

Atividade Metanogênica e Comunidade Microbiana envolvidas na Degradação de Metilamina

Daniele Vital Vich¹, Bruna Soares Fernandes¹, Marcelo Zaiat¹ e Maria Bernadete A. Varesche¹

¹Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de São Carlos – Depto. de Hidráulica e Saneamento; Caixa Postal 359 - 13566-590 São Carlos – SP - E-mail: dani_vich@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Fração significativa da biosfera terrestre contém ambientes anaeróbios nos quais microrganismos convertem matéria orgânica complexa em metano e dióxido de carbono. Esses microrganismos são encontrados em diversos habitats, tais como rúmen, trato intestinal, digestores de águas residuárias, raízes, sedimentos de rios, lagos e mares. O processo de conversão da matéria orgânica complexa a compostos simples, representados pelas formas oxidada (CO₂) e reduzida (CH₄) do carbono, requer interação de grupos específicos de organismos anaeróbios (Ferry, 1999).

Segundo Ferry (1999), organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria*, sob condições anaeróbias, convertem a matéria orgânica em hidrogênio, gás carbônico, formiato e acetato, enquanto alguns organismos do Domínio *Archaea* convertem todos esses produtos em metano. Ampla variedade de arqueias metanogênicas possui metabolismo anaeróbio obrigatório e podem ser encontradas em ambientes extremos.

O Domínio *Archaea* possui três filos: Crenarchaeota, que contém as arqueias redutoras de enxofre hipertermófilas, Euryarchaeota, que compreende ampla diversidade de organismos, incluindo as espécies metanogênicas, halófilas extremas e uma espécie hipertermófila, e Korarchaeota, divisão descrita mais recentemente, que engloba organismos hipertermófilos.

Há cinco ordens que divergem filogeneticamente no filo Euryarchaeota e são denominadas metanogênicas (Garrity, 2001): Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanobacteriales, Methanococcales e Methanopyrales. Organismos das ordens Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales e Methanopyrales usam apenas hidrogênio e gás carbônico ou formiato como fonte de energia ou substrato. Em contraste, membros da ordem Methanosarcinales são mais versáteis e usam metanol, metilaminas ou acetato como substrato; muitos deles, também, usam hidrogênio e gás carbônico (Deppenmeier *et al.*, 1999). No filo Euryarchaeota, pode-se considerar os gêneros da ordem Methanosarcinales como principais utilizadores de metilaminas como substrato para a metanogênese.

A metilamina é um gás à temperatura ambiente, com peso molecular de 31,1, ponto de ebulição de -6,32°C a 760mm Hg e odor semelhante a amônia. Dentre seus usos, pode-se destacar: produção de inseticidas, herbicidas, fungicidas, surfactantes, combustíveis fósseis, explosivos, produtos farmacêuticos, químicos fotográficos, tintas, tecidos, solventes, borrachas e anti-corrosivos; inibição da polimerização de hidrocarbonetos durante a destilação; prevenção do enovelamento e coagulação em látex naturais e sintéticos e prevenção da polimerização em removedores de tintas.

A metilamina é estudada em sistemas de biofiltros, para neutralização de seu odor e sua retirada do ar; em ambientes estuarinos, para controle do fluxo de nitrogênio que ocorre no sedimento e no material particulado suspenso, contribuindo para os florescimentos algais e na área médica, por desempenhar papel importante em distúrbios do sistema nervoso observados em doenças renais e hepáticas. Nesses distúrbios, a via metabólica da metilamina tende à formação de formaldeído em níveis tóxicos capazes de provocar arteriosclerose.

Estudos sobre tratamento de águas residuárias contendo metilamina são escassos e se restringem aos trabalhos que envolvem pesticidas carbamatados, que têm a metilamina como um de seus

metabólitos. Mesmo sendo tóxica, ainda não foram desenvolvidas tecnologias de tratamento e remoção da metilamina no ambiente.

Sendo assim, o objetivo principal desta pesquisa foi avaliar a atividade metanogênica específica e a comunidade microbiana envolvidas na degradação de metilamina em reatores anaeróbios em batelada com diferentes concentrações desse composto. Todas essas informações são úteis para o desenvolvimento de tecnologias que visem à recuperação de eventuais áreas contaminadas com metilamina.

Palavras-chave

Degradação anaeróbia, metilamina, atividade metanogênica específica, PCR/DGGE.

MATERIAL E MÉTODOS

Lodo granular oriundo de reator UASB usado no tratamento de água residuária de avicultura (Avícola Dakar, Tietê-SP) foi inoculado em reatores em batelada contendo meio Zinder (Zinder *et al.*, 1984), solução de bicarbonato de sódio 10%, vitaminas (Touzel e Albagnac, 1983; Dubourguier, 1987), solução redutora de sulfeto 5% e solução de metilamina em diferentes concentrações.

O experimento foi realizado em duplicata - reatores (1) e (2), nas seguintes condições: controle (sem metilamina), 5mM (155 mg/L), 10mM (311 mg/L), 20mM (622 mg/L), 30mM (933 mg/L), 50mM (1550 mg/L), 75mM (2330 mg/L) e 90mM (2790 mg/L) de metilamina. Os frascos reatores usados foram de 2000mL (Duran), com volume útil de 1000 mL e *headspace* de 1000 mL.

Para inoculação, o lodo foi previamente lavado, desfragmentado e mantido sob atmosfera de N₂ (100%) à temperatura ambiente. A inoculação foi feita em meio Zinder, previamente tamponado e reduzido, sob atmosfera de N₂/CO₂ (70:30% v/v). Durante todo o experimento, não houve despressurização dos frascos. A incubação foi feita em estufa, sob agitação de 150 rpm (Domingues, 2002) e temperatura de 30°C ± 1°C. A fonte de carbono (metilamina) foi adicionada após prévio consumo da matéria orgânica proveniente do inóculo.

Determinação de metano

A concentração de metano no biogás foi monitorada através de cromatografia gasosa. Alíquotas de 1ml do *headspace* dos reatores foram retiradas com auxílio de seringa com válvula de trava (1,0 mL da VICI precision sampling, Inc.) e analisadas no cromatógrafo a gás Gow-Mac Instrument Co - TCD, modelo 69 (coluna porapak-Q, gás de arraste H₂, temperatura do detector, injetor e coluna 55°C). Para o cálculo da concentração do gás metano (mmol de CH₄/L) foi preparada curva analítica (calibração) do metano.

Avaliação da atividade metanogênica

O ensaio constituiu na determinação, por cromatografia gasosa, da concentração de metano, presente no biogás produzido no volume livre (*headspace*) dos reatores de 2000 mL. Sua finalidade foi avaliar o potencial da biomassa na conversão de substrato (fonte de carbono na forma de metilamina) em metano.

Essa análise foi realizada durante todo o experimento, em frequência aproximada de quatro vezes ao dia. A metodologia usada para o cálculo da atividade metanogênica foi adaptada do trabalho de Steil (2001).

Os valores das áreas de metano obtidas foram convertidos, por meio da equação da reta padrão, a mmols de CH₄ nas CNTP. Os valores de metano obtidos para 1 mL (volume retirado para a amostragem) foram convertidos para o *headspace* de cada frasco, a partir da seguinte equação:

$$\text{n}^{\circ} \text{ de mols de CH}_4 \text{ no headspace (mmol)} = [\text{CH}_4] \text{ na amostra (mmol)} \times \text{volume do headspace (mL)} / \text{volume injetado da amostra (mL)}$$

Durante todo o experimento, os frascos não foram despressurizados, a fim de se manter concentrações acumuladas do biogás.

Usando o *software* ORIGIN® 7.5, traçou-se uma curva com os valores do metano em função do tempo. Estes valores foram ajustados pela equação diferencial de Boltzmann obtendo-se o ponto de maior velocidade de produção de metano. Dividindo-se este valor pela concentração de biomassa de cada reator (g SVT), obteve-se a atividade metanogênica aparente (AMA).

A atividade metanogênica específica (AME) foi obtida subtraindo-se a atividade metanogênica do controle dos valores das atividades obtidas com a adição de metilamina.

A concentração da biomassa em cada frasco reator foi determinada pela média entre os valores de sólidos suspensos voláteis (APHA, 2005) iniciais e finais.

Determinação de nitrogênio amoniacal

As concentrações de nitrogênio amoniacal foram realizadas no início e final do experimento, para todos os reatores anaeróbios, por meio de análise de injeção de Fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analyses*), de acordo com metodologia descrita em APHA (2005).

Avaliação quantitativa dos grupos microbianos anaeróbios

A técnica do Número Mais Provável (NMP) foi realizada ao final do experimento para quantificação dos grupos microbianos anaeróbios (bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas), para as concentrações de metilamina entre 155 e 2790 mg/L. Foram usados frascos de 30mL, contendo 9mL de água de diluição (meio basal Zinder acrescido de metilamina nas concentrações estudadas) e 1mL de inóculo. Os frascos foram incubados a 30°C ± 1°C durante 15 dias.

O crescimento dos microrganismos foi avaliado pela turvação do meio, formação de biogás e microscopia óptica de contraste de fases e de fluorescência. Combinações de respostas positivas foram a base do cálculo para estimar o NMP, usando a tabela padrão de probabilidade (APHA, 2005), que confere o limite de confiança de 95% para cada valor determinado.

Análise de Biologia Molecular

A avaliação da diversidade da comunidade microbiana foi realizada através da técnica do PCR/DGGE. O DNA foi extraído segundo o protocolo de Griffiths *et al.* (2000). Na amplificação dos fragmentos do DNA foram usados *primers* específicos do Domínio *Bacteria* – 968FGC e 1392R (Nielsen *et al.*, 1999) e do Domínio *Archaea* – 1100FGC e 1400R (Kudo *et al.*, 1997). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE. A intensidade das bandas de DGGE não foi considerada fator variável.

Na comparação dos padrões de bandas de DGGE, utilizou-se a equação de GILLIAN *et al.* (1998), que calcula o coeficiente de similaridade entre duas amostras através da equação (1):

$$Cs=2j/(a+b) \times 100$$

Equação (1)

Sendo

a = número de bandas da amostra 1;

b = número de bandas da amostra 2;

j = número de bandas comuns.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de atividade metanogênica tiveram duração aproximada de 250 horas, indicando a degradação da metilamina em diferentes concentrações.

Os reatores controle, que não receberam adição de metilamina, tendo como substrato apenas o meio basal Zinder e vitaminas, apresentaram produção de metano inferior aos que receberam adição de metilamina em diferentes concentrações. A concentração de metano acumulado ficou em torno de 2,57 mmol/L em 160 horas de experimento para o reator Controle (1). O reator Controle (2), no mesmo tempo de experimento, teve valor de metano acumulado igual a 3,25 mmol/L. Nesses reatores, não existiu fase *lag*, uma vez que a produção de CH_4 apresentou comportamento linear, diferente dos reatores alimentados com metilamina, que apresentaram padrão de crescimento sigmoidal. Os resultados dos reatores controle estão expressos graficamente na Figura 1a.

Os reatores alimentados com 155 mg/L de metilamina apresentaram fase *lag* com duração de 20 horas. Após aproximadamente 116 horas de experimento, a concentração de metano acumulado atingiu valor máximo de 6,91 mmol/L no reator 1 e 6,58 mmol/L no reator 2. A Figura 1b mostra graficamente a produção de metano nesses reatores.

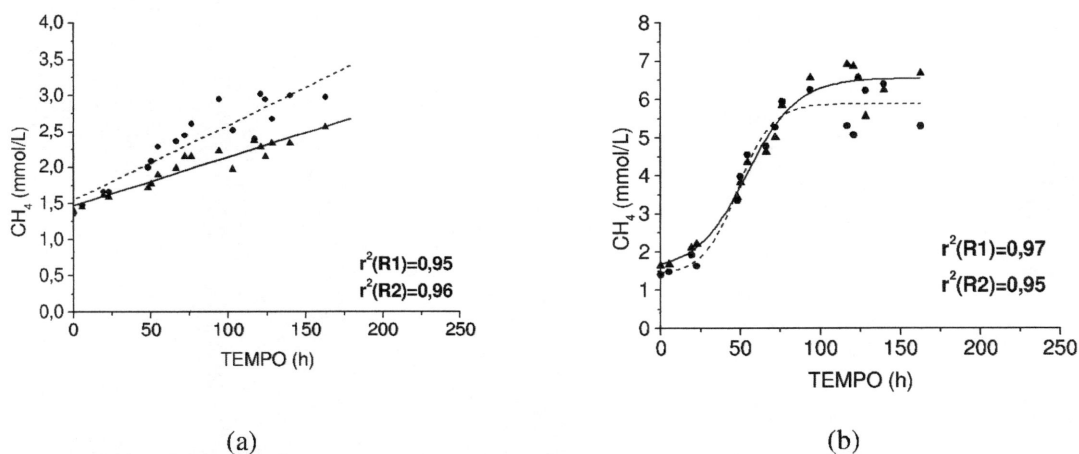
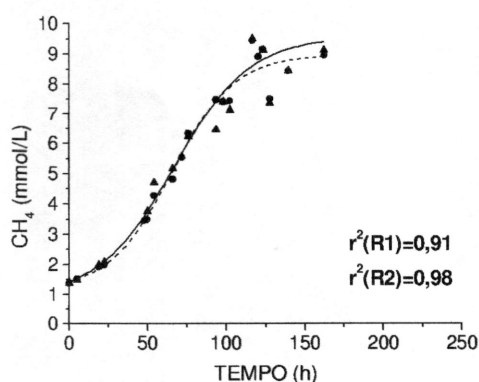


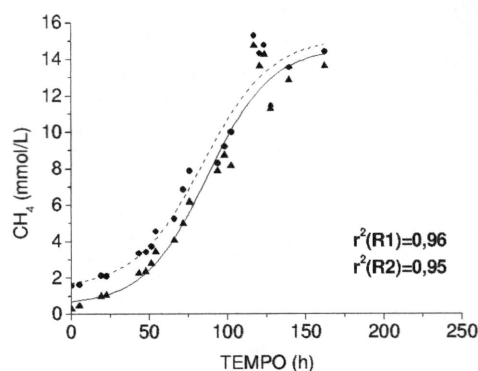
Figura 1: Variação temporal da produção de metano no reator 1 ($\blacktriangle$ - valores experimentais; — modelo) e no reator 2 ($\bullet$ - valores experimentais; ---- modelo) controles (a) e alimentados com metilamina (155 mg/L) (b).

Nos reatores alimentados com 311 mg/L de metilamina, a fase *lag* teve duração de 20 horas. A produção máxima de metano nos reatores ocorreu após aproximadamente 120 horas e atingiram valores de 11,8 mmol/L no reator (1) e 9,44 mmol/L no reator (2). A Figura 2a mostra graficamente a produção de metano nesses reatores.

Nos reatores alimentados com 622 mg/L e 933 mg/L, a fase *lag* foi de 50 horas do início do experimento. Os valores máximos de metano acumulado, nos reatores com 622 mg/L de metilamina, foram obtidos após 116 horas do início do experimento e iguais a 14,7 mmol/L no reator (1) e 15,3 mmol/L no reator (2). Nos reatores alimentados com 933 mg/L de metilamina as concentrações máximas de metano acumulado, observadas após 122 horas do início do experimento, foram de 20 mmol/L no reator (1) e 20,4 mmol/L no reator (2). As Figuras 2b e 3a mostram graficamente a produção de metano nas duplicatas dos reatores (1) e (2) alimentados com 622 mg/L e 933 mg/L de metilamina.



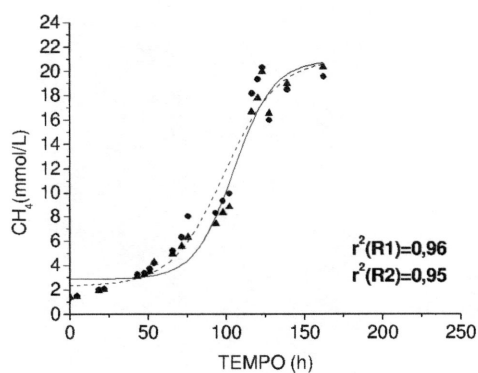
(a)



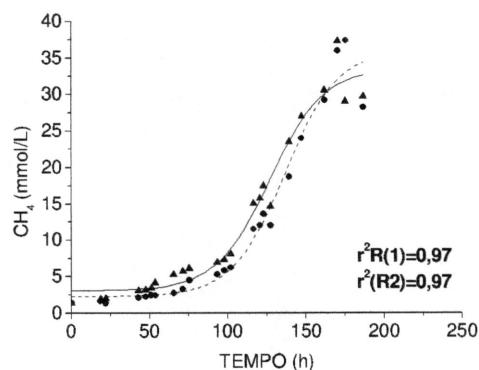
(b)

Figura 2: Variação temporal da produção de metano no reator 1 (▲ - valores experimentais; — modelo) e no reator 2 (● - valores experimentais; ---- modelo) alimentados com metilamina nas concentrações de 311 mg/L (a) e 622 mg/L (b).

Nos reatores alimentados com 1550 mg/L de metilamina, a fase *lag* teve duração de 100 horas. O reator (1) teve valor máximo de metano acumulado igual a 37,3 mmol/L, após 170 horas. O reator (2) apresentou o mesmo valor, após 175 horas. A Figura 3b mostra graficamente a produção de metano nesses reatores.



(a)



(b)

Figura 3: Variação temporal da produção de metano no reator 1 (▲ - valores experimentais; — modelo) e no reator 2 (● - valores experimentais; ---- modelo) alimentados com metilamina nas concentrações de 933 mg/L (a) e 1550 mg/L (b).

A fase *lag* dos reatores alimentados com 2330 mg/L de metilamina teve duração de 120 horas. Os valores máximos de metano acumulado, atingidos após aproximadamente 170 horas de experimento, foram de 46,5 mmol/L no reator (1) e 37,4 mmol/L no reator (2). A Figura 4a mostra graficamente a produção de metano nesses reatores.

Os reatores alimentados com 2790 mg/L de metilamina apresentaram fase *lag* com duração aproximada de 125 horas. Os valores máximos de metano acumulado foram obtidos após 170 horas, com valores de 38,6 mmol/L para o reator (1) e 39,6 mmol/L para o reator (2). A Figura 4b mostra graficamente a produção de metano nesses reatores.

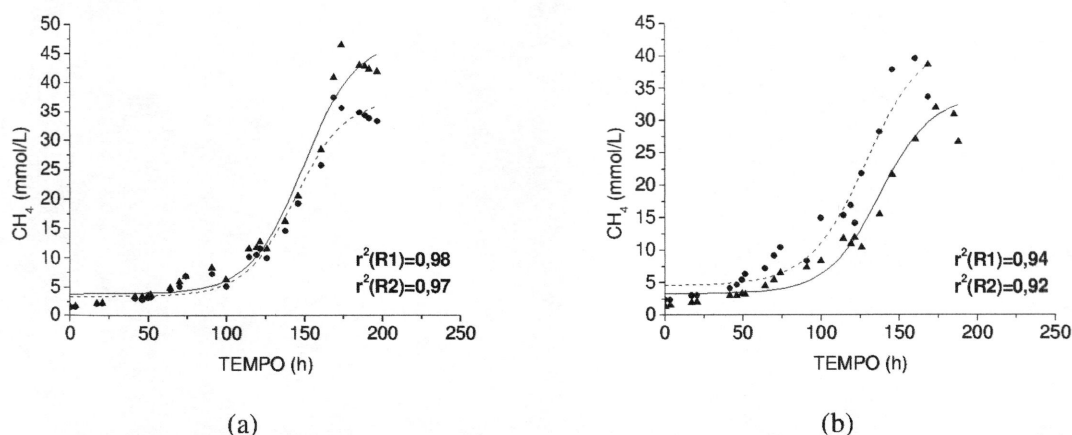


Figura 4: Variação temporal da produção de metano no reator 1 ($\blacktriangle$ - valores experimentais; — modelo) e no reator 2 ($\bullet$ - valores experimentais; ---- modelo) alimentados com metilamina nas concentrações de 2330 mg/L (a) e 2790 mg/L (b).

A concentração inicial de Sólidos Voláteis Totais (SVT) foi de 5 g/L. Os reatores controle, assim como aqueles alimentados com 155 mg/L, 311 mg/L e 622 mg/L de metilamina não tiveram aumento significativo no valor de SVT, variando entre 4,2 g/L no reator (2) – 311 mg/L e 5,6 g/L no reator (1) – 155 mg/L. Para os reatores alimentados com 933 mg/L de metilamina, os valores de SVT foram de 6,2 g/L para o reator (1) e 5,1 g/L para o reator (2), respectivamente. Os reatores alimentados com 1550 mg/L de metilamina tiveram valor médio de SVT próximo a 7,5 g/L. Os maiores valores de SVT foram obtidos para os reatores alimentados com 2330 mg/L e 2790 mg/L de metilamina, variando entre 8,3 g/L (2330 mg/L - reator 2) e 9,5 g/L (2790 mg/L - reator 1).

Até a concentração de 622 mg/L de metilamina, o crescimento não foi favorecido, levando à mortalidade celular e à seleção de microrganismos. Todavia, para os reatores alimentados com 933 mg/L, 1550 mg/L, 2330 mg/L e 2790 mg/L de metilamina, ocorreu aumento da biomassa com acréscimo de 13%, 49%, 73% e 81% respectivamente, para valor inicial de SSV adicionado igual a 5 g/L. Esses resultados indicam que a biomassa foi favorecida com o aumento nas concentrações de metilamina, principalmente em 1550 mg/L, 2330 mg/L e 2790 mg/L.

Para determinação da Atividade Metanogênica Aparente (AMA), adotou-se a média entre os Sólidos Voláteis Totais iniciais (inóculo) e os Sólidos Voláteis Totais finais de cada reator. Para cálculo da Atividade Metanogênica Específica (AME), adotou-se a média entre as atividades metanogênicas aparentes dos reatores controles A e B; esta média foi subtraída dos valores de AMA obtidos em todos os demais reatores. Os valores de AME estão expressos na Tabela 1.

No presente trabalho, os valores de AMA ficaram em $1,31 \cdot 10^{-3}$ mmol $\text{CH}_4/\text{g SVT} \cdot \text{h}$ e $2,45 \cdot 10^{-3}$ mmol $\text{CH}_4/\text{g SVT} \cdot \text{h}$ para os reatores Controle (1) e (2). Os valores de AME variaram entre $1,31 \cdot 10^{-3}$ e $88,7 \cdot 10^{-3}$ para os reatores acrescidos de fonte de carbono (metilamina). Como os frascos reatores foram inoculados com lodo de mesma origem, e foram submetidos às mesmas condições experimentais, observou-se que o aumento da AME foi devido à maior disponibilidade de fontes orgânicas. Isso justificou o crescente aumento da AME de acordo com o aumento das concentrações de metilamina.

O modelo cinético de Monod foi ajustado aos valores da AME compreendidos entre 0 mg/L (controle) e 2330 mg/L (Figura 5). A Atividade Metanogênica Específica Máxima foi determinada em 0,15 mmol $\text{CH}_4/(\text{g SVT} \cdot \text{h})$. Os reatores com 2790 mg/L de metilamina, que apresentaram valores de atividade metanogênica inferiores aos de concentrações 1550 mg/L e 2330 mg/L, não foram ajustados ao modelo cinético.

Tabela 1: Valores médios de sólidos voláteis totais, atividade metanogênica aparente (AMA), atividade metanogênica específica (AME)

Reator anaeróbio em batelada	Média entre SVT inicial e final (g/L)	AMA mmol CH ₄ .10 ⁻³ /(g SVT.h)	AME mmol CH ₄ .10 ⁻³ /(g SVT.h)
Controle R1	5,15	1,31	-
Controle R2	4,68	2,45	-
155 mg/L R1	5,31	15,0	13,1
155 mg/L R2	5,01	18,2	16,3
311 mg/L R1	5,17	17,3	15,3
311 mg/L R2	4,65	20,9	19,1
622 mg/L R1	4,65	37,4	35,5
622 mg/L R2	4,60	34,4	32,5
933 mg/L R1	5,61	61,6	59,7
933 mg/L R2	5,07	59,6	57,7
1550 mg/L R1	5,22	84,7	82,8
1550 mg/L R2	6,26	79,9	78,0
2330 mg/L R1	7,01	90,6	88,7
2330 mg/L R2	6,65	68,9	76,3
2790 mg/L R1	7,24	61,6	59,7
2790 mg/L R2	6,80	66,6	64,7

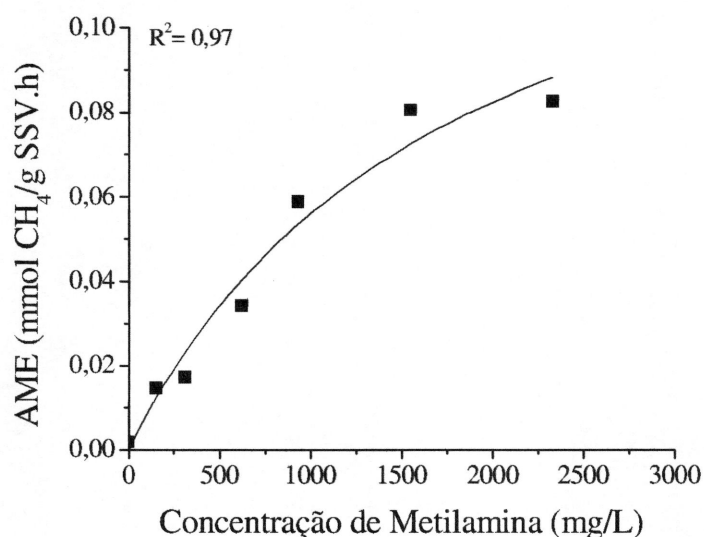
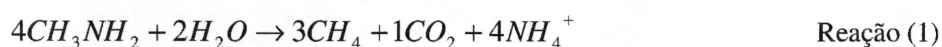


Figura 5: Ajuste do modelo cinético de Monod

A metilamina pode ser convertida a CH₄, CO₂ e NH₄⁺ por arqueias metanogênicas (Reação 1) (Garcia *et al.*, 2000). Sendo assim, determinou-se, também, a porcentagem de conversão do N presente na molécula de metilamina a N amoniacal. As concentrações de N amoniacal foram determinadas no início e final do experimento. A produção aumentou de acordo com as concentrações de metilamina adotadas, com exceção do reator 2790 mg/L que teve decréscimo de produção comparado ao reator de concentração 2330 mg/L. A comparação entre todas as concentrações está apresentada na Figura 6.



Para as menores concentrações de metilamina, provavelmente o nitrogênio amoniacal (N-NH_4) gerado foi usado no metabolismo celular dos microrganismos (assimilação) e não acumulou no meio. Reatores alimentados com metilamina em concentrações 622 mg/L, 933 mg/L e 1550 mg/L apresentaram quase 100% de formação de N-NH_4 a partir da amina presente na molécula de metilamina. Os reatores com metilamina em concentração 2330 mg/L e 2790 mg/L apresentaram certa inibição na formação de N-NH_4 (86,4% no reator 2330 mg/L e 66,9% no reator 2790 mg/L).

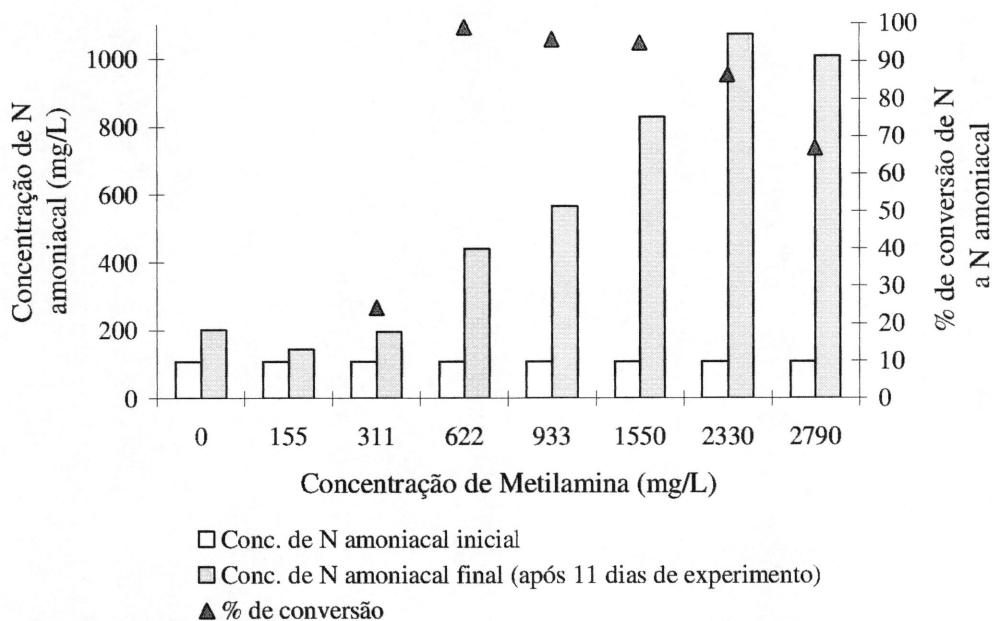


Figura 6: Concentrações de N amoniacal no início e final do experimento e porcentagem de conversão de nitrogênio a N amoniacal.

Os resultados da técnica de NMP mostraram aumento do NMP/mL de microrganismos anaeróbios de acordo com o aumento da concentração de metilamina. As bactérias anaeróbias totais e as arqueias metanogênicas foram encontradas na mesma ordem de grandeza. Isto indicou que quase a totalidade de microrganismos anaeróbios presentes era representada por microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea* (Figura 7).

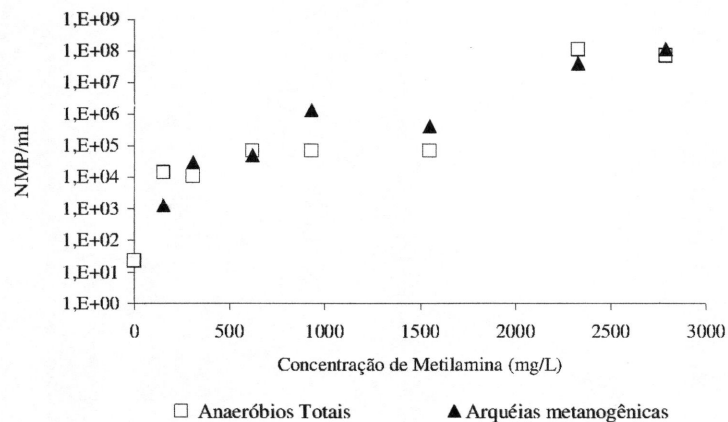


Figura 7: Número Mais Provável (NMP/mL) de bactérias anaeróbias totais e arqueias metanogênicas.

Os exames microscópicos mostraram semelhança de morfologias microbianas para os reatores anaeróbios alimentados com diferentes concentrações de metilamina. Em relação ao Domínio *Archaea*, foram encontrados organismos semelhantes a *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp e formas encistadas. O Domínio *Bacteria* foi representado por bacilos, cocos, coco-bacilos e filamentos. Aglomerados de bacilos estavam presentes em todos os reatores. Cocos foram observados com baixa frequência. Bacilos delgados, coco-bacilos e filamentos foram as morfologias predominantes em todas as concentrações de metilamina. Algumas das morfologias observadas estão representadas na Figura 8.

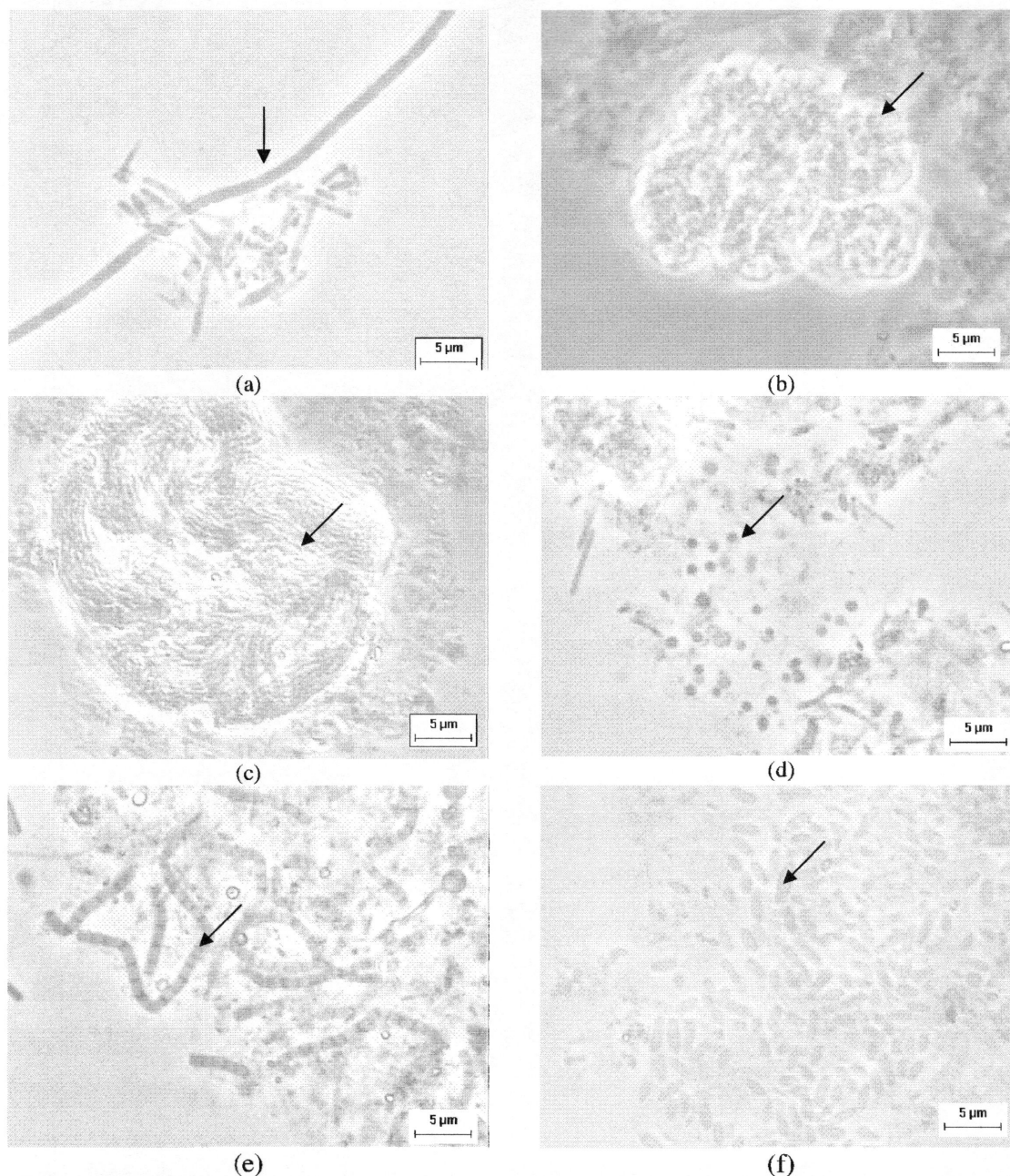


Figura 8: Microscopia de contraste de fase de amostras dos reatores anaeróbios em batelada: a - *Methanosaeta* sp. (1550 mg/L de metilamina), b - *Methanosarcina* sp. (1550 mg/L de metilamina); c - Aglomerado de bacilos (155 mg/L de metilamina), d - Cocos (2330 mg/L de metilamina); e - Filamentos (2790 mg/L de metilamina); f - Bacilos (622 mg/L de metilamina)

Na comparação dos padrões de bandas de DGGE, utilizou-se a equação de GILLIAN *et al.* (1998), que calcula o coeficiente de similaridade entre duas amostras. A intensidade das bandas de DGGE não foi considerada fator variável. O coeficiente de similaridade, para *Bacteria*, variou entre 92% (na comparação do inóculo com as diferentes concentrações de metilamina) e 100% (na comparação entre as diferentes concentrações de metilamina). Aparentemente a diversidade microbiana, com relação ao Domínio *Bacteria*, visualizada pelas bandas do DGGE manteve-se constante para todas as condições estudadas, inclusive para os controles.

As bandas de DGGE para o Domínio *Bacteria* estão representadas na Figura 9a. Praticamente não houve variação no padrão de bandas entre as amostras de diferentes concentrações de metilamina. A população indicada pelas bandas B, C e E foram favorecidas em todas as concentrações. As populações representadas pelas bandas A e D foram as mais sensíveis às alterações na composição do meio, pois foram encontradas somente no inóculo. As populações representadas pelas demais bandas parecem ter sido favorecidas pelas condições do sistema.

O coeficiente de similaridade, para o Domínio *Archaea*, também variou entre 92% (na comparação entre o inóculo e as diferentes concentrações de metilamina) e 100% (na comparação entre as diferentes concentrações de metilamina).

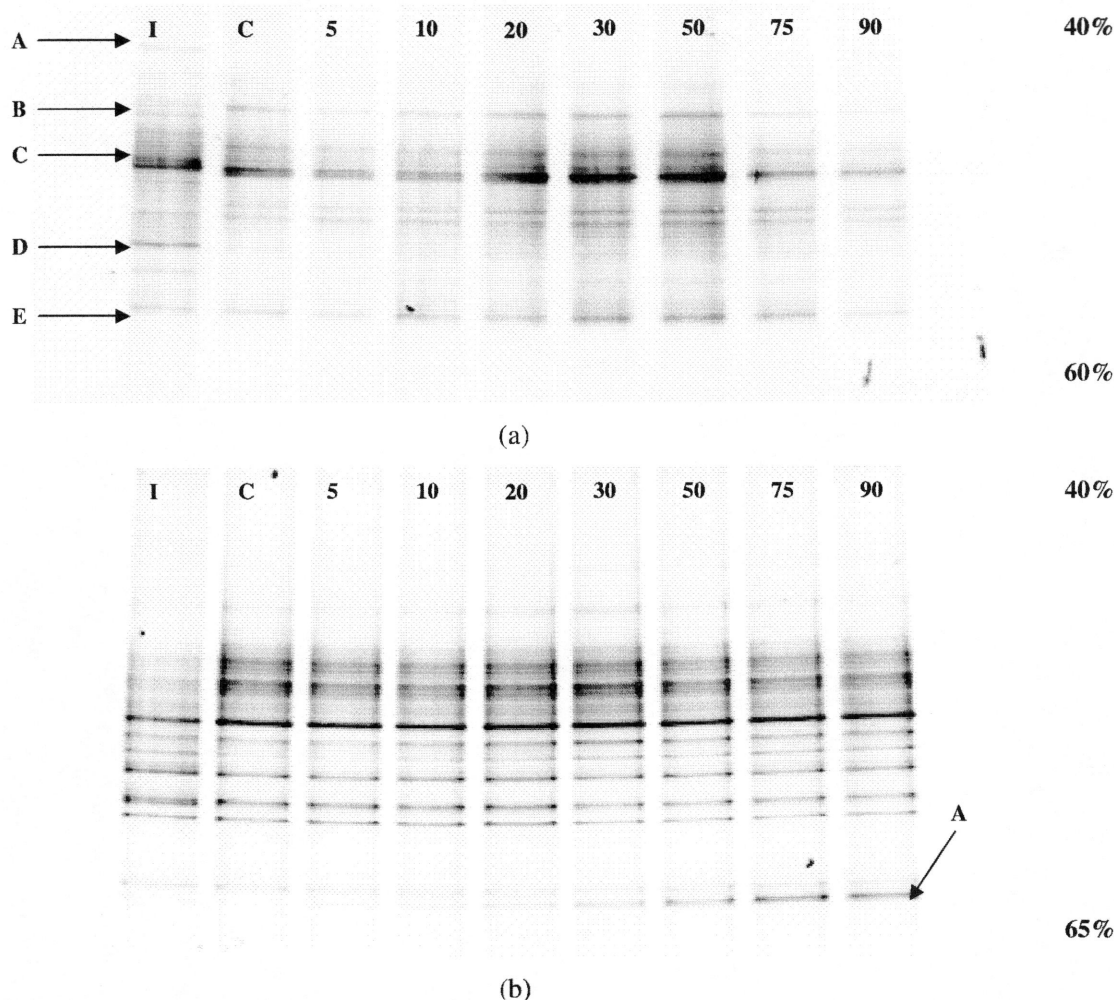


Figura 9: Análises de DGGE dos produtos de PCR amplificados com *primers* do Domínio *Bacteria* (a) e do Domínio *Archaea* (b) para as amostras: I-inóculo, C-contrôle (sem metilamina), 5 (155 mg/L de metilamina), 10 (311 mg/L de metilamina), 20 (622 mg/L de metilamina), 30 (933 mg/L de metilamina), 50 (1550 mg/L de metilamina), 75 (2330 mg/L de metilamina) e 90 (2790 mg/L de metilamina).

Aparentemente a diversidade microbiana com relação ao Domínio *Archaea* visualizada pelas bandas do DGGE manteve-se constante para todas as condições estudadas.

As populações do Domínio *Archaea*, representadas pelas bandas de DGGE, estão indicadas na Figura 9b. Não houve variação no padrão de bandas entre as amostras de diferentes concentrações de metilamina. A banda A parece representar a única população de arqueia metanogênica favorecida pelo aumento nas concentrações de metilamina.

CONCLUSÕES

Em relação à Atividade Metanogênica Específica (AME) dos reatores pôde-se perceber que o aumento das concentrações de metilamina promoveu aumento na AME. Os melhores resultados foram observados para os reatores com metilamina em concentrações de 1550 mg/L e 2330 mg/L, que apresentaram maior produção de metano e maiores velocidades de formação de metano. O modelo cinético de Monod ajustou-se aos dados experimentais. Os resultados indicaram inibição da AME para os reatores alimentados com 2790 mg/L de metilamina.

Os resultados da técnica de Número Mais Provável (NMP) mostraram que quase a totalidade de bactérias anaeróbias presentes nos reatores era composta por arqueias metanogênicas, pois os resultados foram obtidos na mesma ordem de grandeza. Os exames microscópicos mostraram a presença de ampla diversidade de microrganismos dos Domínios *Bacteria*, representados por bacilos, coco-bacilos, filamento e cocos, e do Domínio *Archaea*, representados por *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. Na análise de DGGE, tanto para o Domínio *Archaea* quanto para o Domínio *Bacteria*, não houve variação no padrão de bandas na comparação dos reatores alimentados com diferentes concentrações de metilamina.

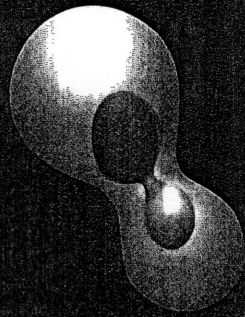
RESUMO

A metilamina é um composto orgânico usado principalmente na produção de pesticidas, surfactantes, combustíveis fósseis, tintas e borrachas. Estudos sobre tratamento de águas residuárias contendo metilamina se restringem aos trabalhos envolvendo pesticidas carbamatados, que têm a metilamina como um de seus metabólitos. Sendo assim, esta pesquisa estudou a comunidade microbiana e a atividade metanogênica em reatores anaeróbios em batelada, inoculados com lodo granular oriundo de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, sob diferentes condições nutricionais: controle – sem metilamina, 155 mg/L, 311 mg/L, 622 mg/L, 933 mg/L, 1550 mg/L, 2330 mg/L e 2790 mg/L de metilamina. Desses reatores foram obtidas amostras para a determinação da atividade metanogênica específica (AME), sólidos suspensos voláteis (SVT), nitrogênio amoniacal e exames microscópicos. Ao final do experimento, foram realizados exames da biomassa por meio da técnica do número mais provável (NMP) e análise da diversidade microbiana por PCR/DGGE. O aumento da AME foi proporcional ao aumento das concentrações de metilamina, com inibição de produção de metano apenas nos reatores alimentados com 2790 mg/L de metilamina. Os reatores alimentados com 1550 mg/L e 2330 mg/L de metilamina apresentaram os melhores resultados, com valores médios de AME de $80,4 \cdot 10^{-3}$ e $82,5 \cdot 10^{-3}$ mmol CH₄/g SVT.h, respectivamente. Foi verificado semelhança de morfologias microbianas em todas as concentrações estudadas, com presença de *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp., bacilos, coco-bacilos, filamentos e cocos. A análise de DGGE não mostrou variação significativa nos padrões de bandas, tanto para o Domínio *Archaea* quanto para o Domínio *Bacteria*. Os resultados da técnica de NMP mostraram predominância de microrganismos produtores de metano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apha, Awwa, Wpcf (2005), Standard methods for the examination of water and wastewater, Washington, Estados Unidos.
- Deppenmeyer, U.; Lienard, T.; Gottschalk, G. (1999), Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic *Archaea*, *FEBS Letters*, 457, 291-297.

- Domingues, M. R. (2002), Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e de leito fixo sob condições termofílicas. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Brasil.
- Ferry, J. G. (1999), Enzymology of one-carbon reactions in methanogenic pathways, *FEMS Microbiological Reviews*, 23, 13-38.
- Garcia, J.L., Patel, B.K.C., Ollivier B. (2000), Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe.*, 6, 205- 226.
- Garrity, G. (2001), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Editora Springer-Verlag, New York, 721p.
- Gillan, D.; Speksnijder, A.; Zwart, G.; Ridder, C. (1998), Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9), 3464-3472.
- Kudo, Y.; Nakajima, T.; Miyaki, T.; Oyazu, H. (1997), Methanogen flora of paddy soils in Japan, *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 39-48.
- Nielsen, A. T.; Liu, W. T.; Filipe, C.; Grady, L.; Molin, S.; Stahl, D. A. (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3), 1251-1258.
- Steil, L. (2001), Avaliação do uso de inóculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brasil.
- Touzel, J. P.; Albagnac, G. (1983), Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3, *FEMS Microbiology Letters*, 16, 241-245.
- Zinder, S. H.; Cardwell, S. C.; Anguish, T.; Lee, M.; Koch, M. (1984), Methanogenesis in a thermophilic (58° C) anaerobic digester. *Methanothrix* sp. as an important acetoclastic methanogen, *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 796-807.



Sinaferm 2007

XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

Certificado

Participou do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM 2007
realizado em Curitiba nos dias 29 de julho a 01 de agosto de 2007.

Curitiba, 01 de agosto de 2007.

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Presidente da Comissão
Organizadora do SINAFERM 2007