

Rodrigo Mendonça de Lucena

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA DIVERSIDADE
MICROBIANA EM REATOR UASB
DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO**

**Recife
2008**

Rodrigo Mendonça de Lucena

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA DIVERSIDADE
MICROBIANA EM REATOR UASB
DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Jr.

Co-orientador:

Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos

**Recife
2008**

Lucena, Rodrigo Mendonça de.

Identificação Molecular da Diversidade Microbiana em Reator UASB de Estação de Tratamento de Esgoto / Rodrigo Mendonça de Lucena. – Recife: O Autor, 2008.

63 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Programa de Pós-Graduação em Genética, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Reator UASB. 2. rRNA 16S. 3. Tratamento de esgoto - estação. 4. Esgoto - microorganismos. 5. Bacteria, Archaea. I. Título.

628.32/.35

CDU (2.ed.)

UFPE

628.3

CDD (22.ed.)

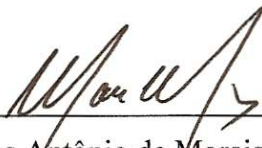
CCB – 2008-19

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA

Parecer da Comissão Examinadora da defesa de **Dissertação de Mestrado**, com área de concentração em Genética Molecular de Rodrigo Mendonça de Lucena, sob o título: “Identificação Molecular da Diversidade Microbiana em Reator UASB de Estação de Tratamento de Esgoto”. Tendo como orientador o Profº Drº Marcos Antônio de Moraes Júnior, Departamento de Genética - UFPE e, como co-orientadora a Profª Drª Sália Gavazza dos Santos Pessoa, Departamento de Engenharia Civil – UFPE.

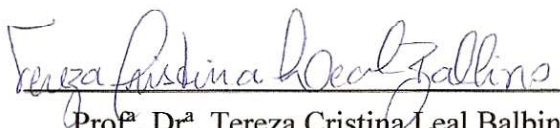
A Comissão Examinadora composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o candidato **Rodrigo Mendonça de Lucena, aprovado.**



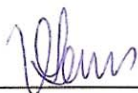
Profº. Drº. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Departamento de Genética - UFPE



Profº Drº. Valdir de Queiroz Balbino
Departamento de Genética - UFPE



Profª. Drª. Tereza Cristina Leal Balbino
Departamento de Microbiologia - CPqAM



Profª. Drª. Valdinete Lins da Silva
Departamento de Engenharia Química – UFPE

Recife, 15 de setembro de 2008

Dedico aos meus pais, Eliane e Manoel
pelo apoio incondicional
aos meus irmãos, Romualdo e Rodolfo
pelo companheirismo e momentos construtivos
e em especial a Suzana Pedroza pelo amor,
força, lealdade, amizade e por ter compartilhado
vários momentos de alegrias e alguns de aflições.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao professor Marcos Morais por sempre ter acreditado em meu potencial e por me inspirar como exemplo de competência, sabedoria, honestidade e ética profissional.
- ✓ A professora Sávia Gavazza por toda contribuição, confiança e apoio durante o período de convivência e trabalho.
- ✓ Ao professor Mário Kato por tudo que aprendi durante o período de pesquisa em seu laboratório.
- ✓ A professora Lourdinha Florêncio pelos ensinamentos em digestão anaeróbia.
- ✓ Ao professor Valdir Balbino pelas valiosas contribuições na Bioinformática.
- ✓ Ao professor Antônio Carlos pelas sábias palavras em momentos importantes.
- ✓ Ao professor Diogo Simões pela disponibilidade de seu laboratório para realização de parte deste trabalho.
- ✓ A Cássia e Viviane do Centro de Pesquisa AGGEU Magalhães pelo sequenciamento da diversidade dos rRNA 16S, ajuda fundamental para realização deste trabalho.
- ✓ A Edmilson Silva, operador da ETE – Mangueira, pela amizade e ajuda nas árduas coletas de lodo.
- ✓ A senhora Luzinete do Laboratório de Genética Humana, pela simpatia no fornecimento incansável de gelo.
- ✓ Ao Romildo e dona Zizi pelo o apoio em alguns momentos de execução do trabalho.
- ✓ As amigas que formei no Laboratório de Saneamento Ambiental que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.
- ✓ Aos vários amigos que fiz no departamento de genética e no Laboratório de Genética de Microrganismos, tais como: Theresa pelos valiosos ensinamentos em genética desde o início deste trabalho; a Fernanda e Rute por várias orientações fundamentais; ao Guilherme pela força; a Brígida pelas contribuições importantes; ao Esteban e Neto pelas discussões construtivas; a Luciana e Will pelo o apoio e momentos de descontração; e a todos os outros integrantes do laboratório sem exceções.
- ✓ A CAPES pela concessão de bolsa, fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Xote Ecológico

*“Não posso respirar, não posso mais nadar
A terra tá morrendo, não dá mais pra plantar
Se planta não nasce se nasce não dá
Até pinga da boa é difícil de encontrar
Cadê a flor que estava ali?Poluição comeu.
E o peixe que é do mar?Poluição comeu
E o verde onde que está?Poluição comeu
Nem o Chico Mendes sobreviveu”*

Luiz Gonzaga

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. A ÁGUA EM NOSSO PLANETA.....	4
3.1.1. Distribuição da água na Terra.....	4
3.1.2. Poluição das águas e saneamento.....	6
3.2. TRATAMENTO DO ESGOTO.....	7
3.2.1. Composição dos esgotos domésticos.....	7
3.2.2. Sistemas Anaeróbios.....	8
3.2.3. Reator UASB.....	9
3.2.4. Atividade Metanogênica Específica – AME.....	10
3.2.5. Etapas da digestão anaeróbia.....	12
3.2.5.1. Hidrólise.....	12
3.2.5.2. Acidogênese.....	12
3.2.5.3. Acetogênese.....	14
3.2.5.4. Metanogênese.....	14
3.3. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E GENÉTICOS	16
3.3.1. Os Três Domínios biológicos.....	16
3.3.2. Diversidade	19
3.3.3. Ferramentas genômicas para estudar a diversidade microbiana.....	24
3.3.4. O Gene 16S rRNA.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. COLETA DO LODO, DO AFLUENTE E EFLUENTE.....	29
4.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	30
4.2.1. Biomassa, Afluente e Efluente.....	30
4.2.2. Atividade Metanogênica Específica – AME.....	30
4.3. ANÁLISE GENÉTICA.....	32
4.3.1. Extração de DNA.....	32
4.3.2. PCR.....	33
4.3.3. Clonagem.....	34
4.3.3.1. Ligação.....	34
4.3.3.2. Células Competentes.....	34
4.3.3.3. Transformação.....	35
4.3.3.4. Extração dos plasmídeos (miniprep).....	35
4.3.4. Sequenciamento.....	36
4.3.5. Análise das Sequências do 16S rDNA.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	38

5.2. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO.....	39
5.3. DOMÍNIO BACTERIA.....	40
5.3.1. <i>Actinobacteria</i>	40
5.3.2. <i>Proteobacteria</i>	45
5.3.3. <i>Chloroflexi</i>	46
5.3.4. <i>Firmicutes</i>	46
5.3.5. <i>Bacteroidetes</i>	47
5.2. DOMÍNIO ARCHAEA.....	47
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

A água, depois de utilizada para o abastecimento público e nos processos produtivos, retorna com sua composição alterada, constituindo o esgoto. Os esgotos quando lançados aos corpos d'água sem tratamento adequado podem causar graves problemas de saúde pública e ambientais como a eutrofização. Reatores biológicos anaeróbios tipo UASB (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo) são uma alternativa interessante para o tratamento dos esgotos domésticos, combinando baixos custos de implantação e simplicidade operacional. No entanto, o sucesso do processo depende do tipo, adaptação e atividade da população microbiana presente em seu interior. Diante disto, este trabalho vem contribuir para o melhor entendimento do consorcio microbiano em reator tipo UASB para tratamento de esgoto, realizando a identificação dos microrganismos pertencentes aos domínios Bactéria e Archaea por meio da análise das seqüências dos genes rRNA 16S. Neste sentido, foram coletadas amostras de lodo dos cinco níveis do reator UASB localizado na ETE Mangueira, Recife/PE, para posterior extração de DNA. Em seguida foi realizada a clonagem e sequenciamento dos produtos de PCR provenientes dos genes rRNA 16S heterogêneos. A comparação das seqüências com os bancos de dados de rRNA 16S, NCBI e RDP, indicaram a ocorrência de representantes dos filos *Actinobacteria* (42%), *Proteobacteria* (13%), *Chloroflexi* (9%), *Firmicutes* (6%) e *Bacteroidetes* (4%) para o domínio Bacteria, e representantes das ordens *Methanomicrobiales* (43%), *Methanobacteriales* (17%) e *Methanosarcinales* (12%) para Archaea, distribuídos distintamente ao longo dos cinco níveis do reator. Do total das seqüências, 26% das de Bacteria e 17% das de Archaea não apresentaram similaridade com seqüências já conhecidas, levando a crer que possivelmente sejam pertencentes a microrganismos ainda não descritos.

Palavras-chave: UASB, esgoto, rRNA 16S, sequenciamento, Bacteria, Archaea.

ABSTRACT

The water, after used in public supply and productive process, return with its changed composition, forming the sewage. When the sewages are discharged within water courses, those can to cause serious problems at public health and environmental which Eutrophication. Biological anaerobes reactors kinds UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor) are interesting alternative for domestic wastewater treatment, joining low costs implantation and simplicity operation. However, the success in process is depending of kind, adaptation and activity of the microbial community present within reactor. In front this, the present study came to contribute to better understand about microbial consortium in UASB reactor for sewage treatment, realizing the identification of microorganisms pertaining at domains Bacteria and Archaea through analyses of sequences of genes 16S rRNA. In this sense, was colleted sludge samples along five reactor UASB levels placed in the Mangueira plant at Recife/PE, to DNA extraction later. After, was made the cloning and sequencing of the PCR products deriving from genes 16S rRNA heterogeneous. The sequences in comparison with the data banks of 16S rRNA, NCBI and RDP, showed incident of the representing from phylum *Actinobacteria* (42%), *Proteobacteria* (13%), *Chloroflexi* (9%), *Firmicutes* (6%) e *Bacteroidetes* (4%) to the domain Bacteria, and representing from order *Methanomicrobiales* (43%), *Methanobacteriales* (17%) and *Methanosarcinales* (12%) to Archaea, differently distribute along five reactor levels. Of the whole sequences, 26% from Bacteria and 17% from Archaea doesn't showed similarity with know sequences, suggesting that this sequences likely property the microorganisms not yet discovered.

Keywords: UASB, sewage, 16S rRNA, sequencing, Bacteria Archaea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.	Áreas de escassez física e econômica de água.....	5
Figura 3.2.	Esquema de um reator UASB.....	10
Figura 3.3.	Esquema representando as principais etapas do processo de digestão anaeróbia.....	13
Figura 3.4.	Esquema da árvore universal da vida baseada nas seqüências de rRNA, mostrando a relativa posição evolucionária dos grupos nos domínios Bacteria, Archaea e Eukarya.....	16
Figura 3.5.	Esquema de árvore universal da vida mostrando as relações filogenéticas e os eventos de transferência lateral de genes entre os três domínios.....	17
Figura 3.6.	Esquema mostrando o total de espécies e de registros de seqüências contidas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI.....	18
Figura 3.7.	A árvore filogenética apresenta 52 filos bacterianos.....	22
Figura 3.8.	Filogenia do domínio Archaea baseada no 16S rRNA de espécies cultiváveis e não cultiváveis.....	23
Figura 3.9.	Representação da estrutura secundária dos rRNAs da subunidade menor para os três domínios. Regiões escuras apontadas por setas em <i>Escherichia coli</i> ou em <i>Methanococcus vannielii</i> identificam os locais onde Bacteria e Archaea caracteristicamente divergem.....	27
Figura 3.10.	Localização das principais posições que distinguem Bacteria de Archaea na estrutura secundária do rRNA (rRNA de <i>Escherichia coli</i>).....	28
Figura 4.1.	Reator UASB. a) Parte superior e ao fundo a lagoa de tratamento. b) Tubulações de coleta e descarga de lodo. c) Leito de secagem de lodo. d) Vista lateral do reator UASB.....	29
Figura 4.2.	Esquema do sistema para o teste AME.....	31
Figura 5.1.	Foto de gel mostrando produtos de PCR provenientes da amplificação da região 16S do rRNA de Archaea e Bacteria.....	40
Figura 5.2.	Representação da distribuição dos filos do domínio Bacteria encontrados nos níveis A, B, C, D e E do reator UASB.....	41
Figura 5.3.	Representação da distribuição das ordens do domínio Archaea encontrados nos níveis A, B, C, D e E do reator UASB.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Distribuição da água em nosso planeta.....	4
Tabela 3.2.	Percentual de municípios, por condição de esgotamento sanitário, segundo as grandes regiões.....	7
Tabela 3.3.	Níveis de tratamento dos esgotos.....	8
Tabela 4.1.	Composição do reator para o teste AME.....	30
Tabela 4.2.	<i>Primers</i> universais para os domínios Bacteria e Archaea.....	33
Tabela 4.3.	Composição da reação de PCR.....	33
Tabela 4.4.	Programa da PCR para Bacteria e Archaea.....	34
Tabela 4.5.	Composição da reação de ligação.....	34
Tabela 4.6.	Soluções para extração plasmidial.....	36
Tabela 5.1.	Parâmetros físico-químicos de monitoramento do reator UASB.....	38
Tabela 5.2.	Valores de temperatura, pH, sólidos e Atividade Metanogênica Específica para o lodo do reator UASB.....	39
Tabela 5.3.	Resultados da busca por similaridade das seqüências de 16S rDNA para o domínio Bacteria, em relação ao banco de dados do NCBI.....	41
Tabela 5.4.	Resultados da busca por similaridade das seqüências de 16S rDNA para o domínio Archaea, em relação ao banco de dados do NCBI.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

IBGE	Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
16S rDNA	Ácido Desoxirribonucleico ribossômico 16S
16S rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico 16S
AGV	Ácido Graxo Volátil
BAC	cromossomos artificiais de bacteria
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CH ₄	Gás Metano
CO ₂	Dióxido de Carbono
d	Dia
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
H ₂	Gás Hidrogênio
KOH	Hidróxido de Potássio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO ₃ ⁻	Nitrato
O ₂	Gás Oxigênio
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Pernambuco
RDP	Ribosomal Dabase Project
SO ₄ ²⁻	Sulfato
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor – Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e manta de Lodo
YAC	Cromossomos artificiais de levedura

1. INTRODUÇÃO

A água é de fundamental importância para a manutenção da vida no planeta, porém apenas 0,8% da água disponível pode ser utilizada para abastecimento público e apenas 3% desta fração é de extração mais fácil. Esses valores ressaltam a grande importância de se preservar os recursos hídricos na Terra, e de se evitar a contaminação da pequena fração facilmente disponível.

A água é utilizada nas diversas atividades domésticas como: higiene pessoal, lavagem de utensílios de cozinha, roupas, carros, entre outras. O resultado dessas atividades é a produção das águas residuárias domésticas, o esgoto. No Brasil, segundo dados do IBGE, no ano 2000 dos 52,2% dos municípios que têm esgotamento sanitário 32 % têm serviço de coleta e 20,2% coletam e tratam o esgoto. Esses dados demonstram a grande necessidade pela busca de tecnologias de tratamento de esgotos adequadas à realidade brasileira.

Os esgotos domésticos são constituídos de aproximadamente 99,9% de água. O restante inclui sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, bem como microrganismos. É por causa destes 0,1% que é necessário o tratamento dos esgotos. O lançamento da matéria orgânica proveniente de esgoto em um corpo d'água, resulta em um excessivo consumo de oxigênio dissolvido por diversos microrganismos e conseqüente desequilíbrio ecológico.

Contudo, em decorrência da ampliação de conhecimento na área, os sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos, principalmente os que empregam os reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo, UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor), cresceram em maturidade, passando a ocupar uma posição de destaque no mundo e, principalmente no Brasil, face as nossas condições ambientais favoráveis.

No entanto, o sucesso de qualquer processo anaeróbio para tratamento de efluentes, especialmente os de alta taxa, depende fundamentalmente da manutenção dentro dos reatores de uma biomassa adaptada, com elevada atividade microbiológica e resistente a choques físico-químicos. Neste sentido, torna-se imperativo o estudo da ecologia microbiana para otimização do processo de digestão anaeróbia.

A digestão anaeróbia de compostos orgânicos complexos é normalmente considerada um processo de dois estágios onde no primeiro, um grupo de bactérias

facultativas e anaeróbias, pertencentes ao domínio Bacteria, convertem os orgânicos complexos em outros compostos como os ácidos voláteis. No segundo estágio ocorre a conversão dos ácidos orgânicos, CO₂, e H₂ em principalmente CH₄ e CO₂, pela ação de microrganismos metanogênicos pertencentes ao domínio Archaea.

Estimativas da diversidade de comunidades microbianas naturais tem tradicionalmente dependido do cultivo dos microrganismos, mas o resultado do uso de técnicas moleculares para avaliar a diversidade sugere que as culturas têm subestimado a diversidade de microrganismos existente.

Métodos moleculares de análise de DNA proporcionam ferramentas para avaliação da comunidade bacteriana por inteira, incluindo também aqueles microrganismos que não podem ser cultivados em laboratório. Desta maneira, estes métodos vêm crescendo cada vez mais em importância para o estudo de ecologia microbiana de diversos ambientes.

Uma das ferramentas genômicas para estudos da diversidade microbiana são os eficientes sistemas de clonagem “in vivo” (incluindo vetores de clonagem e hospedeiros). Estes sistemas permitem a separação e amplificação de seqüências individuais de DNA provenientes de amostras heterogêneas de genes.

A necessidade de identificação dos microrganismos para visualizar e comparar a complexidade das comunidades microbianas irá determinar a estratégia experimental mais apropriada a ser utilizada. Os microrganismos formadores de uma comunidade em certo ambiente são frequentemente identificados por meio da análise do gene 16S rDNA, que revelam melhor as relações evolutivas do que o uso das características fenotípicas clássicas, especialmente para microrganismos.

Para avaliação das comunidades microbianas, primeiramente, é feita: a extração do DNA total e em seguida realiza-se a PCR; os produtos de PCR são clonados em vetores, selecionados, e então sequenciados. Após o sequenciamento, é feita uma busca por homologia da seqüência em bancos de dados genômicos que possuem informações taxonômicas e filogenéticas da linhagem correspondente à seqüência estudada. Desta forma, se obtêm de maneira rápida e eficiente, informações valiosas sobre a diversidade microbiana ambiental, tanto para os microrganismos cultiváveis, quanto para os não cultiváveis em laboratório.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Determinar a diversidade microbiana de reator UASB em escala real, implementado para o tratamento de esgotos, localizado na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) – Mangueira, cidade do Recife-PE.

2.2. ESPECÍFICO

Investigar a diversidade de microrganismos pertencentes aos domínios Archaea e Bacteria ao longo dos cinco níveis de uma célula do reator UASB.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A ÁGUA EM NOSSO PLANETA

3.1.1. Distribuição da água na Terra

A água é de fundamental importância para a manutenção da vida no planeta. Dos $1,38 \times 10^9 \text{ km}^3$ de água disponível existente na Terra, aproximadamente 96,5% é constituída por água dos oceanos; 1,8% calotas polares, geleiras e icebergs e 1,7% de água doce. Destes 1,7%, 99% são constituídos de água subterrânea e 1% de água superficial como apresentados na Tabela 3.1 (Gleick, 1996).

Nota-se que, da água disponível, apenas uma pequena parcela pode ser utilizada para abastecimento público e apenas 1% desta fração (águas superficiais) são de extração mais fácil. Esses valores ressaltam a grande importância de se preservar os recursos hídricos na Terra, e de se evitar a contaminação da pequena fração facilmente disponível (Sperling, 1996).

Tabela 3.1. Distribuição da água em nosso planeta. Adaptado de Gleick, 1996.

Reservatórios	Volume de Água em km^3	%
Oceanos e Mares	1.338.000.000	96,5000
Calotas Polares e Geleiras	24.064.000	1,7400
Águas Subterrâneas	23.400.000	1,7000
Iceberg e Gelo permanente	300.000	0,0220
Lagos	176.400	0,0130
Solo	16.500	0,0010
Atmosfera	12.900	0,0010
Brejos	11.470	0,0008
Rios	2.120	0,0002
Seres vivos	1.120	0,0001
Total	1.386.000.000	100,00

A água é essencial para o desenvolvimento sócio-econômico e para a manutenção dos ecossistemas. Com o crescimento das populações, também cresceu a demanda por águas superficiais e subterrâneas para os usos doméstico, agrícola e do

setor industrial. Isto promoveu um aumento dos conflitos pelo uso da água e também da poluição sobre os recursos hídricos em todo o planeta (World Water Day, 2007).

O aumento da poluição ambiental e mau uso da água estão levando a um grave problema de escassez. Um grande estudo realizado pela Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture – CA revela que hoje, uma em cada três pessoas no mundo está diante do problema da escassez de água (CA, 2007). Cerca de 1,2 bilhões de pessoas, ou aproximadamente 1/5 da população mundial, vivem em áreas de escassez física, ou seja, os recursos hídricos não conseguem atender a demanda da população, como em regiões áridas. Aproximadamente 500 milhões de pessoas estão nesta situação. Outros 1,6 bilhões de pessoas, ou aproximadamente 1/4 da população mundial, sofrem por falta de investimento em infra-estrutura e distribuição desigual de água, o que caracteriza uma escassez econômica. (IWMI, 2006; CA, 2007). A Figura 3.1 representa as áreas de escassez física e econômica de água.

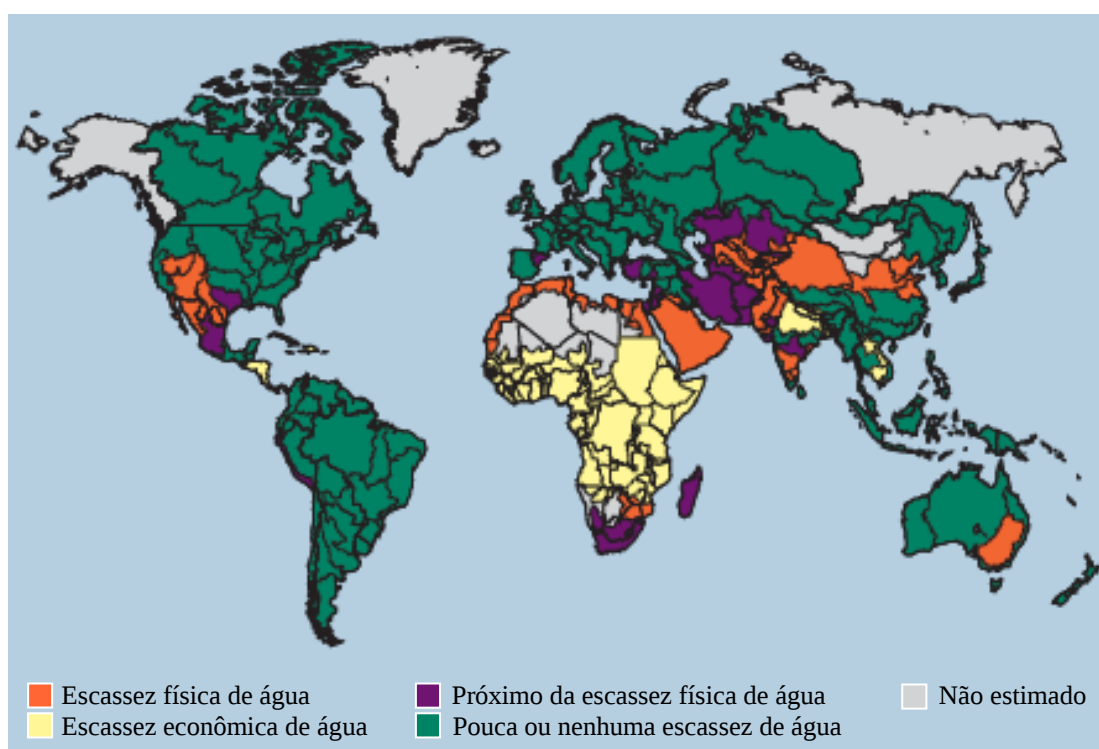


Figura 3.1. Áreas de escassez física e econômica de água - Adaptado de CA, 2007.

Estimativas indicam que em 2050, cerca de 25% das pessoas provavelmente viverá em um país afetado por escassez de água potável, o que poderá restringir seriamente a oferta de água para todas as finalidades, particularmente para a agricultura, que atualmente responde por 70% de toda a água consumida (UN/WWAP, 2003; CA, 2007).

Mesmo o Brasil, que possui aproximadamente 12% da água doce disponível no mundo, não deverá escapar da crise hídrica prevista. Deste montante, mais de 80% de todo o volume de águas superficiais disponíveis está localizado na região amazônica. Os 20% restantes estão distribuídos por todo o país, de maneira pouco uniforme, e se destinam a abastecer aproximadamente 95% da população brasileira (Rebouças *et al.*, 1999).

3.1.2. Poluição das águas e saneamento

Toda a poluição, imediatamente ou eventualmente, se envolve com o ciclo hidrológico na Terra, uma vez que, os poluentes emitidos no ar e alguns presentes no solo são carregados pelas precipitações. A água é considerada poluída quando a sua composição está alterada, tornando-a menos apropriada ou inapropriada para seu uso ou propósito natural. Esta definição inclui mudanças nas propriedades físicas, químicas, e biológicas da água. (UIA, 2007).

Descargas de substâncias gasosas, líquidas e sólidas em águas causam problemas de saúde pública, no uso doméstico, comercial, industrial, agrícola e nos ecossistemas. A poluição pode ser acidental (às vezes com graves consequências) ou causada mais frequentemente pelo descontrolado lançamento de esgotos e outros resíduos resultantes do uso da água, seja doméstico ou industrial, contendo uma variedade de poluentes e efluentes agrícolas provenientes da criação de animais e drenagem da irrigação. (UIA, 2007).

Aproximadamente 1,1 bilhões de pessoas no mundo não têm acesso a fontes adequadas de água e 2,4 bilhões de pessoas não têm acesso a saneamento. Cerca de 2 milhões de pessoas morrem todo o ano de doenças como a diarreia, sendo a maioria, crianças com menos de 5 anos de idade. (WHO, 2007).

No Brasil, segundo dados do IBGE (2000) dos 52,2% dos municípios que têm esgotamento sanitário, 32% têm serviço de coleta e 20,2% coletam e tratam o esgoto. No país diariamente, 14,5 milhões de m³ de esgoto são coletados, sendo que 5,1 milhões de m³ são tratados. O Sudeste é a região que tem a maior proporção de municípios com esgoto coletado e tratado (33,1%), seguido do Sul (21,7%), Nordeste (13,3%), Centro-Oeste (12,3%) e Norte (3,6%), conforme dados mostrados na Tabela 3.2.

No entanto, a World Health Organization (WHO) esclarece que, a cada 1 dólar investido em saneamento básico, representa uma redução de 4 a 5 dólares nas despesas hospitalares.

Tabela 3.2. Percentual de municípios, por condição de esgotamento sanitário, segundo as grandes regiões. Fonte: IBGE, 2000.

Regiões	Percentual de municípios, por condição de esgotamento sanitário		
	Sem coleta	Só coletam	Coletam e tratam
Brasil	47,8	32,0	20,2
Norte	92,9	3,5	3,6
Nordeste	57,1	29,6	13,3
Sudeste	7,1	59,8	33,1
Sul	61,1	17,2	21,7
Centro-Oeste	82,1	5,6	12,3

3.2. TRATAMENTO DO ESGOTO

3.2.1. Composição dos esgotos domésticos

A água é utilizada em diversas atividades como: higiene pessoal, lavagem de utensílios de cozinha, roupas, carros, em indústrias, entre outras. O resultado dessas atividades é a produção das águas residuárias, o chamado esgoto.

Os esgotos domésticos são constituídos de aproximadamente 99,9% de água. O restante inclui sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, bem como microrganismos. É por causa destes 0,1% que é necessário o tratamento dos esgotos. Este lançamento da matéria orgânica proveniente de esgoto em um corpo d'água, resulta em um excessivo consumo de oxigênio dissolvido por diversos microrganismos e conseqüente desequilíbrio ecológico (Sperling, 1996).

A fração sólida é formada pelos sólidos suspensos, compostos orgânicos (proteínas: 40% a 60%; carboidratos: 25 a 50%; óleos e graxas: 10%; e gorduras), nutrientes (nitrogênio e fósforo), metais, sólidos inertes, sólidos dissolvidos inorgânicos, sólidos grosseiros, compostos não biodegradáveis, microorganismos e, ocasionalmente, contaminantes tóxicos decorrentes de atividades industriais ou acidentais. Contudo, os sistemas de tratamento de esgotos têm por objetivo remover as impurezas e o material

potencialmente poluidor, transferindo-os para a fase gasosa ou concentrando-os no lodo produzido (Ilhenfeld, *et al.*, 1999).

A remoção das impurezas que estão dissolvidas e suspensas no meio líquido nas Estações de Tratamento de Esgotos – ETEs, ocorre através de processos físicos químicos e biológicos durante as etapas de tratamento preliminar, primário, secundário e terciário (Tabela 3.3), gerando um grande número de subprodutos na forma sólida, semi-sólida e líquida, cujo destino final depende do método de purificação e da tecnologia utilizada (Nicoll, 1989; Lima, 1996).

Tabela 3.3. Níveis de tratamento dos esgotos. Adaptado de Sperling (1996) e Fernandes (1999).

Nível	Tratamento Predominante	Remoção
Preliminar	Físico	Sólidos em suspensão grosseiros (materiais de maiores dimensões e areia).
Primário	Físico	Sólidos em suspensão sedimentáveis; DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) em suspensão (matéria orgânica componente dos sólidos em suspensão sedimentáveis).
Secundário	Biológico	DBO em suspensão (matéria orgânica em suspensão fina, não removida no tratamento primário); DBO solúvel (matéria orgânica na forma de sólidos dissolvidos).
Terciário	Biológico e/ou Químico	Nutrientes, patógenos, compostos não biodegradáveis, metais pesados, sólidos inorgânicos dissolvidos e sólidos em suspensão remanescentes.

3.2.2. Sistemas Anaeróbios

Com o aumento do conhecimento na área, os sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos, principalmente os reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo, UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor), cresceram em maturidade, passando a ocupar uma posição de destaque no mundo e, principalmente no Brasil, face as nossas favoráveis condições ambientais. Diante desta realidade, a digestão anaeróbia tem sido largamente utilizada no tratamento de resíduos sólidos e líquidos, incluindo

culturas agrícolas, dejetos de animais, lixo urbano e também efluentes industriais (Chernicharo, 1997).

Em sistemas aeróbios, ocorre somente cerca de 40 a 50% de degradação biológica, com conseqüente conversão em CO₂. Grande parte da matéria orgânica é convertida em biomassa microbiana (cerca de 50 a 60%), que vem a se constituir o lodo excedente do sistema. Cerca de 5 a 10% da matéria orgânica deixa o reator sem degradação. Já nos sistemas anaeróbios a maior parte do material orgânico é convertido em biogás (cerca de 70 a 90%), que é removido da fase líquida e deixa o reator na forma gasosa. Pequena parcela do material orgânico é convertida em biomassa microbiana (cerca de 5 a 15%), sendo este o lodo excedente. Cerca de 10 a 30% da matéria orgânica deixa o reator sem degradação (Chernicharo, 1997).

3.2.3. Reator UASB

O Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo, UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor) foi desenvolvido na década de 70 pelo professor Gatze Lettinga e sua equipe na Universidade Agrícola de Wageningen (Holanda). Neste tipo de reator não é necessário nenhum meio suporte, e ocorre a formação de flocos ou grânulos pela agregação das células microbianas. Estes formam camadas de densidade maior que se depositam no fundo, formando um leito de lodo, e camadas de densidades menores formando uma manta de lodo. O sistema possui um separador trifásico (sólidos, líquidos e gases) Figura 3.2. O reator possui alto tempo de retenção da biomassa e curto tempo de detenção hidráulica e pode receber altas cargas orgânicas. A mistura dentro do reator é intensificada devido as bolhas de gás que são formadas no fundo, e devido ao fluxo ascendente do afluente no sistema (van Haandel e Lettinga, 1994).

De acordo com van Haandel e Lettinga (1994), para se obter sucesso no controle operacional de sistemas de tratamento anaeróbio, deve-se implantar um programa de monitoramento, que vise: 1) assegurar o funcionamento adequado das unidades de pré-tratamento; 2) avaliar a eficiência do biodigestor, através da remoção dos sólidos suspensos e da matéria orgânica; 3) avaliar a estabilidade do biodigestor, através da determinação da alcalinidade e pH; 4) e determinar a quantidade e a qualidade da biomassa no reator.

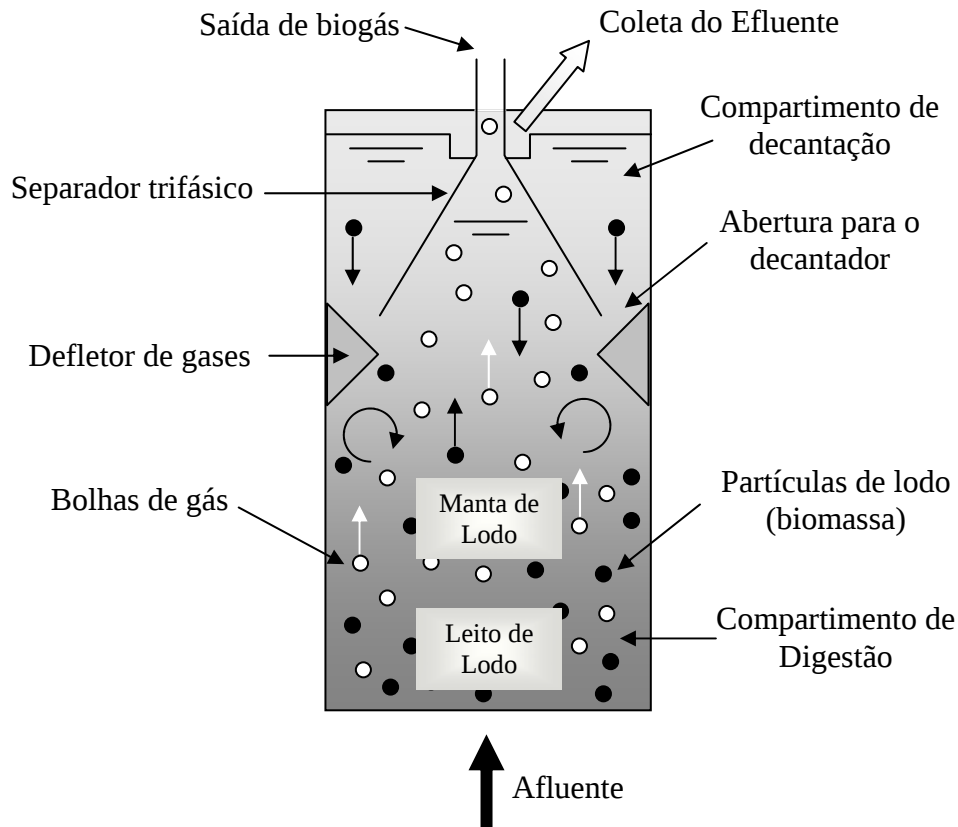


Figura 3.2. Esquema de um reator UASB. Adaptado de Chernicharo, 1997.

A etapa que requer um monitoramento mais intenso é a da partida, ou seja, o período de adaptação e crescimento da biomassa às condições do sistema de tratamento (Foresti, 2001). Um dos principais pontos que chamam a atenção é o volume de inóculo que deve ser aplicado ao reator. A carga biológica (kg DQO/kg SSV.d) é o parâmetro que caracteriza a carga orgânica aplicada ao sistema em relação à quantidade de biomassa presente no reator e pode ser determinada através de testes de atividade metanogênica específica (Chernicharo, 1997).

3.2.4. Atividade Metanogênica Específica – AME

A eficiência no tratamento pelos reatores UASB depende da adaptação da biomassa microbiana, de sua atividade e resistência a choques físico-químicos. Essa biomassa pode ser monitorada através de técnicas que avaliam a atividade das archaeas metanogênicas. A avaliação da atividade metanogênica do lodo anaeróbico é importante para determinar seu potencial para converter substratos solúveis em metano e dióxido de

carbono. Através desse parâmetro é possível determinar a carga orgânica ótima para uma rápida e confiável partida do reator. Além do teste da AME determinar a atividade metanogênica específica da biomassa, também pode ser usado para detectar algum tipo de inibição ou alteração no funcionamento do sistema após longos períodos de operação. (Field *et al.*, 1988; Monteggia, 1997; Aquino, *et al.*, 2007).

Na prática, o teste AME consiste em avaliar a capacidade das archaeas metanogênicas em converter substrato orgânico em metano e gás carbônico. Dessa forma, a partir de quantidades conhecidas de biomassa (g SSV), substrato (g DQO), nutrientes e sob condições estabelecidas, pode-se avaliar a produção de metano ao longo do período do teste. A AME é então calculada a partir das taxas de produtividade máxima de metano ($\text{mL CH}_4/\text{g SSV.d}$ ou $\text{g DQO}_{\text{CH}_4}/\text{g SSV.d}$) (Chernicharo, 1997).

A quantidade de metano produzido em reatores com pequenos volumes pode ser medida pelo deslocamento de líquido. Um dos sistemas de medição comumente utilizados consiste em uma garrafa invertida contendo uma solução de NaOH ou KOH com uma concentração de 15 a 50 g/l, na qual, o CO_2 contido no biogás é absorvido pelo meio fortemente alcalino ($\text{pH} > 12$) formando carbonato, e só o CH_4 fica no espaço superior interno do recipiente de medição, deslocando um volume equivalente de líquido. O CH_4 produzido pode ser determinado pelo volume ou massa de líquido deslocado (Field *et al.*, 1988; Aquino, *et al.*, 2007).

Em muitos experimentos é usado acetato como fonte de carbono e energia para os testes de AME, ao invés de uma mistura de AGVs (ácidos graxos voláteis). Isto geralmente ocorre em virtude de que o acetato é o precursor de 60 a 70% do gás metano gerado pelas metanogênicas (Chernicharo, 1997). Entretanto, alguns pesquisadores (Field *et al.*, 1988; Florencio, 1994) utilizam uma mistura dos AGVs: acetato, propionato e butirato, que servem não só para avaliar a atividade das metanogênicas, como também a atividade das bactérias acetogênicas. É importante notar que a avaliação da atividade dos microrganismos sintróficos é fundamental para a boa operação dos digestores anaeróbios. Como os microrganismos metanogênicos não produzem metano a partir de propionato ou butirato, a queda de eficiência de um reator anaeróbio pode estar mais relacionada à baixa atividade dos microrganismos acetogênicos produtores de acetato do que à atividade de microrganismos metanogênicos consumidores de acetato (Aquino, *et al.*, 2007).

3.2.5. Etapas da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia consiste em um ecossistema onde diversos grupos de microrganismos interagem na conversão da matéria orgânica complexa em principalmente metano (CH_4) e gás carbônico (CO_2) na ausência de aceptores de elétrons como o oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-) e sulfato (SO_4^{2-}) (Speece, 1996; Chernicharo, 1997; Kuang, 2002). Esta tem sido tradicionalmente utilizada para o tratamento de efluentes domésticos e industriais, mas também na produção de metano para uso como fonte de energia (Lyberatos, 1999).

A digestão anaeróbia de compostos orgânicos complexos é normalmente considerada um processo de dois estágios onde no primeiro, um grupo de bactérias facultativas e anaeróbias, denominadas formadoras de ácidos ou fermentativas, convertem os orgânicos complexos em outros compostos como os ácidos voláteis. No segundo estágio ocorre a conversão dos ácidos orgânicos, CO_2 , e H_2 em produtos finais: o CH_4 e CO_2 (Speece, 1996; Chernicharo, 1997; Kuang, 2002).

Este processo de digestão anaeróbia em duas etapas pode ser subdividido em quatro fases como mostra a Figura 3.3.

3.2.5.1. Hidrólise

Nesta fase ocorre a hidrólise da matéria orgânica particulada complexa (carboidratos, proteínas, lipídios) em materiais dissolvidos mais simples como açúcares, aminoácidos, peptídeos e ácidos graxos de cadeias longas (van Haandel e Lettinga, 1994), através de enzimas extracelulares (celulases, amilases, proteases e lipases), produzidas por bactérias pertencentes a gêneros como *Clostridium*, *Proteus*, *Bacillus*, *Vibrio* e *Bacterioides* (Stronach *et al*, 1986; Kalogo *et al*, 2000; Keyser, 2006).

As bactérias hidrolíticas e fermentativas, possuindo membros tanto anaeróbios facultativos quanto anaeróbios obrigatórios, são responsáveis pela remoção das pequenas quantidades de O_2 introduzido durante a alimentação do reator (Parawira, 2004).

3.2.5.2. Acidogênese

Durante a acidogênese, açúcares, aminoácidos e ácidos graxos de cadeia longa são utilizados como substrato pelos microrganismos fermentativos para produzir ácidos orgânicos, como o ácido acético, propiônico, butírico e outros ácidos de cadeia curta,

álcoois, H_2 e CO_2 (Kalyuzhnyi *et al.*, 2000). Durante uma digestão anaeróbia regular, a principal rota para a metanogênese é via acetato, CO_2 e H_2 , e estes produtos da fermentação podem ser usados diretamente pelas archaeas metanogênicas (Schink, 1997).

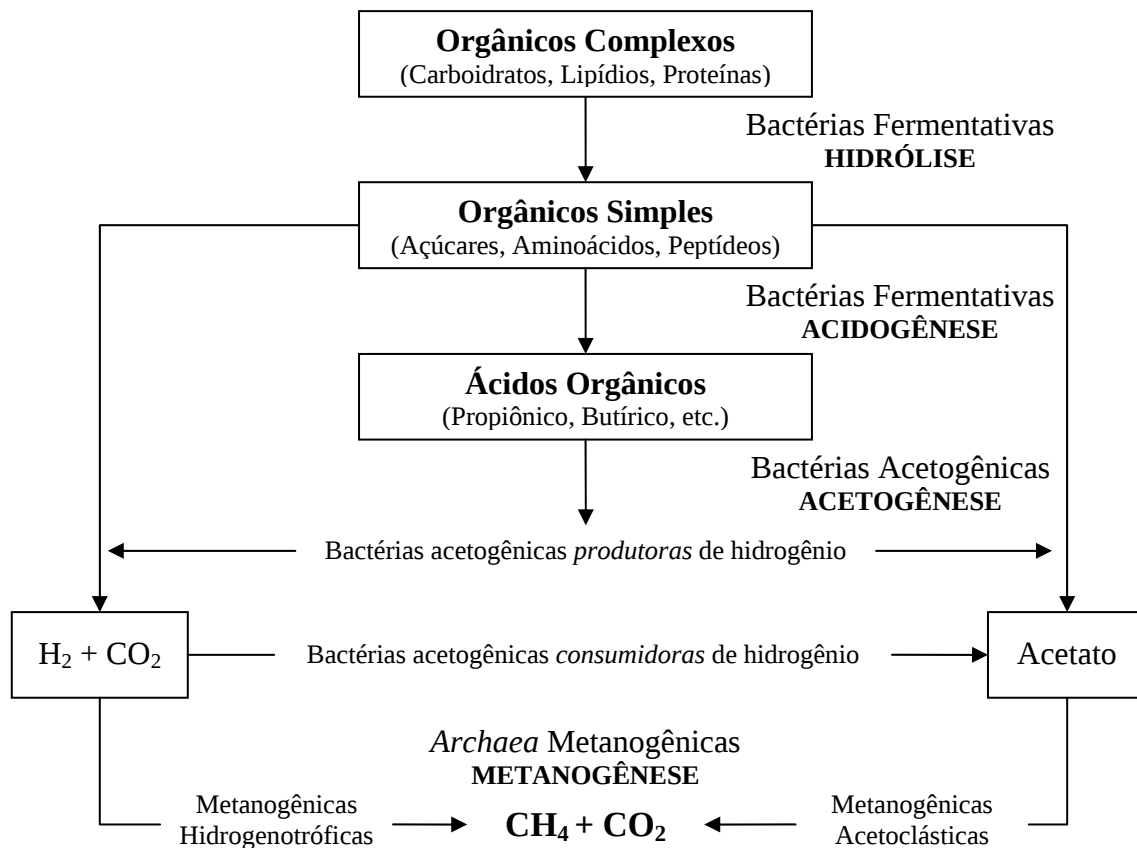


Figura 3.3. Esquema representando as principais etapas do processo de digestão anaeróbia. Adaptado de Speece (1996) e Chernicharo (1997).

Os microrganismos acidogênicos são os primeiros a atuar na etapa sequencial de degradação do substrato, e são os que mais se beneficiam energeticamente. Por causa disso, bactérias acidogênicas possuem baixo tempo de geração (~30 minutos) e as mais elevadas taxas de crescimento do consórcio microbiano. Desta forma, a etapa acidogênica só será limitante do processo se o material a ser degradado não for facilmente hidrolisado (Aquino e Chernicharo, 2005).

No entanto a atividade excessiva das bactérias acidogênicas pode resultar em problemas para o reator, e deve-se dar devida atenção na relação entre as concentrações de AGV no reator e sua performance. Ácidos orgânicos são precursores para produção de CH_4 , porém, em altas concentrações podem causar stress aos microrganismos e

conseqüente falha do sistema. Já a inibição do consumo de hidrogênio pelas metanogênicas resulta em um aumento da pressão parcial de hidrogênio no biorreator, o qual inibe a degradação dos ácidos graxos de cadeia longa. Isto resultará em acúmulo de AGV e num decréscimo no pH, ocasionando o colapso do reator. (Aquino e Chernicharo, 2005; Keyser, 2006). Várias bactérias acidogênicas têm sido encontradas em reatores anaeróbios como as pertencentes aos gêneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* (Snaird *et al.*, 1993; Sekiguchi *et al.*, 1998; Lapara *et al.*, 2000; Koussemon *et al.*, 2001; Keyser, 2006).

3.2.5.3. Acetogênese

Nesta etapa os ácidos produzidos na etapa anterior são convertidos a acetato, formiato, CO₂ e H₂. Os substratos produzidos nesta etapa são muito importantes para produção de biogás, pois os mesmos podem ser diretamente utilizados pelas archaeas metanogênicas (Lyberatos, 1999).

Nos reatores anaeróbios, existem dois grandes problemas práticos associados à formação de propionato, butirato e outros compostos mais reduzidos que o acetato. O primeiro é que tais compostos não são substratos diretos das metanogênicas, ou seja, a estabilidade de reatores anaeróbios passa a depender não somente da boa atividade dos microorganismos produtores de metano, mas também dos microorganismos sintróficos acetogênicos. O segundo é que a atividade de microrganismos sintróficos acetogênicos, e consequentemente a produção de acetato a partir de propionato e butirato, é termodinamicamente inibida pela presença de relativamente baixas concentrações de hidrogênio dissolvido e de acetato. Portanto, as bactérias acetogênicas dependem da atividade de microrganismos consumidores de hidrogênio para sua existência. (Aquino e Chernicharo, 2005).

Acetogênese inclui membros dos gêneros: *Syntrophomonas*, qual utilizam valeriato e butirato como substrato e; *Syntrophobacter*, qual utilizam propionato como substrato. (Karnholz, 2002; Parawira, 2004; Keyser, 2006).

3.2.5.4 Metanogênese

Esta etapa é conduzida restritamente pelos microrganismos produtores de metano que pertencem ao domínio Archaeobacteria ou Archaea. Poucos substratos podem ser utilizados pelas metanogênicas para produção de metano e energia como por exemplo: H₂, CO₂, metanol e formiato. (van Haandel e Lettinga, 1994; Chernicharo,

1997; Thauer, 1998; Kalyuzhnyi *et al.*, 2000; Aquino e Chernicharo, 2005). As metanogênicas podem ser divididas em dois principais grupos:

a) Metanogênicas Acetoclásticas

Este grupo de metanogênicas utiliza em seu metabolismo o acetato como substrato para formação de CH₄, sendo estas bactérias responsáveis pela maior parcela na produção de metano (cerca de 70%) e de remoção de DQO do sistema (Aquino e Chernicharo, 2005). Infelizmente esses microorganismos possuem um lento crescimento, com um tempo de geração mínimo de 2 a 3 dias e são extremamente dependentes da manutenção de condições ótimas de crescimento (Mosey, 1983). De todos os gêneros de metanogênicas, somente dois, *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, utilizam o acetato para produção de metano (Chernicharo, 1997; Thauer, 1998). *Methanosaeta* spp. possui baixo crescimento em altas concentrações de acetato, já *Methanosarcina* spp. tem afinidade entre 5 a 10 vezes maior pelo acetato. Portanto, uma ou outra espécie irá predominar dependendo da concentração de acetato no reator (Jentten *et al.*, 1992).

b) Metanogênicas Hidrogenotróficas

O metano também pode ser produzido a partir da redução de dióxido de carbono ou formiato, por microorganismos hidrogenotróficos. Estes microrganismos são de rápido crescimento, com tempo de geração mínimo de 6 horas (Mosey, 1983), e além de contribuírem com aproximadamente 30% do metano formado, a presença deles ajuda a manter baixas concentrações de hidrogênio dissolvido em reatores anaeróbios, favorecendo assim, a degradação de propionato e butirato e um bom funcionamento do sistema (Mosey, 1983; Aquino e Chernicharo, 2005). Fazem parte deste grupo gêneros como *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter* (Chernicharo, 1997; Thauer, 1998).

Keyser (2006) em seu estudo detectou predominância *Methanosaeta concilii* em lodos provenientes de reatores para tratamento de efluente de vinícola e cervejaria. Também encontrou *Methanosaeta thermophila* mas somente em reatores para tratamento de efluente de cervejaria. Zhang *et al.* (2005) também identificou *Methanosaeta concilii* em seu estudo sobre a estrutura das comunidades microbianas em lodo proveniente de reator de tratamento de esgoto doméstico. Leclerc *et al.* (2004) estudou a diversidade de Archaea em 44 reatores anaeróbios para tratamento de diferentes efluentes. Ele encontrou uma predominância de *Methanosaeta concilii*, *Methanosaeta* sp. e *Methanobacterium formicicum*.

3.3. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E GENÉTICOS

3.3.1. Os Três Domínios biológicos

Os pioneiros trabalhos de Carl Woese e Fox (1977) com análises comparativas dos RNAs da subunidade menor do ribossomo (16S e 18S rRNA) forneceram bases para se determinar as relações evolutivas entre os organismos e determinar a diversidade da vida. Woese propôs que a vida na Terra pode ser dividida em três grupos primários (domínios), um eucarioto (Eucarya, também chamado Eucaryota) e dois procarióticos (Bacteria e Archaea) (Woese, 1987). A Figura 3.4 mostra a árvore filogenética representando os três domínios.

Tradicionalmente o termo bactéria foi aplicado para todos os procariontes unicelulares microscópicos. Entretanto, a sistemática molecular mostrou que os procariontes consistem em dois domínios separados, originalmente chamados, Archaeobacteria e Eubactéria, e que agora se chamam Archaea e Bactéria. Estes dois grupos evoluíram independentemente de um ancestral comum (Woese *et al.*, 1990). Os Archaea e os Eukarya são mais próximos relacionados do que com os organismos pertencentes ao domínio Bacteria, e estes três domínios formam a base do sistema de classificação mais utilizado atualmente em microbiologia (Gupta, 2000).

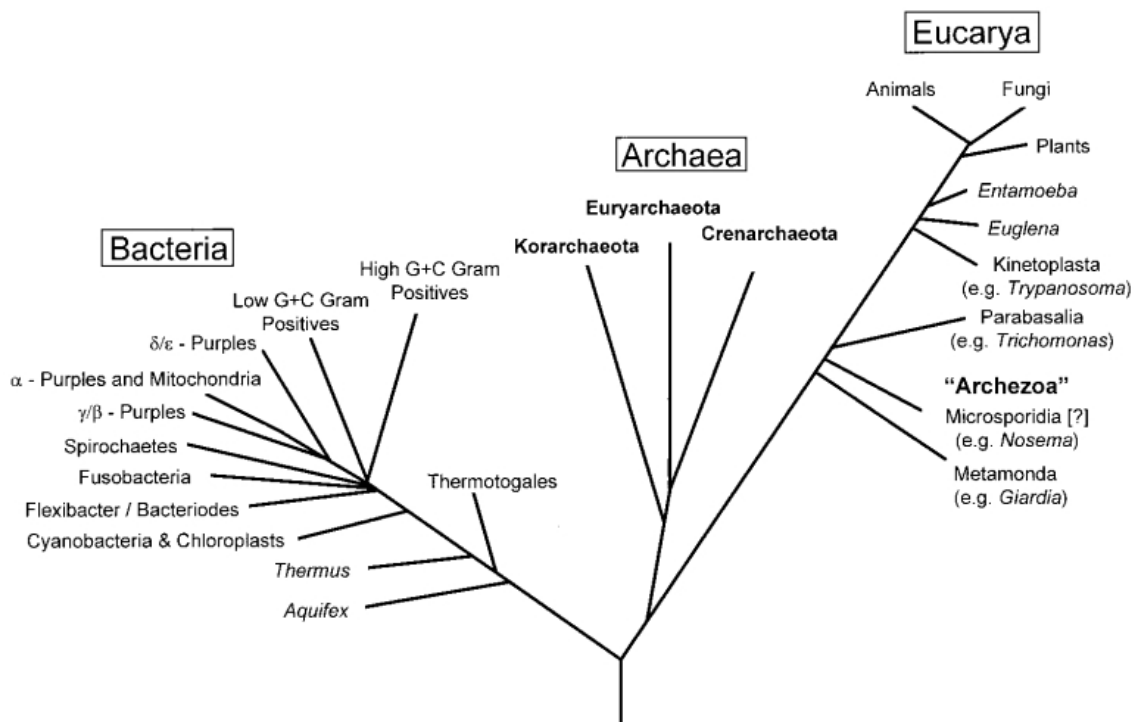


Figura 3.4. Esquema da árvore universal da vida baseada nas sequências de rRNA, mostrando a relativa posição evolucionária dos grupos nos domínios Bacteria, Archaea e Eukarya. Brown e Doolittle (1997).

Com esta relativa recente introdução da sistemática molecular e com o rápido crescimento do número de genomas seqüenciados disponíveis, a classificação bacteriana vem mudando e se expandindo (Rappé e Giovannoni, 2003; Doolittle, 2005). Por exemplo, alguns biólogos argumentam que Archaea e Eukarya evoluíram de uma Bacteria gram-positiva (Cavalier-Smith, 2002). Já para Gupta (1998) a principal divisão dentro dos procariotos deveria ser entre Monodermprokaryotes (células envoltas por uma membrana apenas) os quais pertenceriam, as bactérias gram-positivas e as archaeas, e Didermprokaryotes (todas as verdadeiras bactérias gram-negativas contendo uma membrana citoplasmática interna e outra externa). Esta proposta seria consistente com a morfologia celular e as assinaturas das seqüências em proteínas. Existem também pesquisadores como James Brown (2003) e Ford Doolittle (2000) que chamam atenção para eventos de transferência lateral de genes que ocorreram entre Archaea, Bacteria e Eukarya, os quais influenciam na análise filogenética e consequentemente na construção de árvores (Figura 3.5).

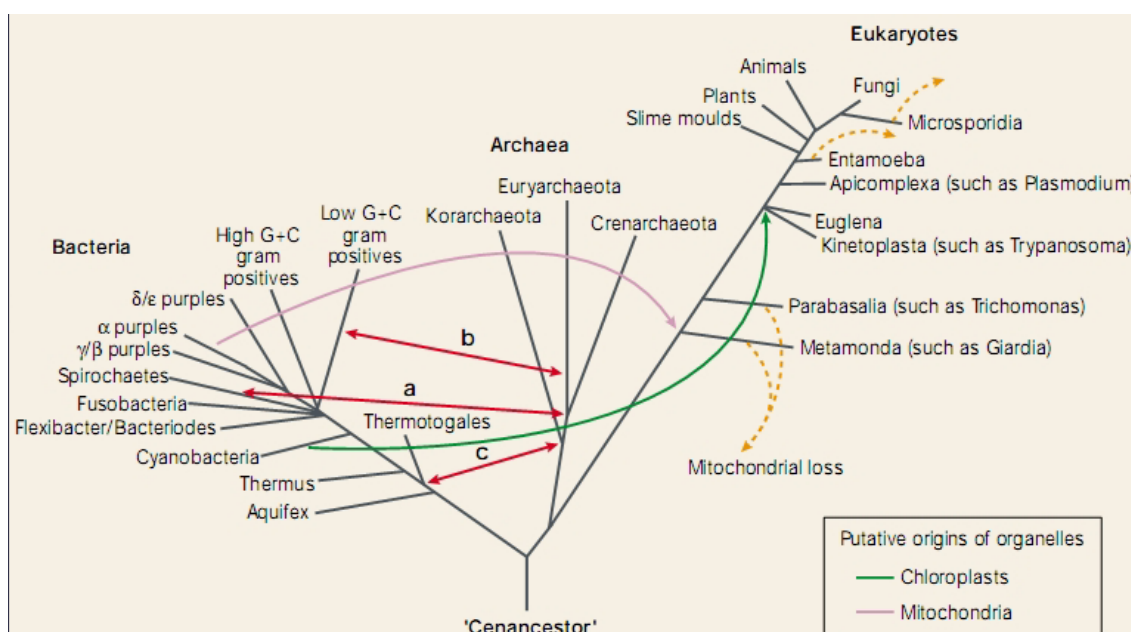


Figura 3.5. Esquema de árvore universal da vida mostrando as relações filogenéticas e os eventos de transferência lateral de genes entre os três domínios. As setas verde e violeta representam os eventos de transferência lateral de genes associados com a origem de mitocôndrias e cloroplastos. Outras associações também são observadas como: entre spirochaetes e Archaea (seta a); entre low G+C Gram-Positive Bacteria e Archaea (seta b) e thermophilic Bacteria e Archaea (seta c). O diagrama mostra a relativa posição evolucionária dos vários grupos dos três domínios, mas os ramos não estão em escala. Entre os Eucariotes existe também o grupo Protista, uma vez chamado Archezoa, o qual se acredita que tenham perdido secundariamente suas mitocôndrias (setas tracejadas amarelas). Brown (2003).

O National Center for Biotechnology Information – NCBI contém um banco de dados de genomas, cromossomos completos, mapas de seqüências com contigs e mapas físicos. O banco de dados é organizado em seis principais grupos: Archaea, Bactéria, Eukarya, Vírus, Viroides e Plasmídeos. A Figura 3.6 mostra um esquema da magnitude deste banco de dados.

Juntamente com o uso dos rRNAs, Archaea pode ser distinguido de Bacteria pela natureza dos glicolipídeos da membrana. Em Archaea eles são éteres de glicerol e isoprenol e em bactérias e eucariotos os lipídeos são éteres de glicerol e ácidos graxos (Kates, 1993). Outra diferença entre Archaea e Bacteria é a ausência de mureína em Archaea, enquanto que este composto está presente na parede celular das bactérias (Kandler and König, 1998). Algumas Archaea possuem uma parede celular rígida baseada em heteropolissacarídeo (Halococcus) ou pseudomureína (Methanobacteriales). No nível molecular as diferenças entre Archaea e Bacteria são exemplificadas pela resistência de Archaea a muitos antibióticos que são ativos em Bacteria. Estudos em biologia molecular de Archaea têm mostrado que esta resistência se deve a importantes diferenças nos alvos dos antibióticos como, RNA polimerase ou proteínas ribossomais (Forterre *et al.*, 2002).

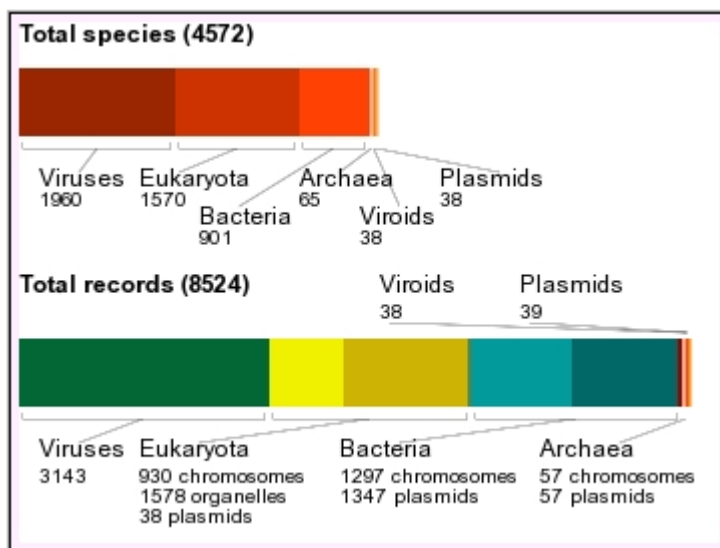


Figura 3.6. Esquema mostrando o total de espécies e de registros de seqüências contidas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI. Acesso em 10/07/2008.

Além do mais, genomas de Archaea codificam muitas proteínas homólogas às daquelas de Eukarya, mas não de Bacteria. Isto é mais evidente no caso da replicação do DNA, uma vez que muitas das proteínas envolvidas na replicação são homólogas entre

Archaea e Eukarya, não sendo encontrada homologia com Bactéria. Por exemplo, o genoma de *Methanococcus jannaschii* revelou várias prováveis proteínas homólogas envolvidas com o complexo fator de replicação (cfr) em eucariontes (Brown e Doolittle, 1997). Dois genes possivelmente codificam proteínas homólogas a proteínas associadas com a iniciação da replicação em leveduras. Outra proteína de *M. jannaschii*, primeiramente identificada em *Sulfolobus solfataricus*, corresponde a proteína Pelota de *Drosophila*, conhecida por estar envolvida nos estágios iniciais da meiose e mitose (Ragan *et al.*, 1996). Flap endonucleases I (FEN-1) e Rad2p são enzimas de reparação do DNA codificadas por genes duplicados em eucariontes no qual são genes homólogos em Archaea, mas não em versões de bactérias (Diruggiero *et al.*, 1999). Também são encontrados fragmentos de Okazaki com tamanhos similares em Archaea e Eukarya (Matsunaga *et al.*, 2001).

3.3.2. Diversidade

Os procariotos certamente são os mais abundantes organismos habitando o planeta Terra. Eles também são os filogeneticamente mais diversos e possuem mais diversidade metabólica que os eucariotos, sendo responsáveis por muitos dos processos chaves nos ciclos biogeoquímicos da Terra (Oren, 2004).

Whitman *et al.* (1998) fez um inventário da estimativa do número de procariotos (archaeobacteria e eubacteria) na Terra. O número total de células é de $4-6 \times 10^{30}$, que representa uma quantidade de $350-550 \times 10^{15}$ g em carbono, distribuídos em diversos ecossistemas. Esta quantidade de carbono nos procariotos é de 60-100% do carbono total estimado nos vegetais. Em relação ao nitrogênio (N) e fósforo (P) os procariotos contêm $85-130 \times 10^{15}$ g de N e $9-14 \times 10^{15}$ g de P, valores 10 vezes maiores que em plantas.

Outro dado impressionante é que existem aproximadamente dez vezes mais células bacterianas que células humanas no próprio corpo humano, com grande número vivendo harmonicamente na pele e trato digestivo. A maioria delas é inofensiva, muitas são benéficas e outras são patogênicas (Sears, 2005). As bactérias são de fundamental importância no ciclo dos nutrientes e muitos destes são dependentes delas, como a fixação de nitrogênio da atmosfera (Rappé e Giovannoni, 2003). Na indústria, as bactérias são importantes em vários processos como, tratamento de efluentes poluidores,

produção de queijo e iogurte, e na produção de antibióticos e substâncias químicas (Ishige, 2005).

Desde a demarcação de 12 filos bacterianos pela comparação da análise filogenética do 16S rRNA em 1987 realizada por Carl Woese, o conhecimento da diversidade microbiana se expandiu bastante devido a clonagem de seqüências de genes rRNA de amostras ambientais. Até o momento apenas 26 de aproximadamente 52 filos dentro do domínio Bacteria, têm representantes cultiváveis. Muitos dos filos não cultiváveis são encontrados em diversos habitats, incluindo oceano, rios e solo. Muitos são biologicamente e geoquimicamente importantes e foram pouco relatados tanto fenotipicamente quanto por sequenciamento genômico (Rappé e Giovannoni, 2003). A Figura 3.7 mostra uma árvore filogenética de Bactéria.

O domínio Archaea é representado por microrganismos procarióticos evolutivamente distintos dos organismos encontrados no domínio Bacteria. Várias Archaeas possuem metabolismo anaeróbico obrigatório, enquanto outras espécies vivem em ambientes extremos, como fontes geotermais, habitats com elevada salinidade, solos e sistemas aquáticos altamente ácidos ou alcalinos. Pode-se dizer que certas espécies de Archaea definem claramente os limites de tolerância biológica nos extremos físicos e químicos da vida na Terra (Balch *et al.*, 1979; Woese, 1998).

O domínio Archaea consiste em três divisões: Crenarchaeota, que contém as Archaea redutoras de enxofre hipertermófilas; Euryarchaeota, que compreende uma grande diversidade de organismos, incluindo as espécies metanogênicas, as halófilas extremas e uma espécie hipertermófila; e Korarchaeota, uma divisão descrita mais recentemente, que engloba organismos hipertermófilos pouco conhecidos, ainda não cultivados em laboratório (Woese, 1987; Hugenholtz, 2002).. A Figura 3.8 mostra a árvore filogenética de Archaea, baseada na comparação de seqüências do rRNA 16S.

O emprego dos organismos metanogênicos em saneamento ambiental é amplamente conhecido e busca a mineralização anaeróbia da matéria orgânica. Porém, as perspectivas se ampliam como, por exemplo, na bioprospecção de enzimas resistentes a condições extremas (temperaturas da ordem de 80-100°C) presentes em espécies como: *Pyrococcus* spp., *Thermococcus* spp., *Thermofilum* spp. e *Thermoproteus* spp. (Vazoller, 1995).

Em pesquisa básica e Biotecnologia, podem ser relacionadas outras aplicações de Archaea, tais como a manipulação genética de moléculas termoestáveis e a produção de compostos químicos e combustíveis (biogás e álcool). Considerando-se que os

bioprocessos de Archaea ocorrem sob temperaturas, salinidade e/ou pH marcadamente superiores aos dos organismos comumente empregados em biotecnologia, estes seriam extremamente atraentes para o desenvolvimento de novas tecnologias. Uma gama diversa de substâncias de interesse industrial pode ser produzida pelo metabolismo termófilo extremo: ácidos orgânicos, vitaminas, aminoácidos, antibióticos e produtos bioativos (por exemplo, estimuladores de crescimento de tecido celular). Algumas Archaea, como *Sulfolobus* spp., podem processar reações de biotransformação estereoespecíficas em moléculas de hidrocarbonetos (Vazoller,1995).

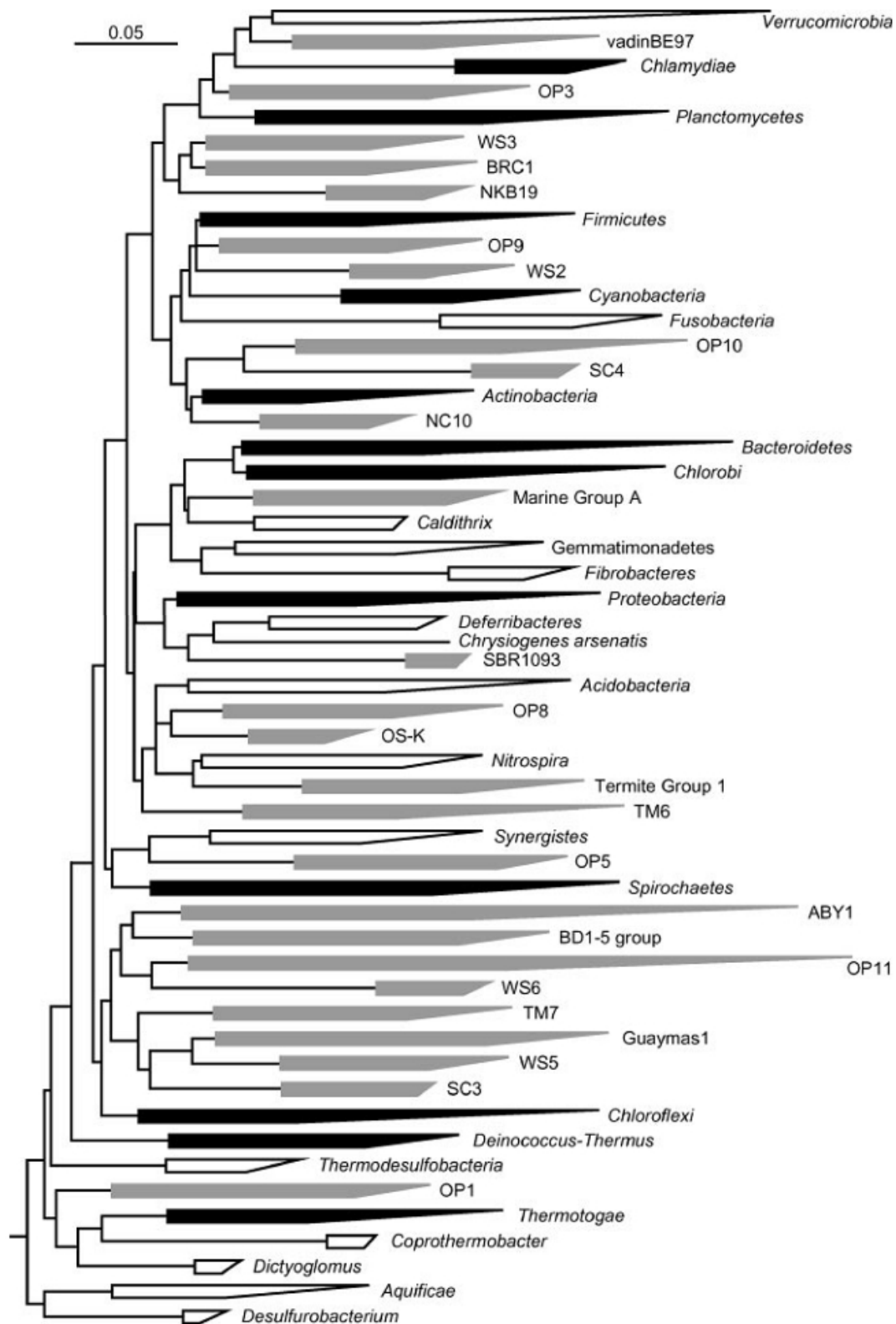


Figura 3.7. A árvore filogenética apresenta 52 filos bacterianos. Setas preenchidas representam os 12 filos originais (bactérias gram negativas foram divididas em Firmicutes e Actinobacteria) descritos por Woese (WOESE, 1987); estão sem preenchimento os filos que possuem representantes cultivados reconhecidos desde 1987 e em cinza estão os 26 filos candidatos que não possuem representantes cultiváveis conhecidos. A barra de escala representa 0,05 mudanças nucleotídicas por posição. Fonte: Rappé e Giovannoni, 2003.

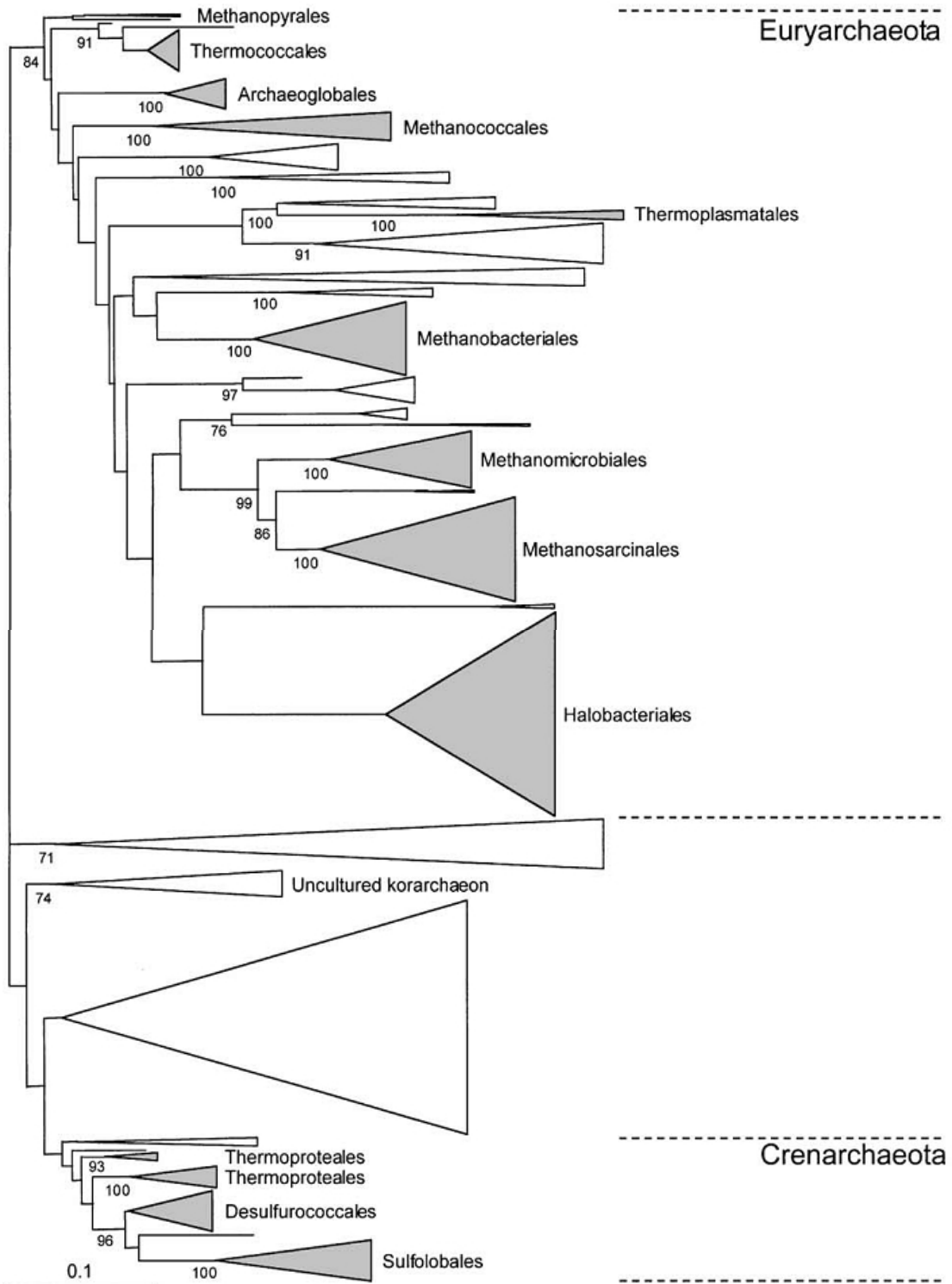


Figura 3.8. Filogenia do domínio Archaea baseada no 16S rRNA de espécies cultiváveis e não cultiváveis. Foi construída uma árvore filogenética neighbour-joining com 342 archaeas com 1.235 seqüências completas do 16S rRNA. As distâncias foram calculadas com método de Tamura e Nei (1993) e o α -parâmetro foi computado com PAUP 4b8. A barra de escala corresponde a 10 substituições após 100 posições por unidade de tamanho do ramo. Os três foram enraizados arbitrariamente. O Tamanho dos triângulos é proporcional ao número de seqüências analisadas. Triângulos cinza incluem SSU rRNA de ambas cultiváveis e não cultiváveis espécies, onde os triângulos brancos incluem somente seqüências ambientais (espécies não cultiváveis). Fonte: Forterre *et al.* 2002.

3.3.3. Ferramentas genômicas para estudar a diversidade microbiana

Estimativas da diversidade de comunidades microbianas naturais tem tradicionalmente dependido do cultivo dos microrganismos, mas o resultado do uso de técnicas moleculares para medir a diversidade sugere que as culturas têm subestimado esta diversidade de microrganismos existente (Torsvik *et al*, 2002).

Métodos moleculares proporcionam ferramentas para análise da comunidade bacteriana por inteira, incluindo também aqueles microrganismos que não podem ser cultivados em laboratório. Desta maneira, estes métodos vêm crescendo cada vez mais em importância para o estudo de ecologia microbiana (Stackebrandt *et al.*, 1993; Amann *et al.*, 1995).

Vigdis Torsvik (1996) aplicou com sucesso diferentes técnicas de análise do DNA para avaliar comunidades microbianas inteiras, isolados bacterianos, e clones de genes específicos. A análise em larga escala dos genomas, com o uso da técnica de reassociação de DNA, permite a determinação genética de toda a diversidade das comunidades bacterianas (Torsvik *et al.*, 2002). Já o uso da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e análises de genes para rRNA dão informações sobre as principais mudanças na estrutura das comunidades (Muyzer *et al.*, 1993). Quando a análise de genes rRNA por DGGE é combinada com a hibridização usando sondas ou sequenciamento, a filogenia e número de membros na comunidade pode ser obtido (Øvreås *et al.*, 1997). O uso da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) de células bacterianas com sondas específicas permite a direta observação e estimativa dos microrganismos em nível de espécie, gênero, famílias ou filo de dada amostra ambiental (Hahn *et al.*, 1992; Amann *et al.*, 1995; Saiki, 2002).

Outra ferramenta genômica para estudos da diversidade microbiana são os eficientes sistemas de clonagem *in vivo* (incluindo vetores de clonagem e hospedeiros). Estes sistemas permitem a separação e amplificação de seqüências individuais de DNA provenientes de amostras heterogêneas de genes. A grande variedade de sistemas é classificada de acordo com os diferentes tipos e tamanhos de fragmentos de DNA que podem comportar. Dependendo do tamanho do fragmento a ser clonado, o vetor pode ser baseado em: plasmídeos (suportando fragmentos com tamanho ideal de 0,5-2 kb, e limite máximo de ~10 kb); bacteriófagos (7-10 kb, ~20 kb); cosmídeos (35-40 kb; ~45 kb); cromossomos artificiais de bactéria (BAC, 80-120 kb, ~200 kb), e cromossomos artificiais de levedura (YAC, 200-800 kb, ~1,5 Mb). Vetores que suportam grandes

insertos são ideais para estudos de microrganismos ambientais não cultiváveis. Por exemplo, o recente e promissor campo da metagenômica tem se beneficiado com sistemas de clonagem tipo cosmídeos, BACs e YACs (Xu, 2006).

A necessidade de identificação dos microrganismos para visualizar e comparar a complexidade das comunidades microbianas irá determinar a estratégia experimental mais apropriada a ser utilizada. Os microrganismos formadores de uma comunidade em certo ambiente são frequentemente identificados por meio da clonagem e sequenciamento de produtos de PCR das amostras em estudo. Primeiramente os produtos são clonados em vetores, selecionados, e então sequenciados. Após o sequenciamento, é feita uma busca por homologia da sequência em bancos de dados genômicos que possuem informações taxonômicas e filogenéticas da linhagem correspondente à sequência estudada. O algoritmo de busca de homologia comumente mais utilizado é o Blast, qual está disponível online no National Center for Biotechnology Information - NCBI [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] (González, 2005).

3.3.4. O Gene 16S rRNA

A classificação taxonômica proposta por Carl Woese foi baseada em estudos moleculares das estruturas e das sequências nucleotídicas dos rRNA 16S e 18S (Figura 3.9), que revelam melhor as relações evolutivas do que o uso das características fenotípicas clássicas, especialmente para microrganismos. (Woese *et al.*, 1990).

Os rRNAs apresentam características muito interessantes para a filogenia tais como: são bons cronômetros moleculares, apresentando alta conservação da sequência e função; ocorrem em todos os organismos vivos; estas sequências mudam em diferentes localizações a diferentes taxas, e eles são sequências suficientemente grandes e possuem vários domínios. (Woese *et al.*, 1990).

A molécula de rRNA 16S faz parte, juntamente com 20 proteínas, da subunidade menor do ribossomo nos domínios Archaea e Bacteria. Além de possuírem pareamentos tipo Watson-Crick (A-U e C-G) em sua estrutura secundária (Figura 3.10), os rRNAs possuem pareamentos diferenciados (por exemplo: A-G e G-U) e várias hélices provenientes do pareamento intra-cadeia (Woese *et al.*, 1983; Gutell *et al.*, 1994). O

número total de hélices e a suas localizações podem ser utilizados para estudos filogenéticos (Dams *et al.*, 1988).

Informações detalhadas a respeito da variabilidade ou conservação das posições dos nucleotídeos no rRNA é importante por várias razões. Por exemplo, regiões em que a sua função pode ser reconhecida, frequentemente possuem estruturas conservadas. Além disso, regiões conservadas são de grande importância para o alinhamento de seqüências e para busca por regiões homólogas em diferentes organismos.

Oligonucleotídeos podem ser desenvolvidos com base nas regiões mais conservadas da molécula e usados como primers universais na amplificação do mesmo gene em organismos diferentes. Por outro lado, regiões variáveis podem ser usadas no desenvolvimento de sondas de hibridização espécie-específicas ou primers para PCR, aplicáveis na detecção e identificação de microrganismos. A quantificação de regiões variáveis também é importante do ponto de vista filogenético. Áreas conservadas podem ser usadas para o estudo de organismos evolutivamente distantes, e as áreas mais variáveis servem para estudos entre organismos evolutivamente próximos (Van de Peer, 1996).

Portanto, o uso do rRNA 16S para identificação de microrganismos ambientais cultiváveis ou não, se torna uma poderosa ferramenta para avaliação da diversidade bacteriana em vários tipos de ambientes, incluindo os reatores anaeróbios. Neste sentido, nosso trabalho vem contribuir para o melhor entendimento do consorcio microbiano em reator UASB para tratamento de esgoto, realizando a identificação dos microrganismos pertencentes aos domínios Bactéria e Archaea por meio da análise das seqüências dos genes 16S rRNA.

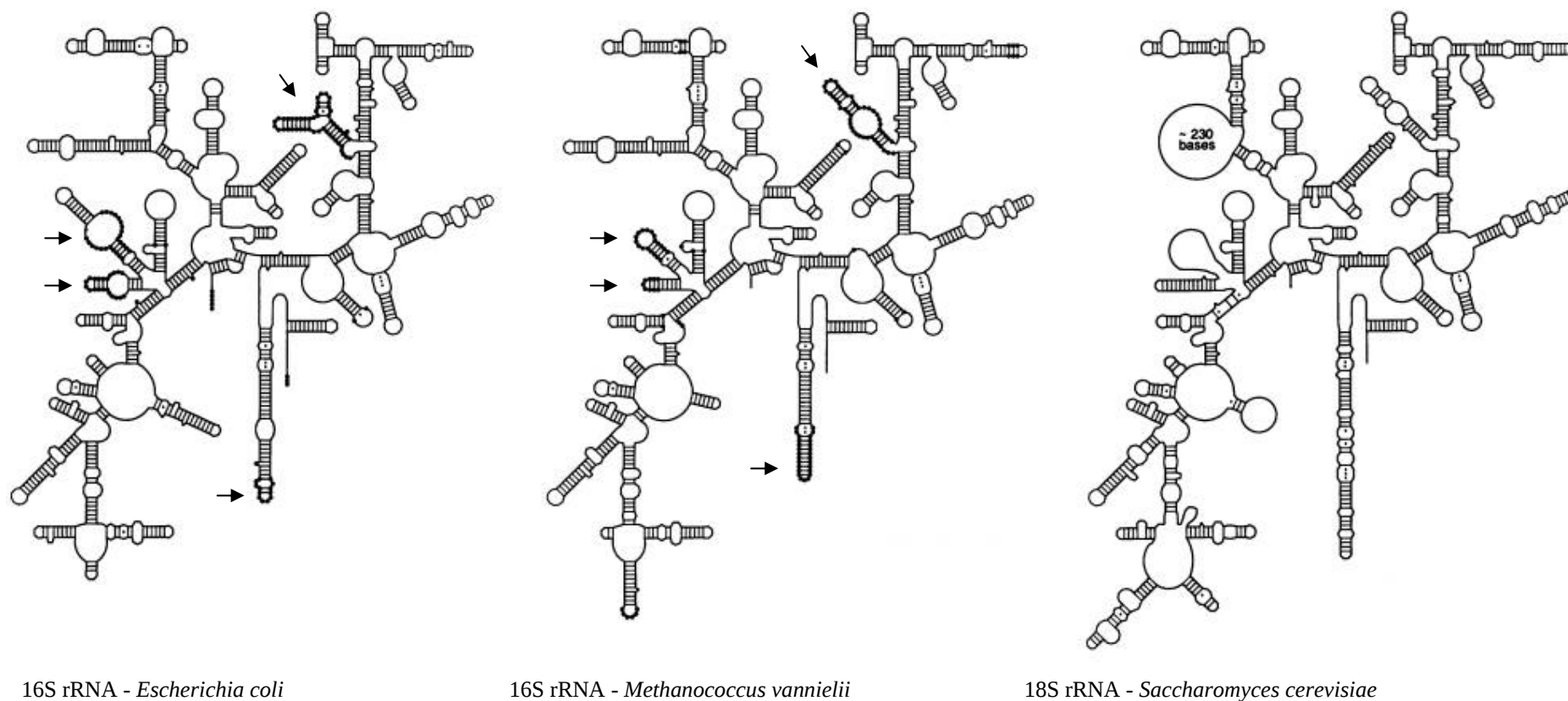


Figura 3.9. Representação da estrutura secundária dos rRNAs da subunidade menor para os três domínios. Regiões escuras apontadas por setas em *Escherichia coli* ou em *Methanococcus vannielii* identificam os locais onde Bacteria e Archaea caracteristicamente divergem. Adaptado de Woese, 1987.

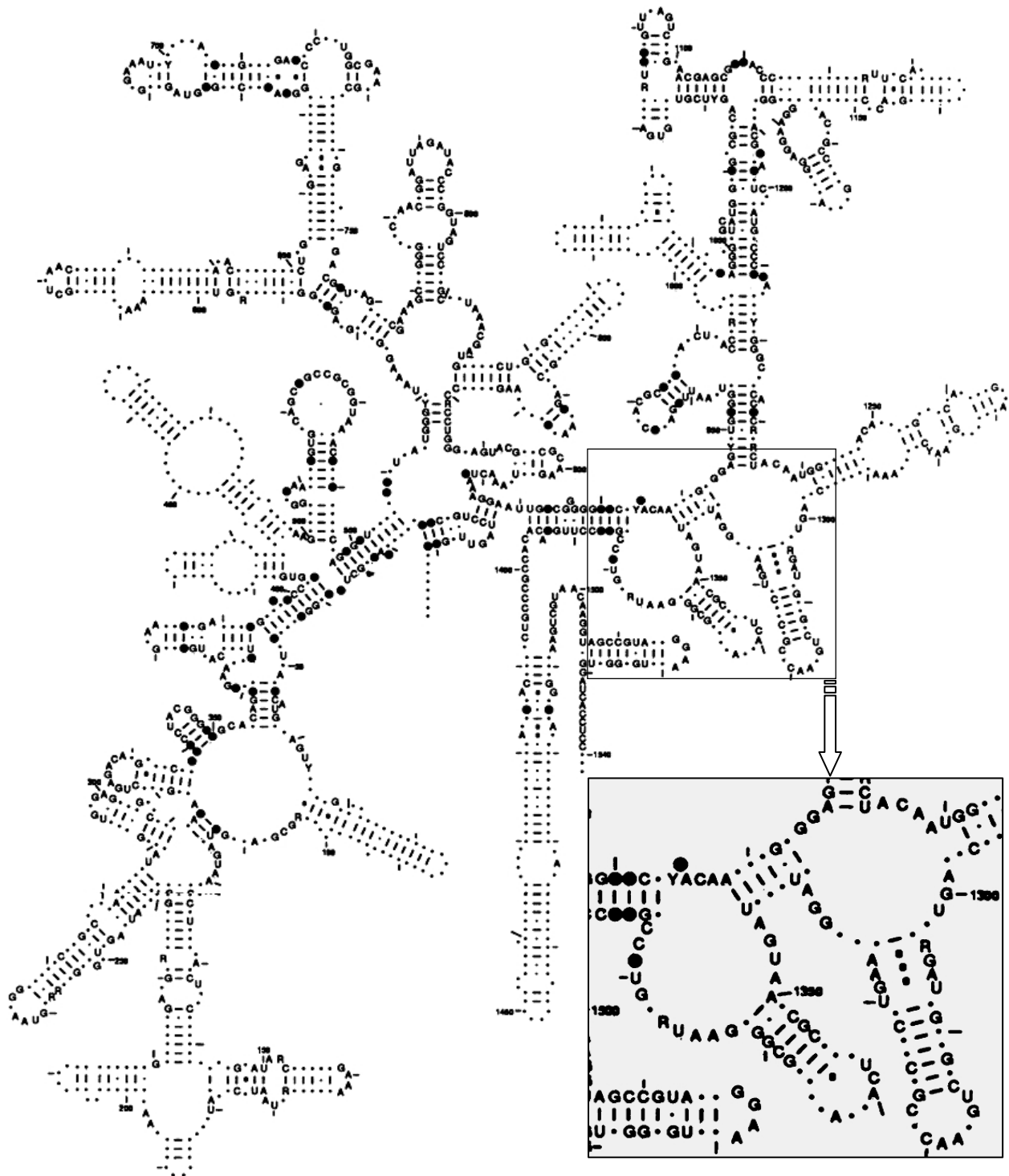


Figura 3.10. Localização das principais posições que distinguem Bactéria de Archaea na estrutura secundária do rRNA (rRNA de *Escherichia coli*). As posições de assinatura são indicadas por círculos preenchidos. Posições onde a composição é altamente conservada (a mesma acima de 90% das seqüências catalogadas) entre Bactéria e Archaea estão indicadas; Todas as outras são oligonucleotídeos de *E. coli*, e estão marcadas com um ponto. Traços marcam de 10 em 10 posições e as numeradas marcam de 50 nucleotídeos. O quadro em destaque mostra alguns dos tipos de interações entre os nucleotídeos. Adaptado de Woese, 1987.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA DO LODO, DO AFLUENTE E EFLUENTE

O lodo (biomassa) anaeróbio utilizado neste estudo foi proveniente de um reator UASB em escala real, implementado para o tratamento de esgotos, localizado na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) - Mangueira que fica no bairro da Mangueira, cidade do Recife-Pernambuco. A ETE Mangueira recebe os esgotos oriundos dos bairros de Mustardinha, San Martin e Mangueira, em Recife.

O reator UASB é constituído por oito células independentes de 103 m³ que trabalham em paralelo. Cada célula possui cinco tubulações de amostragem de lodo ao longo de sua altura que conduzem o lodo ao leito de secagem permitindo assim sua coleta e descarga Figura 4.1.

Foram coletados dois litros de lodo para cada um dos cinco níveis (alturas) da célula 7 do reator (de baixo para cima: A- 0,8 m; B- 1,3 m; C - 1,8 m; D - 2,3 m; E - 2,8m) (Figura 4.1). Dos 2 litros, 40 ml de lodo de cada altura foram colocados em tubos falcon de 50 ml estéreis e armazenados em freezer a -20°C para posterior extração de DNA. Também foram coletados do reator, dois litros do afluente e dois litros do efluente que em seguida foram armazenados em geladeira a 8°C para posterior análise.



Figura 4.1. Reator UASB. a) Parte superior e ao fundo a lagoa de tratamento. b) Tubulações de coleta e descarga de lodo. c) Leito de secagem de lodo. d) Vista lateral do reator UASB

4.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental – LSA do Departamento de Engenharia Civil da UFPE.

4.2.1. Biomassa, Afluente e Efluente

Para o lodo foi determinado o pH, temperatura e os sólidos suspensos totais, fixos e voláteis para cada altura do reator segundo APHA (1992).

Foram também realizadas tanto para o afluente quanto para o efluente, duas vezes por semana, durante três meses, as seguintes determinações segundo APHA (1992): pH, Temperatura, DQO Bruta, DQO Filtrada, Alcalinidade Parcial, Alcalinidade Total, Ácidos Voláteis, Potencial Redox, Sólidos Totais, Sólidos Suspensos Totais, Sólidos Suspensos Voláteis.

4.2.2. ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA - AME

O método foi adaptado de Florencio (1994) e Field *et al.*, (1988). O teste foi realizado em triplicata para o lodo coletado em cada altura do reator. Foram utilizados os seguintes parâmetros de acordo com a Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição do reator para o teste AME.

Componente	Concentração
Biomassa	1,5 g SSV.l ⁻¹
Fonte de Carbono: 1:1:1 de ácido acético, propiônico e butírico neutralizados com NaOH 40% m/v.	4 g DQO.l ⁻¹
Macro e Micronutrientes (Florencio, 1994)	200 ml.l ⁻¹
Água destilada	Completar

O ensaio foi realizado em sala com temperatura controlada para 30°C. Após a montagem de todo o conjunto para o teste (Figura 4.2), pesou-se uma vez por dia a

acumulação de solução alcalina no recipiente de coleta até que toda a fonte de carbono tenha sido consumida. Esta solução alcalina deslocada corresponde à quantidade de metano produzido no sistema. Por meio de cálculos estequiométricos faz-se a relação entre a quantidade de líquido deslocado e a produção de metano.

A AME é então calculada a partir da equação:

$$\text{AME} = (\text{ml CH}_4/\text{d})/(\text{F.C.} * \text{V} * \text{SSV}), \text{ ou seja:}$$

AME é igual à taxa de produtividade máxima de metano dividida pelo fator de conversão CH_4 -DQO, multiplicado pelo volume do reator e pela concentração da biomassa em sólidos suspensos voláteis (SSV). Onde: Fator de Conversão: 405 ml de solução alcalina (CH_4) correspondente a 1 g DQO;

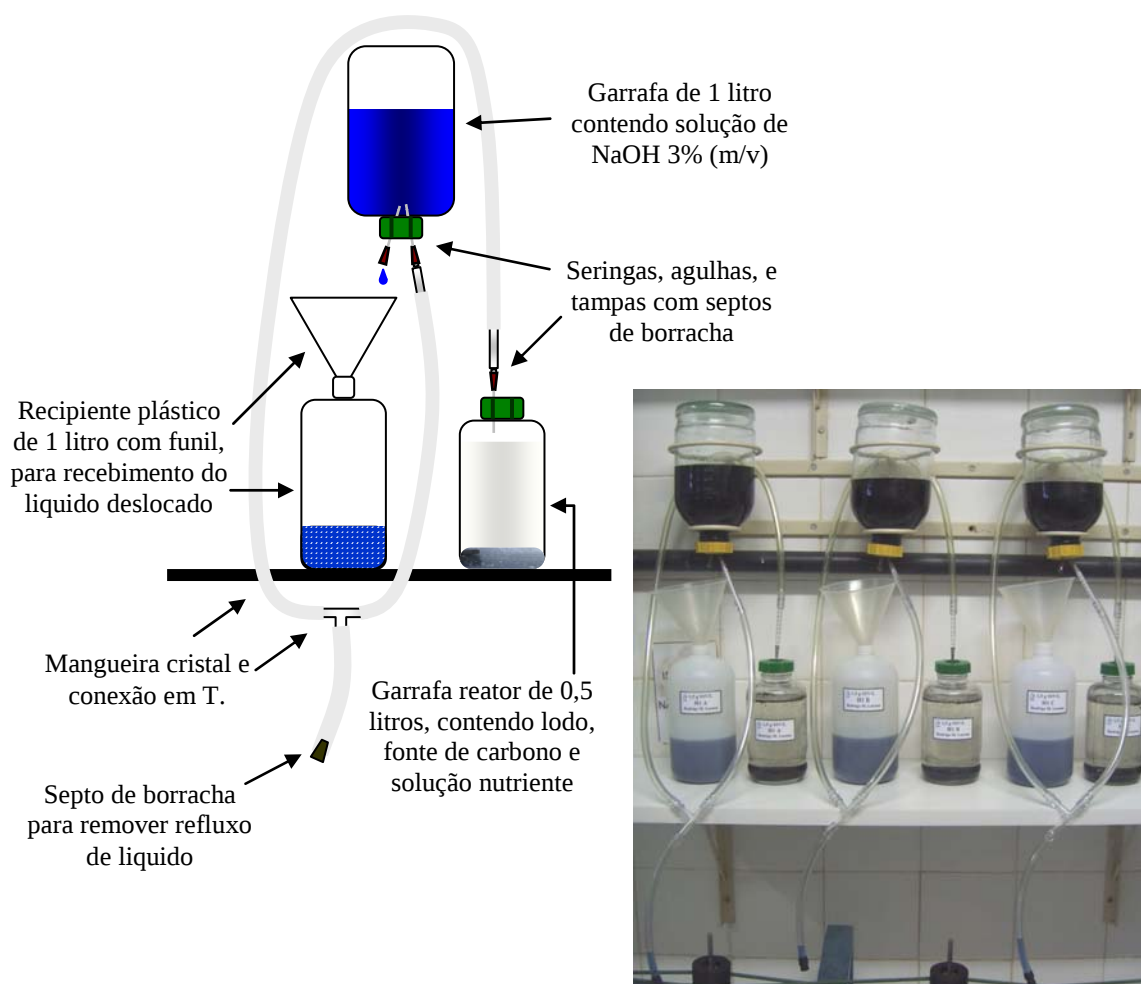


Figura 4.2. Esquema do sistema para o teste AME. O teste se inicia com a inoculação da biomassa juntamente com a fonte de carbono (ácidos voláteis), nutrientes e água. Os microrganismos irão se adaptar e então começarão a consumir o substrato e crescer. Como resultado do seu metabolismo, eles produzirão principalmente, gás metano e gás carbônico. Estes gases irão percorrer a mangueira até chegar à garrafa que contém solução alcalina. O CO_2 irá reagir com o NaOH formando carbonato, e o CH_4 que se dissolve pouco em líquido, irá para parte superior do frasco fazendo com que, o líquido desça. Finalmente pesa-se uma vez por dia a garrafa coletora e então fazer-se os cálculos de produção de metano.

4.3. ANÁLISE GENÉTICA

4.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA

Foi extraído o DNA total do lodo de cada altura do reator. O método de extração foi o de Moreira *et al.*, 2005 com modificações.

1. Transferiu-se aproximadamente 10 ml de lodo homogeneizado, em um tubo falcon de 15 ml. Centrifugou-se a 4.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida até que o precipitado atingisse 2 ml.
2. Foi adicionado ao tubo 10 ml de PBS 1X e homogeneizou-se em vortex. Foi transferido 1 ml para um novo microtubo de 1,5 ml (com o auxílio de uma ponteira cortada na ponta). Centrifugou-se a 4.000 rpm por 10 minutos.
3. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado com 1 ml de H₂O Milli-Q autoclavada (*ressuspendeu-se com 500 µl e depois acrescentou-se mais 500 µl*). Os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos.
4. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado (*ressuspender com 500 µl e depois acrescentar mais 500 µl*) com 1 ml de TE₁₀ (Tris 50mM, EDTA 10mM, pH 8.0) acrescido de lisozima (10mg/ml) e incubou-se por 1 hora a 37 °C sob agitação.
5. Os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado com 540 µl de TE₁₀, adicionou-se 60 µl de SDS 10% e 3 µl de RNase (20mg/ml). Misturou-se 5 minutos por inversão.
6. Posteriormente, foi acrescentado 300 µl de fenol (saturado com tris) mais 300 µl de clorofórmio P. A. (1:1 fase aquosa e fase orgânica). Homogeneizou-se 5 minutos por inversão. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos.
7. A fase aquosa foi transferida (~ 500 µl) para um novo microtubo. Acrescentou-se 500 µl de fenol (1 volume). Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos.
8. A fase aquosa foi transferida (~ 400 µl) para um novo microtubo. Foi acrescentado 400 µl de clorofórmio (1 volume). Centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos.
9. Transferiu-se a fase aquosa (~ 300 µl) para um novo microtubo. Foi acrescentado 300 µl de isopropanol (absoluto gelado) (1 volume), misturou-se por inversão. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C.
10. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70% gelado. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

11. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e então os tubos foram colocados em estufa a 37°C por ~20 minutos para evaporação do etanol residual.
12. O DNA foi ressuspendido em 50 ou 100 µl de TE₁ (Tris 10 mM, EDTA 1mM). O DNA foi armazenado em freezer a -20°C.

4.3.2. PCR

Foram realizadas duas reações de PCR (com kit invitrogen) para o DNA total extraído de cada uma das cinco alturas do reator Biocycler MJ96. A primeira foi para amplificar uma região variável do gene 16S rDNA, específica para o domínio Bacteria e a segunda foi para uma região variável 16S rDNA, específica do domínio Archaea. Os *primers* utilizados para amplificação estão indicados na Tabela 4.2 e a composição e as condições para a PCR estão indicadas nas Tabelas 4.3 e 4.4. Após a amplificação os produtos da PCR foram purificados com kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega.

Tabela 4.2. Primers universais para os domínios Bacteria e Archaea. As seqüências GC clamp estão ligadas aos primers forward.

Domínio	Primer	Seqüência (sentido 5' → 3')
Bacteria Nielsen <i>et al.</i> , 1999	968 f	AAC GCG AAG AAC CTT AC
	1392 r	ACG GGC GGT GTG TAC
	GC Clamp ^a	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG
Archaea Kudo <i>et al.</i> , 1997	1100f	AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG
	1400 r	CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC
	GC Clamp ^a	CGC CCG CCG CGC GCGGCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

^aO GC Clamp seria necessário em gel de DGGE. Neste trabalho eles permaneceram nos amplicons, sendo posteriormente removidos virtualmente, após sequenciamento, com ferramentas de bioinformática.

Tabela 4.3. Composição da reação de PCR.

Reagentes	Volume em µl (reação de 50 µl)
Água Milli-Q estéril	30.0
Tampão PCR 10x	5.0
BSA	5.0
dNTP (2mM)	5.0
Primer forward (10 pmol/µl)	0.5
Primer reverse (10 pmol/µl)	0.5
MgCl ₂ (50mM)	1.5
Taq Polimerase (5U/µl)	0.5
Templante DNA (20-100 ng/µl)	2.0

Tabela 4.4. Programa da PCR para Bacteria e Archaea.

Etapa		Domínio <i>Bacteria</i>		Domínio <i>Archaea</i>	
		Temperatura (°C)	Duração	Temperatura (°C)	Duração
35 ciclos	Pré-desnaturação	94	5 min.	94	90 seg.
	Desnaturação	94	45 seg.	94	30 seg.
	Anelamento	45	1 min.	55	30 seg.
	Extensão	72	90 seg.	72	90 seg.
Extensão Final		72	5 min.	72	3 min.

4.3.3. CLONAGEM

A clonagem dos produtos da amplificação (inserto) dos genes 16S rDNA a partir das amostras de lodo foi feita de forma aleatória utilizando-se o kit comercial pGEM-T Vector System (Promega) específico para clonagem de fragmentos de PCR.

4.3.3.1. Ligação

A reação de ligação procedeu de acordo com o kit de clonagem (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Composição da reação de ligação.

Reagentes	Produto PCR (100 ng/μl)	Inseto Controle (4 ng/μl)
Água Milli-Q estéril	2,00 μl	0,75 μl
Tampão 2X	5,00 μl	5,00 μl
pGEM-T (50ng/μl)	1,00 μl	1,00 μl
Inserto	1,00 μl	2,25 μl
T4 DNA ligase	1,00 μl	1,00 μl

A reação foi feita em microtubo de 200μl e incubada por 1 hora a temperatura ambiente (~23°C) e depois a 4°C por 16 h em termociclador Mj96G Thermo HBPXEO2.

4.3.3.2. Células Competentes

Foram preparadas células quimio-competentes de *E. coli* DH10α adaptado de Sambrook *et al* (2001):

1. Foi inoculada uma cultura de células em meio LB sem antibióticos a 37°C por cerca e 16 horas.

2. Após crescimento foi inoculado 2 ml da pré-cultura em 500 ml de meio LB (1 ml para cada um dos dois Erlenmeyer de 500 ml contendo 250 ml de LB). Acompanhou-se o crescimento a 37 °C sob agitação vigorosa até obter uma D.O. A600 de 0,5.
3. Mantendo a cultura no gelo transferiu-se para tubos tipo falcon de 50 ml, e centrifugou-se a 4.000 rpm por 8 minutos a 4°C. Descartar o meio.
4. Ressuspender cada pellet com 30 ml de da solução gelada de CaCl₂ 100 mM. Incubar em gelo por 30 minutos.
5. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C.. Descartar o meio.
6. Ressuspender cada pellet gentilmente com 5 ml de CaCl₂(100 mM)/glicerol 15% gelada.
7. Armazenar as alíquotas em microtubos de 1,5 ml e estocar a -80 °C.

4.3.3.3. Transformação

Para cada tubo contendo a transformação foi adicionado 50 µl de células competentes, e 25 µl de tampão de transformação (MgCl₂ 5 mM + Tris-HCl 5 mM pH 7). Então tudo foi gentilmente homogeneizado e incubado em gelo por 30 minutos. Após incubou-se a 42°C em banho-maria.

Após o término da transformação as células foram plaqueadas em placas contendo LB/ampicilina (100µg.ml⁻¹) - IPTG (0,5 mM) - X-Gal (0,05mg.ml⁻¹) concentrações finais. Logo em seguida as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

As colônias que apresentaram cor branca, ou seja, possuíam o plasmídeo com inserto, foram transferidas separadamente para meio 10ml de LB/ampicilina (100 µg/ml) e incubadas por 16 horas para posterior extração plasmidial.

4.3.3.4. Extração dos plasmídeos (miniprep)

A extração plasmidial foi feita conforme metodologia de Sambrook *et al* (2001) com modificações.

1. Foi centrifugado 10 ml de cultura a 12.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante.
2. O pellet foi ressuspendido em 100 µl da solução I (Tabela 4.6) gelada. Agitou-se em vortex.

3. Posteriormente, foi adicionado 200 µl da solução II preparada na hora e os tubos foram homogeneizados gentilmente 10 vezes por inversão. Após, os tubos foram incubados em gelo por 5 minutos.
4. Então foi adicionado 150 µl da solução III gelada e os tubos foram homogeneizados gentilmente 10 vezes por inversão. Então os tubos foram incubados em gelo por 5 minutos.
5. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos.
6. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml.
7. Adicionou-se 1 volume de isopropanol gelado. Os tubos foram homogeneizados gentilmente 10 vezes por inversão.
8. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 15 minutos.
9. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e foi adicionado 150 µl de etanol 70% gelado. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos.
10. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e então foram colocados em estufa a 37°C por ~20 minutos para evaporação do etanol residual.
11. Então o pellet foi ressuscitado em 30 µl de água Milli-Q estéril e armazenado em freezer a -20°C.

Tabela 4.6. Soluções para extração plasmidial.

Soluções	Reagente	Concentração
I	Glicose	50 mM
	Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
	EDTA (pH 8.0)	10 mM
II	NaOH	0,2 N
	SDS	1%
III	Acetato de Potássio	5 M
	Ácido Acético Glacial	11,5 ml
	Água Milli-Q estéril	28,5 ml

4.3.4. SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento foi realizado com o apoio do suporte tecnológico do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fiocruz.

Para o sequenciamento foram realizadas duas reações (forward e reverse) contendo 200-500 ng de DNA plasmidial, 3,2 pmol do *primer* M13, Tampão de PCR 1X, BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e Água Milli-Q para volume final de 10 µl. Para a reação foi utilizado o termociclador: 96-Well GeneAmp® PCR System

9700 do fabricante Applied Biosystems com o seguinte programa: 94°C por 2 min; 40 ciclos a 94 °C por 15 seg, 55 °C 10 seg e 60 °C 4 min; mantendo: 4°C sempre. Após a reação, foi feita precipitação com Etanol/EDTA/Acetato de sódio e após foi ressuspensionado com formamida. Após a placa seguiu para Seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer do fabricante Applied Biosystems.

4.3.5. ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DO 16S rDNA

Foi utilizado o programa BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999) e o conjunto de programas Staden Package <<http://staden.sourceforge.net/>>, para análise da qualidade das seqüências e montagem das seqüências consenso.

As seqüências consenso foram submetidas à comparação com o banco de dados do Ribosomal Database Project – RDP <<http://rdp.cme.msu.edu/>> utilizando o programa *Classifier* (confidence threshold = 95%), e com o programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), em suas configurações padrões para o banco de dados da coleção nucleotídica nr/nt, do National Center for Biotechnology Information – NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. O Classifier do RDP realiza a comparação com o banco de dados que contém seqüências de rRNA 16S de organismo já descritos, ou seja, que possuem uma sólida análise taxonômica. Por outro lado o BLAST do NCBI realiza a comparação com o banco de dados completo, incluindo também seqüências de rRNA 16S de organismos ainda não classificados ou descritos.

Seqüências que apresentaram similaridade igual ou superior a 95% foram agrupadas em um mesmo gênero de acordo com o RDP. Entretanto o valor mínimo de 97% foi utilizado para agrupamento de seqüências como pertencentes à mesma espécie. Este valor de 97% está de acordo com o valor mínimo de similaridade de 70% utilizado na comparação entre genomas inteiros para agrupamento de espécies (Stackebrandt e Goebel, 1994).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os valores relativos às análises físico-químicas do reator UASB estão apresentados na Tabela 5.1. Os valores de pH e temperatura foram medidos em torno de 6,5 e 30°C, respectivamente, adequados para a digestão anaeróbia e metanogênese. O potencial redox foi medido em torno de -330 mV, o que corresponde a um ambiente anaeróbio redutor (Speece, 1996; Aquino e Chernicharo, 2005). A alcalinidade e os ácidos voláteis se mantiveram em valores constantes suficientes para prevenir mudanças no pH. Contudo, a demanda química de oxigênio (DQO) e os sólidos suspensos voláteis apresentaram valores baixos em relação a este mesmo reator em outro período de monitoramento, que teve valores médios de eficiência de remoção de DQO entre 60 e 90% e valores médios de sólidos suspensos voláteis de 46 mg.l⁻¹ no efluente (Morais *et al.*, 2004)

Tabela 5.1. Parâmetros físico-químicos de monitoramento do reator UASB.

Parâmetro	Afluente	Efluente	Eficiência ^a %
pH	6,54 ± 0,25	6,61 ± 0,29	-
Temperatura °C	29,6 ± 0,20	29,7 ± 0,20	-
DQO Bruta – mg.l ⁻¹	520,01 ± 12,32	268,71 ± 2,09	48,33
DQO Filtrada – mg.l ⁻¹	172,21 ± 7,95	81,73 ± 5,13	47,45
Alcalinidade Parcial - mg.l ⁻¹	114,60 ± 3,67	160,40 ± 7,35	-
Alcalinidade Total - mg.l ⁻¹	251,40 ± 6,51	252,60 ± 4,24	-
Ácidos Voláteis - mg.l ⁻¹	201,03 ± 3,76	206,35 ± 6,26	-
Potencial Redox – mV	-338,90 ± 22,27	-328,35 ± 36,64	-
Sólidos Totais - mg.l ⁻¹	618,00 ± 237,7	566,67 ± 208,5	8,31
Sólidos Suspensos Totais - mg.l ⁻¹	187,00 ± 52,26	143,67 ± 40,08	22,77
Sólidos Suspensos Voláteis - mg.l ⁻¹	132,33 ± 21,20	106,33 ± 26,95	19,61

^a Eficiência média de remoção do sistema.

O pH no lodo no instante da coleta foi medido entre 7,2 e 7,4 para todos os níveis de A a E do reator. A temperatura também foi medida no mesmo momento da coleta e estava aproximadamente 30°C para todos os níveis (Tabela 5.2). Ambos os parâmetros apresentaram-se na faixa ótima para digestão anaeróbia e metanogênese (Speece, 1996; Aquino e Chernicharo, 2005).

A concentração de todos os tipos de sólidos suspensos variou conforme o nível do reator como mostra a Tabela 5.2. O nível A apresentou a maior concentração de sólidos, diminuindo em C, e novamente aumentando em E. Este comportamento talvez tenha ocorrido devido ao fluxo ascendente da alimentação do reator em C, fazendo com que uma boa parte do lodo suba para E, e a outra parte decante naturalmente para A.

Em relação à Atividade Metanogênica Específica, observou-se uma leve diminuição da produção de metano com o aumento da altura do reator, tanto para a primeira quanto para a segunda alimentação (Tabela 5.2). Possivelmente a composição dos microrganismos em cada nível tenha influenciado neste resultado.

Tabela 5.2. Valores de temperatura, pH, sólidos e Atividade Metanogênica Específica para o lodo do reator UASB.

Nível ^a	Temperatura (°C)	pH	Sólidos Suspensos (g.l ⁻¹)			AME (g DQO _{CH4} /g SSV.d)	
			Totais	Fixos	Voláteis	1 ^a Aliment.	2 ^a Aliment.
E	30,7	7,2	58,52	30,49	28,03	0,2884	0,3620
D	30,8	7,4	48,73	26,72	22,01	0,3396	0,3755
C	30,8	7,4	35,94	18,99	16,95	0,3370	0,3926
B	30,8	7,3	62,45	34,52	27,93	0,3049	0,3204
A	31,2	7,2	89,94	49,75	40,20	0,3740	0,4070

^aOs cinco níveis do reator UASB. De baixo pra cima: A, B, C, D e E.

5.2. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR amplificados a partir do DNA extraído de Bacteria e Archaea possuíam tamanho aproximado de 450 pb e 350 pb respectivamente para todos (Figura 5.1). Estes fragmentos foram clonados, e cada placa de transformação gerou entre 60 e 120 colônias. Destas colônias, cerca de 90%, apresentaram coloração branca, ou seja, possuíam o inserto. Então foram selecionadas ao acaso 16 colônias de cada placa para crescimento e posterior extração plasmidial. Após a extração, os plasmídios seguiram para o sequenciamento.

Foram cinco placas (correspondendo aos cinco níveis do reator) para cada um dos dois domínios, 16 clones por placa e duas seqüências para cada clone (*primers* forward e reverse), totalizando 320 seqüências. Entretanto as seqüências foram submetidas a um rigoroso controle de qualidade para formação das seqüências consenso, onde somente foram aceitas seqüências com qualidade igual ou superior a

PHRED 30. Isto resultou em um total de 53 sequências para Bacteria e 56 para Archaea, que em seguida foram utilizadas para comparação nos bancos de dados.

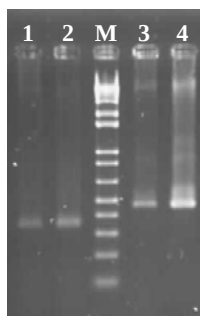


Figura 5.1. Foto de gel mostrando produtos de PCR provenientes da amplificação da região 16S do rRNA de Archaea e Bacteria. Colunas 1 e 2 são produtos relativos aos níveis A e B para Archaea, e as colunas 3 e 4 são produtos dos níveis A e B para Bacteria. M é o marcador de 1kb. Gel de agarose 1,5%.

5.3. DOMÍNIO BACTERIA

Foram encontrados representantes de cinco filos bacterianos de acordo com o Classifier RDP e o NCBI, distribuídos da seguinte maneira: 42% pertenciam ao filo *Actinobacteria*, 13% ao filo *Proteobacteria*, 9% ao *Chloroflexi*, 6% *Firmicutes* e 4% *Bacteroidetes*. Os 26% das seqüências restantes não se enquadraram em nenhum dos filos (Figura 5.2). A Tabela 5.3 mostra o resultado da busca por similaridade no banco de dados do NCBI para todas as seqüências de Bacteria encontradas.

5.3.1. *Actinobacteria*

Pertencem a este grupo bactérias Gram-positivas com alto teor de G + C, que têm importante papel na decomposição da matéria orgânica e no ciclo do carbono. (Stackebrandt *et al.*, 1997). Representantes deste filo foram encontrados nos níveis A, B, C e D no reator.

Membros da família *Nocardioideaceae* como *Nocardioides dokdonensis* e *Propionicimonas paludicola* foram encontrados nos níveis A e B respectivamente. *Nocardioides dokdonensis* é uma espécie ainda pouco conhecida pertencente a um gênero que foi identificado inicialmente em solos, onde muitas espécies são conhecidas por degradarem hidrocarbonetos presentes em óleos brutos (Schippers *et al.*, 2005). *Propionicimonas paludicola* é anaeróbia facultativa, mas cresce melhor em culturas anaeróbias produzindo produtos fermentados como o propionato (Akasaka *et al.*, 2003).

Membros da família *Propionibacteriaceae* como *Brooklawnia cerclae* e *Tessaracoccus sp.* KSS-17Se foram encontrados em todos os níveis do reator.

Brooklawnia cerclae inicialmente foi isolada de lençóis freáticos contaminados com misturas de solventes clorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. São mesofílicos e os principais produtos produzidos são o propionato e o acetato a partir de glicose (Bae *et al.*, 2006). *Tessaracoccus* sp. KSS-17Se pertence a um gênero de anaeróbios facultativos formando tétrades de cocos, tal como *Tessaracoccus bendigoensis*, que utiliza diversos substratos em seu metabolismo, tais como, glicose, sacarose, frutose, manose, trealose, ácido valérico, ácido butírico e ácido propiônico. São mesofílicos naturais de lodos ativados (Maszenan *et al.*, 1999).

Três seqüências apresentaram similaridade com *Cellulomonas* sp. d20, e foram encontradas nos níveis A e B do reator. Faz parte deste gênero bactérias hidrolíticas fermentativas hábeis em produzir acetato, ethanol e formiato a partir de polissacarídeos complexos como a celulose (Guyot *et al.*, 1986; Na *et al.*, 2005).

A busca por similaridade para a seqüência D15 no NCBI (que foi encontrado somente no nível D) resultou na bactéria *Pseudonocardia petroleophila* como resultado. O gênero foi descrito em 1957 por Henssen como pertencente a bactérias bioquimicamente versáteis, com algumas espécies podendo oxidar hidrocarbonetos e outras oxidar sulfeto para sulfato ou degradar celulose (Huang *et al.*, 2002). No entanto a seqüência D15 apresentou apenas 89% de similaridade com esta bactéria. Também foi feita busca por similaridade no RDP, utilizando o programa Classifier. Neste caso o isolado D15 foi classificado em nível de filo *Actinobacteria*. Estes resultados indicam que D15 provavelmente corresponde a uma bactéria ainda não descrita, próxima de *Pseudonocardia petroleophila*.

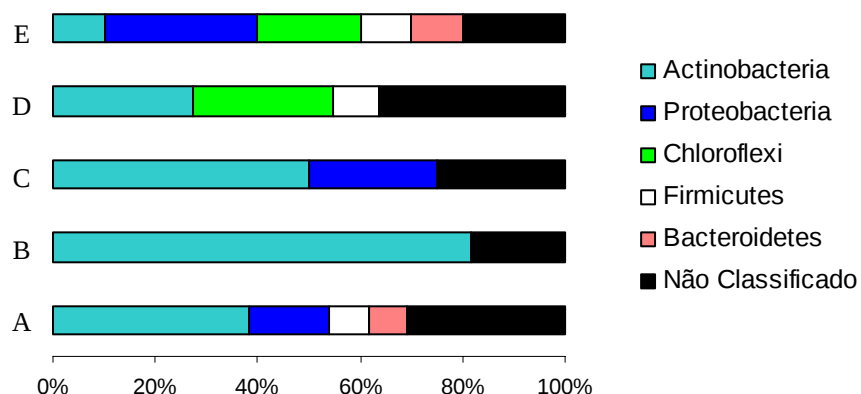


Figura 5.2. Representação da distribuição dos filos do domínio Bacteria encontrados nos níveis A, B, C, D e E do reator UASB. Representantes encontrados: ACTINOBACTERIA - *Nocardioide dokdonensis*, *Propionimonas paludicola*, *Brooklawnia cerclae* e *Tessaracoccus* sp., *Cellulomonas* sp. *Pseudonocardia petroleophila*. PROTEOBACTERIA - *Brachymonas denitrificans*, *Propionivibrio limicola*, *Thiobacillus* sp., *Desulfovibrio* sp. CHLOROFLEXI - classe *Anaerolineae*. FIRMICUTES - *Succinoclasticum ruminis*, *Megasphaera elsdenii*. BACTEROIDETES - ordem *Bacteroidales*.

Tabela 5.3. Resultados da busca por similaridade das seqüências de 16s rDNA para o domínio Bacteria, em relação ao banco de dados do NCBI.

Clone	Descrição	Acesso	ID ^a	e-value	Autor	Origem
A4	Propionibacteriaceae bacterium DA02	EU541469.1	98%	2e-160	Ma et al., 2008	Não informada
A7	Nocardioides dokdonensis strain FR1436	EF633986.1	98%	0.0	Baik et al., 2007	Sedimento arenoso
A8	Cellulomonas sp. d20	AJ298927.1	93%	5e-156	Oravec et al., 2003	Bactérias fecais
A9	Succiniclasticum ruminis	X81137.1	96%	2e-165	van Gylswyk, 2003	Ruminantes
A5	Tessaracoccus sp. KSS-17Se	FM178840.1	97%	8e-169	Kaempfer et al., 2008	Fluidos metalúrgicos
A15	Brachymonas denitrificans strain a44	EU434445.1	98%	1e-142	Li, 2008	Efluente de produção de antibióticos
A12	Uncultured bacterium clone C16	EU234255.1	100%	0.0	Li et al., 2007	Efluente de produção de penicilina
A13	Uncultured bacterium clone 6E6_cons	EF688250.1	100%	9e-173	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio
A16	Uncultured bacterium clone 4D11_cons	EF688195.1	100%	0.0	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio
A1	Uncultured Nocardioidaceae bacterium	EU266885.1	98%	2e-169	Winderl et al., 2008	Degradação anaeróbia de tolueno
A6	Uncultured gamma proteobacterium	EF141974.1	96%	7e-139	Zhou et al., 2007	Caverna sudeste da China
A11	Uncultured bacterium clone R5 E8	DQ462739.1	90%	6e-105	Enright et al., 2006	Digestão anaeróbia de solventes
A14	Uncultured low G+C Gram-positive bacterium	AY261810.1	99%	1e-177	Zhang et al., 2003	Lodo granular de UASB
B4	Cellulomonas sp. d20	AJ298927.1	97%	0.0	Oravec et al., 2003	Bactérias fecais
B10	Cellulomonas sp. d20	AJ298927.1	97%	0.0	Oravec et al., 2003	Bactérias fecais
B14	Propionicimonas paludicola	AB078859	100%	0.0	Akasaka et al., 2004	Campos de arroz
B2	Propionibacteriaceae bacterium WR061	AB298731.2	98%	0.0	Ueki et al., 2008	Bact. fermentativa de resíduo de pecuária
B3	Brooklawnia cerclae strain BL-34	DQ196625.1	97%	0.0	Bae et al, 2006	Água contaminada com clorossolvente
B7	Brooklawnia cerclae strain BL-34	DQ196625.1	97%	0.0	Bae et al, 2006	Água contaminada com clorossolvente

^aMáxima Identidade.

Tabela 5.3. Continuação.

Clone	Descrição	Acesso	ID ^a	e-value	Autor	Origem
B15	Uncultured bacterium gene	AB291424.1	99%	7e-165	Narihiro et al., 2007	Reator UASB
B5	Uncultured bacterium clone 4D11_cons	EF688195.1	99%	0.0	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio
B9	Uncultured bacterium clone ORSFAB_b12	EF393231.1	99%	0.0	D'Angelo e Nunez, 2007	Trat. anaeróbio de sedimento de Rio
B13	Uncultured bacterium clone Eb48	EF063623.1	99%	0.0	Fernandez et al., 2008	Reator desnitrificante
B11	Uncultured bacterium clone Eb48	EF063623.1	98%	0.0	Fernandez et al., 2008	Reator desnitrificante
C1	Tessaracoccus sp. KSS-17Se	FM178840.1	99%	3e-163	Kaempfer et al., 2008	Fluidos metalúrgicos
C5	Propionibacteriaceae bacterium FH044	AB298766.2	100%	0.0	Ueki et al., 2008	Bact. fermentativa de resíduo de pecuária
C11	Desulfovibrio sp. A45	AB081579.1	100%	2e-153	Sato et al., 2007	Raízes de plantas de arroz
C15	Uncultured Thiobacillus sp.	AB425223.1	100%	1e-121	Horath et al., 2008	Fontes sulfurosas
C6	Bacterium enrichment culture clone MB2_3	AM933660.1	100%	0.0	Lechner, 2008	Cultura enriquecida com dioxina
C8	Uncultured bacterium clone 4D10_cons	EF688194.1	98%	4e-127	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio
C3	Uncultured bacterium clone Eb48	EF063623.1	99%	0.0	Fernandez et al., 2008	Reator desnitrificante
C16	Uncultured bacterium clone Eb48	EF063623.1	97%	0.0	Fernandez et al., 2008	Reator desnitrificante
D4	Propionibacteriaceae bacterium FH044	AB298766.2	100%	3e-179	Ueki et al., 2008	Bact. fermentativa de resíduo de pecuária
D12	Propionibacteriaceae bacterium WR061	AB298731.2	98%	1e-161	Ueki et al., 2008	Bact. fermentativa de resíduo de pecuária
D15	Pseudonocardia petroleophila	X80596.1	89%	2e-150	Ruimy et al., 2004	Não informado
D2	Megasphaera elsdenii	AY038994.1	100%	0.0	Kim et al., 2002	Bactéria do Rumem
D8	Uncultured bacterium clone 4D11_cons	EF688195.1	99%	0.0	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio

^aMáxima Identidade.

Tabela 5.3. Continuação.

Clone	Descrição	Acesso	ID ^a	e-value	Autor	Origem
D16	Uncultured bacterium clone 4D11_cons	EF688195.1	100%	0.0	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio
D11	Uncultured bacterium clone 4D11_cons	EF688195.1	98%	0.0	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio
D10	Uncultured anaerobic bacterium clone B-1AI	AY953155.1	98%	0.0	Von Arb et al., 2005	Efluentes suínos
D3	Uncultured anaerobic bacterium clone B-1AG	AY953154.1	99%	2e-170	Von Arb et al., 2005	Efluentes suínos
D13	Uncultured bacterium clone Eb48	EF063623.1	97%	1e-172	Fernandez et al., 2008	Reator desnitrificante
D7	Uncultured bacterium partial	CR933321.1	98%	4e-112	Chouari et al., 2006	Lodo de reator anaeróbio
E15	Propionivibrio limicola strain GolChi1 T	AJ307983.1	98%	0.0	Ludwig et al., 2002	Degradação de hidrocarbonetos
E12	Tessaracoccus sp. KSS-17Se	FM178840.1	98%	0.0	Kaempfer et al., 2008	Fluidos metalúrgicos
E2	Uncultured bacterium clone 4D11_cons	EF688195.1	98%	0.0	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio
E5	Uncultured epsilon proteobacterium PD-UASB-2	AY261811.1	99%	0.0	Zhang et al., 2003	Lodo granular para degradação de fenol
E8	Uncultured bacterium clone 3C7_cons	EF688178.1	99%	0.0	Roest, 2008	Lodo de reator anaeróbio
E10	Uncultured bacterium clone LTR-R13	EU722381.1	99%	0.0	Scully et al., 2008	Reator EGSB
E11	Uncultured bacterium clone 013C-F4	DQ905431.1	99%	0.0	Mai et al., 2007	Microbiota intestinal
E16	Uncultured bacterium clone C16	EU234255.1	99%	0.0	Li et al, 2007	Efluente de produção de penicilina
E3	Uncultured bacterium clone Flyn1_9	DQ256687.1	95%	0.0	Uthicke, 2006	Sedimentos de calcário
E6	Uncultured bacterium	CR933321.1	98%	0.0	Chouari et al., 2006	Lodo de reator anaeróbio

^aMáxima Identidade.

5.3.2. *Proteobacteria*

Os organismos alocados nesse grupo apresentam coloração Gram-negativa e uma enorme diversidade de morfologia e metabolismo. Incluem muitos patógenos, fixadores de nitrogênio e organismos fotossintéticos. Constituem o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, distribuídas em cinco principais classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*. Foram encontrados no reator UASB representantes de todas as classes, exceto *Alphaproteobacteria*.

a) *Betaproteobacteria*

Brachymonas denitrificans linhagem A44 foi encontrado no nível A do reator. Isolada inicialmente de lodos ativados (Hiraishi *et al.* 1995), esta linhagem possui habilidade de remover fósforo do sistema sob condições aeróbias, e nitrogênio sob condições anoxicas – ausência de oxigênio molecular e presença de nitratos (Shi, *et al.*, 2007). Este processo é muito importante em reatores, pois previne efluentes ricos nestes nutrientes e conseqüente eutrofização de corpos d'água (Gumaelius, 2001). *Propionivibrio limicola strain GolChi1 T* foi encontrado somente no nível E do UASB. É uma bactéria mesofílica anaeróbia. Foi isolado em cultura metabolizando compostos hidroaromáticos como ácido quínico e o ácido chiquímico, produzindo somente propionato e acetato (Brune *et al.*, 2002).

b) *Gammaproteobacteria*

No nível C a sequência C15 apresentou 100% de similaridade com *Thiobacillus sp.* Esse organismo está relacionado com a oxidação de ácido sulfídrico (H₂S) em reatores de tratamento de efluentes e fontes sulfurosas (Visser *et al.*, 1997; Ravichandra *et al.*, 2007). Esta habilidade é interessante para reatores anaeróbios, pois o H₂S é um inibidor da metanogênese e causa problemas de corrosão e mau cheiro (Chernicharo, 1997). É interessante notar a presença desta bactéria no reator UASB, uma vez que ela é descrita na literatura como uma bactéria quimioautotrófica aeróbia (Visser *et al.*, 1997; Kantachote e Innuwat, 2004; Dul'tseva *et al.*, 2006; Ravichandra *et al.*, 2007). Entretanto existem trabalhos que relatam a atividade de *Thiobacillus sp.* em ambientes chamados de microaerófilos, ou seja, ambientes com pouco oxigênio (Janssen *et al.*, 1995; González-Sánchez *et al.*, 2005; Thar e Fenchel, 2005; Syed *et al.*, 2006). Talvez este ambiente microaerófilo venha a se formar devido à introdução de pequenas quantidades de O₂ no reator proveniente de sua alimentação. Outra sequência

encontrada no nível A do reator, apenas foi possível classificá-la dentro da classe *Gammaproteobacteria*.

c) *Deltaproteobacteria*

Desulfovibrio sp. A45 faz parte do grupo das bactérias redutoras de sulfato (SRB) e foi encontrado no nível C do reator UASB. São um grupo de microrganismos que vivem em diversos ambientes anaeróbios, incluindo solos, e efluentes domésticos, industriais e de mineração (Chang *et al.*, 2001). Todos os membros possuem a habilidade de utilizar o sulfato como aceptor final de elétrons. As SRB podem usar muitos substratos, incluindo hidrogênio, lactato, formiato, malato, fumarato, piruvato, álcoois, ácidos graxos voláteis e vários tipos de hidrocarbonetos e compostos fenólicos. (Oude Elferink *et al.*, 1995; Wawer e Muyzer, 1995; Rueter *et al.*, 2002).

d) *Epsilonproteobacteria*

Somente um representante não cultivável, *epsilon proteobacterium* PD-UASB-2, foi encontrado no nível E do reator. De acordo com os dados do NCBI, este foi identificado em lodo granular de reator UASB para tratamento de fenol a temperatura ambiente. Já no RDP, o Classifier indicou relação de 98% com a família *Helicobacteraceae*, família esta a quem pertence patógenos intestinais humanos (Oxley *et al.*, 2004).

5.3.3. *Chloroflexi*

A procura por similaridade das seqüências D3, D7, D10, E6 e E10 no banco de dados do NCBI nos forneceu identidade máxima com bactérias não cultiváveis. A busca no RDP Classifier indicou que as seqüências pertenciam à classe *Anaerolineae*. Estudos relativos ao filo *Chloroflexi* têm demonstrado que seus membros possuem papel importante na formação do grânulo em reatores tipo UASB (Björnsson *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2005)

5.3.4. *Firmicutes*

Integrantes deste filo foram encontrados nos níveis A, D e E do reator. *Succiniclasicum ruminis*, encontrado no nível A, foi isolado inicialmente de rumem de vacas. É uma bactéria Gram-negativa mesofílica que fermenta succinato a propionato (van Gylswyk, 1995). *Megasphaera elsdenii* apareceu no nível D. Compreende um grupo de bactérias que vivem no rumem e intestino, sendo encontrada também em

reatores anaeróbios. Podem fermentar glicose e lactato, produzindo como produtos finais, valeriato, propionato e butirato (Marounek *et al.*, 1989; Bouallagui *et al.*, 2004). A sequência E11 somente foi classificada a nível de filo, e de acordo com os bancos de dados genômicos, foi denominada clone de Bacteria não cultivável (*Uncultured bacterium* clone Flyn1_9).

5.3.5. *Bacteroidetes*

As seqüências A12 e E16 apenas foram classificadas a nível de filo, quando comparadas ao NCBI, e são oriundas de efluentes de produção de penicilina. No entanto, o Classifier forneceu a informação de que elas pertenciam a ordem *Bacteroidales*, que é uma classe bastante distribuída pelo ambiente, incluindo solo, água do mar e intestino de animais de sangue quente (Ley *et al.*, 2005).

5.2. DOMÍNIO ARCHAEA

De acordo com o Classifier, 43% das seqüências pertenciam à ordem *Methanomicrobiales*, 17% a ordem *Methanobacteriales* e 12% a *Methanosarcinales* (Figura 5.2). Os outros 17% restantes foram apenas agrupados com confiança a nível do filo *Euryarchaeota*. No entanto, comparando as nossas seqüências com as do banco de dados do NCBI, foram encontrados organismos pertencentes aos gêneros *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, *Methanolinea* e a espécie *Methanobacterium beijingense*.

Methanobacterium sp. foi encontrado nos níveis A, B, C e D do reator, não aparecendo no nível mais alto. Já *Methanospirillum* sp., *Methanobrevibacter* sp. somente foram encontrados nas alturas D e E respectivamente. Estes gêneros hidrogenotróficos foram também encontrados em reatores anaeróbios para tratamento de diversos efluentes como os de cervejaria (Keyser, 2006), fábrica de papel, produção de alimentos, produtos fenólicos, produção de whisky e esgoto doméstico (Leclerc, 2004). Eles podem utilizar H_2 /CO₂ e formiato em seu metabolismo para obtenção de energia e produção de CH₄ (Schauer *et al.*, 1982).

Methanosaeta sp. foi encontrado em A, C, D e E no reator. Esta bactéria tem função importante na remoção do carbono do sistema, podendo utilizar como fonte de energia o acetato e também metanol e metilaminas (Thauer, 1998). O gênero foi

também identificado em vários reatores como para o tratamento de esgoto (Zhang *et al.* 2005), efluente de matadouro, produção de vinho e papel (Leclerc, 2004).

Recentemente foi isolada de cultura anaeróbia enriquecida com propionato, uma nova espécie identificada como *Methanolinea tarda* proveniente de lodo de esgoto doméstico no Japão. A linhagem utiliza H_2 e formiato como fonte de energia e produção de CH_4 (Imachi *et al.*, 2008). Uma das seqüências obtidas neste trabalho foi observada apenas no nível A do reator e apresentou 97% de similaridade com o gênero *Methanolinea*.

Methanobacterium beijingense foi encontrado em reator anaeróbio para tratamento de efluente de produção de cerveja em Pequim, China. Este microrganismo também utiliza H_2 e formiato como fonte de energia e produção de CH_4 (Ma *et al.*, 2005). A seqüência D9 encontrada no nível D do reator UASB apresentou 94% de similaridade com este Archaea. Este valor relativamente baixo de identidade foi compensado pelo alto nível de qualidade (valores de PHRED entre 35 e 49), o que sugere que esta seja a seqüência de uma bactéria ainda não descrita, mas próxima a *Methanobacterium beijingense*.

Também foi notada a marcante presença de seqüências similares a um clone da ordem *Methanomicrobiales* (nº acesso: AB236107.1 no NCBI) referente a uma bactéria não cultivável. Este clone foi encontrado em todos os níveis do reator UASB, e representa 42% do total das seqüências de Archaea, e oito das nove seqüências identificadas no nível B. Utilizando o programa Classifier do RDP, foram encontradas 20 seqüências com 87% de similaridade à família *Methanomicrobiaceae*, e algumas destas, apresentando pouca similaridade com o gênero *Methanoculleus*.

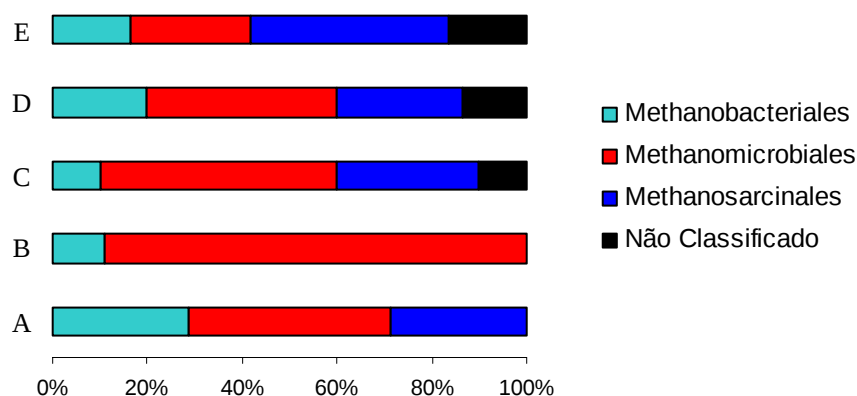


Figura 5.3. Representação da distribuição das ordens do domínio Archaea encontrados nos níveis A, B, C, D e E do reator UASB. Representantes encontrados: METHANOMICROBIALES – *Methanospirillum* sp.; METHANOBACTERIALES – *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp., *Methanobacterium beijingense*; METHANOSARCINALES – *Methanosaeta* sp.

Tabela 5.4. Resultados da busca por similaridade das seqüências de 16s rDNA para o domínio Archaea, em relação ao banco de dados do NCBI.

Clone	Descrição	Acesso	ID ^a	e-value	Autor	Origem
A9	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	98%	3e-137	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
A8	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	3e-92	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
A4	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	5e-109	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
A2	Uncultured Methanosaeta sp. clone D_E05	AY454756.1	99%	1e-161	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
A15	Uncultured Methanosaeta sp. clone D_G10	AY454768.1	99%	2e-155	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
A6	Uncultured Methanolinea sp.	AB434764.1	97%	6e-51	Sumino et al, 2008	Reator anaeróbio a baixa temperatura
A16	Methanobacterium sp. T01	AB288275.1	98%	8e-139	Shimizu et al, 2007	Sedimentos do norte do Japão
A7	Methanobacterium sp. F	AB302952.1	98%	3e-118	Watanabe et al, 2007	Solo de campos de arroz do Japão
B2	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	6e-140	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
B4	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	1e-126	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
B5	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	1e-150	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
B6	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	1e-155	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
B11	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	3e-152	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
B14	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	1e-150	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
B3	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	96%	8e-123	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
B16	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	96%	3e-138	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
B7	Methanobacterium sp. T01	AB288275.1	100%	6e-125	Shimizu et al, 2007	Sedimentos do norte do Japão
C6	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	1e-135	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
C5	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	2e-155	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios

^aMáxima Identidade.

Tabela 5.4. Continuação.

Clone	Descrição	Acesso	ID ^a	e-value	Autor	Origem
C17	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	3e-122	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
C1	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	7e-124	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
C4	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	5e-135	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
C3	Uncultured Methanosaeta sp. clone D_E05	AY454756.1	100%	4e-172	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
C15	Uncultured Methanosaeta sp.	AB288619.1	99%	5e-150	Ishii et al., 2008	Amostras ambientais
C10	Uncultured Methanosaeta sp.	AY454758.1	99%	1e-121	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
C2	Uncultured Methanosaeta sp.	AM491934.1	100%	2e-133	Aburto, 2007	Ambiente contaminado por benzeno
C9	Uncultured Methanosaeta sp.	AB434763.1	98%	6e-72	Sumino et al, 2008	Reator anaeróbio a baixa temperatura
C11	Methanobacterium sp. T01	AB288275.1	99%	4e-146	Shimizu et al, 2007	Sedimentos do norte do Japão
D13	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	2e-159	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
D14	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	4e-152	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
D15	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	2e-159	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
D4	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	7e-149	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
D2	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	99%	9e-158	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
D3	Uncultured Methanosaeta sp.	AY454761.1	99%	5e-161	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
D11	Uncultured Methanosaeta sp.	AB434763.1	99%	8e-149	Sumino et al, 2008	Reator anaeróbio a baixa temperatura
D1	Uncultured Methanosaeta sp. clone DI_G06	AY454766.1	100%	2e-129	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
D10	Uncultured Methanosaeta sp. clone DI_C03	AY454761.1	99%	5e-161	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
D12	Uncultured Methanosaeta sp. clone D_G10	AY454768.1	99%	5e-166	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
D6	Uncultured Methanospirillum sp.	DQ903695.1	97%	6e-160	Chinalia et al., 2006	Reator anaeróbio psicrófilo

^aMáxima Identidade.

Tabela 5.4. Continuação.

Clone	Descrição	Acesso	ID ^a	e-value	Autor	Origem
D5	Methanobacterium sp.	AB368917.1	99%	2e-139	Kitamura et al., 2005	Solo de plantação de arroz
D8	Methanobacterium sp. T01	AB288275.1	99%	7e-129	Shimizu et al, 2007	Sedimentos do norte do Japão
D16	Methanobacterium sp. T01	AB288275.1	96%	3e-127	Shimizu et al, 2007	Sedimentos do norte do Japão
D9	Methanobacterium beijingense strain 4-1	AY552778.3	94%	6e-110	Ma et al., 2008	Nova especie em reatores anaeróbios
E10	Uncultured Methanomicrobiales archaeon	AB236107.1	100%	4e-141	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
E13	Uncultured Methanosaeta sp. clone D_G10	AY454768.1	99%	1e-120	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
E4	Uncultured Methanomicrobia archaeon	AB236066.1	98%	9e-128	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
E5	Uncultured Methanomicrobia archaeon	AB236066.1	98%	7e-149	Sakai et al., 2008	Ambientes anaeróbios
E3	Uncultured Methanosaeta sp. clone DI_G06	AY454766.1	99%	2e-170	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
E15	Uncultured Methanosaeta sp. clone DI_G06	AY454766.1	99%	2e-154	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
E7	Uncultured Methanosaeta sp. clone D_G10	AY454768.1	99%	3e-75	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
E9	Uncultured Methanosaeta sp. clone D_G10	AY454768.1	95%	6e-104	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
E2	Uncultured Methanosaeta sp.	AB288619.1	99%	1e-156	Ishii et al., 2008	Amostras ambientais
E1	Uncultured Methanosaeta sp.	AB288619.1	99%	3e-137	Ishii et al., 2008	Amostras ambientais
E6	Uncultured Methanosaeta sp.	AB434766.1	98%	4e-94	Sumino et al, 2008	Reator anaeróbio a baixa temperatura
E12	Uncultured Methanobrevibacter sp. clone DI_B05	AY454733.1	100%	8e-153	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais
E8	Uncultured Methanobrevibacter sp. clone EI_G11	AY454736.1	99%	9e-107	Piza et al., 2005	Sedimentos de estuários tropicais

^aMáxima Identidade.

6. CONCLUSÕES

O uso das técnicas de biologia molecular baseadas na clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene 16S rDNA, foi eficaz na elucidação da composição microbiológica do reator UASB da ETE-Mangueira, outrora desconhecida.

A análise da estrutura das populações microbianas no reator mostrou que as populações de Bacteria e Archaea distribuíram-se de maneira diversificada entre os diferentes níveis do reator. Este comportamento talvez possa ser explicado por uma deficiência no mecanismo de mistura dentro do reator ou diferenças nas densidades dos flocos microbianos ou ambas.

Os membros do filo *Actinobacteria* foram os mais abundantes do domínio Bacteria no reator. Quanto ao domínio Archaea, os membros da ordem *Methanomicrobiales* é que foram os mais presentes.

Foram encontrados no lodo integrantes de Archaea e Bacteria que possuíam as habilidades metabólicas descritas para realização de todas as etapas da digestão anaeróbia desejável para o processo: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, tanto acetoclástica quanto hidrogenotrófica; como também foram identificadas bactérias sulfato redutoras (indesejadas no processo), e bactérias consumidoras de H₂S (muito interessantes para o processo).

Também foram encontrados representantes do domínio Bacteria que possuíam metabolismo com potencial biotecnológico para tratamento de poluentes compostos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e solventes clorados.

Além dos organismos que tiveram suas identidades reveladas, a biomassa do reator demonstrou também possuir muitos microrganismos ainda não descritos, tanto para Bacteria quanto para Archaea como, por exemplo, a sequência classificada como “Uncultured Methanomicrobiales archaeon” que se fez presente em todos os níveis do reator UASB.

Para complementação deste trabalho e a realização de novas pesquisas poderão ser feitas investigações, tais como: a avaliação da composição microbiana durante períodos maiores de operação do reator UASB; isolamento e caracterização dos microrganismos de Bacteria e Archaea que devem representar novas espécies; avaliar as populações metabolicamente ativas de Bactéria e Archaea com o uso da técnica de hibridização fluorescente *in situ* – FISH; testes de aplicabilidade destes microrganismos para biodegradabilidade de compostos poluidores provenientes de outras fontes de contaminação diferentes dos esgotos; e finalmente o isolamento e caracterização destes microrganismos e seus genes responsáveis por seus metabolismos de interesse biotecnológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKASAKA, H.; UEKI, A.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; UEKI, K. *Propionicimonas paludicola* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003 Nov;53(Pt 6):1991-8.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. *Nucleic. Acids Res*. 1997, v. 25, p. 3389-3402.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.; *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. *Microbiol. Rev*. 1995, 59, 143–169.
- AN, D. S.; IM, W. T.; YANG, H. C.; KANG, M. S.; KIM, K. K.; JIN, L.; KIM, M. K.; LEE, S. T. *Cellulomonas terrae* sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005 Jul;55(Pt 4):1705-9.
- APHA/AWWA/WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th edition, Washington, 1992.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; *Acúmulo de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs) em Reatores Anaeróbios sob Estresse: Causas e Estratégias de Controle*. *Eng. Sanit. Ambient*. Abr-Jun, 2005, v.10, n. 2, p.152-161
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E. *Methodologies for determining the specific methanogenic activity (SMA) in anaerobic sludges*. *Eng. Sanit. Ambient.*, Apr./Jun., 2007, v.12, n.2, p.192-201. ISSN 1413-4152.
- BAE, H. S.; MOE, W. M.; YAN, J.; TIAGO, I.; DA COSTA, M. S.; RAINEY, F. A. *Brooklawnia cerclae* gen. nov., sp. nov., a propionate-forming bacterium isolated from chlorosolvent-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006 Aug;56(Pt 8):1977-83.
- BALCH, W. E.; FOX, G. E.; MAGRUM, L. J.; WOESE, C. R.; WOLFE, R. S. *Methanogens: reevaluation of a unique biological group*. *Microbiol Rev*. 1979 Jun;43(2):260-96.
- 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*. 2002 Aug;148(Pt 8):2309-18.
- BOUALLAGUI, H.; TORRIJOS, A.; GODON, J. J.; MOLETTA, R.; BEN CHEIKH, R.; TOUHAMI, Y.; DELGENES, J. P.; DI, A. H. *Two-phases*

- anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes: bioreactors performance.* Biochem. Eng. J. 2004, 21 (2), 193.
- BROWN, J. R. *Ancient Horizontal Gene.* Nature Reviews Genetics. 2003, volume 4, February, 121.
- BROWN, J. R.; DOOLITTLE, W. F. *Archaea and the Prokaryote-to-Eukaryote Transition.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, Dec. 1997, P. 456–502.
- BRUIJN, F.J.. *Use of repetitive (repetitive extragenic element and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of Rhizobium meliloti isolates and other soil bacteria.* Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58, 2180–2187.
- BRUNE, A.; LUDWIG, W.; SCHINK, B. *Propionivibrio limicola* sp. nov., a fermentative bacterium specialized in the degradation of hydroaromatic compounds, reclassification of *Propionibacter pelophilus* as *Propionivibrio pelophilus* comb. nov. and amended description of the genus *Propionivibrio*. Int J Syst Evol Microbiol. 2002 Mar;52(Pt 2):441-4.
- CA (Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture). *Water for food, water for life: A comprehensive assessment of water management in agriculture.* London, UK: Earthscan; and Colombo, Sri Lanka; IWMI, 2007.
- CAVALIER-SMITH T. *The neomuran origin of archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification.* Int J Syst Evol Microbiol. 2002 Jan;52(Pt 1):7-76.
- CHANG, Y. J.; PEACOCK, A. D.; LONG, P. E.; STEPHEN, J. R.; MCKINLEY, J. P.; MACNAUGHTON, S. J.; HUSSAIN, A. K; SAXTON, A. M.; WHITE, D. C. *Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site.* Appl Environ Microbiol. 2001 Jul;67(7):3149-60.
- CHERNICHARO, C. A. L. *Reatores anaeróbios*, Belo horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, Belo Horizonte, 1997, p. 15; 17; 24-28; 86 e 161;203-204. - 27 (colocar o a, b, c...)
- DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEFS, J-M.; SMITS, GEERT.; VANDENBEMPT, I.; WACHTER, R. *Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences.* Nucleic Acids Res., v. 16, p. 87-173, 1988.
- DIRUGGIERO, J.; BROWN, J. R.; BOGERT, A. P.; ROBB, F. T. *DNA repair systems in archaea: mementos from the last universal common ancestor?* J Mol Evol. 1999, Oct;49(4):474-84.
- DOOLITTLE, R. F. *Evolutionary aspects of whole-genome biology.* Curr Opin Struct Biol. 2005,15, 3: 248–253

- DOOLITTLE, W. F. *Uprooting the Tree of Life*. Scientific American. February, 2000.
- DUL'TSEVA, N. M.; TUROVA, T. P.; SPIRIDONOVA, E. M.; KOLGANOVA, T. V.; OSIPOV, G. A.; GORLENKO, V. M. *Thiobacillus sajanensis* sp. nov., a new obligately autotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from Khoito-Gol hydrogen-sulfide springs, Buryatia. Mikrobiologiya. 2006 Sep-Oct;75(5):670-81.
- FERNANDES, F. *Manual Prático para Compostagem de bio-sólidos*. Programa em Pesquisa em Saneamento Básico. PROSAB, Rio de Janeiro; Associação Brasileira de Engenharia Sanitária – ABES, 1999, p. 84,.
- FIELD, J.; ALVAREZ, R. S.; LETTINGA, G. *Ensayos Anaerobios. Depuración Anaerobia de Aguas Residuales*. Actas del 4º Seminario D. A. A. R. Valladolid, Espana, p. 65, 1988.
- FLORENCIO, L. *The Fate of Methanol in Anaerobic Bioreactors*. Ph.D. Dissertation. Wageningen Agricultural University. Wageningen, The Netherlands, 1994.
- FORESTI, E. *Perspectives on anaerobic treatment in developing countries*. Water Sci. Tech., 2001, v. 44, n.8, p. 141–148.
- FORTERRE, P.; BROCHIER, C.; PHILIPPE, H. *Evolution of the Archaea*. Theoretical Population Biology. 2002, 61, 409–422.
- GLEICK, P. H. *Water resources*. In Encyclopedia of Climate and Weather, ed. by S. H. Schneider, Oxford University Press, New York, 1996, vol. 2, p.817-823.
- GONZÁLEZ, J. M. *Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks*. International Microbiology, 2005, 8:189-194.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; ALCÂNTARA, S.; RAZO-FLORES, E.; REVAH, S. *Oxygen transfer and consumption in a thiosulfate oxidizing bioreactor with sulfur production*. Lett Appl Microbiol. 2005;41(2):141-6.
- GUMAELIUS, L.; MAGNUSSON, G.; PETTERSSON, B.; DALHAMMAR, G. *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2001), 51, 999–1006
- GUPTA, R. S. *Life's Third Domain (Archaea): An Established Fact or an Endangered Paradigm?* Theoretical Population Biology. 1998, 54, 91-104
- GUYOT, J.P. *Role of formate in methanogenesis from xylan by Cellulomonas sp. associated with methanogens and Desulfovibrio vulgaris: inhibition of the acetoclastic reaction*. FEMS Microbiology Letters 1986, 34 149-153
- GUPTA, R. S. *The natural evolutionary relationships among prokaryotes*. Crit Rev Microbiol. 2000, 26 (2): 111–31

- GUTELL, R.R.; LARSEN, N.; WOESE, C.R. *Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective*. Microbiol Rev. 1994, Mar; 58(1):10-26.
- HAHN, D.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; AKKERMANS, A.D.L. SCHLEIFER, K.H. *Detection of microorganisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides*. J. Gen. Microbiol. 1992,138, 879–887.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.1999, 41:95-98.
- HIRAISHI, A.; SHIN, Y. K.; SUGIYAMA, J. *Brachymonas denitrificans gen. nov., sp. nov., an aerobic chemoorganotrophic bacterium which contains rhodoquinones, and evolutionary relationships of rhodoquinone producers to bacterial species with various quinone classes*. J Gen Appl Microbiol. 1995, 41, 99–117.
- HUANG, Y.; WANG, L.; LU, Z.; HONG, L.; LIU, Z.; TAN, G. Y.; GOODFELLOW, M. *Proposal to combine the genera Actinobispora and Pseudonocardia in an emended genus Pseudonocardia, and description of Pseudonocardia zijingensis sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol. 2002 May;52(Pt 3):977-82.
- HUGENHOLTZ, P. *Exploring prokaryotic diversity in the genomic era*. Genome Biology. 2002, 3 (2).
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa saneamento no Brasil*. em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/27032002pnsb.shtm>> Acesso em: 22 jan. 2008.
- ILHENFELD, R. G. K.; PEGONINI, E. S. e ANDREOLI, C. V. *Fatores Limitantes: Uso e Manejo do Lodo de Esgoto na Agricultura*. Rio de Janeiro. Programa de Pesquisa em Saneamento Básico – PROSAB, 1999, cap. 5, p. 46-63.
- IMACHI, H.; SAKAI, S.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. *Methanolinea tarda gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge*. Int J Syst Evol Microbiol. 2008 Jan;58(Pt 1):294-301.
- ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU S. *Whole organism biocatalysis*. Curr Opin Chem Biol 2005, 9 (2): 174–80.
- IWMI <http://www.iwmi.cgiar.org/About_IWMI/Strategic_Documents/Annual_Reports/2006_2007/index.html> Acesso em: 22 jan. 2008.
- JANSSEN, A. J.; SLEYSER, R.; VAN DER KAA, C.; JOCHEMSEN, A.; BONTSEMA, J.; LETTINGA, G. *Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor*. Biotechnol Bioeng. 1995 Aug 5;47(3):327-33.

- JENTTEN, M. S. M.; STAMS, A. J. M.; ZENDER, A. J. B. *Methanogenesis from acetate: a comparison of acetate metabolism in Methanotrix soehngenili and Methanosarcina spp.* FEMS Microbiological Review, 1992, 81, 181-198.
- KALOGO, Y.; ROSILLON, F.; HAMMES, F.; VERSTRAETE W. *Effect of a water extract of Moringa oleifera seeds on the hydrolytic microbial species diversity of a UASB reactor treating domestic wastewater.* Letters in Applied Microbiology 2000, 31, p. 259-264
- KALYUZHNYI, S., VEEKEN, A. AND HAMELERS, B. *Two-particle model of anaerobic solid-state fermentation.* Water Science Technology, 2000, p. 41, 43 - 50.
- KANDLER, O.; KONIG, H.. *Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria).* Cell Mol. Life Sci. 1998, 54, 305–308.
- KANTACHOTE, D.; INNUWAT, W. *Isolation of Thiobacillus sp. for use in treatment of rubber sheet wastewater.* DOAJ - Directory of Open Access Journals Year: 2004 Volume: 26 - Issue: 5
- KARNHOLZ, A.; KUSEL, K.; GOSSNER, A.; SCRAMM, A.; DRAKE, H. L. *Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen.* Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68, 1005-1009.
- KATES, M. *Membrane lipids of Archaea*, in “*The Biochemistry in of Archaea (Archaeobacteria)*” Elsevier, Amsterdam. 1993, p. 261–295.
- KEYSER, M. *PCR detection, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) Fingerprinting and identification of the microbial consortium in different types of UASB granules.* Doctor of Philosophy in Food Science. Department of Food Science. Faculty of AgriScience. University of Stellenbosch, 2006.
- KOUSSEMON, M.; COMBET-BLANC, Y.; PATEL, B. K. C.; CAYOL, JEAN-LUC; THOMAS, P.; GARCIA, JEAN-LOUIS; OLLIVIER, B. *Propionibacterium microaerophilum sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2001), 51, 1373–1382.
- KUANG, Y. *Enhancing Anaerobic Degradation of Lipids in Wastewater by Addition of Co-substrate.* Thesis of Doctor of Philo School of Environmental Science Murdoch University, 2002.
- KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. *Methanogen flora of paddy soils in Japan.* FEMS microbiology ecology. 1997, vol. 22, n^o1, pp. 39-48
- LAPARA, T. M.; NAKATSU, C. H.; LISA PANTEA,; ALLEMAN J. E. *Phylogenetic Analysis of Bacterial Communities in Mesophilic and Thermophilic Bioreactors Treating Pharmaceutical Wastewater.* Appl Environ Microbiol. 2000, 66(9), p. 3951–3959.

- 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. *Environ Microbiol.* 2004 Aug;6(8):809-19.
- LEY, R. E.; BÄCKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. *Obesity alters gut microbial ecology.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2;102(31):11070-5. Epub 2005 Jul 20.
- LYBERATOS G. *Modelling of anaerobic digestion - a review.* Department of Chemical Engineering, University of Patras, Greece, 1999, v. 1, n. 2, p. 63-76,.
- MA, K.; LIU, X.; DONG, X. *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005 Jan;55(Pt 1):325-9.
- MORAIS, J. C. ; GAVAZZA,; FLORENCIO, L. ; KATO, M T. *Six-year monitoring period of a full-scale UASB reactor treating domestic sewage under tropical conditions.* In: 10th World Congress on Anaerobic Digestion, 2004, Montreal. *Proceedings 10th World Congress on Anaerobic Digestion, 2004.* v. 1. p. 1-4.
- MAROUNEK, M.; FLIEGROVA, K.; BARTOS, S. *Metabolism and some characteristics of ruminal strains of Megasphaera elsdenii.* *Appl Environ Microbiol.* 1989 Jun;55(6):1570-3.
- MASZENAN, A. M.; SEVIOUR, R. J.; PATEL, B. K.; SCHUMANN, P.; REES, G. N. *Tessaracoccus bendigoensis* gen. nov., sp. nov., a gram-positive coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Apr;49 Pt 2:459-68.
- MATSUNAGA, F.; FORTERRE, P.; ISHINO, Y.; MYLLYKALLIO, H. *In vivo interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, Sep 25;98(20):11152-7. Epub 2001 Sep 18.
- MOSEY, F. E. *Mathematical modelling of the anaerobic digestion: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose.* *Water Science and Technology*, 1983, vol. 15, p. 209-232,.
- MUYZER, G.; DE-WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G.; *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA.* *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59, 695–700.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome>> Acesso em: 10/07/2008.
- NICOLL, E. H. *Small water pollution control works – design and practice.* Ellis Horwood Limited, England, 1989, p. 502.

- NIELSEN, A. T.; LIU, W. T.; FILIPE, C.; GRADY, L. JR.; MOLIN, S.; STAHL, D. A. *Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor*. Appl Environ Microbiol. 1999 Mar; 65(3):1251-8.
- OREN, A. *Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 2004 359, 623–638
- OUDE ELFERINK, S. J.; MAAS, R. N.; HARMSSEN, H. J.; STAMS, A. J. *Desulforhabdus amnigenus gen. nov. sp. nov., a sulfate reducer isolated from anaerobic granular sludge*. Arch Microbiol. 1995 Aug;164(2):119-24.
- ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.D.; TORSVIK, V.; *Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælen vannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA*. Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63, 3367–3373.
- OXLEY, A. P. A.; POWELL, M.; MCKAY, D. B. *Species of the Family Helicobacteraceae Detected in an Australian Sea Lion (Neophoca cinerea) with Chronic Gastritis*. Journal of Clinical Microbiology, Aug. 2004, p. 3505–3512
- PARAWIRA W. *Anaerobic Treatment of Agricultural Residues and Wastewater*. Doctoral Dissertation. Department of Biotechnology. Lund University. Swede., 2004.
- RUETER, P.; RABUS, R.; WILKEST, H.; AECKERSBERG, F.; . RAINEY, F. A.; JANNASCH, H. W.; WIDDEL, F. *Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria*. Nature 372, 455 – 458, 2002.
- RAGAN, M. A.; LOGSDON, J. M. JR.; SENSEN, C. W.; CHARLEBOIS, R. L.; DOOLITTLE, W. F.. *An archaeobacterial homolog of pelota, a meiotic cell division protein in eukaryotes*. FEMS Microbiol Lett. 1996, Nov 1;144(2-3):151-5.
- RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI S. J. *The Uncultured Microbial Majority*. Annual Review of Microbiology. Department of Microbiology, Oregon State University, Corvallis, 2003, 57: 369–94.
- RAVICHANDRA, P.; MUGERAYA, G.; RAO, A. G; RAMAKRISHNA, M.; JETTY, A. *Isolation of Thiobacillus sp from aerobic sludge of distillery and dairy effluent treatment plants and its sulfide oxidation activity at different concentrations*. Environ Biol. 2007 Oct;28(4):819-23.
- REBOUÇAS, A.; GALÍZIA TUNDISI J.; BRAGA, B. *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. Instituto de Estudos Avançados, USP, São Paulo 1999.

- SAIKI, Y.; IWABUCHI, C.; KATAMI, A.; KITAGAWA, Y. *Microbial analyses by fluorescence in situ hybridization of well-settled granular sludge in brewery wastewater treatment plants*. J Biosci Bioeng. 2002, 93(6):601-6.
- SAMBROOK J. , DAVID W. RUSSELL AND JOE SAMBROOK. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- SCHAUER, N. L.; BROWN, D. P.; FERRY, J. G. Kinetics of Formate Metabolism in *Methanobacterium formicicum* and *Methanospirillum hungatei*. Appl Environ Microbiol. 1982 Sep;44(3):549-554.
- SCHINK, B. *Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, cap. 61, p. 262-280.
- SCHIPPERS, A.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C. *Nocardioides oleivorans* sp. nov., a novel crude-oil-degrading bacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 2005 Jul;55(Pt 4):1501-4.
- SEARS CL. *A dynamic partnership: celebrating our gut flora*. Anaerobe, 2005, **11** (5): 247–51.
- SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; SYUTSUBO, K.; OHASHI, A.; HARADA, H.; NAKAMURA, K. *Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis*. Microbiology 1998, 144, 2655–2665
- SHI, H. P.; LEE, C. M. Phosphate removal under denitrifying conditions by *Brachmonas* sp. strain P12 and *Paracoccus denitrificans* PP15. Can J Microbiol. 2007 Jun;53(6):727-37.
- SNAIDR, J.; AMANN, R.; HUBER, I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; *Phylogenetic Analysis and In Situ Identification of Bacteria in Activated Sludge*. Applied And Environmental Microbiology, 1997, p. 2884–2896
- SPEECE, R.E. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Vanderbilt University. Published by Archae Press. United States of America, 1996, p. 13; 26,.
- SPERLING, M. *Princípio do tratamento biológico de águas residuárias. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. Belo Horizonte: DESA - UFMG, 1996, v. 1, p. 12-13, 18 e 59.
- STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W.; GOEBEL, B.M.; *Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis*. FASEBJ. 1993. 7, 232–236.
- STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. *Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rDNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. 44, 846–849.

- STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD N. L. *Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov.* International Journal Of Systematic Bacteriology, Apr. 1997, p. 479-491
- STRONACH, S. M.; RUDD, T.; LESTER, J. N. *Anaerobic Digestion Processes in Industrial Wastewater Treatment.* Springer-Verlag, Berlin, 1986.
- SYED, M.; SOREANU, G.; FALLETTA, P.; BÉLAND, M. Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review. Canadian Biosystems Engineering. 2006, Vol. 48.
- TAMURA, K.; NEI, M. *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.* Mol Biol Evol. 1993, May;10(3):512-26.
- THAR, R.; FENCHEL, T. *Survey of motile microaerophilic bacterial morphotypes in the oxygen gradient above a marine sulfidic sediment.* Appl Environ Microbiol. 2005 Jul;71(7):3682-91.
- THAUER, R. K. *Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson* Microbiology, 1998, 144, 2377–2406.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. J. *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.* Nucleic Acids Research, submitted, June 1994.
- TORSVIK, V.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J. *Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review.* J. Indust. Microbiol. 1996, 17, 170–178.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. *Prokaryotic Diversity—Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors.* 2002, VOL. 296 SCIENCE.
- UIA (Union of International Association) <<http://www.diversitas.org/db/x.php?dbcode=pr&go=e&id=11300620>> Acesso em: 22 jan. 2008.
- UN/WWAP (United Nations/World Water Assessment Programme). *UN World Water Development Report: Water for People, Water for Life.* Paris, New York and Oxford: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization and Berghahn Books, 2003.
- YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y.; IMACHI, H.; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. *Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules.* Appl Environ Microbiol. 2005 Nov;71(11):7493-503.
- VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; DE WACHTER, R. *A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA.* Nucleic Acids Res. 1996, Sep 1;24(17):3381-91.

- VAN GYLSWYK, N. O. *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a Ruminant Bacterium Converting Succinate to Propionate as the Sole Energy-Yielding Mechanism. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Apr. 1995, P. 297-300.
- VAN HAANDEL, A. C. e LETTINGA, G. *Tratamento Anaeróbio de Esgotos. Um Manual para Regiões de Clima Quente*. Universidade Federal da Paraíba, cap. 2., 1994.
- VISSER, J. M.; ROBERTSON, L. A.; VAN VERSEVELD, H. W.; KUENEN, J. G. *Sulfur Production by Obligately Chemolithoautotrophic Thiobacillus Species*. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Jun;63(6):2300-2305.
- WAWER, C.; MUYZER, G. *Genetic diversity of Desulfovibrio spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments*. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Jun;61(6):2203-10.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBES, W. J. *Prokaryotes: the unseen majority*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1998, v. 95, p. 6578-6583.
- WHO (World Health Organization) <http://www.who.int/water_sanitation_health/hygiene/en/index.html> Acesso em: 22 jan. 2008.
- WOESE, C.R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74:5088-5090
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 1987, v. 51, n. 2, p. 221-271.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria e Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1990, v. 87, p. 4576-4579.
- WOESE, C.R. *The universal ancestor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, Jun 9;95(12):6854-9.
- WORLD WATER DAY <<http://www.worldwaterday07.org/>> Acesso em: 22 jan. 2007.
- XU J. *Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances*. *Molecular Ecology*. 2006, 15, 1713–1731.
- ZHANG, Y.; AIYUK, S.; XU, H.; CHEN, G.; VERSTRAETE, W. *Study of microbial community structures in UASB sludge treating municipal wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA*. *Sci China C Life Sci*. 2005, May, 48 Suppl 1:128-35.