales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Rhodocyclales</i>	7,27%	9,70%	4,64%
<i>SBl14</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>SC-I-84</i>	1,51%	1,09%	0,43%

<i>Ordem</i>	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Desulfarcucales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Desulfobacterales</i>	0,40%	0,28%	0,01%
<i>Thiobacterales</i>	0,00%	0,02%	0,00%
<i>Bdellovibrionales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Desulfovibrionales</i>	0,02%	0,31%	0,38%
<i>Desulfuromonadales</i>	0,00%	0,03%	0,00%
<i>GMD14H09</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>GW-28</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>MBNT15</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Myxococcales</i>	2,44%	0,11%	0,01%
<i>NKB15</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Syntrophobacterales</i>	21,92%	2,53%	0,55%
<i>Campylobacterales</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Aeromonadales</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Alteromonadales</i>	0,01%	0,04%	0,01%
<i>Chromatiales</i>	0,01%	0,08%	0,00%
<i>Enterobacterales</i>	0,00%	0,00%	0,26%
<i>HOC36</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Legionellales</i>	0,01%	0,01%	0,07%
<i>Methylococcales</i>	8,91%	8,19%	6,95%
<i>Oceanospirillales</i>	0,00%	0,00%	0,03%
<i>PYR10d3</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Pseudomonadales</i>	0,04%	0,01%	0,00%
<i>Thiotrichales</i>	0,06%	0,12%	0,00%
<i>Vibrionales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Xanthomonadales</i>	2,80%	4,98%	0,42%
<i>Marinicellales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>PHOS-HD29</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Sphaerochaetales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Spirochaetales</i>	0,01%	0,04%	0,00%
<i>Leptospirales</i>	0,06%	0,00%	0,00%
<i>Synergistales</i>	0,19%	0,02%	0,00%
<i>Acholeplasmatales</i>	0,66%	0,00%	0,00%
<i>Thermotogales</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Opitutales</i>	1,29%	0,21%	0,13%
<i>LD1-PB3</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>WCHB1-41</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Verrucomicrobiales</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Methylacidiphilales</i>	0,00%	0,45%	0,84%
<i>Methylacidiphilales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Pedosphaerales</i>	0,42%	0,41%	0,56%
<i>Chthoniobacterales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>GN03</i>	0,01%	0,03%	0,00%
<i>PBS-III-9</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Sediment-1</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cloacamonales</i>	0,00%	0,00%	0,00%
Não classificados	6,13%	15,10%	32,20%

Tabela 12-3. Gêneros obtidos através da plataforma Miseq Illumina nos dias 191, 241 e 417 amostrados do RBS. (Continua)

Gênero	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Methanobacterium</i>	0,09%	0,01%	0,00%
<i>Methanobrevibacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Candidatus Methanoregula</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Methanospirillum</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Methanosaeta</i>	0,00%	0,01%	0,25%
<i>Methanomethylovorans</i>	0,00%	0,01%	0,01%
<i>Methanosarcina</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Candidatus Koribacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Candidatus Solibacter</i>	0,02%	0,02%	0,01%
<i>Iamia</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Actinomyces</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Geodermatophilus</i>	0,00%	0,00%	0,05%
<i>Gordonia</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Phycoccus</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Microbacterium</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Salinibacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Catellatospora</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Pilimelia</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Mycobacterium</i>	0,00%	0,06%	3,58%
<i>Nocardia</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Rhodococcus</i>	3,66%	0,08%	0,01%
<i>Nocardioides</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Pimelobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Propionicimonas</i>	0,00%	0,03%	0,00%
<i>Propionibacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteroides</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Paludibacter</i>	0,00%	0,17%	0,00%
<i>Prevotella</i>	0,01%	0,00%	0,05%
<i>Blvii28</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Sporocytophaga</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Candidatus Amoebophilus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Crocinitomix</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Fluviicola</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Flavobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,13%
<i>Chryseobacterium</i>	1,88%	0,02%	0,00%
<i>Cloacibacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Sediminibacterium</i>	0,05%	0,01%	0,00%
<i>Caldisericum</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Chlorobaculum</i>	0,01%	0,14%	0,03%
<i>Anaerolinea</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>C1_B004</i>	0,01%	0,01%	0,00%
<i>Longilinea</i>	0,02%	0,11%	0,16%
<i>SHD-231</i>	0,00%	0,02%	0,00%

Gênero	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>T78</i>	0,00%	0,04%	0,07%
<i>WCHB1-05</i>	0,00%	0,02%	0,00%
<i>Caldilinea</i>	0,01%	0,10%	0,00%
<i>Acutodesmus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Alicyclobacillus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacillus</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Brevibacillus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Paenibacillus</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Lactobacillus</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Turicibacter</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Caldicoprobacter</i>	0,00%	0,02%	0,01%
<i>Clostridium</i>	0,01%	0,01%	0,03%
<i>Oxobacter</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>SMB53</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Sarcina</i>	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Dehalobacterium</i>	0,26%	0,01%	0,00%
<i>Anaerofustis</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Lutispora</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Anaerostipes</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Coprococcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Epulopiscium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Lachnospira</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Roseburia</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Desulfurispora</i>	0,07%	0,07%	0,02%
<i>Pelotomaculum</i>	0,00%	0,01%	0,01%
<i>Tepidibacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Oscillospira</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Ruminococcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Symbiobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Syntrophomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Acidaminococcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Sporomusa</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Anaerovorax</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Sedimentibacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Tissierella_Soehngenia</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Nitrospira</i>	0,58%	0,18%	0,06%
<i>Gemmata</i>	0,00%	0,02%	0,00%
<i>A17</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Pirellula</i>	0,02%	0,00%	0,00%
<i>Planctomyces</i>	0,01%	0,17%	0,04%
<i>Candidatus Brocadia</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Mycoplana</i>	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Chelatococcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Balneimonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%

<i>Gêneros</i>	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Bosea</i>	0,04%	0,07%	0,01%
<i>Bradyrhizobium</i>	0,01%	0,00%	0,11%
<i>Ochrobactrum</i>	0,01%	0,03%	0,00%
<i>Hyphomicrobium</i>	11,65%	0,41%	0,57%
<i>Parvibaculum</i>	0,00%	0,01%	0,02%
<i>Rhodoplanes</i>	0,76%	0,51%	0,11%
<i>Methylobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Methylosinus</i>	0,76%	2,30%	0,16%
<i>Pleomorphomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Mesorhizobium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Phyllobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Agrobacterium</i>	0,03%	0,00%	0,01%
<i>Kaistia</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Blastochloris</i>	0,01%	0,02%	0,00%
<i>Paracoccus</i>	0,09%	0,00%	0,00%
<i>Rhodobacter</i>	0,02%	0,00%	0,00%
<i>Azospirillum</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Magnetospirillum</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Oleomonas</i>	0,04%	0,45%	0,03%
<i>Phaeospirillum</i>	0,03%	0,08%	0,00%
<i>Acanthamoeba</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Prototheca</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Vermamoeba</i>	0,00%	0,07%	0,01%
<i>Novosphingobium</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Sphingobium</i>	0,04%	0,00%	0,00%
<i>Sphingomonas</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Achromobacter</i>	0,03%	0,09%	0,08%
<i>Pigmentiphaga</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Pandoraea</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Comamonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Methylibium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Ralstonia</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Thiobacillus</i>	0,00%	0,02%	0,01%
<i>Nitrosovibrio</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Azoarcus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Azospira</i>	0,11%	0,80%	0,03%
<i>Dechloromonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Dok59</i>	0,01%	0,01%	1,75%
<i>K82</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Propionivibrio</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Sterolibacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Sulfuritalea</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Thauera</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Bdellovibrio</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Desulfococcus</i>	0,25%	0,03%	0,00%
<i>Desulfobulbus</i>	0,00%	0,01%	0,00%

Gêneros	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Desulfomicrobium</i>	0,00%	0,04%	0,01%
<i>Desulfovibrio</i>	0,01%	0,27%	0,04%
<i>Geobacter</i>	0,00%	0,03%	0,00%
<i>Desulfobacca</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Desulfomonile</i>	0,02%	0,24%	0,03%
<i>Syntrophus</i>	0,31%	0,02%	0,01%
<i>Syntrophobacter</i>	0,25%	0,01%	0,35%
<i>Arcobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Sulfuricurvum</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Ruminobacter</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>HB2-32-21</i>	0,01%	0,02%	0,00%
<i>Pseudidiomarina</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Shewanella</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Halothiobacillus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Citrobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Serratia</i>	0,00%	0,00%	0,26%
<i>Legionella</i>	0,00%	0,00%	0,06%
<i>Tatlockia</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Methylocaldum</i>	8,89%	8,2%	1,73%
<i>Methylomonas</i>	0,00%	0,02%	0,33%
<i>Marinobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Acinetobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Perlucidibaca</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Pseudomonas</i>	0,03%	0,00%	0,00%
<i>Arenimonas</i>	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Lysobacter</i>	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,25%	0,63%	0,26%
<i>Stenotrophomonas</i>	0,03%	0,14%	0,02%
<i>Sphaerochaeta</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Treponema</i>	0,00%	0,04%	0,00%
<i>za29</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Aminiphilus</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>HA73</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>PD-UASB-13</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>vadinCA02</i>	0,19%	0,00%	0,00%
<i>E6</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Acholeplasma</i>	0,66%	0,00%	0,00%
<i>Fervidobacterium</i>	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Kosmotoga</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Opitutus</i>	1,29%	0,15%	0,09%
<i>Luteolibacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Verrucomicrobium</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Candidatus Methylocaldiphilum</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>W22</i>	0,00%	0,00%	0,00%
Não classificados	67,33%	83,77%	89,20%

Tabela 12-4. Grupos fisiológicos e porcentagem de cada *read* que compõe os grupos.

Bactérias Metanotróficas	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Methylosinus</i>	0,00%	0,00%	0,76%	2,30%	0,16%
<i>Methylocystis</i>	0,00%	0,2%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Methylococcales</i>	0,00%	2%	8,9%	8,2%	7,0%
<i>Methylacidiphilales</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,5%	0,8%
Somatório	0,0%	2,7%	9,7%	10,9%	8,0%
Arquéias Metanogênicas	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Methanobacterium</i>	8,05%	1,01%	0,09%	0,01%	0,00%
<i>Methanobrevibacter</i>	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Candidatus Methanoregula</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Methanospirillum</i>	0,10%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Methanosaeta</i>	0,19%	0,00%	0,00%	0,01%	0,25%
<i>Methanomethylovorans</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%
<i>Methanosarcina</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%
Somatório:	8,40%	1,01%	0,11%	0,03%	0,26%
Bactérias redutoras de sulfato	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Desulfarculales</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Desulfobacterales</i>	0,02%	0,00%	0,40%	0,28%	0,01%
<i>Desulfovibrionales</i>	0,20%	0,02%	0,02%	0,31%	0,38%
<i>Desulfuromonadales</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%
<i>Syntrophorhabdaceae</i>	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Syntrophobacterales</i>	0,02%	0,20%	21,92%	2,53%	0,55%
Somatório	0,28%	0,22%	22,34%	3,15%	0,95%
Bactérias hidrolíticas/fermentadoras	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Clostridiales</i>	6,63%	2,17%	4,06%	1,06%	8,41%
<i>Flavobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,13%
<i>Schlesneria</i>	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Singulisphaera</i>	0,00%	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Achromobacter</i>	0,00%	0,00%	0,03%	0,09%	0,08%
<i>Comamonadaceae</i>	0,04%	0,63%	0,04%	0,61%	4,56%
<i>Aminobacterium</i>	17,76%	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Aminomonas</i>	22,86%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Synergistes</i>	6,15%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cloacibacillus</i>	1,38%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteroides</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacillus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Escherichia</i>	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Prevotella</i>	0,0%	1,2%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>Caldilinea</i>	0,0%	2,3%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Aminiphilus</i>	0,00%	0,50%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Opitutus</i>	0,0%	2,3%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Lactobacillus</i>	0,02%	0,03%	0,01%	0,00%	0,00%
Somatório	54,86%	9,50%	4,16%	1,78%	13,23%
Bactérias sintróficas acetogênicas	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 400
<i>Syntrophomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Smithella</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

<i>Syntrophobacter</i>	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Syntrophus</i>	0,00%	0,00%	0,31%	0,02%	0,01%
Somatório	0,02%	0,01%	0,31%	0,02%	0,02%
Bactérias desnitrificantes/Redutoras de nitrito²/Redutoras de nitrito³	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 400
<i>Flavobacterium</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,13%
<i>Bacillus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%
<i>Clostridium</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,03%
<i>Comamonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Pseudomonas</i>	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%
<i>Ralstonia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bradyrhizobium</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,11%
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,00%	0,00%	0,25%	0,63%	0,26%
<i>Acidovorax</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Variovorax</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Thermomonas</i>	0,00%	0,12%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Paracoccus</i>	0,00%	0,00%	0,09%	0,00%	0,00%
<i>Azospirillum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Azoarcus</i>	0,0%	0,1%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Azospira</i>	0,0%	0,2%	0,11%	0,80%	0,03%
<i>Dechloromonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Planctomyces²</i>	0,0%	4,5%	0,0%	0,2%	0,0%
<i>Hyphomicrobium²</i>	0,0%	0,0%	11,6%	0,4%	0,6%
<i>Pseudoxanthomonas³</i>	0,0%	0,1%	0,25%	0,63%	0,26%
Somatório	0,04%	4,98%	12,41%	2,66%	1,43%
Bactérias sulfurosas	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Cromatiales</i>	0,02%	0,10%	0,01%	0,08%	0,00%
<i>Thiobacillus</i>	0,00%	0,10%	0,00%	0,02%	0,01%
<i>Thiobacteriales</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%
<i>Halotheiobacillus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Chlorobiales</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,14%	0,03%
<i>Thiotrichales</i>	0,00%	0,00%	0,06%	0,12%	0,00%
<i>Sulfuricurvum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
Somatório	0,02%	0,20%	0,08%	0,39%	0,05%
Bactérias não sulfurosas	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Rhodobacter</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%
<i>Rhodococcus</i>	0,00%	0,00%	3,66%	0,08%	0,01%
<i>Blastochloris</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	0,00%
<i>Rhodoplanes</i>	0,00%	0,00%	0,76%	0,51%	0,11%
<i>Rhodopseudomonas</i>	0,00%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%
Somatório	0,00%	0,02%	4,47%	0,63%	0,14%

Tabela 12-5. Número de reads apresentado pelas OTUs mais abundantes

OTUs	Número de reads				
	Pirosequenciamento 454		Miseq (Illumina)		
	Inóculo	Dia 100	Dia 191	Dia 241	Dia 417
<i>Planctomycetaceae</i>	0	1422			
<i>Pectinatus</i>	0	119			
<i>Opitutus</i>	0	180	5248	641	342
<i>Methylocaldum</i>	0	201	36264	34097	6841
<i>Methanobacterium</i>	101	1			
<i>Prevotella</i>	0	102	42	2	179
<i>Synergistes</i>	0	242			
<i>Aminobacterium</i>	860	0			
<i>Aminomonas</i>	1106	1			
<i>Planctomyces</i>	0	182			
<i>Synergistes</i>	55	0			
<i>Sphaerobacter</i>	0	764			
<i>Enterobacteriaceae</i>	0	95			
<i>Caldilinea</i>	0	207			
<i>Conexibacter</i>	0	144			
<i>Methanobacterium</i>	247	4			
<i>Sphaerobacter</i>	2	350			
<i>Prostheco bacter</i>	0	760			
<i>Planctomyces</i>	0	200	37	693	142
<i>Paludibacter</i>			18	706	17
<i>Flavobacterium</i>			12	2	520
<i>Chlorobaculum</i>			31	602	128
<i>Desulfurispora</i>			288	309	91
<i>Bosea</i>			162	302	50
<i>Hyphomicrobium</i>			47525	1728	2272
<i>Rhodoplanes</i>			3114	2136	420
<i>Methylosinus</i>			3083	9616	621
<i>Achromobacter</i>			133	392	314
<i>Azospira</i>			454	3332	106
<i>Desulfococcus</i>			1002	119	9
<i>Desulfovibrio</i>			28	1116	167
<i>Nannocystis</i>			4890	7	3
<i>Desulfomonile</i>			70	1004	104
<i>Syntrophus</i>			1281	67	50
<i>Syntrophobacter</i>			1009	39	1378
<i>Serratia</i>			2	14	1037
<i>Legionella</i>			2	3	257
<i>Methylomonas</i>			14	99	1315
<i>Pseudoxanthomonas</i>			1023	2618	1021
<i>Stenotrophomonas</i>			104	595	61
<i>Acholeplasma</i>			2680	4	0
<i>Methanosaeta</i>			4	25	977