



II-435 - DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA EMISSÃO DE SULFETO E METANO EM REATOR UASB TRATANDO ESGOTO DOMÉSTICO

Graziella Patrício Pereira Neto⁽¹⁾

Bióloga pelo Unicentro Metodista Izabela Hendrix. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos na Escola de Engenharia da UFMG.

Silvana de Queiroz Silva

Bióloga pela UFSCar, Doutora em Microbiologia pela University of Essex, Inglaterra, Pós-doutoranda do Departamento de Ciências Biológicas da UFOP.

Juliana Calábria de Araújo

Bióloga pela UFRJ. Doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC/USP. Pesquisadora do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG e professora do CEFET/MG.

Cláudio Leite de Souza

Engenheiro Civil (UFV), Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos (UFMG). Doutorando em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos (UFMG).

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Engenheiro Civil e Sanitarista. Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade de Newcastle upon Tyne – UK. Professor Associado do DESA/UFMG.

Endereço⁽¹⁾ : Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Av. do Contorno, nº. 842 - 7º. andar - Centro - Belo Horizonte - MG - CEP: 30110-060 - Brasil - Tel: (31) 3409-1050 - e-mail: graziella.patricio@gmail.com

RESUMO

A camada de espuma formada na superfície de decantadores de reatores UASB é constituída de materiais flutuantes remanescentes ao tratamento biológico. A hipótese deste trabalho é que a espuma abrigue microrganismos capazes de oxidar sulfeto e metano e, desta forma, contribua para minimização do mau odor e da emissão de metano, respectivamente. Adicionalmente, acredita-se que o metano também possa ser oxidado anaerobiamente dentro do reator UASB. Para a identificação dos microrganismos capazes de oxidar sulfeto, foram realizadas análises qualitativas por meio de microscopia óptica comum e contraste de fase. Para detecção dos microrganismos envolvidos na oxidação de metano, extraiu-se o DNA da espuma e juntamente com primers específicos realizou-se a reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados obtidos da análise qualitativa demonstraram a presença de bactérias oxidadoras de sulfeto, tais como *Beggiatoa* sp., *Thiotrix* sp. e *Chlorobium* sp. Em relação à técnica de PCR, o primer geral do grupo de metanotrófica aeróbica (A189f-A682r) detectou a presença destes microrganismos na espuma, assim como os primers específicos identificaram metanotróficas do tipo I: *Methylobacter/Methylosarcina* (A189f-Mb601r) e *Methylococcus* (A189f-Mc468r); e representantes do tipo II: *Methylocapsa* (A189f-Mcap630r) e *Methylosinus* (II223f-II646r). Além disso, os grupos de arqueias anaeróbicas oxidadoras de metano (ANMEf-907r) e de bactérias redutoras de sulfato (907-385) foram também detectados na espuma.

PALAVRAS-CHAVE: Espuma, Oxidação de Metano, Reator UASB, Sulfeto.

INTRODUÇÃO

Dentre as tecnologias de engenharia aplicadas no processo de tratamento de águas residuárias estão os biodigestores, tais como o reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB). Estes biorreatores são ecossistemas muito complexos, contém diferentes espécies microbianas que utilizam os compostos orgânicos biodegradáveis presentes nos esgotos domésticos como fonte de carbono e/ou energia e dessa forma, contribuem para a eficiência do tratamento na remoção da matéria orgânica.

A espuma é um importante constituinte deste processo. Formada na superfície do decantador do reator UASB, dispõe-se como camada sólida composta por materiais com densidade menor que a da água e de difícil degradação (SOUZA *et al.*, 2006). Estes materiais, juntamente com microrganismos filamentosos, formam uma trama que serve de habitat para diferentes microrganismos, tais como arqueias, bactérias, protozoários,



cianobactérias e algas, sendo as duas últimas responsáveis pela coloração predominantemente esverdeada da espuma.

Um dos maiores problemas da degradação anaeróbia de águas residuárias é a presença de enxofre. Nestas condições, o sulfeto de hidrogênio é formado no processo de redução de sulfato. Dentre as espécies ionizadas (HS^- e S_2^{2-}) e não-ionizadas (H_2S) de enxofre, apenas o último é capaz de atravessar a membrana celular, sendo a forma mais tóxica de sulfeto que ocasiona a inibição dos microrganismos. Além disso, quando o sulfeto passa da forma dissolvida no efluente para a gasosa, ocorre exalação de maus odores em ambientes abertos.

Nestas condições, uma possibilidade para controle de odor foi sugerida por Souza *et al.* (2006). Os autores consideraram a camada de espuma, como um filme biológico capaz de remover compostos reduzidos de enxofre por meio de microrganismos oxidadores de sulfeto.

No tratamento anaeróbio, a comunidade microbiana transforma a matéria orgânica complexa em gases (principalmente metano e gás carbônico). A produção de metano (metanogênese) é a principal etapa em que ocorre a remoção efetiva da matéria orgânica carbonácea da fase líquida, uma vez que o metano é pouco solúvel em água. Entretanto, segundo Campos (1999), parcela significativa de metano pode permanecer dissolvida no líquido e, assim, sair com o efluente final tratado. Contudo, na camada de espuma, uma parcela do metano pode ser removida por meio da oxidação biológica, mediada pelas bactérias metanotróficas aeróbias que o utilizam como única fonte de carbono.

As metanotróficas são freqüentemente detectadas em superfícies de sedimentos recobertos com água com alto teor de oxigênio dissolvido, ou na zona do metalímnio, entre as zonas anóxicas saturadas de metano e o epilímnio aeróbio. São fisiologicamente e filogeneticamente distintas e divide-se em dois grupos: gamma-Proteobacteria, que inclui as metanotróficas do tipo I, e alfa-Proteobactéria, que inclui as metanotróficas do tipo II. Os microrganismos do tipo I crescem preferencialmente em altas concentrações de oxigênio e baixas concentrações de metano, em contraste com o tipo II de metanotróficas que crescem em baixas concentrações de oxigênio e nitrogênio e altas concentrações de metano (ZHENG *et al.*, 2008).

A oxidação de metano pode ocorrer também em ambientes anaeróbios, tais como sedimentos marinhos e áreas alagadas, como os pântanos. Os microrganismos responsáveis pela oxidação anaeróbia do metano (OAM) ainda não foram isolados e o mecanismo permanece desconhecido. Contudo, estudos moleculares mostram que as metanotróficas anaeróbias (ANME) são filogeneticamente afiliadas com arqueias metanogênicas da família *Methanosarcinales* e dois grupos filogenéticos são reconhecidos: ANME-I e ANME-II. Além disso, com exceção da *Methylocella palustris*, todas as metanotróficas possuem a enzima *particulate methane monooxygenase* (pMMO) que cataliza a oxidação de metano.

As evidências da oxidação anaeróbia de metano são bem documentadas na literatura, baseado na modelagem geoquímica (WARD *et al.*, 1987), isótopos estáveis (BURNS, 1998), perfil químico da água (BOROWSKI, PAULL e USSLER, 1999), estudos de inibidores (CHAN & PARKIN, 2000) e incubações de amostras com traçadores radioativos (THOMSEN, FINSTER e RAMSING, 2001). Os resultados destes estudos levaram a hipótese de que a oxidação anaeróbia de metano é mediada por um consórcio de arqueias e bactérias redutoras de sulfato (BRS). O metano é convertido por arqueias metanotróficas a dióxido de carbono e os subprodutos desta reação (metanol, hidrogênio molecular ou acetato) são subsequentemente metabolizados por bactérias redutoras de sulfato (HALLAM *et al.*, 2004).

Sabe-se que o metano é um dos mais potentes gases do efeito estufa, apresentando potencial de aquecimento global aproximadamente 21 vezes superior ao do gás carbônico. Felizmente, o metano lançado na atmosfera é degradado por processos químicos. Contudo, a oxidação biológica de metano é responsável por remover mais metano do que a oxidação química. Acredita-se que em ambientes aeróbios e anaeróbios, a oxidação biológica do metano é responsável por remover o metano antes mesmo de atingir a atmosfera, diminuindo desta forma sua emissão. Assim, sem a oxidação biológica do metano, as concentrações deste composto na atmosfera seriam ainda maiores.

Nesse contexto, a hipótese deste trabalho é que a espuma abrigue microrganismos aeróbios e microaerofílicos envolvidos na oxidação de sulfeto e na oxidação de metano e, desta forma, contribua para minimização de maus odores e da emissão de metano, respectivamente. Além disso, acredita-se também que o metano possa ser oxidado anaerobiamente dentro do reator UASB, o que explicaria parte da perda de metano reportada por



diversos autores. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar a presença de bactérias oxidadoras de sulfeto e de metano em amostras de espuma de reator UASB, por meio de técnicas de microscopia óptica e de biologia molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, foi utilizado um reator UASB, em escala piloto, destinado ao tratamento de esgotos domésticos. O reator era equipado com retentor de espuma, o que possibilitava a acumulação desta na superfície do decantador. O aparato experimental (Figura 1) foi instalado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG/COPASA.



Figura 1: Vista do reator UASB e do decantador (ampliado, à direita).

As amostras de espuma foram coletadas no decantador do reator UASB e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG, para prosseguimento das análises. O volume de espuma totalizava-se entre 15-18 mL, sendo completado para 50mL com tampão PBS 1X (NaCl 0,13M; Na₂HPO₄ 0,7Mm; NaH₂PO₄ 0,3Mm; pH 7,2). Essas amostras foram lavadas com tampão PBS 1X e 50mL de cada amostra foram transferidas para o tubo *Falcon* e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos. Para análise molecular, os sedimentos dessas amostras foram armazenados em tubos tipo *Eppendorf* de 2,0 mL e mantidos à temperatura de -20°C.

Para caracterização morfológica dos microrganismos presentes na espuma, realizaram-se análises microscópicas. A solução ágar 1% foi aquecida em forno microondas por aproximadamente 1 minuto e distribuída sobre a lâmina de vidro. Após solidificação do ágar, foi colocada alíquota da amostra e, por conseguinte, a laminula. A caracterização microbiana foi realizada no período de 14/08/07 a 18/08/08, por meio de microscopia óptica comum e contraste de fase no microscópio binocular da marca Olympus, modelo BX-50, com câmara acoplada para captura de imagem.

Para outros microrganismos - algas e cianobactérias - foi necessário fixar a amostra de espuma com 1mL de lugol. A identificação dos microrganismos presentes na espuma foi possível com a utilização de chaves taxonômicas (ANAGNOSTIDIS e KOMÁREK, 1988, KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999 e 2005, SANT'ANNA e AZEVEDO, 1989 e 2000, AZEVEDO e SANT'ANNA, 2003, BICUDO E MENEZES, 2006).

Para a extração do DNA microbiano da espuma do reator UASB foi utilizado o método descrito por Egli *et al.*, (2003). O método consiste basicamente em lise celular química e mecânica, seguida de purificação dos ácidos nucleicos em fenol e clorofórmio. O material genômico purificado foi ressuspensionado em água e mantido a -20°C.

Foram realizadas três extrações da amostra de espuma e alíquotas de 5,0µL foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% a 75 Volts por 45 minutos. Para se avaliar o tamanho dos ácidos nucleicos extraídos, utilizou-se como marcador de peso molecular, o Ladder 1Kb (Fermentas). Enquanto que, para estimar a



concentração de DNA no gel, foi utilizado o DNA Lambda na concentração de 300ng/ μ L. O lambda foi diluído 100X (3ng/ μ L) e no gel, aplicou-se 4 μ L do Lambda obtendo-se a concentração final de 12ng/ μ L.

O gel de agarose foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado sob luz ultravioleta para verificação da extração do DNA genômico. As imagens dos géis foram registradas por um sistema de captura de imagem.

As extrações de DNA obtidas das amostras de espuma foram submetidas à amplificação por PCR, por meio de diferentes pares de iniciadores (*primers*) conforme o grupo de interesse. Na reação de amplificação dos fragmentos de DNA foram usados os seguintes reagentes, com suas respectivas concentrações, para um volume final de 25 μ L: tampão de PCR (1X); MgCl₂ (1,5mM), dNTPs (200 μ M); *primer forward* (200nM) e *primer reverse* (200nM); enzima Taq polimerase (1,25U) e 1 μ L do DNA extraído.

Todas as reações de PCR foram realizadas juntamente com um controle sem DNA (branco). O processamento da reação de PCR ocorreu no termociclador (*Eppendorf*). As reações foram realizadas em três eventos diferentes, ou seja, três reações de PCR independentes para o mesmo fragmento de interesse, para garantir a representabilidade dos resultados.

A detecção do grupo geral de metanotróficas aeróbias foi feita por meio de PCR com gradiente de temperatura (primers A189F-682R, Tabela 1). Para os gêneros específicos de metanotróficas aeróbias, utilizou-se o produto de PCR (obtido com os primers para o grupo geral) como DNA alvo para a segunda reação de PCR, com primers específicos para os gêneros *Methylobacter*/*Methylosarcina*, *Methylococcus*, *Methylocapsa* e *Methylosinus*. Enquanto que, para detecção dos microrganismos envolvidos na oxidação anaeróbia de metano, utilizou-se os primers ANMEf-907R e 907-385, para a detecção das arqueias anaeróbias oxidadoras de metano e bactérias redutoras de sulfato, respectivamente. As temperaturas utilizadas na programação para as amplificações do fragmento de interesse estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Perfis de temperatura utilizados para cada par de primers na reação de PCR.

Par de primers	Grupo alvo	Tamanho do fragmento	Condição de amplificação	Referência
A189f A682r	Grupo geral das metanotróficas aeróbias	500 pb	94°C,45s;62-52°C,60s;72°C, 180s (30 ciclos)	Horz <i>et al.</i> , 2005
A189f Mb601r	<i>Methylobacter</i> / <i>Methylosarcina</i>	432 pb	94°C,45s; 56°C,60s; 72°C, 3min (30 ciclos)	Kolb <i>et al.</i> , 2003
A189f Mc468r	<i>Methylococcus</i>	299 pb	94°C,45s; 62°C,60s; 72°C, 3min (30 ciclos)	Kolb <i>et al.</i> , 2003
II223f II646r	<i>Methylosinus</i>	444 pb	94°C,45s; 62°C,60s; 72°C, 3min (30 ciclos)	Kolb <i>et al.</i> , 2003
A189f Mcap630	<i>Methylocapsa</i>	461 pb	94°C,45s; 56°C,60s; 72°C, 3min (30 ciclos)	Kolb <i>et al.</i> , 2003
ANMEf 907R	Grupo geral de metanotróficas anaeróbias	817 pb	94°C,45s; 57°C,60s; 72°C, 3min (30 ciclos)	Thomsen <i>et al.</i> , 2001
907 385	Grupo geral de bactérias redutoras de sulfato	522pb	94°C,30s; 63°C,60s; 72°C, 60s (20 ciclos); 94°C,30s; 53°C,60s; 72°C, 60s (10 ciclos)	Amann <i>et al.</i> , 1990

Todas as reações de PCR iniciaram com desnaturação em 94°C por 3 minutos e finalizou com alongamento a 72°C por 10 minutos, com temperatura de espera em 4°C. O PCR touch-down foi usado de 62°C a 52°C. Depois de cada ciclo, a temperatura de anelamento decaiu 0,5°C até atingir 52°C.

RESULTADOS

Os resultados da caracterização morfológica da espuma por observação em microscopia óptica estão apresentados na Figura 2, que corresponde às bactérias similares a *Beggiatoa* sp., *Thiotrix* sp. e *Chlorobium*



sp., respectivamente. Estas bactérias são capazes de oxidar sulfeto e produzir sulfato, além de acumular grânulos intracelulares de enxofre elementar para ser oxidado posteriormente, o que indica a importância das mesmas no ciclo do enxofre. Dentre estas bactérias, destaca-se *Chlorobium* sp., bactéria fototrófica anoxigênica, que sob condições anóxicas e na presença de luz, utiliza o sulfeto como doador de elétrons na fotossíntese anoxigênica. A incidência direta da luz e o contato do efluente com a espuma possibilita a realização da fotossíntese anoxigênica, entretanto, este dado não foi avaliado na prática. Ainda, outras morfologias bacterianas foram observadas tais como: bacilos, cocos e espirilos, além de filamentos de cianobactérias.



Figura 2: Microrganismos presentes na espuma. A- *Beggiatoa* sp., B - *Thiotrix* sp. e C- *Chlorobium* sp.

A extração do DNA pelo método de Egli *et al.*, (2003) foi eficiente para extração de DNA da amostra de espuma conforme apresentado na Figura 3. Contudo, a análise da extração de DNA em gel de agarose mostrou que a quantidade de DNA extraído foi pequena, quando efetuada a análise quantitativa do DNA em relação ao DNA Lambda (Figura 3), totalizando em 12ng/µL de DNA extraído.

Além disso, a extração apresentou “rastros”, que podem ser contaminantes como os ácidos húmicos, proteínas ou ainda resíduos dos reagentes da extração. O fato das bandas apresentarem mais claras, indicado por setas na Figura 3, pode ser devido à ocorrência da perda de DNA durante o processo de extração da amostra. Contudo, a qualidade e a quantidade de DNA não interferiram nas amplificações por PCR.

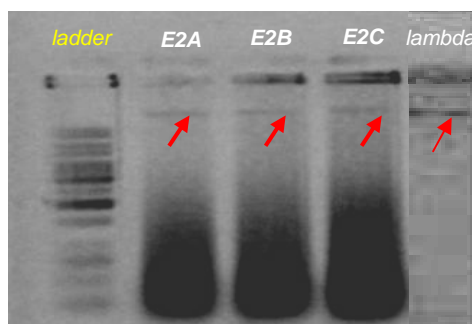


Figura 3: Resultados da extração de DNA da amostra de espuma do decantador do reator UASB e DNA Lambda na concentração de 12ng/µL na última canaleta.

Após as extrações de DNA das amostras de espuma, uma quantidade de DNA foi utilizada nas reações de PCR para detecção das metanotróficas aeróbias. A presença do grupo geral de metanotróficas aeróbias foi constatada por meio de reação de amplificação com o par de primers geral (A189F-A682R); o resultado da amplificação está apresentado na Figura 4, canaleta 7. Com o objetivo de identificar os gêneros de metanotróficas aeróbias foram utilizados os primers específicos para detectar *Methylobacter*/*Methylosarcina*, *Methylococcus*, *Methylocapsa* e *Methylosinus* e os resultados encontrados foram positivos para todos os organismos testados (Figura 4, canaletas de 2 a 6). A diversidade de metanotróficas aeróbias encontradas na espuma sugere que estes microrganismos possam estar realizando a oxidação do metano no efluente do reator UASB, visto que, são capazes de utilizar este gás como fonte de carbono e energia.

O limite de detecção dos primers utilizados para investigação dos grupos de metanotróficas é de 10^1 a 10^2 moléculas alvo/reacção (KOLB *et al.*, 2003). Portanto, os primers testados para os gêneros de metanotróficas

aeróbias foram capazes de detectar os representantes deste grupo mesmo quando estavam presentes em pequena quantidade. Considerando que o tipo I de metanotróficas cresce preferencialmente em altas concentrações de oxigênio e baixas concentrações de metano, os gêneros *Methylobacter*/*Methylosarcina* e *Methylococcus* podem estar presentes em menor quantidade, uma vez que a camada de espuma apresenta as condições favoráveis para o crescimento dos membros do tipo II, que crescem em baixas concentrações de oxigênio e nitrogênio e altas concentrações de metano (ZHENG *et al.*, 2008).

Em concordância com os resultados encontrados, o estudo realizado por Halet *et al.* (2006) detectou estes microrganismos em condições mesofílicas durante a compostagem da matéria orgânica, e os grupos pertencentes ao tipo II foram predominantes sob altas concentrações de metano. Ainda, conforme Miguez *et al.*, 1999, o gênero *Methylosinus* se adaptou nas condições do reator UASB, parcialmente aerado. Além desses estudos, RASTOGI (2007) observou grupos de metanogênicas e metanotróficas no biogás de um reator e concluiu que o biogás contém uma diversidade de metanotróficas aeróbias.

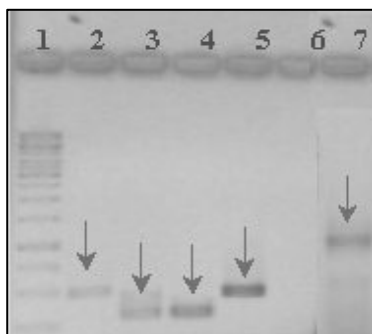


Figura 4: Produtos de PCR da amostra de espuma correspondente à detecção de metanotróficas aeróbias. 1- Marcador de peso molecular (Ladder 1Kb, Fermentas), 2- *Methylocapsa* sp., 3- *Methylococcus* sp., 4- *Methylobacter*/*Methylosarcina* sp., 5- *Methylosinus* sp., 6- branco, 7- grupo geral de metanotróficas aeróbias.

Em relação aos microrganismos envolvidos na oxidação anaeróbia de metano, os grupos de arqueias anaeróbias e bactérias redutoras de sulfato foram encontrados na espuma, conforme apresentado na Figura 5. A presença de metanotróficas anaeróbias (Figura 5a) na camada de espuma pode estar intimamente relacionada com a perda de sólidos provenientes do lodo anaeróbio em direção a camada de espuma. A presença destes microrganismos na espuma não necessariamente indica que estão metabolicamente ativos realizando a oxidação de metano, mas é um fator importante que sugere sua adaptação nas condições do reator UASB.

Além disso, as bactérias redutoras de sulfato (Figura 5b) também foram detectadas na espuma, o que subsidia a possibilidade de oxidação anaeróbia de metano na camada de espuma. Segundo Hallam (2004), a conversão do metano a dióxido de carbono é realizada pelas arqueias metanotróficas e os subprodutos desta reação (metanol, hidrogênio molecular ou acetato) são subsequentemente metabolizados pelas bactérias redutoras de sulfato.

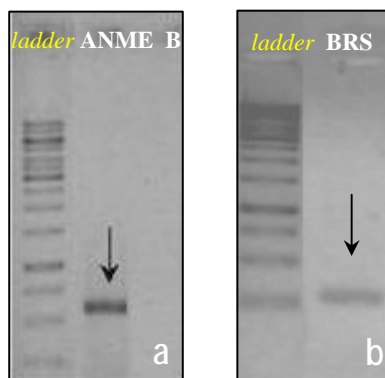


Figura 5: Produtos de PCR da amostra de espuma correspondente à detecção dos microrganismos envolvidos na oxidação anaeróbia de metano (indicado pela seta). a - arqueias anaeróbias; b- bactérias redutoras de sulfato.



Apesar de não haver relatos na literatura sobre a oxidação anaeróbia de metano em reator UASB, Girguiz (2003) obteve crescimento de arqueias anaeróbias oxidadoras de metano juntamente com bactérias redutoras de sulfato em um bioreator de fluxo contínuo. Neste estudo, foi analisado o impacto da mudança do fluxo na comunidade OAM e observou-se que o grupo ANME-II apresentou maiores taxas de crescimento em regimes de menor fluxo em relação ao grupo ANME-I, que demonstrou maiores taxas de crescimento em regimes de maior fluxo.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A espuma apresenta potencial para controlar o odor e a toxicidade causada pelo sulfeto, já que a mesma apresentou diversidade morfológica de bactérias similares a *Beggiatoa* sp., *Thiotrix* sp. e *Chlorobium* sp., as quais são capazes de remover enxofre por oxidação biológica.

A detecção do grupo geral de metanotróficas aeróbias indicou a presença destes microrganismos na camada de espuma, os quais, possivelmente, estão envolvidos na oxidação aeróbia de metano proveniente do reator UASB, antes de sua emissão para a atmosfera.

A detecção das metanotróficas *Methylobacter*/*Methylosarcina*, *Methylococcus*, *Methylocapsa* e *Methylosinus* na espuma indica alta diversidade de gêneros de metanotróficas representando diferentes tipos fisiológicos, o que sugere que a oxidação aeróbia do metano pode ocorrer sob diferentes condições ambientais (ex: concentração de oxigênio dissolvido, concentração de metano etc).

O grupo de metanotróficas anaeróbias e bactérias redutoras de sulfato, envolvidos na oxidação anaeróbia de metano, foram presentes na camada de espuma do decantador do reator UASB. A presença das arqueias anaeróbias oxidadoras de metano na espuma provavelmente está relacionada com a presença de sólidos provenientes do interior do reator UASB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMANN, R.I., BINDER, B.J., OLSON, R.J., CHISHOLM, W.S., DEVERUX, R., STAHL, D.A. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, v.172, p.762-770, 1990.
2. ANAGNOSTIDIS, K., KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes, Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, v.80, n.1-4, p.327-472, 1988.
3. AZEVEDO, M.T.P., SANT'ANNA, C.L. *Sphaerocavum*, a new genus of planktic cyanobacteria from continental water bodies in Brazil. *Algol. Studies*, v.109, p.79-92, 2003.
4. BICUDO, C.E.M., MENEZES, M. *Gêneros de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)*. 2 ed. RiMa, São Carlos. Brasil, 2006. 502p.
5. BURNS, S.J. Carbon isotopic evidence for coupled sulfate reduction-methane oxidation in Amazon Fan sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v.62, p.797-804, 1998.
6. BOROWSKI, W., PAULL, C.K., USSLER, W. Global and local variations of interstitial sulfate gradients in deep-water, continental margin sediments: sensitivity to underlying methane and gas hydrates. *Mar. Geol.*, v.159, p.131-154, 1999.
7. CAMPOS, J.R. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Programa de Pesquisa em Saneamento Básico. 435 p., 1999.
8. CHAN, A.S.K. & PARKIN, T.B. Evaluation of potential inhibitors of methanogenesis and methane oxidation in a landfill cover soil. *Soil Biology & Biochemistry*, v.32, p.1581-1590, 2000.
9. GIRGUIS, P.R., ORPHAN, V.J., HALLAM, S.J., DELONG, E.F. Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic archaea in a continuous-flow bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.9, p.5472-5482, 2003.
10. HALET, D., BOON, N., VERSTRAETE, W. Community dynamics of methanotrophic bacteria during composting of organic matter. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.101, n.4, p.297-302, 2006.



11. HALLAM, S.J., PUTNAM, N., PRESTON, C.M., DETTER, J.C., ROKHSAR, D., RICHARDSON, P.M., DELONG, E.F. Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, v.305, p.1457-1461, 2004.
12. KOMÁREK, J., ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chlorococcales. – In: ETTL, H., GÄRTNER, G., HEYNING, H., MOLLENHAUER, D. (Ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer, Stuttgart, 1999, p.545.
13. KOMÁREK, J., ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 2. Teil: Oscillatoriales. – In: BÜDEL, B., KRIENITZ, L., GÄRTNER, G., SCHAGERL, M. (Ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer, Stuttgart, 2005, p.759.
14. KOMÁREK, J., ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4. Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, v.82, n.3, p.247-345, 1989.
15. MIGUEZ, C.B., SHEN, C.F., BOURQUE, D., GUIOT, S.R., GROLEAU, D. Monitoring methanotrophic bacteria in hybrid anaerobi-aerobic reactors with PCR an a catabolic gene probe. *Appl and Environmental Microbiology*, v.65, n.2, p.381-388, 1999.
16. RASTOGI, G., RANADE, D.R., YEOLE, T.Y., GUPTA, A.K., PATOLE, M.S., SHOUCHE, Y.S. Novel methanotroph diversity evidenced by molecular characterization of particulate methane monooxygenase A (pmoA) genes in a biogas reactor. *Microbiological Research*, p.1-9, 2007.
17. SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, v.71, p.359-385, 2000.
18. SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. *Nova Hedwigia*, v.16, p.89-131, 1989.
19. SOUZA, C.L., SILVA, S.Q., AQUINO, S.F., CHERNICHARO, C.A.L. Production and characterization of scum and its role in odour control in UASB reactors treating domestic wastewater. *Water Science and Technology*, v.54, n.9, p.201-208, 2006.
20. THOMSEN, T.R., FINSTER, K., RAMSING, N.B. Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.4, p.1646-1656, 2001.
21. WARD, B.B., KILPARTICK, K.A., NOVELLI, P.C., SCRANTON, M.I. Methane oxidation and methane fluxes in the ocean surface layer and deep anoxic waters. *Nature*, v.327, p.226-229, 1987.
22. ZHENG, Y., ZHANG, L., ZHENG, Y., DI, H., HE, J. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *J. Soils Sediments*, v.8, p.406-414, 2008.