



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
DOUTORADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

KELLIANNY OLIVEIRA AIRES

**COMUNIDADES DE BACTÉRIAS E ÁRQUEAS E PRODUÇÃO DE BIOGÁS EM
CÉLULA EXPERIMENTAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS**

**Campina Grande - PB
2018**

KELLIANNY OLIVEIRA AIRES

**COMUNIDADES DE BACTÉRIAS E ÁRQUEAS E PRODUÇÃO DE BIOGÁS EM
CÉLULA EXPERIMENTAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias de Tratamento de Água e Resíduos.

Orientador: Prof. Dr. Rui de Oliveira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Veruschka Escarião Dessoles Monteiro.

**Campina Grande - PB
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A298c Aires, Kellianny Oliveira.
Comunidades de bactérias e arqueas e produção de biogás em célula experimental de resíduos sólidos urbanos [manuscrito] / Kellianny Oliveira Aires. - 2018.
134 p.
Digitado.
Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.
"Orientação : Prof. Dr. Rui de Oliveira, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - CCT."
"Coorientação: Profa. Dra. Veruschka Escarião Dessoles Monteiro, Coordenação do Curso de Engenharia Civil - CCTS."
1. Resíduos sólidos urbanos. 2. Biodegradação. 3. Bactérias. 4. Arqueas. 5. Biogás. I. Título

21. ed. CDD 628.7

KELLIANNY OLIVEIRA AIRES

COMUNIDADES DE BACTÉRIAS E ÁRQUEAS E PRODUÇÃO DE BIOGÁS EM
CÉLULA EXPERIMENTAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias de Tratamento de Água e Resíduos.

Aprovada em: 01/10/2018.

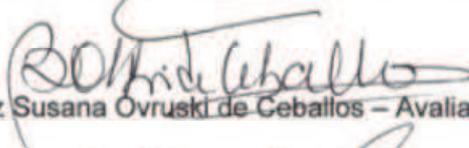
BANCA EXAMINADORA



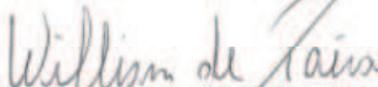
Prof. Dr. Rui de Oliveira – Orientador (UEPB)



Profa. Dra. Veruschka Escarvão Dessoles Monteiro – Co-orientadora (UFCG)



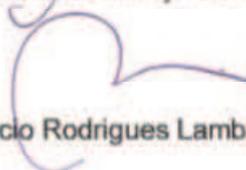
Profa. Dra. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos – Avaliadora Interna (UEPB)



Prof. Dr. William de Paiva – Avaliador Interno (UEPB)



Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos – Avaliadora Externa (UFCG-CES)



Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais – Avaliador Externo (UFPB-CCA)

Dedico esta tese aos meus pais, irmãs e sobrinhos pelo incentivo, amor e carinho.

Ao meu esposo, Marcos Aurélio, com amor, admiração, por sua compreensão, atenção e paciência ao longo do período deste trabalho.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me conceder o dom da vida e a oportunidade de poder estar desfrutando de todas as suas maravilhas, dando-me coragem para prosseguir nessa caminhada, sem desistir diante dos obstáculos da vida, sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais Maria do Socorro Oliveira e João Bosco Aires, pelo apoio nos momentos difíceis, pelos princípios passados, enfim, pelo que sou.

À minhas irmãs Katiana, Kessia e Karine pelo carinho, amor e compreensão.

Aos meus sobrinhos Ana Rita e Vinicius que sempre guardam os melhores sorrisos e me proporcionam momentos ímpares de alegria.

Ao meu esposo, Marcos Aurélio, pelo incentivo incondicional e diário, por acreditar todos os dias na minha capacidade, por ouvir minhas angústias, por enxugar minhas lágrimas, pelas palavras de apoio, por contribuir com as correções e, principalmente, por saber esperar com paciência e compreensão. Amo você!

Às minhas tias Helena, Socorro (*in memoriam*), Lourdes, Maria José e Vilani pelas orações e torcida para que eu chegasse ao fim de mais uma conquista.

Aos queridos professores, Rui de Oliveira, Veruschka Monteiro, Márcio Melo e Magnólia Campos, pela acolhida, partilha, correções e ensinamentos repassados.

Aos professores William de Paiva, Beatriz Ceballos e Marcio Lambais pela disponibilidade e contribuições valiosas. Aos servidores Nadilma, Maria José, Ladjane, Nildinho e Josete que me atenderam com tanta atenção quando precisei.

Aos membros do GGA da UFCG que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, sem o apoio de vocês não seria possível concretizá-lo. Aos subgrupos de

gases e microbiologia, em especial, Márbara, Jisla, Josy, Gleson, Naiara, Elisa, Pablo, Luís e Ivan.

Às amigas Gracielle e Edilma pelas lembranças dos momentos de estudos e por compartilhar alegrias, dúvidas, angústias e conhecimentos.

Ao CNPq e a CAPES pela bolsa concedida. À Rede FINEP/Biogás e a ECOSOLO/PAQTCPB pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa, em especial, Prof. Dr. Fernando Jucá, Daniela e Sávio (UFPE), João Azevedo (ECOSOLO) e Armênia (PAQTCPB).

À minha amiga “prima” Andrezza que me cedeu muito mais que seu lar em Cuité, quando precisei, dividiu a cama, o lençol, a comida, o vinho, me emprestou seus ouvidos, me deu os melhores conselhos. Por rasgar um vestido e me levar para casar em seu carro, por me incentivar, me fazer rir e chorar. Muito obrigada!!!

Às colegas que Cuité-PB me trouxe Graciete, Rayane, Bruna, Camila, Amanda, Talita, Claudio, Nita, aos vigilantes que me conduziram pelo Campus tarde da noite, aos servidores que sempre me atenderam quando foi necessário, aos motoristas que me transportaram e a Josivaldo que atendeu muitas chamadas para me pegar e deixar na UFCG, independentemente do horário.

Aos meus queridos amigos Wanessa, Luciano, Laurinha, Anderson, Silmary, Leandro, Ricardo, Fabrício, Rafael, Beth, Edla, Renatinha, Andréia, Cleópatra, Edna, Adriano, Juliana, Edcarlos, Nilda, Rafaela, Mayara, Lucilene, Jaciara, Renato, Kierve, Lilian, Nita, Amanda e Aluska que acompanharam minha trajetória, que de alguma forma me ajudaram, me aguentaram nos momentos difíceis e me proporcionaram tantas risadas, os guardarei para sempre em meu coração.

Aos irmãos em Cristo da Paróquia de Nossa Senhora do Rosário. À Família Tropeiros da Borborema que me distraiu por muitos finais de semana.

Enfim, a todos que estiveram presentes ao longo desta caminhada, que acreditaram no meu potencial e me ensinaram que, com persistência, empenho e confiança em si mesma é possível buscar e conquistar TODO e QUALQUER objetivo.

A todos vocês, muito obrigada por tudo que fizeram nesses anos!!!

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso,
mas o que ele se torna com isso.”

John Ruskin

RESUMO

Populações de bactérias e arqueas são responsáveis tanto pela degradação de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) quanto pela produção de biogás presente em aterros sanitários. Entretanto, o conhecimento desses microrganismos em resíduos sólidos aterrados pode levar ao desenvolvimento de alternativas tecnológicas mais eficientes quanto ao processo biodegradativo e a produção de biogás, com impacto positivo sobre a operação de aterros sanitários, saúde pública e o meio ambiente. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar as comunidades de bactérias e arqueas e a produção de biogás em resíduos sólidos urbanos aterrados em uma Célula experimental. A metodologia utilizada neste trabalho contou com a etapa de construção, planejamento estatístico dos bairros de Campina Grande-PB para coleta e preenchimento da Célula experimental com RSU. As amostras de resíduos foram coletadas mensalmente, para a extração de DNA pelos métodos Kit e CTAB, a amplificação foi realizada com os primers universais e específicos da região 16S, os produtos foram analisados por PCR e DGGE, posteriormente, as amostras foram quantificadas, purificadas e enviadas para sequenciamento. Os indicadores físico-químicos e microbiológicos dos RSU monitorados *in situ* e em laboratório foram: temperatura, umidade, pH, sólidos voláteis e quantificação dos microrganismos aeróbios totais. O biogás produzido na Célula experimental foi mensurado por meio de um detector portátil com infravermelho que mediu as concentrações de CH₄, CO₂, O₂, CO e H₂S. Os resultados mostraram que as principais bactérias encontradas foram *Uncultured Pseudomonas sp*, *Uncultured bacterium*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Uncultured Bacillus sp.* que participaram dos processos de hidrólise, acidogêne e acetogênese. Entre as arqueas, foram caracterizadas as espécies *Methanosarcina flavescens*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina spelaei* e *Methanosaeta concilii* indicando que a metanogênese acetoclástica foi a via predominante para a síntese de metano na biodegradação dos RSU. A análise dos indicadores microbiológicos e físico-químicos foi propícia à biodegradação dos resíduos, ao desenvolvimento das comunidades de bactérias e arqueas e à produção de biogás. O processo de retroalimentação da Célula experimental, com resíduos novos, elevou à quantidade de matéria orgânica, entretanto, as concentrações de CO₂ excederam as de CH₄, que teve valor máximo de 20%.

Palavras-chave: resíduos sólidos urbanos; biodegradação; bactérias; arqueas; biogás.

ABSTRACT

Populations of bacteria and archaea are responsible both for the degradation of Urban Solid Waste (USW) and for the production of biogas present in landfills. However, the knowledge of these microorganisms in solid grounded waste can lead to the development of more efficient technological alternatives for the biodegradation process and the biogas production, with a positive impact on the operation of landfills, public health and the environment. In this sense, the objective of this work was to investigate the communities of bacteria and archaea and the production of biogas in urban solid wastes grounded in an experimental Cell. The methodology used in this work included the construction stage, statistical planning of the neighborhoods of Campina Grande-PB for collection and filling of the experimental Cell with USW. Samples residues were collected monthly for DNA extraction by the methods Kit and CTAB, amplification was performed with universal and specific primers of the 16S region the products were analyzed by PCR and DGGE, subsequently, the samples were quantified purified and sent for sequencing. The physico-chemical and microbiological indicators of USW monitored *in situ* and in the laboratory were: temperature, humidity, pH, volatile solids and quantification of total aerobic microorganisms. The biogas produced in the experimental Cell was measured by means of a portable infrared detector that measured the concentrations of CH₄, CO₂, O₂, CO e H₂S. The results showed that the main bacteria found were Uncultured *Pseudomonas sp*, Uncultured *bacterium*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, Uncultured *Bacillus sp.* which participated in the hydrolysis, acidogenic and acetogenesis processes. Amongst the archaea species have been characterized *Methanosarcina flavescens*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina spelaei* and *Methanosaeta concilii* indicating that the acetoclastic methanogenesis was the predominant pathway for synthesis of methane in the biodegradation of USW. The analysis of the microbiological and physico-chemical indicators was favorable to the biodegradation of the residues, to the development of microbial communities and to the production of biogas. The experimental Cell feedback process, with new residues, increased to the amount of organic matter, however, CO₂ concentrations exceeded those of CH₄, which had a maximum value of 20%.

Keywords: urban solid waste; biodegradation; bacteria; archaea; biogas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corte da seção transversal de um aterro de RSU.....	23
Figura 2 - Etapas metabólicas e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia.	25
Figura 3 - Fases de biodegração dos RSU e gases formados.	29
Figura 4 - Fatores que afetam a produção de biogás em aterros.	33
Figura 5 - Árvore filogenética dos domínios <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> e <i>Eukarya</i>	38
Figura 6 - Ordens, famílias, gêneros e números de espécies de arqueas metanogênicas pertencentes ao filo <i>Euryarchaeota</i>	39
Figura 7 - Célula experimental de RSU.	45
Figura 8 - Mapa dos bairros de Campina Grande-PB e locais de coleta dos RSU. ...	46
Figura 9 – (a) Instrumentação da Célula experimental; (b) Configuração após a retroalimentação com RSU.	48
Figura 10 - Detalhes da composição gravimétrica e volumétrica dos RSU.....	50
Figura 11 - Fluxograma de monitoramento da Célula experimental de RSU.	51
Figura 12 - Marcador molecular (a) Low Mass DNA Ladder; (b) 1 Kb DNA Ladder. .	53
Figura 13 - (a) Espectrofotômetro; (b) Aplicação e quantificação do DNA.....	55
Figura 14 - (a) Monitoramento das concentrações de biogás; (b) Dräger X-am 7000.	60
Figura 15 - Placa de fluxo estática.	62
Figura 16 - Instalação da placa de fluxo na Célula experimental.....	62
Figura 17 - Composição gravimétrica e volumétrica (soltos e compactados) dos RSU.	64
Figura 18 – Perfil dos produtos da PCR-DGGE.	70
Figura 19 - Dendrograma para domínio <i>Bacteria</i>	71
Figura 20 – Representação da distribuição dos filios do domínio <i>Bacteria</i>	77
Figura 21 - PCR com os primers (a) P1; (b) P2 e (c) P3.	80
Figura 22 – Bandas visualizadas após a Re-PCR com os primers P4, P5 e P6.	83
Figura 23 - Microrganismos envolvidos na biodegradação de RSU.	90
Figura 24 – Temperatura em relação ao tempo de aterramento dos RSU.	91
Figura 25 – Umidade em relação ao tempo de aterramento dos RSU.	93
Figura 26 - Precipitação e evaporação de Campina Grande-PB.	94
Figura 27 - Fissuras na camada de cobertura da Célula experimental.....	95
Figura 28 – pH em relação ao tempo de aterramento dos RSU.	96
Figura 29 – Sólidos voláteis em relação ao tempo de aterramento dos RSU.	98
Figura 30 – Aeróbios totais em relação ao tempo de aterramento dos RSU.	100
Figura 31 - Concentração volumétrica (%) de CH ₄ , CO ₂ e O ₂	102
Figura 32 – Concentração volumétrica (ppm) de CO e H ₂ S.	104
Figura 33 – Concentrações de CH ₄ , CO ₂ e O ₂ na camada de solo compactado.....	108
Figura 34 – ACP das variáveis monitoradas na Célula experimental de RSU.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica do biogás em aterros.....	31
Tabela 2 - Propriedades de alguns gases existentes no biogás de aterros.	32
Tabela 3 - Representação das zonas e quantitativo de RSU coletados.	46
Tabela 4 - Mês de referência e dias decorridos do primeiro enchimento e da retroalimentação da Célula experimental de RSU.	49
Tabela 5 – Sequências de primers universais utilizados para o domínio <i>Bacteria</i>	55
Tabela 6 - Característica do equipamento de medição das concentrações do biogás.	60
Tabela 7 – Comparação da composição gravimétrica dos RSU de Campina Grande-PB no período de 2008 a 2015.	66
Tabela 8 – Quantificação de DNA das amostras de RSU (Filtração e Centrifugação).	69
Tabela 9 - Quantificação de DNA das amostras de RSU (Centrifugação Kit e CTAB).	78
Tabela 10 - PCR realizada com os primers P4, P5 e P6.	81
Tabela 11- Caracterização geotécnica do solo.....	109
Tabela 12 – Mínimo, máximo, média, desvio padrão e coeficiente de variação dos indicadores monitorados na Célula experimental.	110
Tabela 13 - Matriz de correlação.....	112

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Período médio de duração das fases de biodegradação dos RSU.....	30
Quadro 2 - Diferenças entre os domínios <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> e <i>Eucarya</i>	38
Quadro 3 - Primers específicos utilizados nas PCRs do domínio <i>Archaea</i>	57
Quadro 4 - Metodologia das análises físico-químicas e microbiológicas.	59
Quadro 5 - Ensaio geotécnicos para caracterização do solo.	61
Quadro 6 - Identidade dos microrganismos - Domínio <i>Bacteria</i>	72
Quadro 7 - Identidade dos microrganismos - Domínio <i>Archaea</i>	85

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

1I – Primera Filtração Nível Inferior
1S - Primera Filtração Nível Superior
2I - Segunda Filtração Nível Inferior
2S - Segunda Filtração Nível Superior
A - Adenina
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABRELPE - Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais
ACP – Análise de Componentes Principais
AESAs – Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba
AGV – Ácidos Graxos Voláteis
APHA - American Public Health Association
ARDRA – Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado
As – Arsênio
AWWA - American Water Works Association
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato
C – Citosina
Cd - Cádmiio
CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CG – Composição Gravimétrica
CH₄ – Metano
cm – Centímetro
CO – Monóxido de Carbono
CO₂ – Dióxido de Carbono
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONDER - Companhia de Desenvolvimento Urbano no Estado da Bahia
Cr - Cromo
CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio
Cu – Cobre
DGGE – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DLU – Diretoria de Limpeza Urbana
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DNTPs – Desoxirribonucleotídeo trifosfatos
DO – Densidade Óptica
ECOSAM - Empresa de Consultoria em Saneamento Ambiental.
EDTA – Ácido Etileno Diamono Tetracético
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
FISH – Hibridização Fluorescente

F - Forward
g – Gravidade/rpm
g - Grama
G – Guanina
GGA – Grupo de Geotecnia Ambiental
H₂ – Hidrogênio
H₂S – Sulfeto de Hidrogênio
Hg - Mercúrio
I - Inferior
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kg - Quilograma
kg/hab – Quilograma por Habitante
kN - KiloNewton
km – Quilômetro
km² – Quilômetro Quadrado
LBiotec – Laboratório de Biotecnologia
LGA – Laboratório de Geotecnia Ambiental
m – Metro
M - Molar
mA - Miliampère
m² – Metro Quadrado
m³ – Metro Cúbico
mg - Miligrama
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mL – Mililitro
µL - Microlitro
mm – Milímetro
MM – Marcador Molecular
MMA – Ministério do Meio Ambiente
m/s – Metro Por Segundo
n - nucleotídeo
N₂ – Nitrogênio
NaCl – Cloreto de Sódio
NBR – Norma Brasileira
NCBI – National Center for Biotechnology Information
ng/µL – Nanograma por Microlitro
NH₃ – Amônia
Ni - Níquel
nm – Nanômetro
O₂ – Oxigênio
P1 – Primer 1 (*Methanobrevibacter*)
P2 – Primer 2 (*Methanobrevibacter smithii*)
P3 – Primer 3 (*Methanobacteriales*)
P4 – Primer 4 (*Methanosarcina spp.*)

P5 – Primer 5 (*Methanosaeta spp.*)
P6 - Primer 6 (*Methanosarcinaceae*)
pb – Pares de Bases
Pb - Chumbo
PB - Paraíba
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PE - Pernambuco
P_{FS} – Peso de Cada Fração Segregada
pH – Potencial Hidrogeniônico
PMCG – Prefeitura Municipal de Campina Grande
PMGIRS - Plano Municipal de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos
ppm – Partes Por Milhão
P_T – Peso Total
PVC – Policloreto de Vinila
PVP – Polivinilpirrolidona
R- Reverse
RJ – Rio de Janeiro
REMECOM – Réseau Européen de Mesures pour la Caractérisation des Ordures
Ménagères
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAr – Ácido Ribonucleico Ribossomal
RPM – Rotações por Minuto
RSU – Resíduos Sólidos Urbanos
S – Nivel Superior
SOSUR – Secretaria de Obras e Serviços Urbanos
T - Temperatura
T - Timina
t – tonelada
TA – Tampão de Amostra
TAE – Tris-Acetato-EDTA
Taq - *Thermus aquaticus*
T-RFLP ou TRF – Terminal Restrição Fragmento Comprimento Polimorfismo
UASB – Digestor Anaeróbico de Fluxo Ascendente
UEPB – Universidade Estadual da Paraíba
UFC – Unidade Formadora de Colônias
UFCG – Universidade Federal de Campina Grande
USEPA - United States Environmental Protection Agency
USP – Universidade de São Paulo
UV - Ultravioleta
V- Volts
W – Watt
WEF - Water Environment Federation
WHO - World Health Organization
Zn – Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 Aspectos gerais relacionados aos resíduos sólidos	21
3.2 Microbiologia e digestão anaeróbia	24
3.3 Biodegradação dos resíduos sólidos urbanos	28
3.4 Composição do biogás	30
3.5 Fatores intervenientes na biodegradação dos RSU e na produção de biogás....	32
3.6 Ecologia microbiana	36
3.7 Técnicas de biologia molecular nos estudos de ecologia microbiana	40
4 METODOLOGIA	44
4.1 Área de estudo.....	44
4.2 Delineamento experimental.....	44
4.2.1 Construção, instrumentação e locais de amostragem da Célula experimental	44
4.2.2 Retroalimentação da Célula experimental de RSU.....	47
4.2.3 Composição gravimétrica e volumétrica dos RSU	49
4.3 Monitoramento da Célula experimental	50
4.3.1 Extração de DNA - Kit	52
4.3.2 Extração de DNA – CTAB	53
4.3.3 Quantificação de DNA nas amostras de RSU	54
4.3.4 PCR com primers universais – Domínio <i>Bacteria</i>	55
4.3.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	56
4.3.6 Preparação das amostras para sequenciamento - Domínio <i>Bacteria</i>	56
4.3.7 PCR com primers específicos – Domínio <i>Archaea</i>	57
4.3.8 Preparação das amostras para sequenciamento - Domínio <i>Archaea</i>	58
4.3.9 Indicadores físico-químicos e microbiológicos.....	59
4.3.10 Monitoramento do biogás	60
4.3.10.1 Ensaios na camada de cobertura de solo compactado	61
4.4 Tratamento dos dados e estatística.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
5.1 Composição gravimétrica e volumétrica dos RSU	64
5.2 Extração, quantificação, PCR, DGGE e sequenciamento - Domínio <i>Bacteria</i>	68
5.3 Extração, quantificação, PCR e sequenciamento - Domínio <i>Archaea</i>	77

5.4 Indicadores físico-químicos e microbiológicos.....	91
5.4.1 Temperatura	91
5.4.2 Umidade.....	92
5.4.3 Potencial hidrogeniônico (pH)	96
5.4.4 Sólidos voláteis	98
5.4.5 Quantificação de aeróbios totais	100
5.5 Concentrações de biogás.....	101
5.5.1 Ensaio realizado na camada de cobertura de solo compactado	107
5.6 Análises estatísticas.....	109
5.6.1 Estatística descritiva.....	109
5.6.2 Matriz correlação.....	111
5.6.3 Análise de Componentes Principais (ACP)	113
6 CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

No processo de biodegradação dos Resíduos Sólidos Urbanos (RSU), a matéria orgânica é biodegradada por meio de uma complexa cooperação metabólica entre diferentes grupos microbianos.

Em aterros sanitários é indispensável a otimização de projetos e a aplicação de metodologias operacionais capazes de assegurar, de modo satisfatório, a evolução dos processos de degradação, a estabilidade geotécnica do aterro e a minimização da poluição, uma vez que, a fração sólida dos resíduos, quando degradada, é responsável pela produção de líquidos (lixiviados) que contaminam o lençol freático e gases tóxicos que contribuem para o aumento do efeito estufa.

A emissão de biogás pelos drenos de gases e camada de cobertura em aterros sanitários representa um grave problema de poluição atmosférica em nível local e global, devendo esta emissão ser mitigada e controlada. O biogás de aterros de resíduos sólidos é uma mistura gasosa combustível, resultante da biodegradação da matéria orgânica pela ação de microrganismos, contendo em sua composição metano, gás carbônico e, em menores quantidades, hidrogênio, nitrogênio, gás sulfídrico, monóxido de carbono, amônia, oxigênio e aminas voláteis (PECORA et al., 2008).

Os microrganismos são os principais agentes responsáveis por promover os processos de degradação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos (QUINTAES et al., 2012). As comunidades microbianas presentes nos aterros sanitários incluem bactérias hidrolíticas e fermentativas, acidogênicas, acetogênicas e arqueas metanogênicas, além de bactérias redutoras de sulfato, fungos e protozoários (MATA-ALVAREZ, 2002).

Considerando que toda informação microbiológica dos ecossistemas dos aterros é importante para a avaliação dos processos biodegradativos de resíduos sólidos, o emprego de técnicas de biologia molecular, tais como extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de gradiente com desnaturante (DGGE) e sequenciamento de DNA são ferramentas valiosas para identificação específica, caracterização da estrutura e da distribuição espacial de populações microbianas em amostras complexas, inclusive de resíduos sólidos (AMANN et al., 1995; MUYZER; SMALA, 1998).

Nesse sentido, este trabalho visa caracterizar as comunidades de bactérias e arqueas e a produção de biogás em resíduos sólidos urbanos aterrados em uma

Célula experimental construída na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Tais resultados visam contribuir com o desenvolvimento de alternativas tecnológicas, que permitam uma maior eficiência nos processos biodegradativos relacionados à produção de biogás, fornecer subsídios para possíveis ajustes das condições de operação de aterros sanitários, além de contribuir para a proteção da saúde pública e para a redução dos efeitos nocivos ao meio ambiente. Propõe-se ainda identificar aspectos funcionais do tratamento desses resíduos, aperfeiçoar técnicas de amostragens e extração de DNA, sugerindo que as respostas obtidas com o sequenciamento de bactérias e arqueas metanogênicas, caracterizadas no processo de digestão anaeróbia, possam servir de premissa para estudos mais específicos, que venham a colaborar com o entendimento do processo biodegradativo em resíduos sólidos urbanos aterrados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as comunidades de bactérias e arqueas e a produção de biogás em uma Célula experimental de resíduos sólidos urbanos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as comunidades de bactérias e arqueas em uma Célula experimental de RSU, utilizando técnicas moleculares para caracterização dos principais grupos associados à degradação de resíduos;
- Verificar as concentrações de biogás produzidas ao longo do tempo na Célula experimental de resíduos sólidos aterrados;
- Estabelecer a relação entre a produção de biogás e os indicadores físico-químicos e microbiológicos;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aspectos gerais relacionados aos resíduos sólidos

A geração de resíduos sólidos é um fenômeno inevitável que ocorre diariamente, ocasionando muitas vezes danos irreversíveis ao meio ambiente. A preocupação com os resíduos é universal e vem sendo discutida nas esferas nacional e internacional.

A NBR 10004/2004 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) define resíduos sólidos, como resíduos nos estados sólido e semi-sólido que resultam de atividades humanas de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Considera-se, também, resíduo sólido o lodo proveniente de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle da poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornam inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos d'água, ou exijam, para isso, soluções técnicas e economicamente inviáveis, face às tecnologias disponíveis.

Quanto à classificação dos resíduos sólidos, referente aos seus riscos potenciais, estes são classificados pela NBR 10004 (ABNT, 2004) em perigosos (classe I) e não perigosos (classe II). Por sua vez, os resíduos de classe II são divididos em não inertes (classe II A) e inertes (classe II B).

Os resíduos da classe I podem apresentar riscos à saúde pública devido às suas características de inflamabilidade, corrosividade, toxicidade e patogenicidade. Os resíduos da classe II não apresentam riscos ao ser humano e ao meio ambiente. Finalmente, os resíduos que não se enquadram na classe I ou classe II B são denominados não inertes e, podem ter como propriedades combustibilidade, biodegradabilidade ou solubilidade em água.

Os Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) são constituídos basicamente por matéria orgânica putrescível, papel/papelão, podas de árvores e gramados, plástico, vidro, material metálico ferroso e não ferroso, ossos e demais tipos de resíduos, muitas vezes denominados de material inerte, dependendo dos critérios de caracterização física ou gravimétrica (CASSINI et al., 2003).

A caracterização gravimétrica é a determinação dos constituintes e de suas respectivas porcentagens em peso ou volume, em uma amostra de resíduos sólidos (ABNT, 2004). A composição física dos RSU, os tipos de materiais que os

constituem, sua heterogeneidade e as proporções de diferentes compostos e elementos químicos, dependem basicamente das condições de geração e do modo de coleta. O foco desta pesquisa está voltado para os RSU que englobam os materiais de origem domiciliar, de estabelecimentos de comércio, de serviços de varrição e de feiras livres, sendo de atribuição e responsabilidade das prefeituras, desde a coleta até a destinação final.

Existem várias formas de tratamento e disposição de resíduos sólidos urbanos que são comumente escolhidas em função do custo, da área disponível e da necessidade de cada município. Define-se tratamento como uma série de procedimentos destinados a reduzir a quantidade ou o potencial poluidor dos resíduos sólidos, seja impedindo descarte no meio ambiente ou local inadequado, seja transformando-o em material inerte ou biologicamente estável. As formas de tratamento e disposição final de resíduos mais comuns e utilizados no Brasil são: lixões ou vazadouros, compostagem, incineração, usinas de triagem para reciclagem, aterros controlados e aterros sanitários (PHILIPPI, 2005).

De acordo com Philippi (2005), os aterros sanitários são obras de engenharia destinadas ao tratamento e à disposição final dos resíduos sólidos urbanos, sobre terreno natural, por meio do confinamento em camadas cobertas com material inerte, geralmente solo, segundo normas operacionais específicas, de modo a evitar prejuízos ao meio ambiente, em particular à saúde e à segurança pública. Para que os aterros sanitários se configurem como unidades de tratamento de resíduos e não causem danos, se faz necessário um acompanhamento adequado da disposição de RSU, à luz das tecnologias existentes e critérios previstos para tal.

De acordo com a NBR 8419 (ABNT, 1992) um aterro sanitário conta necessariamente com as seguintes características: impermeabilização de base, drenagem e tratamento dos líquidos percolados, drenagem de gases, drenagem das águas superficiais e cobertura de solo compactado. Todas essas características permitem minimizar os efeitos das duas principais fontes de poluição provenientes da disposição de resíduos sólidos, o biogás e o lixiviado. A Figura 1 apresenta um corte da seção transversal de um aterro de resíduos sólidos urbanos, apontando a estrutura de setores em preparo, operação e conclusão.

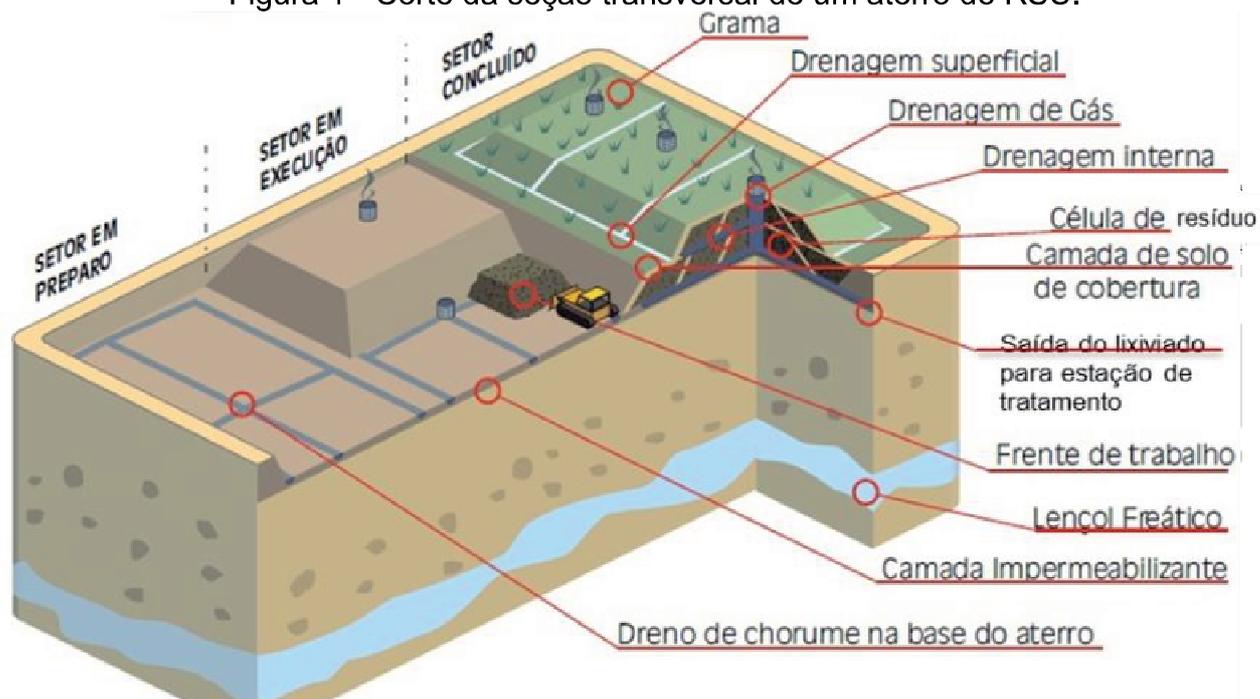
Conhecer os mecanismos que atuam sobre os aterros sanitários, bem como os indicadores que os descrevem, é importante, principalmente porque a eficiência da disposição de RSU contribuirá com a garantia de sua segurança e estabilidade estrutural, uma vez que, a operação dos aterros sanitários envolve inúmeras

intervenções e atividades multidisciplinares, relacionadas à engenharia civil e sanitária e ao controle ambiental.

Do ponto de vista biológico, o aterro sanitário de RSU corresponde a um sistema dinâmico, que envolve reações metabólicas num ambiente formado pela massa de resíduos com suas características físicas, químicas, microbiológicas e suas inter-relações, formando um sistema complexo.

Para McDougall e Philp (2001), o comportamento dos resíduos depositados em aterros é semelhante ao de um biorreator, que em condições ótimas promove a degradação da fração biodegradável dos resíduos sólidos. Avaliar o comportamento de aterros sanitários quanto à eficiência na degradação e produção de biogás, torna-se necessário para entender e aperfeiçoar essa técnica de disposição e reaproveitamento de áreas (MONTEIRO et al., 2006).

Figura 1 - Corte da seção transversal de um aterro de RSU.



Fonte: CONDER (2007).

Nesse contexto, Células experimentais, biorreatores ou lisímetros, consistem em um sistema que simula a disposição final em aterros sanitários, e permite o conhecimento do processo de decomposição dos resíduos sob condições conhecidas e/ou controladas. Uma Célula experimental pode levar à rápida estabilização dos resíduos com alta produção de metano, quando se almeja o aproveitamento energético do biogás (BORGLIN et al., 2004).

Simular, por meio de Células experimentais, o comportamento de um aterro em escala real favorece o estudo dos processos que ocorrem em seu interior, bem como a avaliação do comportamento dos resíduos quanto aos aspectos físicos, químicos e microbiológicos. As Células experimentais construídas e monitoradas corretamente minimizam os impactos ambientais, controlam a produção de lixiviado e as emissões de biogás, reduzindo assim, a contaminação do solo e as emissões de gases ao meio ambiente. Além disso, normas técnicas podem ser reformuladas ou aprimoradas a partir de estudos realizados em Células experimentais (MONTEIRO et al., 2006).

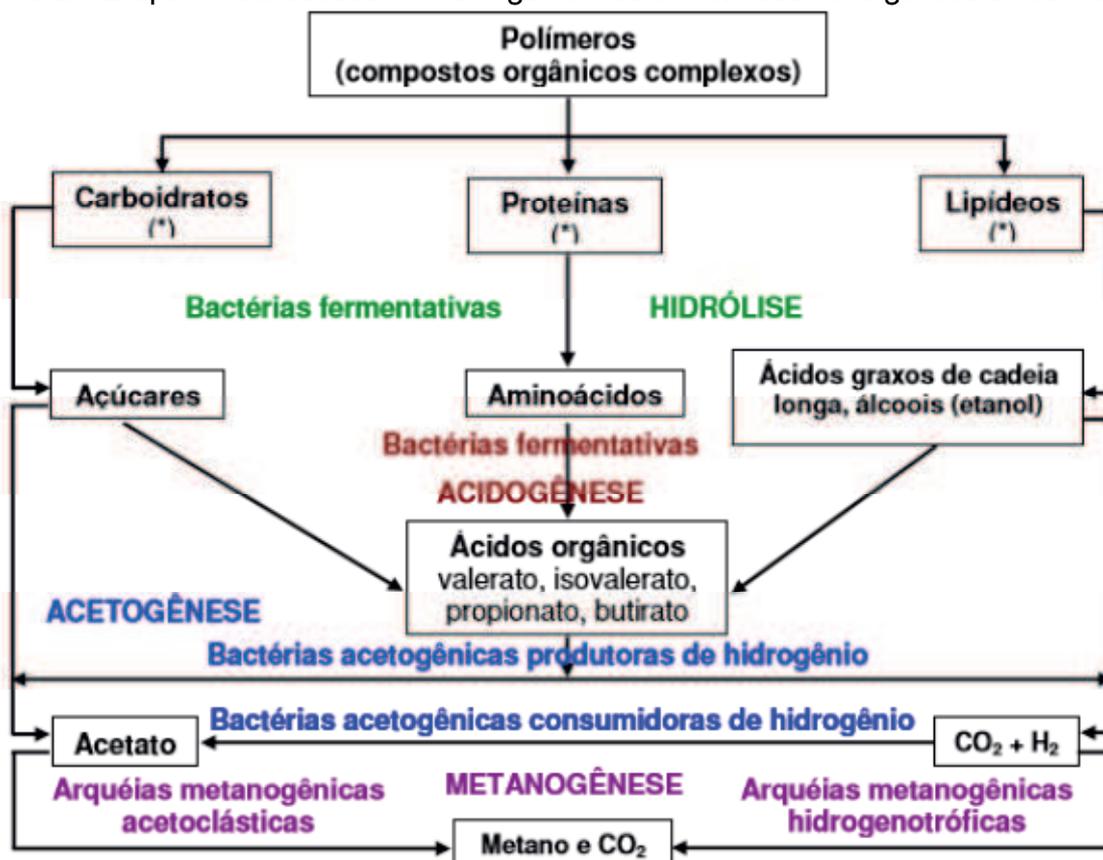
3.2 Microbiologia e digestão anaeróbia

As transformações biológicas da matéria orgânica complexa em produtos mais simples podem ocorrer na presença ou na ausência de oxigênio molecular, ou ainda, em condições nas quais coexistem em um mesmo meio, ambientes aeróbios e anaeróbios.

Os processos de biodegradação de RSU em aterros sanitários se dividem em duas fases: aeróbia e anaeróbia. Assim que o resíduo é aterrado, um período de aclimatação é observado, correspondendo à fase em que ocorre um acúmulo de umidade e oxigênio que sustentam a atividade microbiana. Durante esse primeiro estágio de decomposição, o oxigênio presente nos espaços entre os resíduos recém-aterrados é rapidamente consumido por microrganismos aeróbios, resultando na produção de dióxido de carbono, água e no aumento da temperatura. Uma fase de transição se instala na ausência do oxigênio molecular. Essa fase é breve em relação à decomposição anaeróbia, pois o oxigênio não é repostado, uma vez que, os resíduos são cobertos por camadas de solo (TCHOBANOGLIOUS et al., 1993; MCBEAN et al., 1995; KJELDSEN et al., 2002).

Ao contrário da degradação aeróbia, na qual a matéria orgânica carbonácea é metabolizada diretamente a CO_2 , a degradação anaeróbia envolve 4 etapas (Figura 2). Por serem constituídos de proteínas, carboidratos e lipídeos, vários são os caminhos metabólicos da conversão dos compostos a CH_4 , realizados pelos microrganismos. Portanto, trata-se de um processo bioquímico, composto de várias reações sequenciais, cada uma envolvendo determinadas populações microbianas.

Figura 2 - Etapas metabólicas e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia.



(*) exoenzimas que degradam carboidratos: celulase, hemicelulase, xilanase, amilase;
 exoenzimas que degradam proteínas: proteases;
 exoenzimas que degradam lipídeos: lipase, fosfolipase.

Fonte: Adaptado de Mc Carty (1964).

A fase anaeróbia é subdividida em quatro estágios: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (POHLAND; HARPER, 1985).

A fase de hidrólise marca o início do processo de decomposição anaeróbia. Com a diminuição da quantidade de oxigênio, começam a predominar microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, aqueles que preferencialmente não usam oxigênio na biodegradação da matéria orgânica. Essas bactérias convertem o material orgânico particulado, como a celulose e outros, em compostos dissolvidos. A água, presente nos resíduos, pela sua umidade e pelas águas que infiltram ou são recirculadas, aceleram o início da degradação anaeróbia, promovendo a diluição de agentes inibidores e facilitando a distribuição de microrganismos e nutrientes na massa de RSU. Sendo assim, a hidrólise do material particulado, bem como do material solúvel de maior tamanho é uma etapa essencial para aumentar o acesso das células microbianas ao substrato (CHERNICHARO, 2000).

Dentre os gêneros de bactérias hidrolíticas que se destacam no processo anaeróbio estão: *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, que são gêneros

produtores de lipases para degradação de lipídeos a ácidos graxos; *Bacteroides*, *Butyvirbio*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Peptococcus* e *Bacillus*, que são gêneros produtores de proteases para degradação de proteínas a aminoácidos; e *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Acetivibrio*, *Eubacterium*, que são gêneros produtores de amilases para degradação de polissacarídeos a açúcares menores. A composição relativa e ativa destes microrganismos será refletida pelo tipo de substrato presente no processo (ANDERSON, 2003).

A hidrólise leva à produção de ácidos orgânicos voláteis, amônia, hidrogênio e dióxido de carbono. A decomposição ocorre por meio da hidrólise dos polímeros e fermentação dos monossacarídeos resultantes a ácidos carboxílicos e álcoois, caracterizando assim, o início da fase acidogênica (MATA-ALVAREZ, 2002). Durante essa fase são produzidas quantidades consideráveis de compostos orgânicos simples e de alta solubilidade, principalmente ácidos graxos voláteis.

A acidogênese é realizada, em sua maioria, por um grupo diversificado de bactérias fermentadoras anaeróbias obrigatórias. Entretanto, algumas espécies são facultativas e podem metabolizar a matéria orgânica por via oxidativa, utilizando oxigênio molecular como acceptor de elétrons, removendo resíduos de oxigênio dissolvido no sistema e, dessa forma, eliminando qualquer efeito tóxico aos microrganismos estritamente anaeróbios, dentre eles, as arqueas metanogênicas.

Entre os gêneros de bactérias acidogênicas mais comuns estão *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, e *Escherichia*. Os produtos metabólicos gerados pela atividade das bactérias acidogênicas são importantes substratos para as bactérias acetogênicas e para as arqueas metanogênicas (ARCHER; KIRSOP, 1990).

A conversão de ácidos e álcoois, a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, marca o início da fase acetogênica. A principal função das bactérias acetogênicas na digestão anaeróbia é a produção desses substratos que são metabolizados pelas arqueas metanogênicas.

Dois grupos distintos de acetogênicas podem ser distinguidos, com base em seu metabolismo. O primeiro grupo é de bactérias acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio, também chamadas de acetogênicas redutoras de prótons, que produzem ácido acético, CO₂ e H₂ a partir de uma grande variedade de

substratos, dentre eles, ácidos graxos intermediários (propionato e butirato), álcoois ou outros ácidos orgânicos (valerato, isovalerato, palmitato).

O segundo grupo é formado por bactérias acetogênicas estritamente anaeróbias fermentativas, que catalisam a formação de acetato a partir de CO_2 e H_2 . Os gêneros mais conhecidos dessas bactérias acetogênicas são *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Butyribacterium*, *Clostridium* e *Pelobacter*.

Os subprodutos da etapa anterior são utilizados por um consórcio de arqueas metanogênicas, e convertidos a metano e dióxido de carbono. As condições redutoras dessa fase irão influenciar na solubilidade dos sais inorgânicos, resultando na precipitação ou dissolução desses compostos. Por exemplo, sulfato e nitrato são reduzidos a sulfetos e amônia, respectivamente. Comumente, nas caracterizações do biogás produzido em aterros sanitários e Células experimentais encontram-se pequenas quantidades de gás sulfídrico.

Existem dois principais grupos de arqueas que atuam na fase metanogênica. Um grupo metaboliza o acetato oriundo da fase anterior da anaerobiose e recebe o nome de arqueas acetoclásticas. Outro grupo utiliza o hidrogênio para redução do dióxido de carbono, denominadas arqueas hidrogenotróficas.

Metanogênicas acetoclásticas: grande parte da produção de metano na fase metanogênica é responsabilidade deste grupo. Existem dois gêneros de arqueas acetoclásticas *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. O primeiro é mais versátil por utilizar inclusive o hidrogênio no seu metabolismo e o segundo utiliza exclusivamente o acetato. De forma geral, nas reações bioquímicas dessas arqueas, o CH_4 é produzido a partir da redução do ácido acético. A *Methanosarcina* possui uma taxa de crescimento específico maior (24 horas de tempo de duplicação celular), quando comparado ao da *Methanosaeta*, entretanto, apresenta uma baixa afinidade pelo acetato.

Metanogênicas hidrogenotróficas: são responsáveis por utilizar o hidrogênio existente no meio para produzir metano e propiciar a produção de ácidos pelas bactérias acidogênicas e acetogênicas. Pertencem a este grupo as ordens *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanocellales* e *Methanopyrales*.

Uma terceira via pode ainda ser utilizada por alguns grupos de metanogênicos hidrogenotróficos, principalmente, quando há baixa atividade dos metanogênicos acetoclásticos, com conseqüente baixa produção de gás carbônico (FINKE et al., 2003). Trata-se da via metilotrófica, em que compostos metilados

(metanol, metilamina, dimetilamina, trimetilamina) são utilizados como substrato, produzindo gás carbônico, metano e, no caso das metilaminas, amônia.

Rich et al. (2008) acrescentam uma quinta etapa, a estabilização biológica. Durante a etapa final dos RSU nos aterros sanitários, nutrientes e substratos tornam-se limitantes, levando a comunidade microbiana ao estado de dormência. A produção de gás cai drasticamente, no entanto, a degradação das frações orgânicas recalcitrantes continua lentamente gerando substâncias húmicas (HINOJOSA et al., 2014).

Cada estágio é dinâmico e depende da criação de um ambiente favorável pelo estágio antecedente, que estabelecerá as condições necessárias para que a microbiota execute o processo de degradação.

Nesse sentido, aterros sanitários e Células experimentais se mostram como um sistema heterogêneo complexo quanto às características físicas, químicas e biológicas onde diferentes microrganismos coexistem e interagem (SZYŁAK-SZYDŁOWSKI; KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, 2012).

3.3 Biodegradação dos resíduos sólidos urbanos

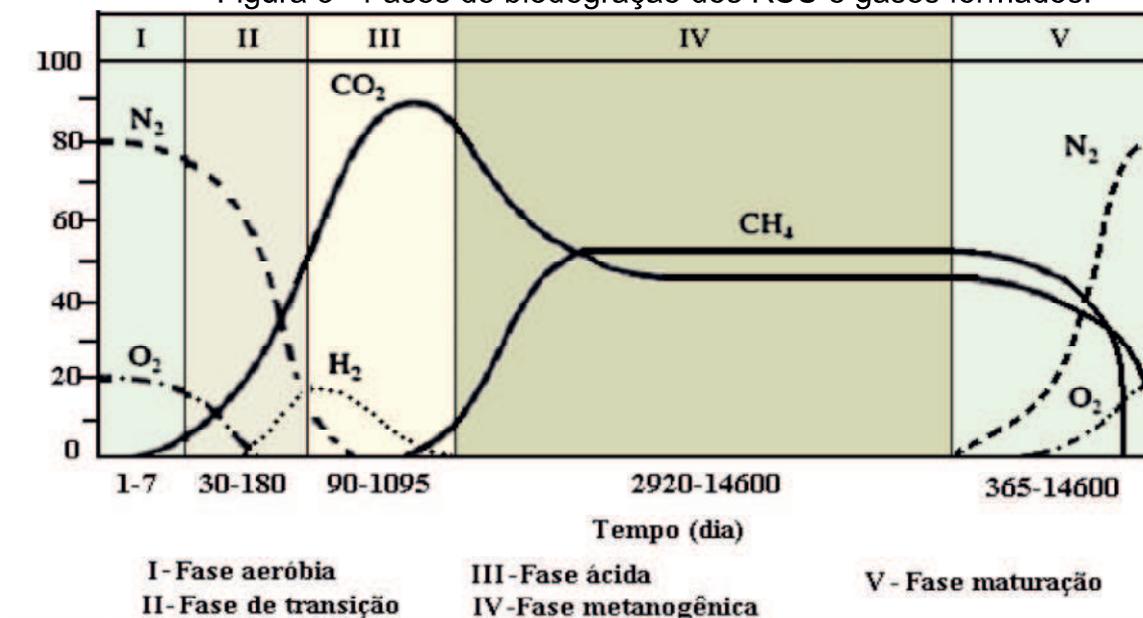
As tentativas de aproximar os modelos teóricos de biodegradação ao que de fato ocorre nos RSU em aterros, se intensificaram nas décadas de 1980 e 1990. As dinâmicas envolvidas no processo de decomposição dos resíduos e na formação do biogás podem ser facilitadas quando divididas em fases.

A biodegradação dos RSU envolve diferentes processos ao longo do tempo, sendo dividida por 5 fases: Ajuste Inicial (fase I), Transição (fase II), Ácida (fase III), Metanogênica (fase IV) e Maturação (fase V) (TCHOBANOGLIOUS et al., 1993). Esta subdivisão não é única, sendo possível encontrar na literatura, outras maneiras para elucidar o processo de biodegradação. A Figura 3 mostra as diversas fases da biodegradação em aterros sanitários e os gases formados, segundo Tchobanoglous et al. (1993).

Ajuste Inicial (fase I): é a fase em que os RSU começam a ser decompostos, com presença predominante de bactérias aeróbias pela exposição da massa de resíduos ao ar e, conseqüente ao oxigênio, em concentração semelhante à atmosférica (21%). O tempo de duração dessa fase pode variar de algumas horas a poucas semanas, porque após a cobertura da massa de resíduos nos aterros, a

quantidade de oxigênio começa a diminuir rapidamente, devido ao consumo acelerado pelas bactérias aeróbias.

Figura 3 - Fases de biodegração dos RSU e gases formados.



Fonte: Tchobanoglous et al. (1993).

Transição (fase II): nesta fase os níveis de gases atmosféricos, como o nitrogênio e o oxigênio diminuem, iniciando-se a fase anaeróbia da biodecomposição. Não existe ainda a produção de metano, pela presença residual de oxigênio molecular ou nitratos e sulfatos disponíveis como aceptores de elétrons. O ácido acético e o propiônico são os mais importantes para a formação do metano. Na fase de transição intensifica-se a produção de CO₂, por ser gerado como um subproduto da fermentação da matéria orgânica.

Ácida (fase III): na fase ácida intensifica-se a formação de ácidos orgânicos e sua conversão em ácido acético, que serão substratos para arqueas metanogênicas. Inicia-se a formação de CH₄, mas ainda em quantidades mínimas. No entanto, o CO₂ atinge o pico de produção, proveniente do metabolismo fermentativo gerando compostos orgânicos simples. O H₂ apresenta-se em maior quantidade no início da fase III, mas tende a decrescer com o incremento da produção de CH₄.

Metanogênica (fase IV): a fase metanogênica é também chamada de fase metanogênica estável, pela estabilização da produção de metano. Nessa fase diminui, consideravelmente, a presença de bactérias aeróbias ou facultativas e predominam os microrganismos estritamente anaeróbios, denominados arqueas metanogênicas. A produção de CO₂ decai e tende a se estabilizar em valores entre

35% e 50% do gás gerado no aterro. A produção de CH₄ tende a crescer no início dessa fase e se estabilizar na faixa de 45% a 60%.

Maturação (fase V): com a diminuição dos nutrientes, cai a produção de metano e dióxido de carbônico. Restam na massa de resíduos os substratos de difícil degradação e a decomposição microbiana torna-se lenta. A pressão interna da Célula de RSU diminui, propiciando novamente o aparecimento de gases atmosféricos como o nitrogênio e o oxigênio.

O período de duração das fases de biodegradação dos RSU pode sofrer alterações intensas, resultantes das diversas variáveis envolvidas no processo. O Quadro 1 sugere o intervalo de tempo para cada fase da biodegradação que ocorre em aterros de RSU.

Quadro 1 - Período médio de duração das fases de biodegradação dos RSU.

Fases	Condição	Período
I	Aeróbia	Algumas horas a 1 semana
II	Anaeróbia Facultativa	1 a 6 meses
III	Anaeróbia, Metanogênica Instável	3 meses a 3 anos
IV	Anaeróbia, Metanogênica Estável	8 a 40 anos
V	Anaeróbia, Metanogênica Declinante	1 ano a mais de 40 anos

Fonte: Banco Mundial (2003).

O processo de biodegradação dos RSU confinados em aterros sanitários pode se estender por muitos anos, fazendo-se necessário o monitoramento por até mais de 30 anos, após o encerramento das operações de aterramento, período durante o qual ainda se pode detectar a produção de biogás.

Castilhos Jr. et al. (2003) consideram que embora essa divisão em fases facilite o entendimento dos fenômenos de estabilização biológica dos RSU e seus impactos sobre as emissões gasosas, na prática, em um aterro sanitário, essas fases não estão bem definidas. Isto porque sempre há o aterramento de resíduos novos, causando diferença na idade do material disposto, não sendo difícil encontrar as várias fases ocorrendo simultaneamente. A Célula experimental deste estudo passou pelo processo de estabilização biológica e, após 1309 dias, recebeu uma nova camada de RSU, cujo procedimento está detalhado no item 4.2.2.

3.4 Composição do biogás

Em aterros sanitários o processo de biodegradação ocorre, predominantemente, sob condições anaeróbias, os principais constituintes do biogás, de acordo com Tchobanoglous et al. (1993), incluem o metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), monóxido de carbono (CO), hidrogênio (H_2), oxigênio (O_2) e amônia (NH_3), além de outros gases traço ou oligogases, assim denominados por estarem presentes em menores quantidades.

Tchobanoglous et al. (1993) apresentam uma composição típica para o biogás gerado em aterros sanitários e, conforme mostra a Tabela 1, observa-se que, o CH_4 e o CO_2 são os gases resultantes, com maior percentual, no processo de estabilização da matéria orgânica sob condições anaeróbias.

Tabela 1 - Composição típica do biogás em aterros.

Gases	Porcentagem
Metano	45% - 60%
Dióxido de carbono	40% - 60%
Nitrogênio	2% - 5%
Oxigênio	0,1% - 1,0%
Enxofre, Mercaptanas	0% - 1,0%
Amônia	0,1% - 1,0%
Hidrogênio	0% - 0,2%
Monóxido de carbono	0% - 0,2%
Gases em menor concentração	0,01% - 0,6%

Fonte: Tchobanoglous et al. (1993).

O biogás pode conter mais de 300 gases, sendo que muitos deles, geralmente não ultrapassam 1% da composição total. As concentrações médias, principalmente de CH_4 e CO_2 , podem sofrer alterações dependendo de oscilações de clima e hábitos culturais da região.

Em aterros sanitários brasileiros, Real (2005) obteve porcentagens de gás metano entre 64 e 72% no aterro de Pacarambi-RJ, que podem ser consideradas elevadas. Pesquisas realizadas no aterro de Nova Iguaçu-RJ apresentaram concentrações de metano entre 44 e 76% (BORBA, 2006). No aterro da Muribeca-PE, Jucá et al. (2005) obtiveram de 20 a 42% para valores de dióxido de carbono e de 30 a 58% para o gás metano. No aterro sanitário de Campina Grande-PB, as concentrações de metano encontradas durante o monitoramento variaram de 48 a 56% e de dióxido de carbono entre 40 e 45% (GGA/UFCEG, 2017).

As proporções desses gases no biogás de aterros sanitários e Células experimentais dependem das condições de biodigestão existentes, como presença

de substrato, populações de bactérias específicas e equilíbrio entre os grupos de microrganismos. A proporção relativa dos gases na composição de biogás pode sofrer variação, dependendo também da fase da biodegradação ou da idade dos RSU depositados no aterro (AIRES et al., 2016).

As diferenças existentes entre as concentrações de CH_4 e CO_2 , principais gases gerados na biodecomposição dos resíduos sólidos, estão também relacionadas às características dos gases, conforme apresentado na Tabela 2.

O dióxido de carbono tem grande solubilidade em água, ao contrário do gás metano. Assim, uma parcela considerável de gás carbônico permanece dissolvida na fração aquosa da massa de RSU (ENSINAS, 2003). Uma observação sobre o CH_4 é a respeito do limite de explosividade, pois, quando está presente no ar em concentrações de 5% a 15% torna-se explosivo, o que pode acarretar desastres ambientais, além de representar risco à saúde pública.

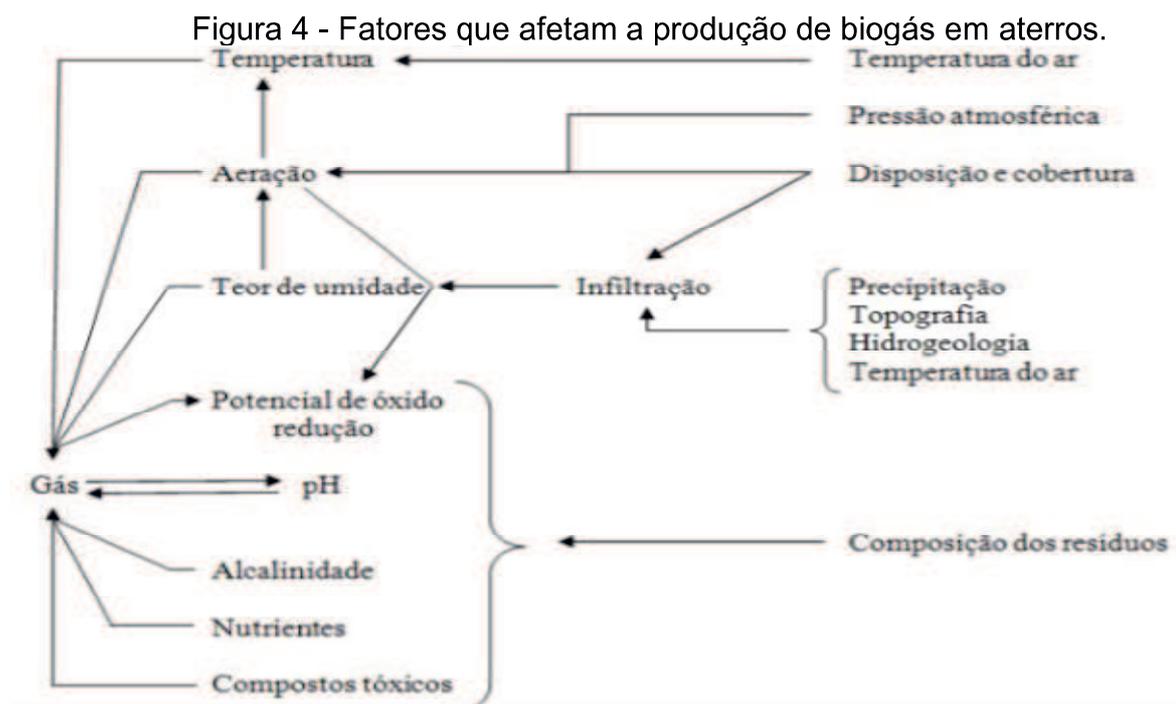
Tabela 2 - Propriedades de alguns gases existentes no biogás de aterros.

Gás	Concentração típica no biogás	Limite de explosividade	Solubilidade em água (g/l)	Propriedades gerais
CH_4	45% - 60%	5% - 15%	0,0024	Inodoro, incolor, não tóxico, asfixiante e inflamável
CO_2	35% - 60%	-	1,688	Inodoro, incolor, asfixiante
N_2	0 - 10%	-	0,013	Inodoro, incolor
O_2	0 - 4%	-	0,008	Inodoro, incolor
CO	<0,1%	12,5% - 74%	0,028	Inodoro, incolor, tóxico, inflamável
H_2	<0,1%	4% - 74%	0,001	Inodoro, incolor, não tóxico, inflamável
H_2S	<0,1%	4,3% - 45,5%	3,846	Incolor, muito tóxico

Fonte: Adaptado pela autora, Gandolla et al. (1997).

3.5 Fatores intervenientes na biodegradação dos RSU e na produção de biogás

Diversos fatores influenciam no processo de biodegradação dos RSU e na produção de biogás, entre eles: disponibilidade de nutrientes para os microrganismos, composição gravimétrica dos RSU, idade do aterro, umidade, presença de O_2 , temperatura e pH do meio (USEPA, 2004). A taxa de bioconversão do material orgânico em biogás pode ser influenciada por diversos outros fatores, que incluem aspectos ambientais de manejo do aterro e indicadores físico-químicos. A relação entre esses fatores é apresentada na Figura 4.



Fonte: Adaptado de McBean et al. (1995).

A composição gravimétrica possibilita o conhecimento dos RSU quanto à sua quantidade em peso, que é expressa em percentual, e identifica a presença de cada componente. Já a composição volumétrica, representa o espaço físico ocupado por cada fração de resíduos no interior da Célula após o aterramento. A composição física dos RSU é uma etapa fundamental na gestão de resíduos, contribuindo para o estabelecimento de índices socioeconômicos, para a avaliação da degradabilidade, do poder de contaminação ambiental, do potencial para reciclagem, reuso, além de ser um dos principais fatores que influenciam a produção de biogás (THANH et al 2010; BARR et al., 2013; AIRES et al., 2017).

A composição dos RSU depende do crescimento populacional, dos padrões de consumo, dos hábitos alimentares, da quantidade de resíduos, do poder aquisitivo, das condições climáticas da região, da existência de programas de reciclagem e valorização energética, sendo de grande importância na definição das tecnologias mais adequadas para tratamento e disposição final de resíduos (ZHANG et al., 2010; OGWUELEKA, 2013, SONG et al., 2013). Esta composição afeta quantitativamente e qualitativamente a produção dos gases. A disponibilidade de frações facilmente degradáveis (carboidratos, proteínas e lipídios), significa maior quantidade de substrato para a atuação de microrganismos. Desta forma, os resíduos com porções elevadas de matéria orgânica devem apresentar maior potencial de produção de biogás.

A umidade corresponde ao valor obtido em porcentagem que é expresso pela quantidade de água perdida durante o processo de secagem. A água fornece nutrientes dissolvidos para os microrganismos, possibilita sua rápida propagação no meio sólido, facilita o transporte de enzimas e de outros metabólitos importantes no processo de biodegradação. Os valores de umidade considerados adequados se estabelecem entre 40 e 60% (O'LEARY e TCHOBANOGLIOUS, 2002). Essa faixa percentual determina uma melhor produção de metano no processo biodegradativo dos RSU em aterros. Valores de umidade fora dessa faixa prejudicam a atividade metabólica dos microrganismos e a produção de biogás (OLIVEIRA; GOMES, 2001).

Cabe ressaltar que, Palmisano e Barlaz (1996) afirmam que a umidade ótima fica entre 20 e 40%, para uma degradação eficiente dos resíduos sólidos aterrados. Esses valores são inferiores aos apresentados por O'Leary e Tchobanoglous (2002), dessa forma, essa faixa de umidade é bastante ampla.

A temperatura afeta os microrganismos de duas maneiras opostas. À medida que a temperatura aumenta, as reações químicas e enzimáticas da célula passam a ocorrer com maior velocidade e o crescimento é acelerado. Entretanto, acima de uma determinada temperatura, os componentes celulares podem sofrer danos irreversíveis (MADIGAN et al., 2010).

As condições de temperatura dentro da massa de RSU influenciam o tipo de microrganismo predominante e o nível de produção de biogás, sendo a faixa ótima de temperatura para as bactérias mesofílicas de 25 a 35 °C e para as bactérias termofílicas de 45 a 65 °C (MCBEAN, 1995). Temperaturas abaixo de 15 °C geram severas limitações para a atividade metanogênica, sendo a faixa ótima de temperatura para a produção de biogás entre 30 e 40 °C.

As arqueas metanogênicas são mais sensíveis às mudanças na temperatura do que as bactérias acidogênicas e acetogênicas. Dessa forma, mudanças de temperatura frequentes podem comprometer a eficiência do sistema de tratamento. Entretanto, se a temperatura permanecer constante por um longo tempo, mesmo fora da faixa ótima para determinados organismos, uma nova população adaptada à condição imposta irá predominar e, uma boa eficiência no tratamento e produção de metano poderá ser alcançada.

O potencial hidrogeniônico (pH) está relacionado com as fases de degradação da matéria orgânica nos sistemas aeróbios e anaeróbios, podendo variar com o tempo de degradação dos resíduos. As bactérias produtoras de ácido atingem alta taxa de crescimento na faixa de pH entre 5,0 e 6,0. Essas bactérias são tolerantes a

grandes variações de pH, podendo atuar em valores próximos a 4,5 (CHERNICHARO, 2000). Por outro lado, as arqueas metanogênicas atingem crescimento e produção de metano máxima em valores de pH entre 6,5 e 7,6. De forma geral, o pH durante o processo de biodegradação dos resíduos sólidos em aterros varia em suas diversas fases entre 6,0 e 8,0.

De acordo com Leite (2008), na decomposição bioquímica da matéria orgânica, uma variedade de bactérias saprófitas hidrolisa e converte o material complexo em compostos de menor peso molecular, como os ácidos graxos (acético, propiônico e butírico). O acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) associados ao aumento da produção de CO₂ pelas bactérias acidogênicas e acetogênicas, consumirá alcalinidade do meio e pode levar à redução do pH, a depender da capacidade de tamponamento do sistema. A instabilidade do processo anaeróbio pode ocorrer quando a produção de ácidos voláteis for maior que seu consumo, provocando queda do pH e a inibição das arqueas metanogênicas.

Os sólidos voláteis em RSU podem ser considerados como um indicador da degradabilidade dos resíduos ao longo do tempo. Altos teores de sólidos voláteis indicam a presença abundante de matéria orgânica a ser degradada, enquanto baixos valores indicam que a matéria orgânica já passou por um processo acentuado de degradação. De acordo com Monteiro et al. (2006), os sólidos voláteis presentes na fração líquida, resultante do processo de biodegradação, representam a parcela facilmente degradável resultante da atividade microbiana.

Entre outros fatores que interferem na biodegradação dos resíduos e na produção de biogás, podem ser citadas ainda, a disponibilidade de nutrientes, tipo e quantidade de bactérias, compactação dos resíduos, tipo de cobertura de solo, pressão, condições meteorológicas e a dimensão e operação do aterro.

As principais características da geometria do aterro para produção dos gases são a altura da massa de resíduos e o sistema de cobertura final, que reduz consideravelmente, os efeitos das condições atmosféricas na massa de resíduos. A compactação do solo influencia diretamente a biodegradação da massa de resíduos, pois sua maximização diminui a presença de oxigênio no interior do aterro, evitando o carreamento excessivo de águas pluviais infiltradas para a massa de RSU.

Condições meteorológicas como, precipitação e evaporação são fatores relevantes que interferem na evolução do processo de biodegradação dos RSU e, portanto, podem influenciar também a produção de biogás. Entender a variação de umidade, no interior da massa de resíduos em função do tempo de aterramento,

torna-se relevante para avaliar a dispersão de nutrientes, enzimas e microrganismos no interior de Células de resíduos, facilitando o ataque microbiológico aos compostos biologicamente degradáveis.

Para Oliveira; Braga (2017) em projetos de aterros de disposição de resíduos, a análise das condições climáticas é uma medida de proteção ambiental, tendo em vista que, esses fatores auxiliam no monitoramento do volume de água armazenada e, que a geração de efluentes líquidos e gasosos está associada à infiltração de água no aterro.

3.6 Ecologia microbiana

Estudos na área de ecologia molecular microbiana vêm se desenvolvendo desde a década de 1980, utilizando diferentes técnicas para análise das comunidades microbianas a partir de amostras ambientais. A diversidade microbiana na avaliação do processo de decomposição de resíduos tornou-se um dos principais passos em direção ao entendimento das propriedades metabólicas e, conseqüentemente, da produção de biogás.

A detecção e a identificação de microrganismos, tradicionalmente, são realizadas de acordo com os meios de obtenção de carbono e energia, exigências nutricionais, meio de cultivo para seu crescimento e observação direta em microscópio (KENNEDY, 1999). No entanto, a utilização dessas metodologias fornecem informações limitadas, impedindo a detecção de muitos microrganismos “não cultiváveis”.

Amann et al. (1995), sugerem que pequenos percentuais das espécies bacterianas do planeta, tenham sido identificadas, deixando uma vasta porção dessa biota desconhecida e não estudada. Para Klammer et al. (2008) apenas 20% das bactérias que ocorrem naturalmente foram isoladas e caracterizadas.

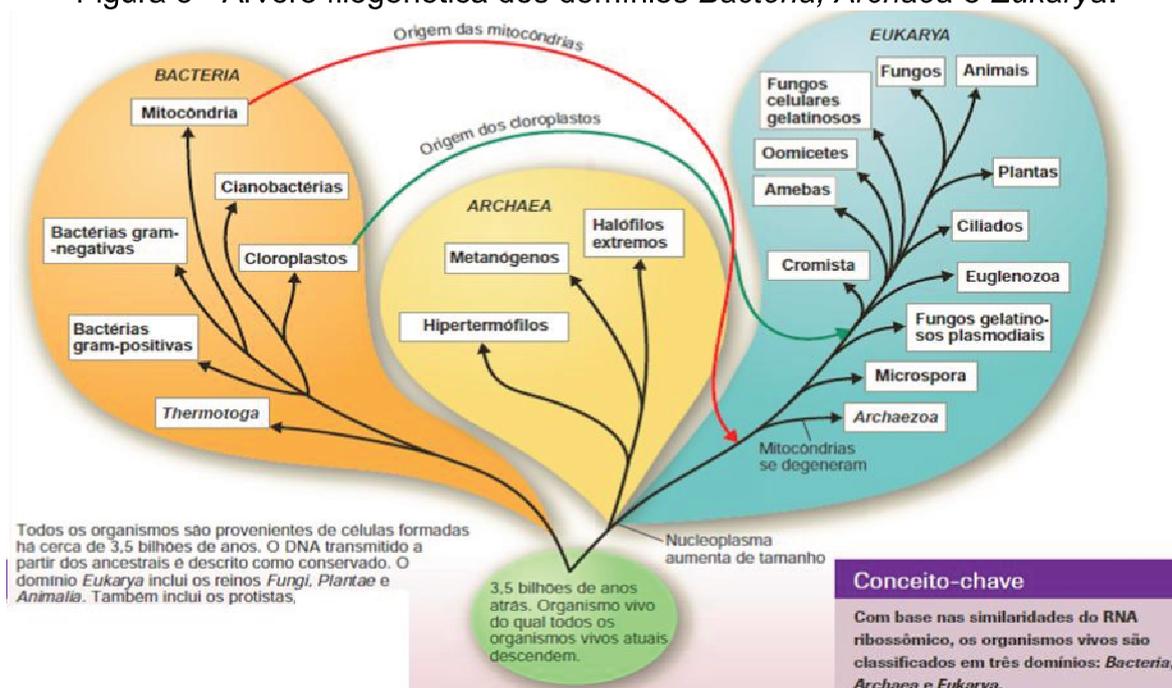
Em alguns sistemas de tratamento anaeróbio em escala plena, cujas condições não são totalmente controladas, tais como aterros sanitários e digestores de lodo, as análises moleculares indicam que a atividade e a diversidade de arqueas metanogênicas é menor que a de bactérias. Entretanto, em outros sistemas como reatores Digestor Anaeróbio de Fluxo Ascendente (UASB) tratando efluente de cervejaria, as populações de arqueas metanogênicas são bastante expressivas, chegando a constituir mais de 78% da comunidade microbiana (DÍAZ et al., 2005).

Vale ressaltar que, o fato da diversidade microbiana ser modificada durante as fases de digestão anaeróbia, nem sempre quer dizer alteração na eficiência de tais sistemas. Uma comunidade microbiana muito diversa pressupõe a existência de várias espécies ou gêneros que desempenhem funções ecológicas semelhantes. A depleção de um ou mais grupos, poderia ser suprida por outros metabolicamente semelhantes, sem prejuízo do funcionamento do sistema. Entretanto, há populações que são essenciais, mesmo que em menor número, que poderiam, inclusive, definir a rota metabólica principal no ecossistema (ABREU, 2007).

Para estudar a produção de biogás em RSU aterrados se faz necessário analisar a evolução da decomposição da matéria orgânica, bem como os microrganismos que atuam nesse processo. Nesse contexto, os domínios *Bacteria* e *Archaea* são complexos e estão em constante alteração, abrangendo uma grande diversidade de microrganismos, cada um com o seu próprio genoma, componentes celulares e reações metabólicas, que interagem entre si e com o ambiente de diferentes maneiras (SANTOS et al., 2009).

Woese et al. (1990) realizaram a análise comparativa das sequências das moléculas do gene RNA ribossomal (RNAr) 16S, e sugeriram três linhagens celulares filogeneticamente distintas. As linhagens, denominadas domínios, são *Bacteria* e *Archaea* (ambos procariotos) e Eukarya (eucariotos), conforme Figura 5. Acredita-se que os domínios divergiram a partir de um organismo ancestral comum ou de uma comunidade de organismos, no início da vida na Terra (MADIGAN et al., 2010).

A árvore filogenética da vida revela dois fatos evolutivos muito importantes: (1) todos os procariotos não exibem estreita relação filogenética e (2) as *Archaea* estão mais relacionadas à *Eucarya* que a *Bacteria*. Assim, a partir do último ancestral universal comum, a diversificação evolutiva seguiu, inicialmente, duas direções: *Bacteria* e uma segunda linhagem principal. Essa segunda linhagem por fim divergiu, originando o domínio *Archaea*, que manteve a estrutura celular procariótica, e o domínio *Eukarya*, que não o fez (MADIGAN et al., 2010).

Figura 5 - Árvore filogenética dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.

Fonte: Madigan et al. (2010).

Após serem divididos com base nas sequências do gene rRNA 16S, estudos subsequentes mostraram que cada domínio está associado a uma série de fenótipos, que podem ser únicos, enquanto outros são compartilhados entre dois ou até entre os três domínios, conforme observa-se no Quadro 2.

Quadro 2 - Diferenças entre os domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*.

Características	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eucarya</i>
Membrana nuclear	Ausente	Ausente	Presente
Número de cromossomos	1	1	>1
Parede celular	Peptidoglicano	Pseudo-peptidoglicano, glicoproteínas e outros	Celulose em plantas, quitina em fungos e nenhuma em animais
Lipídeos da membrana celular	Glicerídeos ligados a éster, não ramificado, saturado ou mono-insaturado	Isoprenóide, glicerol diéter ou di-glicerol tetraéter	Glicerídeos ligados a éster, não ramificado, poli-insaturado
Organelas (mitocôndria e cloroplastos)	Ausente	Ausente	Presente
Ribossomo	70S	70S	80S
Síntese de proteínas inibida por cloranfenicol e estreptomicina	Sim	Não	Sim

O domínio *Archaea* taxonomicamente está formado por cinco filos, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota* e *Thaumarchaeota*. Embora esta seja a classificação formal, de acordo com a taxonomia, podem-se distinguir quatro grupos distintos de arqueas: haloarchaeas, archaea metanogênica, archaea hipertermófila e archaea acidófila extrema (PINTO, 2017). De acordo com García (2014), a produção biológica de metano é realizada pelas arqueas metanogênicas (anaeróbias estritas), que pertencem em sua maioria ao filo *Euryarchaeota*. Atualmente, muitas arqueas metanogênicas já foram descritas com base na comparação das sequências do gene RNAr 16S e estão classificadas em 6 ordens, 14 famílias, 33 gêneros e 690 espécies (Figura 6).

Figura 6 - Ordens, famílias, gêneros e números de espécies de arqueas metanogênicas pertencentes ao filo *Euryarchaeota*.

Ordem	Família	Gênero	Nº de espécies
Methanobacteriales	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	123
		<i>Methanobrevibacter</i>	112
		<i>Methanosphaera</i>	6
	<i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanothermobacter</i>	14
		<i>Methanothermus</i>	3
Methanococcales	<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	19
		<i>Methanotorris</i>	3
	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococcus</i>	18
		<i>Methanothermococcus</i>	16
Methanomicrobiales	<i>Methanocalculaceae</i>	<i>Methanocalculus</i>	29
	<i>Methanocorpusculaceae</i>	<i>Methanocorpusculum</i>	11
		<i>Methanoculleus</i>	72
	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanofollis</i>	9
		<i>Methanogenium</i>	7
		<i>Methanolacinia</i>	2
		<i>Methanomicrobium</i>	2
		<i>Methanoplanus</i>	4
	<i>Methanoregulaceae</i>	<i>Methanolinea</i>	16
		<i>Methanoregula</i>	18
<i>Methanosphaerula</i>		1	
Methanocellales	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>	7
	<i>Methanocellaceae</i>	<i>Methanocella</i>	4
	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	38
Methanosarcinales	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanimicrococcus</i>	2
		<i>Methanococcoides</i>	13
		<i>Methanohalobium</i>	2
		<i>Methanohalophilus</i>	21
		<i>Methanolobus</i>	20
		<i>Methanomethylavarans</i>	9
		<i>Methanosalsum</i>	3
		<i>Methanosarcina</i>	79
Methanopyrales	<i>Methermicoccaceae</i>	<i>Methermicoccus</i>	1
	<i>Methanopyraceae</i>	<i>Methanopyrus</i>	6

Fonte: Adaptado Pinto (2017).

3.7 Técnicas de biologia molecular nos estudos de ecologia microbiana

De acordo com Hinojosa et al. (2014), os ensaios moleculares apresentam vantagens de serem altamente específicos e usados para detectar um gene ou sequências de ácidos nucleicos de um organismo particular, ou de um grupo de organismos e de detectar organismos específicos ou grupos taxonômicos amplificados. Durante muito tempo, essas técnicas foram caras e laboriosas para serem executadas de forma rotineira, mas este quadro tem mudado, consideravelmente, nos últimos anos e, diversas metodologias moleculares têm sido desenvolvidas, contribuindo significativamente, para um grande avanço do conhecimento sobre a variabilidade genética de microrganismos.

Um dos métodos moleculares aplicados na caracterização microbiana é o uso de biomarcadores, moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e regiões variáveis, específicas de cada um. As regiões variáveis podem ser consideradas a impressão digital de um organismo (PACE et al., 2012).

Um biomarcador comumente utilizado para inferir identidade de organismos é o gene que codifica o RNA ribossomal (RNAr), que é parte integrante do ribossomo, onde ocorre a síntese de proteínas e está presente em todas as células. A região 16S compõe a subunidade menor dos ribossomos presentes em organismos procariontes (bactérias e arqueas), constituído por um polirribonucleotídeo de aproximadamente 1500 nucleotídeos.

Embora existam posições filogeneticamente informativas ao longo de todo o gene, a maior variabilidade se concentra nas primeiras 500 bases nucleotídicas (PATEL et al., 2002). GenBank, o maior banco de dados de sequências, tem aproximadamente 20 milhões de sequências depositadas, das quais 90000 são referentes ao gene que codifica o RNAr 16S, o que permite a comparação da sequência das linhagens desconhecidas com as disponíveis.

A variação genética do RNAr 16S tem sido explorada para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos, para “desenhar” primers específicos e para a detecção de grupos microbianos individuais em habitats naturais. A amplificação e a análise do gene que codifica o RNAr, portanto, têm sido utilizadas comumente para investigar a biodiversidade e a estrutura da comunidade microbiana de diversos ambientes, inclusive de aterros sanitários.

A extração de DNA é o primeiro passo para utilização de técnicas moleculares. Neste aspecto, a qualidade e a integridade do DNA são fundamentais para o sucesso nas etapas posteriores. Normalmente, os componentes da solução extratora variam de acordo com o protocolo utilizado, sendo que cada solução deve conter um tampão para estabilizar o pH, um sal para dissociar as proteínas, um detergente para solubilizar as membranas e um agente inativante das DNAses, cuja função é proteger o DNA. A extração e purificação de DNA a partir de diversas amostras experimentais é uma etapa fundamental para obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os métodos moleculares, independentes de cultivo, utilizam como etapa inicial, a amplificação de genes marcadores pela PCR. Após a extração do DNA de uma dada amostra, o material extraído serve como molde para a PCR. A região a ser amplificada, deverá conter sequências conservadas, que irão permitir o pareamento dos iniciadores e regiões variáveis que serão utilizadas para filogenia (YE et al., 2012).

Dentre as técnicas moleculares recentes, aplicadas aos microrganismos encontrados em aterros, destacam-se: T-RFLP ou TRF (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism); Hibridização fluorescente *in situ* (FISH), Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis (ARDRA); Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) e pirosequenciamento.

As técnicas de PCR e DGGE são as mais aplicadas em amostras de aterros sanitários e no estudo microbiológico para a formação do biogás. Essas técnicas são caracterizadas por fornecerem a identificação de microrganismos em nível de gênero e espécie, como também se determinado composto está sendo degradado, pois, há como determinar se um gene está sendo expresso, independentemente, de qual gênero esteja atuando. Assim, pode-se dizer que, em algum momento, ocorreu a produção de determinado composto ou sua degradação (LIU et al., 2011).

A PCR criada em 1983 por Kary Mullis, é uma das técnicas mais comuns utilizadas em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para diversos fins, como o sequenciamento de genes e diagnóstico de doenças hereditárias, *fingerprinting* genético (usado em testes de paternidade e na medicina forense), diagnóstico de doenças infecciosas e criação de organismos transgênicos, bem como a identificação de organismos patogênicos e de agentes infecciosos não cultiváveis (QUINTAES et al., 2012).

A PCR é um método sensível de amplificação (criação de múltiplas cópias) de DNA que permite detectar organismos, mesmo que em pequenas quantidades e de forma rápida e precisa. A técnica consiste na síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase, sendo esse método considerado sensível e viável economicamente, embora, em princípio, seu custo seja elevado, a frequente utilização desta técnica é compensatória.

Cada ciclo de replicação *in vitro* de DNA envolve três etapas básicas, desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação (normalmente a 94 °C) ocorre à separação da dupla fita de DNA para exposição dos sítios-alvo. Na segunda etapa, com a diminuição da temperatura (por exemplo, a 55 °C), ocorre o anelamento dos primers em regiões específicas de cada fita simples de DNA, que serve como molde, delimitando, assim, a região inicial e a região final da sequência genômica a ser amplificada. Finalmente, na etapa de extensão, ocorre a síntese de DNA complementar à fita-molde que, geralmente, é realizada em uma temperatura de 72 °C. Desta forma, em 25 a 40 ciclos, é possível produzir, em poucas horas, milhões de cópias específicas de DNA, até mesmo quando a amostra inicial contém apenas uma única sequência alvo original.

A DGGE, foi desenvolvida por Muyzer et al. (1993) e permite a separação de fragmentos amplificados de DNA do mesmo tamanho, mas que têm diferenças na sua constituição química. Seu princípio baseia-se na diferença de estabilidade das fitas duplas de DNA, que depende do conteúdo das bases nitrogenadas em um gradiente desnaturante.

A migração dos produtos de PCR amplificados no gel gera um perfil de bandas. Assim, fragmentos com mesmo tamanho, mas com composição de bases diferentes irão apresentar diferentes mobilidades no gel. Cada banda no gel representa teoricamente, uma espécie ou um grupo de microrganismos, com mesmo comportamento desnaturante. O padrão de bandejamento representa a comunidade microbiana estudada (MUYZER et al., 1998; ABREU, 2007). Por meio do DGGE é possível detectar 50 das variações em sequências de fragmentos com até 500 pares de base (pb).

A técnica de DGGE tem sido intensamente utilizada, em vários estudos, para investigar biodiversidade microbiana nos mais variados ambientes, tais como aterros sanitários, aquíferos contaminados, campos de plantio de arroz, sedimentos de lagos e reatores anaeróbios (CASAMAYOR et al., 2000; CASSERLY et al., 2003; WATANABE et al., 2004; AKARSUBASI et al., 2005; BUZZINI et al., 2006).

Existem algumas limitações que foram observadas na técnica de DGGE. Por exemplo, mais de uma banda presente no gel pode estar relacionada a um mesmo microrganismo; como é uma técnica semi-quantitativa, bandas pouco visíveis são mais difíceis de serem detectadas, sendo somente possível a identificação das bandas mais intensas, o que corresponderia aos microrganismos mais frequentes na comunidade em estudo (MUYZER; SMALLA, 1998).

O uso combinado das técnicas de biologia molecular tem sido bastante aplicado para avaliar a diversidade microbiana em vários ambientes. Contudo, se além da estrutura, deseja-se caracterizar as espécies ou os táxons presentes na comunidade, utilizam-se técnicas de identificação, como o sequenciamento de DNA, que fornece uma visão acerca da diversidade e da riqueza da comunidade amostrada (QUINTAES et al., 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

O município de Campina Grande está localizado na mesorregião Agreste do estado da Paraíba, possui uma área de 594 km², perímetro urbano de 75 km² e situa-se a 120 km da capital do Estado, João Pessoa. De acordo com estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE (2017), sua população é de aproximadamente 407.754 habitantes, sendo a segunda cidade mais populosa da Paraíba. A região metropolitana, formada por dezenove municípios, possui população estimada em 630.777 habitantes.

A altitude média é de 551 m, com as seguintes coordenadas geográficas: latitude de 7° 13' 50" Sul e longitude de 35° 52' 52" Oeste. O clima da região é do tipo semiárido com temperatura média anual de 22,4 °C e precipitação média de 875,4 mm (AESAs, 2013). A geração per capita de RSU é de 0,64 kg.hab⁻¹.dia⁻¹ resultando em uma produção em torno de 261 t.dia⁻¹ de resíduos (ECOSAM, 2014; ECOSOLO, 2016).

O desenvolvimento deste estudo contou com a construção, instrumentação e monitoramento de uma Célula experimental de RSU, localizada no Campus I da UFCG. Esta Célula possui estrutura cilíndrica rígida, com seção transversal circular. O modelo foi escolhido visando facilitar a distribuição e a compactação dos resíduos, uniformizar a distribuição das pressões laterais na parede interna, evitar caminhos preferenciais de percolação do lixiviado e reduzir a área de superfície lateral interna. As dimensões foram definidas com o objetivo de atingir a altura de resíduos suficiente para facilitar o estabelecimento de condições anaeróbias, levando em consideração também o custo para construção e preenchimento com os resíduos.

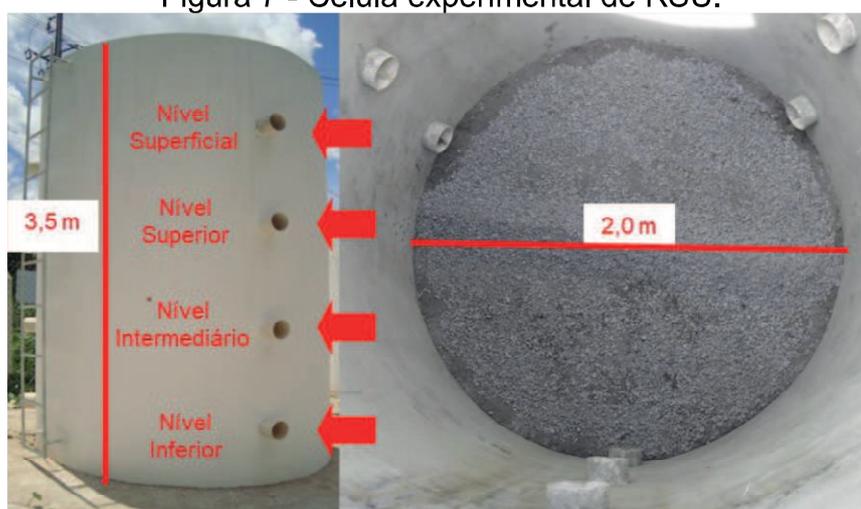
4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Construção, instrumentação e locais de amostragem da Célula experimental

A Célula experimental foi construída em alvenaria de tijolos maciços, possui 2,0 m de diâmetro interno, 3,5 m de altura e volume de 11 m³ (Figura 7). É dotada de sistemas de drenagem de líquidos e gases, medidores de nível dos líquidos, de recalque superficial e profundo e de temperatura ao longo da profundidade.

O sistema de drenagem do lixiviado foi construído com um tubo de PVC de 40 mm perfurado, apoiado sobre o solo e por uma camada de brita nº 19, que promove a drenagem da área da base da Célula experimental. Nas camadas de base e de cobertura foi utilizado um solo com características de baixa permeabilidade, para evitar o fluxo excessivo de líquidos e gases. Apresenta ainda, 12 pontos de coletas de RSU distribuídos ao longo do diâmetro e altura da Célula experimental, os quais são definidos em níveis de profundidade superficial, superior, intermediário e inferior.

Figura 7 - Célula experimental de RSU.



Fonte: Autor (2013).

Visando obter amostras representativas dos RSU de Campina Grande-PB, a Célula experimental foi preenchida com resíduos coletados, em locais selecionados a partir de um planejamento estatístico, com nível de confiança de 95% e erro máximo de 5%. Esse planejamento levou em consideração a população dos bairros, as zonas da cidade (Norte, Sul, Leste e Oeste) e a quantidade de RSU produzidos, segundo dados obtidos junto à Diretoria de Limpeza Urbana (DLU) e ao IBGE.

A partir das 4 zonas da cidade foi realizada uma amostragem estratificada proporcional ao número de bairros existentes em cada zona. Em seguida, por meio de uma amostragem aleatória, foram selecionados os locais de coleta dos RSU.

A coleta nos bairros sorteados foi realizada em um caminhão basculante, cedido pela Prefeitura Municipal de Campina Grande (PMCG), de acordo com as rotas definidas juntamente com a Secretaria de Obras e Serviços Urbanos (SOSUR). A Figura 8 ilustra o mapa de Campina Grande-PB, com destaque para as zonas existentes e os bairros onde foram coletados os resíduos sólidos urbanos.

Figura 8 - Mapa dos bairros de Campina Grande-PB e locais de coleta dos RSU.



A Tabela 3 apresenta o número de bairros pertencentes a cada zona, o percentual amostral, a quantidade de bairros selecionados por zona, os locais sorteados para coleta dos RSU e a quantidade de resíduos a ser pesada para garantir a representatividade da amostra.

Tabela 3 - Representação das zonas e quantitativo de RSU coletados.

Zonas	Número de bairros	Percentual amostrado (%)	Quantidade de bairros por zona	Bairros	Peso dos resíduos (kg)
Norte	14	28	3	Conceição Nações Palmeira	271,13 110,85 448,66
Sul	16	32	4	Estação Velha Jardim Paulistano São José Velame	261,20 632,84 311,41 475,90
Leste	07	14	2	José Pinheiro Nova Brasília	1.270,24 739,97
Oeste	13	26	3	Dinamérica Malvinas Quarenta	431,95 3.052,04 393,87
TOTAL					8.400,06

Fonte: Adaptado de Silva (2016).

4.2.2 Retroalimentação da Célula experimental de RSU

Durante o desenvolvimento das atividades da Célula experimental, preenchida no ano de 2011, foi observado que a altura de resíduos no ano de 2015, apresentou redução de mais de 50% em relação à altura inicial, ocorrida devido aos recalques acentuados (deformações verticais na massa de RSU), o que gerou problemas técnicos e operacionais durante as coletas e monitoramento dos resíduos.

Os principais problemas destacados foram, a inviabilização da retirada de resíduos em 6 pontos de coleta da Célula experimental e a redução nas concentrações de gás metano. Objetivando cumprir as metas propostas no plano de tese, foi verificada a necessidade de manutenção da Célula experimental, por meio de reparos construtivos e a inserção de nova instrumentação, a fim de dar continuidade às pesquisas e ao monitoramento do sistema experimental. Com base nestas constatações, foi realizado um novo enchimento da Célula com RSU, denominado de retroalimentação. É importante destacar que, esse procedimento de retroalimentação é comum na rotina operacional de aterros sanitários.

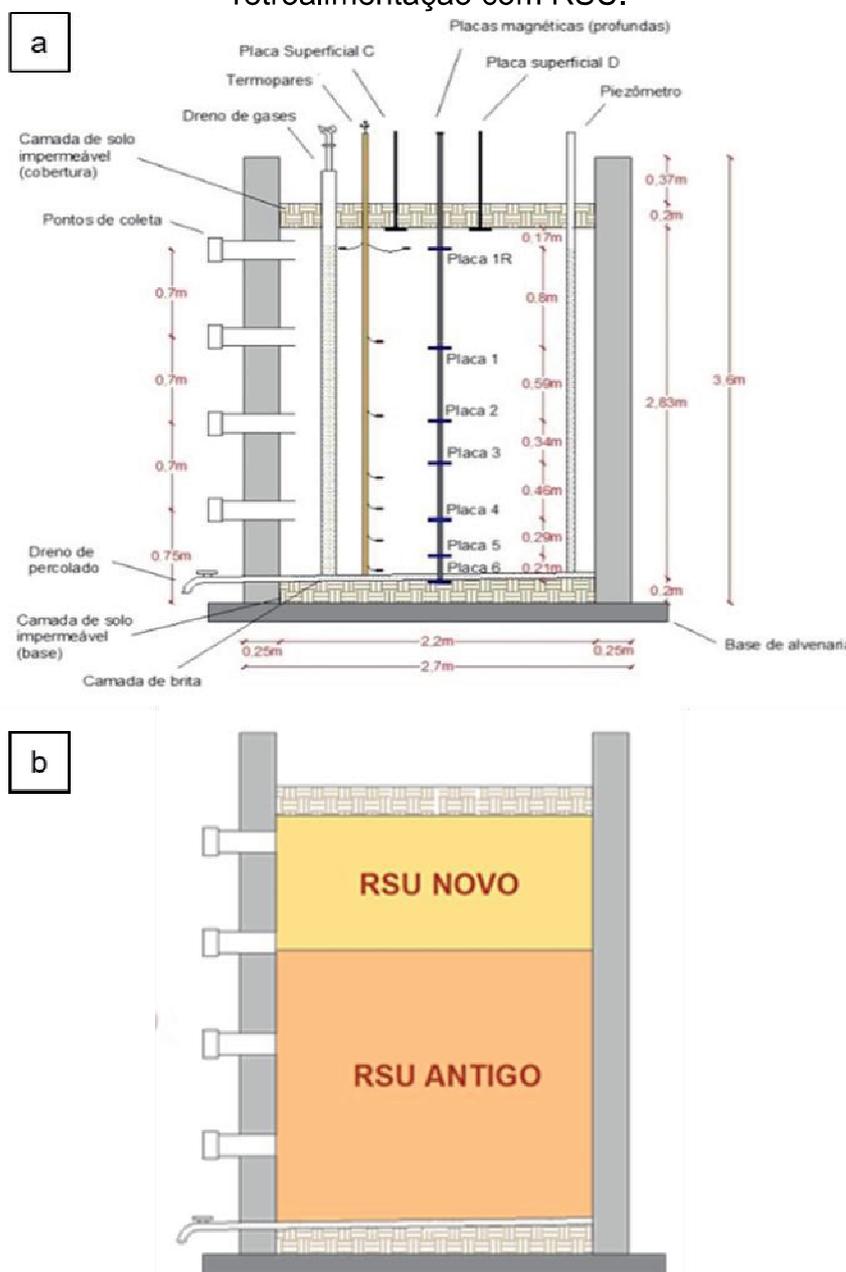
Sendo assim, com a retroalimentação da Célula experimental buscou-se obter informações atuais da composição gravimétrica e volumétrica dos resíduos sólidos da cidade de Campina Grande-PB; repor os RSU na Célula; avaliar os recalques e a estabilidade dos resíduos compactados; viabilizar as coletas de amostras sólidas em todos os pontos da Célula e estimular a produção de biogás.

Ainda nesse processo, houve a retirada da camada de cobertura (solo compactado) e a realização de manutenção na instrumentação já instalada, bem como a inclusão de instrumentos complementares para o monitoramento dos resíduos. Dos instrumentos instalados durante a retroalimentação, podem-se destacar: inserção de sensores de temperatura do tipo k, placas magnéticas de recalques ao longo da massa dos novos resíduos e placas de recalques superficiais (Figura 9).

Desta forma, a distribuição dos resíduos na Célula experimental consiste de resíduos antigos e novos. Os resíduos antigos correspondem ao enchimento realizado em setembro de 2011 e a retroalimentação com resíduos novos foi realizada em abril de 2015. A amostragem dos RSU coletados seguiu a mesma configuração do primeiro enchimento da Célula. Os resultados contemplados para

esta pesquisa representam o monitoramento da Célula experimental, apenas após o processo de retroalimentação.

Figura 9 – (a) Instrumentação da Célula experimental; (b) Configuração após a retroalimentação com RSU.



A Tabela 4 apresenta os meses de referência e os dias decorridos do primeiro enchimento e do procedimento de retroalimentação da Célula experimental. Vale ressaltar que, as amostras foram coletadas mensalmente e são referentes aos níveis superior, intermediário e inferior, pois, o nível superficial foi desativado após 30 dias do início do monitoramento, devido ao deslocamento vertical da massa de resíduos, ocasionado tanto por fatores mecânicos, quanto pela ação dos microrganismos na degradação da matéria orgânica.

Tabela 4 - Mês de referência e dias decorridos do primeiro enchimento e da retroalimentação da Célula experimental de RSU.

Dias enchimento	Mês de referência	Dias retroalimentação
1309	abr-15	0
1348	mai-15	39
1389	jun-15	80
1418	jul-15	109
1446	ago-15	137
1481	set-15	172
1515	out-15	206
1542	nov-15	233
1558	dez-15	249
1607	jan-16	298
1628	fev-16	319
1649	mar-16	340
1691	abr-16	382
1733	mai-16	424
1761	jun-16	452
1782	jul-16	473
1817	ago-16	508
1908	nov-16	599
2013	mar-17	704
2139	jul-17	830
2149	ago-17	858
2151	set-17	860

4.2.3 Composição gravimétrica e volumétrica dos RSU

Para determinar a composição gravimétrica e volumétrica dos RSU, a metodologia seguiu a Réseau Européen de Mesures pour la Caractérisation des Ordures Ménagères (REMECOM), descrita no Caderno Técnico Lipor (2000) para a triagem de resíduos.

Inicialmente, os resíduos coletados foram homogeneizados e quarteados, em seguida, retirou-se 160 kg da pilha resultante do quarteamento dos RSU. Posteriormente, os resíduos foram pesados e separados em frações de plásticos, metal, vidro, papel e papelão, matéria orgânica, compósitos (madeira, ossos, caixas de leite, entre outros) e têxteis sanitários (papel higiênico, absorventes, fraldas descartáveis). Para determinar o percentual de cada componente presente nos resíduos sólidos foi utilizada a Equação 1.

$$CG = \frac{P_{FS}}{P_T}$$

Equação 1

Onde:

CG = Composição gravimétrica (%);

Para exprimir a CG em %, a relação entre os pesos deve ser multiplicada por 100.

P_{FS} = Peso de cada fração segregada (kg);

P_T = Peso total dos resíduos sólidos a serem segregados (kg).

Para a composição volumétrica foram realizadas leituras de volume do mesmo material utilizado na composição gravimétrica. A compactação dos resíduos foi realizada com um soquete manual, confeccionado pelo Grupo de Geotecnia Ambiental (GGA), medindo 0,503 m² de área, 0,075 m³ de volume e peso de 26 kg. Após a compactação dos RSU, foram medidos a altura e o diâmetro, obtendo-se o volume destes resíduos. Os procedimentos realizados para a composição gravimétrica e volumétrica estão ilustrados na Figura 10.



4.3 Monitoramento da Célula experimental

As amostras de RSU foram extraídas da Célula experimental (Figura 9) em diferentes profundidades (2,70; 2,0; 1,35 e 0,7 m). O procedimento de coleta seguiu

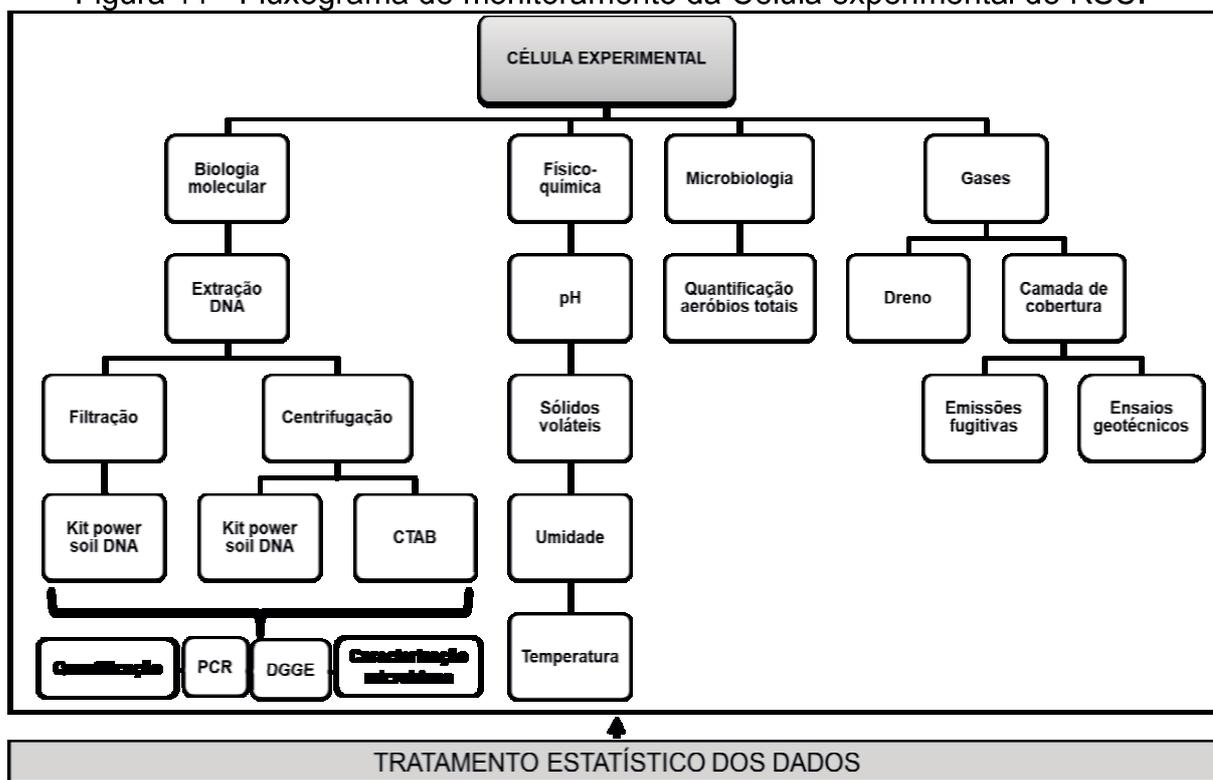
a NBR 10007 (ABNT, 2004) - Amostragem de Resíduos, tendo sido retirados, aproximadamente, 0,5 kg de RSU de cada nível, com o auxílio de um amostrador com formato helicoidal.

As amostras coletadas nos diferentes níveis da Célula foram picotadas e imersas em 1000 mL de água destilada, por 30 minutos, para obtenção do extrato líquido, procedimento recomendado pela NBR 10006 (ABNT, 2004). Do extrato de lixiviado obtido por meio de amostras sólidas dos RSU foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas mensais, em seguida, os remanescentes das amostras foram etiquetados e refrigerados a 4 °C no Laboratório de Geotecnia Ambiental (LGA) da UFCG.

Posteriormente, as amostras refrigeradas foram caracterizadas por meio da biologia molecular em duas etapas. A primeira foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Milho e Sorgo - Núcleo de Biologia Aplicada (Sete Lagoas-MG) para caracterização bacteriana. E a segunda etapa foi realizada no Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) da UFCG-Campus Cuité, para caracterização das arqueas metanogênicas.

Na Figura 11 apresenta-se o fluxograma com os procedimentos que foram realizados para o monitoramento da Célula experimental de RSU.

Figura 11 - Fluxograma de monitoramento da Célula experimental de RSU.



4.3.1 Extração de DNA - Kit

Inicialmente, duas metodologias foram testadas na preparação das amostras para extração de DNA, com o objetivo de verificar qual técnica potencializaria a ruptura das células, evitando perdas e, que apresentaria maior rendimento e pureza de ácidos nucleicos.

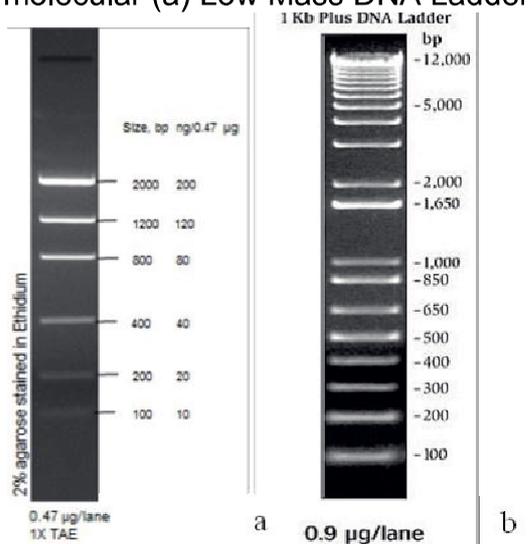
O procedimento de filtração (Lab1000, modelo LM-300) consistiu em separar 200 mL do extrato de lixiviado e dividir em duas alíquotas de 100 mL cada. Para cada alíquota foram realizadas três pré-filtragens, uma com filtro médio (Whatman Schleicher & Schuell, US) e duas com membrana de 0,45 µm de porosidade (Whatman Schleicher & Schuell, US), ambas a fim de remover os sólidos em suspensão. A extração do DNA foi realizada a partir do material depositado no filtro de 0,45 µm de porosidade resultante das duas últimas filtrações.

O procedimento de centrifugação (Quimis, modelo Q222TM104) consistiu em transferir 45 mL do extrato de lixiviado para tubos cônicos estéreis, tipo falcon, sendo coletados 15 mL das amostras dos diferentes níveis da Célula experimental (superior, intermediário e inferior). A centrifuga foi programada para 4000 g, por 30 minutos a 20 °C, para separação da fração líquida. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o material centrifugado foi conduzido à balança analítica para pesagem de 0,5 g da fração sedimentada.

Para extração foi escolhido o Kit Power Soil DNA Isolation (MOBIO Laboratories), por ser bastante utilizado em estudos de comunidades ou grupos específicos, em lixiviados, reatores anaeróbios, solos para aterros de RSU, agrossistemas cafeeiros e de cana-de-açúcar (SCARAMAL et al., 2005; BIANCO et al., 2015). O procedimento de extração direta é simples, rápido e permite analisar um número de amostras sem perder a reprodutibilidade; o protocolo seguiu as recomendações do fabricante que acompanha o kit.

Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, a 100 Volts, por 30 minutos. Os marcadores utilizados (Figura 12), para estimar o peso molecular dos fragmentos de DNA lineares de cadeia dupla, na corrida em gel de agarose foram o Low Mass DNA Ladder e o 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Para visualização do material aplicado no gel de agarose, foi utilizado um transiluminador, modelo L-Pix (Loccus Biotecnologia).

Figura 12 - Marcador molecular (a) Low Mass DNA Ladder; (b) 1 Kb DNA Ladder.



Fonte: Instruction Manual (2013).

4.3.2 Extração de DNA – CTAB

O método Dellaporta et al. (1983) ou CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) é comumente utilizado para extração de DNA em diferentes espécies vegetais, sendo modificado para extração de DNA das amostras de RSU.

O protocolo baseado no detergente CTAB, normalmente, fornece DNA íntegro para ampliações por PCR e mostrou-se eficiente por realizar a extração de várias amostras, apresentando elevado rendimento de DNA. Esse método foi escolhido como uma alternativa, visto que, o Kit Power Soil DNA Isolation (MOBIO Laboratories) permite poucas extrações, tem elevado custo e fornece menor quantidade de DNA total ao final do procedimento de extração, limitando o número de alíquotas e estocagem em longo prazo.

O procedimento de extração do DNA consistiu em: a) inserir nas amostras de RSU 3 mL de tampão CTAB, que contém em sua composição: brometo de cetiltrimetilamônio, NaCl, Tris-HCl com pH 8,0, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) com pH 8,0, polivinilpirrolidona (PVP) e água destilada; adicionar 2 µL de β-mercaptoetanol e 5 µL de proteinase K. b) colocar as amostras com CTAB, em banho-maria a 65 °C, por 5 minutos. c) retirar do banho-maria e conduzir as amostras para a câmara incubadora com agitação orbital (*Shaker*) a 37 °C, por 10 minutos a 100 g. d) ao retirar do *Shaker*, as amostras foram novamente para o banho-maria a 65 °C, por 5 minutos. e) transferir em duplicata 700 µL das amostras para os tubos eppendorfs de 2 mL, previamente identificados. f) adicionar 700 µL de

solução de clorofórmio e de álcool isoamílico (Clorofil) e homogeneizar a amostra no agitador tipo vortex. g) centrifugar a 12000 *g*, por 20 minutos, em temperatura ambiente para separar a fase orgânica e a fase aquosa. h) remover a fase aquosa (superior) para um novo microtubo tipo eppendorf de 1,5 mL, identificado. i) após a remoção final do sobrenadante, adicionar 800 μ L de isopropanol (gelado). j) armazenar a -20 °C, por no mínimo 120 minutos (para evitar a precipitação de polissacarídeos). k) retirar a amostra refrigerada e novamente centrifugar a 12000 *g*, por 20 minutos em temperatura ambiente. l) descartar o sobrenadante. m) adicionar ao *pellet* 500 μ L de etanol a 70% (gelado). n) centrifugar a 12000 *g*, por 5 minutos a 20 °C. o) descartar o sobrenadante e secar o *pellet* por 60 minutos ou inserir na estufa de esterilização a 65 °C, por 3 minutos. p) ressuspender o *pellet* em 100 μ L de água ultrapura (Milli-Q). q) incubar a -20 °C.

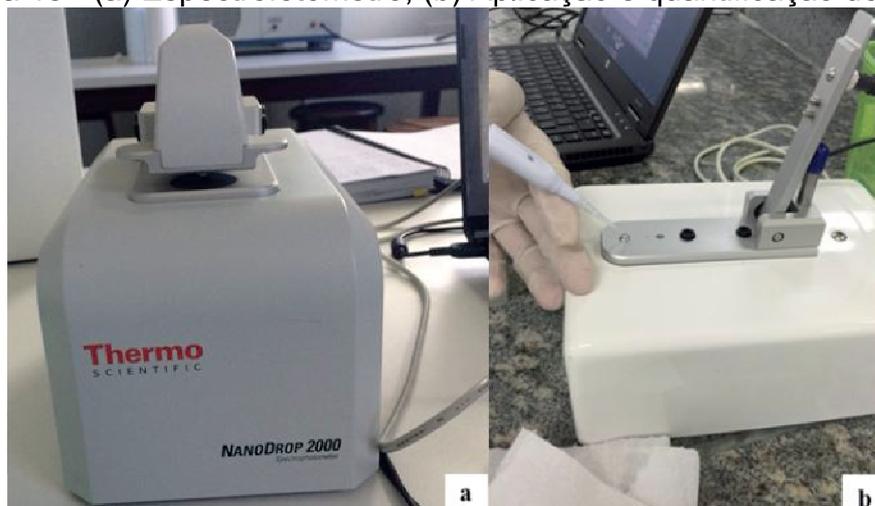
Posteriormente, o DNA extraído pode ser quantificado e analisado quanto à sua qualidade. Para esse fim, um gel de agarose na concentração 0,8% foi preparado com a adição de 5 μ L de brometo de etídio. Em seguida, 5 μ L de DNA extraído e 1 μ L de TA (Tampão de Amostra) foram inseridos no poço do gel de agarose. A fonte utilizada para corrida eletroforética foi programada para uma tensão elétrica de 100 V, uma corrente elétrica de 500 mA, potência de 100 W, por 30 minutos. O marcador utilizado foi o Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). Finalmente, o material aplicado no gel de agarose após a eletroforese foi visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado por meio de um transiluminador, modelo L-Pix (Loccus Biotecnologia).

4.3.3 Quantificação de DNA nas amostras de RSU

As amostras de DNA foram avaliadas quanto à concentração e pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, visto que, o DNA absorve luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas absorvem 280 nm. As quantidades de DNA e de proteína foram avaliadas para estimar a qualidade do DNA extraído pela relação $A_{260/280}$.

A quantificação de todas as amostras de RSU que tiveram o DNA extraído pelos métodos CTAB e Kit, foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc). Esse equipamento possibilita, de forma muito rápida, mensurar as concentrações e a pureza das amostras com apenas 1 μ L de DNA (Figura 13).

Figura 13 - (a) Espectrofotômetro; (b) Aplicação e quantificação do DNA.



4.3.4 PCR com primers universais – Domínio *Bacteria*

Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas à amplificação dos genes que codificam a região 16S do RNA ribossomal de bactérias, com primers universais (Tabela 5). Na PCR foram utilizadas alíquotas específicas nos microtubos tipo eppendorf, que continham um mix de solução tampão de PCR, DNA das amostras de RSU, água ultrapura (Milli-q), desoxirribonucleotídeoestrifosfatos (dNTPs), $MgCl_2$, DMSO 20%, Taq-DNA polimerase, primer forward e reverse. O kit utilizado para o preparo do mix foi KAPA Taq PCR (Kapa biosystems).

Tabela 5 – Sequências de primers universais utilizados para o domínio *Bacteria*.

	Primer	PCR	Sequências nucleotídicas
Bactéria	27F	1ª PCR	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1492R	1ª PCR	TACCTTGTAGACT
	341F	2ª PCR	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
	534R	2ª PCR	ATTACCGCGGCTGCTGG

Os primers universais utilizados na PCR foram 27F forward e 1492R reverse. Em seguida, foi realizada a Nested PCR, que se baseia em amplificar, em uma segunda etapa, uma sequência mais específica da região do DNA, que foi originalmente amplificada na primeira PCR. Para a segunda amplificação foi utilizado o par de primers 341F forward e 534R reverse para bactérias.

As amplificações foram realizadas no termociclador (Applied Biosystems Thermal Cyclers). As condições térmicas que ofereceram melhores resultados de

amplificação foram: 2 minutos a 95 °C (desnaturação inicial), 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a 55 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão) e, finalmente, 5 minutos a 72 °C (extensão final).

Posteriormente, a eletroforese foi realizada em gel de agarose, na concentração de 1%, contendo 5 µL de brometo de etídio. Foram inoculados em cada poço 1 µL de TA (Tampão de Amostra) e 15 µL da PCR. A fonte utilizada para corrida eletroforética foi programada para uma tensão elétrica de 80 V, uma corrente elétrica de 500 mA, potência de 100 W, por 90 minutos. O marcador utilizado foi o Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). Finalmente, o material aplicado no gel de agarose, após a eletroforese foi visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado por meio de um transiluminador, modelo L-Pix (Loccus Biotecnologia).

4.3.5 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os produtos de PCR obtidos a partir das amostras de RSU foram submetidos à DGGE. A solução do gel foi feita segundo protocolo de Muyzer et al. (1993) e a corrida eletroforética ao longo do gel se processou a 60 °C e 80 V, em cerca de 7 L de tampão TAE 0,5 X, durante 17 horas. Ao final da eletroforese, o gel foi corado por 20 minutos, em solução contendo 60 µL de gel red concentrado, 200 µL de água deionizada, 4 µL de NaCl 5 M e visualizado sob luz ultravioleta. As imagens do gel foram documentadas usando um sistema de captura digital de imagem Launch Doc ITLS – UVP, versão 5.0.

As bandas de interesse foram excisadas e introduzidas em tubos do tipo eppendorf, contendo 50 µL de água ultrapura estéril, que foram agitados em microdesmembrador a 4800 g, durante 3 minutos e armazenados a 4 °C (*overnight*). Após este período, os tubos foram centrifugados a 2800 g, por 3 minutos e o sobrenadante contendo os fragmentos de DNA foi coletado e armazenado em microtubos a -20 °C.

4.3.6 Preparação das amostras para sequenciamento - Domínio *Bacteria*

As bandas purificadas dos géis de DGGE foram reamplificadas com os mesmos pares de primers forward e reverse universais (Tabela 5). O programa de ciclos de PCR adotado foi: 2 minutos a 95 °C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a 55 °C (anelamento); 1 minuto e 30

segundos a 72 °C (extensão) e 5 minutos a 72° (extensão final). Cerca de 90 µL de produtos de PCR de cada banda extraída foram purificados utilizando o kit Wizard DNA Clean-Up System (Qiagen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Os produtos de PCR, uma vez purificados e quantificados, foram sequenciados no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG. A caracterização microbiana foi realizada por comparação das sequências publicadas no banco de dados Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) nucleotide (n), considerando a identidade acima de 98%.

4.3.7 PCR com primers específicos – Domínio *Archaea*

A sintetização de primers específicos para arqueas foi definida a fim de obter informações detalhadas das populações presentes nos RSU aterrados. A escolha dos primers foi realizada de acordo com Skillman et al. (2004), Armougom et al. (2009), Kim et al. (2014), Sawayama et al. (2005) e Yu et al. (2005).

Os primers, o grupo alvo, as sequências nucleotídicas forward e reverse, o número de pares de base esperados e a temperatura de anelamento de cada primer estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Primers específicos utilizados nas PCRs do domínio *Archaea*.

№	Grupo Alvo	P Forward	Sequência F	P Reverse	Sequência R	Pares de base (pb)	Temperatura de anelamento
F1	Gênero <i>Methanobrevibacter</i>	Mbb1	CTCCGCAATGTGAGAAATCG	Arch r1386	GCGGTGTGTGCAAGGAGC	322	54 °C
F2	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	M. smithii F	COGGGTATCTAATCCGGTTC	M. smithii R	CTCCAGGGTAGAGGTGAAA	123	54,6 °C
F3	Ordem <i>Methanobacteriales</i>	Mbac 1331	GAGATGGAACCTGAGACAAG	Arch r1386	GCGGTGTGTGCAAGGAGC	216	52,4 °C
F4	<i>Methanosaeta</i> spp.	Methanosaeta F	TAGCAAGGGCCGGGCAACA	Methanosaeta R	ATCCCGGAGGACTGACCAAA	140	55,2 °C
F5	<i>Methanosaeta</i> spp.	Methanosaeta F	GATAAGGGRAYCTCGAGTGCY	Methanosaeta R	GGCCGRCTACAGACCCT	187	50,6 °C
F6	Família <i>Methanosaetaceae</i>	Msc380F	GAAACCGYGTATAGGGGA	Msc328R	TAGCGARCATCGTTTACG	408	49 °C

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia (LBIotec) da UFCG – Campus Cuité. Cada PCR continha volumes de 20 µL, sendo 2 µL de DNA, 2 µL de tampão, 0,6 µL MgCl₂, 0,16 µL de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 1 µL de cada primer (forward e reverse) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

As amplificações foram realizadas no termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti 96). As condições térmicas que ofereceram melhores resultados de amplificação foram: 2 minutos a 95 °C (desnaturação inicial), 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos anelamento (temperatura em °C estabelecida no Quadro 3 para cada par de primer), 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão) e 5 minutos a 72 °C (extensão final).

4.3.8 Preparação das amostras para sequenciamento - Domínio *Archaea*

Após a PCR com os primers específicos do domínio *Archaea*, foi realizada uma reamplificação (Re-PCR) em volumes de 50 µL que continham, 2,5 µL da primeira PCR, 5 µL de tampão, 1,5 µL MgCl₂, 0,4 µL de DNTPs, 2,5 µL de cada primer específico (forward e reverse), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 35,3 µL de água ultrapura (Milli-Q).

O programa de ciclos da Re-PCR adotado foi: 2 minutos a 95 °C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos para o anelamento (temperatura em °C estabelecida no Quadro 3 para cada par de primer), 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão) e 5 minutos a 72° (extensão final). Posteriormente, a eletroforese em gel de agarose foi realizada na concentração de 1%, contendo 5 µL de brometo de etídio.

Foram inoculados em cada poço 4 µL de TA e 50 µL da Re-PCR. A fonte utilizada para corrida eletroforética foi programada para uma tensão elétrica de 80 V, uma corrente elétrica de 500 mA, potência de 100 W, por 80 minutos. O marcador utilizado foi o Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). Finalmente, o material aplicado no gel de agarose, após a eletroforese, foi visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado por meio de um transiluminador, modelo L-Pix (Loccus Biotecnologia).

As bandas visíveis no gel de agarose, resultantes da Re-PCR, foram excisadas e eluídas para purificação, de acordo com as recomendações do Gel Purification Kit (Ludwig Biotecnologia Ltda). Os produtos da Re-PCR, uma vez purificados e quantificados, foram enviados para sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP).

O método de Sanger, utilizado nesta pesquisa, é um procedimento tradicional de sequenciamento, que foi realizado por um sistema de análise de DNA de 48

capilares, denominado ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies-Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). As corridas foram realizadas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. Em seguida, as sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando a Base Caller KB. Cabe destacar que, as reações de sequenciamento por esse método alcançam em média 600 a 650 bases.

Finalmente, as sequências forward e reverse recebidas foram alinhadas usando o programa ClustalW. A caracterização microbiana foi realizada por comparação das sequências de DNA publicadas no banco de dados (BLASTn, GenBank), considerando como ponto de corte a identidade de 99%.

4.3.9 Indicadores físico-químicos e microbiológicos

As amostras de RSU coletadas nos diferentes níveis da Célula experimental (superior, intermediário e inferior) foram monitoradas com frequência mensal no Laboratório de Geotecnia Ambiental (LGA). No Quadro 4, estão descritas as metodologias que foram utilizadas para realização das análises físico-químicas e microbiológicas.

Quadro 4 - Metodologia das análises físico-químicas e microbiológicas.

Indicador	Variáveis	Unidade	Método	Referência
Físico-químico	pH	-	Potenciométrico	APHA/AWWA/WEF, 2012; SILVA; OLIVEIRA, 2001
	Sólidos voláteis e Umidade	(%)	Gravimétrico - Ignição e secagem a 500 ± 50 °C	WHO (1979)
	Temperatura	°C	Termopar tipo K com leitura direta em termômetro digital portátil	Instruções do fabricante, modelo MT-600, faixa de medição -100 a 1300 °C
Microbiológico	Quantificação de bactérias aeróbias totais	UFC/mL	<i>Spread-Plate</i>	APHA/AWWA/WEF, 2012; CETESB, 2004

4.3.10 Monitoramento do biogás

O monitoramento do biogás na Célula experimental foi realizado *in situ* com um detector automático de gases com infravermelho, denominado Dräger, modelo X-am 7000. Este equipamento é dotado de uma pequena bomba que faz a sucção do gás e direciona o fluxo para os sensores de leitura (Figura 14).

Figura 14 - (a) Monitoramento das concentrações de biogás; (b) Dräger X-am 7000.



O Dräger permite realizar leituras das concentrações dos gases (CH_4 , CO_2 , O_2 , H_2S e CO), cujas características estão apresentadas na Tabela 6. As concentrações de biogás foram obtidas após a estabilização das leituras do equipamento, que duram em média 5 minutos, tornando as análises viáveis pela praticidade, rapidez e pela margem de erro que é de $\pm 5\%$, sendo possível ainda realizar várias análises por dia e diversos gases ao mesmo tempo (AIRES et al., 2016).

Destaca-se que é considerado na leitura das concentrações o maior valor obtido pelo equipamento para os gases CH_4 , CO_2 , H_2S e CO . Entretanto, a faixa de medição para o oxigênio é de 0 – 25% e ao contrário dos outros gases, considera-se o percentual mínimo detectado.

Tabela 6 - Característica do equipamento de medição das concentrações do biogás.

Equipamento	Gases	Faixa de medição
Dräger X-am 7000	CO_2	0 – 100%
	CH_4	0 – 100%
	O_2	0 – 25 %
	H_2S	0 – 100 ppm
	CO	0 – 200 ppm

Fonte: Aires (2013).

4.3.10.1 Ensaios na camada de cobertura de solo compactado

Para camada de cobertura da Célula experimental, foi escolhido um solo com características de baixa permeabilidade para evitar fluxos excessivos de gases. O solo foi retirado de uma jazida localizada em Boa Vista-PB, município ao oeste de Campina Grande-PB e, em seguida, as amostras foram conduzidas ao LGA da UFCG para a realização de ensaios geotécnicos normativos.

Inicialmente, foi efetuada a preparação da amostra, que incluiu as etapas de secagem prévia ao ar, destorroamento, quarteamento, peneiramento e pesagem do solo, para posteriores ensaios de caracterização. No Quadro 5 estão apresentados os ensaios de caracterização do solo, como também os ensaios de compactação e permeabilidade convencionais realizados.

Quadro 5 - Ensaios geotécnicos para caracterização do solo.

Ensaio	Norma
Preparação das amostras determinação do teor de umidade com secagem em estufa	NBR 6457/16 – Amostras de Solo – Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização.
Determinação da massa específica dos grãos	NBR 6458/16 – Grãos de solos que passam na peneira de 4,8 mm – Determinação da massa específica.
Ensaio de compactação	NBR 7182/16 – Solo – Ensaio de compactação.
Permeabilidade à carga variável	NBR14545/00 - Solo - Determinação do coeficiente de permeabilidade de solos argilosos a carga variável.

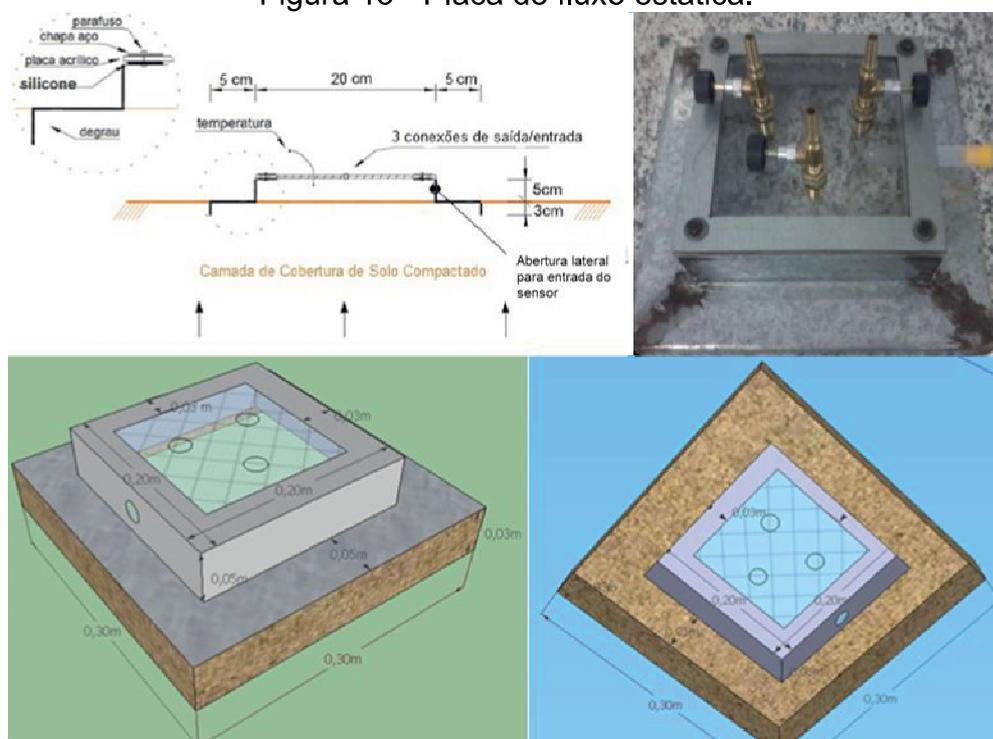
A medição de gases na camada de cobertura da Célula experimental foi realizada pelo método de placa de fluxo, que consiste em avaliar a concentração de gases em função do tempo em caixas fechadas (estáticas) cravadas no solo.

As placas de fluxo garantem uma precisa determinação das emissões pontuais, além de apresentarem baixo custo, simples instalação e avaliação simultânea de diversos gases. Após certo intervalo de tempo, a pressão, temperatura e concentração dos gases no interior da placa aumentam e o fluxo tende a decrescer até a estabilização em valores próximos a zero (MACIEL, 2009).

A placa de fluxo foi construída em aço galvanizado, com espessura de 2 mm e, no topo foi instalada uma placa de acrílico com espessura de 8 mm. A placa confeccionada apresenta dimensões de 0,20 x 0,20 m, área útil de 0,04 m² e volume útil de 0,002 m³ (Figura 15). Possui ainda, três saídas para acoplar os equipamentos

de medição de concentração e pressão dos gases, além de uma abertura lateral para a medição da umidade e temperatura.

Figura 15 - Placa de fluxo estática.



Fonte: Autor (2015).

O formato da placa em degrau foi determinado para facilitar a cravação no solo e evitar a entrada de ar atmosférico. A instalação da placa seguiu os procedimentos ilustrados na Figura 16, os quais foram baseados em Maciel (2009).

Os instrumentos utilizados para realização do ensaio foram: detector portátil de gases com infravermelho Dräger X-am 7000 (concentração de CO_2 , CH_4 , O_2), termoanemômetro digital portátil modelo TAD-500 (velocidade do ar e temperatura ambiente) e manômetro digital portátil modelo 477-2 (pressão dos gases).

Figura 16 - Instalação da placa de fluxo na Célula experimental.



Demarcação da placa no local do ensaio

Cravação e nivelamento da placa

Instalação dos equipamentos

Fonte: Autor (2015).

4.4 Tratamento dos dados e estatística

As imagens digitalizadas dos géis de DGGE foram analisadas com auxílio do pacote de programas Bionumerics 7.0 (Applied Maths, BE). A partir do perfil de bandas apresentado nos géis, uma matriz de similaridade foi calculada e com o método de classificação hierárquico foram gerados os dendrogramas.

As sequências forward e reverse, obtidas após o sequenciamento de bactérias e arqueas, foram alinhadas nos dois sentidos, com o auxílio do programa ClustalW. As sequências "consenso" de ambos os fragmentos amplificados foram comparadas no banco de dados 16S RNAr (*Bacteria* e *Archaea*) do GenBank. Para a identificação de escores, identidades e homologia foi utilizado o programa "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) nucleotide (n) do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), disponível no endereço <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Os indicadores físico-químicos e microbiológicos monitorados foram tabulados e submetidos à estatística descritiva, visando auxiliar a análise do comportamento dos dados. Os indicadores descritivos avaliados foram máximo, mínimo, média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Em seguida, foi gerada uma matriz de correlação de Pearson com as variáveis envolvidas no processo: temperatura interna e ambiente, CO₂, CH₄, O₂, CO, H₂S, pH, umidade, sólidos voláteis, tempo e quantificação de aeróbios totais, verificando o nível de correlação entre duas ou mais variáveis. Para o processamento dos dados foi utilizado o Microsoft Excel 2010.

Posteriormente, foi realizada a análise de componentes principais (ACP ou PCA - Principal Component Analysis) que é uma técnica de análise multivariada, usada para inter-relações entre um grande número de variáveis, como é o caso desse estudo. O software utilizado para realização da ACP foi Past 3.

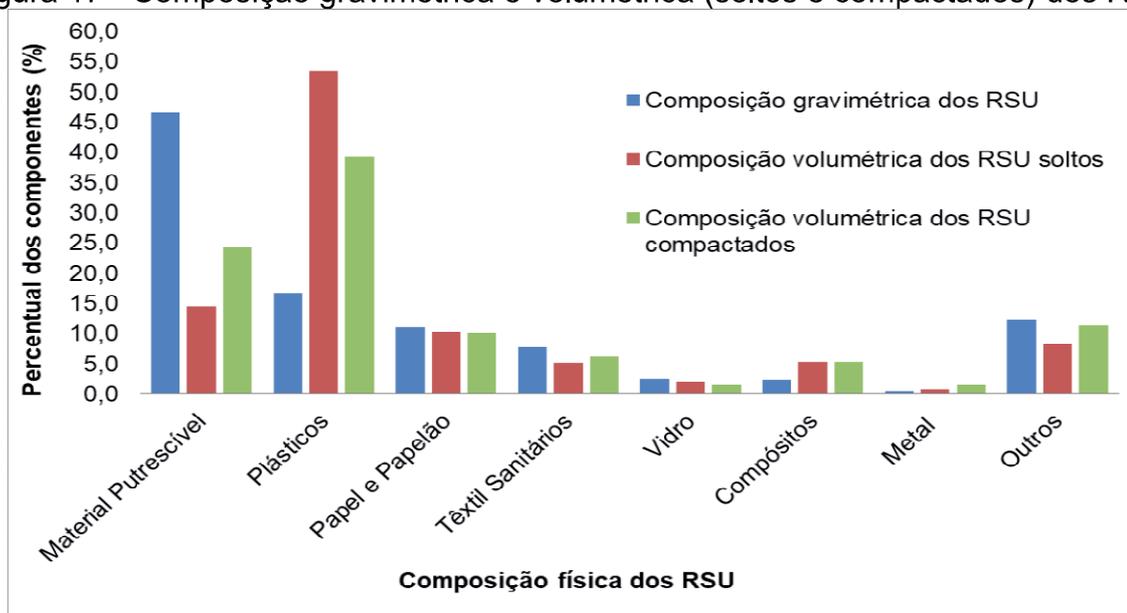
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Composição gravimétrica e volumétrica dos RSU

As composições gravimétrica e volumétrica dos RSU soltos e compactados estão representadas em percentuais na Figura 17. A composição gravimétrica dos RSU produzidos em Campina Grande-PB, mostrou que 46,5% é referente a matéria orgânica putrescível, representada pelos restos de alimentos, cascas, restos de frutas e legumes. Na biodegradação anaeróbia estes materiais são convertidos em líquidos e gases.

Entre os componentes potencialmente recicláveis dos RSU, o plástico aparece com maior valor percentual (16,7%), seguido pelo papel e papelão (11,1%), vidro (2,5%) e metal (0,6%). Vale ressaltar que, esses materiais quando dispostos em excesso nos aterros sanitários podem dificultar os processos biodegradativos e, conseqüentemente, a produção de biogás. A caracterização física dos RSU revelou ainda, percentuais de 2,4% para os compósitos, 7,8% para os têxteis sanitários e 12,4% para os outros resíduos que não foram classificados como madeira, tecido, couro e borracha.

Figura 17 - Composição gravimétrica e volumétrica (soltos e compactados) dos RSU.



Na Figura 17 as três maiores categorias, por ordem percentual em peso são matéria orgânica, plásticos, papel e papelão que correspondem, conjuntamente, a 74,3% do peso total dos resíduos preenchidos na Célula experimental. O percentual

de matéria orgânica de 46,5% ficou abaixo da média nacional, que é de 50 a 55%, conforme pesquisas realizadas pelo Ministério do Meio Ambiente (2012) e Colmanetti et al. (2000). Os RSU no Brasil possuem elevadas taxas de detritos orgânicos, sendo caracterizados, portanto, como resíduos que produzem grande quantidade de lixiviado e biogás.

A porcentagem de matéria orgânica encontrada no Brasil é maior do que em muitos países (MUNNICH et al., 2006). Zeng et al. (2005), encontraram porcentagens de matéria orgânica variando entre 18 e 29% no aterro sanitário da cidade de Columbia, EUA. Sarakikya; Kiplagat (2015) identificaram 37% de matéria orgânica na cidade de Arusha, Tanzania. Magrinho et al. (2006) obtiveram em Portugal 35% de matéria orgânica na composição física dos RSU.

A Figura 17, expressa ainda os percentuais volumétricos dos resíduos sólidos soltos e compactados. Foi observado que a quantidade de matéria orgânica aumentou após a compactação de 14,5 para 24,4%, devido à redução de volume da maioria dos componentes dos RSU.

A quantidade de plásticos apresentou a maior variação em termos volumétricos e representou 16,7% em peso dos resíduos, que ocuparam 53,5% do volume após a compactação. A diferença desses valores mostra a ausência de programas de gestão integrada dos resíduos sólidos no município de Campina Grande-PB, uma vez que, apresentaram índices volumétricos dos resíduos compactados e soltos elevados de 39,2 e 53,5%, respectivamente.

Embora os plásticos sejam materiais leves, em grandes quantidades ocupam um volume considerável, podendo interferir nos processos de compactação dos resíduos sólidos em aterros sanitários, reduzindo a área disponível e diminuindo a vida útil. Ao serem dispostos no solo e aterrados, os plásticos também podem prejudicar a decomposição dos materiais putrescíveis, porque podem criar camadas impermeáveis que afetam as trocas de líquidos e gases produzidos no processo de biodegradação da matéria orgânica,

A quantidade de plásticos em termos volumétricos demonstra o potencial para o processo de reciclagem desses materiais. Logo, a triagem dos plásticos é de extrema importância e deve ser valorizada para que as condições do aterro sanitário sejam melhoradas.

De acordo com Silva et al. (2011), os plásticos possuem um elevado poder calorífico e, por isso são considerados como um componente importante no processo biodegradativo, favorecendo a produção de biogás e seu consequente

aproveitamento energético. Os demais componentes que foram caracterizados, tiveram percentuais menores, tanto em relação ao peso quanto ao volume.

Estudos de composição gravimétrica dos RSU realizados no município de Campina Grande-PB, em anos anteriores ao desta pesquisa, demonstraram a presença de diferentes percentuais dos componentes físicos, conforme apresentado na Tabela 7.

Leite (2008), Alves (2012), Aires (2013) e a Empresa de Consultoria em Saneamento Ambiental-ECOSAM (2014) relataram valores de aproximadamente 70%, 66%, 47% e 42% de matéria orgânica putrescível, respectivamente. A diferenciação percentual na caracterização gravimétrica, entre os anos de 2008 e 2014, pode estar associada aos hábitos de alimentação da população e ao aumento no consumo de produtos industrializados, que possuem grandes volumes de embalagens plásticas, justificando a redução nos teores de matéria orgânica.

Tabela 7 – Comparação da composição gravimétrica dos RSU de Campina Grande-PB no período de 2008 a 2015.

Componentes	Ano da caracterização gravimétrica dos RSU				
	2008 ^(a)	2012 ^(b)	2013 ^(c)	2014 ^(d)	2015
Matéria orgânica	70%	66%	47%	42%	47%
Plástico	11%	11%	23%	22,25%	17%
Papel e papelão	6%	5%	9%	11,89%	11%
Vidro	1%	4%	2%	2,24%	2%
Metal	1%	3%	2%	2,88%	1%
Têxteis sanitários	7%	4%	6%	8,69%	8%
Compósitos	1%	1%	3%	-	2%
Outros	3%	6%	8%	7,28%	12%
TOTAL	100%	100%	100%	100%	100%

Fontes: (a) Leite (2008); (b) Alves (2012); (c) Aires (2013); (d) ECOSAM (2014).

Os materiais passíveis de serem reciclados ou reutilizados, como plásticos, papelão, papel, vidro e metais, apresentaram percentuais diferentes ao longo dos anos das pesquisas. Nota-se que, a quantidade de plástico aumentou, significativamente, sendo observado um percentual de 11% no estudo realizado em 2008 e de 23% no realizado em 2013, estando próximo ao obtido pela ECOSAM com 22,25%, em 2014.

O aumento no percentual desse material refere-se, principalmente, ao descarte significativo de sacolas plásticas utilizadas no acondicionamento de resíduos nas residências e pontos comerciais. Estes plásticos não são materiais facilmente degradáveis e o percentual elevado nos RSU remete à necessidade de

tratamento adequado, que pode ser por meio de processos de reciclagem ou com a substituição desse material por embalagens de fácil degradação.

Em relação ao papel e papelão foram observadas variações consideráveis. De 2008 a 2015 a porcentagem desse material foi de 6% a 11%, contudo, o valor de 2015 está próximo ao da média nacional de 13% (CARVALHO et al., 2010).

Outros componentes recicláveis que não deveriam ser aterrados, segundo a Lei 12.305/2010, como metais e vidros podem ser responsáveis por retardar a biodegradação e a produção de biogás. Entretanto, os resultados apresentados na Tabela 7 mostraram baixos percentuais desses materiais. Cabe destacar que, alumínio, papel, plástico e vidro, são os quatro setores industriais que abrigam as principais atividades de reciclagem pós-consumo no país (ABRELPE, 2016).

A ECOSAM determinou a composição gravimétrica dos RSU da cidade de Campina Grande-PB, para elaboração do Plano Municipal de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos (PMGIRS CG, 2014) apresentando dados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa. Em que foram relatados maiores percentuais de matéria orgânica (42,8%), seguidos de plásticos (22,2%) e papel/papelão (11,9%). Tais resultados validam a metodologia de amostragem utilizada neste estudo, para a caracterização dos RSU de Campina Grande – PB, visto que, semelhanças foram observadas em outros estudos de composição gravimétrica, realizados no município com uso de outras metodologias.

A caracterização física dos RSU de Campina Grande-PB, mostrou-se similar à encontrada em estudos de composição gravimétrica de resíduos sólidos no Brasil, sendo matéria orgânica e plásticos, os principais resíduos gerados com percentuais de 51,4% e 27%, respectivamente (MMA, 2012).

Com os dados das composições gravimétrica e volumétrica dos RSU e a determinação das concentrações de biogás, a partir da degradação de cada tipo de material, é possível estimar quantitativamente a produção de biogás, pois cada componente dos resíduos sólidos urbanos contribui de forma diferenciada na geração desse subproduto.

Os resultados da composição física dos resíduos de Campina Grande-PB, apresentaram altos percentuais de material putrescível e sugerem a viabilidade, do ponto de vista de tratamento dos resíduos, por meio de tecnologias como a compostagem e o aproveitamento energético do biogás. Porém, o município, atualmente, não dispõe de coleta seletiva, o que dificulta que ações de tratamento desses resíduos sejam colocadas em prática, sugerindo que na massa de RSU

aterrada haja uma maior diversidade de microrganismos, devido à heterogeneidade encontrada.

5.2 Extração, quantificação, PCR, DGGE e sequenciamento - Domínio *Bacteria*

Na caracterização molecular uma das etapas principais é a extração de DNA, uma vez que, qualquer inconsistência nesse procedimento, compromete os passos subsequentes. Por outro lado, o êxito na extração de DNA depende de vários fatores como, a adequação do protocolo, o estado do material a ser extraído e, sobretudo, o manuseio dos utensílios de maneira adequada para evitar contaminações das amostras.

Durante os testes realizados pelo método de filtração com membranas de 0,45 μm foi observado que, na maioria das vezes, as membranas eram rompidas durante o processo de raspagem. Como a extração de DNA era realizada com material depositado no filtro, esse método de preparação das amostras tornou-se inviável, por haver muitas perdas durante o processo e baixo rendimento na quantificação do DNA extraído. Santos (2010) utilizando o mesmo procedimento obteve bons resultados, com a extração de DNA de bactérias presentes no lixiviado dos aterros sanitários de Gramacho-RJ, Gericinó-RJ, Morro do Céu-RJ, Nova Iguaçu-RJ e Muribeca-PE.

Diante dos testes, o processo de centrifugação foi escolhido, por ser realizado de forma mais rápida e por evitar perdas de ácidos nucleicos durante o processo, quando comparado à técnica de filtração.

Segundo Head et al. (1998), a principal limitação dos métodos moleculares é a quantidade de ácidos nucleicos recuperada das amostras ambientais, sendo difícil assegurar uma eficiente recuperação por qualquer técnica de extração. Há sempre perdas de DNA durante o processo e alguns microrganismos apresentam estrutura celular difícil de ser rompida (esporos, células gram-positivas, por exemplo). Para minimizar tais problemas é necessário utilizar métodos de extração de DNA eficientes para todos os tipos de células, bem como realizar várias extrações de uma mesma amostra, para garantir a homogeneidade do DNA extraído.

As amostras de DNA foram quantificadas e analisadas, quanto à concentração ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e pureza expressa pela razão $A_{260/280}$, por meio da análise da densidade óptica em espectrofotômetro. As amostras de DNA extraídas com o Kit

Power Soil DNA Isolation por filtração e centrifugação (Tabela 8), mostraram concentrações variando de 4,1 a 18 ng/ μ L, com média de 11,8 ng/ μ L.

As menores concentrações de DNA foram observadas em (2S) e (2I), indicando perdas de ácidos nucleicos na segunda filtração, enquanto que maiores quantidades de DNA foram obtidas pelo processo de centrifugação (I) 18 ng/ μ L e (S) 15,4 ng/ μ L.

Tabela 8 – Quantificação de DNA das amostras de RSU (Filtração e Centrifugação).

Amostras	DNA ng/ μ L	A _{260/280}
Superior (S)	15,4	1,93
Inferior (I)	18	1,77
1º filtro superior (1S)	13,6	2,02
1º filtro inferior (1I)	12,4	2,03
2º filtro superior (2S)	7,5	1,93
2º filtro inferior (2I)	4,1	2,22
Máximo	18	2,22
Mínimo	4,1	1,77
Média	11,8	2,0

Para Solléro et al. (2004) são consideradas concentrações ideais acima de 10 ng/ μ L após o processo de extração. As amostras (S) e (I) obtidas pela centrifugação e as resultantes da primeira filtração (1S) e (1I), apresentaram concentrações acima do valor recomendado. Entretanto, valores menores não comprometem a PCR, uma vez que, esse procedimento amplifica a quantidade de DNA.

A pureza expressa pela razão A_{260/280} indica o nível de contaminação nas amostras. Em DNAs livres de impurezas por proteínas, a relação A_{260/280} esperada como satisfatória deve estar entre 1,8 e 2,0 (SAMBROOK; RUSSEL, 2001; BRITO et al., 2004).

Na Tabela 8, as razões A_{260/280} oscilaram entre 1,7 e 2,2, com média de 2,0 para as extrações realizadas com o Kit. O valor médio obtido indica que as amostras ficaram dentro do valor considerado como ideal, porém, a amostra inferior (I) apresentou valor um pouco abaixo do recomendado. Por outro lado, (1S), (1I) e (2I), estavam acima do considerado como ideal. Vale ressaltar que, essas amostras também tiveram concentrações inferiores de DNA.

Na PCR realizada com os primers universais 27F e 1492R para bactérias, observou-se que as amostras de RSU foram caracterizadas por bandas menores

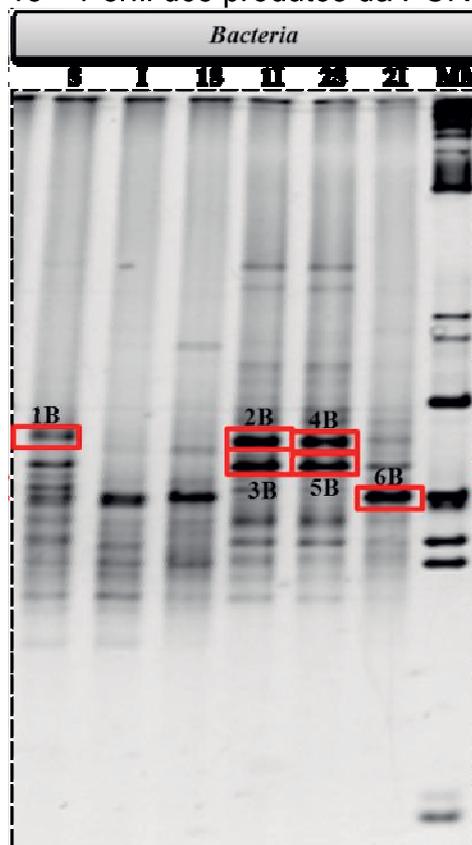
que 2000 pb e que algumas bandas visualizadas no gel de agarose a 1%, ficaram inespecíficas.

Algumas técnicas são usadas para diluir possíveis moléculas inibidoras presentes na amostra, melhorar a especificidade e aumentar a proporção de sequência alvo entre as etapas da reação. Visando todos esses benefícios e maiores concentrações do DNA amplificado, foi realizada uma reação de *Nested* PCR, com o conjunto de primers 341GC e 534R para bactérias universais.

Com essa técnica, pode-se verificar que as bandas do produto da PCR foram inferiores a 500 pares de bases. Ovreas et al. (1997) em estudos de diversidade microbiana em lixiviados provenientes de RSU, ao utilizar os mesmos pares de primers, também encontraram bandas menores que 500 pb.

Para verificar a diversidade microbiana optou-se, inicialmente, por ensaios de DGGE. A comunidade de bactérias presente nos RSU da Célula experimental derivados da PCR-DGGE está representada no perfil da Figura 18, em que foram selecionadas 6 bandas, destacadas e identificadas como 1B, 2B, 3B, 4B, 5B e 6B.

Figura 18 – Perfil dos produtos da PCR-DGGE.



Legenda: (MM) marcador molecular 1 kb, (S) nível superior, (I) nível inferior, (1S) 1º filtro nível superior, (1I) 1º filtro nível inferior, (2S) 2º filtro nível superior, (2I) 2º filtro nível inferior. Fonte: Autor (2016).

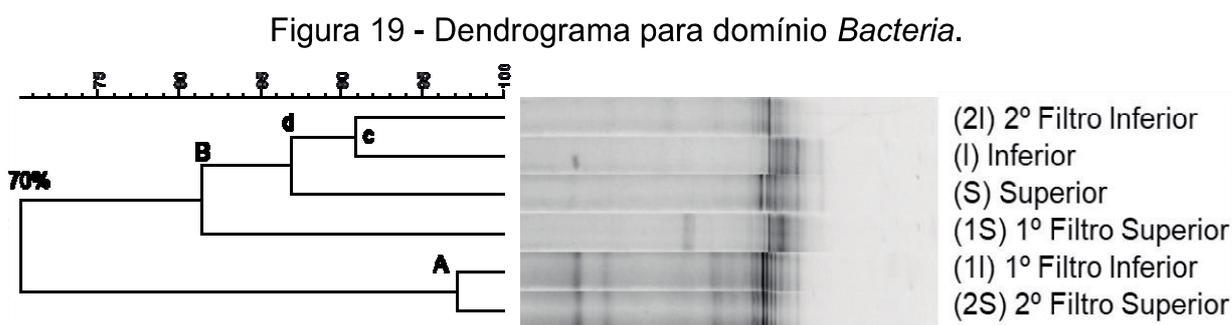
Normalmente, considera-se cada banda da DGGE, como sendo uma espécie microbiana. Porém, diversas bactérias podem apresentar diferentes mobilidades no gel com gradiente desnaturante, resultando em múltiplas bandas da mesma espécie microbiana (NUBEL et al., 1996; BOON et al., 2000). É importante ressaltar que a técnica de DGGE, quando realizada com iniciadores universais é capaz de detectar apenas as populações mais abundantes nas amostras.

De acordo com a Figura 18 diferenças pouco significativas, foram observadas entre os níveis da Célula experimental, sugerindo que os mesmos microrganismos estavam presentes nas amostras superior e inferior. Desta forma, dendrogramas foram elaborados, a partir das análises conclusivas da DGGE, com o objetivo de verificar a similaridade entre populações de bactérias nas amostras de RSU.

A similaridade foi determinada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel, considerando as semelhanças entre os padrões de bandas, tomadas em pares, que podem ser expressas em um valor percentual (DIEZ et al., 2001).

O dendrograma gerado a partir dos valores de similaridade, obtido com o perfil de bandas de DGGE para o domínio *Bacteria* das amostras (S), (I), (1S), (1I), (2S) e (2I) da Célula experimental de RSU pode ser observado na Figura 19.

Na Figura 19, o dendrograma apresentou um cluster principal com coeficiente de similaridade de 70%. Neste caso, a comunidade microbiana preexistente na Célula experimental sofreu alteração nos níveis inferior (I) e superior (S) e nos diferentes métodos de preparação das amostras para extração.



Fonte: Autor (2016).

Pode-se observar que, do grande cluster com 70% de similaridade, formaram-se dois agrupamentos distintos (A e B), unindo no grupo A as amostras (1I) e (2S), com coeficiente de similaridade de 97%, sendo diferenciado em 3% com o surgimento de uma nova banda na amostra (1I).

O grupo B composto por (1S), (S), (I) e (2I) apresentou coeficiente de similaridade de 81% entre si. Esse agrupamento mostrou ainda, dois subgrupos “c” e “d”. O subgrupo “c” apresentou um coeficiente de similaridade na ordem de 91%. Essa diferença surgiu em função de uma banda a mais e, ainda, a perda de outra, em posições diferentes. O subgrupo “d” obteve um coeficiente de similaridade entre as amostras (S), (I) e (2I) de aproximadamente 87%.

De modo geral, verificou-se que a similaridade entre as camadas superior e inferior da Célula experimental pode ser considerada elevada e, embora os RSU sejam de idades diferentes eles têm a mesma composição de matéria orgânica.

5.2.1 Caracterização de bactérias

De acordo com os perfis resultantes do DGGE obtidos na Figura 18, foram selecionadas 6 bandas para o sequenciamento do domínio *Bacteria*, as filiações foram determinadas por comparação com as depositadas no GenBank. As bandas 1B, 2B, 3B, 4B, 5B e 6B estão indicadas no Quadro 6.

Quadro 6 - Identidade dos microrganismos - Domínio *Bacteria*.

<i>Bacteria</i>				
Amostra	Banda	Definição	Identidade	GenBank
Superior (S)	1B	Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i>	99% (354/357)	JX527024.1
1º Filtro Inferior (1I)	2B	Uncultured <i>bacterium</i>	98% (427/435)	JF964694.1
1º Filtro Inferior (1I)	3B	<i>Enterobacter sp.</i>	99% (358/361)	HQ268733.1
2º Filtro Superior (2S)	4B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99% (357/361)	JN644624.1
2º Filtro Superior (2S)	5B	<i>Enterobacter sp.</i>	98% (203/209)	HQ268733.1
2º Filtro Inferior (2I)	6B	Uncultured <i>Bacillus sp.</i>	99% (398/401)	KF722674.1

O resultado obtido no sequenciamento da banda 1B da amostra superior (S) da Célula experimental de RSU apresentou 99% de identidade com a bactéria não cultivável *Pseudomonas sp.* (JX527024.1). Esse gênero bacteriano pertence ao filo *Proteobacteria* e pode se desenvolver em uma ampla gama de habitats, principalmente, na água e em solos úmidos (BREATHNACH et al., 2012).

Pseudomonas também são capazes de se desenvolver em lixiviado de aterro e, desta forma, a presença destas populações pode ser discutida no que tange à saúde pública. Quintaes et al. (2012), observaram que as análises microbianas de uma Célula de aterro sanitário, revelaram grande número de bactérias patogênicas e oportunistas. Muitas dessas espécies pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* têm sido relatadas por diversos autores (ADEYEMI et al., 2007; EFUNTOYE et al., 2011; ZHANG et al., 2010; GRISEY et al., 2010).

De acordo com o estudo realizado pela Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos (ABRELPE, 2016), 70% dos brasileiros ainda não têm acesso à coleta seletiva de RSU e a situação de Campina Grande-PB não é diferente. Sem a segregação na fonte geradora, muitos resíduos considerados do serviço de saúde, são encontrados em residências e dispostos juntamente com resíduos domiciliares, o que pode ter contribuído para a presença desse gênero na Célula experimental.

Entretanto, presume-se que as *Pseudomonas* tenham participado no processo biodegradativo disponibilizando substratos para as arqueas metanogênicas, por meio das fases de hidrólise, acidogênese e acetogênese. Segundo Xie et al. (2011), o estudo da comunidade bacteriana oriunda de um aterro sanitário revelou a predominância das bactérias sobre os demais microrganismos, destacando as *Pseudomonas* como as responsáveis pela remoção de poluentes e pela elevada taxa de biodegradação orgânica.

Para Beal; Betts (2000) os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, são capazes de mineralizar muitos dos compostos aromáticos recalcitrantes presentes em RSU. Lalucat et al. (2006), detectaram no lixiviado de aterros sanitários que este gênero participa dos processos de degradação e desnitrificação da matéria orgânica.

Na banda 2B, resultante da primeira filtração do nível inferior (1I) da Célula experimental, foi caracterizada uma bactéria não cultivável (JF964694.1), descrita por Huang e Zhang (2013), que avaliaram em diferentes regiões geográficas a microbiota de larvas de um tipo de besouro (*Coleoptera*) e como esses organismos respondiam à heterogeneidade ambiental.

Sabe-se que em resíduos sólidos é comum a presença de coleópteros (besouro, escaravelho, joaninha, potó, vaga-lume, entre outros), que se alimentam de organismos mortos ou de materiais parcialmente em decomposição. Esses organismos detritívoros são de fundamental importância para a cadeia alimentar,

porque promovem a degradação inicial da matéria orgânica facilitando a quebra de compostos para a ação de fungos e bactérias na massa de resíduos.

As bandas 3B e 5B das amostras (1I) e (2S) da Célula experimental de RSU apresentaram 99% de identidade com a bactéria *Enterobacter sp.* (HQ268733.1). Esse gênero, que também pertence ao filo *Proteobacteria*, é classificado como anaeróbico facultativo e pode ser encontrado em ambientes como água, solo, esgoto e fezes humanas.

Na digestão anaeróbia, a conversão de diversos ácidos e álcoois dá início à fase acetogênica, onde a função das bactérias é a produção de substratos que serão metabolizados pelas arqueas metanogênicas. Apine; Jadhav. (2011) citam o gênero *Enterobacter* como um dos principais produtores de ácidos graxos.

De acordo com Carbone et al. (2002), *Enterobacter spp.* são bactérias fermentadoras ativas que podem produzir ácido graxo e ácido láctico e, desta forma, estão entre os organismos responsáveis pela primeira etapa na bioconversão de hidratos de carbono a CH₄. De acordo com Takayanagui et al. (2007) algumas espécies podem ainda solubilizar fosfato e atuar degradando amido e celulose.

Enterobacter sp. foi encontrada nas amostras dos perfis superior e inferior e, se mostrou favorável para as condições de pH, temperatura, umidade, presença de ácidos e sólidos voláteis da Célula experimental. Vale ressaltar que, esse gênero pertence ao grupo dos coliformes termotolerantes, que estão presentes nas fezes de animais de sangue quente e participam da degradação de matéria orgânica.

De acordo com dados de composição gravimétrica (Figura 17), os têxteis sanitários representaram um percentual de 8%, desta forma, não é difícil encontrar nas amostras de RSU da Célula experimental, fraldas descartáveis contendo excrementos que possam abrigar bactérias desse gênero. Carvalho et al. (2010) observaram que entre os principais microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal de recém-nascidos estão os gêneros *Enterobacter* e *Escherichia*.

A banda 4B é referente à segunda filtração do nível superior (2S) da Célula experimental de RSU e, apresentou 99% de identidade com a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (JN644624.1), espécie que também pertence ao filo *Proteobacteria*.

A *Klebsiella pneumoniae* tem sido uma das bactérias mais importantes associadas às infecções hospitalares, sendo muito comuns em infecções do trato urinário, do trato respiratório, abscessos do fígado e bacteremias. Essa espécie bacteriana tem merecido destaque, principalmente, para o desenvolvimento de resistência a alguns antimicrobianos (SUN et al., 2006; DEBBY et al., 2011).

A detecção dessas bactérias no ambiente hospitalar, bem como em amostras ambientais é importante para avaliar o potencial biodegradativo, os perfis de resistência bacteriana do local analisado e identificar as possíveis rotas de contaminação e disseminação desses agentes.

De acordo com Odeyemi et al. (2013) e Tomassoni et al. (2014) *Klebsiella pneumoniae* são bactérias versáteis na utilização de substratos e têm a capacidade de se adaptarem às condições tóxicas dos RSU.

Bactérias como *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentam capacidade lipolítica, sugerindo a aplicação destas no pré-tratamento de resíduos ricos em lipídeos, podendo ainda, serem utilizadas nos processos de biorremediação de solos (ODEYEMI et al., 2013). As bactérias lipolíticas catalisam a hidrólise de lipídios em moléculas miscíveis em água e ainda consumir os produtos dessa lipólise, como fontes de carbono (HASANUZZAMAN et al., 2004).

Bactérias que degradam a matéria orgânica são sensíveis à presença de metais pesados, cujas concentrações são frequentemente encontradas em RSU, podendo prejudicar o processo biodegradativo. Liu et al. (2018) indicaram que a *Klebsiella pneumoniae* teve a capacidade de se adaptar a ambientes com a presença de metais como Cd, Hg, As e Cr. Vale ressaltar que, metais como Cd, Pb, Cu, Zn e Ni, são encontrados nos RSU e podem elevar os níveis de contaminação do solo e da água (ZHENG et al., 2013; HUANG et al., 2013).

Silva (2016) encontrou na mesma Célula experimental de RSU desse estudo, concentrações de Ni, Cd, Cr, e Pb acima dos valores estabelecidos pela NBR 10004/2004, sugerindo o enquadramento dos resíduos como Classe I (perigosos). Bactérias ambientais comuns como a *Klebsiella pneumoniae*, apesar de algumas serem patogênicas, a grande maioria, são seguras para aplicações biotecnológicas e, tornam-se importantes não só para degradar os lipídios, mas também para tolerar a presença de metais pesados, podendo ser uma ferramenta útil para tratar resíduos industriais (ODEYEMI et al., 2013).

Finalmente, o resultado obtido no sequenciamento do fragmento 6B, resultante da segunda filtração do nível inferior (2I) da Célula experimental de RSU, apresentou 98% de identidade com a bactéria não cultivável *Bacillus sp.* (KF722674.1). Esse gênero pertencente ao filo *Firmicutes*, tem como habitat principal o solo e desempenha um papel importante no ciclo do carbono e do enxofre.

Várias bactérias acidogênicas têm sido encontradas em reatores anaeróbios e em aterros sanitários como as pertencentes aos gêneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* e *Streptococcus* (SNAIDR et al., 1993; SEKIGUCHI et al., 1998; LAPARA et al., 2000; KOUSSEMON et al. 2001; KEYSER et al., 2006).

Membros do gênero *Bacillus* possuem capacidade de sintetizar enzimas hidrolíticas, de interesse biotecnológico (ABELL; BOWMAN, 2005). Gorlac-Lira; Coutinho (2007) avaliaram a diversidade microbiana no solo do Cariri paraibano e verificaram que bactérias do filo *Firmicutes* têm capacidade celulolítica, proteolítica e amiliolítica, promovendo por fermentação a formação de ácidos graxos voláteis ou a outros subprodutos utilizados pelas arqueas metanogênicas (PATEL et al., 2014).

Bacillus spp. apresentam-se distribuídos no solo e possuem vasta capacidade metabólica, podendo persistir em ambientes críticos em relação à temperatura, umidade, agentes químicos e radiação, como é o caso da Célula experimental de RSU. Na literatura até 2013, foram citadas 265 espécies e 7 subespécies do gênero *Bacillus*, porém, nesta pesquisa foi encontrada uma espécie do gênero *Bacillus* não cultivável. Diversos estudos explicam as dificuldades de diferenciar geneticamente espécies do gênero *Bacillus* e sugerem a utilização de primers específicos (CHEN; TSEN, 2002; TZENEVA et al., 2004).

Provavelmente, o gênero *Bacillus* atuou na Célula experimental de RSU nos processos de hidrólise, acidogênese e acetogênese devido à sua versatilidade na utilização de substratos. Rodriguez; Fraga (1999) descreveram que esse gênero possui ainda grande potencial de solubilização de fósforo nos solos. Alguns estudos também mostraram que *Bacillus spp.* são capazes de degradar hidrocarbonetos (SORKHOH et al., 1993).

De modo geral, o domínio *Bacteria* possui pelo menos 80 grupos evolutivos principais. Alguns filós (*Thermomicrobia*, *Fibrobacteres*, *Cryssiogenetes* e *Deferribacteres*) consistem em uma única ou algumas poucas espécies, enquanto outros como *Proteobacterias*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* incluem milhares de espécies, as quais correspondem a 90-95% de todas as espécies conhecidas (MADIGAN et al., 2010).

A análise do sequenciamento do domínio *Bacteria*, nas amostras de RSU da Célula experimental, revelou a presença de dois filós distintos *Proteobacteria* e *Firmicutes* (Figura 20). O filo *Proteobacteria* apresenta uma grande diversidade morfológica e fisiológica e, entre as estratégias para obtenção de energia, são

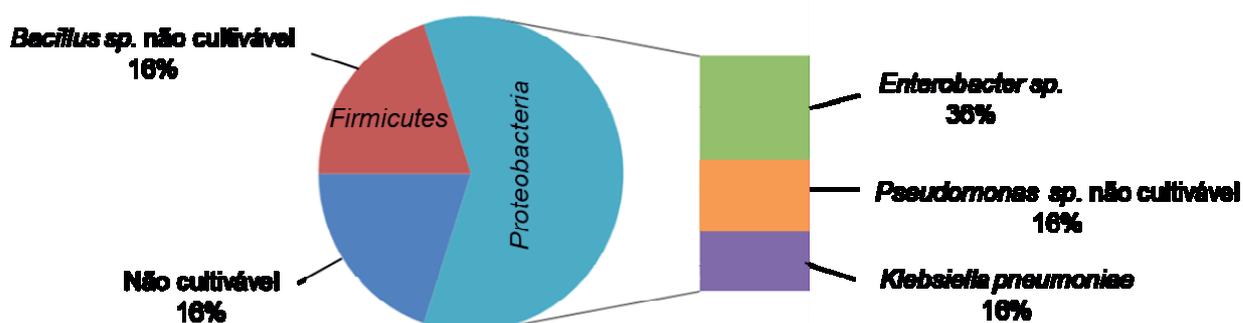
encontrados organismos com metabolismos quimiolitotrófico, quimiorganotrófico e fototrófico, além de outras vias metabólicas (CANHOS et al., 1997).

Níveis abundantes do filo *Proteobacteria* foram detectados em um aterro sanitário japonês (SAWAMURA et al., 2010). E em rejeitos antigos dos aterros sanitários de Xangai (XIE et al., 2012). Na Célula experimental, os resíduos depositados são de idades diferentes, desta forma, o filo *Proteobacteria* pode ter representado função ecológica importante nos resíduos de difícil degradação.

Firmicutes têm a capacidade de degradar ácidos graxos voláteis, tais como o butirato e os seus análogos. Esta degradação produz H₂, o qual pode ser degradado pelas metanogênicas hidrogenotróficas. De acordo com Song et al. (2015), que estudaram a diversidade de comunidades bacterianas em aterros sanitários, o filo *Firmicutes* tem um papel importante na decomposição da celulose, sendo prevalentes nos estágios acidogênicos e acetogênicos, devido à sua capacidade de fermentar açúcares e aminoácidos, além da produção dos ácidos acético e láctico (DOLOMAN et al., 2017; KLOCKE et al., 2007; CHOUARI t al., 2005).

As bactérias caracterizadas por meio deste estudo são fundamentais nos processos de hidrólise, acidogênese e acetogênese, uma vez que, os substratos produzidos, principalmente, acetato e hidrogênio serão metabolizados pelas arqueas metanogênicas que são responsáveis pela produção de biogás, sobretudo de CH₄.

Figura 20 – Representação da distribuição dos filios do domínio *Bacteria*.



5.3 Extração, quantificação, PCR e sequenciamento - Domínio *Archaea*

Na Tabela 9, estão apresentados os resultados da quantificação de DNA das amostras de RSU da Célula experimental, que foram preparadas por centrifugação e tiveram o DNA extraído pelos protocolos do Kit e CTAB.

Antes de iniciar a quantificação das amostras é necessário realizar o teste branco, em que a concentração foi de -0,1 ng/μL. Para Sambrook e Russel (2001) a

concentração do teste branco deve ter valores oscilando de -0,1 a 0,8 ng/μL, porém, podem ocorrer valores distintos desse indicador, caso uma solução incorreta seja utilizada como teste branco ou devido à fluorescência de algum corante na solução. Desta forma, a quantidade obtida (-0,1 ng/μL) foi considerada satisfatória, quando analisada por espectrofotometria referente à concentração da amostra em branco.

As concentrações de DNA variaram de 4,3 a 22,5 ng/μL, com média de 10,7 ng/μL para as amostras extraídas com o Kit, enquanto que, pelo método CTAB oscilaram de 60,7 a 419,3 ng/μL, com média de 209,7 ng/μL, nos 830 dias de monitoramento da Célula experimental (Tabela 9).

Tabela 9 - Quantificação de DNA das amostras de RSU (Centrifugação Kit e CTAB).

Dias	KIT		CTAB	
	Quantificação (ng/μL)	260/280	Quantificação (ng/μL)	260/280
0	4,3	1,81	120,8	1,83
39	8	1,58	392,2	1,46
80	9,5	1,63	267,8	1,39
109	8,6	1,7	246,1	1,5
137	8,8	1,66	170,3	1,56
172	10,1	1,59	182,9	1,48
206	7,5	1,77	211,5	1,49
233	9	1,71	100,1	1,56
249	6,7	1,65	120,7	1,53
298	13,4	1,72	326,1	1,45
319	7,2	1,81	419,3	1,4
340	13,4	1,9	243,7	1,49
382	10,9	2	230,7	1,55
424	13,3	1,93	71,2	1,46
452	9,6	1,89	260,3	1,67
473	9,2	2	72	1,56
508	13,5	1,69	219,6	1,55
599	22,5	1,72	175	1,49
704	15,6	1,46	303,4	1,83
830	12	1,9	60,7	1,52
Máximo	22,5	2	419,3	1,83
Mínimo	4,3	1,46	60,7	1,39
Média	10,7	1,8	209,7	1,5

As amostras de DNA extraídas com o Kit até o dia 137 foram inferiores a 10 ng/μL, entretanto, para este mesmo período, foram verificadas concentrações de metano que variaram de 0 a 18%, indicando o início da fase metanogênica (Figura

31). As quantificações de DNA referentes aos dias 206, 233, 249, 319, 452 e 473 também ficaram na faixa inferior ao recomendado, admitindo-se que as amostras extraídas com Kit apresentaram baixo rendimento e/ou, o DNA tenha sido degradado após o armazenamento a 4 °C, até as amostras serem extraídas.

Por outro lado, todas as amostras de DNA extraídas por CTAB tiveram concentrações superiores às que foram realizadas pelo Kit, acima de 10 ng/ μ L, mostrando alto rendimento pelo método alternativo utilizado. Vale ressaltar que, na literatura técnica não foram encontrados registros de amostras de RSU utilizando CTAB para extração de DNA.

A relação $A_{260/280}$ calculada para caracterizar a pureza do DNA (Tabela 9) variou de 1,46 a 2,0 com média de 1,8 para as amostras extraídas com o Kit e de 1,39 a 1,83, com média de 1,5 para as extraídas com o CTAB. A grande maioria das amostras quantificadas ficou abaixo do ideal (1,8 a 2,0), com exceção das amostras de DNA referentes aos dias 0, 319, 340, 382, 424, 452 e 473, extraídas com o Kit e, os dias 0 e 704 extraídas por CTAB. Para Tataurov et al. (2008), este comportamento indica a contaminação do DNA por proteínas.

Segundo Glasel (1995) é comum que as amostras de ácido nucléico sejam contaminadas com outras moléculas (proteínas, compostos orgânicos, entre outros), entretanto, partículas podem ter contaminado as amostras, causando espalhamento de luz na faixa visível no espectrofotômetro e, desta forma, aconselha-se a utilização de um método eficaz para remoção de contaminantes, como a purificação de materiais genéticos. Vale ressaltar que, este procedimento foi realizado em todas as amostras, na etapa que precede o sequenciamento do DNA.

Na maioria dos ambientes, as arqueas tendem a ter uma diversidade menor do que as bactérias, entretanto, na biodegradação dos resíduos sólidos as arqueas contribuem com uma grande proporção dos organismos procarióticos para produção do biogás. Assim, a pesquisa direcionou-se para a PCR com a amplificação do fragmento do RNAr 16S do domínio *Archaea* com a utilização de primers específicos (Quadro 3), objetivando a caracterização microbiana em nível de gêneros e/ou espécies presentes nas amostras de RSU da Célula experimental.

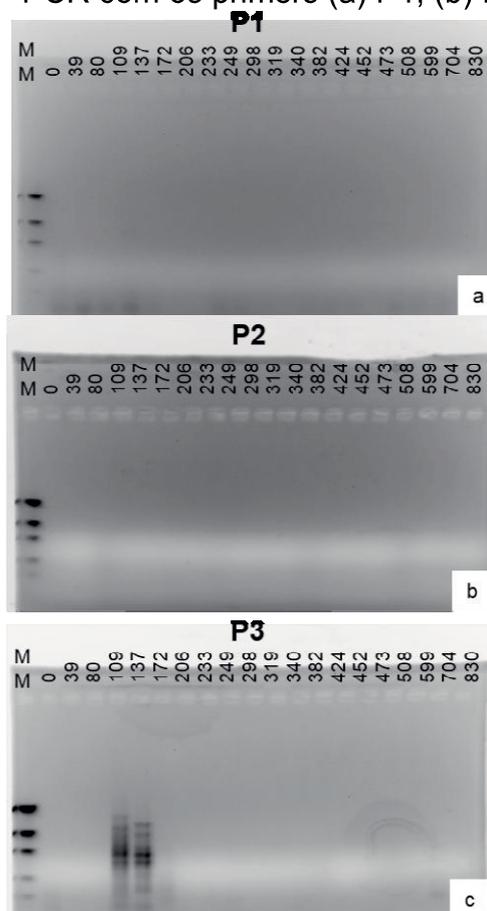
A fase metanogênica inicial começa com as primeiras concentrações mensuráveis de metano. Durante esta fase, acetato, hidrogênio e outros compostos metilados, produzidos pelos microrganismos acidogênicos e acetogênicos, são convertidos em metano e gás carbônico ou metano e água, dependendo do substrato utilizado (GHALY, 1996). No processo de degradação da matéria orgânica,

a capacidade de utilizar acetato ou hidrogênio como aceptores finais de elétrons diferencia os metanogênicos em dois grupos principais: acetoclásticos e hidrogenotróficos, respectivamente.

Desta forma, com o intuito de verificar na Célula experimental de RSU a principal via de produção de CH₄, foram utilizados 6 pares de primers (P1, P2, P3, P4, P5 e P6), onde 3 foram referentes às arqueas metanogênicas hidrogenotróficas: P1 (*Methanobrevibacter*), P2 (*Methanobrevibacter smithii*), P3 (*Methanobacteriales*) e 3 para arqueas metanogênicas acetoclásticas: P4 (*Methanosarcina spp*), P5 (*Methanosaeta spp.*) e P6 (*Methanosarcinaceae*).

A PCR empregando os iniciadores (P1, P2 e P3) apresentaram resultados negativos frente aos microrganismos: *Methanobrevibacter*, *Methanobrevibacter smithii* e *Methanobacteriales*, tanto para as extrações realizadas com o Kit, quanto para o CTAB. A eletroforese dos produtos da PCR, visualizada sob luz UV, não registrou ocorrência de bandas nas amostras da RSU, conforme Figura 21 (a) e (b), mas em (c) observou-se nas amostras referentes aos dias 109 e 137 dias, arrastes com bandas inespecíficas, indicando a possível degradação dessas amostras.

Figura 21 - PCR com os primers (a) P1; (b) P2 e (c) P3.



Legenda: (MM) marcador molecular (Low Mass DNA Ladder – Invitrogen)

De acordo com a Figura 21, é possível que a não amplificação com os primers para arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, seja devido a efeitos inibitórios da reação, apesar das diversas tentativas de otimização da amplificação das amostras, ou ainda, que as condições ambientais ao qual a Célula experimental está submetida, provavelmente, não favoreceram seu crescimento.

De acordo com Yu et al. (2005), devido às maiores taxas de crescimento, os metanogênicos hidrogenotróficos apresentam vantagem competitiva sobre os metanogênicos acetoclásticos. Entretanto, em biorreatores anaeróbios, aproximadamente, 70% do metano produzido resultam da atividade acetoclástica, enquanto cerca de 30% derivam da atividade hidrogenotrófica (SOUSA et al., 2009).

Os resultados com a utilização dos primers específicos (P4, P5 e P6) na PCR para as arqueas metanogênicas acetoclásticas: *Methanosarcina spp*, *Methanosaeta spp.* e *Methanosarcinaceae* encontram-se expostos na Tabela 10.

Na Tabela 10, foram observadas diferenças significativas nas amplificações dos fragmentos 16S das arqueas, utilizando os dois métodos de extração, especialmente, para os primers P4 e P6. As amostras extraídas com o Kit promoveram 38 reações positivas, sendo 15 para o P4, 14 para P5 e 9 para P6. E as com CTAB totalizaram 17 reações, consistindo em 2 para P4, 13 para P5 e 2 para P6, ressaltando-se que todas as PCRs tiveram as mesmas condições térmicas.

Tabela 10 - PCR realizada com os primers P4, P5 e P6.

		KIT			CTAB	
1	0				+	+
3	80	+	+	+		+
5	137	+	+	+		
7	206					+
9	249	+	+	+		+
11	319	+				+
13	382	+	+	+		
15	452	+	+			+
17	508	+	+	+		
19	704					
21	Controle -					

Legenda: + = amplificou; branco = não amplificou.

Diversas repetições foram realizadas, buscando maiores ampliações das amostras de CTAB com os primers P4 e P6, como não houve a presença de bandas específicas, uma das suposições seria que a quantidade de DNA estaria abaixo do limite de detecção do método.

Como o volume de DNA template usado nas reações de PCR foi o mesmo e, assumindo que, após as diluições realizadas, todos os DNAs tenham gerado concentrações semelhantes (10 ng/ μ L), pode-se considerar a intensidade do sinal como estimativa indireta da quantidade de DNA amplificado.

De forma geral, estes resultados contrastam com os obtidos para a família *Methanosarcinaceae* apresentados na Tabela 10, uma vez que, esperava-se um comportamento similar entre família e gênero, porém, isto não foi verificado, principalmente, pelo método CTAB. O monitoramento com os primers específicos P6 e P4 das amostras extraídas com o Kit mostrou-se similar para família e gênero, sendo que não foram verificados amplicons para P6 nas amostras referentes aos dias 172, 233, 319, 424, 452 e 473.

O primer P5 (*Methanosaeta spp.*) alcançou maiores amplicons entre as amostras de DNA extraídas para ambos os métodos (Kit e CTAB), entretanto, divergiram nos dias 0, 137, 206, 233, 319, 340, 382, 424 e 508. A presença desses microrganismos é um indicativo de resíduos mais antigos e bioestabilizados, por se caracterizarem como sucessores na ocupação de micronichos em diferentes habitats (ZINDER et al., 1993; YU et al., 2005), o que parece ser confirmado com este estudo, em que a Célula experimental possui RSU com 2151 e 830 dias.

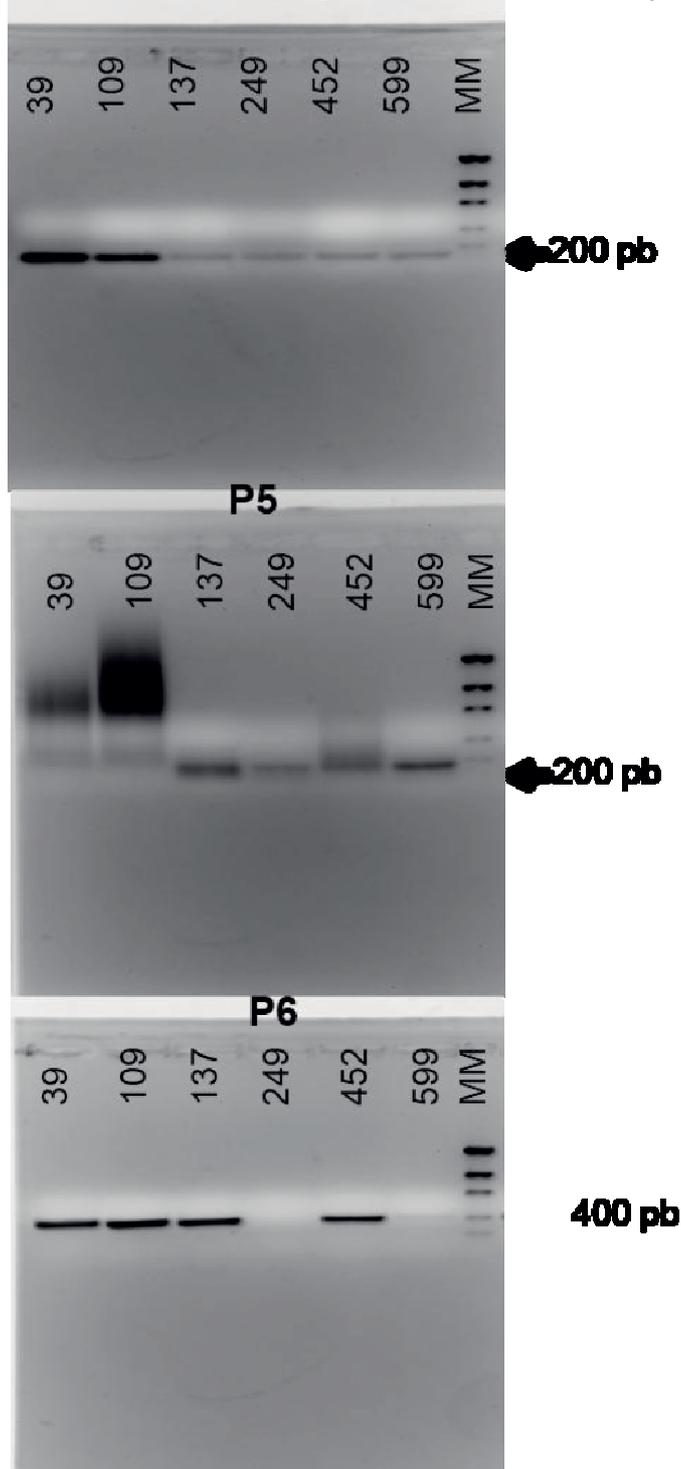
O primer P4 utilizado para *Methanosarcina spp.* foi escolhido devido à atividade metabólica desses microrganismos, que podem ser acetoclásticos, hidrogenotróficos ou metilotróficos (DEMIREL; SCHERER, 2008). Para Montero et al. (2009), os metanogênicos acetoclásticos são dominantes em reatores para produção de biogás e desempenham um papel fundamental na estabilização da carga de matéria orgânica na fase final da metanogênese.

Os membros da família *Methanosarcinaceae* e *Methanosaetaceae* diferem em sua fisiologia e bioquímica de crescimento em relação à concentração de acetato no ambiente (GRADY JR et al., 1999). De acordo com Yu et al. (2005), as *Methanosaeta spp.* têm alta afinidade pelo acetato, mas a taxa de utilização desse substrato relativamente baixa. Por outro lado, as *Methanosarcina spp.* têm uma afinidade muito menor ao acetato, com uma taxa de utilização mais alta, indicando que a predominância de *Methanosaeta spp.* é favorecida com pequenas

concentrações de acetato, enquanto que, a *Methanosarcina spp.* tenderia a predominar em elevadas concentrações desse substrato.

Após a PCR foi realizada uma Re-PCR com os mesmos ciclos térmicos e iniciadores P4, P5 e P6, os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 22.

Figura 22 – Bandas visualizadas após a Re-PCR com os primers P4, P5 e P6.



Legenda: (MM) marcador molecular (Low Mass DNA Ladder – Invitrogen)

De acordo com a Figura 22, primers para amplificar *Methanosarcina spp.* (P4) geraram bandas menores de 200 pb, que corresponderam ao tamanho esperado de 140 pares de base (pb), conforme o Quadro 3. Observou-se que todas as amostras foram amplificadas, entretanto, com intensidades diferentes, indicando que, possivelmente, *Methanosarcina spp.* predominaram na fase inicial de biodegradação.

Para *Methanosaeta spp.* (P5), os amplicons de quatro amostras apresentaram também tamanhos menores que 200 pb (137, 206, 452 e 599), como esperado (187 pb), enquanto que, para as amostras da fase inicial (39 e 109) as bandas foram inespecíficas. A Re-PCR realizada para família *Methanosarcinaceae* (P6) gerou bandas com tamanho esperado (408 pb) para as amostras 39, 109, 137 e 452, entretanto, as amostras 206 e 599 não foram reamplificadas.

De maneira geral, os resultados obtidos apontam a metanogênese acetoclástica, como via predominante para a produção de biogás na biodegradação dos RSU de Campina Grande-PB, em que foram confirmados os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta*.

Após a Re-PCR as bandas foram purificadas e enviadas para o sequenciamento. Embora, o número de ampliações da primeira PCR tenha sido elevado (Tabela 10), poucas amostras tiveram condições de serem enviadas para sequenciamento (Figura 22), uma vez que, a visualização das bandas em UV para excisão e purificação, como também a quantificação entre 10 e 20 ng/μL após esse procedimento, foram limitantes, apesar das repetições e otimizações da Re-PCR.

O critério de escolha das bandas para o sequenciamento, levou em consideração alguns aspectos como o tamanho da banda visível no gel de agarose com o transiluminador UV, a idade da amostra após a retroalimentação e a concentração de metano monitorada ao longo do tempo.

5.3.1 Caracterização das arqueas metanogênicas

De acordo com os resultados obtidos após a Re-PCR, foram selecionadas 10 bandas para o sequenciamento do domínio *Archaea*. As sequências nucleotídicas foram determinadas por identidade de bases no banco de dados 16S RNAr (*Bacteria* e *Archaea*), depositadas no GenBank/NCBI. A homologia das sequências com base no BLASTn está indicada no Quadro 7.

Quadro 7 - Identidade dos microrganismos - Domínio *Archaea*.

<i>Archaea</i>				
Microrganismos	Banda	Definição	Identidade	Genbank
P4 <i>Methanosarcina spp.</i>	1A	<i>Methanosarcina flavescens</i>	100% (105/105)	NR_148758.1
	2A	<i>Methanosarcina sp.</i>	-	-
	3A	Nenhuma semelhança significativa		
	4A	<i>Methanosarcina flavescens</i>	100% (82/82)	NR_148758.1
P5 <i>Methanosaeta spp.</i>	5A	<i>Methanosaeta concilii</i>	100% (91/91)	NR_102903.1
	6A	<i>Methanosaeta concilii</i>	100% (84/84)	NR_104707.1
	7A	<i>Methanosaeta concilii</i>	99% (70/71)	NR_102903.1
P6 <i>Methanosarcinaceae</i>	8A	<i>Methanosarcina spelaei</i>	99% (284/286)	NR_148337.1
	9A	<i>Methanosarcina mazei</i>	100% (279/279)	NR_041956.1
	10A	<i>Methanosarcina mazei</i>	100% (391/391)	NR_041956.1

A análise das sequências dos amplicons representadas pelas bandas 1A e 4A revelaram 100% de identidade com a arqueia *Methanosarcina flavescens* (NR_148758.1). *Methanosarcina spp.* podem ser encontrados em diferentes ambientes anaeróbios, como sedimentos marinhos e de água doce, solos, resíduos sólidos e em tratamentos digestivos de animais de sangue quente (GANZERT et al., 2014; SHIMIZU et al., 2015).

Além da importância ecológica, a *Methanosarcina flavescens* exerce influência no tratamento de RSU e está, possivelmente, associada à fase inicial da metanogênese.

Apesar da elevada identidade (100%), a análise no BLASTn revelou que outras espécies também tiveram alta homologia com as sequências desse estudo, entretanto, nenhuma delas estava associada à produção de biogás.

Methanosarcina flavescens é um novo microrganismo metanogênico estritamente anaeróbio, descrito por Kern et al. (2016), que foi isolado de uma usina de biogás em escala real na Alemanha. Esta arqueia metanogênica cresceu

autotroficamente em H₂ e CO₂ e, adicionalmente, as células poderiam utilizar acetato, metanol, mono-, di- e trimetilamina como fontes de carbono e energia.

A temperatura interna da Célula experimental para o período específico que a *Methanosarcina flavescens* foi caracterizada variou de 25 a 36 °C (Figura 24), por outro lado, Kern et al. (2016), identificaram como temperatura ótima a faixa de 40 a 45 °C, indicando que membros dessa espécie podem ser mesofílicos e/ou termofílicos.

Com relação às condições de pH para o crescimento dessa espécie foram encontradas na Célula experimental de RSU variações de 5,7 a 8,4 (Figura 28), entretanto, Kern et al. (2016) testaram o crescimento da *Methanosarcina flavescens* com pH variando de 5,0 a 8,5 e, encontraram as condições ideais para crescimento e produção de biogás entre 7,0 e 8,0, que é o valor pH característico para o desenvolvimento de arqueas metanogênicas (WHITMAN et al., 2006). Em valores de pH acima de 8,5 ou abaixo de 5,5, nenhum crescimento da *Methanosarcina flavescens* pôde ser observado.

A capacidade desse microrganismo de metabolizar amostras com composições de substratos variados, como em aterros de resíduos sólidos urbanos, ressalta que, apesar da recente identificação, a *Methanosarcina flavescens* (KERN et al., 2016) mostrou-se favorável às condições de pH e temperatura encontradas durante o monitoramento da Célula experimental de RSU.

Com relação à banda 2A, não foi obtido resultado conclusivo, uma vez que, não houve nenhuma semelhança significativa no GenBank/NCBI. Isso acontece, na maioria das vezes, pela baixa qualidade e tamanho das sequências.

Os primers específicos (P4) usados na Re-PCR para o gênero *Methanosarcina* amplificaram fragmentos de tamanho esperado (140 pb). Para classificação da banda 3A, após o sequenciamento, confirmou-se que a análise da sequência forward tratava-se de uma espécie de *Methanosarcina*, por outro lado, a sequência reverse não teve semelhança significativa no banco de dados.

As sequências dos amplicons representadas pelas bandas 5A e 6A apresentaram 100% de identidade com a *Methanosaeta concilii* (NR_102903.1), a 7A também resultou nessa mesma espécie, entretanto, com 99% de identidade (NR_104707.1).

De acordo com Mori et al. (2003), *Methanosaeta* pode ser amplamente distribuído na natureza e talvez seja o produtor predominante de CH₄ na Terra, sendo abundante em habitats onde os receptores de elétrons, como oxigênio, nitrato

e sulfato, são estritamente limitados, como é o caso dos aterros sanitários (LALOUICARPENTIER et al., 2006; MORI et al., 2003), digestores anaeróbios (LECLERC et al., 2004) e Células experimentais de RSU.

O gênero *Methanosaeta* possui afinidade com ambientes em que prevalecem baixas concentrações de acetato, que é um composto fundamental para a degradação da matéria orgânica e, corresponde a dois terços do total de CH₄ produzido na metanogênese acetoclástica, na qual se utiliza acetato e CO como fontes de carbono (PATEL; SPROTT, 1990; JONES, 1991).

Methanosaeta concilii foram encontradas tanto na fase metanogênica inicial da Célula experimental de RSU (109 dias), como também no final do monitoramento (599 dias). *Methanosaeta concilii* é a única árquea acetoclástica mesofílica entre as espécies do seu gênero, sendo as demais termofílicas (TIAN et al., 2016). Desta forma, as condições de temperatura da Célula experimental durante todo o monitoramento permaneceram na faixa mesofílica (Figura 24), favorecendo o crescimento e a produção de biogás por essa espécie.

O pH oscilou de 5,7 a 8,4 durante 599 dias de monitoramento da Célula experimental (Figura 28), entretanto, a *Methanosaeta concilii* foi caracterizada com valores médios de pH na faixa 8,0. De acordo com estudos realizados por Mori et al. (2012), a espécie *Methanosaeta concilii* isolada de sedimentos marinhos foi capaz de crescer em temperaturas entre 20 e 35 °C e valores de pH entre 6,0 e 7,8, com crescimento ótimo a 30 °C e pH 7,5, estes mesmos autores constataram ainda que, o número de genes pertencentes à *Methanosaeta* foi 10 vezes maior que o de genes de *Methanosarcina*, indicando que o metano produzido a partir do acetato foi originário da espécie *Methanosaeta concilii*.

Patel; Sprott (1990) observaram o crescimento desta espécie com temperaturas variando de 35 a 40 °C e pH entre 6,6 e 7,8, com crescimento ótimo a 35 °C e pH 7,2. Tian et al. (2016), verificaram a correlação entre fatores bióticos e abióticos em 19 biodigestores de biogás em regiões tropicais e subtropicais da Província de Yunnan, China. E concluíram que a *Methanosaeta concilii* foi dominante em todos os 19 biodigestores de biogás, entretanto, com fatores abióticos difentes, onde o pH variou de 7,2 a 8,4 e a temperatura de 16 a 28 °C.

Na metanogênese da Célula experimental de RSU a *Methanosaeta concilii* se mostrou importante para a produção de metano, uma vez que, essa espécie foi dominante do início ao final do monitoramento. Portanto, otimizar as condições de crescimento da *Methanosaeta concilii* pode garantir elevada produção de biogás,

visto que, essa espécie contribuiu, significativamente, para a degradação anaeróbia da matéria orgânica em ambientes com RSU.

A sequência do amplicom representada pela banda 8A apresentou 99% de identidade com a árquea metanogênica acetoclástica, denominada *Methanosarcina spelaei* (NR_148337.1), que foi descrita por Ganzert et al. (2014) e isolada a partir de um biofilme flutuante de um lago subterrâneo sulfuroso na Caverna Movile, em Mangalia, no sudeste da Romênia. Recentemente, esta espécie também foi encontrada em outros ambientes anaeróbios, como sedimentos de manguezais tropicais (JING et al., 2016) e digestores anaeróbios (ZIGANSHIN et al., 2016).

De acordo com Ziganshin et al. (2016), análises comparativas de composições e dinâmicas metanogênicas em 11 reatores em escala laboratorial alimentados com diferentes materiais agrícolas como, esterco de galinha e bovino, palha e silagem de milho e grãos de destilaria, demonstraram que a produção de biogás foi, significativamente, correlacionada com os membros da família *Methanosarcinaceae*, que são capazes de atingir um crescimento estável a altas taxas de carga orgânica, níveis de amônio e acetato.

Na Célula experimental de RSU, a *Methanosarcina spelaei* cresceu com valores médios de temperatura de 28 °C (Figura 24) e pH de 7,5 (Figura 28). Ganzert et al. (2014), ao isolarem a *Methanosarcina spelaei* de uma caverna, observaram que essa árquea metanogênica é estritamente anaeróbia e que cresceu na presença de H₂, CO₂, acetato, metanol, monometilamina, dimetilamina e trimetilamina, como fontes de carbono e energia. O ecossistema foi caracterizado por ter uma atmosfera de 7 a 10% de O₂, 2 a 3,5% de CO₂ e 1 a 2% de CH₄. A temperatura para desenvolvimento desse microrganismo variou de 12 a 33 °C e o pH de 5 a 8,6.

Portanto, a Célula experimental de RSU mostrou-se favorável as condições de substrato, pH e temperatura, entretanto, as concentrações de biogás em que a *Methanosarcina spelaei* cresceu, apresentou concentrações de CH₄ até 18,5%, CO₂ 35% e O₂ 1% (Figura 31). Isto implica que, essa árquea metanogênica está adaptada à composição física dos RSU e que diversas espécies de microrganismos têm papéis distintos em uma organização coletiva, o que torna a Célula experimental um ambiente especializado e complexo.

Cabe destacar que, as sequências nucleotídicas de amplicons representada pela banda 8A foram depositados no GenBank (número de acesso MH793496), visto que, nenhuma das sequências do banco de dados associou esse microrganismo à

biodegradação de resíduos sólidos urbanos e às condições em que se encontra a Célula experimental.

Finalmente, as sequências nucleotídicas dos amplicons representadas pelas bandas 9 e 10 A apresentaram 100% de identidade com as sequências de *Methanosarcina mazei* (NR_041956.1) que de acordo com Cairó et al. (1992), são as espécies mesofílicas mais representativas do gênero *Methanosarcina*. Desta forma, a presença desses microrganismos pode ser considerada comum na biodegradação de RSU, devido às suas altas taxas de crescimento e ao consumo rápido e amplo de substratos (acetato, metanol e hidrogênio).

Methanosarcina mazei cresceram e produziram biogás na Célula experimental de RSU com temperaturas médias de 25 °C (Figura 24) e pH 7,8 (Figura 28). Membros do gênero *Methanosarcina* são frequentemente, tolerantes a condições de estresse, como flutuações no pH e temperatura, baixa disponibilidade de matéria orgânica, toxicidade de amônia e altas concentrações de sal (DOLOMAN et al., 2017; CALLI et al., 2005; CONKLIN et al., 2006; SHIN et al., 2011).

Para Battumur et al. (2017), que conduziram estudos para isolamento e caracterização de novos microrganismos em um digestor anaeróbio com lixiviado, a faixa de temperatura observada em que a *Methanosarcina mazei* foi caracterizada variou de 20 a 40 °C, com o crescimento mais rápido ocorrendo a 39 °C, enquanto que, o pH monitorado oscilou de 4,0 a 9,0 com valores ótimos de 6,8 a 7,2.

Walter et al. (2012) pesquisaram comunidades microbianas em usinas de biogás na Itália e na Áustria e verificaram que a temperatura na maioria dos reatores variou entre 37,5 e 42 °C e o pH entre 7,4 a 8,2. As concentrações de CH₄ variaram entre 43,2 e 58% e as de CO₂ entre 33,5 e 46,5%.

O crescimento e produção de biogás da *Methanosarcina mazei* na Célula experimental de RSU tiveram as condições de pH compatíveis com as encontradas nos estudos de Walter et al. (2012). Por outro lado, a temperatura da Célula experimental foi compatível com as observadas por Battumur et al. (2017). Vale ressaltar que, as concentrações de CH₄ e CO₂ na Célula experimental não ultrapassaram 10% e 28% (Figura 31), respectivamente, no período de monitoramento em que foi encontrada essa árquea metanogênica.

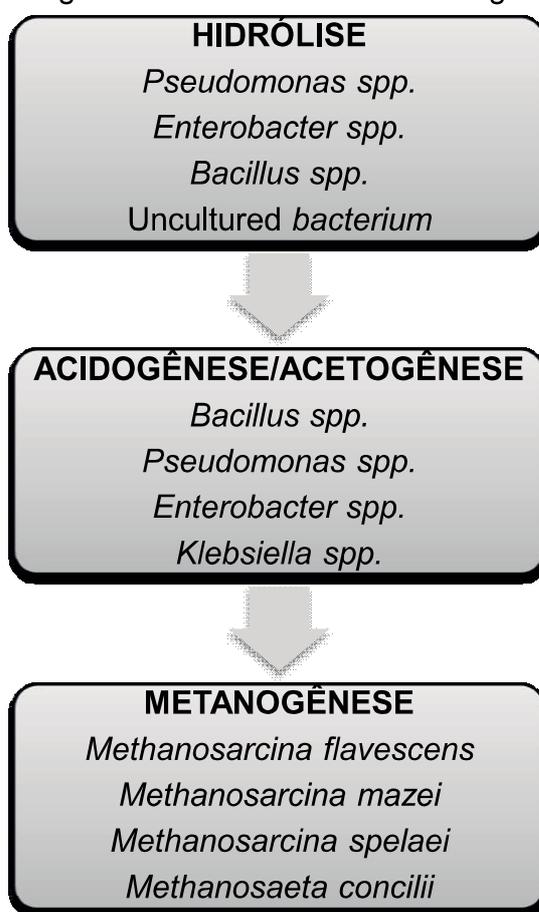
Segundo Maeder et al. (2006), no processo de biodegradação de resíduos e na produção de biogás, a *Methanosarcina mazei* é fisiologicamente importante, porque esse microrganismo é dotado de uma proteína denominada hememoxigenase, conhecida como citocromo P450, que desempenha um papel

crítico na síntese e degradação de muitos compostos xenobióticos (MAEDER et al., 2006; WHITLOCK; DENISON JR, 1995). Essa espécie também contribuiu com a degradação anaeróbia de resíduos ricos em lipídios (SCHMIDT et al., 2000).

Em suma, os metanogênicos acetotróficos *Methanosarcina flavescens*, *Methanosaeta concilii*, *Methanosarcina spelaei* e *Methanosarcina mazei* foram encontrados na Célula experimental de RSU, podendo-se inferir que o acetato pode ser o precursor mais importante durante a digestão anaeróbia mesofílica, sendo responsável pelo CH₄ produzido.

Nesse contexto, as amostras de resíduos sólidos urbanos apresentaram populações microbianas diversas de bactérias e arqueas, as quais dependendo dos indicadores operacionais como, temperatura, disponibilidade de substratos e pH podem produzir maiores volumes de biogás. Desta forma, para resumir a análise das comunidades de bactérias e arqueas metanogênicas envolvidas no processo biodegradativo da Célula experimental de RSU, foi configurado um fluxograma que está apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Microrganismos envolvidos na biodegradação de RSU.



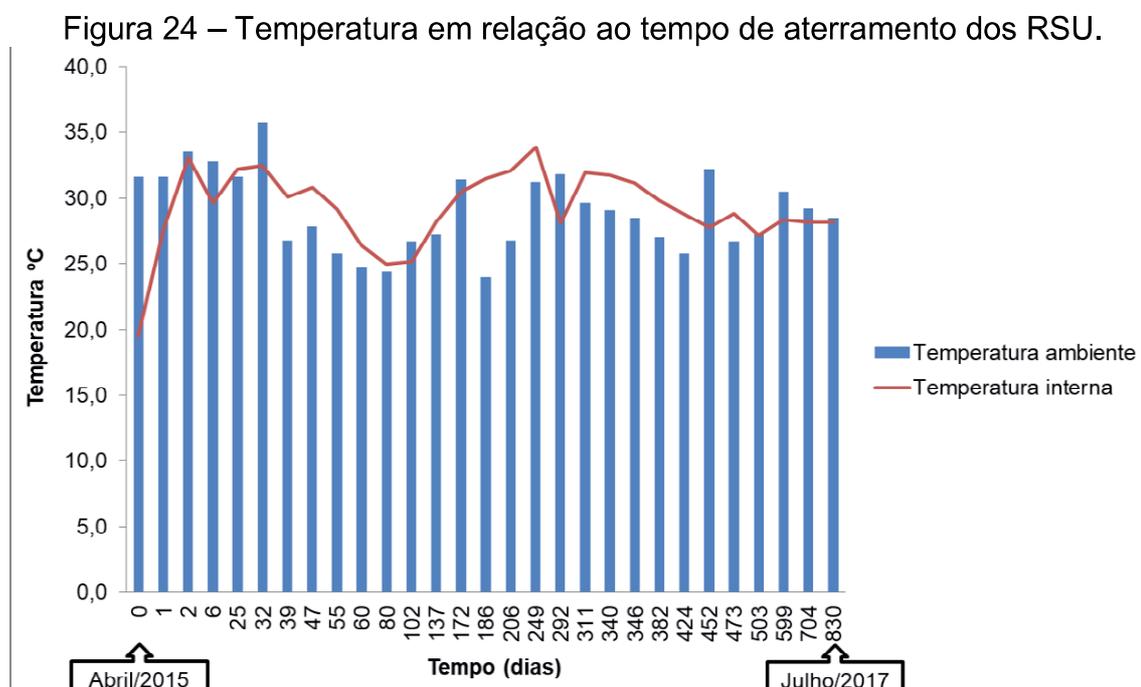
5.4 Indicadores físico-químicos e microbiológicos

5.4.1 Temperatura

A evolução da temperatura dos RSU fornece informações sobre a atividade microbiana no processo de degradação da matéria orgânica. Nesse contexto, foram observadas temperaturas variadas no ambiente interno e externo à Célula experimental.

A Figura 24 ilustra o comportamento das temperaturas interna e ambiente em função do tempo de aterramento dos RSU na Célula experimental. No interior da massa de RSU a temperatura oscilou de 19,5 a 33,8 °C, com média de 29,2 °C, no ambiente externo as temperaturas variaram de 24 a 35,8 °C, com média de 28,9 °C.

O processo de retroalimentação proporcionou uma diminuição na temperatura interna na massa de resíduos (dia 0), justificada pela retirada da camada de cobertura de solo compactado, que refletiram em temperaturas distintas. Após 2 dias de monitoramento, foi observado um aumento expressivo, indicando a ocorrência de biodegradação dos RSU, em que a temperatura interna atingiu 33 °C.



A diferença na temperatura interna, inicialmente, está relacionada aos microrganismos aeróbios que, ao degradarem a matéria orgânica a compostos mais simples como H₂O e CO₂, liberam calor. Ao longo do tempo, o oxigênio é consumido rapidamente e os grupos, predominantemente, aeróbios diminuem seu metabolismo,

prevalecendo os microrganismos facultativos e anaeróbios. Contudo, estes novos grupos microbianos precisam adaptar-se enzimaticamente a este meio.

Na maior parte do período de monitoramento, a temperatura ambiente ficou abaixo da temperatura interna, o que já esperado, uma vez que, a atividade microbiana libera maiores quantidades de calor na massa de RSU aterrada.

Observou-se um decréscimo nas temperaturas interna e externa a partir do dia 55, mudança que está associada a fatores como, umidade e precipitações, em que foram observados índices de precipitações de 120 mm (Figura 26).

A temperatura média interna apresentou-se com limites aceitáveis para a degradação microbiana dos resíduos sólidos, ficando na faixa mesofílica, considerada ótima para produção de metano. Segundo Tchobanoglous et al. (1993) para uma maior eficiência do processo de digestão anaeróbia, os níveis de temperatura ótima são os mesofílicos de 20 a 40 °C e os termofílicos de 50 a 55°C.

Para Igoni et al. (2008) a temperatura mesofílica é vital, mas a estabilização ao longo do tempo é preponderante, uma vez que, variações de temperaturas, abaixo ou acima da faixa considerada ótima, poderiam alterar de forma negativa, a eficiência do processo biodegradativo, sob o risco de perda nas populações microbianas.

McHugh et al. (2003) estudando a estrutura populacional de metanogênicos na biodegradação de resíduos, concluíram que, baixas temperaturas não influenciam na diversidade populacional metanogênica, apenas no número de indivíduos presentes. A diversidade microbiana parece estar vinculada à composição química do meio (GROTEHUIS et al., 1991).

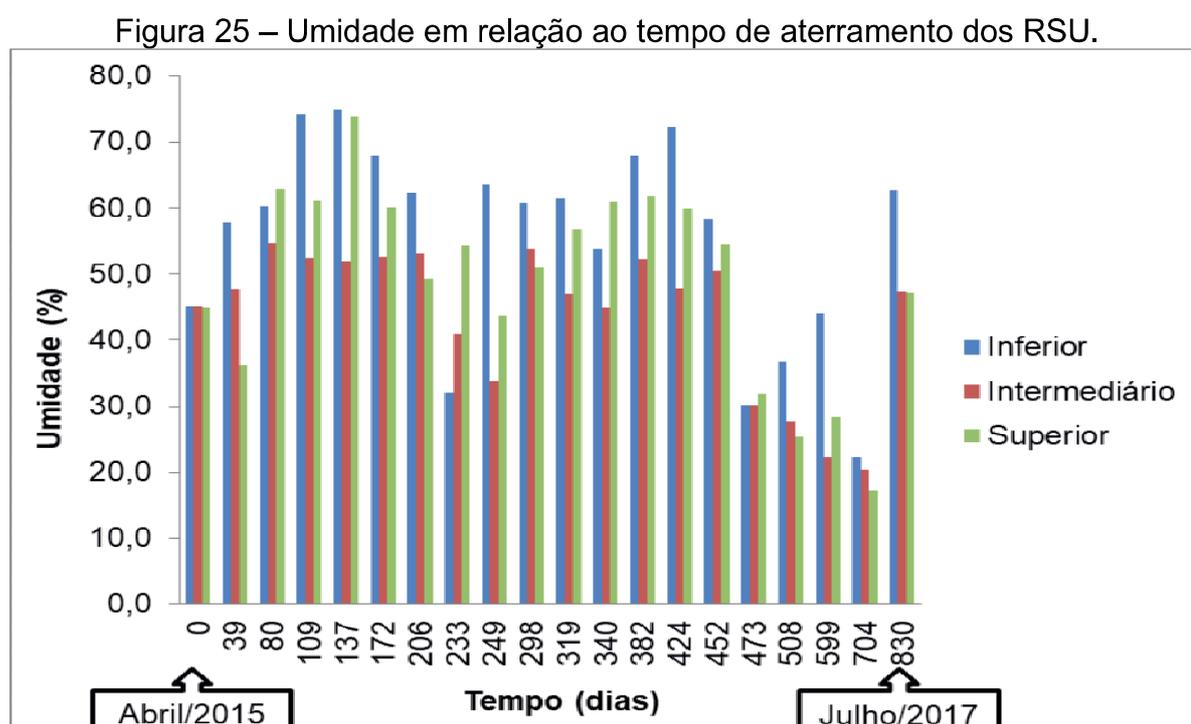
Temperaturas muito elevadas (>50°C) podem alterar a composição microbiana, ocorrendo à sucessão ecológica por metanogênicos termófilos. Desta forma, a temperatura mesofílica na Célula experimental de RSU foi um indicador favorável ao desenvolvimento dos microrganismos envolvidos na biodegradação dos RSU e na produção de biogás.

5.4.2 Umidade

Para Tchobanoglous et al. (1993) a água é um elemento necessário para que ocorram as reações químicas de degradação da matéria orgânica. Um fato a ser considerado é que a umidade tanto pode estimular, quanto inibir a biodegradação dos resíduos, uma vez que, infiltrações excessivas podem diminuir a ação dos

microrganismos, sobretudo das áruqueas metanogênicas. A Figura 25 apresenta o comportamento da umidade dos RSU no interior da Célula experimental.

De acordo com a Figura 25, mudanças significativas na umidade foram observadas, com percentuais entre 20 e 75% ao longo do tempo de monitoramento. Tais variações podem estar associadas ao quantitativo de matéria orgânica presente nos RSU, as condições meteorológicas locais, a taxa de biodegradação, ao funcionamento dos sistemas de coleta de líquidos no interior da Célula e a eficiência da camada de cobertura de solo compactado.



O percentual inicial da umidade, acima de 40%, pode ser atribuído ao processo de retroalimentação, que elevou em 46,5% a quantidade de matéria orgânica na Célula experimental (Figura 17), além do mais, os resíduos de Campina Grande-PB são caracterizados na fonte geradora, como resíduos úmidos, antes mesmo do aterramento (ECOSOLO, 2016).

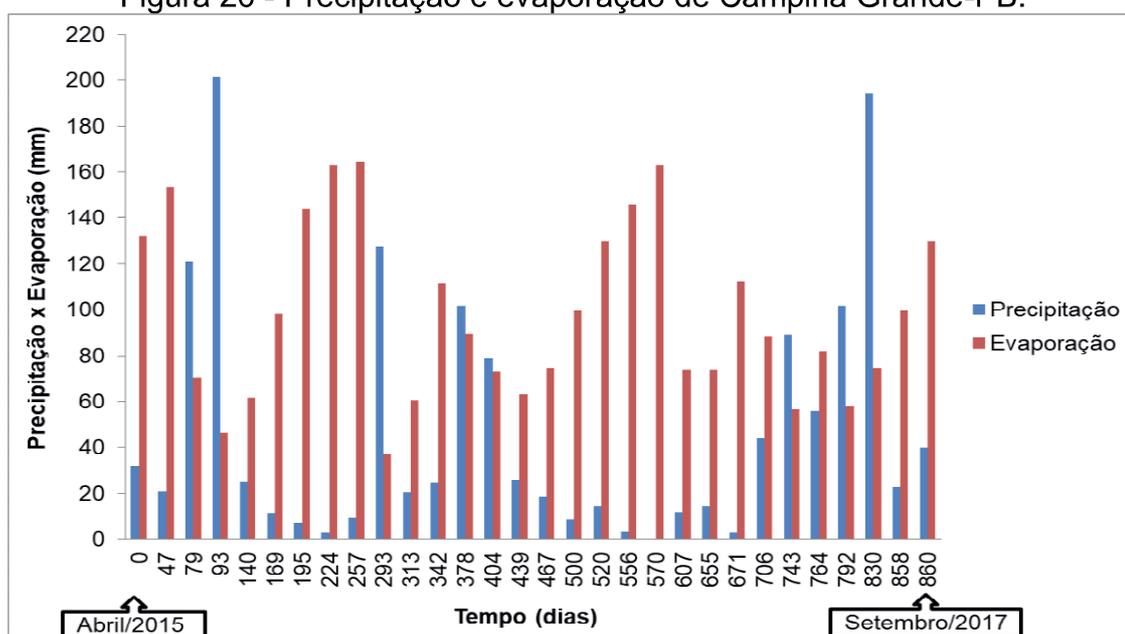
Estudos desenvolvidos por Palma et al. (2000), mostraram que a umidade ótima para a biodegradação de resíduos variou entre 50 e 70%. Yuen et al. (2001) consideraram que a umidade, reportada na literatura, apresenta uma faixa muito mais ampla (20 a 80%), uma vez que, a quantidade de água pode ser influenciada também por fatores como a composição física dos resíduos, peso específico, porosidade e idade dos RSU.

Analisando a Figura 25, o nível inferior apresentou maiores percentuais de umidade durante os dias de monitoramento. De acordo com Silva (2016), ao sofrer o fenômeno de contração, com a perda de umidade para o ambiente externo, tanto a massa de RSU aterrados, quanto à camada de cobertura do solo compactado, deslocam-se da parede da Célula, favorecendo caminhos preferenciais. Assim, ao escoar pelas laterais, a água infiltra e se dispersa longitudinalmente, acumulando-se nas partes mais baixas da Célula.

Observou-se ainda que, o máximo valor de umidade encontrado nos dias 109 e 137, referem-se aos meses entre junho e julho de 2015, que corresponderam ao período caracterizado como sendo de maior precipitação em Campina Grande-PB, conforme ilustra a Figura 26. Valores de umidade acima de 60%, também foram encontrados nos dias 382 e 424, que corresponderam aos meses de abril e maio de 2016, com índices pluviométricos acima de 80 mm. Cabe destacar que, a água infiltrada, através das camadas de RSU, pode carrear nutrientes e compostos químicos, influenciando a atividade microbiana e a velocidade da biodegradação.

Cunha et al. (2009), descreveram que o município de Campina Grande-PB, caracteriza-se por apresentar chuvas de outono-inverno, cuja estação chuvosa inicia em março/abril e finaliza em agosto. Por outro lado, a estiagem prolonga-se entre cinco e seis meses, compreendendo ao período de setembro a fevereiro, sendo o mês de novembro o mais seco, conforme a Figura 26, este mês atingiu índices pluviométricos de 3 mm 2015 e 0 mm em 2016 (dias 224 e 570).

Figura 26 - Precipitação e evaporação de Campina Grande-PB.



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (2018).

No período final de monitoramento, especialmente, entre os dias 473 e 704 foi verificada uma redução nos percentuais de umidade, que pode ser justificada pela perda de água por evaporação (dias 467 a 706), haja vista que, na camada de cobertura de solo compactado da Célula experimental existem fissuras (Figura 27) que promovem a passagem de líquidos e gases e, favorecem as trocas do meio interno com o externo.

O valor médio observado de umidade no dia 830 foi superior a 50%, coincidindo com o índice de precipitação em julho 2017, que atingiu 194 mm, contudo, o nível inferior teve umidade superior a 60%, implicando que neste nível ocorreu o processo de lixiviação a partir da biodegradação dos resíduos.

Nesse contexto, analisando a Figura 26, percebe-se que a evaporação em Campina Grande-PB, durante grande parte do monitoramento, foi superior aos índices pluviométricos medidos, com exceção dos dias 79, 93, 293, 378 404, 743, 792 e 830. Apesar das precipitações favorecerem o aumento de líquidos na massa de RSU, os percentuais de umidade tendem a reduzir, com o passar do tempo, uma vez que, a fração orgânica dos RSU torna-se menor, devido aos processos biodegradativos e a produção de biogás.

De acordo com Tchobanoglous et al. (1993), são consumidos 0,165 kg de água para cada metro cúbico de gás emitido, além da perda de água em forma de vapor, uma parcela também é incorporada na formação do biogás.

Vale ressaltar que, condições de baixa pluviometria e elevada evaporação, segundo Moura et al. (2009) e Moreira (2018), são típicas do semiárido brasileiro, que se caracteriza por chuvas escassas e mau distribuídas espaço-temporalmente, geralmente, concentradas em poucos meses do ano. De modo geral, o percentual de umidade na Célula experimental, não limitou o desenvolvimento dos processos biodegradativos e a produção de biogás pela atividade microbiana.

Figura 27 - Fissuras na camada de cobertura da Célula experimental.



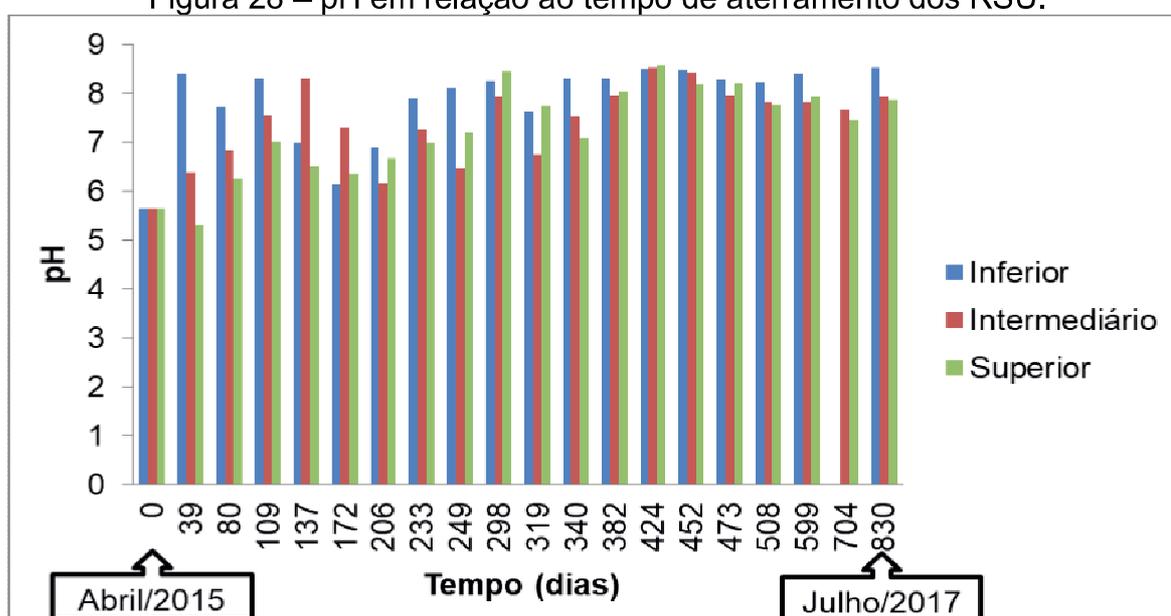
5.4.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

A variação do pH no interior da massa de resíduos afeta o processo de digestão anaeróbia, uma vez que, está relacionado aos produtos formados a partir das fases de biodegradação dos resíduos sólidos, podendo as oscilações desse indicador, acelerar ou retardar a produção de biogás.

A Figura 28 apresenta o comportamento do pH ao longo do tempo de aterramento dos RSU. De maneira geral, o pH dos RSU oscilou de 5,2 a 8,5 na Célula experimental. Tais variações estão associadas às fases de hidrólise, acidogênese e acetogênese, ao processo de retroalimentação da Célula que elevou a quantidade de matéria orgânica e aos fatores ambientais externos.

Segundo Chernicharo (2000), valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 8,3 devem ser evitados, porque inibem a atividade das arqueas metanogênicas. No estudo desenvolvido por Alcântara (2007) com Células experimentais de RSU, no aterro da Muribeca, em Recife-PE, foram encontrados valores de pH em torno de 6,0, para as fases aeróbia e anóxica; entre 6,0 e 7,0 para a fase ácida; e uma faixa de variação entre 7,0 e 8,0 na fase metanogênica.

Figura 28 – pH em relação ao tempo de aterramento dos RSU.



Foi observado na Figura 28, que o nível superior apresentou um comportamento mais ácido durante o monitoramento, o que já era esperado, uma vez que, este nível é constituído de RSU novos. Características iniciais ácidas do pH, são um indicativo da presença de bactérias fermentadoras, hidrolíticas,

acidogênicas e acetogênicas, que promovem o acúmulo de ácidos orgânicos e de elevadas concentrações de CO₂ no interior da massa de resíduos sólidos.

Nesse sentido, a concentração máxima de CO₂ atingiu 35% (Figura 31) na Célula experimental e, desta forma, favoreceu o crescimento de bactérias como *Pseudomonas sp*, *Uncultured bacterium*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Uncultured Bacillus sp*. Segundo Kim et al. (2014) as bactérias produtoras de ácidos têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 5,0 e 6,5. Igoni et al. (2008) concluíram que o crescimento microbiano tem influência direta na concentração de biogás, porque a biodegradação dos RSU é inibida pela acidez excessiva.

Os níveis intermediário e inferior são constituídos por RSU resultantes do primeiro enchimento da Célula experimental, ocorrido no ano de 2011, nesses níveis, foram observados menores variações do pH, indicando que nestas camadas, haja menores quantidades de matéria orgânica e/ou que sofreram menores interferências de fatores externos, como entrada de ar pelos pontos laterais da Célula. Embora a entrada de ar, provavelmente, ocorra em todos os níveis da Célula experimental, o nível superior oferece uma maior exposição ao ambiente externo, quando comparado aos demais, em função da maior área de contato com o ambiente externo (MELO et al., 2016).

De acordo com a Figura 28, após 298 dias de monitoramento, todos os níveis (superior, intermediário e inferior) da Célula experimental tenderam para o pH neutro a básico (6,8 a 8,5), condição indispensável para o bom desempenho da atividade metanogênica. Em relação às fases de degradação, a elevação do pH indica a transição para a fase metanogênica. Tal fato implica na produção de bicarbonato pelas arqueas metanogênicas, que convertem ácidos e hidrogênio, presentes no meio, em metano, aumentando assim, o pH.

De acordo com Tchobanoglous et al. (1993), a fase metanogênica ocorre em valores de pH variando entre 6,8 e 8,0. Esta fase é longa e pode perdurar durante toda a vida útil do aterro. Mesmo tendo sido identificados valores de pH adequados para metanogênese, não houve elevada produção de CH₄ na Célula experimental, as concentrações máximas atingiram 20% durante o monitoramento (Figura 31).

O comportamento das fases biodegradativas dos RSU, aliado a sucessão microbiana e ao pH são de extrema importância para produção de biogás na Célula experimental. Melo et al. (2016), afirmaram que as fases de degradação ocorreram de maneira mais rápida em uma Célula experimental de RSU, quando comparadas a aterros em escala real, provavelmente, pela área de superfície ser bem maior que o

volume dos resíduos depositados em aterros sanitários, o que facilitou as trocas de calor e energia com o ambiente, aumentando o metabolismo dos microrganismos.

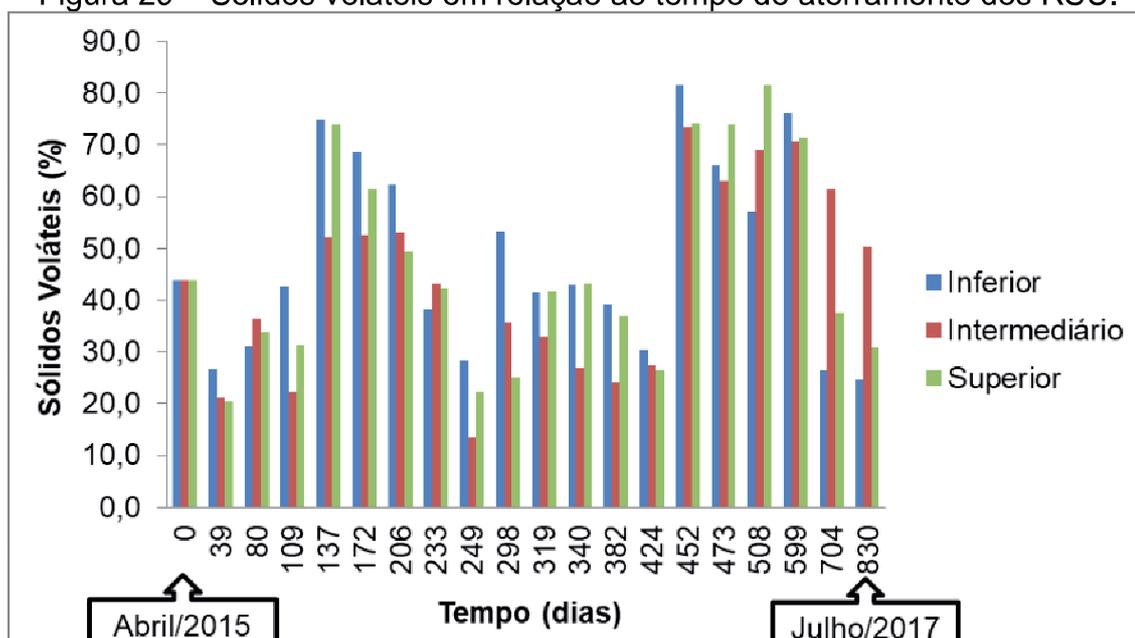
Embora a evolução do pH concorra para o estabelecimento das fases de biodegradação dos resíduos, essas fases não puderam ser definidas com exatidão, visto que, a Célula experimental é composta por RSU de diferentes idades, podendo encontrar o estabelecimento de mais de uma fase ao mesmo tempo, assim como ocorre comumente em aterros sanitários.

5.4.4 Sólidos voláteis

O teor de sólidos voláteis faz alusão à biodegradabilidade da fração orgânica de RSU, assim, quanto maior o teor de sólidos voláteis, maior a quantidade de matéria orgânica a ser decomposta e, conseqüentemente, maior será o potencial de produção de biogás (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2008). A Figura 27 ilustra os percentuais de sólidos voláteis na Célula experimental de RSU.

Foram observados variações de 14 a 81%, com média de 45%, para os sólidos voláteis, no decorrer do período de monitoramento, indicando um percentual significativo de matéria orgânica a ser biodegradada. De maneira geral, o teor de sólidos voláteis apresentou comportamento bastante variável ao longo do tempo de aterramento, o que pode estar associado à idade e a heterogeneidade dos RSU inseridos na Célula experimental e as condições climáticas de Campina Grande-PB.

Figura 29 – Sólidos voláteis em relação ao tempo de aterramento dos RSU.



Analisando-se os primeiros 109 dias, pode-se afirmar que a matéria orgânica estava sendo degradada ao longo do tempo de aterramento, uma vez que, ocorreu a diminuição dos sólidos voláteis, principalmente, para os níveis superior e intermediário, atingindo um percentual de 21%.

Com 137 dias de monitoramento, houve um aumento nos percentuais dos sólidos voláteis na Célula experimental de RSU, o que pode estar associado à elevada evaporação, após o período de chuvas em Campina Grande-PB (Figura 26). Vale ressaltar que, para este mesmo período foram identificados baixos índices pluviométricos, que podem minimizar a dissolução de compostos orgânicos presentes na Célula, aumentando assim, o teor de sólidos voláteis.

Em termos percentuais, o nível superior apresentou a maior redução na matéria orgânica chegando a 61%, o nível intermediário teve uma redução de 60% e o nível inferior atingiu 57%, no período de monitoramento da Célula experimental. Esse comportamento já era esperado, visto que, para o nível superior, a retroalimentação propiciou o incremento de material putrescível, com frações elevadas passíveis de serem degradadas, enquanto que o nível inferior é formado por RSU antigos, que podem acumular materiais recalcitrantes. Cabe destacar que esses materiais, não são facilmente assimilados pelas bactérias e arqueas, podendo assim, interferir nos processos biodegradativos e na produção de biogás.

Segundo Firmo (2013), quanto mais biodegradável é o resíduo, maior é o teor de sólidos voláteis. Ribeiro et al. (2016) obtiveram redução de sólidos voláteis no monitoramento de um biorreator com RSU, em torno de 95% para o nível superior, 61% para o nível intermediário e 60% para o nível inferior. Palmisano e Barlaz (1996) reportaram valores de redução de sólidos voláteis na faixa de 35 a 60%. Kelly (2002) registrou uma redução nos sólidos voláteis de 58% para RSU depositados em Células de aterros com 730 dias de monitoramento. Esse mesmo autor, ainda afirma que, amostras de resíduos com concentrações de sólidos voláteis menores que 20%, já podem ser consideradas estabilizadas, o que implica em baixos teores de matéria orgânica.

A redução nos sólidos voláteis indica que a degradação no interior da Célula experimental ocorreu, uma vez que, a matéria orgânica estava sendo consumida pelas comunidades microbianas. Cabe destacar que, embora o teor de sólidos voláteis tenha diminuído, eles apresentaram grande variabilidade ao longo do tempo,

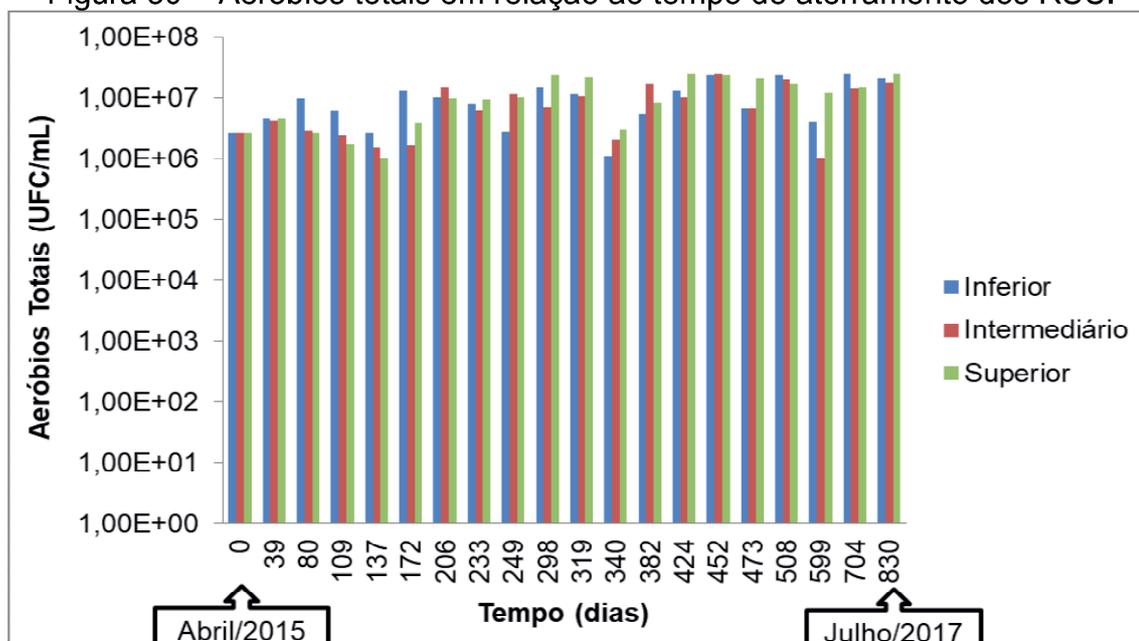
contudo, esse comportamento não interferiu no desenvolvimento dos microrganismos e na produção de biogás.

5.4.5 Quantificação de aeróbios totais

A Figura 30 ilustra a quantificação dos aeróbios totais na Célula experimental em relação ao tempo de aterramento dos RSU. Observa-se que as bactérias aeróbias estiveram presentes ao longo de todo o período de monitoramento, em concentrações que variaram de 10^6 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), sendo um indicativo da presença de microrganismos facultativos, que sobrevivem tanto na presença como na ausência do oxigênio molecular.

Diferentemente do que se esperava em um ambiente que simula um aterro sanitário, em que a maior parte dos processos de degradação ocorre em condições anaeróbias, a Célula experimental de RSU apresentou características diferenciadas com a presença de bactérias aeróbias, em todos os níveis (superior, intermediário e inferior). Esse comportamento pode estar atribuído à altura da massa de RSU e a entrada de ar pelos pontos laterais de coleta de RSU da Célula experimental, que não permitem um ambiente com condições totalmente controladas de anaerobiose.

Figura 30 – Aeróbios totais em relação ao tempo de aterramento dos RSU.



Com base no sequenciamento de DNA das amostras de RSU, caracterizou-se a presença de pelo menos três microrganismos aeróbios, quimiorganotróficos ou

aeróbios facultativos, representantes característicos das fases de hidrólise, acidogênese e acetogênese, entre eles, uma espécie não cultivável do gênero *Pseudomonas*, outra do gênero *Enterobacter* e a *Klebsiella pneumoniae*, todas pertencentes ao filo *Proteobacteria*. Nesse sentido, a presença de aeróbios totais é importante para o processo biodegradativo, visto que, esses microrganismos irão fornecer substratos que serão metabolizados pelas arqueas metanogênicas.

De acordo com Madigan et al. (2010) o gênero *Pseudomonas*, por exemplo, apresenta necessidades nutricionais bastante simples, crescendo quimiorganotroficamente em pH neutro e temperaturas na faixa mesofílica, o que foi verificado na maior parte do monitoramento da Célula experimental, onde as alterações foram relativamente pequenas para os dois indicadores.

Resultados semelhantes a dessa pesquisa, foram obtidos por Aires (2013) e Silva et al. (2015) que encontraram bactérias aeróbias em todas as camadas da Célula experimental, mesmo naquelas mais profundas, onde teoricamente deveria haver menor quantidade de oxigênio. Monteiro et al. (2006) relataram a presença de bactérias aeróbias totais nos RSU de Células cobertas há 5 anos no Aterro da Muribeca, em Recife-PE, associando este fato à entrada de oxigênio pelos sistemas de cobertura e drenagem de gases.

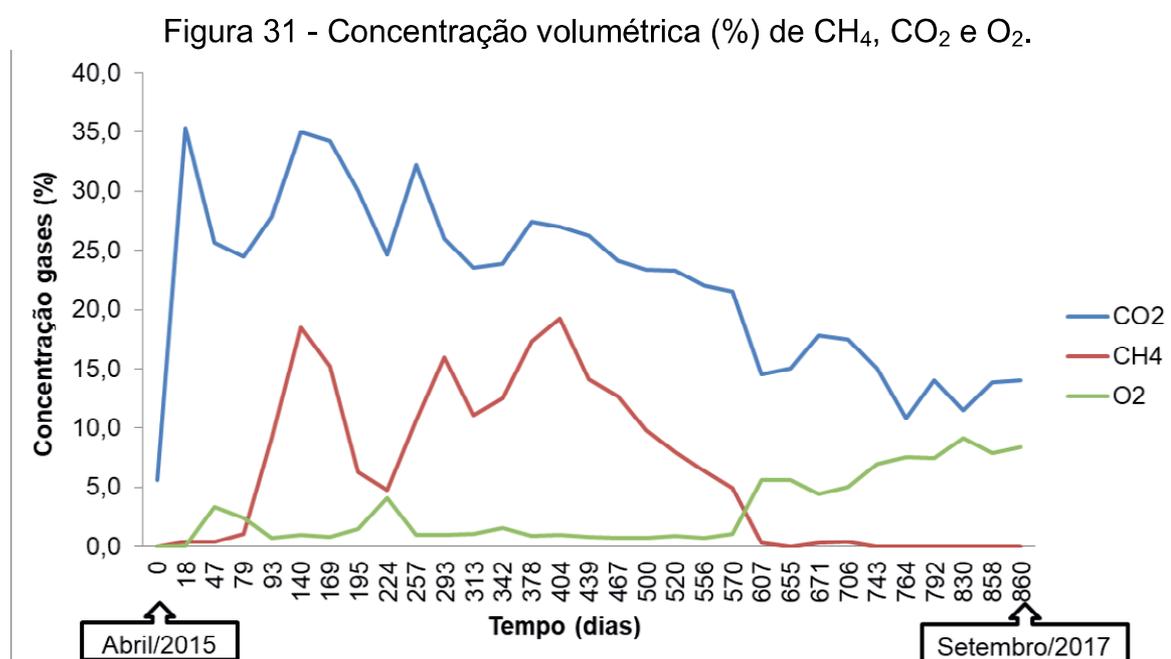
Para Aires et al. (2018) microrganismos aeróbios sofrem menor influência de fatores externos, quando comparados aos anaeróbios, visto que, são menos sensíveis a mudanças ambientais, fato que permite pequenas variações na contagem de suas colônias ao longo do tempo.

O monitoramento das concentrações de gases na Célula experimental mostrou que, embora outros gases estejam presentes neste ambiente, concentrações de oxigênio foram observadas ao longo do tempo de aterramento, contudo, em concentrações menores que 4% até 570 dias, após esse período, as concentrações de O₂ chegaram a 9% (Figura 31). Dentre os fatores intervenientes para esse fato ter ocorrido, pode-se citar as aberturas existentes nas laterais da Célula para coleta das amostras de resíduos, as fissuras na camada de cobertura de solo compactado e a percolação de águas pluviais que trazem consigo oxigênio dissolvido em sua composição.

5.5 Concentrações de biogás

Com o monitoramento dos gases produzidos durante o processo biodegradativo pode-se verificar a estabilidade dos resíduos orgânicos, analisar as fases de degradação dos resíduos sólidos e indicar o potencial de poluição ambiental. As concentrações dos gases resultantes da decomposição da matéria orgânica no interior da Célula experimental de RSU são ilustradas na Figura 31, em termos dos gases metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e oxigênio (O_2).

As concentrações dos gases monitorados no dreno da Célula experimental variaram de 0% a 19,8 % para CH_4 , com média de 6,5%, para o CO_2 as concentrações oscilaram de 5,6% a 35%, com média de 22,2% e para o oxigênio as concentrações variaram de 0% a 9,1%, com média de 3%.



De acordo com a Figura 31, no início do monitoramento foi observado um percentual elevado de CO_2 , devido ao processo de retroalimentação que aumentou a disponibilidade de nutrientes e a umidade na Célula experimental, favorecendo a degradação da massa de RSU pela atividade microbiana. Por volta do dia 140, o valor médio do pH dos RSU na Célula experimental era de 7,5 e a temperatura em torno de 28,2 °C, indicando o final da fase de transição do processo de degradação. Nessa fase, intensificou-se a produção de CO_2 , por ser gerado como um subproduto da fermentação da matéria orgânica.

Com relação às concentrações de O_2 na Célula experimental, pode-se dizer que permaneceram na maioria do período de monitoramento, em baixos percentuais (< 5%). No dia 224, verificou-se que o aumento da concentração de O_2

correspondeu a uma redução de CH₄, indicando o efeito inibitório do oxigênio na atividade metanogênica.

Elevadas concentrações de O₂ podem ser prejudiciais ao sistema, contudo, pequenas concentrações podem ser benéficas, desde que, não afetem o metabolismo dos microrganismos anaeróbios estritos (AIRES et al., 2017).

Foi observado que as concentrações de CO₂ prevaleceram sobre as de CH₄ e, embora o processo de retroalimentação tenha melhorado o desempenho da Célula experimental, não houve a predominância da fase metanogênica. Para Tchobanoglous et al. (1993), em aterros sanitários, esta fase apresenta concentrações médias de 40% para o CO₂ e 55% para o CH₄.

Mesmo tendo sido identificadas condições favoráveis de umidade, temperatura, pH e sólidos voláteis na Célula experimental, não houve elevada produção de biogás, tal fato pode estar associado à heterogeneidade dos resíduos, a fatores ambientais que as arqueas metanogênicas exigem para seu desenvolvimento, uma vez que, esses microrganismos são anaeróbios estritos, ou ainda, às dimensões da Célula experimental e as condições meteorológicas de Campina Grande-PB.

Vale ressaltar que, a partir de 607 dias, as concentrações de metano e dióxido de carbono foram reduzidas, enquanto que as de oxigênio aumentaram o que pode ser um indicativo da bioestabilização dos resíduos sólidos urbanos.

As concentrações de metano mensuradas durante o monitoramento da Célula experimental de RSU estão associadas à caracterização das arqueas metanogênicas, dos gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, indicando que a produção de metano foi, predominantemente, pela atividade acetoclástica e não hidrogenotrófica.

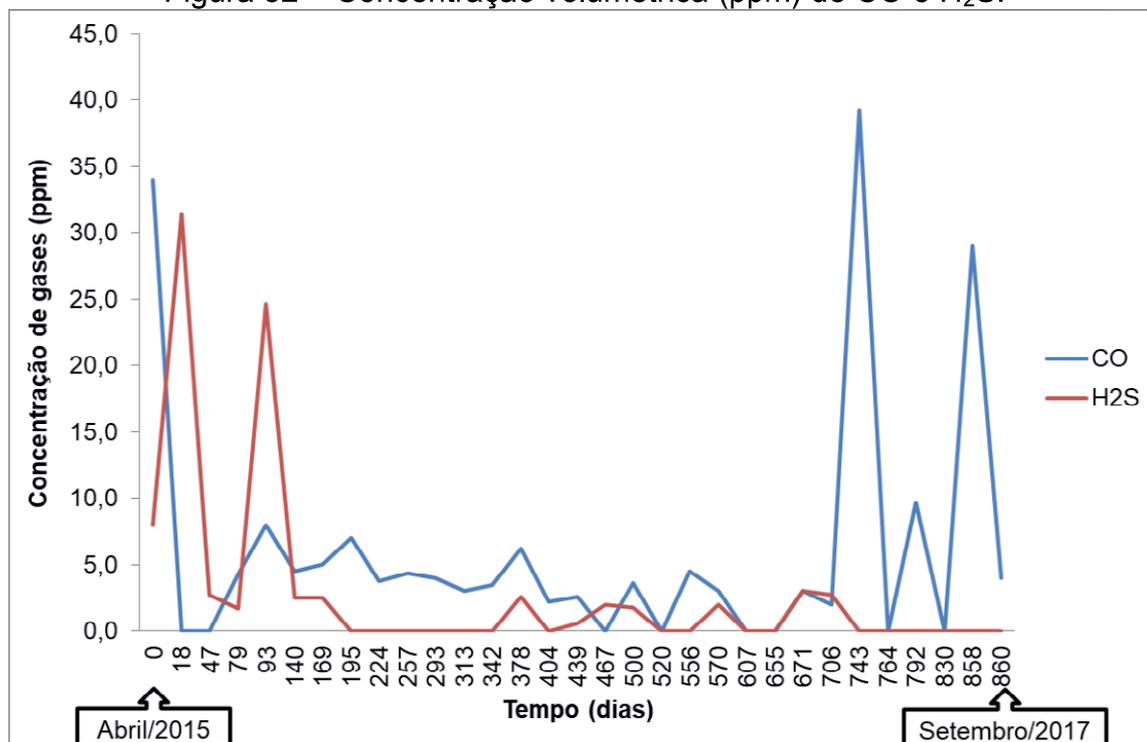
Entretanto, para verificar a participação de arqueas hidrogenotróficas, sugere-se que testes sejam realizados com primers específicos para as classes *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanocellales* e *Methanopyrales*, que não foram utilizados neste estudo, visto que, essas classes não são abundantes na biodegradação de RSU para formação do biogás.

Aa Figura 32 ilustra a concentração volumétrica (ppm) de monóxido de carbono (CO) e sulfeto de hidrogênio (H₂S) em função do tempo de aterramento dos RSU na Célula experimental.

As concentrações variaram entre 0 e 39 ppm para CO, com média de 6,5 ppm e de 0 a 31,4 ppm para o H₂S, com média de 2,8 ppm. Observou-se que as

concentrações de CO foram superiores às de H₂S na maior parte do monitoramento, com exceção de alguns picos de H₂S nos dias 18, 93 e 467.

Figura 32 – Concentração volumétrica (ppm) de CO e H₂S.



O monóxido de carbono é um gás insípido e inodoro, conhecido por suas características tóxicas. Este gás participa do ciclo global do carbono e está envolvido em vias assimilatórias e dissimilatórias de numerosos microrganismos, incluindo membros do domínio *Bacteria* e *Archaea*.

Na produção de biogás, o monóxido de carbono pode atuar como substrato para diferentes metabolismos anaeróbios fermentativos, produzindo compostos orgânicos como acetato, etanol, 2,3-butanodiol e butirato na acidogênese e acetogênese (DIENDER et al., 2015; DÜRRE; EIKMANN, 2015).

De acordo com a Resolução nº 03 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (1990), que trata do padrão de qualidade do ar, os limites das concentrações de CO não devem ultrapassar valores de 9 e 35 ppm para um tempo de exposição de 8 e 1h, respectivamente, mais de uma vez por ano. Quando as concentrações de CO estão na faixa de 9 a 15 ppm durante um período de 8h, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB (2006) indica que o ar possui qualidade inadequada e, quando estiverem acima de 400 ppm são consideradas potencialmente mortais.

A concentração máxima de CO na Célula experimental, constatada apenas no dia 743, foi 39 ppm e excedeu os padrões de qualidade do ar definidos pela CETESB (2006) e pelo CONAMA (1990). Entretanto, como os RSU na Célula experimental encontram-se aterrados, com uma camada de cobertura de solo compactado e, os ensaios realizados no ambiente externo não detectaram concentrações elevadas desse gás na atmosfera, os riscos associados ao tempo exposição são minimizados.

Entre as propriedades do CO, deve-se atentar aos limites de explosividade, pois, quando está presente no ar em concentrações que variam de 12,5% (125000 ppm) a 74 % (740000 ppm), este gás torna-se explosivo, o que pode acarretar em uma série de desastres ambientais, além de representar risco à saúde pública.

Existem poucas informações sobre o monóxido de carbono relacionado ao processo biodegradativo de RSU. Em várias amostras de gases coletadas no aterro Delta, na cidade de Campinas (SP), não foi detectada a presença de CO (ENSINAS, 2003). No aterro da Muribeca (PE), leituras indicaram concentrações de 10 a 28 ppm (MACIEL, 2009). No aterro sanitário de Campina Grande (PB), foram mensuradas concentrações de 16 a 428 ppm (GGA/UFCEG, 2017).

Vale ressaltar que, a medição do CO em equipamentos portáteis tipo Dräger está susceptível a erros, devido às dificuldades de mensuração desse gás, que é reativo e, na maioria das vezes, encontrado em baixas concentrações (ppm). Porém, diversos autores como Jucá et al. (2001), Alcântara (2007) e Aires et al. (2016) realizaram o monitoramento de gases em aterros sanitários e Células experimentais com esse equipamento e tiveram bons resultados.

O sulfeto de hidrogênio é um gás de odor forte, tóxico, que pode causar sérios danos à saúde humana e dos animais, que tem como principal fonte à decomposição anaeróbia de excrementos. Mesmo tendo uma baixa composição no biogás, cuja concentração típica é de 0 a 70 ppm, acredita-se que o H₂S participe da metanogênese (AIRES et al., 2016).

A formação de H₂S a partir da biodegradação de RSU resulta, principalmente, da conversão biológica de sulfato por bactérias redutoras de sulfato (BRS), que são consideradas anaeróbias obrigatórias. No entanto, alguns estudos mostraram que esse processo também pode ocorrer na presença de O₂ (LONG et al., 2016; DING et al., 2012; PANZA; BELGIORNO, 2010).

A concentração de H₂S na Célula experimental teve como valor máximo detectado 31,4 ppm, indicando à rápida biodegradação dos RSU, ocasionada pela

hidrólise, que correspondeu as medições iniciais (93 dias). Após esse período, foram mensuradas apenas, concentrações de H₂S abaixo de 2,7 ppm (Figura 32).

De acordo com Alcântara (2007), nos lisímetros preenchidos com RSU, localizados no aterro da Muribeca, em Pernambuco, foram verificadas concentrações de 150 a 448 ppm. No Aterro Metropolitano de Salvador-BA as concentrações variaram de 6 a 14 ppm. Nos aterros Vila Albertina, Santo Amaro e Bandeirantes, localizados em São Paulo, as concentrações máximas obtidas de H₂S foram de 39, 29 e 30 ppm, respectivamente (ENSINAS, 2003). No aterro sanitário de Campina Grande-PB, as concentrações oscilaram de 18 a 949 ppm (GGA/UFCG, 2017).

De acordo com Long et al. (2016), que estudaram o controle das emissões de H₂S em seis aterros sanitários simulados, por vias semi-aeróbias e anaeróbias, os gêneros de bactérias que metabolizam enxofre foram: *Desulfobulbus*, *Desulfofustis*, *Desulfomicrobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Halothiobacillus*, *Ochrobactrum*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus*. Os cinco primeiros gêneros são afiliados a bactérias redutoras de sulfato (BRS) e os que predominaram foram *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrio* em condições semi-aeróbias, enquanto que sob condições anaeróbias, as bactérias oxidantes de enxofre predominantes foram *Rhodococcus*, *Paracoccus*, *Ochrobactrum* e *Pseudomonas*. Nesse contexto, na Célula experimental de RSU foram caracterizados os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* que estão associados à fase de hidrólise.

Vale ressaltar que, a redução biológica de sulfato no processo biodegradativo de RSU é, em geral, considerada como indesejável, uma vez que, o sulfato oxida material orgânico que deixa de ser transformado em metano, formando o gás sulfídrico, que é corrosivo e confere odor muito desagradável ao biogás, além de poder ser tóxico para arqueas metanogênicas.

Segundo a Norma Regulamentadora 15 (NR-15), o limite máximo permitido de tolerância da exposição de seres humanos ao H₂S é de 8 ppm ou 12 mg/m³, até 48 horas por semana (BRASIL, 1977; BRASIL, 1978).

Durante o monitoramento do H₂S, observou-se que o comportamento desse gás, ultrapassou em poucas medições o valor máximo permitido, podendo representar risco à saúde pública, caso não houvesse a camada de solo compactado na Célula experimental, para minimizar os efeitos nocivos de exposição a esse gás. Vale ressaltar que, da mesma forma que o CO, as medições com o equipamento Dräger não detectaram concentrações elevadas de H₂S na atmosfera.

Dentre os fatores que afetam a migração do CO e do H₂S em aterros sanitários estão, o tipo de cobertura utilizada, a velocidade e a direção do vento, a umidade e a temperatura dos resíduos. De acordo com Gouveia e Prado (2010), viver em localidades próximas a aterros de resíduos sólidos significa estar exposto aos produtos tóxicos ali presentes. Dados da World Health Organization (WHO, 2000), afirmam que qualquer exposição potencial a contaminantes existentes em depósitos de resíduos sólidos, deve estar confinada a um raio de 1 km em via aérea e 2 km considerando-se a água como rota de exposição.

5.5.1 Ensaios realizados na camada de cobertura de solo compactado

Emissões fugitivas de CH₄ e CO₂, na camada cobertura de solo compactado em aterros sanitários, têm sido investigadas com maior intensidade, devido ao potencial de aquecimento global que esses gases possuem. De acordo com Solomon et al. (2007), o CH₄ é um dos gases de efeito estufa mais poderoso, com um potencial de aquecimento em torno de 20 vezes maior que o de CO₂. Desta forma, concentrações elevadas desses gases, oriundos do processo de biodegradação de RSU, em camadas de cobertura de aterros sanitários e Células experimentais, devem ser controladas e/ou mitigadas.

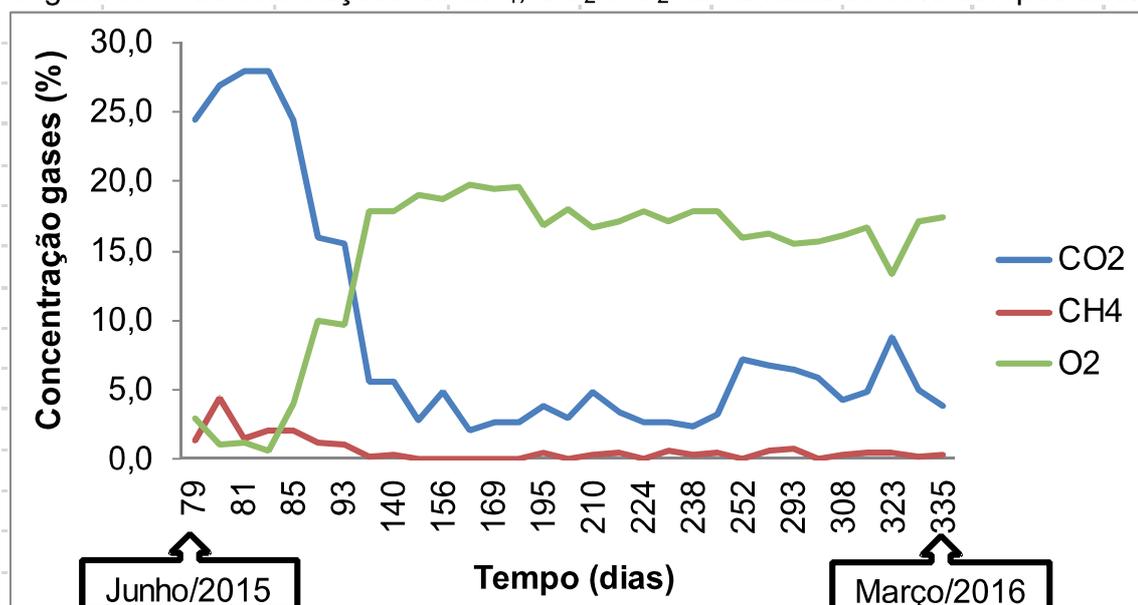
A Figura 33 ilustra o comportamento das concentrações de CH₄, CO₂ e O₂ pelo método placa de fluxo, na camada de cobertura de solo compactado da Célula experimental de RSU. Observou-se que as concentrações de CH₄ no início do monitoramento foram menores que 4,4% e, após 140 dias, foram praticamente nulas. Tal fato pode sugerir que o solo estava retendo CH₄ de forma satisfatória. Contudo, durante o monitoramento foram detectadas inúmeras fissuras na camada de cobertura de solo compactado próximas à placa, o que pode ter possibilitado o escape de biogás para a atmosfera por caminhos preferenciais.

Por outro lado, as concentrações de CO₂, atingiram valores próximos a 30% na fase inicial do monitoramento e, após 85 dias, as concentrações desse gás reduziram drasticamente, à medida que elevaram as concentrações de O₂. Com 140 dias de monitoramento o O₂ alcançou concentrações típicas desse gás na atmosfera, podendo ser um indicativo de entrada de ar na placa de fluxo.

De modo geral, as concentrações do biogás que passaram pela camada de cobertura de solo compactado, diferem das concentrações de biogás produzidas no interior da Célula experimental. Essa diferença pode estar associada às diversas

reações químicas e bioquímicas, que acontecem ao longo do fluxo ascendente do biogás em direção à camada de cobertura de solo. Dentre essas reações, destaca-se o processo de oxidação biológica do metano por bactérias metanotróficas presentes no solo (TEIXEIRA et al., 2009).

Figura 33 – Concentrações de CH₄, CO₂ e O₂ na camada de solo compactado.



Devido a problemas técnicos e operacionais durante o monitoramento, tais como, o aparecimento de fissuras no solo da camada de cobertura e imperfeições mecânicas na estrutura da placa de fluxo, os dados de concentração do biogás da camada de cobertura, não puderam ter continuidade, sendo interrompidas as medições após 335 dias de monitoramento.

Camadas de cobertura de solo compactado têm por objetivo minimizar o contato entre os resíduos aterrados e o meio externo. Os sistemas de cobertura são constituintes fundamentais dos aterros sanitários e auxiliam na redução da geração de lixiviado, na atração de vetores, na dispersão de gases e odores e, evitam o vazamento dos gases gerados na degradação da matéria orgânica para a atmosfera, além de favorecer a realização do processo biodegradativo e, conseqüentemente, a produção de biogás (ANTUNES et al., 2018).

Nesse contexto, foram realizados alguns ensaios geotécnicos de umidade, massa específica dos grãos, compactação e permeabilidade, para avaliação da camada de cobertura de solo compactado da Célula experimental de RSU, estando os resultados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Caracterização geotécnica do solo.

Indicadores geotécnicos	Resultados
Teor de umidade	$h = 3,474\%$
Massa específica dos grãos	$\delta = 26,36 \text{ kN/m}^3$
Compactação	$W_{\text{ótima}} = 13\%$ $\delta_{s,\text{máx}} = 19,42 \text{ kN/m}^3$
Permeabilidade	$K = 4,73 \times 10^{-8} \text{ m/s}$

Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Os resultados obtidos nos ensaios geotécnicos do solo apresentaram boas características de impermeabilidade da camada de cobertura de solo compactado da Célula experimental. A NBR 13896 (ABNT, 1997) considera um coeficiente de permeabilidade inferior a 10^{-8} m.s^{-1} . Segundo Mariano et al. (2007); Ferreira; Mahler (2006), o coeficiente de permeabilidade adequado para utilização de solos como camada de cobertura em aterros deve se situar na faixa de 10^{-5} a 10^{-9} m/s . A constante de permeabilidade à água, determinada pelo ensaio realizado por meio do permeâmetro de carga variável vertical foi de $K = 4,73 \times 10^{-8} \text{ m/s}$. Desta forma, pode-se inferir que o solo apresentou baixa permeabilidade, podendo ser usado como material para camada de cobertura e base da Célula experimental de RSU.

5.6 Análises estatísticas

5.6.1 Estatística descritiva

A Tabela 12 apresenta os valores máximo, mínimo, média, desvio padrão e coeficiente de variação dos indicadores monitorados na Célula experimental. A partir da análise de dispersão dos dados, percebe-se a ocorrência de uma alta variabilidade nos valores encontrados, indicada pelo coeficiente de variação.

Segundo Fonseca; Martins (1996) um coeficiente menor ou igual a 15% corresponde a uma baixa dispersão. Se o coeficiente de variação estiver entre 15 e 30% haverá uma média dispersão e, se maior que 30% uma alta dispersão.

De acordo com os dados da Tabela 12, foi observado que apenas os indicadores temperatura interna e externa e pH apresentaram coeficiente de variação inferior a 15%, que indica a alta homogeneidade dos dados. Com média dispersão foram identificados os indicadores umidade e sólidos voláteis. Todos os demais indicadores monitorados na Célula experimental apresentaram dispersão alta, indicando elevada variabilidade dos dados. Essa discrepância pode estar

associada à heterogeneidade dos RSU, pois sua composição variável não proporciona a obtenção de dados homogêneos, bem como as condições ambientais externas ao qual a Célula experimental está submetida.

Tabela 12 – Mínimo, máximo, média, desvio padrão e coeficiente de variação dos indicadores monitorados na Célula experimental.

DIAS	T ambiente	T interna	Aeróbios	pH	Umidade	Sól. Volát	CO ₂	CH ₄	O ₂	CO	H ₂ S
0	31,6	19,5	2,63E+06	5,6	45,1	45,1	5,6	0	0	34	8
39	31,1	30,8	6,29E+06	6,9	47,2	52,7	35,36	0,37	0,04	4,33	1,67
80	24,9	25	5,52E+06	6,8	53,2	48,5	25,67	0,43	3,3	8	24,67
109	26,7	25	4,14E+06	7,7	65,2	66,8	24,5	1,1	2,43	4,5	2,5
137	27,2	28,2	1,48E+06	7,5	74,7	63,4	27,83	9,13	0,77	5	2,5
172	31,4	30,5	6,11E+06	6,6	68,5	60,3	35	18,5	0,95	7	0
206	26,8	32	1,14E+07	6,6	54,9	57,7	34,25	15,2	0,85	3,75	0
233	31,2	33,8	7,83E+06	7,5	42,4	36,4	30	6,3	1,5	4,4	0
249	31,8	28	8,19E+06	7,2	47,1	48,8	32,2	10,6	0,96	4	0
266	26,6	31,9	1,51E+07	8,2	55,2	57,3	26	16	1	3	0
319	29,1	31,7	1,47E+07	7,4	55,1	54,3	23,5	11,1	1,07	3,5	0
340	26,5	31,2	2,04E+06	7,6	53,3	49,4	27,4	17,3	0,86	6,2	2,6
362	27	29,8	1,03E+07	8	60,7	60,1	27	19,3	0,95	2,25	0
424	25,8	26,7	1,60E+07	8,4	60,0	60,0	26,2	14,1	0,84	2,6	0,6
452	32,2	27,7	2,41E+07	8,3	54,5	54,4	24,13	12,7	0,7	0	2
473	26,7	26,8	1,15E+07	8,2	30,7	30,2	23,4	9,8	0,76	3,6	1,8
506	27,2	27,2	2,04E+07	7,9	29,9	32,2	21,5	4,9	1,1	3	2
569	30,5	26,4	5,68E+06	8	31,5	33,2	17,5	0,4	5	2	2,77
704	29,2	26,2	1,78E+07	7,5	20,0	21,4	10,83	0	7,53	9,7	0
830	26,5	26,2	2,13E+07	8,1	52,4	55,0	11,5	0	9,17	0	0
Máximo	32,2	33,8	2,41E+07	8,4	74,69	66,62	35,36	19,3	9,17	34	24,67
Mínimo	24,9	19,5	1,48E+06	5,6	20,01	21,41	5,6	0	0	0	0
Média	28,85	28,73	1,08E+07	7,5	50,06	49,35	24,47	8,36	1,99	5,54	2,56
Desv. padrão	2,19	3,06	6,82E+06	0,71	13,47	12,17	7,81	6,87	2,40	6,93	5,40
Coef. Var (%)	7,57	10,67	6,23E+01	9,44	26,91	24,67	31,90	82,10	120,80	125,01	211,33

A baixa dispersão observada na análise dos resultados de temperatura e pH, demonstraram uma circunstância esperada, em função das pequenas variações constatadas durante o monitoramento. A temperatura ambiente apresentou o menor coeficiente de variação (7,5%), mantendo-se esse indicador, na faixa mesofílica tanto no ambiente interno, quanto no externo à Célula experimental.

No caso do pH, o baixo coeficiente de variação (9,44%) das medições oscilaram próximo ao pH 7,0, o qual representa resultados positivos e significativos para a comunidade microbiana, uma vez que, o pH é um dos fatores mais importantes para o entendimento das dinâmicas e alterações ocorridas no interior da Célula experimental.

Os sólidos voláteis apresentaram valores diferenciados de amplitude e dados com média dispersão, com tendência à redução, visto que, à medida que o tempo passa, esse indicador converge para percentuais menores, em função do consumo da matéria orgânica, principalmente, pelas bactérias e arqueas metanogênicas.

A umidade associada a fatores climáticos e a degradação da fração orgânica dos RSU, apresentaram média dispersão, entretanto, os percentuais monitorados mostraram-se dentro da faixa adequada para desenvolvimento das comunidades microbianas, favorecendo o processo de biodegradação e a produção de biogás.

As bactérias aeróbias mostraram coeficiente de variação elevado de 62%, não apresentando comportamento tendencial, visto que, foram observadas quantificações dessas bactérias durante todo o monitoramento.

De maneira geral, todos os gases monitorados (CH_4 , CO_2 , O_2 , CO e H_2S) apresentaram coeficientes de variação maior que 30%. Tal fato está associado às diferentes fases de biodegradação dos RSU, que acarretaram em concentrações diferenciadas durante o processo; às diferentes idades de disposição dos RSU na Célula experimental; à composição física dos resíduos aterrados e ao comportamento dos indicadores físico-químicos ao longo do monitoramento.

Diante dos resultados obtidos, pode-se afirmar que é possível ocorrer o estabelecimento de mais de uma fase biodegradativa ao mesmo tempo, gerando diferenças entre as concentrações máximas e mínimas de cada componente do biogás. Assim, a Célula experimental de RSU reflete o comportamento de um aterro sanitário em escala real, em que as condições são conhecidas, entretanto, não são totalmente controladas.

5.6.2 Matriz correlação

A análise da correlação amostral estuda o comportamento conjunto de duas variáveis distintas, ao medir o grau de associação entre elas. De acordo com Hair Jr. et al. (2009) os coeficientes de correlação podem variar de -1,0 a 1,0. Na prática, quanto mais próximo de 1,0 (independentemente do sinal) maior é o grau de dependência estatística entre as variáveis (SILVA, 2016).

De acordo com Dancey; Reidy (2006) correlações entre 0,10 e 0,30 podem ser consideradas fracas; entre 0,40 e 0,60 podem ser consideradas moderadas; e valores entre 0,70 e 1,0 podem ser interpretados como fortes. Neste trabalho, serão consideradas e discutidas apenas correlações significativas moderadas e fortes, ou seja, aquelas que apresentaram valores $\pm 0,40$.

A significância estatística do coeficiente de correlação é determinada por sua comparação com o coeficiente crítico. Na Tabela 13 estão apresentados os dados da matriz de correlação.

De maneira geral, a Tabela 13 apresenta diversos indicadores que se correlacionaram, atingindo correlações fortes de 0,96. Foi observado que o tempo é um fator importante, que se relacionou forte e moderadamente com a maioria dos indicadores. Com o passar dos dias de monitoramento da Célula experimental, ocorreu o aumento do pH, dos aeróbios totais e das concentrações de O₂.

Entretanto, correlações negativas também foram observadas, entre o tempo e os indicadores umidade, sólidos voláteis, CO₂ e CO, visto que, com o passar dos dias a matéria orgânica vai sendo degradada e, conseqüentemente, esses indicadores tendem a serem reduzidos.

Tabela 13 - Matriz de correlação.

	DIAS	T ambiente	T interna	Aeróbios	pH	Umidade	Sól. Volát	CO ₂	CH ₄	O ₂	CO	H ₂ S
DIAS	1,00											
T ambiente	-0,06	1,00										
T interna	0,16	0,07	1,00									
Aeróbios	0,89	0,00	0,16	1,00								
pH	0,87	-0,22	0,36	0,54	1,00							
Umidade	-0,49	-0,16	0,08	-0,29	-0,09	1,00						
Sól. Volát	-0,44	-0,15	0,06	-0,18	-0,05	0,96	1,00					
CO ₂	-0,47	-0,03	0,82	-0,25	-0,01	0,46	0,44	1,00				
CH ₄	-0,06	-0,04	0,53	0,06	0,22	0,47	0,43	0,56	1,00			
O ₂	0,70	-0,09	-0,08	0,33	0,22	-0,35	-0,32	-0,57	-0,53	1,00		
CO	-0,43	0,23	-0,87	-0,41	-0,74	-0,12	-0,16	-0,49	-0,30	-0,16	1,00	
H ₂ S	-0,36	-0,34	-0,52	-0,31	-0,41	0,02	-0,05	-0,14	-0,38	0,04	0,34	1,00

Analisando a Tabela 13, pode inferir que pequenas variações de temperatura no interior da Célula experimental favoreceram as concentrações de CH₄ e CO₂. Foi verificada uma correlação moderada entre esses fatores, o que pode ser justificado pelo fato das arqueas metanogênicas exigirem, para seu desenvolvimento na produção de biogás, condições de temperatura mesofílica, o que foi observado no monitoramento da Célula experimental. Por outro lado, também foram verificadas correlações moderadas negativas, podendo-se inferir que, principalmente, no início do monitoramento, quando as temperaturas internas estavam mais baixas, as concentrações de CO e H₂S estavam mais elevadas.

O pH também apresentou correlação moderada positiva com os aeróbios totais e negativa com as concentrações de CO e H₂S, indicando que um consórcio sintrófico de microrganismos está presente na massa de RSU e, dependendo da comunidade microbiana e da composição dos resíduos, o processo biodegradativo pode ser realizado em faixas ácidas, neutras e básicas por bactérias e arqueas (SOLLI et al., 2014).

O teor de sólidos voláteis e a umidade se relacionaram fortemente e, também apresentaram correlações moderadas e positivas com as concentrações de CO_2 e CH_4 . Para Schirmer et al. (2015), resíduos com alto conteúdo de matéria orgânica, possuem maior potencial de produção de gases. À medida que as populações microbianas realizam a biodegradação dos RSU, intensifica-se a liberação de água e, desta forma, maiores proporções de umidade são correlacionadas às taxas de biodegradação dos resíduos.

A fase metanogênica é caracterizada como a etapa final do processo de biodegradação dos RSU, em que os principais produtos são CO_2 e CH_4 . Nesse contexto, uma correlação moderada positiva foi obtida entre esses gases, que compõem a maior parcela do biogás.

Correlações moderadas negativas foram observadas entre CO_2 e CH_4 e os demais gases (O_2 , CO e H_2S) que foram monitorados, o que já era esperado, uma vez que, os microrganismos envolvidos de gradação da matéria orgânica são, preferencialmente, anaeróbios estritos e necessitam de condições ótimas para seu metabolismo. Apesar de serem considerados gases traços na proporção do biogás o O_2 , CO e H_2S em elevadas concentrações, podem inibir a metanogênese.

5.6.3 Análise de Componentes Principais (ACP)

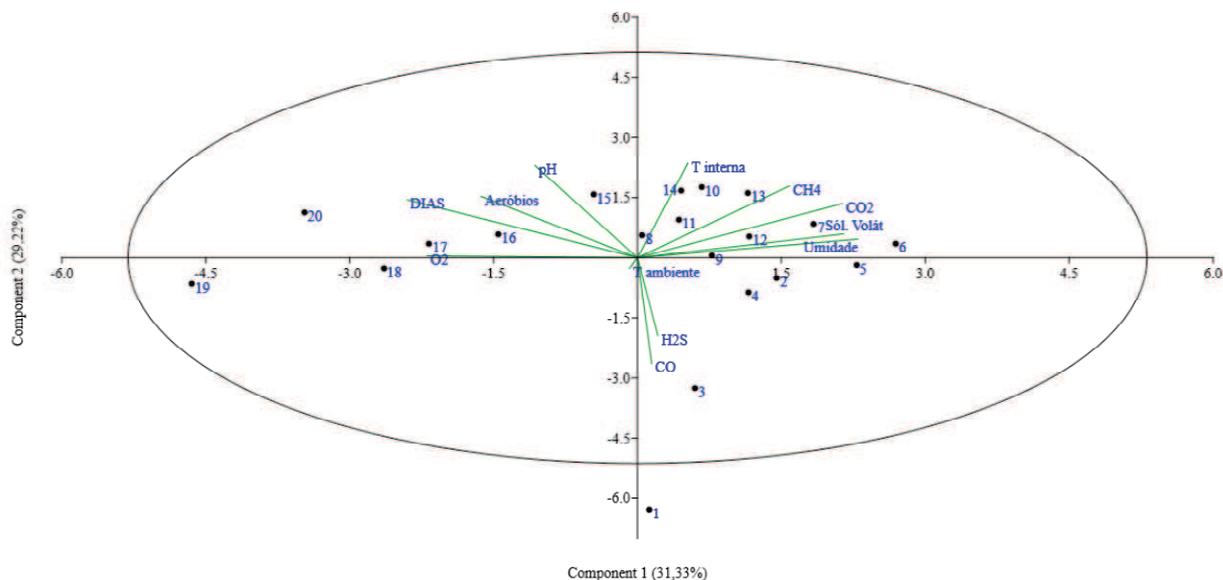
A Análise de Componentes Principais (ACP) ilustrada na Figura 34 tem o objetivo de explicar a estrutura da variância de um conjunto de variáveis, por meio de componentes artificiais formadas por combinações lineares das variáveis originais. Um conjunto pequeno de componentes (as principais) deve explicar a maior parte da variância do conjunto amostral.

Analisando a Figura 34, foi verificado que a primeira componente explica 31,33% da variabilidade dos dados, enquanto que a segunda explica 29,22%. Desta forma, as duas primeiras componentes principais explicaram 60,55% da variação total dos dados, mostrando que o mapa percentual bidimensional apresentado está adequado para avaliar as relações entre as variáveis, uma vez que, se busca uma explicação maior que 50% nas duas primeiras componentes.

De acordo com a Figura 34, os números de 1 a 20 correspondem às amostras de RSU, no período de 0 a 830 dias, que totalizaram 20 amostras durante o monitoramento. A maioria das amostras analisadas se agruparam próximas umas das outras, com exceção das amostras 1, 3, 18, 19 e 20, que estão relativamente

dispersas, indicando que essas amostras, iniciais e finais do monitoramento, explicaram uma menor parte das variações espaciais que ocorreram no interior da Célula de resíduos.

Figura 34 – ACP das variáveis monitoradas na Célula experimental de RSU.



Os vetores da componente principal 1, agruparam as variáveis temperatura interna, CH_4 , CO_2 , sólidos voláteis e umidade. Indicando que as amostras numeradas de 6 a 14 são referentes ao período de monitoramento de 172 a 424 dias. Nesse período específico, as variáveis da componente principal 1, explicaram a maior parte das variações espaciais na Célula experimental da RSU.

Os resultados da análise estatística multivariada demonstraram alguns indicadores muito distintos como CO e H_2S , que apresentaram relação negativa com O_2 , dias, pH e aeróbios, no entanto, esses indicadores foram associados positivamente entre si, na componente principal 2, com as amostras 15, 16 e 17 que correspondem ao período de monitoramento referente aos dias 452, 473 e 508.

De modo geral, as análises estatísticas serviram de subsídio para elucidar o comportamento das variáveis monitoradas na Célula experimental, explicando o processo biodegradativo dos resíduos sólidos urbanos ao longo do tempo de aterramento e, conseqüentemente, a produção de biogás por meio da atividade microbiana.

6 CONCLUSÕES

- A composição física dos RSU de Campina Grande-PB, mostrou-se favorável à produção de biogás e a heterogeneidade dos resíduos contribuiu de forma direta para as comunidades de bactérias e arqueas na Célula experimental.
- As diferentes metodologias utilizadas para extração de DNA (Kit e CTAB) apresentaram distintas integridades, rendimentos e purezas, no entanto, o método CTAB obteve maior rendimento, indicando que esse método é viável e de baixo custo para extrações de DNA em amostras de RSU.
- A caracterização bacteriana possibilitou encontrar membros em nível de gênero e espécie, alguns ainda não cultiváveis, como: *Uncultured Pseudomonas sp.*, *Uncultured bacterium*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Uncultured Bacillus sp.*, sugerindo que nos RSU existem representantes ainda desconhecidos e/ou não isolados, que participaram dos processos de hidrólise, acidogênese e acetogênese.
- Foram detectadas as arqueas *Methanosarcina flavescens*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina spelaei* e *Methanosaeta concilii*, que são metanogênicas acetoclásticas, sugerindo que a síntese de metano na biodegradação dos RSU de Campina Grande-PB seja realizada, principalmente, por microrganismos que metabolizam acetato.
- A sequência amplificada com o primer específico para *Methanosarcinaceae*, apresentou elevada identidade com as sequências do gene RNAr 16S de *Methanosarcina spelaei*, desta forma, as sequências de nucleotídeos estão depositadas no banco de dados do GenBank/NCBI, fornecendo subsídios para outras pesquisas relacionadas, tendo como número de acesso MH793496.
- Os indicadores físico-químicos monitorados na Célula experimental, foram propícios à biodegradação dos RSU e à produção de biogás, tendo sido constatadas temperaturas mesofílicas, pH neutro, sólidos voláteis e umidade elevadas, que são condições importantes para o desenvolvimento do metabolismo das comunidades microbianas caracterizadas.
- A presença de bactérias aeróbias totais na Célula experimental está associada a representantes quimiorganotróficos ou aeróbios facultativos, característicos das fases de hidrólise, acidogênese e acetogênese, além da contribuição de fatores externos como aberturas laterais para coleta das amostras de RSU, fissuras na camada de cobertura de solo compactado e percolação de águas pluviais.

- A produção de biogás foi estimulada com a retroalimentação da Célula experimental, que após o preenchimento com novos resíduos, obteve um percentual de 46,5% de material putrescível, entretanto, o metano atingiu concentrações máximas em torno de 20%.
- As concentrações de CO₂ prevaleceram sobre as de CH₄, durante todo o período de monitoramento, indicando o efeito inibitório que o oxigênio pode ocasionar na atividade das arqueas metanogênicas.
- Maiores concentrações de O₂ e CO foram encontradas após 607 dias de monitoramento da Célula experimental, sugerindo que valores elevados desses gases sejam associados ao final da fase metanogênica e/ou à RSU parcialmente estabilizados.
- O solo utilizado na Célula experimental de RSU apresentou baixa permeabilidade $4,73 \times 10^{-8}$ m/s, sendo eficiente quanto à impermeabilização das camadas de base e cobertura, evitando emissões fugitivas para atmosfera, de gases que contribuem para o efeito estufa, como é o caso do biogás.
- As análises estatísticas comprovaram o comportamento multivariado dos indicadores monitorados na Célula experimental, resultante da atividade microbiana associada à produção de biogás e aos processos biodegradativos dos RSU ao longo do tempo de aterramento.
- Os resultados deste estudo podem contribuir para futuros projetos e operação de aterros sanitários, visto que, foi observado um comportamento semelhante, apesar das condições peculiares da geometria imposta às diferentes escalas (real e experimental).
- As interações microbianas na Célula experimental de RSU forneceram informações privilegiadas a respeito das vias de síntese do metano, podendo servir de subsídios para aceleração do processo biodegradativo, quando o objetivo for a utilização do biogás para fins energéticos.

REFERÊNCIAS

- ABELL, G. C.; BOWMAN, J. P. Ecological and biogeographic relationships of class *Flavobacteria* in the Southern Ocean. **Microbiol Ecol.** v. 51, n. 2, 2005. p. 265-277.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6457:** Amostras de solo – Preparação para ensaios de compactação e caracterização. Rio de Janeiro, 2016.
- _____**NBR 6458:** Grãos de pedregulho retidos na peneira de abertura 4,8 mm - Determinação da massa específica, da massa específica aparente e da absorção de água. Rio de Janeiro, 2016. 10p.
- _____**NBR 7182:** Compactação - Procedimento. Rio de Janeiro, 2016. 9p.
- _____**NBR 8419:** Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos. Rio de Janeiro, 1992. 7p.
- _____**NBR 10004:** Resíduos Sólidos – classificação. Rio de Janeiro, 2004. 74p.
- _____**NBR 10006:** Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004. 3p.
- _____**NBR 10007:** Resíduos Sólidos – amostragem de Resíduos. Rio de Janeiro, 2004.
- _____**NBR 13896:** Aterros de resíduos não perigosos - Critérios para projeto, implantação e operação. Rio de Janeiro, 1997.
- _____**NBR 14545:** Solo: determinação do coeficiente de permeabilidade de solos argilosos a carga variável. Rio de Janeiro, 2000. 12p.
- ABRELPE. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil.** Grappa Editora e Comunicação, 2016.
- ABREU, E. F. **Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário.** 2007. 105p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais-MG.
- ADEYEMI, O.; OLOYEDE, O.; OLADIJI, A. Physicochemical and microbial characteristics of leachate-contaminated groundwater. **Asian. J. Biochem.** v. 5, 2007. p. 343-349.
- AESA.** Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba. Disponível em: <<http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/sort.do?layoutCollection=0&layoutCollectionProperty=&layoutCollectionState=3&pageNumber=0>>. Acesso em 12/11/2013.
- AIRES, K. O. **Monitoramento das concentrações de gases em uma célula experimental de resíduos sólidos urbanos na cidade de Campina Grande – PB.**

118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba. 2013.

AIRES, K. O.; ALMEIDA, M. A. V.; GOMES, N. A.; MONTEIRO, V. E. D.; MELO, M. C. Concentrações de dióxido de carbono e oxigênio associadas à quantificação de aeróbios totais na biodegradação de resíduos sólidos urbanos. **In: Anais III Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino de Ciências**. Campina Grande, Paraíba-PB, 2018. v. 1 p. 1-4.

AIRES, K. O.; GUEDES, M. J. F.; CELESTINO, M. A. S.; ARAÚJO NETO, C. L.; MONTEIRO, V. E. D. Análise das concentrações de CO e H₂S provenientes da biodegradação dos resíduos sólidos urbanos. **In: Anais I Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino de Ciências**. Campina Grande, Paraíba-PB, 2016. v. 1 p. 1-5.

AIRES, K. O.; MOREIRA, F. G.; GUEDES, M. J. F.; SANTOS, J. J. N.; MELO, M. C. Composição física dos resíduos sólidos urbanos na produção de biogás em uma célula experimental. **In: Anais II Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino de Ciências**. Campina Grande, Paraíba-PB, 2017. v. 1 p. 1-5.

AKARSUBASI, A. T.; INCE, O.; KIRDAR, B. OZ, N. A.; ORHON, D.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M.; INCE, B. K. Effect of wastewater composition on *Archaea* population diversity. **Water Research**. v. 39, 2005. p. 1576-1584.

ALCÂNTARA, P. B. **Avaliação da Influência da Composição de Resíduos Sólidos Urbanos no Comportamento de Aterros Simulados**. 2007. 366p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

ALVES, F. S. **Influência das condições meteorológicas na biodegradação dos resíduos sólidos urbanos em Campina Grande-PB**. 2012. 146p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande-PB.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHKEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.** v. 59, 1995.

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22 ed. Washington, 2012.

ANDERSON, T. H. Microbiol eco-physiological indicators to asses soil quality. **Agriculture Ecosystems and Environment**. Amsterdam, 2003. v. 98. p. 285-293.

ANTUNES, I. S.; SANTOS, J. J. N.; AIRES, K. O.; GUEDES, M. J. F.; MONTEIRO, V. E. D. Caracterização do solo e propriedades de fluxo da camada de cobertura de aterro sanitário de Campina Grande – PB. **In: Anais III Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino de Ciências**. Campina Grande, Paraíba-PB, 2018. v. 1. p. 1-5.

APINE, O. A.; JADHAV, J. P. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. J. **Appl. Microbiol.** v.110, 2011. p.1235–1244.

ARCHER, D. B.; KIRSOP, B. H. The microbiology and control of anaerobic digestion. In: **Anaerobic digestion: a waste treatment technology**. p. 43-91, 1990.

ARMOUGOM, F.; HENRY, M.; VIALETES, B.; RACCAH, D.; RAOULT, D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. **PLoS One**, 2009. v. 4, p. 7125.

BANCO MUNDIAL. **Manual para a Preparação de Gás de Aterro Sanitário para Projetos de Energia na America Latina e Caribe (2003)**. Disponível em: <http://www.bancomundial.org.ar/lfg/gas_access_po.htm>. Acesso em Dezembro/2016.

BARR, S.; GUILBERT, S.; METCALFE, A.; RILEY, M.; ROBINSON, G. M.; TUDOR, T. L. Beyond recycling: An integrated approach for understanding municipal waste management. **Applied Geography**, v. 39, 2013. p. 67-77.

BATTUMUR, U.; YOON, Y.; BAE, G. S.; KIM, C. H. Isolation and characterization of new *Methanosarcina mazei* strains KOR-3, -4, -5, and-6 from an anaerobic digester using pig slurry. **Asian-Australas J Anim Sci**. v. 30. n. 8, 2017. p. 1198–1205.

BEAL, R.; BETTS, W. B. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Appl Microbiol**. 2000, v. 89, p.158–168.

BIANCO, C. I.; VILELA, F. R.; GUERMANDI, J. I.; SCHALCH, V. Caracterização da comunidade de procariotos atuante no processo de biometanização da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos. **Anais 28º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro, 2015.

BOON, N.; MARLÉ, C.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W. Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. **Applied Microbiology and Biotchnology**. v. 53, 2000. p. 742-747.

BORBA, S. M. P. **Análise de Modelos de Geração de Gases em Aterros Sanitários – Estudo de Caso**. 2006. 149 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.

BORGLIN, S. E.; HAZEN, T. C.; OLDENBURG, C. M.; ZAWISLANSKI, P. T. Comparison of Aerobic and Anaerobic Biotreatment of Municipal Solid Waste. **J. Air & Waste Manage. Assoc**. v. 54. 2004.

BRASIL. **Lei nº 12.305**, de 02 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos-PNRS. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 ago. 2010.

BRASIL. **Norma Regulamentadora 15 (NR-15)**, Aprovada pela Portaria n. 3.214, de 8 de junho de 1978.

BRASIL. **Segurança e Medicina do Trabalho**, Lei n. 6.514, de 22 de dezembro de 1977.

BREATHNACH, A. S.; CUBBON, M. D.; KARUNAHARAN, R. N.; POPE, C. F.; PLANCHE, T. D. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in two hospitals: association with contaminated hospital waste-water systems. **Journal of Hospital Infection**. v. 82, 2012. p. 19-24.

BRITO, L. G. et al. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA celular a partir de adultos de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, 2004. p. 168-172.

BUZZINI, A. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B., PIRES, E. C. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 168-176, 2006.

CAIRÓ, J.; CLARENS, M.; TOUZEL, J. P.; BARDULET, M.; PARÍS, J. M. *Methanosarcina mazei* JC2, uma nova cepa metanogênica isolada de sedimentos de lagos, que não utiliza H₂/CO₂. **Microbiologia** (Madrid, Espanha), v. 8, 1992. p. 21-31.

CALLI, B.; MERTOGLU, B.; ROEST, K.; INANC, B. Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. **Bioresource Technology**. v. 97, 2005. p. 641-647.

CANHOS, V. P. et al. Diversidade no domínio bactéria. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. (orgs). Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. **Microrganismos & Vírus**. São Paulo: FAPESP, v. 1, 1997. p.1-13.

CARBONE, S. R. et al. Bacterial population of a two-phase anaerobic digestion process treating effluent of cassava starch factory. **Environmental Technology**, v. 23, n. 5, p. 591– 597, 2002.

CARVALHO, J. L. V.; JESUS, S. C.; PORTELLA, R. B. Composição gravimétrica dos resíduos sólidos domiciliares e comerciais do centro da cidade de barreiras – BAHIA. **Revista Chão Urbano Ano X**. Rio de Janeiro, 2010.

CASAMAYOR, E. O.; SHÄFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C; MUYZER, G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, 2000. p. 499-508.

CASSERLY, C.; ERIJMAN, L. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 52, 2003. p. 7-12.

CASSINI, S. T.; VAZOLLER, R. F.; PINTO, M. T. Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do biogás. Rio de Janeiro: ABES, RIMA, 2003. p. 1-9.

CASTILHOS JR, A. B. (Coordenador). **Resíduos Sólidos Urbanos: Aterro sustentável para cidade de pequeno porte**. Projeto PROSAB - RIMA, ABES. Rio de Janeiro. 294p. 2003.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Análises Microbiológicas da Água**. São Paulo, 2004. p. 36-49.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. São Paulo: CETESB, 2. ed., 2006.

CHEN, M. L.; TSEN, H. Y. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. **J Appl Microbiol**. v. 92, 2002. p. 912-919.

CHERNICHARO C. A. L. **Reatores Anaeróbios - Cap. 2 - Fundamentos da Digestão Anaeróbia**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2000.

CHOUARI, R.; PASLIER, D. L.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WESSENBACH, J.; SGHIR, A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. **Environmental Microbiolgy**. v. 7, n. 8, 2005. p. 1104-1115.

COLMANETTI, J. P.; BERNARDES, R. S.; PALMEIRA, E. M. Uso de Reatores de Batelada para Digestão Anaeróbia de Resíduos Sólidos Municipais. **Anais XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Porto Alegre, 2000.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 3 de 28/06/90: dispõe sobre os padrões de qualidade do ar e concentrações de poluentes atmosféricos, 1990.

CONDER - Companhia de Desenvolvimento Urbano no Estado da Bahia. **Manual de Operação de Aterro Sanitário**. 2007.

CONKLIN A., STENSEL HD, FERGUSON J. Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. **Water Environ Res**. v. 78, 2006. p. 486–496.

CUNHA, J. E. de B. L.; RUFINO, I. A. A.; IDEIÃO, S. M. A. **Determinação da temperatura de superfície na cidade de Campina Grande-PB a partir de imagens do satélite Landsat 5-TM**. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, XIV, 2009, Natal-RN. Anais... Natal: XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 2009, INPE, p. 5717-5724.

DANCEY, C; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed, 2006.

DEBBY, B. D.; GANOR, O.; YASMIN, M; DAVID, L.; NATHAN, K.; ILANA, T.; DALIT, S.; SMOLLAN, G.; GALIA, R. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 31, 2011. p.1811–1817.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1983. p.19-21.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 173–190, 2008.

DÍAZ, L. F.; SAVAGE, G. M.; EGGERTH, L. L. Alternatives for the treatment and disposal of healthcare wastes in developing countries. **Waste Management**. v. 25, p. 626–637, 2005.

DIENDER, M.; STAMS, A. J.; SOUSA, D. Z. Pathways and bioenergetics of anaerobic carbon monoxide fermentation. **Front. Microbiol.** 2015, v. 6, p. 1275.

DIEZ, B. C.; PEDROS-ALIO, T. L.; MARSH R. M. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. **Appl Environ Microbiol.** v. 67, 2001. p. 2942-2951.

DING, Y. et al. Characterization and control of odorous gases at a landfill site: A case study in Hangzhou, China. **Waste Manage.** 2012, v. 32, p. 317–326.

DOLOMAN, A.; SOBOH, Y.; WALTERS, A. J.; SIMS, R. C.; MILLER, C. D. Qualitative Analysis of Microbial Dynamics during Anaerobic Digestion of Microalgal Biomass in a UASB Reactor. **International Journal of Microbiology**, 2017, p. 1-12.

DÜRRE, P.; EIKMANN, B. J. C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. **Curr. Opin. Biotechnol.** 2015, v. 35, p. 63–72.

ECOSAM. Empresa de Consultoria em Saneamento Ambiental. Plano municipal de gestão integrada de resíduos sólidos do município de Campina Grande – PB: Diagnóstico da situação atual dos resíduos sólidos urbanos. 2014. 289p. Disponível em: <http://sesuma.org.br/estudos/Diagnostico_2204_VF.pdf> Acesso em: Maio/2016.

ECOSOLO. Dados do monitoramento do Aterro Sanitário de Campina Grande: ano 2016. Campina Grande: ECOSOLO, 2016. (Documento impresso).

EFUNTOYE, M. O.; BAKARE, A. A.; SOWUNMI, A. A. Virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* from landfill leachate. **African Journal of Microbiology Research**. v. 523, 2011. p.3994-3997.

ENSINAS, A. V. **Estudo da geração de biogás no aterro sanitário Delta em Campinas – SP.** 2003. 145p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-SP.

FERREIRA, M. A. S.; MAHLER, C. F. Avaliação do Solo das Camadas de Cobertura Intermediárias e Finais Estudo de Caso. In: **COBRAMSEG**, 2006.

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

- FIRMO, A. L. B. **Estudo numérico e experimental da geração de biogás a partir da biodegradação de resíduos sólidos**. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- FONSECA, J. S.; MARTINS, G. A. **Curso de Estatística**. Editora Atlas. 6 ed. 1996.
- GANDOLLA, M.; ACAIA, C.; FISCHER, C. Formazione, captazione e sfruttamento di biogás in discariche, Seminario di Aggiornamento. **Collana Ambiente**. v. 18, C.I.P.A, Milão, Itália, 1997.
- GANZERT, L.; SCHIRMACK, J.; ALAWI, M.; MANGELSDORF, K.; SAND, W.; HILLEBRAND-VOICULESCU, A.; WAGNER, D. (2014). *Methanosarcina spelaei* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a floating biofilm of a subsurface sulphurous lake. **Int J Syst Evol Microbiol** 64, 3478–3484.
- GARCÍA, J. Q. **Producción de metano en ambientes hipersalinos: diversidad microbiana, estructura y función de la comunidad de arqueas metanógenas**. La Paz (California): Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2014.
- GGA/UFCCG. Grupo de Geotecnia Ambiental da Universidade Federal de Campina Grande-PB. **Relatório do Monitoramento do Aterro Sanitário de Campina Grande – PB**. N° 002/2017.
- GHALY, A.E. A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two-stage reactor. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 61-72, 1996.
- GLASEL, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. **Biotechniques**. v. 18, 1995. p. 62–3.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; NIETO-DIEZ, P. P.; LEON-COFRECES, C.; GARCIA-ENCINA, P. A. Solids and nutrients removal from liquid fraction of swine manure slurry through screening and flocculation treatment and influence of these processes on anaerobic biodegradability. **Bioresour Technol**. 2008, v. 99, p. 6233–6239.
- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracelular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, 2007. p. 135-141.
- GOUVEIA, N.; PRADO, R. R. Riscos à saúde em áreas próximas a aterros de resíduos sólidos urbanos. **Revista Saúde Pública [online]**. v. 44, n. 5, 2010. p. 859-866.
- GRADY JR, C. P. L.; DAIGGER, G. T.; LIM, H. C. 1999. **Biological wastewater treatment**. New York: Marcel Dekker. 1076 p.
- GRISEY, E.; BELLE, E.; DAT, J.; MUDRY, J.; ALEYA, L. Survival of pathogenic and indicator organisms in groundwater and landfill leachate through coupling bacterial enumeration with tracer tests. **Desalination**. v. 261, 2010. p. 162–168.
- GROTEHUIS, J. T. C.; SMIT, M.; PLUGGE, C. M.; YUANSHENG, X.; LAMMEREN, A. A. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Bacteriological composition and

structure of granular sludge adapted to different substrate. **Appl. Environ. Microbiol.** 1991. v. 57. p. 1942–1949.

HAIR Jr., J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6 ed. Porto Alegre, Bookman, 2009. 688 p.

HASANUZZAMAN, M.; UMADHAY-BRIONES, K. M.; ZSIROS, S. M.; MORITA, N.; NODASAKA, Y.; YUMOTO, I.; OKUYAMA, H. Isolation, identification and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. **Curr Microbiol.** 2004, v. 49 p. 108–114.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v. 35, 1998. p. 1-21.

HINOJOSA, M. A. G.; QUINTAES, B. R.; CAMPOS, J. C.; MIGUEL, M. A. L. Uso de Ferramentas Moleculares para Estudos de Comunidades Microbianas em Lixiviado de Aterro de Resíduos Sólidos Urbanos. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**. n. 31, 2014.

HUANG, S.; ZHANG, H. The Impact of Environmental Heterogeneity and Life Stage on the Hindgut Microbiota of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **PLOS ONE**. v. 8, n. 2, 2013. 14p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Contagem Populacional**. 2017.

IGONI, A. H.; AYOTAMUNO, M. J.; EZE, C. L.; OGAJI, S. O. T.; PROBERT, S. D. Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid-waste. **Applied Energy**, 2008, v. 85, n. 6, p. 430-438.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. **Dados históricos: BDMPE – Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em julho de 2018.

INSTRUCTION MANUAL. (2013). Marcador 1 kb Plus DNA Ladder. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10787018>>. Acesso em: Janeiro/2017.

JING, H.; CHEUNG, S.; ZHOU, Z.; WU, C.; NAGARAJAN, S.; LIU, H. Spatial Variations of the Methanogenic Communities in the Sediments of Tropical Mangroves. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9. 2016. p. 1-18.

JONES, W. J. 1991. Diversity and physiology of methanogens, p 219–235. In Rogers J E, Whitman W B (ed), **Microbial production and consumption of greenhouse gasses: methane, nitrogen, oxides, and halomethanes**. ASM Press, Washington, DC.

JUCÁ, J. F. T; FUCALE, S. P.; MACIEL, F. J. Monitoramento Ambiental de Gases em Aterros de Resíduos Sólidos. In: **21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Vila Velha, Espírito Santo, 2001.

JUCÁ, J. F. T.; MARIANO, M. O. H.; ALVES, M. C. M.; MACIEL, F. J.; LINS, E. A. M. Feasibility of gas recovery from the Muribeca Landfill-Brazil. In: **Tenth International Waste Management and Landfill Symposium S. Margherita di Pula**. Cagliari. Italy. 2005.

KELLY, R.J. **Solid waste biodegradation enhancements and the evaluation of analytical methods used to predict waste stability**. Thesis (Master in Science) - Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2002. 66f.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agricult. Ecosyst. Environ.** v. 74. 1999. p. 65.

KERN, T.; FISCHER, M. A.; DEPPENMEIER, U.; SCHMITZ, R. A.; ROTHER, M. *Methanosarcina flavescens* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a full-scale anaerobic digester. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2016 v. 66, p. 1533–1538.

KEYSER, M.; WITTHUHN, R. C.; LAMPRECHT, C.; COETZEE, M. P. A.; BRITZ, T. J. PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 77-84, 2006.

KIM, T. G.; JEONG, S. Y.; CHO, K. S. Development of droplet digital PCR assays for methanogenic taxa and examination of methanogen communities in full-scale anaerobic digesters. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2014. p. 1-14.

KJELDSEN, P.; BARLAZ, M. A.; ROOKER, A. P.; BAUN, A.; LEDIN, A.; CHRISTENSEN, T. H. Present and long-term composition of municipal solid leachate. Critical Reviews. **Environmental Science and Technology**. v. 32, n. 4, 2002. p. 297-336.

KLAMMER, S.; KNAPP, B.; INSAM, H. Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. **Waste Management Res.** v. 26, 2008. p. 173.

KLOCKE, M.; M'AHNERT, P.; MUNDT, K.; SOUIDI, K.; LINKE, B. Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. **Systematic and Applied Microbiology**, 2007, v. 30, n. 2, p. 139–151.

KOUSSEMON, M.; COMBET-BLANC, Y.; PATEL, B. K. C.; CAYOL, J. L.; THOMAS, P.; GARCIA, J. L.; OLLIVIER, B. *Propionibacterium microaerophilum* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 51, 2001. p. 1373–1382.

LALLOUI-CARPENTIER, W.; LI, T.; VIGNERON, V.; MAZEAS, L.; BOUCHEZ, T. 2006. Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates. **Antonie Van Leeuwenhoek** 89:423–434.

LALUCAT, J.; BENNASAR, A.; BOSCH, R.; GARCÍA-VALDÉS, E.; PALLERONI, N. J. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. **Microbiol Mol Biol R.** 2006, v. 70, p. 510–547.

LAPARA, T. M.; NAKATSU, C. H.; PANTEA, L.; ALLEMAN, J. E. Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. **Appl Environ Microbiol.** v. 66, 2000. p. 3951–3959.

LECLERC, M.; DELGENES, J.P.; GODON, J.J. 2004. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. **Environ. Microbiol.** 6:809–819.

LEITE, H. E. A. S. **Estudo do comportamento de aterros de RSU em um biorreator em escala experimental na cidade de Campina Grande-PB.** 2008. 220p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Campina Grande.

LIPOR. **Serviço Intermunicipalizado de Gestão de Resíduos do Grande Porto.** Caderno Técnico, 2000.

LIU, J.; WU, W.; CHEN, C.; SUN, F.; CHEN, Y. Prokaryotic diversity, composition structure, and phylogenetic analysis of microbial communities in leachate sediment ecosystems. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 91, 2011.

LIU, P.; LI, X.; LUO, M.; XU, X.; SU, K.; CHEN, S.; QING, Y.; LI, Y.; QIU, J. Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Meta-Analysis. **Microbial Drug Resistance.** v. 24, n. 2. 2018.

LONG, Y.; FANG, Y.; SHEN, D.; FENG, H.; CHEN, T. Hydrogen sulfide (H₂S) emission control by aerobic sulfate reduction in landfill. **Scientific Reports.** 2016. v. 6. p. 1-9.

MACIEL, F. J. **Geração de biogás e energia em aterro experimental de resíduos sólidos urbanos.** 2009. 354p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock.** 12 ed. Artmed, Porto Alegre, 2010. p. 1160.

MAEDER, D. L.; ANDERSON, I.; BRETTIN, T. S.; BRUCE, D. C.; GILNA, P.; HAN, C. S.; LAPIDUS, A.; METCALF, W. W.; SAUNDERS, E.; TAPIA, R.; SOWERS, K. R. The *Methanosarcina barkeri* Genome: Comparative Analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* Reveals Extensive Rearrangement within Methanosarcinal Genomes. **Journal of Bacteriology.** v. 188 . n. 22, 2006, p. 7922–7931 .

MAGRINHO, A.; DIDELET, F.; SEMIÃO, V. Municipal solid waste disposal in Portugal, Science Direct. **Waste Management.** 2006. v. 26. P. 1477-1489.

MARIANO, M. O. H.; MACIEL, F. J.; FUCALE, S. P.; JUCÁ, J. F. T.; BRITO, A. R. de. Composição gravimétrica e volumétrica dos RSU da célula piloto do aterro de resíduos sólidos da Muribeca. In: **24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental,** 2007.

MATA-ALVAREZ, J. **Biomethanization of the organic fraction of municipal solid waste.** 2 ed. Iwa Publishing, 2002. 323p.

MCBEAN, E. A.; F. A. ROVERS.; G. J. FARQUHAR. **Solid Waste Landfill Engineering and Design**. Editora: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1995.

MCCARTY, P. L. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals - Part Four - Process Design. Public Works, v. 5 1964, p. 95-99.

MCDUGALL J. R.; PHILP J. C. Parametric Study of Landfill Biodegradation Modelling: Methanogenesis & Initial Conditions. **In: Proc. Sardinia, 2001. p. 79-88. 8th Intl. Waste Man. & Landfill Symp.** Eds. Christensen TH, Cossu R & Stegmann R, CISA, Cagliari, v. 1.

MCHUGH, S.; CARTON, M.; MAHONY, T.; O'FLAHERTY, V. Methanogenic population structure of anaerobic granular sludges from psychrophilic, mesophilic and thermophilic bioreactors. **FEMS Microbiol. Lett.** 2003, v. 219, p. 297–304.

MELO, M. C.; FARIAS, R. M. S; CARIBÉ, R. M.; SOUSA, R. B. A.; MONTEIRO, V. E. D. A Case of Study About the Influence of Organic Matter in Municipal Solid Waste Settlement. **Soils and Rocks**, São Paulo, 2016, n. 39, v. 2, p. 139-148.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Plano Nacional de Resíduos Sólidos. Brasília. 104p. Fevereiro, 2012. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/E99F974D/Doc_PNRS_consultaspublicas1.pdf. Acesso em: Junho de 2015.

MONTEIRO, V. E. D.; MELO, M. C.; ALCANTARA, P. B.; ARAUJO, J. M.; ALVES, I. R. de F. S.; JUCÁ, J. F. T. Estudo do comportamento de RSU em uma célula experimental e suas correlações com aspectos microbiológicos, físicos e químicos. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. II, 2006. p. 223-230.

MONTERO, B. et al. Analysis of methanogenic activity in a thermophilic-dry anaerobic reactor: Use of fluorescent in situ hybridization. **Waste Management**, v. 29, n. 3, p. 1144– 1151, 2009.

MOREIRA, F. G. dos S. **Emissões fugitivas de biogás em célula de aterro sanitário**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2018.

MORI, K.; SPARLING, R.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. 2003. Quantification and diversity of the archaeal community in a landfill site. **Can. J. Microbiol.** 49:28–36.

MORI, K.; IINO, T.; SUZUKI, K. I.; YAMAGUCHI, K.; KAMAGATA, Y. Aceticlastic and NaCl-Requiring Methanogen "*Methanosaeta pelagica*" sp. nov., Isolated from Marine Tidal Flat Sediment. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78. n. 9. 2012. p. 3416–3423.

MOURA, M. S. B. de; GALVINCIO, J. D.; BRITO, L. T. de L.; SOUZA, L. S. B. DE.; SÁ, I. I. S.; SILVA, T. G. F. da. Potencialidades da água de chuva no Semi-Árido brasileiro. Cap. 2. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. p. 37-59.

MUNNICH, K; MAHLER, C.F.; FRICKE, K. Pilot project of mechanicalbiological treatment of waste in Brazil. **Waste management (Elmsford)**. 2006, v. 26, n. 2, p. 150-157.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturin ggradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel eletrophoresis (DGGE). *Microbial Ecology. Antonie van Leeuwenhoek International J. of Gen. Mol. Microbiol.* v. 73, 1998, p. 127.

MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactionamplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, 1993, p. 695-700.

NUBEL, U. B.; ENGELEN, A.; FELSKE, J.; SNAIDR, A.; WIESHUBER, R. I.; AMANN, W.; LUDWIG H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **J Bacteriol.** v. 178, 1996. p. 5636-43.

ODEYEMI, A. T.; ADERIYE, B. I.; BAMIDELE, O. S. Lipolytic activity of some strains of *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus spp.* from restaurant wastewater and receiving stream. **J Microbiol Res.** 2013, v. 3, p. 43-52.

OGWUELEKA, T. C. Survey of household waste composition and quantities in Abuja, Nigeria. **Resources, Conservation and Recycling.** v. 77, 2013. p. 52-60.

O'LEARY, P. R; TCHOBANOGLOUS, G. Landfilling, Chapter 14. In: TCHOBANOGLOUS, G.; KREITH, F. **Handbook of Solid Waste Management.** 2 ed. McGraw-Hill, 2002.

OLIVEIRA, K. T. L. L.; GOMES, R. A. **Contribuições da recuperação do biogás de aterro sanitário: uma análise para Goiânia.** Goiás, 2001.

OLIVEIRA, R. F.; BRAGA, R. M. Q. L. Sistema de cobertura final de um aterro sanitário para a RMB de Belém-PA com emprego de resíduos da construção civil. **R. gest. sust. ambient.** Florianópolis, 2017, v. 6, n. 3, p. 573-596.

OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Saelevanet, as Determined by Denaturand Gradient Gel Electrophoresis of PCR – Amplified Gene Fragments Coding for 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 63, 1997. p. 3367-3373.

PACE, R.; BENINCASA, P.; GHANEM, M. E.; QUINET, M.; LUTTS, S. Germination of untreated and primed seeds in rapeseed (*Brassica napus var Oleifera Del.*) under salinity and low matric potential. **Experimental Agriculture**, v. 48, n. 2, 2012. p. 238-251.

PALMISANO, A. C.; BARLAZ, M. A. **Microbiology of Solid Waste.** In: Anna C. Palmisano, Morton A. Barlaz (eds), 1996. 224 p.

PANZA, D.; BELGIORNO, V. Hydrogen sulphide removal from landfill gas. **Process Saf. Environ.** 2010. v. 88, p. 420–424.

PATEL, J. B.; LEONARD, D. G.; PAN, X.; MUSSER, J. M.; BERMAN, R. E.; NACHAMKIN, I. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the Micro Seq 500 16S rDNA bacterial identification system. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, 2002. p. 246.

PATEL, V.; MUNOT, H.; SHOUCHE, Y. S.; MADAMWAR, D. Response of bacterial community structure to seasonal fluctuation and anthropogenic pollution on coastal water of Alang–Sosiya ship breaking yard, Bhavnagar, India. **Bioresource Technology**. v. 161, 2014. p. 362–370.

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

PECORA, V; FIGUEIREDO, N. J. V.; VELÁZQUEZ, S. M. S. G.; COELHO, S. T. Aproveitamento do biogás proveniente de aterro sanitário para geração de energia elétrica e iluminação a gás. In: **VIII Conferência Internacional de Aplicações Industriais**. Poços de Caldas, 2008. 5p.

PHILIPPI, A. **Saneamento, Saúde e Meio Ambiente**. Editora: Manole LTDA, Barueri, 2005.

PINTO, N. G. **Filogenia de los seres vivo: Domínio Archaea**. Sevilla, 2017. p. 1-40.

POHLAND, F. G.; HARPER, S. R. **Critical review and summary of leachate and gas production from landfill**. Cincinnati: USEPA, 1985. 212 p.

QUINTAES, B. R.; SILVA, C. A. M. C.; HINOJOSA, M. A. G.; CAMPOS, J.C. Avaliação de comunidades microbianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos – Revisão. **Revista Ciência & Tecnologia**. v. 12, n. 2, 2012. p. 7-19.

REAL, J. L. G. **Riscos Ambientais em Aterros de Resíduos Sólidos com Ênfase na Emissão de Gases**. 2005. 183 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.

RIBEIRO, L. S.; SILVA, A. S.; ALVES, F. S.; MELO, M. C.; PAIVA, W; MONTEIRO, V. D. E. Monitoramento físico-químico de um biorreator com resíduos sólidos urbanos em escala piloto na cidade de Campina Grande (PB). **Engenharia Sanitária e Ambiental (Online)**, 2016. v. 21, p. 1-9.

RICH, C.; GRONOW, J.; VOULVOULIS, N. The potential for aeration of MSW landfills to accelerate completion. **Waste Management**. v. 28, 2008. p. 1039–1048.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol.** v. 17, 1999. p. 319–339.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning - a laboratory manual**, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

SANTOS, A. L. **Diversidade molecular microbiana de lixiviados de aterros**. 2010. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - RJ.

SANTOS, A. L.; PEIXOTO, R.; ROSADO, A. S. New approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment. **Oecologia Brasiliensis**. v. 13, n. 4, 2009. p. 631-648.

SARAKIKYA, H.; KIPLAGAT, J. Combustion Characteristics and Energy Potential of Municipal Solid Waste in Arusha City, Tanzania. **American Journal of Energy Engineering**. 2015, v. 3, n. 5, p. 71-77.

SAWAMURA, H.; YAMADA, M.; ENDO, K.; SODA, S.; ISHIGAKI, T.; IKE, M. Characterization of microorganisms at different landfill depths using carbon-utilization patterns and 16S rRNA gene based T-RFLP. **J Biosci Bioeng**, 2010, v. 109, p. 130–137.

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

SCARAMAL, A.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S. Análise da diversidade microbiana do solo no agrossistema cafeeiro orgânico através do DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). **Anais do IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Lavras, 2005. 5p.

SCHIRMER, W. N. et al. Avaliação da geração de gás sulfídrico no biogás gerado a partir de resíduos sólidos urbanos. **Ciência & Tecnologia**, FATEC-JB, Jaboticabal - SP, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2015.

SCHMIDT, J. E.; MLADENOVSKA, Z.; LANGE, M.; AHRIN G, B. K. Acetate conversion in anaerobic biogas reactors: traditional and molecular tools for studying this important group of anaerobic microorganisms. **Biodegradation**. v. 11, 2000. p. 359–364.

SEKIGUGUI, 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**. v. 144, 1998. p. 2655-2665.

SHIMIZU, S.; UENO, A.; NAGANUMA, T.; KANEKO, K. (2015). *Methanosarcina subterranea* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface diatomaceous shale formation. **Int J Syst Evol Microbiol** 65, 1167–1171.

SHIN, S. G.; ZHOU, B. W.; LEE, S.; KIM, W.; HWANG, S. Variations in methanogenic population structure under overloading of pre-acidified high-strength organic wastewaters. **Process Biochem**. v. 46, 2011. p. 1035–1038.

SILVA, A. dos S. **Análise de componentes tóxicos em resíduos sólidos urbanos**. 2016. 158p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande-PB.

SILVA, A. S.; RIBEIRO, L. S.; PAIVA, W.; MELO, M. C.; MONTEIRO, V. E. D. Avaliação do potencial tóxico dos resíduos sólidos urbanos da cidade de Campina Grande – PB. **Revista Matéria**. Rio de Janeiro. 2015. v. 20, n.4, p. 840-851.

SILVA, J. C.; OLIVEIRA, M. A.; PIRES, P. H.; SILVA, T. P.; RODRIGUES, M. Reciclagem energética: uma solução inovadora para o plástico não reciclável. **Revista Eletrônica E-xacta**, Belo Horizonte, 2011, v. 4, n. 2 – Edição Especial Interdisciplinaridade. p. 87-96.

SILVA, S. A.; OLIVEIRA, R. **Manual de análises físico-químicas de águas de abastecimento e residuárias**. Campina Grande-PB: O Autor, 2001. 265p.

SKILLMAN, L. C.; EVANS, P. N.; NAYLOR, G. E.; MORVAN, B.; JARVIS, G. N.; JOBLIN, K. N. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. **Anaerobe**. 2004. v. 10, p. 277–285.

SNAIDR, J.; AMANN, R.; HUBER, I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic analysis and in situ identification of Bacteria in activated sludge. **Appl Environ Microbiol**. 1993. p. 2884–2896.

SOLLÉRO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: **Anais Congresso Nacional de Zootecnia**. Brasília, DF: Associação Brasileira de Zootecistas, 2004. p. 1-4.

SOLLI, L.; HÅVELSRUD, O. E.; HORN, S. J.; RIKE, A. G. A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. **Biotechnol. Biofuels**, 2014. v. 7, n. 1, p. 146.

SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K. B.; TIGNOR, M.; MILLER, H. L. **Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007**. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. and New York, NY, U.S., 2007.

SONG, L.; WANG.; TANG, W.; LEI, Y. Bacterial community diversity in municipal waste landfill sites. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2015. p. 1-12.

SONG, Q.; WANG, Z.; LI, J. Environmental performance of municipal solid waste strategies based on LCA method: a case study of Macau. **Journal of Cleaner Production**. v. 30, 2013. p. 1-9.

SORKHOH, N. A.; IBRAHIM, A. S.; GHANNOUM, M. A.; RADWAN, S. S. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 39, 1993. p. 123–126.

SOUSA, D.Z., SMIDT, H., ALVES, M.M., and STAMS, A.J.M. (2009) Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. **FEMS Microbiol Ecol** 68: 257–272.

SUN, H. Y.; CHEN, S. Y.; CHANG, S. C.; PAN, S. C.; SU, C. P.; CHEN, Y. C. Community-onset *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: influence of health care exposure on antimicrobial susceptibility. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2006, v. 55, p. 135–141.

SZYŁAK-SZYDŁOWSKI, M.; KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T. The mycobiota of landfill leachates in the pretreatment process in a sequencing batch reactor. **Cent. Eur. J. Biol.**, v. 7, 2012. p. 250-258.

TAKAYANAGUI, O. M.; DIVANI, M. C.; CARLOS, A. D. O.; ALZIRA, M. M. B.; MADALENA, H. T.; OKINO, A. A. M. C. C. S.; MARIA, A. O.; ELIANA G. A. R.; ANGELA, M. M. T. Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP. **Rev. Soc. Bras. De Med. Trop.** v. 40, n. 2, 2007. p. 239-241.

TATAUROV, A. V.; YOU, Y.; OWCZARZY, R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. **Biophys Chem.** v. 133, 2008. p. 66–70.

TCHOBANOGLIOUS, G.; THEISEN, H.; VIGIL, S. A. **Integrated solid waste management.** Engineering principles and management issues. New York, 1993.

TEIXEIRA, A. R.; CHERNICHARO, C. A. de L.; SOUTO, T. F. da S.; PAULA, F. S. de. Influência da alteração da distribuição do tamanho de partículas no desempenho de reator UASB tratando esgoto doméstico. **Engenharia Sanitária e Ambiental.** v. 14, n. 2, 2009. p. 159-166.

THANH, N. P.; MATSUI, Y.; FUJIWARA, T. Household solid waste generation and characteristic in a Mekong Delta city, Vietna. **Journal of Environmental Management.** v. 91, 2010. p. 2307-2321.

TIAN, G.; LI, Q.; DONG, M.; WU, Y.; YANG, B.; ZHANG, L.; LI, Y.; YIN, F.; ZHAO, X.; WANG, Y.; XIAO, W.; CUI, X.; ZHANG, W. Spatiotemporal dynamics of bacterial and archaeal communities in household biogas digesters from tropical and subtropical regions of Yunnan Province, China. **Environ Sci Pollut Res.** v. 23. 2016, p. 11137–11148.

TOMASSONI, F.; SANTOS, R. F.; SANTOS, F. S.; CARPINSKI, M.; SILVEIRA, L. Técnica de biorremediação do solo. **Acta Iguazu,** 2014, v. 3, n. 3, p. 46-56.

TZENEVA, V. A.; LI, Y.; FELSKA, A. D.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D.; VAUGHAN, E. E.; SMIDT, H. Development and application of a selective PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to detect a recently cultivated *Bacillus* group predominant in soil. **Appl Environ Microbiol.** v. 70, n. 10, 2004. p. 5801-5809.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Monitoring Approaches for Landfills Bioreactors,** eds. Toloyamat. T.; Kremer, F.; Carson, D.; Hoover, W. D. Nacional Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio, EPA/600/R-04/301, 2004.

WALTER, A.; KNAPP, B. A.; FARBMACHER, T.; EBNER, C.; INSAM, H.; WHITTLE, I. H. F. Searching for links in the biotic characteristics and abiotic parameters of nine different biogas plants. **Microb Biotechnol.** v. 5, 2012. p. 717–730.

WATANABE, T.; ASAKAWA, S.; NAKAMURA, A.; NAGAOKA, K.; KIMURA, M. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. **FEMS Microbiology Letters.** v. 232, 2004. p. 153-163.

WHITLOCK, J. P.; DENISON JR., M. S. 1995. Induction of cytochrome P450 enzymes that metabolize xenobiotics, p. 367–390. In P. R. Ortiz de Montellano (ed.), *Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry*. **Plenum Press**, New York, N.Y.

WHITMAN, J.; FLYNN, T.; CHILDS, J.; WAINNER, R.; GILL, H.; RYDER, M. A comparison between two physical therapy treatment programs for patients with lumbar spinal stenosis. A randomized clinical trial. **Spine**, 2006, v. 31, p. 2541.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. European Centre for Environment and Health. **Methods of assessing risk to health from exposure to hazards released from waste landfills**. Poland, 2000.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Reference Center for Wastes Disposal. **Methods of analysis of sewage sludge solid wastes and compost**. Switzerland, 1979.

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

XIE, B.; XIONG, S.; LIANG, S.; HU, C.; ZHANG, X.; LU, J. Performance and bacterial compositions of aged refuse reactors treating mature landfill leachate. **Bioresource Technol**, 2012, 103:71–77.

XIE, J.; HE, Z.; LIU, X.; VAN NOSTRAND, J. D.; DENG, Y. E.; WU, L.; ZHOU, J. GeoChip-Based Analysis of the Functional Gene Diversity and Metabolic Potential of Microbial Communities in Acid Mine Drainage. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n. 3, 2011. p. 991-999.

YE, L.; ZHANG, T.; WANG, T.; FANG, Z. Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. **Environmental Science and Technology**. v. 46. 2012. p. 13244–13252.

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

YUEN, S. T. S.; WANG, Q. J.; STYLES, J. R.; MCMAHON T. A. Water balance comparison between a dry and a wet landfill – a full-scale experiment. **Journal of Hydrology**, Ed. Elsevier. 2001. v. 251, p.29-48.

ZENG, Y.; TRAUTH, K. M.; PEYTON, R. L.; BANERJI, S. K. Characterization of solid waste disposed at Columbia Sanitary Landfill in Missouri. **Waste Management & Research**, London, v. 23, n. 1, p. 62–71, 2005.

ZHANG, D; KEAT, T. S.; GERSBERG, R. M. A comparison of municipal solid waste management in Berlin and Singapore. **Waste Management**, v. 30, 2010. p. 921–933.

ZHENG, S. A.; ZHENG, X. Q.; CHEN, C. Transformation of metal speciation in purple soil as affected by waterlogging. **International Journal Environment Science Technology**, 2013, v. 10, p. 351-358.

ZINDER, S. H. 1993. Physiological ecology of methanogens. In: **J. G. Ferry (ed.), Methanogenesis: Ecology, physiology, biochemistry, and genetics**. Chapman & Hall, New York. p. 128–206.

ZIGANSHIN, A. M.; ZIGANSHINA, E. E.; KLEINSTEUBER, S.; NIKOLAUSZ, M. Comparative Analysis of Methanogenic Communities in Different Laboratory-Scale Anaerobic Digesters. **Archaea**, 2016. p. 1-12.