

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL
NÍVEL DOUTORADO**

PAMELA LISIE GHESLA

**IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM LIXIVIADOS DE ATERRO SANITÁRIO
DE DIFERENTES FASES DE ATERRAMENTO**

São Leopoldo

2022

PAMELA LISIE GHESLA

**IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM LIXIVIADOS DE ATERRO SANITÁRIO
DE DIFERENTES FASES DE ATERRAMENTO**

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Doutora em
Engenharia Civil, pelo Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Civil da
Universidade do Vale do Rio dos Sinos
(UNISINOS)

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Paulo Gomes

São Leopoldo

2022

G418i Ghesla, Pamela Lisie.
Identificação microbiológica em lixiviados de aterro
sanitário de diferentes fases de aterramento / por
Pamela Lisie Ghesla. – 2022.
122 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) — Universidade do Vale do Rio dos
Sinos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Civil, São Leopoldo, RS, 2022.
“Orientadora: Dra. Luciana Paulo Gomes”.

1. Resíduos sólidos urbanos. 2. Aterro sanitário.
3. Lixiviado. 4. Digestão anaeróbia.
5. Microrganismos. 6. Sequenciamento de nova
geração. I. Título.

CDU: 628.4

PAMELA LISIE GHESLA

**IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM LIXIVIADOS DE ATERRO SANITÁRIO
DE DIFERENTES FASES DE ATERRAMENTO**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutora em
Engenharia Civil, pelo Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Civil da
Universidade do Vale do Rio dos Sinos
(UNISINOS)

Aprovada em 21 de março de 2022

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristina Rossi Nakayama – Universidade Federal de São Paulo

Dr. Marcelo Oliveira Caetano – Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Dr. Victor Hugo Valiati – Universidade do Vale do Rio dos Sinos

AGRADECIMENTOS À CAPES

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu pai Remi (*in memoriam*), que durante o doutorado partiu, e à minha filha Clara, que chegou trazendo luz.

AGRADECIMENTOS

À professora orientadora Luciana Gomes, pela confiança em novamente me acolher como sua orientanda, viabilizando o doutorado, me guiando e dividindo seu conhecimento ao longo de toda jornada. Também por despertar o desejo de atuar na área da docência e incentivar a aprender novas áreas.

Aos colegas do laboratório e do Grupo de Pesquisa em Saneamento Ambiental, pelos momentos de convivência, auxílios e descobertas compartilhadas. Em especial, ao Marco Aurélio, que se dedicou às pesquisas e atividades em laboratório de forma exemplar; e à Léa Dai-Prá, que sempre esteve disponível, seja nos estudos, seja na caminhada da vida e da maternidade.

Ao professor Victor Valiati, sempre generoso, que juntamente ao grupo de biologia molecular me auxiliou no desenvolvimento da pesquisa em um “mundo” até então desconhecido.

À Unisinos e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, por oferecer as condições para a realização do doutorado.

À empresa CRVR pela disponibilidade de seus dados e autorização para coletar os lixiviados.

Ao meu marido, Gabriel, que foi fundamental, sempre incentivando e apoiando minhas escolhas. Também por ajudar em meu período de luto, ao mesmo tempo que estava atuando na pandemia e cuidando da chegada da nossa filha, minha admiração eterna.

À minha família, que mesmo distante e sem entender muitas vezes o que eu estava estudando, me ensinou a ser forte e seguir em frente.

À vovó Vani e à dona Rose por me auxiliarem com a Clara enquanto eu estudava, ajuda valiosa e sem preço.

À Deus, que sempre me protegeu nos 320 km de estrada para a Unisinos e que cuidou de mim e das pessoas que amo.

RESUMO

A geração de resíduos sólidos urbanos é inerente às atividades do cotidiano, devendo haver adequada gestão e gerenciamento para esses materiais. O aterro sanitário figura entre um dos principais métodos de tratamento e disposição de resíduos, sendo utilizado em diversos países, como no Brasil. Ao longo do tempo, a matéria orgânica aterrada vai sofrendo degradação, em diferentes estágios, por meio de consórcio de microrganismos anaeróbios, gerando gases e lixiviado. A caracterização dessa microbiota permite a compreensão do processo de biodigestão, auxiliando também na questão operacional dos aterros, como otimização das células, tratamento de lixiviado e aproveitamento de biogás. No presente trabalho buscou-se contribuir com informações sobre o aterro sanitário de São Leopoldo (RS), onde foram amostrados lixiviados de cinco pontos, com fases de aterramento distintas (0 ano, 1 ano, 4 anos, 5 anos e 7 anos), em meses diferentes. As análises físico-químicas apresentaram resultados que classificam as fases do aterro como mistas, variando entre estágio ácido e metanogênico de decomposição. O perfil da microbiota foi obtido por enriquecimento de amostras de duas fases do aterro e por sequenciamento de nova geração, utilizando PCR *barcoding* da região do gene 16S rRNA. Os reatores da fase mais recente, enriquecidos com substrato para microrganismos hidrolíticos, apresentou o filo Bacteroidetes com maior abundância. Os reatores da fase mais antiga, enriquecidos com três diferentes substratos, apresentaram maior abundância para o filo Proteobacteria e o único que apresentou microrganismos do Domínio Arqueia, foi o reator enriquecido com metanol. O sequenciamento das amostras brutas das cinco fases de lixiviados apresentou o filo Proteobacteria com maior abundância nas fases mais antigas (cerca de 50%), seguido por Firmicutes, enquanto na fase mais recente foi Firmicutes (com cerca de 40%), seguida por Thermotogae. A presença de alguns filos, como Gemmatimonadetes e Chloroflexi, foi observada somente em algumas fases. O domínio arqueia representou apenas 0,68% do total sequenciado, sendo todas do filo Euryarchaeota, principalmente membros das ordens Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales.

Palavras-chave: Resíduos Sólidos Urbanos. Aterro Sanitário. Lixiviado. Digestão Anaeróbia. Microrganismos. Sequenciamento de Nova Geração.

ABSTRACT

The municipal solid waste production is part of daily activities, being necessary to have the proper management of these materials. Landfill is one of the main methods of waste treatment and disposal, it is used in several countries, as Brazil. Over time, the organic matter landfilled is degraded, in different processes, by aerobic microorganisms, generating gases and leachate. The characterization of this microbiota allows the biodigestion understanding, also can improve the operational issue of landfills, such as cell optimization, leachate treatment and biogas use. This work intended to contribute with information about the sanitary landfill of São Leopoldo (RS), where leachate from five different phases, with different ages (0 year, 1 year, 4 years, 5 years, 7 years), were sampled in distinct months. According to physical and chemical analyses, landfill phases could be classified as mixed, with acid and methanogenic stages of degradation. The microbial communities diversity was assessed by enrichment and next generation sequencing analysis, using PCR barcoding from 16S rRNA gene, of samples from two landfill phases. Recent phase reactors, enriched with substrate for hydrolytic microorganisms, showed the phylum Bacteroides with higher abundance. The oldest phase reactors, enriched with three different substrates, showed higher abundance for the phylum Proteobacteria and the only one that had Archaea Domain was the reactor enriched with methanol. The sequence analysis of samples without enrichment, directly from leachates of the five phases, presented the phylum Proteobacteria with higher abundance (around 50%), followed by Firmicutes. In contrast, in the most recent phases Firmicutes (around 40%) was the most abundant phylum, followed by Thermotogae. The phyla Gemmatimonadetes and Chloroflexi were observed only in some phases. The Archaea domain was only 0.68% of total sequenced, all belonging to the phylum Euryarchaeota, mainly Methanobacteriales, Methanomicrobiales and Methanosarcinales orders.

Key-words: Municipal Solid Waste. Landfill. Leachate. Anaerobic Digestion. Microorganisms. Next Generation Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do processo de digestão anaeróbia.....	25
Figura 2 – Vista geral da área do aterro	44
Figura 3 – Composição gravimétrica dos RSU dispostos no aterro, por Fase.....	47
Figura 4 - Metodologia da pesquisa.....	48
Figura 5 - Pontos de coleta de lixiviado nas diferentes fases do aterro.....	49
Figura 6 – Amostragem para análise microbiológica	50
Figura 7 - Amostras de lixiviados coletadas nas 5 fases do aterro.....	51
Figura 8 – Sequência da inoculação e volumes utilizados.....	54
Figura 9 – Reatores líquidos em estufa	55
Figura 10 – Reatores em meio sólido com marcação de colônias formadas.....	56
Figura 11 – Observação microscópica: lixiviado bruto da Fase 5 (campo claro).....	70
Figura 12 – Observação microscópica: lixiviado bruto da Fase 3 (campo claro).....	71
Figura 13 – Fluxograma de enriquecimento das amostras.....	72
Figura 14 – Amostra MF 2.1 em campo claro.....	74
Figura 15 - Amostra MM 5.1 em campo claro.....	74
Figura 16 – Amostra MM 5.1 em campo escuro	75
Figura 17 – Colônia formada na amostra MM 4.2 em meio sólido.....	75
Figura 18 – Amostra MM 6.2 em meio sólido	76
Figura 19 – Abundância de filamentos em diferentes reatores hidrolíticos na fase de enriquecimento (último repique) e amostra de lixiviado bruto coletado na Fase 5 em novembro (mês de início da etapa de enriquecimento)	77
Figura 20 – Abundância de famílias do filo Bacteroidetes nos reatores hidrolíticos e na amostra de lixiviado bruto coletado na Fase 5.....	78
Figura 21 - Abundância de filamentos em diferentes reatores metanogênicos na fase de enriquecimento (último repique) e amostra de lixiviado bruto coletado na Fase 3 em novembro (mês de início da etapa de enriquecimento)	79
Figura 22 - Abundância de famílias do filo Proteobacteria nos reatores metanogênicos e na amostra de lixiviado bruto coletado na Fase 3	80
Figura 23 – Famílias identificadas em todos os reatores enriquecidos	82

Figura 24 – Gêneros do domínio Arqueia	85
Figura 25 – Filos identificados por mês e Fase	86
Figura 26 – Famílias do Filo Proteobacteria.....	88
Figura 27 – Famílias do Filo Firmicutes	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diferentes propostas de descrição das fases de degradação dos RSU.	24
Quadro 2 – Características de algumas arqueias metanogênicas.....	29
Quadro 3 – Levantamento de bactérias e arqueias por fase de degradação de RSU	31
Quadro 4 - Fases de operação do aterro.....	44
Quadro 5 - Análises físico-químicas realizadas	51
Quadro 6 – Composição geral das soluções utilizadas	53
Quadro 7 – Abundância dos filos nas amostras de lixiviado bruto coletado nas 5 fases do aterro, nos dois meses em estudo	83
Quadro 8 – Microrganismos de maior abundância em gênero	93
Quadro 9 - Preparo da solução de resazurina 0,10% (m/v).....	115
Quadro 10 - Preparo da solução traço de metais	115
Quadro 11 - Preparo do meio Zinder	116
Quadro 12 - Preparo da solução de vitaminas.....	117
Quadro 13 - Preparo da solução de tamponamento.....	118
Quadro 14 - Preparo da solução redutora	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos RSU gerados em municípios de diferentes regiões do Brasil	21
Tabela 2 – Variação da composição do lixiviado gerado em aterros brasileiros	36
Tabela 3 – Classificação dos parâmetros de lixiviado quanto ao tempo e degradação	38
Tabela 4 – Geradores dos RSU encaminhados ao Aterro de São Leopoldo	45
Tabela 5 – Significância dos resultados entre meses para as mesmas Fases	60
Tabela 6 – Significância dos resultados do mês de outubro	60
Tabela 7 – Significância dos resultados do mês de novembro.....	61
Tabela 8 – Resultados dos parâmetros analisados.....	61
Tabela 9 – Nominata das diferentes classificações propostas da Digestão Anaeróbia	66
Tabela 10 – Classificação dos lixiviados amostrados em outubro e novembro no aterro sanitário de São Leopoldo, em todas as fases monitoradas.....	67
Tabela 11 – Classificação final dos lixiviados amostrados em outubro no aterro sanitário de São Leopoldo, em todas as fases monitoradas	68
Tabela 12 – Classificação final dos lixiviados amostrados em novembro no aterro sanitário de São Leopoldo, em todas as fases monitoradas	68

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	American Public Health Association (Associação Americana de Saúde Pública)
ASV	Amplicon Sequence Variant (Variantes de Sequência de Amplicons)
CRVR	Companhia Rio-Grandense de Valorização de Resíduos
DA	Digestão Anaeróbia
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ITS	Internal Transcribed Spacer (Espaçador Interno Transcrito)
LPSN	List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature (Lista de Nomes Procarióticos com Posição na Nomenclatura)
NA	Nitrogênio Amoniacal
NBR	Normas Brasileiras de Regulação
NGS	Next Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)
NT	Nitrogênio Total
OTU	Operational Taxonomic Unit (Unidade Taxonômica Operacional)
P	Fósforo
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAPD	Random Amplified Polymorphic (Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico)
RNA	Ácido Ribonucleico
RSU	Resíduos Sólidos Urbanos
SNIS	Sistema Nacional de Informação Sobre Saneamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo Geral	19
1.2.2 Objetivos Específicos	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS E ATERRO SANITÁRIO.....	21
2.2 BIODEGRADAÇÃO EM ATERRO SANITÁRIO	23
2.2.1 Microrganismos envolvidos na biodegradação	27
2.3 LIXIVIADO.....	35
2.4 MANIPULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	39
2.4.1 Sequenciamento	41
3 ESTUDO DE CASO	43
3.1 CARACTERÍSTICAS DO ATERRO SANITÁRIO	43
3.2 CARACTERÍSTICAS DOS RESÍDUOS	45
4 METODOLOGIA	48
4.1 AMOSTRAGEM	48
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	50
4.3 ENRIQUECIMENTO	52
4.3.1 Preparo e Inoculação	52
4.3.2 Monitoramentos e Repiques em Meio Líquido	54
4.3.3 Transferência para Meio Sólido	55
4.3.4 Caracterização Morfológica	57
4.4 BIOLOGIA MOLECULAR.....	58
4.4.1 Extração de DNA	58
4.4.2 Amplificação e Sequenciamento	58
4.4.3 Análise das sequências	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	60
5.2 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS	70
5.3 ANÁLISE DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS	99

APÊNDICE A – PREPARO DO MEIO E DAS SOLUÇÕES DE SUPLEMENTAÇÃO	
.....	115
APÊNDICE B – PRODUÇÃO DE TRABALHOS	122

1 INTRODUÇÃO

A partir do padrão de produção e consumo da população mundial, são gerados cerca de 2 bilhões de toneladas de resíduos sólidos por ano (KAZA *et al.*, 2018), montante esse que deve ser coletado e encaminhado para algum tipo de tratamento, pois pode causar graves problemas ambientais, econômicos e de saúde coletiva (LUO *et al.*, 2019). A gestão dos resíduos é realizada pelos órgãos públicos administrativos, que têm o desafio de equilibrar o custo com gerenciamento e técnicas ambientalmente adequadas para sua transformação.

O aterro sanitário, mesmo sendo uma técnica antiga, ainda é a mais utilizada para tratamento e disposição final de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU), especialmente em países em desenvolvimento (KAZA *et al.*, 2018; IDOWU *et al.*, 2019). Isso se deve ao fato de que o custo de implantação e operação é baixo quando comparado a outros métodos de tratamento, como os térmicos, que necessitam de alto investimento e controle (MATSAKAS *et al.*, 2017; GHESLA *et al.*, 2018). Futuramente, talvez os aterros não sejam mais o principal destino dos resíduos, se houver gestão eficiente e aplicação de recursos financeiros, priorizando a reciclagem, como preconiza a Política Nacional de Resíduos Sólidos brasileira e ocorre em países como os da União Europeia (FARMER, SHAW, WILLIAMS, 2015; MANNARINO, FERREIRA, GANDOLLA, 2016).

Em contrapartida, em alguns países, o uso de aterros sanitários ainda é meta, como no Brasil, que há anos enfrenta a realidade dos lixões, os quais já deveriam estar totalmente erradicados e encerrados desde 2014, segundo a Lei 12.305/2012 (BRASIL, 2010). Com um baixo índice de RSU encaminhados para reciclagem e compostagem, no ano de 2019, dos 64 milhões de toneladas de RSU coletados, aproximadamente 48 milhões (75%) foram destinados para aterros sanitários e 16 milhões para locais inadequados, como aterros controlados ou lixões. (BRASIL, 2020).

Embora a tendência em alguns locais não seja mais o uso de aterros sanitários como forma de tratamento de resíduos, ele continuará existindo como destinação final para aqueles materiais que não podem ser reciclados ou para receber os rejeitos oriundos de outros tratamentos. (BUTT *et al.*, 2014; STAMPS *et al.*, 2016). Além disso, os aterros já encerrados ainda continuam em atividade, uma vez que mesmo sem receber resíduos, o material permanece se decompondo e não se tem dados sobre o

que acontece depois de longos períodos de encerramento. (KJELDSEN *et al.*, 2002; OSPANBAYEVA, WANG, 2020).

A degradação dos RSU dispostos em aterro sanitário ocorre por meio de um processo amplo, envolvendo fatores físicos, químicos e biológicos. (ALCÂNTARA, 2007). Do ponto de vista biológico, os microrganismos são agentes responsáveis por promover a digestão de compostos orgânicos e inorgânicos (QUINTAES *et al.*, 2012), em uma complexa colaboração metabólica entre diferentes grupos. A maior parte ocorre de forma anaeróbia, com alta biodegradabilidade de resíduos orgânicos, promovida por bactérias e arqueias, nas etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. (STAMPS *et al.*, 2016; MEYER-DOMBARD, BOGNER, MALAS, 2020).

Estudos já realizados na área, demonstram que a microbiota em aterros é única, o que, segundo Zepeda, León e Flores (2015) dificulta a comparação ou reprodução de resultados, pois não são definidos padrões, tornando a avaliação dos estudos caso a caso. Tais diferenças também podem ocorrer dentro de um mesmo aterro, já que os RSU são aterrados durante anos, em diferentes células e com intervalos de tempo, por isso, é comum que partes dele estejam em estágios de decomposição distintos (KJELDSEN *et al.*, 2002). Schalch (1992) *apud* Ferreira (2010), acrescenta que nenhum aterro apresenta uma única fase ou uma sequência perfeitamente ordenada de fases, o que se verifica é um conjunto de diferentes etapas e idades, com condições químicas e biológicas em cada uma delas.

Conforme os resíduos são degradados no interior do aterro, podendo ser comparado a um grande reator anaeróbio, segundo Bidone e Povinelli (1999), são gerados subprodutos, como gases e lixiviados. Os gases correspondem ao gás carbônico e ao metano, considerados como de efeito estufa, devendo ser adequadamente tratados. (CHAKMA, MATHUR, 2016). O lixiviado possui composição variável e complexa, pois depende de diversos fatores, mas basicamente são encontradas altas concentrações de componentes orgânicos e inorgânicos. (GUPTA, PAULRAJ, 2016; COSTA, ALFAIA, CAMPOS, 2019). Ele representa um dos impactos mais significativos da disposição de resíduos em aterro, em razão do risco de contaminação das águas superficiais e subterrâneas, e seu difícil tratamento. (SOUTO, 2009; NAVEEN *et al.*, 2017).

O lixiviado gerado também varia ao longo das fases de aterramento de um aterro e reflete o processo microbiológico que está ocorrendo naquele local.

(BUCHROITHNER, 2015). Para identificar e classificar tais microrganismos, são utilizadas diversas características fenotípicas e moleculares. As técnicas de biologia molecular, especialmente, impulsionaram os estudos de microbiologia (ALAIN, QUERELLOU, 2009), transformando o entendimento da biodiversidade microbiana dos aterros nas últimas décadas (LOCEY, LENNON, 2016).

Em razão do uso de novas tecnologias de identificação, como sequenciamento de DNA, é percebido um aumento no número de trabalhos sobre microrganismos de aterros sanitários. Apesar disso, muito ainda se tem a compreender sobre as populações que coexistem e interagem (ZEPEDA, LEON, FLORES, 2015; STAMPS *et al.*, 2016), necessitando de novas pesquisas em diferentes locais (LIU *et al.*, 2011). Sekhohola-Dlamini e Tekere (2019) acrescentam que muitas vezes as informações obtidas de aterros *in situ* podem parecer incoerentes quando comparadas a aterros simulados, representando um desafio, principalmente sobre aterros que não há controle dos materiais dispostos.

A presente pesquisa busca conhecer os lixiviados de um mesmo aterro, situado no município de São Leopoldo, Rio Grande do Sul, e identificar, por meio de técnicas de cultivo e de biologia molecular os microrganismos anaeróbios (bactérias e arqueias) presentes. O trabalho visa contribuir para a compreensão da digestão anaeróbia (DA) em aterro de escala real, operado em distintas fases de aterramento, além de subsidiar futuras pesquisas sobre tratamento de lixiviados e operação de aterro.

Trabalhou-se com a hipótese de que as fases mais antigas do aterro estão em etapa metanogênica de degradação, sendo encontrada uma maior abundância de arqueias metanogênicas, enquanto nas fases mais recentes do aterro ocorre a etapa ácida, com a maioria de bactérias hidrolíticas-fermentativas. Essa hipótese será discutida na Revisão Bibliográfica e posteriormente nos Resultados e Discussão da tese.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral da pesquisa é relacionar características de operação de um aterro sanitário, a qualidade dos lixiviados gerados e a microbiota identificada.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) caracterizar físico-quimicamente os lixiviados gerados em cinco fases de aterramento;
- b) enriquecer e caracterizar, por meio de exames morfológicos, culturas bacterianas anaeróbias hidrolíticas e arqueias metanogênicas obtidas no lixiviado gerado em duas fases de aterramento;
- c) analisar a diversidade (riqueza e abundância) microbiana, presente nos lixiviados gerados nas cinco fases de aterramento e nas amostras enriquecidas na etapa B, por meio de sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando PCR *barcoding* da região V4 do gene 16S rRNA;

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os principais temas estudados para embasamento teórico no presente trabalho foram: resíduos sólidos, aterro sanitário, biodegradação (digestão anaeróbia) dos resíduos em aterro sanitário, lixiviados, manipulação e identificação de microrganismos. Cada assunto está abordado nos tópicos a seguir.

2.1 RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS E ATERRO SANITÁRIO

Os resíduos sólidos urbanos são compostos por diversos materiais e suas características variam em função de aspectos sociais, econômicos, culturais, geográficos, hábitos alimentares, tamanho de população, entre outros. (MONTEIRO *et al.*, 2001; CAMPUZANO, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2016). A Lei 12.305 (BRASIL, 2010) os classifica como sendo de origem domiciliar e de limpeza urbana, como resíduos domésticos e de varrição das ruas, portanto, não entram na classificação resíduos de construção, de demolição, de saúde, industriais ou perigosos.

A caracterização dos RSU basicamente é dividida em: resíduos putrescíveis (restos de alimentos, podas, contaminantes biológicos), contaminantes químicos (pilhas medicamentos, colas, etc.), plásticos, metais, tecidos, vidros, madeiras, papéis e papelões. A Tabela 1 apresenta a composição gravimétrica de alguns municípios brasileiros das diversas regiões, levantada por Alfaia, Costa e Campos (2017).

Tabela 1 – Composição dos RSU gerados em municípios de diferentes regiões do Brasil

RESÍDUO	Araguaina (norte) (%)	Cubatí (nordeste) (%)	Parnaíba (centro-oeste) (%)	Rio de Janeiro (sudeste) (%)	Porto Alegre (sul) (%)	Brasil (%)
Orgânicos	54,68	57,00	54,02	52,00	57,27	57,27
Metais	1,09	1,74	3,64	1,66	1,20	1,46
Papéis e papelões	10,87	3,70	7,48	15,39	12,90	11,62
Plásticos	14,67	3,86	16,73	21,15	13,00	11,23
Vidros	0,83	1,01	1,87	3,50	1,90	2,56
Outros*	17,86	32,69	16,26	6,30	11,90	15,86

* A categoria “outros” corresponde a resíduos misturados, tecidos e embalagens longa vida
Fonte: Alfaia, Costa, Campos (2017)

A maior parcela de resíduos gerados é de putrescíveis, cerca de 55%, esse valor é esperado para países em desenvolvimento econômico (KAZA *et al.*, 2018),

apesar de alguns estudos terem apresentado diminuição desse material no Brasil ao longo dos anos. (MIGUEL *et al.*, 2016). A nível mundial, os resíduos orgânicos também correspondem à maior categoria, representando 44% do total gerado. Já em países classificados como de alto desenvolvimento econômico, o percentual desta categoria diminui para 32%, sendo os materiais recicláveis a maior parcela (acima de 50%). (KAZA *et al.*, 2018).

Existem diversos tipos de tratamentos dos resíduos sólidos urbanos. Segundo Monteiro (2002), o tratamento é definido como uma série de procedimentos destinados a reduzir a quantidade ou o potencial poluidor dos resíduos, seja impedindo o descarte em local inadequado, seja transformando-o em material inerte ou biologicamente estável. De acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos (BRASIL, 2010), a responsabilidade pela gestão dos RSU é dos municípios e a lei define que ela deve ser executada de maneira integrada, por meio de ações voltadas para a busca de soluções, de forma a considerar as dimensões política, econômica, ambiental, cultural e social, sob a premissa do desenvolvimento sustentável.

Os dados do Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento - SNIS (BRASIL, 2020), revelam que a cobertura de coleta de resíduos no Brasil é de 92,1%, mas apenas 38,7% possuem programa de coleta seletiva, o que acaba dificultando a recuperação de materiais recicláveis ou a compostagem do material orgânico, já que acabam misturados no momento de descarte nos lares ou no momento de coleta.

Os aterros sanitários são considerados tanto como uma forma de tratamento de RSU, quanto de destinação final dos rejeitos. A norma NBR 8419 da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (1992, p.1) define aterro sanitário como,

Técnica de disposição de resíduos sólidos urbanos no solo, sem causar danos à saúde pública e à sua segurança, minimizando os impactos ambientais, método este que utiliza princípios de engenharia para confinar os resíduos sólidos à menor área possível e reduzi-los ao menor volume permissível, cobrindo-os com uma camada de terra na conclusão de cada jornada de trabalho, ou a intervalos menores, se necessário.

De acordo com Kaza *et al.* (2018), cerca de 40% de todos os resíduos gerados no mundo são dispostos em aterros, o que provavelmente se deve ao fato de que ainda são de alto custo as demais alternativas tratamento (IDOWU *et al.*, 2019). Além disso, a existência de alguma forma de disposição final se faz necessária para dispor os rejeitos de outras técnicas, como, por exemplo de reciclagem e de incineração. O levantamento do SNIS (BRASIL, 2019) aponta que 80% dos municípios da região sul

do país encaminham seus RSU para aterro sanitário, seguido pela região sudeste, com 49,5% dos municípios e por último a região nordeste, com 6,0% dos municípios.

Há aterros constituídos por uma única célula, outros com várias células que são construídas independentemente uma das outras, como se fossem aterros separados. Em outro tipo, as células novas são construídas sobre as mais antigas (SOUTO, 2009), já que ao longo do tempo ocorrem deslocamentos verticais (recalques), decorrentes dos processos de compactação e compressibilidade física, química e biodegradativa. (ARAÚJO NETO, 2016).

2.2 BIODEGRADAÇÃO EM ATERRO SANITÁRIO

Os resíduos sólidos urbanos acumulados continuamente em aterros sanitários não são inativos, eles correspondem a uma mistura de grande variedade química e sofrem transformações sob a influência de agentes naturais (CASTILHOS JÚNIOR *et al.*, 2003; FEI, RASKIN, ZEKOS, 2014). A biodegradação depende de diversos fatores, principalmente teor de oxigênio, umidade, temperatura e pH (SEKHOHOLA-DLAMINI, TEKERE, 2019). A velocidade desta degradação também varia de acordo com o tipo de material, Russo (2005), indica que a fração de resíduos de rápida degradação leva de 3 meses a 5 anos para degradar, a moderada de 5 a 10 anos e a fração lenta de 10 a 50 anos ou mais.

A biodegradação dos RSU pela atividade microbiana está, principalmente, relacionada à fração orgânica existente no aterro, posto que a sua transformação pode se realizar por meio da decomposição biológica, levada a efeito pelos microrganismos saprófitos ou decompositores naturalmente existentes no meio. (BIDONE, POVINELLI, 1999).

De acordo com Souto (2009), a dinâmica de um aterro apresenta padrões que permitem que ela seja dividida em fases, que não devem ser confundidas com as fases de decomposição dos resíduos. Segundo o autor, as fases do aterro estão ligadas ao que se observa como saída (lixiviados e gases), ao passo que as fases da decomposição correspondem a cada uma das etapas que fazem com que uma molécula complexa seja convertida em substâncias mais simples, fornecendo matéria e energia para as comunidades microbianas. No presente trabalho, adotou-se a palavra Fase (com letra maiúscula) quando se refere à de operação do aterro e fase (com letra minúscula) para fase de degradação.

Na perspectiva de demonstrar as fases de degradação, modelos globais foram desenvolvidos por diferentes autores, com variações de terminologias e sequência. Farquhar e Rovers (1973) resumiram em quatro fases a decomposição dos resíduos baseados na geração de biogás; Pohland e Harper (1985) propuseram cinco fases para avaliar a estabilização dos resíduos em aterro em função do tempo; Barlaz, Schaefer, Ham (1989) sugeriram quatro fases de degradação e formação de lixiviados; McBean, Rovers e Farquhar (1995) dividiram a evolução dos aterros em três fases; e Castilhos Júnior *et al.* (2003) abordam quatro fases em seu trabalho para descrever a digestão anaeróbia em geral. O Quadro 1 apresenta a descrição, por fase de degradação, dos autores citados.

Quadro 1 – Diferentes propostas de descrição das fases de degradação dos RSU.

AUTOR	FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV	FASE V
Farquhar, Rovers (1973)	Aeróbia	Anaeróbia não Metanogênica	Anaeróbia metanogênica instável	Anaeróbia metanogênica estável	
Pohland, Harper (1985)	Inicial	Transição	Ácida	Metanogênica	Formação final
Barlaz, Schaefer, Ham (1989)	Aeróbia	Ácida	Metanogênica acelerada	Metanogênica desacelerada	
McBean, Rovers, Farquhar (1995)	Ácida	Metanogênica	Maturação		
Castilhos Júnior <i>et al.</i> (2003)	Hidrólise	Acidogênese	Acetogênese	Metanogênese	

Fonte: elaborado pela autora

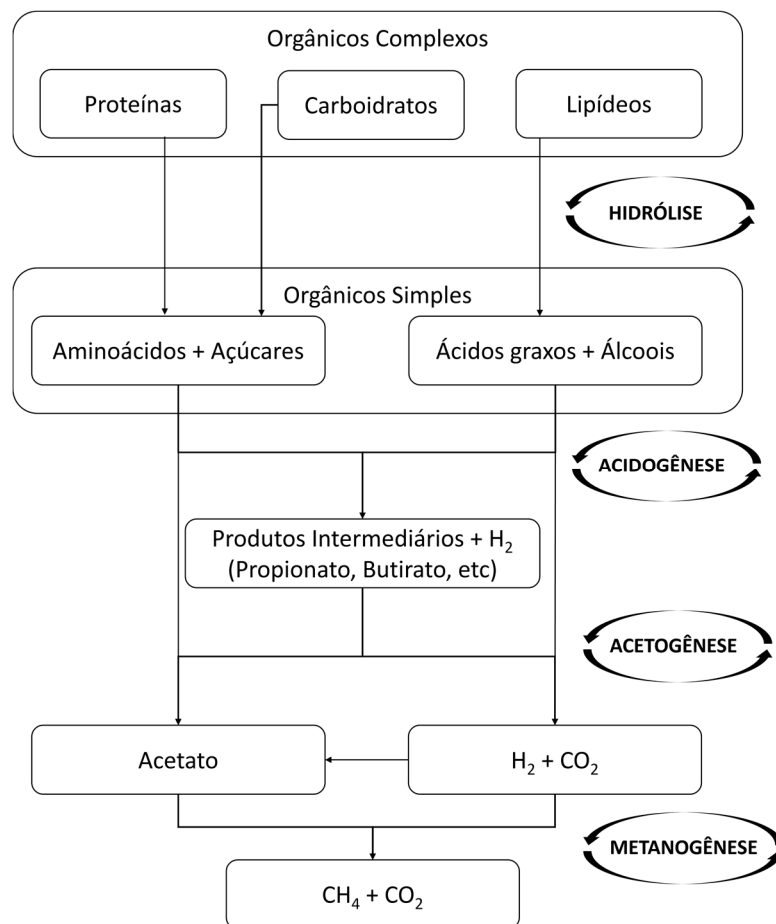
A fase de degradação aeróbia ocorre quando os RSU são dispostos no aterro, seus componentes biodegradáveis começam a sofrer as ações de microrganismos, um período de aclimação é observado, e ocorre um acúmulo suficiente de umidade e oxigênio que suportam a atividade microbiana. (McBEAN, ROVERS, FARQUHAR, 1995). Esta fase é breve, já que o oxigênio não é repostado, uma vez que o resíduo está coberto, e dura aproximadamente um mês, podendo ser um período maior nos casos de aterros pouco profundos (inferiores a 3 metros). Os principais microrganismos envolvidos são as bactérias, as leveduras e os fungos, sendo os subprodutos resultantes desta digestão: CO₂ (gás carbônico), sais minerais de nitrogênio, fósforo, potássio e outros macro e micronutrientes solúveis em água. (BIDONE e POVINELLI, 1999; CASTILHOS Jr *et al.*, 2003).

O restante da biodegradação dos RSU ocorre sob ambiente anaeróbio, na também chamada digestão anaeróbia, onde existem interações metabólicas mútuas,

com correlações complexas, paralelas e em série entre diversos grupos de microrganismos, com um grupo produzindo o substrato para outro. Ou seja, em situação de equilíbrio, todos os produtos de uma etapa metabólica anterior, são convertidos para a etapa posterior (VERMA, 2002; BUCHROITHNER, 2015; SONG *et al.*, 2015). Adotando a divisão encontrada na literatura em quatro fases de biodegradação anaeróbia (Quadro 1), são elas: hidrólise, fermentação ácida ou acidogênese, fermentação acetogênica ou acetogênese e metanogênese (CASTILHOS Jr *et al.*, 2003; METCALF; EDDY, 2016)

Comumente o esquema de biodegradação/digestão anaeróbia é representado por meio de fluxograma, como na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma do processo de digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado de Gerardi (2006); Chernicharo (2007) e Metcalf, Eddy (2016)

A hidrólise é o primeiro processo em um sistema de digestão anaeróbia da matéria orgânica, quando substâncias e materiais orgânicos complexos de alta massa molecular (carboidratos, proteínas e lipídios) são transformadas em moléculas de menor tamanho (açúcares, aminoácidos, ácidos graxos de cadeias longa e glicerina)

por bactérias fermentativas hidrolíticas. (SCHNÜRER, JARVIS, 2010). Diversos grupos de bactérias hidrolíticas-fermentativas atuam na “quebra” das moléculas, como as celulolíticas, amilolíticas e proteolíticas, que fazem a degradação de celulose, amido e proteínas (GERARDI, 2006; AL SEADI *et al.*, 2008).

A segunda fase da digestão anaeróbia é a acidogênese, ou fermentação ácida, quando produtos oriundos da hidrólise são convertidos em produtos intermediários, principalmente em ácido acético, propiônico e butírico, além de álcoois, cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio. (CHERNICHARO, 2007). Esta fase é caracterizada pelo baixo pH do lixiviado devido a presença de ácidos orgânicos e elevadas concentrações de CO₂ e gases ácidos dissolvidos. Ela pode durar alguns anos, quando são produzidas quantidades consideráveis de compostos orgânicos simples e de alta solubilidade, principalmente ácidos graxos voláteis. (CASTILHOS JÚNIOR *et al.*, 2003; BUCHROITHNER, 2015). De acordo com Schnürer e Jarvis (2010), muitos microrganismos que realizam a hidrólise também são capazes de realizar a acidogênese.

Caracterizando a terceira fase, na acetogênese ou fermentação acetogênica, desenvolvem-se os compostos com apenas um ou dois átomos de carbono (metanol ou formiato e acetato) e outros substratos mais simples. Nesta fase ocorre a conversão dos produtos oriundos da acidificação em ácido acético, grandes quantidades de nitrogênio amoniacal (NA), hidrogênio (H₂) e dióxido de carbono (CO₂). Com exceção das bactérias homoacetogênicas, todas as acetogênicas produzem o hidrogênio como metabólito obrigatório. (CASTILHOS JÚNIOR *et al.*, 2003; METCALF, EDDY, 2016).

Os compostos orgânicos simples formados na fase acetogênica, como acetato, hidrogênio e parte do dióxido de carbono, são consumidos na quarta fase, por arqueias metanogênicas, dando origem ao metano (CH₄) e ao CO₂. Metabolicamente, a metanogênese ocorre por meio de três diferentes vias bioquímicas de produção do metano (ABBASI, T., TAUSEEF, S., ABBASI, S., 2012; NAKAYAMA *et al.*, 2019):

- Via hidrogenotrófica, que é a mais difundida, utiliza o dióxido de carbono como fonte de carbono e acceptor de elétrons, e o hidrogênio, como fonte de energia para produção de metano. Formiato também pode ser convertido a metano por essa via, atuando como fonte de CO₂ e potencial redutor;

- Via acetoclástica, realizada através das arqueias metanogênicas acetoclásticas, que formam metano e dióxido de carbono a partir de ácido acético ou metanol, majoritariamente na ausência de H₂. São responsáveis por cerca de 60%-70% de toda produção de metano;
- E a via metilotrófica, que cataboliza compostos contendo grupos metil, como metanol, mono-, di-, trimetilaminas e dimetil sulfeto. (KHANAL, 2009; VAN DE WIJNGAARD *et al.*, 2002 *apud* VICH, 2010).

Buchroithner (2005) ressalta que a estrita divisão do caminho da degradação em fases, ocorrendo uma após a outra, é de natureza teórica. Devido à estratificação do material do aterro, diferentes datas de deposição e diferentes condições dentro das células, as quatro fases podem ocorrer ao mesmo tempo em um aterro.

2.2.1 Microrganismos envolvidos na biodegradação

A maior parte da degradação dos RSU é realizada por bactérias e arqueias anaeróbicas (STAMPS *et al.*, 2016) e ocorre conforme o ciclo de biodigestão abordado no capítulo 2.2. O domínio Bactéria compreende uma enorme variedade de procariotos, no qual alguns podem ser distinguidos pela sua morfologia e fisiologia e outros que somente são identificados por meio de técnicas moleculares. (BUCHROITHNER, 2015).

O tamanho da maioria das bactérias é de 0,3 µm a 3 µm, exceto pelas formas filamentosas (maior que 100 µm), cianobactérias (5 – 50 µm) e espiroquetas (maior que 50 µm). Podem ser agrupadas em três formas básicas: bacilos (bastonete), cocos (esfera) e espirilo (espiral), em algumas espécies de bactérias, a célula-filha não se separa após a divisão celular, resultando na formação de diversos arranjos de crescimento, incluindo colônias, tétrades, correntes e filamentos. (GERARDI, 2006).

A descrição frequente de novas sequências de DNA em bancos de dados vêm acrescentando novas espécies de bactérias ao longo do tempo. A pesquisa de Sawamura *et al.* (2010), por exemplo, investigou os microrganismos presentes nos resíduos aterrados, em diferentes profundidades, em um aterro do Japão. Song *et al.*, (2015) investigaram os microrganismos dos lixiviados gerados em duas fases de um aterro na China. Zainun e Simarani (2018), por sua vez, estudaram amostras de solo de dois lixões (na Malásia), um encerrado e outro em atividade, a fim de conhecer a diversidade de microrganismos nesses locais.

De acordo com a lista do site The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – LPSN (acessado em setembro de 2021), atualmente existem 40 filos de bactérias. Na biodegradação anaeróbia dos RSU, dentre as bactérias hidrolíticas-fermentativas, que atuam nos compostos orgânicos dos RSU, estão as celulolíticas, amilolíticas e proteolíticas. (ALCANTARA, 2007). Destacam-se os gêneros: *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacterioides*, *Proteus*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Bifidobacteria* e *Clostridium*. (GERARDI, 2006; CHERNICHARO, 2007).

Na fase acidogênica os gêneros mais comuns de bactérias são: *Clostridium*, *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Butybuterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Escherichia*. E na fase acetogênica, os gêneros mais conhecidos são: *Acetobacter*, *Desulfovibrio*, *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas* e *Wolinii*. (GERARDI, 2006; CHERNICHARO, 2007; ABBASI, TAUSEEF, ABBASI, 2012).

As arqueias, do Domínio Arqueia, ora se assemelham com as bactérias, ora com os eucariotos, além de possuírem características próprias, inexistentes em outros domínios. (METCALF, EDDY, 2016). Elas são conhecidas por estar presentes em ambientes extremos (MADIGAN *et al.*, 2010), no entanto, o uso de abordagens moleculares contribuiu para a detecção de arqueias em ambientes não extremos também, podendo ser considerada sua distribuição no Domínio Arqueia equivalente àquela do Domínio Bactéria. (COSTA, 2018).

Segundo Madigan *et al.* (2010), as arqueias podem ser divididas em quatro grupos distintos: haloarqueia, metanogênica, hipertermófila e acidófila extrema. De acordo com o site LPSN (acessado em setembro de 2021), 5 filos do Domínio Arqueia são oficialmente aceitos: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota e Thaumarchaeota, sendo os únicos com representantes cultivados. Apesar disso, diversos estudos genômicos propõem novos filos e constante reorganização da árvore filogenética baseada no dinamismo dessa evolução. (TAHON, GEESINK, ETTEMA, 2021).

As arqueias metanogênicas, que realizam a quarta etapa da biodigestão dos RSU, possuem uma grande diversidade morfológica e a maioria pertence aos filos Euryarchaeota e Crenarchaeota. (MADIGAN *et al.*, 2010). As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas são encontradas nas cinco ordens: Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanobacteriales, Methanococcales e Methanopyrales. Os gêneros mais frequentes isolados são *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e

Methanobrevibacter. As arqueias metanogênicas acetoclásticas estão presentes apenas na ordem Methanosarcinales, gêneros comuns são *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (utiliza exclusivamente acetato). E as arqueias metanogênicas metilotróficas são encontradas no gênero *Methanosphaera*, de *Methanobacteriales*. (CHERNICHARO, 2007; ABBASI, T., TAUSEEF, S., ABBASI, S., 2012).

O Quadro 2 apresenta as características, morfologia dos microrganismos e substratos utilizados para a metanogênese, de algumas arqueias metanogênicas encontradas no processo de biodegradação.

Quadro 2 – Características de algumas arqueias metanogênicas

Ordem	Gênero	Morfologia	Substratos
Methanobacteriales	<i>Methanobacterium</i>	Bacilos longos	H ₂ + CO ₂ , formiato
	<i>Methanobrevibacter</i>	Bacilos longos	H ₂ + CO ₂ , formiato
	<i>Methanosphaera</i>	Cocos	Metanol + H ₂
	<i>Methanothermus</i>	Bacilos	H ₂ + CO ₂
	<i>Methanothermobacter</i>	Bacilos	H ₂ + CO ₂ , formiato
Methanococcales	<i>Methanococcus</i>	Cocos irregulares	H ₂ + CO ₂ , piruvato + CO ₂ , formiato
	<i>Methanothermococcus</i>	Cocos	H ₂ + CO ₂ , formiato
	<i>Methanocaldococcus</i>	Cocos	H ₂ + CO ₂
	<i>Methanotorris</i>	Cocos	H ₂ + CO ₂
Methanomicrobiales	<i>Methanomicrobium</i>	Bacilos curtos	H ₂ + CO ₂ , formiato
	<i>Methanogenium</i>	Cocos irregulares	H ₂ + CO ₂ , formiato
	<i>Methanospirillum</i>	Espirilos	H ₂ + CO ₂ , formiato
	<i>Methanoplanus</i>	Células discoides	H ₂ + CO ₂ , formiato
	<i>Methanocorpusculum</i>	Cocos irregulares	H ₂ + CO ₂ , formiato, alcoois
	<i>Methanoculleus</i>	Cocos irregulares	H ₂ + CO ₂ , formiato, alcoois
	<i>Methanofolis</i>	Cocos irregulares	H ₂ + CO ₂ , formiato
	<i>Methanolacinia</i>	Bacilos irregulares	H ₂ + CO ₂ , alcoois
Methanosarcinales	<i>Methanosarcina</i>	Grandes cocos irregulares	H ₂ + CO ₂ , metanol, metilaminas, acetato
	<i>Methanolobus</i>	Cocos irregulares agregados	Metanol, metilaminas
	<i>Methanohalobium</i>	Cocos irregulares	Metanol, metilaminas
	<i>Methanococcoides</i>	Cocos irregulares	Metanol, metilaminas
	<i>Methanohalophilus</i>	Cocos irregulares	Metanol, metilaminas, metil, sulfetos
	<i>Methanosaeta</i>	De bacilos longos a filamentos	Acetato
	<i>Methanosalsum</i>	Cocos irregulares	Metanol, metilaminas, dimetilsulfeto
Methanopyrales	<i>Methanopyrus</i>	Bacilos em cadeia	H ₂ + CO ₂

Fonte: Madigan *et al.* (2010)

Buchroithner (2015) fez o levantamento de alguns trabalhos sobre identificação microbiológica de aterros sanitários, via técnicas independentes de cultivo, com um

overview dos microrganismos encontrados e suas classificações quanto a fase de biodegradação dos resíduos. O Quadro 3 apresenta a relação de bactérias e arqueias identificadas, divididas em filo, classe, ordem, família, gênero e espécie.

Na fase hidrolítica foram relacionados os dados de cinco estudos: Burrell *et al.* (2004); Krishnamurth e Chakrabarti (2013); Li *et al.* (2009); McDonald *et al.* (2008); McDonald *et al.* (2012); Pourcher *et al.* (2001); Van Dyke e McCarthy (2002) e Weiss *et al.* (2008). Na fase acidogênica foram relacionados os trabalhos de Burrell *et al.* (2004); Li *et al.* (2009); Tao *et al.* (2014) e Weiss *et al.* (2008). Na fase acetogênica, foram relacionados os trabalhos de Li *et al.* (2009) e Weiss *et al.* (2008). Já na fase metanogênica foram relacionados os estudos de: Burrell *et al.* (2004); Cardinali Rezende *et al.* (2009); Chen *et al.*, (2003); Huang *et al.* (2002); Huang *et al.* (2003); Krishnamurth e Chakrabarti (2013); Laloui-Carpentier *et al.* (2006); Li *et al.* (2009); Uz *et al.* (2003) e Weiss *et al.* (2008).

O filo mais citado entre todos relacionados no Domínio Bactéria, foi Firmicutes, sendo a maioria das classes Bacilli e Firmicutes. O filo de predominância no Domínio Arqueia foi o Euryarchaeota, com divisão das ordens Methanomicrobiales, Methanosarcinales e Methanobacteriales.

Quadro 3 – Levantamento de bactérias e arqueias por fase de degradação de RSU

FASE HIDROLÍTICA					
FILO	CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>C. stercoarium</i>
	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>C. thermocellum</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>C. leptum</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Oscillospiraceae	<i>Clostridium</i>	<i>C. cellulosi</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Oscillospiraceae	<i>Ruminococcus</i>	<i>R. albus</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Oscillospiraceae	<i>Ruminococcus</i>	<i>R. flavefaciens</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Oscillospiraceae	<i>Eubacterium</i>	<i>E. plautii</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Oscillospiraceae	<i>Sporobacter</i>	<i>S. termitidis</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Lachnospiraceae	<i>Butyrivibrio</i>	-
	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	<i>Desulfotomaculum</i>	-
	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Acetivibrio</i>	-
	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. macmurdoensis</i>
	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	<i>Solibacillus</i>	<i>S. silvestris</i>
	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	<i>Paenisporosarcina</i>	<i>P. macmurdoensis</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	-
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Terribacillus</i>	<i>T. goriensis</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Psychrobacillus</i>	<i>P. insolitus</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Psychrobacillus</i>	<i>P. psychrodurans</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Psychrobacillus</i>	<i>P. psychrotolerans</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. circulans</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Oceanobacillus</i>	-
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Ornithinibacillus</i>	-
	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>B. pabuli</i>
	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. amylolyticus</i>
	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. polymyxa</i>
	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. alginoliticus</i>

	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. chondroitinus</i>
	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. macerans</i>
	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Cohnella</i>	-
	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus</i>	-
	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	-
	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	-	-
	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	-
	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	-
	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. parabrevis</i>
	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. spicheri</i>
	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	-
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Thermomonosporaceae	<i>Actinomadura</i>	-
	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Microbacterium</i>	<i>M. immunditiarum</i>
	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	-
	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	-
	Actinobacteria	Micrococcales	Promicromonosporaceae	<i>Promicromonospora</i>	<i>P. citrea</i>
	Actinobacteria	Micrococcales	Promicromonosporaceae	<i>Promicromonospora</i>	<i>P. sukumoe</i>
	Actinobacteria	Micrococcales	Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>C. cellulans</i>
	Actinobacteria	Micrococcales	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. hominis</i>
	Actinobacteria	Micrococcales	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. turbata</i>
	Actinobacteria	Actinomycetales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	-
	Actinobacteria	Mycobacteriales	Dietziaceae	<i>Dietzia</i>	-
	Actinobacteria	Micromonosporales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	-
	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	-
	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	-
	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	-
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Hiphomicrobiales	Methylobacteriaceae	<i>Microvirga</i>	-
	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acectobacteraceae	<i>Roseomonas</i>	-
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	-
	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	-
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>B. cellulosolvens</i>
Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	<i>Fibrobacter</i>	<i>F. succinogenes</i>

FASE ACIDOGÉNICA					
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	-
Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	<i>Fibrobacter</i>	-
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. toyotomiensis</i>
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. alcaliphila</i>
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. oleovorans</i>
	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. fuchuensis</i>
	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. sakei</i>
	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. hammesii</i>
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Anaerobaculum</i>	<i>A. mobile</i>
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	-	-
FASE ACETOGENICA					
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Anaerobaculum</i>	-
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	-	-
Firmicutes	Tissierellia	Tissierellales	Tissierellaceae	<i>Sporanaerobacter</i>	<i>S. acetigenes</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Lachnospiraceae	<i>Syntrophococcus</i>	<i>S. sucromutans</i>
	Clostridia	Eubacteriales	Eubacteriaceae	<i>Pseudoramibacter</i>	<i>P. alactolyticus</i>
	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoacetogenium</i>	-
	Tissierellia	Tissierellales	Tissierellaceae	<i>Clostridium</i>	<i>C. ultunense</i>
FASE METANOGENICA					
FILO	CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÉNERO	ESPÉCIE
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. bourgensis</i>
	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. oldenburgensis</i>
	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. chikugoensis</i>
	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. marisnigri</i>
	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. palmeoli</i>
	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. olentangyi</i>
	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. thermophilicus</i>
	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. formosanus</i>
	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosaeta</i>	<i>M. concilii</i>
	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	<i>M. thermophila</i>
	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	<i>M. siciliae</i>
	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	<i>M. barkeri</i>

	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	<i>M. semesiae</i>
	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanimicrococcus</i>	-
	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanosphaera</i>	<i>M. stadtmanae</i>
	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanothermobacter</i>	<i>M. thermautotrophicus</i>
	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	<i>M. oryzae</i>
	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobrevibacter</i>	-
	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	<i>M. hungatei</i>
Candidatus Thermoplasma	Thermoplasmatota	Thermoplasmata	Thermoplasmataceae	<i>Thermoplasma</i>	<i>T. acidophilum</i>

Fonte: Adaptado de Buchroithner (2015)

2.3 LIXIVIADO

Conforme visto anteriormente, durante a biodegradação dos RSU, são gerados produtos, especialmente gases e lixiviado. Lange e Amaral (2009, p.9) definem lixiviado como,

Líquido proveniente da umidade natural e da água de constituição presente na matéria orgânica dos resíduos, dos produtos da degradação biológica dos materiais orgânicos e da água de infiltração na camada de cobertura e interior das células de aterramento, somado a materiais dissolvidos ou suspensos que foram extraídos da massa de resíduos.

Diversos fatores influenciam nas características dos lixiviados, como idade, precipitação, variações de clima, tipos de resíduos, profundidade do resíduo aterrado, tipo de operação do aterro, entre outros (RENOU *et al.*, 2008; NAVEEN *et al.*, 2017; BHATT *et al.*, 2017). Sendo assim, é possível afirmar que a composição dos lixiviados é heterogênea e varia consideravelmente de um local para outro e de um mesmo local entre épocas do ano (WANG *et al.*, 2018; VACCARI, TUDOR, VINTI, 2019).

De uma maneira geral, não é possível estabelecer uma composição fixa para o lixiviado (EDUARDO, 2007), mas, segundo Christensen *et al.* (2001) e Mojiri *et al.* (2014), seus compostos podem ser classificados em quatro grandes categorias e seus exemplos:

- Matéria Orgânica Dissolvida: macromoléculas, como ácidos húmicos e fúlvicos, lignina e ácidos graxos voláteis, demonstrada pela DQO ou Carbono Orgânico Total;
- Compostos Orgânicos Xenobióticos: provenientes de produtos químicos industriais, como hidrocarbonetos aromáticos, compostos halogenados, compostos fenólicos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos;
- Macrocomponentes Inorgânicos: sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, cloretos, sulfato, manganês, amônio e bicarbonato;
- Metais Pesados: cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco, geralmente em pequenas concentrações.

No Brasil, o clima tropical, com elevadas temperaturas e volumes altos de precipitação, favorece o processo de degradação de resíduos e formação de lixiviado. (MONTEIRO *et al.*, 2001). Por sua vez, sua composição apresenta altas cargas de

matéria orgânica, reflexo da forma de alimentação dos brasileiros, com grandes gerações de restos de alimentos putrescíveis a partir da preparação das refeições, desperdícios e até má qualidade dos produtos. (COSTA, ALFAIA, CAMPOS, 2019).

As características do lixiviado podem ser representadas por parâmetros, como DQO (Demanda Química de Oxigênio), DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), relação DBO/DQO, pH, sólidos suspensos, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total Kjeldhal e metais pesados. (RENOU *et al.*, 2008). A Tabela 2 apresenta a composição do lixiviado para alguns aterros sanitários brasileiros, indicando as variações que ocorrem entre diferentes cidades.

Tabela 2 – Variação da composição do lixiviado gerado em aterros brasileiros

VARIÁVEL	FAIXA MÁXIMA	FAIXA MAIS PROVÁVEL	FVMP (%)
pH	5,7 – 8,6	7,2 – 8,6	78
Alcalinidade Total (mg/L de CaCO ₃)	750 – 11.400	750 – 7.100	69
DBO (mg/L de O ₂)	<20 – 30.000	<20 – 8.600	75
DQO (mg/L de O ₂)	190 – 80.000	190 – 22.300	83
Óleos e Graxas (mg/L)	10 – 480	10 – 170	63
Fenóis (mg/L de C ₆ H ₅ OH)	0,9 – 9,9	0,9 – 4,0	58
NT (mg/L de N)	80 – 3.100	Não há	-
N-amoniacal (mg/L de N)	0,4 – 3.000	0,4 – 1.800	72
N-orgânico (mg/L de N)	5 – 1.200	400 – 1.200	80
P-total (mg/L)	0,1 – 40	0,1 – 15	63
Sulfeto (mg/L)	0 – 35	0 – 10	78
Sulfato (mg/L)	0 – 5.400	0 – 1.800	77
Cloreto (mg/L)	500 – 5.200	500 – 3.000	72
Sólidos totais (mg/L)	3.200 – 21.900	3.200 – 14.400	79
Sólidos totais fixos (mg/L)	630 – 20.000	630 – 5.000	60
Sólidos totais voláteis (mg/L)	2.100 – 14.500	2.100 – 8.300	74
Sólidos suspensos totais (mg/L)	5 – 2.800	5 – 700	68
Sólidos suspensos voláteis (mg/L)	5 – 530	5 - 200	62
Ferro (mg/L)	0,01 – 260	0,01 – 65	67
Manganês (mg/L)	0,04 – 2,6	0,04 – 2,0	79
Cobre (mg/L)	0,005 – 0,6	0,05 – 0,15	61
Níquel (mg/L)	0,03 – 1,1	0,03 – 0,5	71
Cromo (mg/L)	0,003 – 0,8	0,003 – 0,5	89
Cádmio (mg/L)	0 – 0,26	0 – 0,065	67
Zinco (mg/L)	0,01 – 8,0	0,01 – 1,5	70

FVMP: Frequência de Ocorrência dos Valores Mais Prováveis

Fonte: Souto, Povinelli (2007)

O tempo de aterramento pode influenciar a qualidade dos lixiviados e, conforme sua composição, é usual classificá-lo em lixiviado novo (na fase acidogênica) ou lixiviado estabilizado (fase metanogênica). (KJELDTSEN *et al.*, 2002). Segundo os autores, acredita-se que o potencial poluidor do lixiviado seja inversamente proporcional ao tempo de aterramento e um importante parâmetro para a classificação da idade do lixiviado é a relação DBO/DQO. Gao *et al.* (2015) relata que lixiviados jovens são de aterros com menos de um ano de idade, de relação DBO/DQO acima de 0,5, e lixiviados velhos são de aterros com mais de cinco anos, com relação DBO/DQO menor que 0,1. Para Kjeldsen *et al.* (2002), os valores médios seriam de 0,58 de DBO/DQO para a fase ácida e 0,06 de DBO/DQO para a fase metanogênica.

A Tabela 3 apresenta a classificação dos lixiviados quanto a idade dos aterros, segundo os dados de Farquhar (1989) e Tchobanoglous, Theisen e Vigil (1993); e quanto à fase de degradação dos resíduos, segundo dados de Souto (2009), que compilou dados de 40 aterros sanitários brasileiros, Ehrig (1989) que compilou dados de 20 aterros alemães e Pohland e Harper (1985) que reuniram dados de aterros simulados em laboratório, de diversos locais.

Tabela 3 – Classificação dos parâmetros de lixiviado quanto ao tempo e degradação

Parâmetro	Farquhar, 1989				Tchobanoglous, Theisen e Vigil, 1993		Souto, 2009		Ehrig, 1989		Pohland e Harper, 1985			
	0 a 5 anos	5 a 10 anos	10 a 20 anos	>20 anos	Aterro Jovem (< 2 anos)	Aterro Velho (>10 anos)	Fase Ácida	Fase Metano	Fase Ácida	Fase Metano	Fase Transição	Fase Ácida	Fase Metano	Fase Maturação
pH	3 - 6	6 - 7	7 - 7,5	7,5	4,5 - 7,5	6,6 - 7,5	4,4 - 4,8	5,9 - 9,2	4,5 - 7,5	7,5 - 9	6,7	4,7 - 7,7	6,3 - 8,8	7,1 - 8,8
Turbidez	-	-	-	-	-	-	100 - 540	0,02 - 620	-	-	-	-	-	-
DBO (mgO ₂ /L)	10.000 - 25.000	1.000 - 4.000	50 - 1.000	<50	2.000 - 30.000	100 - 200	1 - 55.000	3 - 17.200	4.000 - 40.000	20 - 550	100 - 10.900	1.000 - 57.700	600 - 3.400	4 - 120
DQO (mgO ₂ /L)	15.000 - 40.000	10.000 - 20.000	1.000 - 5.000	<1.000	3.000 - 60.000	100 - 500	90 - 100.000	20 - 35.000	6.000 - 60.000	500 - 4.500	480 - 18.000	1.500 - 71.100	580 - 9.760	31 - 900
DBO/DQO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23 - 0,87	0,40 - 0,80	0,17 - 0,64	0,02 - 0,13
NA (mg/L)	500 - 1.500	300 - 500	50 - 200	<30	10 - 800	20 - 40	0,07 - 2.000	0,03 - 3.000	-	-	120 - 125	2 - 1.300	6 - 430	6 - 430
NT (mg/L)	1.000 - 3.000	400 - 600	75 - 300	<50	-	-	1,7 - 3.000	0,6 - 5.000	-	-	180 - 860	14 - 1.970	25 - 82	7 - 490
Alc T (mgCaCO ₃ /L)	-	-	-	-	1.000 - 10.000	200 - 1.000	170 - 32.000	125 - 20.200	-	-	200 - 2.500	140 - 9.650	760 - 5.050	200 - 3.520
PT (mg/L)	100 - 300	10 - 100	-	<10	5 - 100	5 - 10	nd - 260	nd - 80	-	-	0,6 - 1,7	0,2 - 120	0,7 - 14	0,2 - 14

*nd= abaixo do limite de detecção

Fonte: Farquhar (1989); Tchobanoglous, Theisen e Vigil (1993); Souto (2009); Ehrig (1989) *apud* Souto (2009); Pohland e Harper (1985)

Souto e Povinelli (2007) levantam a questão de que em aterros de países tropicais, como o Brasil, a transição entre “lixiviado novo” e “lixiviado velho” parece acontecer dentro de um a dois anos após o início da operação, e não após cinco, como nos locais de clima temperado. Para Souto (2009), a distinção entre lixiviado “novo” e “velho” não pode ser feita em função da idade dos aterros, mas sim em relação às fases de degradação dos resíduos e que não haveria lixiviado “intermediário”, dado que os períodos de transição normalmente são curtos.

Ehrig (1983) afirma que o parâmetro pH pode representar um indicativo das condições predominantes no meio de estudo, existindo duas faixas bem nítidas: uma em torno de 6,0, correspondente à fase ácida do aterro, e outra em torno de 8,0, correspondente à fase metanogênica. Existe ainda uma correlação entre pH, alcalinidade e teor de ácidos voláteis que determina o sistema ácido/base, devendo esta relação ser mantida dentro de certos limites para que um equilíbrio químico satisfatório entre os microrganismos atuantes na degradação biológica seja alcançado e preservado. (LANGE, AMARAL, 2009).

Como o lixiviado é um material poluente composto por variados elementos, ele precisa ser drenado, coletado e tratado adequadamente. (BRÁS, FERREIRA, SILVA, 2017; LUO *et al.*, 2019). Existem diversos tipos de tratamentos, o estudo de Costa, Alfaia e Campos (2019) concluiu que no Brasil os mais utilizados são os tratamentos biológicos, como lagoas aeróbias e anaeróbias, filtros biológicos, lodo ativado e *wetlands* (ou banhados construídos). No entanto, em alguns aterros, geralmente de regiões metropolitanas, tecnologias mais avançadas também são utilizadas, como filtração por membranas e processos oxidativos avançados.

Outra alternativa é a recirculação do lixiviado, que é adotada para promover a biodegradação dos resíduos e acelerar a estabilização dos aterros. A técnica, porém, pode causar excesso de pressão de água e gases nos poros, correndo o risco de rupturas do maciço de resíduos. (FENG *et al.*, 2017).

2.4 MANIPULAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A diversidade microbiana pode ser analisada de diversas formas, incluindo o tamanho e morfologia (forma) celulares, fisiologia, motilidade, mecanismo de divisão celular, patogenicidade, biologia do desenvolvimento, adaptação aos extremos ambientais, filogenia e outras. (MADIGAN *et al.*, 2010). Os métodos de identificação

de microrganismos atualmente envolvem uma combinação de técnicas dependentes e independentes de cultivo, estando em constante atualização. (METCALF, EDDY, 2016).

A observação direta, pode-se dizer que está associada ao uso de microscópios, iniciado em 1663, e ainda utilizada. A partir dos anos de 1880, o uso de técnicas de cultivo permitiu que alguns microrganismos pudessem ser estudados individualmente, o que contribuiu para a explosão do conhecimento em fisiologia e genética microbiana nos anos de 1960 a 1980. (HANDELSMAN, 2004; ZEPEDA, LEÓN, FLORES, 2015). Essa abordagem clássica é baseada no isolamento e identificação de culturas puras, envolve o cultivo dos microrganismos em meios sólidos ou líquidos, contendo uma fonte de carbono apropriada para o seu crescimento, bem como adequadas fontesceptoras de elétrons, além de uma série de condições que propiciam o crescimento microbiano. (SANTOS, 2010; ALMEIDA, MARTINIS, 2019).

Ao longo dos anos, alguns pesquisadores perceberam que o cultivo dos microrganismos não captava todo o espectro da atividade microbiana (HANDELSMAN, 2004), paralelamente, foram desenvolvidos estudos com DNA. Em 1995, um notável salto nas análises ocorreu, o sequenciamento do primeiro genoma de bactéria. (WOOLEY, GODZIK, FRIEDBERG, 2010). Com o avanço da genética e biologia molecular, diversos equipamentos para sequenciamento de DNA foram desenvolvidos e as chamadas técnicas moleculares, independentes de cultivo, foram sendo otimizadas, contribuindo de maneira extraordinária para o estudo da microbiologia. (THOMAS, GILBERT, MEYER, 2012; ALMEIDA, MARTINIS, 2019).

As técnicas moleculares também vêm permitindo uma constante reformulação da árvore filogenética dos domínios (GOUY, BAURAIN, PHILIPPE, 2015), além de fornecer um bom entendimento das interações e condições populacionais. (ALAIN, QUERELLU, 2009). As abordagens das técnicas podem ser divididas em três categorias, a seguir apresentadas (ANTUNES, 2016):

- 1) Análise do perfil da comunidade microbiana através de:
 - a) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico),
 - b) DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - Eletroforese do Gel de Gradiente Desnaturante) ou
 - c) Hibridização de DNA;

- 2) Sequenciamento de alto desempenho de regiões hipervariáveis do gene do rRNA (Ácido Ribonucleico) 16S, precedido ou não da etapa de clonagem; e
- 3) Sequenciamento de alto desempenho do DNA total extraído da comunidade microbiana.

Em geral, após a extração do DNA total de uma dada amostra, as técnicas moleculares utilizam como etapa inicial a amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) de genes marcadores. Nela são inseridos *primers* específicos que irão variar para o grupo ao qual o organismo de interesse pertence. (RUPPERT; KLINE; RAHMAN, 2019). O gene amplamente utilizado para análises filogenéticas em procariontes é o rRNA 16S, subunidade menor do RNAr, preferida pelo seu tamanho e excelente marcador molecular para a identificação taxonômica. (QUINTAES, 2014).

2.4.1 Sequenciamento

A tecnologia de sequenciamento de DNA evoluiu exponencialmente a partir do estudo pioneiro de Sanger, em 1975, que desenvolveu o método de primeira geração, conhecido como método de terminação em cadeia. (SCHADT *et al.*, 2010). Em 2005 foi lançado comercialmente o sequenciamento de segunda geração, inaugurando a era do chamado Sequenciamento de Nova geração ou de Próxima Geração (NGS – Next Generation Sequencing), que detecta em tempo real as bases nitrogenadas complementares incorporadas e o sequenciamento de uma gama de amostras. (VARSHNEY *et al.*, 2009).

Diversas plataformas de NGS foram lançadas, como Roche 454, Illumina (MiSeq, HiSeq, NextSeq), AB Solid e Helicos Biosciences. A plataforma Ion Torrent (Thermo Fisher) é classificada por alguns autores como uma tecnologia entre a segunda e a terceira geração, e atualmente também possui modelos de NGS. O sequenciamento de terceira geração é caracterizado por leitura de moléculas individuais, sem a necessidade de um sistema enzimático para identificação, como por exemplo a Nanopore MinION e a PacBio. (ALMEIDA, MARTINIS, 2018).

O advento do Sequenciamento de Nova Geração elevou os estudos microbiológicos a outro patamar e estabeleceu o campo da metagenômica. (OULAS *et al.*, 2015). A metagenômica é um método no qual o DNA isolado diretamente do local é sequenciado, ou seja, em seus habitats naturais, sem depender do cultivo ou genomas de referência, investigando comunidades inteiras (WOOLEY, GODZIK,

FRIEDBERG, 2010; OULAS *et al.*, 2015; HIRAOKA, YANG, IWASAKI, 2016; HUG *et al.*, 2016; NESME *et al.*, 2016).

Alguns autores definem que o sequenciamento para metagenômica pode ser realizado por meio de duas abordagens diferentes: o sequenciamento de *amplicons* e o sequenciamento de *shotgun*. (RASHID, STINGL, 2015; STALEY, SADOWSKY, 2018). No sequenciamento de *amplicons*, regiões conservadas de um marcador filogenético em regiões específicas do DNA (como o rRNA 16S, para bactérias e arqueas) são amplificados por PCR, sequenciados e atribuídos a uma Unidade Taxonômica Operacional (OTU) (TONGE, PASHLEY, GANT, 2014; ALMEIDA, MARTINIS, 2018). No entanto, o comprimento da leitura é limitado para algumas centenas de pares de bases, dificultando o trabalho de montagem e predição de genes (ELOE-FADROSH *et al.*, 2016).

Outros autores, como Zepeda, León e Flores (2015) acreditam que a análise metagenômica é apenas a de sequenciamento de *shotgun*, enquanto a de sequenciamento de *amplicons* se chamaria Metaperfil ou Metataxonômica. Garza e Dutilh (2015), e Ranjan *et al.* (2016), também sugerem que somente o de *shotgun* seja relacionado com a metagenômica, pois ele permite a identificação em nível de espécie de microbiota não direcionada. A maior parte dos trabalhos encontrados são realizados por meio do sequenciamento de *amplicons*. (STALEY, SADOWSKY, 2018).

A distribuição taxonômica dos membros da comunidade microbiana requer leituras do sequenciamento e é uma questão muito importante na análise, tanto que diversas ferramentas bioinformáticas estão em desenvolvimento e sendo otimizadas para tal fim. (HIRAOKA, YANG, IWASAKI, 2016). Para Zepeda, León e Flores (2015), além da importância das ferramentas de bioinformática para leitura, a interpretação da grande quantidade de resultados obtidos no sequenciamento exige experiência e estudo por parte dos pesquisadores.

3 ESTUDO DE CASO

As características de um aterro são influenciadas por diversos fatores ambientais, como o clima e o tipo de solo, além dos hábitos de consumo da população onde ele está inserido. A área de estudo está localizada na cidade de São Leopoldo, no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), na chamada Bacia do Rio Dos Sinos, com coordenadas geográficas: latitude $-29,760^\circ$, longitude $-51,147^\circ$. A altitude média acima do mar do município é de 12 metros e o clima, segundo a classificação de W. Köppen, é do tipo subtropical, com períodos de temperado. (WEATHERSPARK, 2019).

São Leopoldo, assim como todo o Estado do Rio Grande do Sul, está localizado numa faixa limítrofe entre a influência das massas de ar tropical quente e úmido e das massas de ar polar frio e seco, constituindo-se como fronteira climática, onde se desenvolve uma grande atividade atmosférica na passagem de frentes quentes e frentes frias numa alternância semanal. (ZELTER, LETTI e ZANINI, 2012). Ao longo do ano, em geral a temperatura na cidade varia de 10°C a 31°C e raramente é inferior a 4°C ou superior a 36°C . (WEATHERSPARK, 2019)

3.1 CARACTERÍSTICAS DO ATERRO SANITÁRIO

O aterro sanitário, objeto do presente estudo, existe desde 2011. Foi construído para receber 5 milhões de toneladas de Resíduos Sólidos Urbanos e é operado pela empresa Companhia Rio-grandense de Valorização de Resíduos (CRVR), subsidiária da holding Solví. A unidade possui uma área de $384.008,02\text{ m}^2$, sendo $119.198,00\text{ m}^2$ para disposição de resíduos. (CRVR, 2021).

A Licença ambiental atual do aterro de São Leopoldo, LO N^o2408/2021 FEPAM, autoriza a operação de: a) Célula de disposição de resíduos referente às fases I, II, III, IV, V, VI e VII com área de 150.613 m^2 ; b) Unidade de tratamento de efluentes com 7 lagoas de acúmulo e uma casa de química de 150 m^2 ; c) Lagoa de emergência pluvial com área de 7.170 m^2 ; d) Unidades administrativas e auxiliares com área de $350,38\text{ m}^2$; e) centro de educação ambiental (CRVR, 2021c). A Figura 2 apresenta uma imagem geral da área do aterro.

Figura 2 – Vista geral da área do aterro



Fonte: CRVR (2019)

O Aterro Sanitário é operado em diferentes fases, sendo que atualmente a operação está na fase 7, com as outras 6 anteriores já encerradas. O tempo de operação de cada fase varia entre elas, sendo que o Quadro 4 apresenta o período e área de cada uma e volume de material disposto.

Quadro 4 - Fases de operação do aterro

CÉLULA	PERÍODO	TOTAL MESES	ÁREA (m²)	VOLUME (m³)
Fase 1	Novembro de 2011 – Setembro de 2012	11	18.785	134.880
Fase 2	Outubro de 2012 – Setembro de 2014	24	23.400	375.855
Fase 3	Outubro de 2014 – Maio de 2015	8	24.730	207.875
Fase 4	Junho de 2015 – Julho de 2017	26	21.300	473.240
Fase 5	Agosto de 2017 – Janeiro de 2018	6	11.520	153.171
Fase 6	Fevereiro de 2018 – Março de 2020	26	19.453	776,033

Fonte: Elaborado pela autora com dados da CRVR (2019b)

Até o momento das amostragens, o aterro havia operado 92 meses, o que corresponde a 38,3% da vida útil estimada. Após o esgotamento da área na Fase 6, a empresa iniciou a operação sobre as primeiras células encerradas, utilizando os espaços disponíveis que ocorrem ao longo do tempo por meio dos recalques verificados no local e posteriormente passou para a operação em nova área.

Na operação diária do aterro, ocorre a colocação de uma camada de cobertura vegetal ao final do trabalho, evitando a exposição dos resíduos. No dia seguinte, antes de receber novos resíduos, esta camada é removida, fazendo com que a camada de solo não ocupe espaço no maciço de resíduos. O grau de compactação dos resíduos

é estimado em cerca de 1 tonelada/m³, valor este acima do encontrado em outros aterros, aumentando assim sua vida útil e dificultando a entrada de água pluvial.

Além do presente estudo no aterro de São Leopoldo, por meio da parceria existente entre a Unisinos e a empresa CRVR, são realizados os relatórios trimestrais exigidos pelo órgão ambiental estadual e outras pesquisas acadêmicas. Um dos trabalhos (SILVEIRA, 2021), analisou a influência da precipitação no volume de lixiviado gerado no aterro, no período de dois anos, e estatisticamente não houve diferença significativa entre quantidade de precipitação e geração de lixiviado. Também está sendo desenvolvida uma pesquisa sobre os lixiviados gerados nas cinco Fases do aterro e suas composições físico-químicas ao longo de um ano de amostragem, a fim de avaliar custos de tratamento.

3.2 CARACTERÍSTICAS DOS RESÍDUOS

Os resíduos dispostos no aterro de São Leopoldo são originários da coleta de RSU do próprio município, de outros municípios e de setores privados. Mensalmente a área recebe cerca de 30.000 m³ de resíduos, em média, sendo esta quantidade controlada na balança quando da entrada dos caminhões.

A Tabela 4 apresenta, em percentual, os principais geradores de cada fase.

Tabela 4 – Geradores dos RSU encaminhados ao Aterro de São Leopoldo

GERADOR	FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4	FASE 5	FASE 6
RSI e RSS (pré-inertizados)	2,91%	2,63%	4,18%	1,71%	0,30%	0,96%
Indústria de Plástico	0,10%	0,10%	0,05%	0,11%	0,01%	0,01%
Indústria de Borracha	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%
Comércio de Pneus	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
Indústria de Cerâmica	0,05%	0,15%	0,12%	0,02%	0,01%	0,01%
Indústria de Metais	0,02%	0,25%	0,06%	0,03%	0,02%	0,01%
Comércio de Metais	0,00%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
Indústria de Autopeças	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
Comércio de Papéis	1,43%	1,76%	0,59%	0,82%	0,51%	1,40%
Construtoras/Pavimentação	0,00%	0,08%	0,13%	0,17%	0,48%	0,29%
Empresas de Transportes	0,07%	0,94%	0,95%	0,56%	1,81%	1,06%
Universidades	0,12%	0,10%	0,08%	0,06%	0,05%	0,04%
Supermercados	0,16%	0,60%	0,79%	1,02%	2,90%	3,54%
Ceasa	0,00%	0,00%	0,00%	2,01%	3,30%	3,29%
Cooperativa	0,00%	0,02%	0,00%	0,71%	0,00%	0,00%
Coleta de RSU de Municípios	95,14%	93,33%	93,01%	92,68%	90,59%	89,35%
Outros	0,00%	0,01%	0,00%	0,07%	0,01%	0,01%

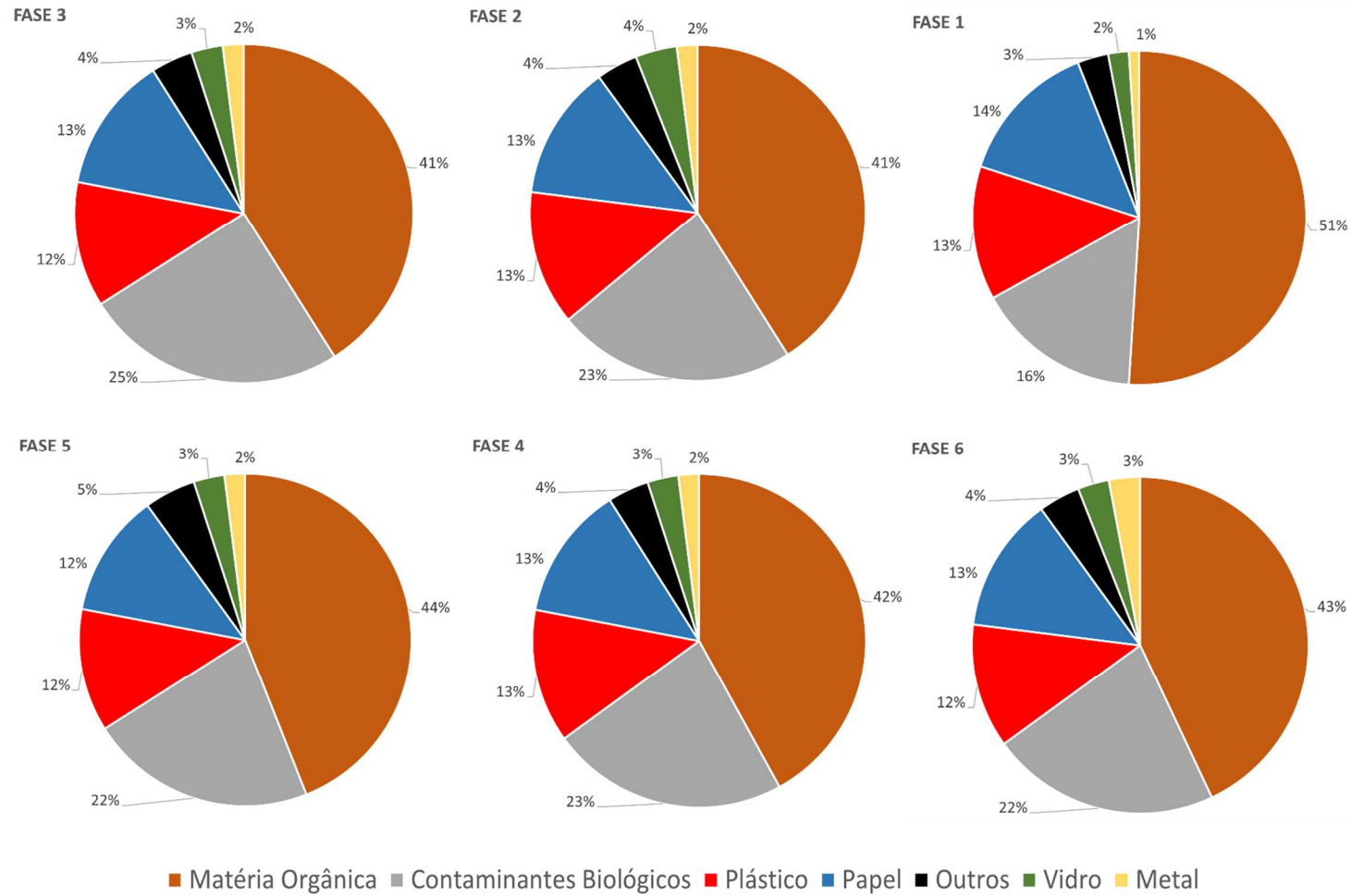
Fonte: Elaborado pela autora com dados da CRVR (2019b)

Os valores apresentados demonstram que o volume de RSU recebido no aterro de São Leopoldo é, quase que total, proveniente dos municípios. Em percentual bem menor aparecem os geradores das indústrias, com resíduos similares aos domésticos, e de saúde (igual observação, apenas resíduos Classe D, segundo a Resolução CONAMA 358 (BRASIL, 2005). Posteriormente aparecem os classificados como “comércio de papéis”, que encaminham o rejeito de suas atividades.

A composição gravimétrica dos RSU recebidos no aterro de São Leopoldo está apresentada, por fases, nos gráficos da Figura 3, elaborados a partir de informações contidas nos Planos Municipais de Gerenciamento de Resíduos Sólidos dos municípios que enviaram resíduos ao aterro. Os resíduos foram divididos em: matéria orgânica putrescível, papel, metal, vidro, plástico, contaminantes biológicos (papel higiênico, fraldas, absorventes) e outros.

Em todas as fases os valores se mantiveram próximos, sendo a maior parcela em todas elas de matéria orgânica putrescível (entre 41% a 51%). Em segundo lugar estão os resíduos classificados como “contaminantes biológicos”, prioritariamente resíduos de banheiros (papel higiênico, absorvente, fraldas) (entre 16% e 25%). Na terceira maior parcela da gravimetria empatam os resíduos do tipo papel e plástico, seguidos por “outros”, que são materiais como embalagens longa vida, tecidos e borrachas. Finalmente aparecem os percentuais de vidro e metal (entre 1% e 4%).

Figura 3 – Composição gravimétrica dos RSU dispostos no aterro, por Fase

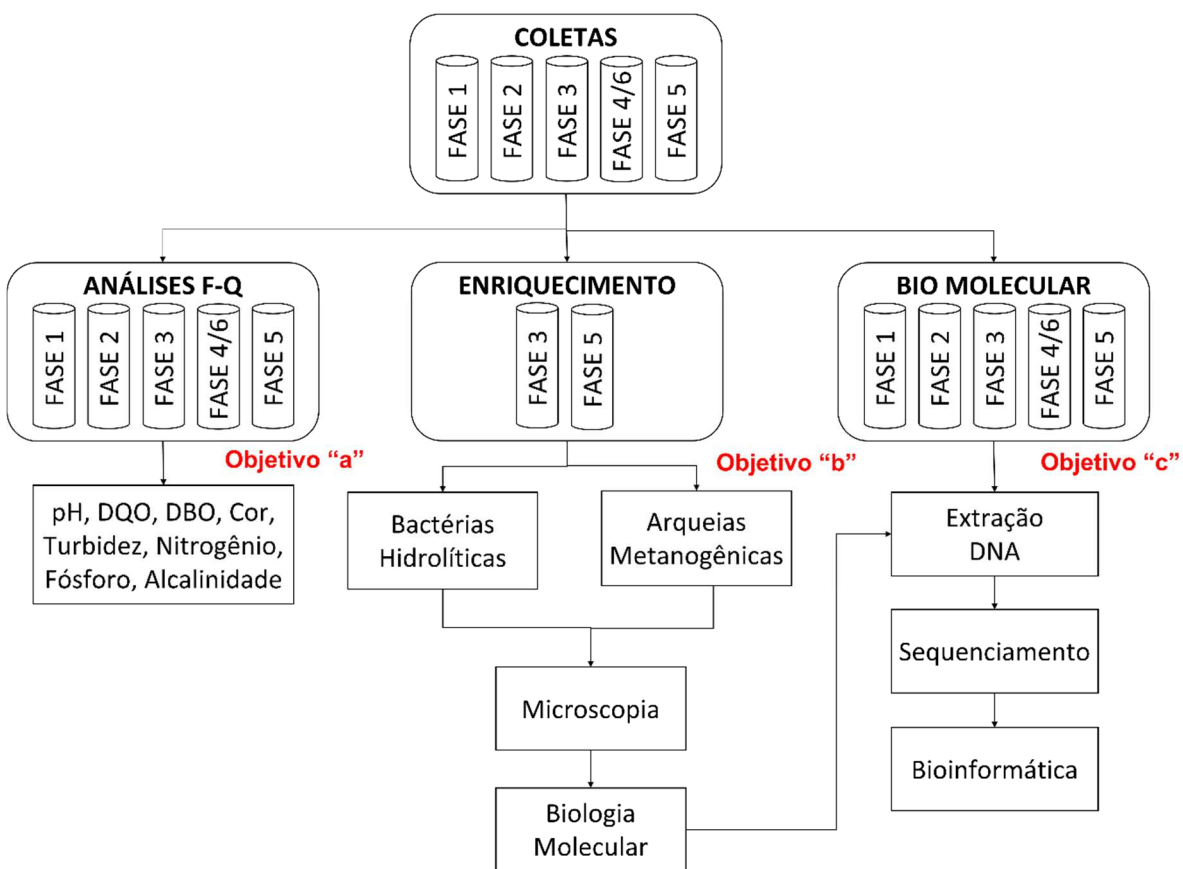


Fonte: Elaborado pela autora com dados da CRVR (2019b)

4 METODOLOGIA

O presente capítulo aborda a metodologia utilizada para atender aos objetivos propostos no trabalho. A Figura 4 apresenta um fluxograma com o delineamento experimental da pesquisa, sendo que as três etapas: análises físico-químicas; enriquecimento e biologia molecular, foram realizadas em alguns momentos em sequência e em outros de forma paralela, os itens a seguir descrevem cada uma delas.

Figura 4 - Metodologia da pesquisa



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1 AMOSTRAGEM

As amostragens dos lixiviados ocorreram nos meses de outubro e novembro de 2019. No aterro sanitário em estudo, os lixiviados gerados nas diversas áreas são drenados (por gravidade) e interligados por rede, que deságua nas lagoas de armazenamento para posterior tratamento. Para a realização das amostragens das

fases em separado, as coletas ocorreram nos poços de visita (PV) de cada uma delas, exceto nas Fases 4 e 6, onde foi feita a coleta no registro de passagem (R04), pois ainda não havia sido instalado o poço de visita da Fase 6, impossibilitando a amostragem em separado dessas duas Fases. A Figura 5 apresenta uma imagem aérea do local e os pontos de amostragem.

Figura 5 - Pontos de coleta de lixiviado nas diferentes fases do aterro



Fonte: Autora, CRVR (2019) e Google Earth (2021).

A profundidade dos poços varia, as amostras foram coletadas assim que os amostradores atingiam o nível do lixiviado. Nas medições realizadas no mês de março de 2019, chegou-se às seguintes informações de profundidade:

- Poço da Fase 1: 8,0 metros
- Poço da Fase 2: 9,0 metros
- Poço da Fase 3: 10,0 metros
- Poço da Fase 5: 9,0 metros
- Registro das Fases 4/6: 3,3 metros

Os amostradores, garrafas de polietileno de 5 litros abertas, coletaram aproximadamente 2 litros de lixiviado em cada ponto, volume imediatamente

transferido para frascos de polietileno identificados. No caso das amostras para análise de biologia molecular, os lixiviados foram transferidos para tubos do tipo Falcon esterilizados e, para as análises microbiológicas, transferidos diretamente para os próprios frascos de cultivo, já esterilizados e sem oxigênio (Figura 6).

Figura 6 – Amostragem para análise microbiológica

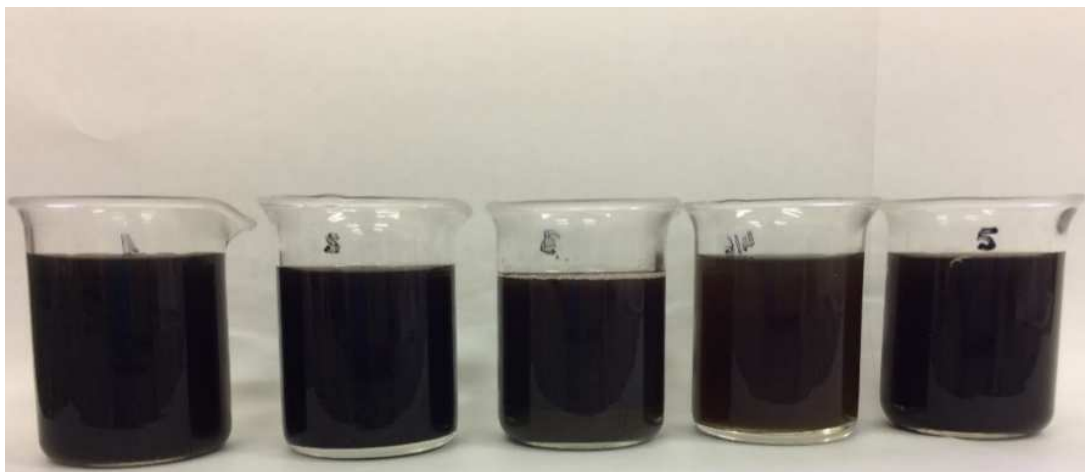


Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As análises para fins de caracterização físico-química dos lixiviados gerados nas cinco fases do aterro sanitário foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental, da Unisinos (Figura 7). A maioria dos ensaios ocorreu no mesmo dia da coleta, quando realizado posteriormente, houve a preservação por meio da adição de ácido sulfúrico até pH inferior a 2,0 e armazenamento em geladeira, conforme procedimento APHA (American Public Health Association, 2017).

Figura 7 - Amostras de lixiviados coletadas nas 5 fases do aterro.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ressalta-se que antes de efetuar a preservação da amostra destinada à caracterização, os parâmetros pH, cor e turbidez foram determinados imediatamente após entrada da amostra no laboratório. As análises foram feitas em triplicata, os parâmetros e os métodos utilizados para a caracterização dos lixiviados estão descritos no Quadro 5.

Quadro 5 - Análises físico-químicas realizadas

PARÂMETRO	MÉTODO	REFERÊNCIA
pH	Potenciométrico (4500 – H ⁺)	APHA, 2017
Cor Aparente	Colorimétrico (2120 – B)	
Cor Verdadeira	Colorimétrico (2120 – B)	
Turbidez	Nefelométrico (2130 – B)	
Nitrogênio Amoniacal (NA)	Titulométrico (4500 – NH ₃ – C)	
Nitrogênio Total (NT)	Macro-Kjedhal (4500 – NOrg – B)	
Fósforo	Colorimétrico de Ácido Molibdovanadofosfórico (4500 – P-C)	
DBO	Manométrico – 5 dias (5210 – B)	
DQO	Colorimétrico por Refluxo Fechado (5220 – D)	
Alcalinidade Total e Ácidos Graxos Voláteis	Titulométrico	Dilallo e Albertson, 1961

Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme mencionado anteriormente, o volume pluviométrico não foi considerado no presente trabalho, já que o estudo de Silveira (2021) identificou que não há influência do índice no lixiviado gerado, em razão do sistema de compactação adotado na operação do aterro.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos foram dispostos e analisados por meio de programa excel, sendo determinados os valores médios, desvio padrão, coeficiente de variação, valores máximos e valores mínimos. Também foi realizado o teste de comparação de médias, teste de Tukey (para o nível de 5% de significância), com o objetivo de verificar se os resultados das cinco fases eram similares ou significativamente diferentes entre si e se havia diferença entre os resultados dos dois meses (outubro e novembro de 2019).

4.3 ENRIQUECIMENTO

A etapa de enriquecimento corresponde ao uso de técnicas de cultivo de bactérias hidrolíticas e arqueias metanogênicas. Esta foi realizada no Laboratório de Saneamento Ambiental da Unisinos e envolveu procedimentos de: preparo e inoculação de meios (denominados reatores); monitoramentos; repiques em meios novos; transferência das culturas; microscopia e envio para análise de biologia molecular.

As amostras das fases 3 e 5 do aterro, do mês de novembro de 2019, foram utilizadas como inóculo. A escolha destas fases se justifica pela busca de microrganismos em etapas metabólicas distintas, já que o tempo de aterramento dos resíduos é diferente entre elas.

4.3.1 Preparo e Inoculação

O preparo dos meios e das soluções para suplementação foi baseado nos estudos sobre culturas anaeróbias realizados por Vazoller (1995), Gomes (1995), Nakayama (2005), Pazinato (2007) e Araujo (2010).

Para os reatores metanogênicos, foi utilizado o meio Zinder, que, de acordo com Nakayama (2005), é usualmente empregado para o cultivo de anaeróbios oriundos de ambientes ou sistemas não salinos. Como fonte de carbono, para as arqueias metanogênicas, foi intercalado o uso de acetato, formiato e metanol, contemplando os três grupos fisiológicos de arqueias metanogênicas. Para os reatores hidrolíticos, foi utilizado o meio Zinder mais celulose, já que, de acordo com Gomes (1995), a celulose é degradada a açúcares nos sistemas de digestão

anaeróbia por bactérias celulolíticas pertencentes ao grupo das hidrolíticas-fermentativas.

Gomes (1995) descreve que para os requerimentos nutricionais dos microrganismos, também é indicado o uso de dióxido de carbono, fonte de nitrogênio, fonte de enxofre, vitaminas e alguns sais minerais. No Quadro 6 estão relacionadas, em termos gerais, as composições de meio e de soluções utilizadas para a suplementação dos microrganismos, já os detalhes estão descritos no Apêndice A – Preparo do Meio e das Soluções.

Quadro 6 – Composição geral das soluções utilizadas

Meio e Soluções	Composição geral
Meio Basal Zinder	Referenciado no Apêndice A
Solução de Vitaminas	Referenciado no Apêndice A
Solução de Tamponamento	Solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v)
Solução de Extrato de Leveduras	Solução de extrato de levedura 2% (m/v)
Solução Redutora	Solução de sulfeto de sódio nonahidratado 5% (m/v)
Celulose	Celulose cristalina
Solução de Acetato de Sódio	Solução de acetato de sódio 16,4% (m/v)
Solução de Formiato de Sódio	Solução de formiato de sódio 5,19% (m/v)
Solução de Metanol	Solução de metanol 20% (m/v)

Fonte: Elaborado pela autora.

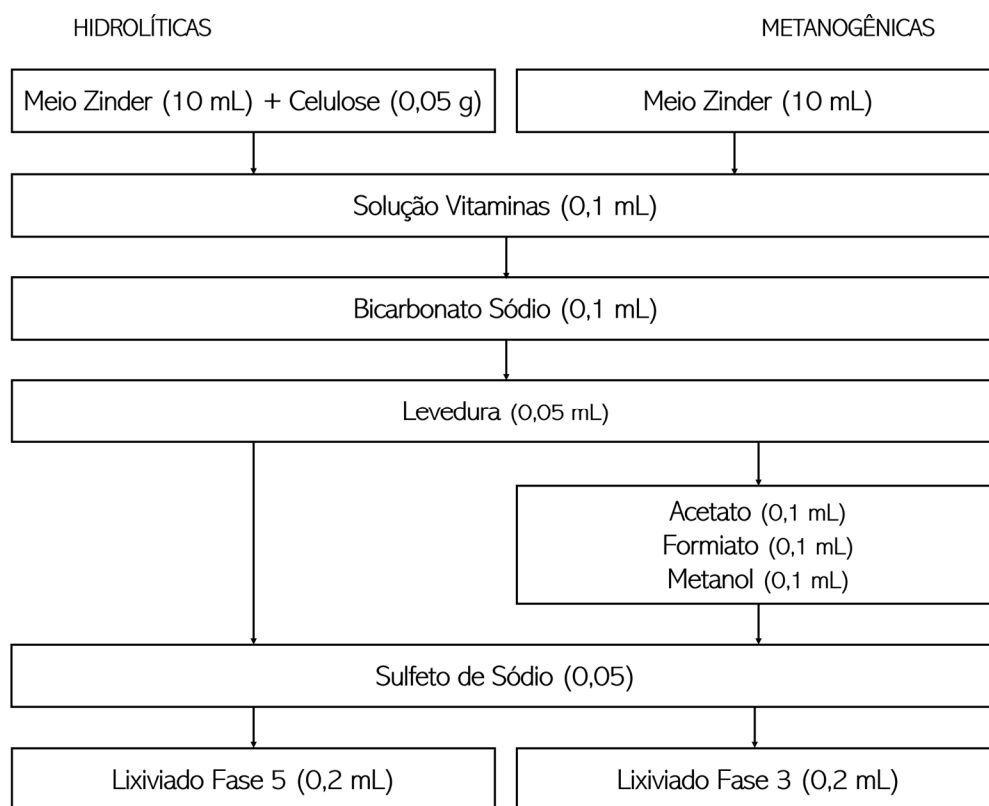
Todos os frascos foram fechados com tampas de borracha de butila, lacrados com lacres de alumínio e autoclavados. Antes de armazenados, houve a troca de atmosfera, por meio de uma bomba a pressão reduzida, e inserção de nitrogênio 100%.

O uso de gases para execução dos procedimentos ocorreu por meio de sistema de distribuição simultânea (VAZOLLER, 1995), composto por tubos de cobre que conectam os cilindros de gases (nitrogênio puro e mistura de nitrogênio e dióxido de carbono 70:30) à distribuição com saídas de fluxo regulável. Em cada saída está instalada uma mangueira, com uma seringa anexa na extremidade contrária.

A montagem dos reatores, em frascos de antibiótico, seguiu a adoção das metodologias de enriquecimento de Vazoller (1989), Gomes (1995), Nakayama (2005) e Pazinato (2007). Primeiramente, a atmosfera do *headspace* (espaço não ocupado) dos frascos com os meios de cultivo, originalmente de nitrogênio, foi trocada para a mistura de N₂CO₂. Houve sucção pela bomba a pressão reduzida durante 15 segundos e injeção da mistura de gás, também durante 15 segundos. Esse ciclo de troca gasosa foi executado três vezes para cada frasco.

As soluções então foram adicionadas, com o auxílio de seringas descartáveis de 1 mL previamente “lavadas” com nitrogênio, na seguinte ordem: solução de vitaminas, bicarbonato de sódio, levedura, acetato/formiato ou metanol e sulfeto de sódio (Figura 8). Após a adição de solução de redutora de sulfeto de sódio, aguardou-se a mudança de coloração do indicador de anaerobiose. Por fim, foi adicionado o inóculo correspondente à cada meio e feita nova troca de atmosfera, como descrito anteriormente, para garantir que não houvesse contaminação por oxigênio.

Figura 8 – Sequência da inoculação e volumes utilizados



Fonte: Elaborado pela autora.

Para evitar possíveis contaminações nos frascos, antes de cada contato das agulhas para injeção das substâncias foi realizada a flambagem das tampas de borracha com álcool etílico. Os reatores foram incubados em estufa (37 ± 2 °C) até o momento da etapa seguinte, de microscopia e repique.

4.3.2 Monitoramentos e Repiques em Meio Líquido

De acordo com (Gomes, 1995), o monitoramento dos reatores pode ser realizado de forma direta, visualmente pela turvação do meio de cultivo, pelo

aparecimento de colônias, pelo consumo de substrato, ou ainda, por meio de análises químicas, como as cromatográficas. No presente trabalho foi utilizada a observação direta da turvação nos reatores em meio líquido, para então a etapa de microscopia, descrita no item 4.3.4.

Também houve observação direta diária da coloração dos frascos, já que, como mencionado anteriormente, a cor rosa indicaria presença de oxigênio, os frascos que assim se apresentaram foram excluídos.

Após os primeiros resultados, estabeleceu-se uma rotina de incubação entre os repiques dos reatores, sendo transferida uma alíquota de 0,2 mL para novos frascos de antibiótico, com os mesmos meios e substratos descritos na Figura 8, além dos mesmos processos de anaerobiose. Todos os reatores permaneceram em estufa até a conclusão do trabalho (Figura 9).

Figura 9 – Reatores líquidos em estufa



Fonte: Elaborado pela autora.

Os reatores que apresentaram imagens mais bem definidas na microscopia, e sem contaminação por oxigênio, seguiram para a segunda etapa, a de transferência para o meio sólido.

4.3.3 Transferência para Meio Sólido

A técnica de transferência utilizada para obtenção de colônias e posterior subcultivo em meio líquido, foi a de *Roll-Tube* (VAZOLLER, 1995; GOMES, 1995; NAKAYAMA, 2007; PAZINATO, 2007). Neste procedimento, foram utilizados tubos de ensaio, de 30 mL, o meio de cultura foi o Zinder, com adição de ágar bacteriológico

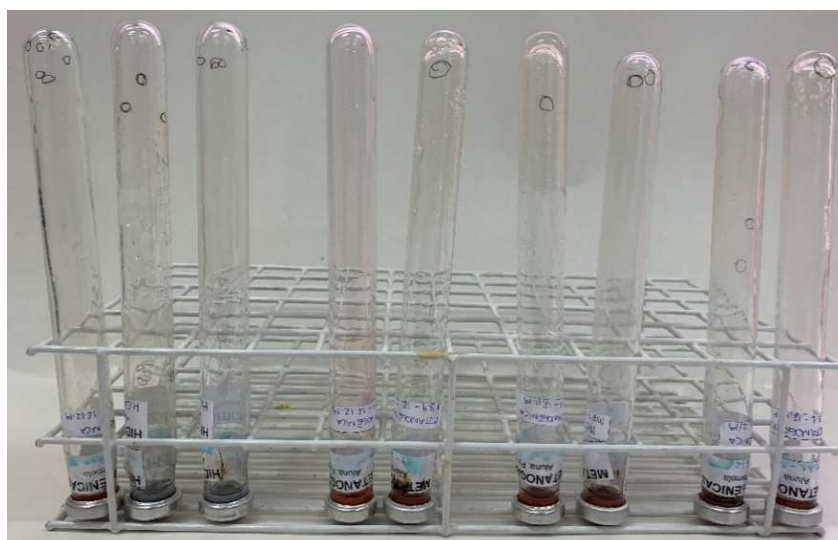
na concentração de 2%, sob fluxo de N₂ (100%). Imediatamente os frascos foram tampados com tampa de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio e autoclavados.

Os frascos foram colocados em banho-maria a temperatura de 55-58 °C, houve a troca de atmosfera para N₂CO₂ (70:30) e foram injetadas as mesmas soluções para suplementação relacionadas no Quadro 6. Apenas nos frascos celulolíticos a celulose foi adicionada antes da autoclavagem (para melhor dissolução).

O inóculo correspondeu a 0,2 mL de cada reator de meio líquido. Depois de inoculados, os tubos foram colocados na posição horizontal em bandeja com água e gelo e rolados rapidamente até ocorrer a solidificação, formando uma película homogênea sobre a parede interna do frasco. Os reatores foram colocados invertidos em estufa a 30-32 °C, para que a água de condensação formada durante o período de incubação acumulasse próximo à saída do tubo.

Periodicamente, os reatores foram observados quanto à formação de colônias e, quando formadas, elas foram marcadas no lado externo dos frascos (Figura 10) e observadas em microscópio.

Figura 10 – Reatores em meio sólido com marcação de colônias formadas



Fonte: Elaborado pela autora.

Após a microscopia, as colônias foram pinçadas, sob alto fluxo de nitrogênio e transferidas para o meio líquido, previamente preparados da mesma forma que apresentado no item 4.4.1. Os novos reatores foram incubados em estufa (37±2 °C), transferidos novamente para o meio sólido e então mais uma vez para o meio líquido.

No capítulo de resultados, a Figura 13 exemplifica a sequência total de enriquecimento realizada.

Encerrada a etapa de enriquecimento, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Unisinos para congelamento até a extração de DNA e sequenciamento em laboratório externo, descrito no item 4.4 deste capítulo.

4.3.4 Caracterização Morfológica

Ao longo de todo experimento de enriquecimento, para observar as morfologias celulares predominantes encontradas, as amostras das culturas incubadas foram examinadas sob microscopia, em média, de 14 em 14 dias, conforme metodologia de Gomes (1995) e observações de turvação dos reatores. O microscópio utilizado foi o modelo Illuminator HBO 50 – Zeiss, com contraste de fase e fluorescência, lente objetiva 100, ocular 10 e zoom 1,25 para as amostras em meio líquido; e lente objetiva 4, ocular 10 e zoom 1,25 para as colônias em meio sólido.

A preparação para microscopia ocorreu uma a uma, sob condições de assepsia, com transferência de 0,1 mL de cada reator das amostras líquidas para cada lâmina, com registro imediato das imagens. Quando das amostras de *Roll-Tube*, os reatores foram abertos sob fluxo de nitrogênio e as colônias imediatamente transferidas para as lâminas e observadas. Para cada lâmina observada, houve o registro de 2 imagens por quadrante, com e sem fluorescência, ou seja, 16 imagens para cada amostra. Foi utilizada a câmera do próprio microscópio e o software ZEN *Imaging V3.0 blue edition* para processamento.

Os pontos de atenção para registro foram: aparência externa, tamanho e estrutura dos microrganismos (GOMES, 1995; NAVEEN *et al.*, 2006). Em relação ao campo escuro, de acordo com Nakayama (2005), as arqueias metanogênicas possuem uma enzima em sua via de produção de metano, a F₄₂₀, que floresce sob luz UV. Assim, esses microrganismos podem ser identificados em observações a fresco pela emissão de luz azulada quando expostas ao comprimento de onda na faixa do ultravioleta.

4.4 BIOLOGIA MOLECULAR

A etapa de análise chamada de “biologia molecular” buscou conhecer a riqueza e abundância dos microrganismos presentes nos lixiviados brutos, das cinco fases do aterro, de outubro e novembro de 2019 e das amostras enriquecidas do item 4.3.

4.4.1 Extração de DNA

As amostras brutas e enriquecidas de lixiviados permaneceram armazenadas em freezer (-20 °C), até o momento da extração de DNA, no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Unisinos, quando foram descongeladas em temperatura ambiente. O kit utilizado foi o DNeasy Power Soil (Cat. Nº 12888-100), da marca Qiagen, tendo como etapa anterior a centrifugação da amostra, conforme indicado no guia do kit para solos com alto conteúdo de água (caso do lixiviado). A centrifugação de 15 mL ocorreu durante 10 minutos, em velocidade de 10.000 x g, com descarte do material sobrenadante.

O material sedimentado foi transferido para o tubo “Bed Tube” do kit, seguindo-se o procedimento indicado no protocolo do fabricante. O rendimento de DNA das amostras foi medido por meio do espectrofotômetro NanoDrop UV (Thermo Scientific Wilmington, DE), com concentração média de 5-10 µg, e posteriormente os DNAs totais extraídos foram congeladas (-20°C) até o envio ao sequenciamento.

4.4.2 Amplificação e Sequenciamento

Para o sequenciamento das amostras, houve a amplificação da região hipervariável V4 do gene 16S rRNA, por meio de PCR, utilizando DNA total (aproximadamente 50 ng por reação). As sequências de primers ou pares de iniciadores foram 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGGACTACHVGGGGTWTCTAAT-3').

Com o intuito de reunir várias amostras em uma mesma reação foi utilizado o método de primer-fusão, tendo cada amostra um código de barras distinto ligado ao produto PCR correspondente. Para a amplificação utilizou-se a Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), sendo os produtos verificados através de eletroforese em gel de agarose. A purificação foi realizada com AMPure XP PCR

Purification Kit (Beckman Coulter), a quantificação foi mensurada com Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen), e submetido a PCR de emulsão usando Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific). Com os grânulos enriquecidos resultantes, foram realizados os sequenciamentos por NGS (Ion Torrent PGM, Life Technologies), usando Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). As análises foram realizadas na Unidade de Pesquisa Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.4.3 Análise das sequências

Os dados brutos do sequenciamento foram processados com o programa R (TEAM, R. CORE), utilizando os pacotes KnitR (XIE, 2016) e BiocStyle (OLES, 2021), foi feita a trimagem para filtrar *reads* de baixa qualidade, a remoção dos *barcodes* e *primers* do início das sequências das leituras de sequenciamento e o final das sequências foi truncado a partir da base 220, resultando em sequências de 225 pb. Após, utilizou-se o método DADA2 de alta resolução para inferir variantes de sequência de *amplicon* (ASVs) exatamente, sem impor nenhum limite arbitrário e, assim, resolver variantes que diferem em apenas um nucleotídeo (CALLAHAN *et al.*, 2016).

O método DADA2 conta com um modelo parametrizado de erros de substituição para distinguir erros de sequenciamento da variação biológica real. Após, houve a construção da tabela de sequências e remoção das possíveis quimeras. O pacote DADA2 implementa o método classificador Bayesiano Naive para este propósito (WANG *et al.*, 2007). Este classificador compara variantes de sequência a um conjunto de treinamento de sequências classificadas, e aqui foi utilizado o conjunto de treinamento RDP v16 (COLE *et al.*, 2009). Então, os objetos foram combinados em um objeto *phyloseq*. O pacote *phyloseq* (McMURDIE, 2013) organiza e sintetiza os diferentes tipos de dados de um experimento típico de sequenciamento de *amplicons* em um único objeto de dados que pode ser facilmente manipulado. Por fim, a filtragem taxonômica e a filtragem de prevalência para as estimativas de abundância para cada grupo taxonômico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados da pesquisa, conforme as etapas indicadas na metodologia.

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados das análises físico-química apresentaram diferenças entre outubro e novembro de 2019. O teste de Tukey revelou que apenas 15% do total de parâmetros, comparados entre meses para as mesmas fases, foram considerados significativamente iguais, conforme destacado em verde na Tabela 5.

Tabela 5 – Significância dos resultados entre meses para as mesmas Fases

Relação Fases*	pH	Cor A.	Cor V.	Turbidez	DQO	N. Amon.	P	Alc. Total
Fase 1	0,72000	0,00200	0,00001	0,00150	0,00020	0,01200	0,00000	0,28000
Fase 2	0,34000	0,00010	0,00000	0,00030	0,00010	0,00700	0,30000	0,17000
Fase 3	0,01100	0,00020	0,00020	0,00000	0,00006	0,03900	0,00000	0,00000
Fase 4/6	0,00005	0,00010	0,00000	0,11000	0,00000	0,00060	0,00002	0,00200
Fase 5	0,03900	0,00010	0,00005	0,00009	0,00001	0,00100	0,00001	0,00030

* $p > 0,05$ = diferença significativa

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Também houve diferenças entre as fases (para cerca de 90% dos resultados), o que já era esperado devido ao diferente tempo de aterramento dos resíduos. A Tabela 6 apresenta as significâncias, entre Fases, no mês de outubro. Já a Tabela 7 apresenta as significâncias no mês de novembro.

Tabela 6 – Significância dos resultados do mês de outubro

Relação ** Fases*	pH	Cor A.	Cor V.	Turbidez	DQO	N. Amon.	P	Alc. Total
F1 X F2	0,02900	0,35000	0,00001	0,00001	0,09000	0,00000	0,00000	0,00060
F1 X F3	0,00030	0,00200	0,00000	0,00000	0,00800	0,00010	0,00000	0,00070
F1 X F4/6	0,01000	0,04100	0,00010	0,00001	0,02000	0,00000	0,00000	0,00000
F1 X F5	0,01000	0,00400	0,00070	0,00002	0,52000	0,00300	0,00000	0,28000
F2 X F3	0,00180	0,00004	0,00005	0,00000	0,02000	0,00010	0,00000	0,00700
F2 X F4/6	0,00750	0,00100	0,00010	0,64000	0,18000	0,00010	0,15000	0,26000
F2 X F5	0,00500	0,00006	0,00001	0,00001	0,08000	0,00000	0,00000	0,00060
F3 X F4/6	0,00010	0,00001	0,00001	0,00000	0,03000	0,00001	0,00000	0,00010
F3 X F5	0,02300	0,00000	0,00000	0,00000	0,00500	0,00005	0,00000	0,00070
F4/6 X F5	0,01300	0,00003	0,00004	0,00020	0,00400	0,00000	0,00000	0,00000

* F1: Fase 1, F2: Fase 2, F3: Fase 3, F4/6: Fase 4/6; F5: Fase 5

** $p > 0,05$ = diferença significativa

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Tabela 7 – Significância dos resultados do mês de novembro

Relação Fases*	pH	Cor A.	Cor V.	Turbidez	DQO	N. Amon.	P	Alc. Total
F1 X F2	0,02900	0,35000	0,00000	0,00001	0,09000	0,00000	0,00000	0,00060
F1 X F3	0,00030	0,00200	0,00000	0,00000	0,00800	0,00010	0,00000	0,00070
F1 X F4/6	0,01000	0,04000	0,00001	0,00002	0,02000	0,00000	0,00000	0,00000
F1 X F5	0,01000	0,00400	0,00040	0,00003	0,52000	0,00300	0,00000	0,28000
F2 X F3	0,00100	0,00003	0,00005	0,00000	0,02200	0,00010	0,00000	0,00700
F2 X F4/6	0,00700	0,00100	0,00010	0,25000	0,18000	0,00010	0,15000	0,26000
F2 X F5	0,00500	0,00006	0,00001	0,00001	0,08900	0,00000	0,00000	0,00070
F3 X F4/6	0,00010	0,00001	0,00001	0,00000	0,03000	0,00002	0,00000	0,00010
F3 X F5	0,02300	0,00000	0,00000	0,00000	0,00500	0,00005	0,00000	0,00070
F4/6 X F5	0,01300	0,00001	0,00004	0,00020	0,00400	0,00000	0,00000	0,00000

* $p > 0,05$ = diferença significativa

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

No parâmetro DQO não houve diferença significativa entre as Fases 1 e 2; 1 e 5; 2 e 4/6; e 2 e 5. Mesmo assim a maioria ainda foi significativamente diferente. Essa variabilidade dos lixiviados gerados em aterros sanitários de RSU é encontrada também em outros aterros, como nos trabalhos publicados por Gómez, Corona e Hidalgo (2019); Araújo *et al.*, 2020; Almeida, 2020; e Hoai *et al.*, 2021.

Os resultados dos dez parâmetros, por mês e Fase, estão apresentados na Tabela 8. A partir disso, foi realizada a discussão dos resultados obtidos nesta etapa.

Tabela 8 – Resultados dos parâmetros analisados

(continua)

Parâmetro	Mês	FASE 1 7 anos	FASE 2 5 anos	FASE 3 4 anos	FASE 4/6 0 ano	FASE 5 1 ano
pH	Outubro	8,09 ± 0,02	8,18 ± 0,05	7,99 ± 0,01	8,05 ± 0,01	7,65 ± 0,17
	Novembro	8,10 ± 0,04	8,21 ± 0,02	7,86 ± 0,05	8,11 ± 0,01	7,94 ± 0,03
DBO* (mgO ₂ /L)	Outubro	966,57	1.499,85	1.562,50	2.100,00	2.200,00
	Novembro	849,92	899,91	1.875,00	1.700,00	1.016,57
DQO (mgO ₂ /L)	Outubro	14.347,81 ± 1.500,45	16.582,63 ± 957,73	20.171,90 ± 1.436,02	17.463,02 ± 31,92	15.025,03 ± 734,26
	Novembro	4.099,21 ± 159,62	8.139,96 ± 191,55	5.250,48 ± 63,85	6.401,76 ± 223,47	3.083,38 ± 63,85
DBO/DQO	Outubro	0,067	0,090	0,077	0,120	0,146
	Novembro	0,207	0,111	0,357	0,266	0,330
Cor Aparente	Outubro	32.033,33 ± 3.873,41	29.633,33 ± 960,90	48.166,67 ± 1.289,70	25.400,00 ± 346,41	19.266,67 ± 351,19
	Novembro	17.266,67 ± 305,51	21.933,33 ± 321,46	75.366,67 ± 3.419,55	18.933,33 ± 650,64	14.366,67 ± 472,58
Turbidez	Outubro	950,00 ± 45,83	243,33 ± 5,77	2.466,67 ± 57,74	226,67 ± 20,82	376,67 ± 5,77
	Novembro	746,67 ± 5,77	320,00 ± 10,00	7.533,33 ± 57,74	200,33 ± 9,50	270,00 ± 10,00
Cor Verdadeira	Outubro	19.786,30 ± 869,40	32.770,37 ± 1.008,40	32.770,37 ± 1.008,40	23.185,19 ± 1.057,16	19.955,56 ± 736,94

(conclusão)

Parâmetro	Mês	FASE 1 7 anos	FASE 2 5 anos	FASE 3 4 anos	FASE 4/6 0 ano	FASE 5 1 ano
Cor Verdadeira	Novembro	17.800,00 ± 1.719,50	30.533,33 ± 1.917,75	30.533,33 ± 1.917,75	20.933,33 ± 1.968,87	14.316,67 ± 1.612,12
N. Amoniacal (mg/L)	Outubro	1.113,29 ± 24,22	2.145,23 ± 30,28	1.605,71 ± 54,50	2.479,22 ± 30,28	1.027,66 ± 0
	Novembro	963,43 ± 54,50	1.896,88 ± 78,72	1.485,82 ± 42,39	2.068,16 ± 66,61	1.331,67 ± 66,61
NT (mg/L)	Outubro	1.271,72	2.355,05	2.543,45	2.689,03	1.121,86
	Novembro	1.083,32	2.106,69	2.016,77	2.265,13	1.464,41
Alc T (mgCaCO ₃ /L)	Outubro	5.300,00 ± 141,42	10.800,00 ± 989,95	7.700,00 ± 424,26	11.550,00 ± 70,71	5.400,00 ± 0
	Novembro	5.400,00 ± 0	9.800,00 ± 282,84	20.500,00 ± 424,26	10.900,00 ± 141,42	7.200,00 ± 282,84
P (mg/L)	Outubro	80,67 ± 1,55	18,12 ± 0,26	355,99 ± 7,73	17,73 ± 0,29	11,24 ± 0,13
	Novembro	17,21 ± 0,52	18,30 ± 0	99,24 ± 0	12,61 ± 0,26	5,99 ± 0,31

*Parâmetro realizado em unicata.

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

O parâmetro pH variou entre 7,65 e 8,21, valores que estão dentro da classificação de faixa mais provável para aterros brasileiros, conforme Souto e Povinelli (2007) (Tabela 2) e, apesar de haver fases “jovens” no aterro, os valores são próximos ao encontrados em aterros encerrados ou antigos, como os de São Leopoldo, Gericinó (RJ), Jardim Gramacho (RJ) e Morro do Céu (RJ), analisados nos trabalhos de Gomes *et al.*, Ferreira *et al.* e Jucá *et al.*, citados em Lange e Amaral (2009). A tabela de Tchobanoglous, Theisen e Vigil (1993) corrobora com essa ideia, sendo os valores de um aterro considerado velho, de 10 a 20 anos (Tabela 3).

Liu, Yuan e Zeng (2008) afirmam que uma condição ótima de biodigestão ocorre em fase ácida, com valores de pH entre 6,8 e 7,2, onde nenhuma das Fases do aterro se enquadra, todas pertenceriam à fase metanogênica, segundo Souto (2009) e Ehring (1983). Köchling *et al.* (2015) classificaram em seu estudo os valores de pH encontrados (entre 7,2 e 7,7) como levemente alcalinos, sendo que as amostras coletadas eram de três diferentes áreas de um aterro em Pernambuco, com apenas 5, 3 e 2 anos de aterramento. Ribeiro *et al.* (2021), que monitoraram durante 9 meses o lixiviado do aterro de Campina Grande/PB, com cerca de três anos, os classificaram como acima da neutralidade, variando entre 7,2 e 8,4.

Outro parâmetro utilizado como forte indicador do nível de degradação biológica do lixiviado, a relação DBO/DQO, classificariam, segundo Gao *et al.* (2015), as Fases 1, 2 e 3 (outubro) como de aterros com mais de cinco anos, o que vai de

encontro com o tempo efetivo de aterramento dos resíduos. Na mesma linha, pela classificação de Pohland e Harper (1985), as três Fases citadas e a Fase 4/6 estariam na fase de maturação e as Fases 1, 3, 4/6 e 5 (novembro) na fase metanogênica de degradação. O resultado da Fase 4/6 pode ser influenciado pela percolação dos resíduos mais antigos, dispostos na Fase 4.

Iwai (2005), que em seu trabalho simulou uma célula de aterro, concluiu que no início da biodegradação, a relação DBO/DQO ficou em torno de 0,5 ou mais e valores entre 0,4 e 0,6 indicam melhor biodegradabilidade, sendo que no caso dessa pesquisa nenhuma das Fases monitoradas apresentaram-se dentro dessa faixa. Souto (2009) não apresentou esta relação definida, pois defende que razões de DBO/DQO altas são sinônimos de elevada biodegradabilidade, mas uma relação baixa não necessariamente significa que os compostos ali presentes sejam pouco biodegradáveis.

O parâmetro de cor aparente variou entre os dois meses, aumentando em novembro na Fase 3 e diminuindo nas demais. Tal Fase também foi a de maior valor, o que pode ser explicado pela influência da turbidez, já que no parâmetro de cor verdadeira o valor se assemelha às outras Fases. Não foi possível determinar a fase de degradação pela classificação de Souto (2009), pois os valores das Fases 2, 4/6 e 5 poderiam pertencer tanto a uma fase ácida, quanto na metanogênica e os valores das Fases 1 e 3 estão acima do valor máximo informado por aquele autor.

Os valores de DQO encontrados no mês de outubro, nas Fases 2, 3, 4/6 e 5 pertencem a aterros de 0 a 5 anos, e da Fase 1 a aterros de 5 a 10 anos, conforme Farquhar (1989), períodos que estão de acordo com o tempo de aterramento dos resíduos. Já em novembro os resultados apresentaram queda em todas as Fases e a classificação passa a ser de aterros de 10 a 20 anos. Quanto à etapa de degradação, os resultados de DQO da Fase 1 e 5 do mês de novembro as classificariam como de fase metanogênica, e o restante, inclusive todas as Fases do mês de outubro, seriam de fase ácida, de acordo com Ehrig (1989).

Almeida (2020) analisou diferentes células do aterro de Campina Grande, em operação há cerca de dois anos, quando não encontrou um comportamento uniforme para os valores de DQO, havendo seguidos episódios de aumento e diminuição de valores ao longo do tempo, o que ele explicou como efeito da presença de materiais de difícil degradação, índices pluviométricos e recirculação de lixiviado. Leite *et al.* (2009) encontraram uma faixa de valores de DQO, para o aterro encerrado de São

Leopoldo, entre 1.319,00 e 9.777,00 mgO₂/L e Roehrs *et al.* (2019) encontraram valor médio de 1.302,00 mgO₂/L para o lixiviado do aterro sanitário encerrado de Lajeado/RS, sendo que ambos haviam iniciado suas operações há mais de dez anos em relação a data do monitoramento.

Os resultados de DBO nesse trabalho estão dentro da faixa mais provável para aterros brasileiros (SOUTO; POVINELLI, 2007). Na questão de idade do aterro, conforme a tabela de Farquhar (1989), a Fase 1 de outubro; e Fase 1 e 2 de novembro seriam de aterros acima de 20 anos, e todas as outras seriam de aterros entre 10 a 20 anos. Nas classificações de todos os outros autores, relacionados na Tabela 3, não foi possível distinguir a qual fase de degradação as Fases desse aterro estariam, segundo a DBO. El-Fadel (2002), que analisou os lixiviados durante 18 meses em um aterro do Líbano encontrou primeiramente valores de DBO acima do mencionado na literatura, após 2 anos, os valores já eram típicos de aterros entre 10 e 15 anos.

Os resultados de Nitrogênio Total classificaram todas as Fases do aterro como de 0 a 5 anos (Farquhar, 1989), e as Fases 1 e 5 como de fase ácida, segundo Pohland e Harper (1985), as demais estão acima do valor máximo da tabela. O nitrogênio amoniacal apresentou valores na faixa máxima para aterros brasileiros nas Fases 2 e 4/6 de outubro e novembro e faixa mais provável nas demais. (SOUTO; POVINELLI, 2007). Na classificação de Farquhar (1989), os lixiviados das Fases 1, 3 e 5 estão dentro da faixa de aterros de 0 a 5 anos, as demais estão acima do valor máximo informado pelo autor. Na tabela de Pohland e Harper (1985), entram as Fases 1 e 3, sendo de fase ácida e na de Souto (2009). As elevadas concentrações de NA podem ser explicadas pela presença de grande quantidade de material orgânico aterrado, segundo Calli; Mertoglu e Inanc (2005) esse parâmetro pode ser tóxico às bactérias decompositoras quando em concentração superior a 600 mg/L.

Sobre os resultados de alcalinidade total, os valores para todas as Fases seriam de aterros jovens (TCHOBANOGLIOUS, THIESEN, VIGIL, 1993) ou de fase ácida (POHLAND, HARPER, 1985). A alcalinidade pode ser definida como um efeito tampão natural do meio, resultante da presença de hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos, ou seja, quanto mais altos os valores de alcalinidade, maior a transformação da matéria orgânica em CO₂ e bicarbonatos (GIORDANO, BARBOSA FILHO, CARVALHO, 2011). Valores similares foram encontrados por Gomes *et al.* (2018) no aterro de Campina Grande, com cerca de um ano de operação.

É possível notar semelhança no comportamento da acidez e do nitrogênio amoniacal, o que ocorreu também no trabalho de Almeida (2020) e pode ser explicado em razão do nitrogênio amoniacal ser formado a partir do bicarbonato de amônio, gerados pela decomposição bioquímica da fração orgânica presente na massa de RSU. (NAVEEN *et al.*, 2016).

Os nutrientes liberados pelos resíduos, entre eles o fósforo, são aproveitados no crescimento da biomassa microbiana. O resultado de fósforo na Fase 1 e 2 ficaram dentro da classificação de Farquhar (1989) para aterros de 5 a 10 anos, e a Fase 3, do mês de outubro, está na faixa de aterros com menos de 5 anos, todas em concordância com a idade do aterramento. Já as Fases 4/6 e 5, que são as mais recentes (1 ano e atual) não correspondem a idade estipulada pelo autor, que seria de 5 a 10 anos e até mesmo acima de 20 anos. Para Tchobanoglous, Thiesen e Vigil (1993), todas as Fases, exceto a Fase 5 no mês de novembro, estariam classificadas como de aterro jovem.

Diante dos resultados das análises físico-químicas obtidos na presente pesquisa, quando comparadas com as classificações da literatura, elas nem sempre refletem a degradação em função do tempo de aterramento. A digestão anaeróbia foi variável, ora com comportamento de lixiviado novo (maior biodegradabilidade) ora como lixiviado antigo (menor biodegradabilidade). O mesmo ocorreu nos estudos dos aterros de João Pessoa, Jardim Gericinó, Morro do Céu, Muribeca e São Leopoldo (municipal), atribuição justificada pelos autores como o fato de estarem em operação contínua e não encerrados. Tal hipótese é adequada para o aterro em estudo, já que há sobreposição de camadas mais recentes em locais onde já existiam resíduos aterrados há mais tempo, como por exemplo a Fase 2, que operou durante 24 meses.

Para finalizar essa avaliação, foram mescladas as Tabelas 3 e 8, para todos os parâmetros citados e obtidos nessa pesquisa. O resultado é a Tabela 10, que indica a classificação para o aterro sanitário de São Leopoldo conforme os 5 trabalhos citados. Para facilitar a montagem dos resultados, foram nominados de A até E as cinco referências e cada tipo de etapa da Digestão Anaeróbia, conforme a classificação dada por cada referência foi também nominada. A Tabela 9 apresenta essa denominação.

Tabela 9 – Nominata das diferentes classificações propostas da Digestão Anaeróbia

Autor	Farquhar, 1989 (Aterros norte-americanos)			
	0 a 5 anos	5 a 10 anos	10 a 20 Anos	>20 anos
Sigla Ref e Classificação	A1	A2	A3	A4
Autor	Tchobanoglous, Theisen e Vigil, 1993 (Aterros europeus e norte-americanos)			
	Aterro Jovem (<2 anos)		Aterro Velho (>10 anos)	
Sigla Ref e Classificação	B1		B2	
Autor	Souto, 2009 (40 aterros Brasil)			
	Fase Ácida		Fase Metano	
Sigla Ref e Classificação	C1		C2	
Autor	Ehrig, 1989 (20 aterros Alemanha)			
	Fase Ácida		Fase Metano	
Sigla Ref e Classificação	D1		D2	
Autor	Pohland e Harper, 1985 (Aterros simulados diversos locais)			
	Fase Transição	Fase Ácida	Fase Metano	Fase Maturação
Sigla Ref e Classificação	E1	E2	E3	E4

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

É importante ressaltar que são resíduos diferentes, apenas a Referência C foi elaborada a partir de lixiviados de aterros sanitários brasileiros, mas como um exercício de entender a etapa da degradação que se encontra os resíduos e, portanto, a qualidade do lixiviado.

Assim, analisou-se os resultados dos lixiviados para as duas amostras (outubro e novembro) para todos os parâmetros e classificou-se as amostras em cada fase (Tabela 10). Posteriormente, foram elaboradas as Tabelas 11 e 12, que apresentam a classificação final. Os números indicados correspondem a quantidade de parâmetros que foram identificados dentro de cada faixa de classificação, aqueles grifados em laranja correspondem a maior quantidade em cada classificação conforme cada referência, portanto, a etapa da digestão anaeróbia principal para aquele lixiviado, naquela fase.

Tabela 10 – Classificação dos lixiviados amostrados em outubro e novembro no aterro sanitário de São Leopoldo, em todas as fases monitoradas

Parâmetro	Mês	FASE 1 7 anos	FASE 2 5 anos	FASE 3 4 anos	FASE 4/6 0 ano	FASE 5 1 ano
pH	Outubro	C2, D2, E3, E4				
	Novembro					
DBO* (mgO ₂ /L)	Outubro	A3, C2, E1, E3			A2, B1, C2, E1, E2, E3	
	Novembro	A3, C2, E1, E3				
DQO (mgO ₂ /L)	Outubro	A2, B1, C1, C2, D1, E1, E2	A1, A2, B1, C1, C2, D1, E1, E2	A1, A2, B1, C1, C2, D1, E2	A1, A2, B1, C1, C2, D1, E1, E2	
	Novembro	A3, B1, C1, C2, D2, E1, E2, E3	B1, C1, C2, D1, E1, E2, E3	B1, C1, C2, E1, E2, E3	B1, C1, C2, D1, E1, E2, E3	A3, B1, C1, C2, D2, E1, E2, E3
DBO/DQO	Outubro	E4			E3	
	Novembro	E1, E3	E4	E1, E3	E1, E3	
N. Amoniacal (mg/L)	Outubro	A1, C1, C2, E2	C2	C1, C2	C2	A1, C1, C2
	Novembro	A1, C1, C2, E2	C1, C2	A1, C1, C2, E2	C2	A1, C1, C2
NT (mg/L)	Outubro	A1, C1, C2, E2	A1, C1, C2		A1, C1, C2	A1, C1, C2, E2
	Novembro	A1, C1, C2, E2	A1, C1, C2		A1, C1, C2	A1, C1, C2, E2
Alc T (mgCaCO ₃ /L)	Outubro	B1, C1, C2, E2	B1, C1, C2	B1, C1, C2, E2	C1, C2	B1, C1, C2, E2
	Novembro	B1, C1, C2, E2	B1, C1	C1	C1, C2	B1, C1, C2, E2
P (mg/L)	Outubro	A2, B1, C1, E2	A2, B1, C1, C2, E2		A2, B1, C1, C2, E2	A2, B1, C1, C2, E2, E3, E4
	Novembro	A2, B1, C1, C2, E2		A2, B1, C1, E2	A2, B1, C1, C2, E2, E3, E4	A4, B1, B2, C1, C2, E2, E3, E4

Nota: os valores de lixiviados apresentados na Tabela 8 foram classificados conforme as faixas apresentadas na Tabela 3.

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Tabela 11 – Classificação final dos lixiviados amostrados em outubro no aterro sanitário de São Leopoldo, em todas as fases monitoradas

Autor	Tempo	Ref	FASE 1 7 anos	FASE 2 5 anos	FASE 3 4 anos	FASE 4/6 0 ano	FASE 5 1 ano
Farquhar (1989)	0 a 5 anos	A1	2	2	2	2	3
	5 a 10 anos	A2	2	2	1	3	3
	10 a 20 anos	A3	1	1	1	0	0
	>20 anos	A4	0	0	0	0	0
Tchobanoglous, Theisen e Vigil (1993)	Aterro Jovem (<2 anos)	B1	3	3	2	3	4
	Aterro Velho (>10 anos)	B2	0	0	0	0	0
Souto (2009)	Fase Ácida	C1	5	4	4	4	5
	Fase Metano	C2	6	7	6	7	7
Ehrig (1989)	Fase Ácida	D1	1	1	1	1	1
	Fase Metano	D2	1	1	1	1	1
Pohland e Harper (1985)	Fase Transição	E1	2	2	1	2	2
	Fase Ácida	E2	5	2	2	3	5
	Fase Metano	E3	2	2	2	3	4
	Fase Maturação	E4	2	2	1	1	2

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Tabela 12 – Classificação final dos lixiviados amostrados em novembro no aterro sanitário de São Leopoldo, em todas as fases monitoradas

Autor	Tempo	Ref	FASE 1 7 anos	FASE 2 5 anos	FASE 3 4 anos	FASE 4/6 0 ano	FASE 5 1 ano
Farquhar (1989)	0 a 5 anos	A1	2	1	2	1	2
	5 a 10 anos	A2	1	1	1	1	0
	10 a 20 anos	A3	2	1	1	1	2
	>20 anos	A4	0	0	0	0	1
Tchobanoglous, Theisen e Vigil (1993)	Aterro Jovem (<2 anos)	B1	3	3	2	2	3
	Aterro Velho (>10 anos)	B2	0	0	0	0	1
Souto (2009)	Fase Ácida	C1	5	5	5	4	5
	Fase Metano	C2	7	6	5	7	7
Ehrig (1989)	Fase Ácida	D1	0	1	0	1	0
	Fase Metano	D2	2	1	1	1	2
Pohland e Harper (1985)	Fase Transição	E1	3	2	3	3	3
	Fase Ácida	E2	5	2	3	2	4
	Fase Metano	E3	4	3	4	5	5
	Fase Maturação	E4	1	2	1	2	2

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Com base nas Tabelas 11 e 12, temos que:

- Comparando-se a classificação proposta por Tchobanoglous, Theisen e Vigil (1993) e os resultados do aterro de São Leopoldo verificou-se que

as Fases 1, 2 e 5 de outubro; e 2 e 4/6 de novembro pertencem a mais de um período, variando entre aterros de 0 a 20 anos. A única com idade exata com a tabela é a Fase 3, nos dois meses. Possivelmente a justificativa é a diferença nos resíduos aterrados, no caso da referência, em aterros europeus e norte-americanos.

- Na classificação segundo Farquhar (1989), todas as Fases do Aterro de São Leopoldo enquadram-se em um Aterro Jovem (abaixo de 2 anos). A Fase 1, por exemplo, já possui 7 anos de aterramento, o que poderia ser explicado pela fração maior de resíduos biodegradáveis do que em aterros norte-americanos, local de referência do autor.
- Já na classificação de Souto (2009), a única que utilizou lixiviados gerados em aterros brasileiros, o resultado é de que todas as Fases, exceto a Fase 4/6 de novembro, se enquadram na fase metanogênica.
- Comparando-se a classificação proposta por Ehrig (1989) e os resultados do aterro de São Leopoldo, verificou-se que as Fases 1, 2, 3, 4/6 de outubro; e 2 e 4/6 de novembro pertencem tanto à fase ácida quanto à metanogênica. A Fase 5 de outubro; 1, 3 e 5 de novembro estão na fase metanogênica.
- Para a classificação de Pohland e Harper (1985) a Fase 1 (outubro e novembro) e 5 (outubro) estão na fase ácida; as Fases 2, 3 e 4/6 (outubro) empatam entre ácida e metanogênica; e as Fases 2, 3, 4/6 e 5 (novembro) estão na fase metanogênica.

As classificações dos autores citados são usualmente utilizadas em trabalhos da área, mas pelo exposto, é visto que existem diferenças nos valores entre locais. A definição por aterros jovens e antigos não se encaixa tanto quanto a de Pohland e Harper (1985), por sinal, a mais antiga das estudadas.

Certamente os resultados dos parâmetros físico-químicos classificam o aterro de São Leopoldo, para o período monitorado (outubro e novembro), em uma variação entre etapas ácidas e metanogênica, com boa degradabilidade. Caso parecido com o trabalho de Passarini *et al.* (2021), que encontrou um mix entre etapas de degradação no perfil do aterro de Foz do Iguaçu, justificado pela recirculação de lixiviado, o que não acontece no aterro do presente estudo.

5.2 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS

A etapa de enriquecimento teve início com a incubação de 21 frascos, 6 unidades com amostra de lixiviado da Fase 5 e 15 unidades com amostra de lixiviado da Fase 3, todos com seus respectivos meios e substratos, descritos na metodologia.

A Figura 11 apresenta uma das imagens registradas (em campo claro) das observações do lixiviado bruto da Fase 5, com os RSU aterrados há 28 meses, no chamado “tempo zero” do experimento.

Figura 11 – Observação microscópica: lixiviado bruto da Fase 5 (campo claro)

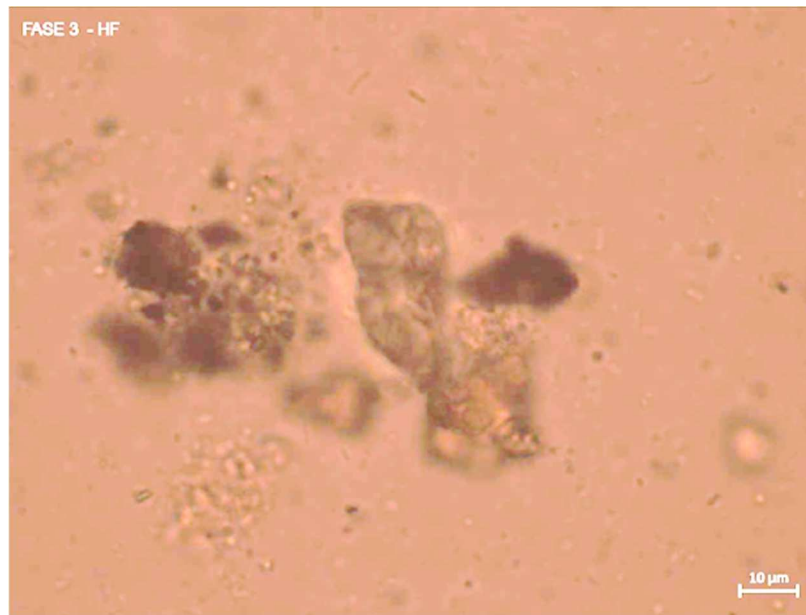


Fonte: Elaborado pela autora.

A presença de partículas inertes, em suspensão inúmeros elementos físicos no lixiviado, oriundos dos diversos resíduos, dificultou a identificação de microrganismos nas amostras brutas. No campo marcado, na Figura 11, foi registrada a presença de cocos, arranjadas em téttrade. (MADIGAN *et al.*, 2010)

A Figura 12 apresenta um dos registros feitos da amostra bruta de lixiviado da Fase 3, com os RSU aterrados há 62 meses. Novamente, há a presença de diversos elementos, com formas e tamanhos variados.

Figura 12 – Observação microscópica: lixiviado bruto da Fase 3 (campo claro)

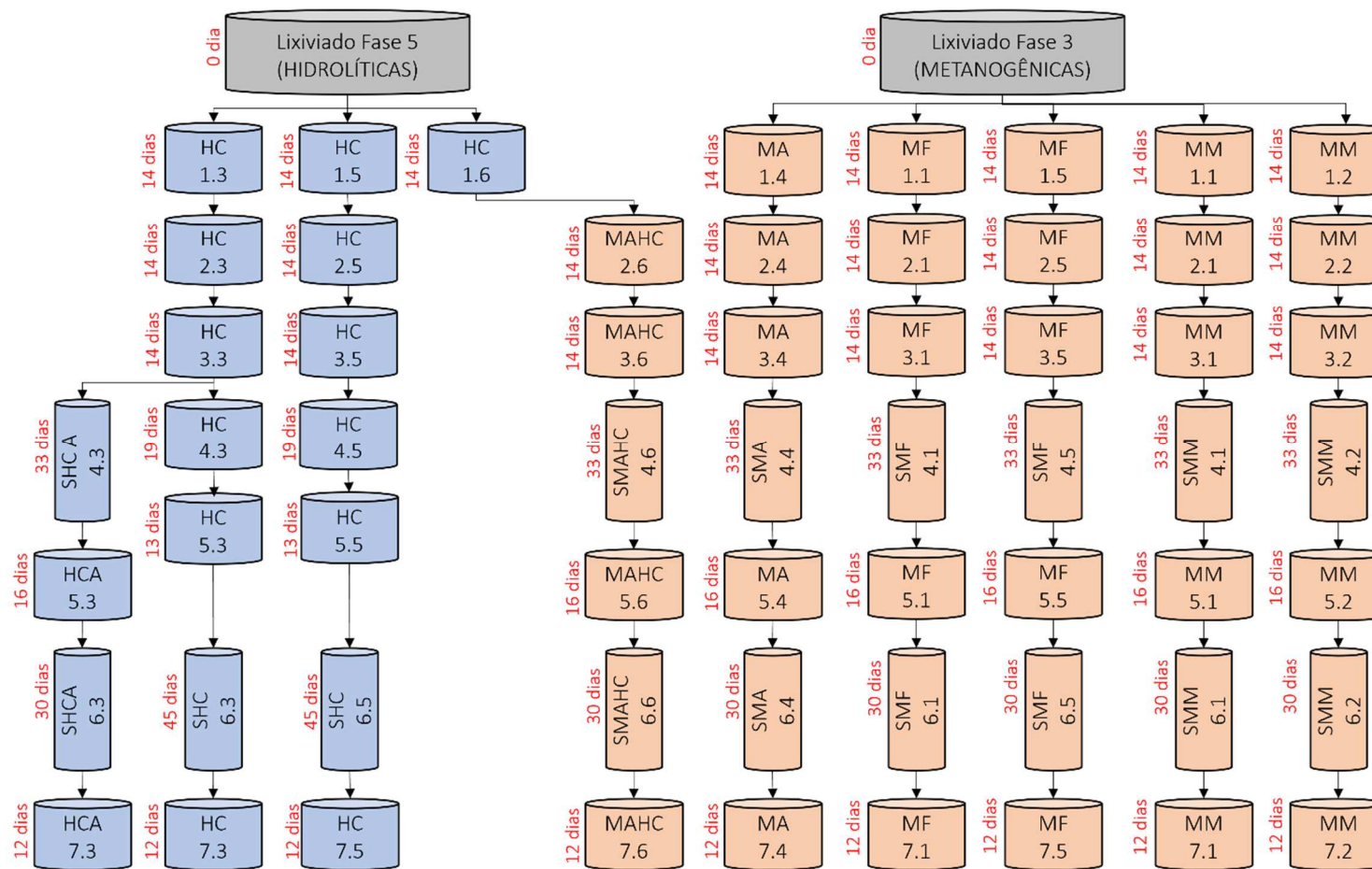


Fonte: Elaborado pela autora.

As primeiras observações dos reatores no microscópio ocorreram após 3 dias de incubação em estufa, não sendo percebida mudança de padrão das imagens das amostras brutas de lixiviado. Após 14 dias de incubação dos frascos em estufa houve mudança na turvação, sendo realizada nova microscopia e feita a seleção dos reatores que seguiram para repique.

A seleção consistiu na qualidade das imagens obtidas e da exclusão de frascos contaminados com oxigênio. Das 21 unidades, 8 foram escolhidas para seguir no enriquecimento, em um total de 133 dias de trabalho. A Figura 13 apresenta de forma visual, em fluxograma, a sequência total de enriquecimento.

Figura 13 – Fluxograma de enriquecimento das amostras



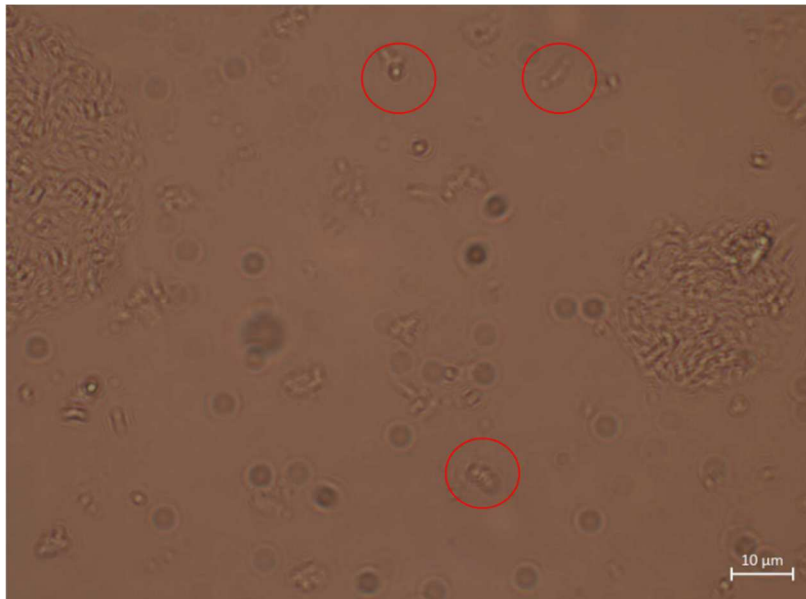
Fonte: Elaborado pela autora.

No esquema, os frascos em azul representam os reatores hidrolíticos, criados a partir do lixiviado da Fase 5. Já os frascos em laranja, representam os reatores metanogênicos, da Fase 3. As siglas utilizadas correspondem ao controle de trabalho, sendo HC “hidrolíticas com celulose”, MA “metanogênicas com acetato”, MF “metanogênicas com formiato”, MM “metanogênicas com metanol”. Na sigla SHCA, houve uso também de acetato e na MAHC/SMAHC “hidrolítica com metanol”. Os frascos redondos (de antibiótico) representam os repiques em meio líquido e os frascos em tubo, os repiques em meio sólido. A numeração seguiu a ordem dos repiques e os dias, em vermelho, correspondem o tempo de incubação dos reatores em estufa.

A partir dos repiques, o campo de observação foi ficando mais “limpo” e possível de identificar alguns microrganismos. A forma mais comum encontrada foi cocos, organizados em diplococos, estreptococos, estafilococos e sarcinas; bacilos e cocobacilos; e espiroquetas. Carneiro (2005) identificou com maior frequência em suas amostras de lixiviado a presença de cocos, cocobacilos e bacilos e Gomes (1995) identificou no isolamento de bactérias hidrolíticas bacilos formadores de esporos e sarcinas fluorescentes.

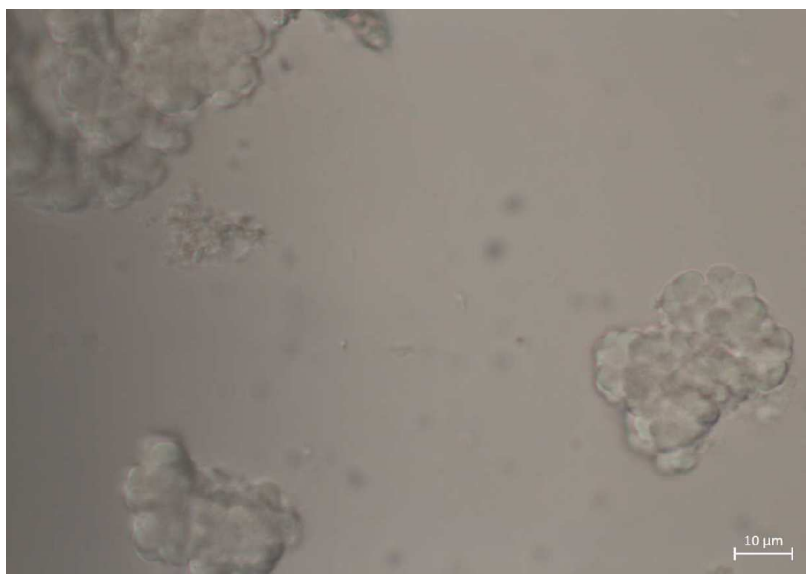
A Figura 14 apresenta uma amostra onde é possível ver bactérias em forma de cocos e bacilos, com diversos arranjos. Pelas formas e fonte de enriquecimento utilizada na amostra (formiato), de acordo com o Quadro 2 (MADIGAN *et al.*, 2010), o microrganismo poderia pertencer à ordem Methanomicrobiales. Já a Figura 15 apresenta o registro de arqueias metanogênicas, em campo claro, sendo possível observar os microrganismos arranjados em sarcinas, provavelmente do gênero *Methanosarcina*, e confirmado na Figura 15, em campo escuro, por meio da emissão de luz UV.

Figura 14 – Amostra MF 2.1 em campo claro



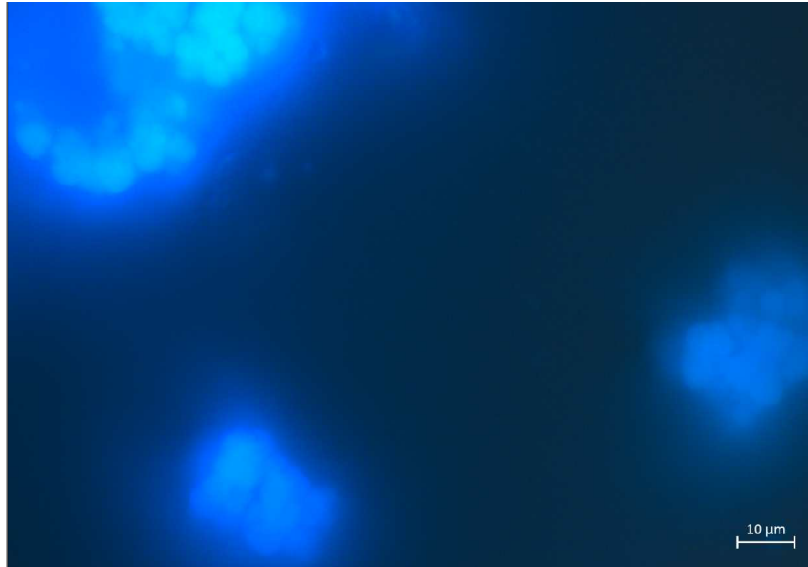
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15 - Amostra MM 5.1 em campo claro



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16 – Amostra MM 5.1 em campo escuro



Fonte: Elaborado pela autora.

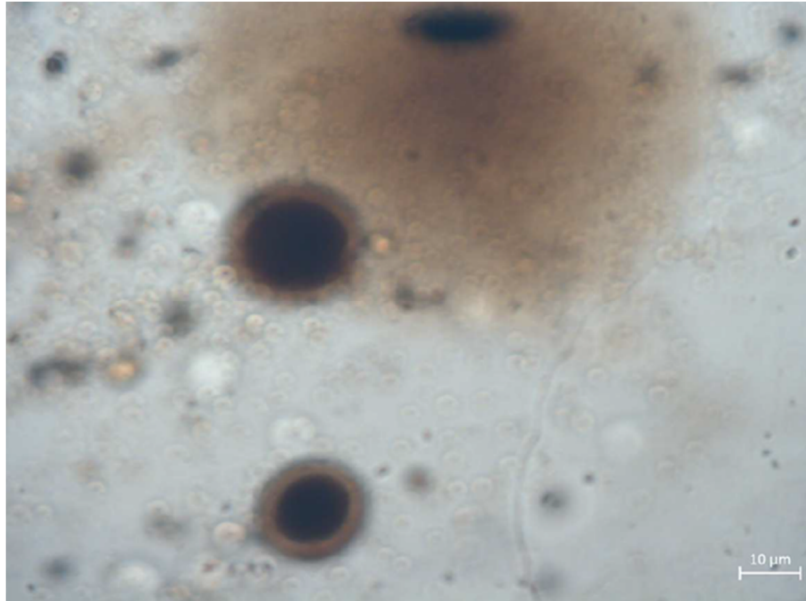
A primeira microscopia realizada, dos reatores metanogênicos em meio sólido, ocorreu após 33 dias de incubação, com a observação de formação de colônias. Já para as hidrolíticas, o tempo de incubação foi de 45 dias, com formação de colônias mais lenta, mesmo ocorrido no trabalho de Gomes (1995). No geral, a média de incubação em meio sólido dos reatores foi de 36 dias, as colônias dos primeiros *roll-tubes* foram maiores que do segundo, como pode ser observado nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 – Colônia formada na amostra MM 4.2 em meio sólido



Fonte: Elaborado pela autora.

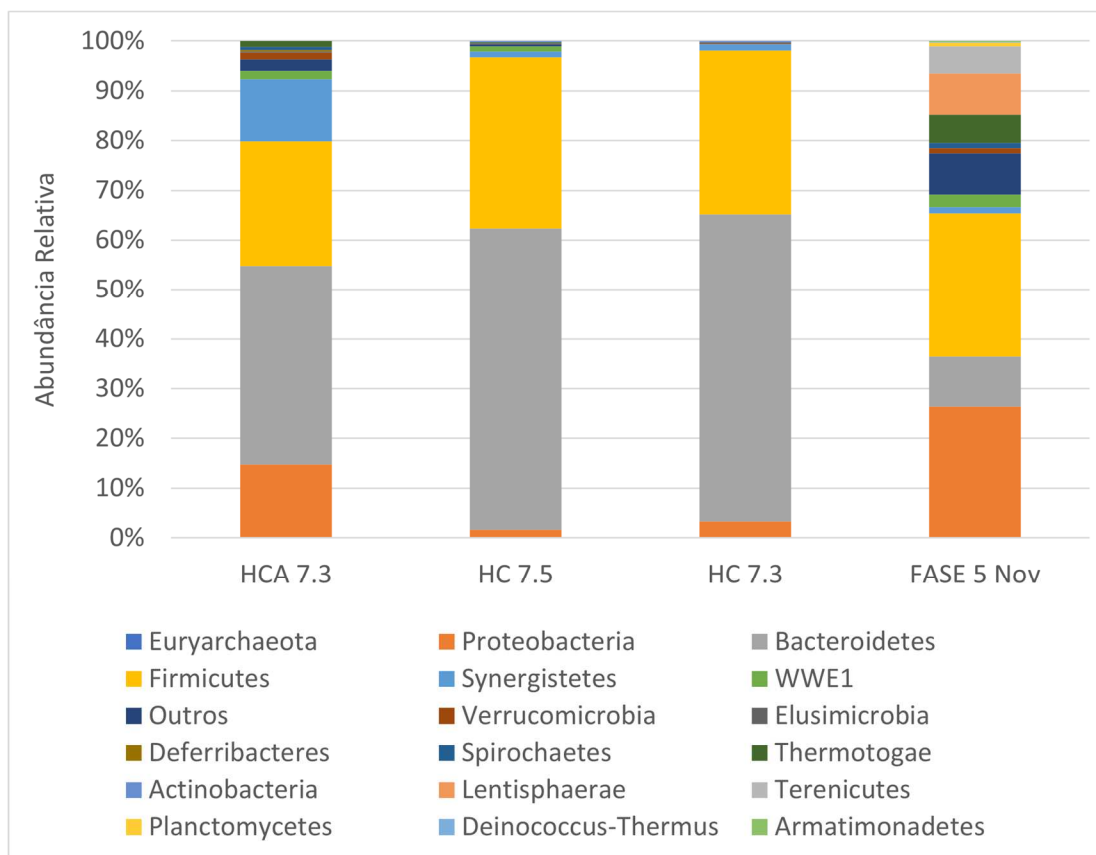
Figura 18 – Amostra MM 6.2 em meio sólido



Fonte: Elaborado pela autora.

Os 9 reatores enriquecidos foram encaminhados para sequenciamento de DNA, sendo obtidas 341.850 OTU. Nos reatores “hidrolíticos” foram identificados 11 filos, enquanto que na amostra bruta da Fase 5 (sem enriquecimento) foram identificados 14 filos. A Figura 19 apresenta a abundância dos filos das amostras enriquecidas e da amostra bruta de novembro, data da amostragem que deu início aos enriquecimentos.

Figura 19 – Abundância de filos em diferentes reatores hidrolíticos na fase de enriquecimento (último repique) e amostra de lixiviado bruto coletado na Fase 5 em novembro (mês de início da etapa de enriquecimento)



Fonte: Elaborado pela autora.

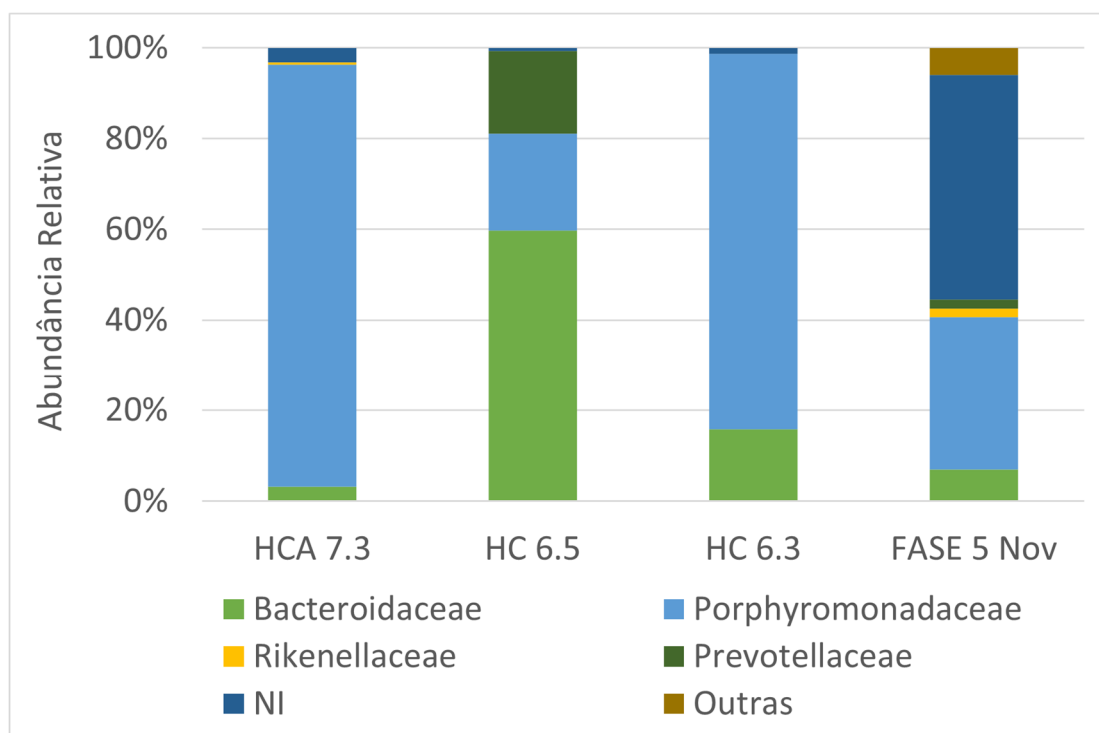
O filo Bacteroidetes foi o mais abundante em todos os reatores, grupo constituído por bactérias gram-negativas, conhecidas pela sua capacidade hidrolítica e fermentativa, responsável pela degradação de proteínas e posterior fermentação de aminoácidos e acetato para microrganismos metanogênicos acetoclásticos. (SONG *et al.*, 2015). Em segundo lugar em abundância, foi o filo Firmicutes, grupo que desempenha importante papel na decomposição de celulose em virtude de sua capacidade de fermentar açúcares e aminoácidos, além da produção dos ácidos acético e láctico. (SONG *et al.*, 2015). Tais características vão de encontro à fase de digestão anaeróbia estimulada por meio da fonte utilizada (celulose) no enriquecimento.

Em comparação, no lixiviado bruto da Fase 5, o de maior abundância foi Firmicutes, seguido por Proteobactéria. Não houve presença do Domínio Arqueia nos reatores enriquecidos. Também nota-se diferença entre os dois reatores enriquecidos

apenas com celulose e o HCA 7.3, que recebeu acetato na etapa de roll-tube, este último com abundância menor entre os filios.

A Figura 20 apresenta as famílias identificadas no filo de maior abundância, Bacteroidetes, nos três reatores hidrolíticos enriquecidos e na amostra bruta da Fase 5. A sigla “NI” corresponde às famílias que não foram identificadas.

Figura 20 – Abundância de famílias do filo Bacteroidetes nos reatores hidrolíticos e na amostra de lixiviado bruto coletado na Fase 5



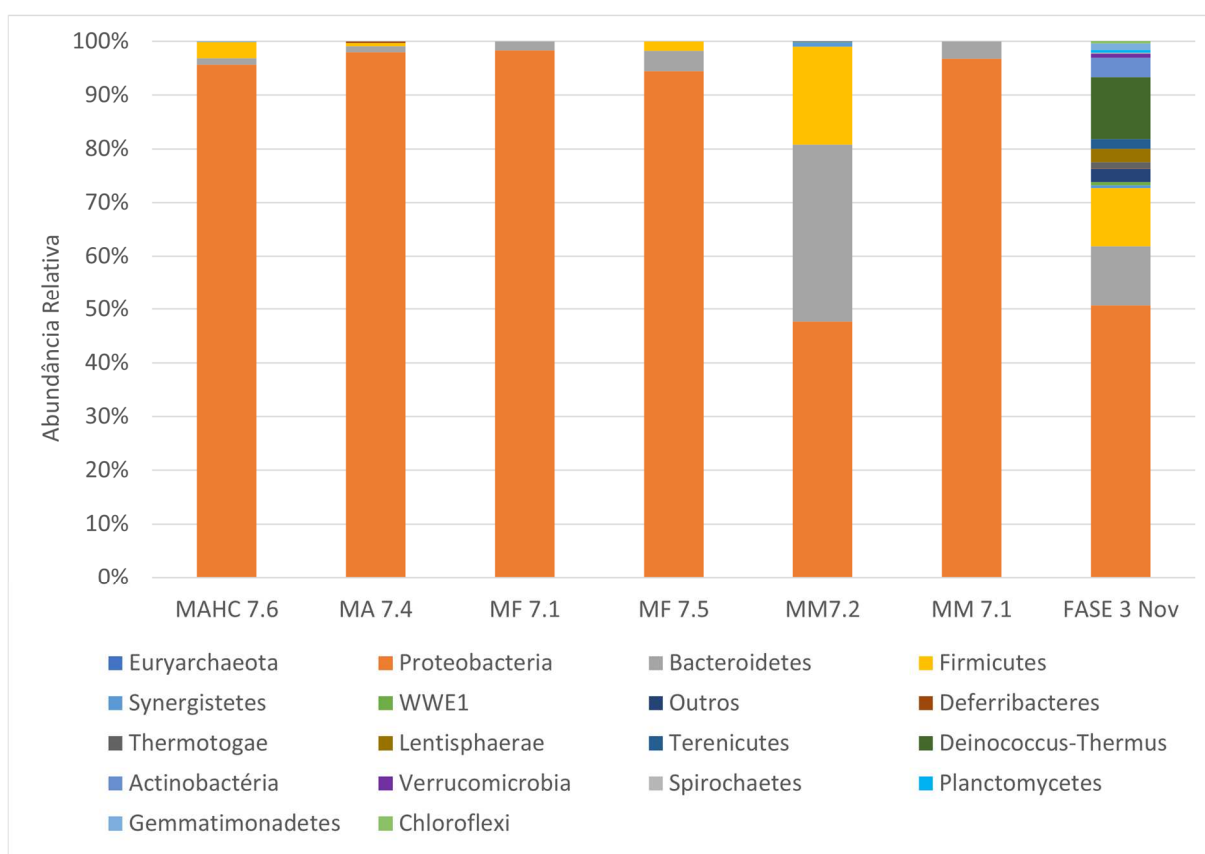
Fonte: Elaborado pela autora.

A família mais abundante nos reatores HCA 7.3, HC 6.3 e lixiviado bruto foi Porphyromonadaceae, com os gêneros *Dysgonomonas*, grupo com capacidade de degradar lignina, encontrado em locais como lodo de indústria de papel e celulose (DUAN *et al.*, 2016) e *Paludibacter*, bactérias produtoras de propionato e acetato como produtos primários da fermentação. (UEKI *et al.*, 2016). No reator HC 6.5 a família mais abundante foi Bacteroidaceae, com o gênero *Bacteroides*, bactérias hidrolíticas produtoras de proteases para degradação de proteínas e aminoácidos e usualmente utilizada como indicador de qualidade da água. (ANDERSON, 2003).

O grupo “Outras” corresponde às famílias do filo Bacteroidetes apenas encontradas na amostra de lixiviado bruto da Fase 5, sendo elas: Flavobacteriaceae e Weeksellaceae.

Nos reatores chamados “metanogênicos”, foram identificados 7 filios, já na Fase 3, do lixiviado bruto de novembro, foram 17 filios identificados. A abundância dos filios que foram comuns às amostras enriquecidas e à amostra bruta de novembro está apresentada na Figura 21.

Figura 21 - Abundância de filios em diferentes reatores metanogênicos na fase de enriquecimento (último repique) e amostra de lixiviado bruto coletado na Fase 3 em novembro (mês de início da etapa de enriquecimento)

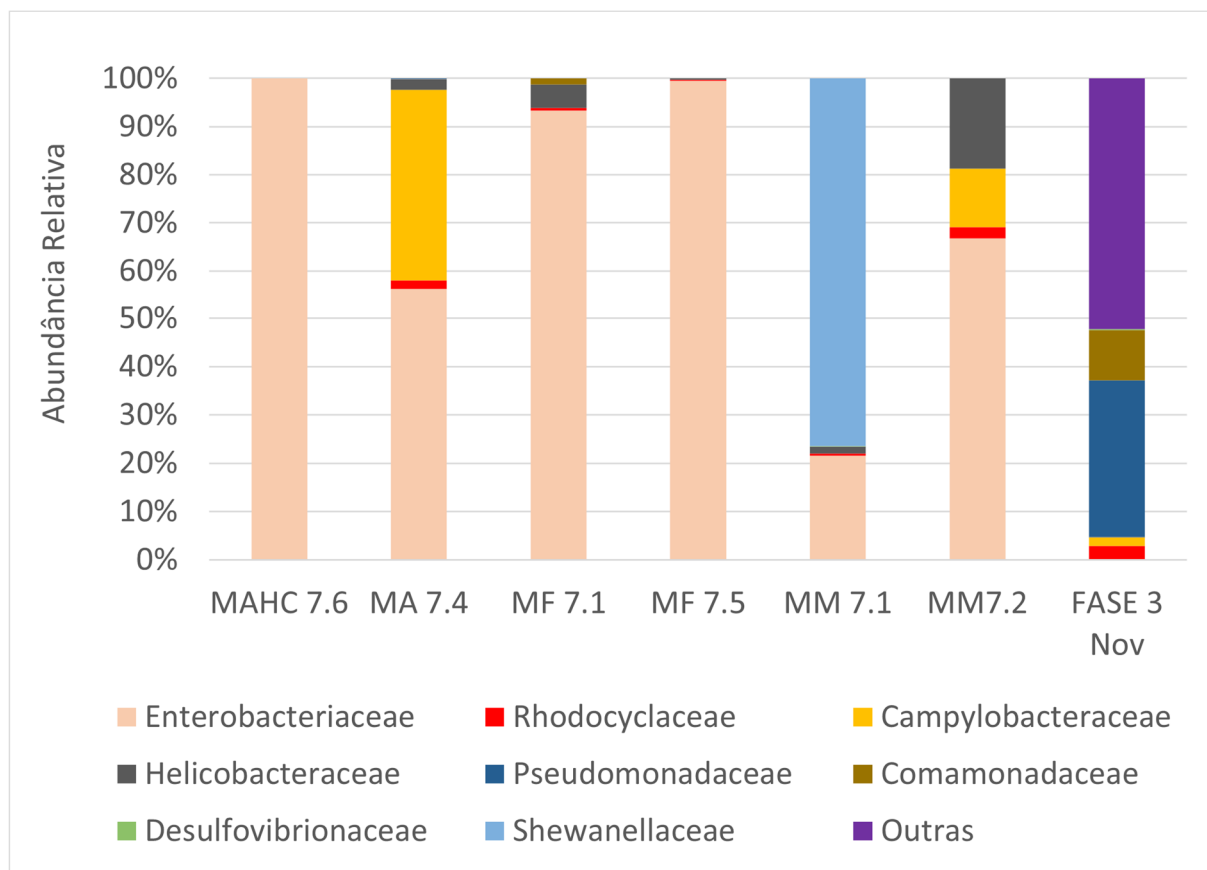


Fonte: Elaborado pela autora.

O grupo Proteobacteria foi o mais abundante em todos os reatores, bem como no lixiviado bruto da Fase 3. De acordo com Gupta (2000) e Moreira e Siqueira (2006), este é o maior e mais diverso filo, representa a grande maioria das bactérias gram-negativas conhecidas, englobando um complexo conjunto de atributos fenotípicos e fisiológicos. Muitos gêneros patogênicos pertencem a esse grupo, assim como muitos gêneros de vida livre e bactérias responsáveis pela fixação de nitrogênio, estando envolvidas nas etapas iniciais de degradação. (MADIGAN *et al.*, 2010). Representantes do Domínio Arqueia foram identificados apenas no reator MM 7.2, com 0,10% do total.

A Figura 22 apresenta as famílias identificadas no filo Proteobacteria, nos seis reatores metanogênicos enriquecidos e na amostra bruta da Fase 3.

Figura 22 - Abundância de famílias do filo Proteobacteria nos reatores metanogênicos e na amostra de lixiviado bruto coletado na Fase 3



Fonte: Elaborado pela autora.

A família com maior abundância em todos os reatores, exceto o MM 7.1, foi Enterobacteriaceae, conhecida por fermentar glicose e reduzir nitrato a nitrito. No reator MAHC 7.6 chegou a ser 100%, enquanto na amostra bruta de lixiviado da Fase 3 ela não foi identificada. O único gênero identificado desta família foi *Escherichia*, grupo de bactéria gram-negativas bacilares, que habita o trato gastrointestinal de humanos e animais, e é comumente utilizado como indicador de qualidade da água. (WELCH, 2006).

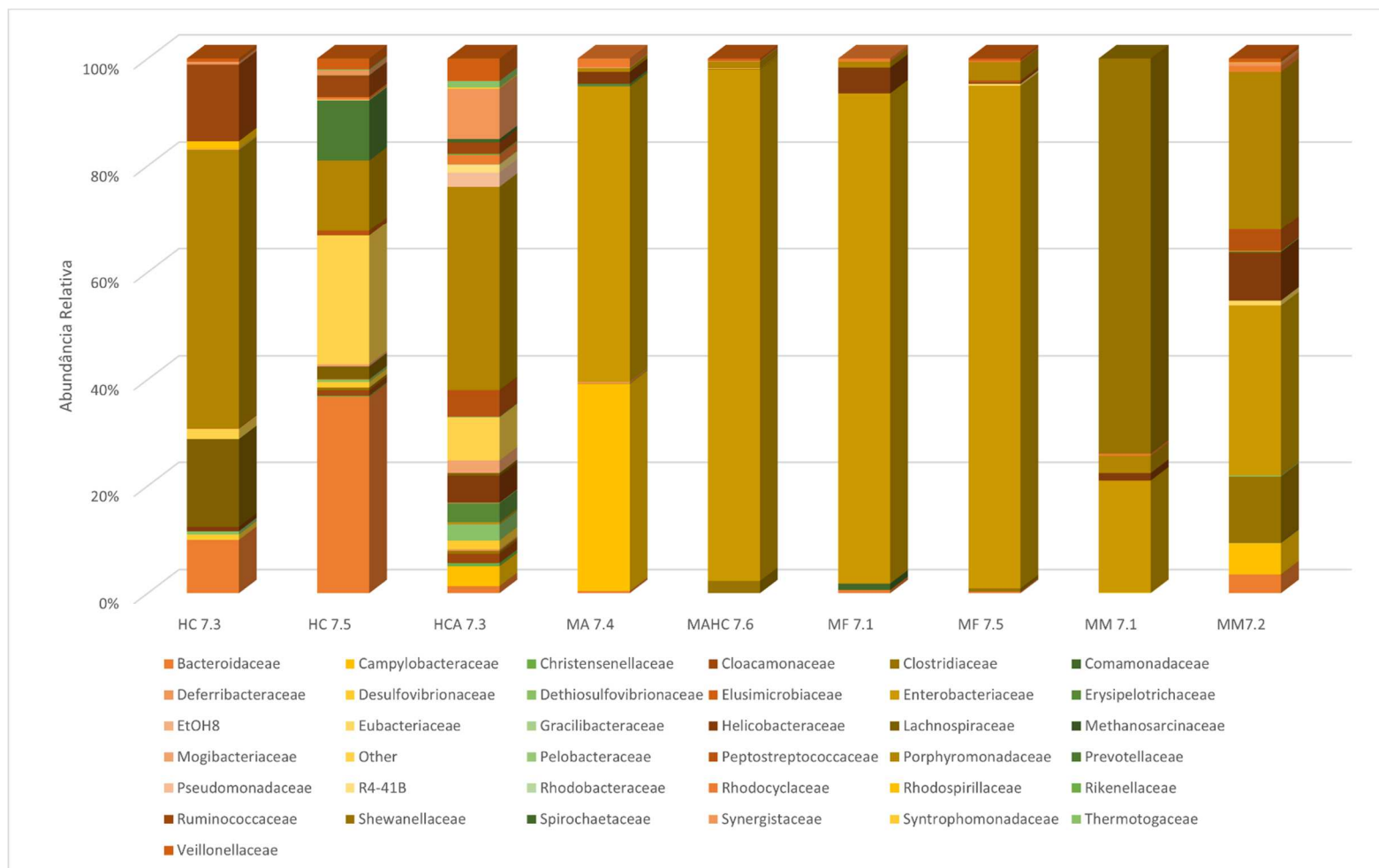
No reator MA 7.4, a segunda família de maior abundância foi Campylobacteraceae, grupo que compreende bactérias bastante diversas fenotipicamente, com os gêneros *Sulfurospirillum* (redutora de enxofre) e *Wolinella*. No reator MM 7.1, a família de maior abundância foi Shewanellaceae, com o gênero *Shewanella*, não sendo encontrada nos demais reatores e no lixiviado bruto.

O grupo “Outros” corresponde às famílias encontradas apenas na amostra de lixiviado bruto da Fase 3, sendo elas: Hyphomicrobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomonadaceae, Acetobacteraceae, Sphingomonadaceae, Alcaligenaceae, Oxalobacteraceae, Nitrosomonadaceae, Bdellovibrionaceae, Geobacteraceae, Pelobacteraceae, Alteromonadaceae, Sinobacteraceae e Xanthomonadaceae.

É possível perceber que a composição da comunidade de microrganismos foi moldada pelas fontes de carbono utilizadas no enriquecimento, já que alguns microrganismos não foram encontrados nos lixiviados brutos, que deram origem aos reatores. No caso dos metanogênicos, também foi visto que o uso de metanol propiciou abundância distinta de microrganismos daqueles reatores enriquecidos com acetato e formiato, sendo o único onde houve arqueias metanogênicas. E o reator MAHC 7.6, que iniciou como hidrolítico mas foi enriquecido com acetato, teve resultado similar aos metanogênicos.

A Figura 23 apresenta um gráfico geral de abundância das famílias identificadas em todos os reatores enriquecidos, onde visualiza-se que também existem diferenças entre reatores que receberam os mesmos substratos, como por exemplo os reatores HC 7.3 e HC 7.5; MM 7.1 e MM 7.2.

Figura 23 – Famílias identificadas em todos os reatores enriquecido



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 ANÁLISE DE BIOLOGIA MOLECULAR

O sequenciamento de DNA das amostras de lixiviados brutos, das cinco fases do aterro de São Leopoldo, em outubro e novembro de 2019, contabilizaram o total de 559.761 OTUs. Este resultado correspondeu na divisão em 27 filos, sendo 26 do domínio bactéria e 1 do domínio arqueia. O Quadro 7 apresenta a abundância dos filos no período estudado.

Quadro 7 – Abundância dos filos nas amostras de lixiviado bruto coletado nas 5 fases do aterro, nos dois meses em estudo

Filo	Abundância Outubro	Abundância Novembro
Euryarchaeota	0,41%	0,93%
Proteobacteria	34,97%	35,87%
Firmicutes	27,34%	26,98%
Bacteroidetes	9,24%	8,66%
Thermotogae	6,99%	5,61%
Lentisphaerae	5,08%	5,05%
Tenericutes	3,55%	3,67%
Deinococcus-Thermus	3,81%	2,61%
Actinobactéria	0,64%	1,87%
Synergistetes	1,25%	1,10%
Verrucomicrobia	0,95%	0,84%
Spirochaetes	0,64%	0,49%
Planctomycetes	0,50%	0,60%
Gemmatimonadetes	0,21%	0,24%
Chloroflexi	0,25%	0,13%
Armatimonadetes	0,06%	0,08%
Deferribacteres	0,02%	0,02%
Outros	4,14%	5,02%

Fonte: Elaborado pela autora.

Em oposto à classificação físico-química, que indicou que os lixiviados amostrados, e conseqüentemente, o aterro nas fases estudadas estavam nas fases ácida e metanogênica, os resultados de sequenciamento de DNA apresentaram apenas 0,68% do total como sendo do domínio Arqueia (fase metanogênica). Esta abundância é abaixo do que se esperava para o aterro, já que existe produção plena de biogás, nos meses de outubro, período quando, segundo a CRVR (CRVR, 2022) foi gerado uma média de 1.148m³/h, sendo 40% gás metano.

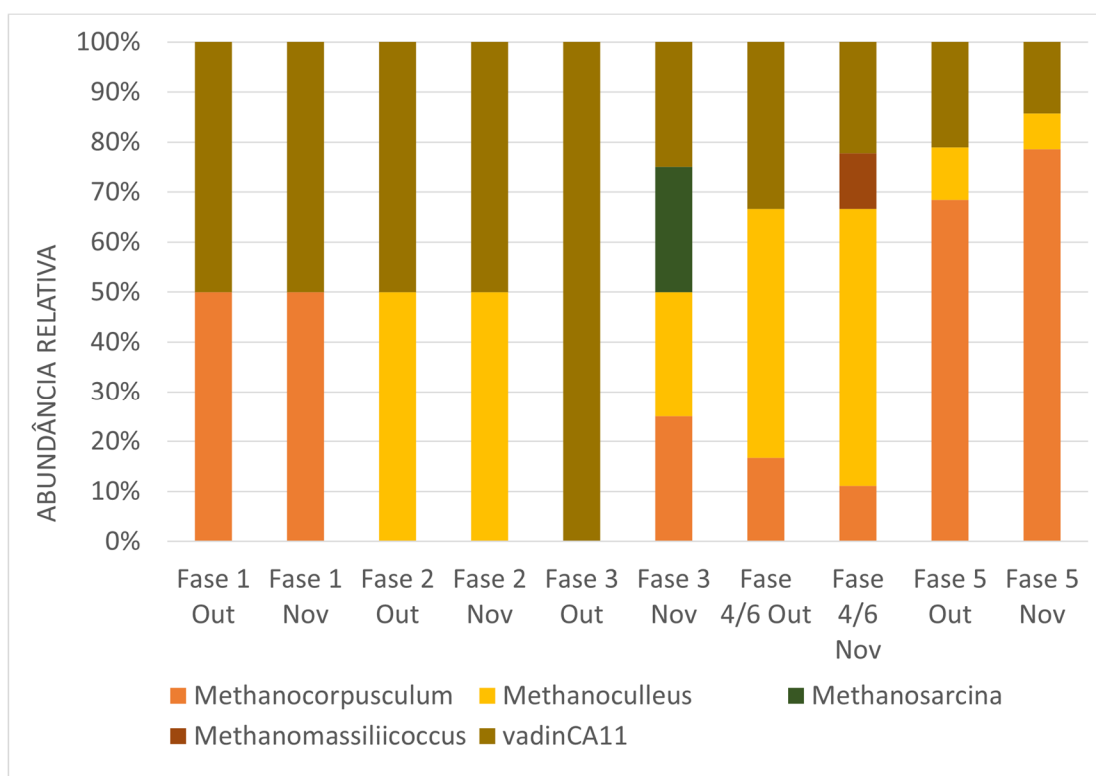
A diferença entre a abundância de bactérias e arqueias também foi verificada em outros trabalhos. No aterro estudado por Passarini *et al.* (2021), apenas 0,41% de

sequencias foram atribuídas ao domínio Arqueia. Stamps *et al.* (2016), que trabalhou com amostras de lixiviados de 19 aterros nos Estados Unidos, obteve de 0,8 a 4,35% de abundância para arqueias do total sequenciado. Os dois autores não apresentaram justificativa para tal diferença. Zainun e Simarani (2018) que analisaram sete amostras de solos de um lixão já encerrado e outro em atividade na Malásia, obtiveram de 0,01% a 9% de arqueias de seu sequenciamento, o maior percentual foi para o lixão mais jovem. Köchling *et al.* (2015) que estudaram os lixiviados de três pontos, com diferentes idades, de um aterro em Pernambuco, também encontraram baixa representatividade do domínio Arqueia, apenas 0,03% do total sequenciado, a maior parte da amostra mais antiga.

A hipótese de Köchling *et al.* (2015), é que os microrganismos ainda estariam se adaptando ao alto volume de matéria orgânica recebida, sendo jovens para oferecer um ambiente ótimo à população, já que outros trabalhos apresentaram abundância maior em aterros com pelo menos 10 anos de operação. Bahram *et al.* (2019) levantam a questão de que quando comparado com o Domínio Bactéria, o grupo de Arqueias geralmente apresenta uma pequena fração dos conjuntos de dados obtidos por meio de *barcoding* para procariontes, possivelmente em razão de incompatibilidade dos *primers* comumente utilizados. Já Sauk (2019), que utilizou tanto o método de *barcoding*, o mesmo trabalhado nessa pesquisa, quanto de metagenômica para analisar os lixiviados de um aterro no Canadá, apresentou perfis a nível de filo semelhantes, incluindo as arqueias.

O filo identificado no Domínio Arqueia foi Euryarchaeota, que, de acordo com Sekhohola-Dlamini e Tekere (2019) é o filo predominantemente encontrado em aterros, principalmente membros das ordens Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales. As ordens identificadas no presente estudo foram Methanomicrobiales, Methanosarcinales e Methanomassiliicoccales, esta última geralmente associada ao trato digestivo de animais e dificilmente encontrada em ecossistemas terrestres ou aquáticos. (COZANNET *et al.*, 2020). Respectivamente, as famílias foram Methanocorpusculaceae, Methanomicrobiaceae, Methanosarcinaceae e Methanomassiliicoccaceae. Os gêneros e sua abundância em relação ao filo estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Gêneros do domínio Arqueia



Fonte: Elaborado pela autora.

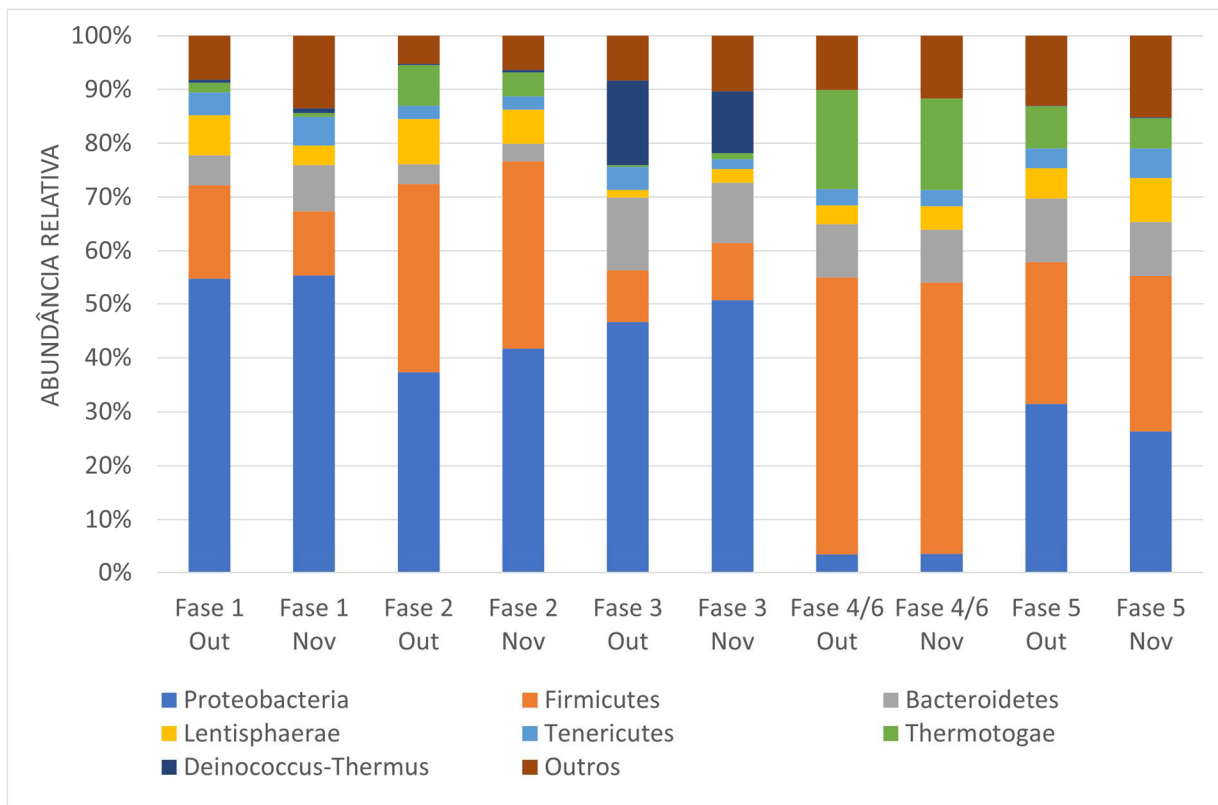
O gênero *Methanocorpusculum*, encontrado no lixiviado mais antigo do trabalho de Song *et al.* (2015), é hidrogenotrófico e teve expressiva abundância nas Fases 1 e 5, e também apareceu nas Fases 4/6 e 3 (novembro). O gênero *Methanoculleus*, que só não esteve presente na Fase 1 e 3 (outubro), são arqueias hidrogenotróficas e também foram identificadas no estudo de Song *et al.* (2015), Staley *et al.* (2018) e Passarini (2021).

O gênero *Methanosarcina*, presente na Fase 3 do mês de novembro também foi identificado por Passarini (2021) e Laloui-Carpentier *et al.* (2005), que estudaram os lixiviados de dois aterros na França. É um grupo acetoclástico e, segundo Buchrointer (2015), predominante em aterros jovens. O único gênero presente em todas as Fases, de todos os meses, principalmente nas Fases 1 e 3, não foi identificado (vadinCA11), mas pertence à família Methanomassiliicoccaceae, grupo de arqueias metilotróficas, a partir de hidrogênio e metilaminas ou metanol. Membro desta mesma família, o gênero *Methanomassiliicoccus*, foi identificado apenas na Fase 4/6 de novembro, e relatado pela primeira vez em estudo sobre aterros sanitários no trabalho de Staley *et al.* (2018).

No Domínio Bactéria, o filo Proteobactéria foi o mais expressivo, seguido por Firmicutes, Bacteroidetes, Thermotogae, Lentisphaerae, Tenericutes e Deinococcus-Thermus. Em menor proporção, foram identificados os filios Actinobactéria, Synergistetes, Verrucomicrobia, Spirochaetes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Chloroflexi, Armatimonadetes e Deferribacter. Há ainda uma porcentagem de bactérias de filios não identificados (denominado “Outros”), cerca de 4% em outubro e 5% em novembro, como os grupos chamados WWE1, OP9, SR1, OD1, WS1, NKB19 e WPS.

A Figura 25 apresenta os filios identificados em maior abundância em cada mês, por Fase do aterro.

Figura 25 – Filios identificados por mês e Fase



Fonte: Elaborado pela autora.

De uma maneira geral, as amostras apresentaram os mesmos filios identificados, com abundâncias peculiares em cada uma das Fases. Tais filios vão de encontro com o que diz Sekhohola-Dlamini e Tekere (2019), que afirmam, baseados em levantamento de pesquisas, que membros de Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes dominam as populações nos aterros. O autor também relata que a diversidade de microrganismos é predominantemente identificada a nível de filo, com

poucos estudos reportando composição de espécies, apesar das classificações intermediárias (como Classe, por exemplo) já fornecer um bom entendimento dos processos fisiológicos e ecológicos que acontecem no local.

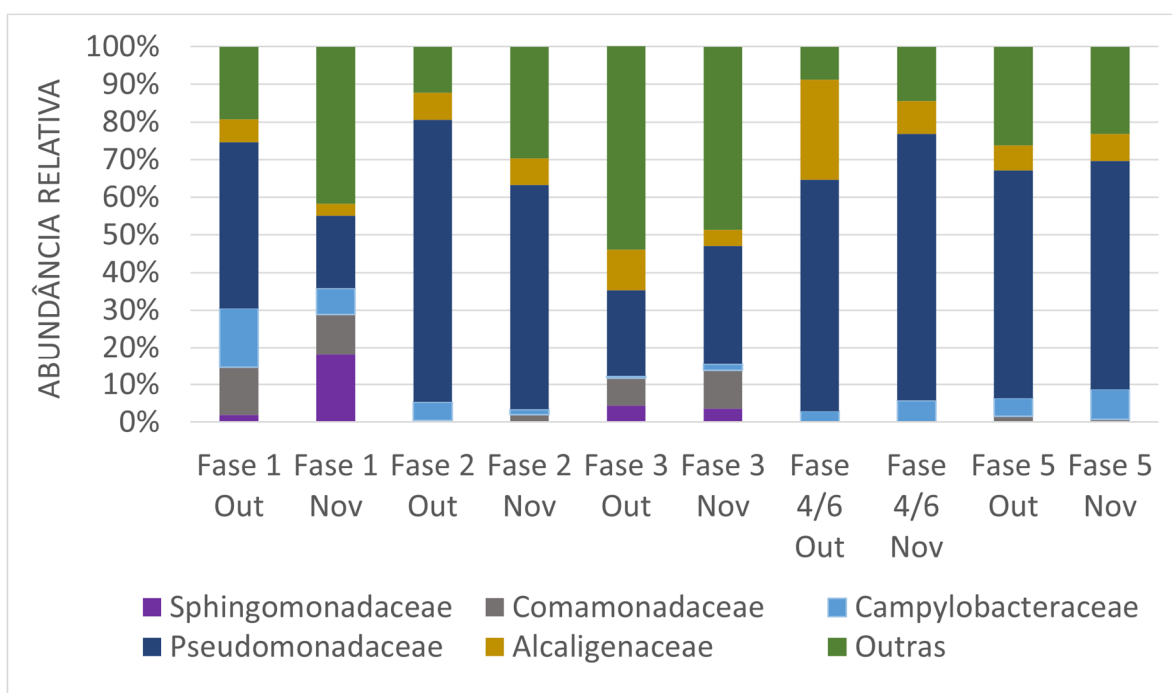
Nas Fases 1, 2 e 3, em outubro e novembro, e na Fase 5 de outubro, o grupo mais abundante foi de Proteobacteria, comumente predominante em amostras ambientais. Para Aires *et al.* (2020), que caracterizaram os microrganismos de RSU de diferentes idades em uma célula experimental, o filo com maior abundância também foi Proteobacteria. Os autores acreditam que este grupo pode representar uma função ecológica importante nos resíduos de difícil degradação. Nos dois lixões estudados por Zainun e Simarani (2018), o filo com maior abundância igualmente foi Proteobacteria, podendo indicar, segundo os autores, que esses microrganismos são protagonistas na degradação de substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo metais pesados. Santos (2010) também encontrou maior abundância de Proteobacteria em 4 dos 5 aterros estudados, segundo a autora, a aparente abundância e diversidade desse grupo, sugere que esses organismos podem desempenhar papel importante no processo de degradação dos resíduos.

Para Dao *et al.* (2016), que estudou os lixiviados brutos e de pós-tratamento em época chuvosa e de seca de um aterro no Vietnã, os filos predominantes foram Proteobacteria (10,6% a 71,2%), Firmicutes (2,2% a 43,4%) e Bacteroidetes (3,9% a 23,5%). Os autores relacionaram maior abundância de Proteobacterias quando os valores de Nitrogênio Total e Amoniacal reduziam no tratamento e quando o pH atingia entre 7 e 8,5. A sugestão de que esse grupo se desenvolve em ambientes neutros ou básicos poderia justificar também os resultados em São Leopoldo.

Zainun e Simarani (2018) constataram em seu estudo que no lixão ainda em atividade, a classe Gammaproteobacteria tinha população maior, enquanto no lixão antigo a classe de maior abundância foi Alphaproteobacteria. O que pode ser explicado pela capacidade que o último grupo tem em utilizar substratos complexos, presentes em áreas mais antigas. No aterro de São Leopoldo, exceto a Fase 1 de novembro, todas as fases nos dois meses apresentaram abundância maior de Gammaproteobacteria.

A Figura 26 apresenta as famílias com maior abundância no filo Proteobacteria, por mês analisado, aquelas de menor percentual estão somadas à categoria “outras”.

Figura 26 – Famílias do Filo Proteobacteria



Fonte: Elaborado pela autora.

É possível perceber que a mais abundante, em todas as Fases é a família Pseudomonadaceae, sendo *Pseudomonas* o único gênero identificado e presente em todas as amostras. As *Pseudomonas* são um grande grupo de espécies de bacilos gram-negativos, conhecido por metabolizar uma variedade de substratos, incluindo açúcares, aminoácidos, bem como hidrocarbonetos (AISLABIE, DESLIPPE, 2013). Utilizam xenobióticos como fontes de carbono e energia, sendo explorados em estudos sobre biorremediação de tais compostos. (STOLZ, BUSSE, KAMPFER, 2007, WANG *et al.*, 2017).

Outra família presente em todas as Fases do aterro foi Campylobacteraceae, com os gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Sulfurospirillum*. As espécies de *Arcobacter*, encontradas com maior abundância na Fase 1, se diferem das de *Campylobacter* pela capacidade de tolerar oxigênio, utiliza como fontes de carbono aminoácidos e ácidos orgânicos, podendo oxidar compostos sulfurados. Carboidratos não são fermentados nem oxidados pela bactéria (KJELDGAARD, JORGENSEN, INGMER, 2009), o que pode explicar sua maior presença na Fase mais antiga do aterro.

A família Alcaligenaceae também foi identificada em todas as fases, com os gêneros *Alcaligenes*, *Denitrobacter*, *Oligella* e *Sutterella*. A família

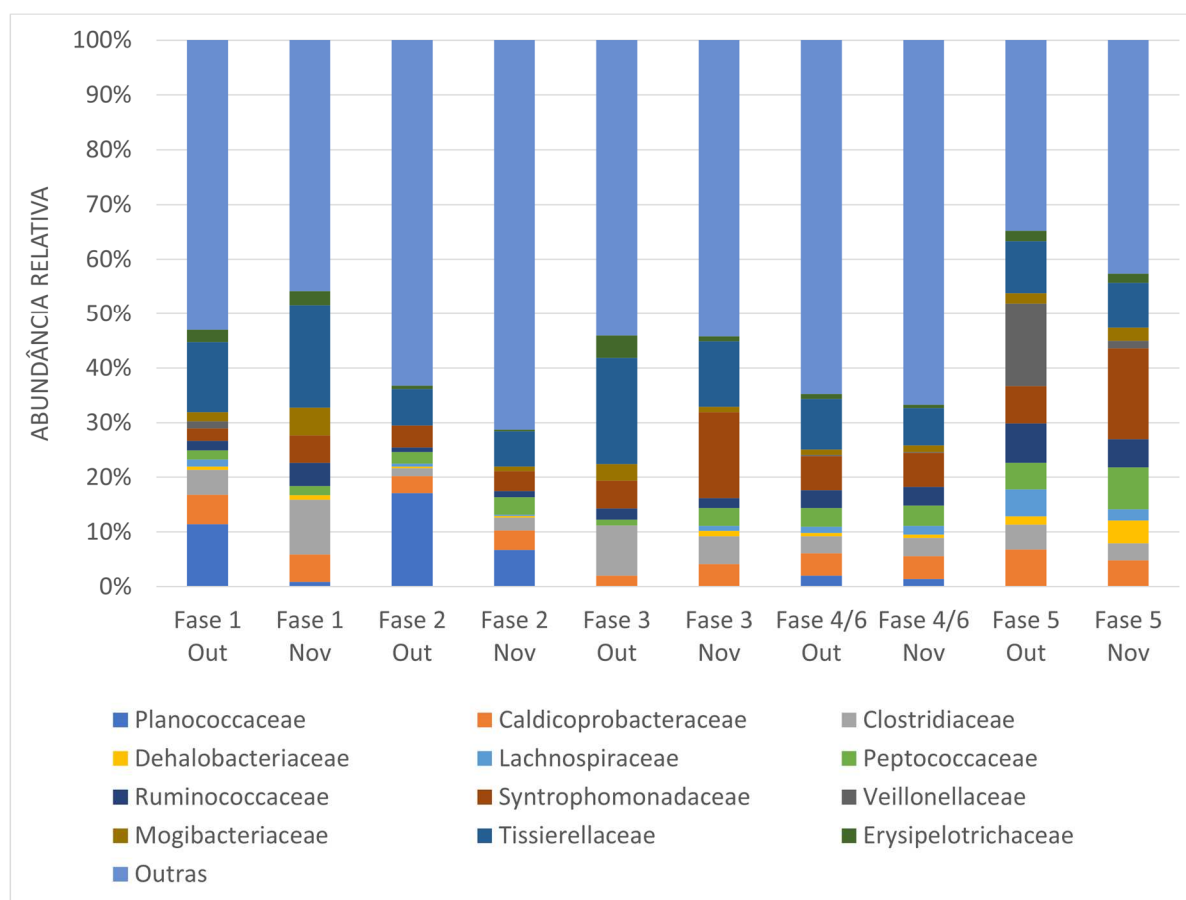
Sphingomonadaceae apareceu nas Fases 1, 2 e 3, sendo os gêneros *Kaistobacter*, *Novosphingobium*, *Sandaracinobacter*, *Sphingobium* e *Sphingopyxis*. E a família Comamonadaceae só não foi identificada na Fase 4/6, os gêneros foram *Comamonas* e *Hydrogenophaga*.

O filo mais abundante, nos meses de outubro e novembro, nas Fases 4/6 e no mês de novembro na Fase 5, foi Firmicutes. Conforme mencionado anteriormente, este filo tem relação na decomposição da celulose, os resíduos de papel no aterro de São Leopoldo, conforme a gravimetria, correspondem, em média, a 13% do total aterrado, mas a celulose pode corresponder até 50% (BARLAZ, SCHAEFER, HAM, 1989), se levado em consideração sua presença também misturada a outros resíduos.

Köchling *et al.* (2015) analisaram o lixiviado de três diferentes células de um aterro e todos tiveram em sua maioria o filo Firmicutes, com 53% na célula mais jovem, 58% na intermediária e 62% na célula mais antiga. Wang *et al.* (2017) realizaram a identificação de microrganismos presentes no solo, em diferentes profundidades, de um aterro de 16 anos na China, sendo Firmicutes o filo mais abundante (46,61%).

A classe Clostridia foi a mais abundante no filo Firmicutes, já as famílias foram de abundância semelhante, com baixo percentual para cada, nas 23 identificadas. A Figura 27 apresenta as famílias mais abundantes, aquelas de menor percentual estão somadas à categoria “outras”.

Figura 27 – Famílias do Filo Firmicutes



Fonte: Elaborado pela autora.

Nas Fases 1 e 2, as famílias mais abundantes foram Planococcaceae, que não apareceu nas Fases 3 e 5; e Tissierellaceae, que foi encontrada em todas as Fases. Os gêneros identificados foram *Sedimentibacter* e *Tepidimicrobium*, *Tissierella*, *Soehngenia*. Na Fase 4/6 a segunda maior abundância foi da família Syntrophomonadaceae, com o gênero *Syntrophomonas*, seguida pela família Caldicoprobacteraceae, com o gênero *Caldicoprobacter*. Na Fase 5 a maior abundância foi da família Veillonellaceae, no mês de outubro, com os gêneros *Acidaminococcus*, *Anaeromusa*, *Anaerovibrio*, *Dialister*, *Megasphaera*, *Mitsuokella* e *Veillonella*. As famílias Lactobacillaceae, Leuconostocaceae e Christensenellaceae foram identificadas apenas na Fase 5, e a família Eubacteriaceae apenas na Fase 2.

O segundo filo de maior abundância na Fase 4/6 foi Thermotogae, que é composto por bactérias termofílicas e mesofílicas, em forma de bastonetes cercadas por um envelope externo semelhante a uma bainha, chamada “toga”. A única família identificada foi Thermotogaceae, esses microrganismos metabolizam diversos carboidratos simples e complexos, produzindo hidrogênio como subproduto.

(BHANDARI, GUPTA, 2014). O segundo filo de maior abundância na Fase 3, foi *Deinococcus-Thermus* com a família *Trueperaceae*, grupo caracterizado por ser resistente a extrema radiação e dessecação, o que o tornou alvo de pesquisas sobre biorremediação de áreas contaminadas por radiação. (HO *et al.*, 2016).

O terceiro filo mais abundante na Fase 1 de novembro e 5 outubro e novembro foi *Bacteroidetes*, grupo de bactérias gram-negativas, conhecido pela sua capacidade hidrolítica e fermentativa, responsável pela degradação de proteínas e posterior fermentação de aminoácidos e acetato para microrganismos metanogênicos acetoclásticos. (Song *et al.*, 2015). A família mais abundante foi *Porphyromonadaceae*, com os gêneros identificados *Paludibacter* e *Parabacteroides*.

Na fase 1, no mês de outubro e Fase 2, outubro e novembro, o terceiro grupo mais abundante foi *Lentisphaerae*, com a família *Victivallaceae* e outras duas não identificadas. Segundo Hedlund *et al.* (2010), este filo é difícil de ser isolado, consiste em cocos quimiorganotróficos de células gram-negativas e sacarolíticas. O filo que apresentou abundância similar em todas as Fases foi *Tenericutes*, com a família identificada *Acholeplasmataceae*, gênero *Acholeplasma*, procariontes sem parede celular, com espécies saprotróficas e patogênicas.

No grupo classificado como "Outros", no gráfico da Figura 23, os filamentos encontrados em todas as Fases foram *Synergistetes* com os gêneros identificados *Aminobacterium* e *Anaerobaculum*, que são bactérias capazes de degradar substratos ricos em proteínas e que parecem estar associadas à etapa acidogênica. (NELSON, MORRISON, YU, 2011). O filo *Verrucomicrobia*, com as ordens identificadas *Pedosphaerales* e *Chthoniobacterales*, bactérias oligotróficas encontradas em locais como filtro biológico de tratamento de efluentes (CONNEL, 2014). O filo *Spirochaetes*, com o gênero identificado *Treponema*, grupo homoacetogênico, que consome hidrogênio e gás carbônico para produção de acetato (SANT'ANNA JR, 2010). E o filo *Planctomycetes*, bactérias que oxidam amônia, com a família identificada *Pirellulaceae*.

Ainda no grupo "Outros", também consta o filo *Actinobactéria*, encontrado apenas nas Fases 1, 2 e 3; com os gêneros identificados *Leucobacter*, *Salinibacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Aeromicrobium*. O filo *Chloroflexi* (família *Anaerolinaceae*), nas Fases 1 e 3; o filo *Armatimonadetes*, nas Fases 2, 4/6 e 5; o filo *Deferribacteres* (gênero *Flexistipes*), na Fase 2 no mês de outubro e na Fase 3 no mês de novembro; e o filo *Gemmatimonadetes*, identificado apenas na Fase 3.

Em relação aos filos e o tempo de aterramento dos resíduos, no trabalho de Song *et al.* (2015), os filos de maior abundância na fase mais jovem do aterro (4 meses) foram: Proteobactéria (59,6%), Firmicutes (21,3%) e Bacteroidetes (11,5%); na fase com maior tempo de aterramento (3 anos), os filos foram: Bacteroidetes (49,4%), Proteobacteria (39,9%) e Firmicutes (4,3%). Köchling *et al.* (2015), em seu trabalho, perceberam que a abundância de Firmicutes e Spirochaetes aumentou ao longo do tempo de aterramento, enquanto de Proteobactéria diminuiu, já para Bacteroidetes não houve aparente tendência de mudança por tempo de aterramento.

Embora os dois aterros sejam brasileiros, no presente trabalho, o comportamento foi oposto ao de Köchling *et al.* (2015), a maior abundância do filo Proteobacteria foi na fase de maior tempo de aterramento - Fase 1, enquanto a menor abundância foi na Fase 4/6, ainda em operação. O filo Firmicutes representou 51% de abundância na Fase 4/6 e apenas 14,74% na Fase 1. Sendo assim, comparando os três trabalhos, todos identificaram os mesmos filos (Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes), mas o fator idade (tempo de aterramento) representou abundâncias diferentes para cada um.

Em relação à análise a nível de gênero, os microrganismos de maior abundância na Fase 1, no mês de outubro, foram *Comamonas*, *Arcobacter* e *Marinobacterium*. No mês de novembro foram *Acholeplasma*, *Sphingobium*, *Arcobacter* e *Leucobacter*, sendo apenas *Arcobacter* comum aos dois meses. Nas Fases 2 e 3, nos dois meses, não houve identificação a nível de gênero. Na Fase 4/6 os gêneros identificados de maior abundância foram *Caldicoprobacter* e *Syntrophomonas*. E na Fase 5, foram *Arcobacter*, *Syntrophomonas* e *Acholeplasma*, todos do mês de novembro. O Quadro 8 apresenta uma relação de todos os gêneros com abundância acima de 2% do total.

Quadro 8 – Microrganismos de maior abundância em gênero

Fase/Mês	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Fase 1 (OUT)	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>
	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	<i>Marinobacterium</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>N.I.</i>
	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	<i>N.I.</i>
	Tenericutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma</i>
Fase 1 (NOV)	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i>
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>N.I.</i>
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	<i>N.I.</i>	<i>N.I.</i>
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Leucobacter</i>
Fase 2 (OUT)	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>N.I.</i>	<i>N.I.</i>	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>N.I.</i>	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	MBA08	<i>N.I.</i>	<i>N.I.</i>

	Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>S1</i>
	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	<i>N.I.</i>
Fase 2 (NOV)	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	N.I.	N.I.	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	MBA08	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	SHA-98	N.I.	<i>N.I.</i>
	Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>S1</i>
	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	<i>N.I.</i>
Fase 3 (OUT)	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	N.I.	N.I.	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>N.I.</i>
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>N.I.</i>
	Deinococcus-Thermus	Deinococcus-Thermus	Deinococcales	Trueperaceae	<i>B-42</i>
Fase 3 (NOV)	Proteobacteria	Betaproteobacteria	N.I.	N.I.	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>N.I.</i>

	Bacteroidetes	N.I.	N.I.	N.I.	<i>N.I.</i>
	Deinococcus-Thermus	Deinococcus-Thermus	Deinococcales	Trueperaceae	<i>B-42</i>
Fase 4/6 (OUT)	Firmicutes	Bacilli	N.I.	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Caldicoprobacteraceae	<i>Caldicoprobacter</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i>
	Firmicutes	Clostridia	MBA08	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	SHA-98	N.I.	<i>N.I.</i>
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>N.I.</i>
	Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>S1</i>
Fase 4/6 (NOV)	Firmicutes	Bacilli	N.I.	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Caldicoprobacteraceae	<i>Caldicoprobacter</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i>
	Firmicutes	Clostridia	MBA08	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	SHA-98	N.I.	<i>N.I.</i>
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>N.I.</i>
	Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>S1</i>
Fase 5 (OUT)	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	N.I.	N.I.	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	N.I.	<i>N.I.</i>

	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>N.I.</i>
	Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>S1</i>
	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	<i>N.I.</i>
	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Z20	R4-45B	<i>N.I.</i>
Fase 5 (NOV)	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	N.I.	N.I.	<i>N.I.</i>
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	EtOH8	<i>N.I.</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i>
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	N.I.	<i>N.I.</i>
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>N.I.</i>
	Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>S1</i>
	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	<i>N.I.</i>
	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Z20	R4-45B	<i>N.I.</i>
	Tenericutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma</i>

N.I.= Não Identificado

Fonte: Elaborado pela autora.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos lixiviados do aterro sanitário de São Leopoldo, separados por Fases, palavra iniciada com letra maiúscula neste trabalho para diferenciar a operação local e a etapa de digestão anaeróbia, concluiu que as fases de degradação não são explicitamente distintas conforme seu tempo de aterramento.

Os parâmetros físico-químicos demonstram condições mistas de degradação anaeróbia, ora com características de fase ácida, ora de fase metanogênica, impedindo a definição de apenas um estágio para cada Fase do aterro, o que pode ser explicado por se tratar de um aterro ainda em atividade. A simples comparação com os valores estabelecidos na literatura, por diversos autores, não é suficiente para a classificação dos lixiviados estudados.

O enriquecimento dos reatores, a partir de amostras de lixiviados de duas Fases, permitiu encontrar morfologias como cocos, sarcinas e bacilos, mas apenas o gênero *Methanosarcina* foi identificado visualmente, tendo como melhor resultado o uso de metanol.

O sequenciamento de DNA das amostras enriquecidas apresentou o filo Proteobacteria como o mais abundante nos reatores metanogênicos e, embora o esperado fosse maior abundância de arqueias, o resultado refletiu o resultado da amostra bruta daquela Fase. Novamente, o único grupo de arqueias foi encontrado no reator que foi enriquecido com metanol. O filo Bacteroidetes foi o mais abundante nos reatores hidrolíticos, seguido por Firmicutes, grupo mais abundante na amostra bruta daquela fase.

Cerca de 99% dos microrganismos identificados no sequenciamento de DNA das cinco Fases correspondem ao domínio bactéria. O filo Proteobacteria foi o mais abundante nas Fases 1, 2 e 3, em outubro e novembro, e na Fase 5 de outubro. O filo Firmicutes foi o mais abundante nas Fases 4/6, nos dois meses, e na Fase 5 em novembro. Podendo-se dizer que no aterro de São Leopoldo, em geral, o grupo Proteobacteria representa o lixiviado mais antigo e Firmicutes o mais recente. Figurou também entre os filios de maior abundância, em terceiro lugar, Thermotogae e Bacteroidetes.

A abundância do domínio arqueia foi menor do que o esperado, mas coincidiu com outros estudos da área. O filo Euryarchaeota foi identificado em todas as Fases,

com as famílias Methanocorpusculaceae, Methanomicrobiaceae, Methanosarcinaceae e Methanomassiliicoccaceae.

O presente trabalho é o primeiro realizado com análise de biologia molecular no aterro de São Leopoldo, podendo contribuir com as demais pesquisas para otimização das operações no local. Como sugestão, poderia ser incluído nas amostragens o ponto de junção dos lixiviados (lagoa), para que houvesse uma comparação entre os resultados por Fase e misturado na entrada do sistema de tratamento. A microbiota do aterro poderia ser analisada também por meio do uso de técnica metagenômica, principalmente para verificar a composição de arqueias.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, T.; TAUSEEF, S.M.; ABBASI, S.A. (2012) Biogas and Biogas Energy: An Introduction. In: Biogas Energy. SpringerBriefs in Environmental Science, vol 2. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1040-9_1
- AIRES, K.O.; DANTAS, G.R.; MELO, M.C.; OLIVEIRA, R.; MONTEIRO, V.E.D. Diversidade bacteriana associada à biodegradação de resíduos sólidos urbanos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.25, p.715-726, 2020.
- AISLABIE, J.; DESLIPPE, J.R.; DYMOND, J. Soil microbes and their contribution to soil services. In: DYMOND, J. (ed.). **Ecosystem Services in New Zealand: Conditions and Trends**. 1. Ed. Lincoln: Manaaki Whenua Press, 2013. p.143-161.
- ALAIN, K.; QUERELLOU, J. Cultivating the uncultured: Limits, advances and future challenges. **Extremophiles**, v.13, p.583-594, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0261-3>. Acesso em 15 ago. 2019.
- ALCÂNTARA, P. B. **Avaliação da influência da composição de resíduos sólidos urbanos no comportamento de aterros simulados**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2007, 366f.
- ALFAIA, R.G.S.M., COSTA, A.M., CAMPOS, J.C. Municipal solid waste in Brazil: a review. **Waste Management and Research**, v.35, p.1195-1209, 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1177/0734242X17735375>. Acesso em: 28 ago. 2019.
- ALMEIDA, M.V.A. Comportamento biodegradativo do aterro sanitário em Campina Grande – PB em função dos subprodutos gerados. Tese (Doutorado em Recursos Naturais), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2020, 154f.
- ALMEIDA, O.G.G., MARTINIS, E.C.P. Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, p.69-82, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9464-9>. Acesso em: 1 set. 2019.
- AL SEADI, T. A.; RUTZ, D.; PRASSL, H.; KÖTTNER, M.; FINSTERWALDER, T.; VOLK, S.; JANSSEN, J. **Biogas Handbook**. Esbjerg: University of Southern Denmark Esbjerg, 2008. *E-book*. Disponível em: <https://www.lemvigbiogas.com/BiogasHandbook.pdf>. Acesso em: 1 set. 2019.
- ANDERSON, K.; SALLIS, P.; UYANIK, S. Anaerobic treatment process. In: MARA, D.; HORAN, N. (Ed.). **The handbook of wastewater microbiology**. 1. Ed. Londres: Academic Press, 2003. p. 99-103
- ANTUNES, L.P. **Metagenômica e metatranscritômica da microbiota da compostagem do parque zoológico de São Paulo**. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2016, 106f.

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23. ed.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC. São Paulo: Pharmabooks, 2017, 1496 f.

ARAUJO, A.C.V. **Diversidade molecular de arqueias em sedimentos de rios da Amazônia e caracterização de espécies metanogênicas cultivadas**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo/Instituto Butantan, São Paulo, 2010, 123f.

ARAUJO, L.G.S.; FERREIRA, R.P.S.; NORBERTO, A.S.; MARIANO, M.O.H.; CALLADO, N.H. Temporal analysis of environmental parameters of the leachate from the landfill in Maceio-AL, Brazil. **Research, Society and Development**, v9, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/4435>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ARAUJO NETO, C. L. de. **Análise do Comportamento dos Resíduos Sólidos Urbanos e Desenvolvimento de Modelos Estatísticos para Previsão das Deformações de Aterros Sanitários**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2016, 163f.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR 8419**: Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos. Rio de Janeiro: ABNT, 1992.

BAHRAM, M.; ANSLAN, S.; HILDEBRAND, F.; BORK, P.; TEDERSOO, L. Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify diverse and novel archaeal taxa from the environment. **Environmental Microbiology Reports**, v.11, p.487-494, 2019. DOI: 10.1111/1758-2229.12684

BARLAZ, M.A.; SCHAEFER, D.M.; HAM, R.K. Bacterial population development and chemical characteristics of refuse decomposition in a simulated sanitary landfill. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.55-65, 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184054/>. Acesso em 1 jun. 2019.

BHATT, A.H., KARANJEKAR, R.V., ALTOUQI, S., SATTTLER, M.L., HOSSAIN, M.D.S., CHEN, V.P. Estimating landfill leachate BOD and COD based on rainfall, ambient temperature, and waste composition: Exploration of a MARS statistical approach. **Environmental Technology and Innovation**, v.8, p.1-16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.03.003>. Acesso em: 24 ago. 2019.

BHANDARI, V.; GUPTA, R.S. The Phylum Thermotogae. *In*: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds). *The Prokaryotes*. 4. Ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 989-1015.

BIDONE, F. R. A.; POVINELLI, J. **Conceitos básicos de resíduos sólidos**. 1ed. São Carlos: EESC/USP, 1999.

BRÁS, I., FERREIRA, B.S., SILVA, M.E. Avaliação do efeito da recirculação de lixiviados num aterro sanitário. **Millenium**, v.2, p.107-117, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.29352/mill0202e.09>. Acesso: 9 maio 2019.

BRASIL. Ministério das Cidades, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. **Diagnóstico do Manejo de Resíduos Sólidos Urbanos 2019**. Brasília, Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento - SNIS, 2020. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-anual-residuos-solidos/diagnostico-do-manejo-de-residuos-solidos-urbanos-2019>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BRASIL. **Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010**. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Brasília, DF: Presidência da República, 2009. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=636>. Acesso em: 4 mar. 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº358**, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos de serviço de saúde e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, 2009. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=462>. Acesso em: 10 set. 2019.

BUTT, T.E, GOUDA, H.M., BALOCH, M.I., PAUL, P., JAVADI, A.A., ALAM, A. Literature review of baseline study for risk analysis - The landfill leachate case. **Environment International**, v.63, p.149-162, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.09.015>. Acesso em: 4 set. 2019.

BUCHROITHNER, D. **Microbiology of landfill sites: review of the present state of knowledge with particular focus on the carbon cycle**. Tese (Doutorado em Engenharia), Vienna University of Technology, Vienna, 2015, 107f.

CALLAHAN, B.; McMURDIE, P.J.; ROSEN, M.J.; HAN, A.W.; JOHNSON, A.J.; HOLMES, S.P. DADA2: High Resolution Sample Inference from Amplicon Data. **Nature Methods**, v.13, p.581-583, 2016.

CALLI, B.; MERTOGLU, B.; INANC, B. Landfill leachate management in Istanbul: applications and alternatives. **Chemosphere**, v.59, p.819-829. DOI: [doi:10.1016/j.chemosphere.2004](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004).

CAMPUZANO, R., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. **Waste Management**, v.54, p.3-12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>. Acesso em: 28 ago. 2019.

CARNEIRO, P.H. **Efeito da adição de lodo ao inóculo de reator anaeróbio híbrido sólido-líquido tratando fração orgânica de resíduos sólidos urbanos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005, 135f.

CASTILHOS JÚNIOR, A.B.; MEDEIROS, P.A.; FIRTA, I.N.; LUPATINI, G.; SILVA, J.D. *In*: CASTILHOS JÚNIOR, A.B. (Coord.). **Principais processos de degradação de Resíduos Sólidos Urbanos**. 1.ed. Rio de Janeiro: ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2003, p.19-50.

CHAKMA, S.; MATHUR, S. Modeling gas generation for landfill. **Environmental Technology**, v.38, p.1435-1442, 2016. DOI: 10.1080/09593330.2016.1231

CHERNICARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores Anaeróbios**. 2.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFMG, 1997.

CHRISTENSEN, T.H., KJELDSSEN, P., BJERG, P.L., JENSEN, D.L., CHRISTENSEN, J.B., BAUN, A., ALBRECHTSEN, H.J., HERON, G. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. **Applied Geochemistry**, v.16, p.659-718, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(00\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(00)00082-2). Acesso em: 5 maio 2019.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; McGARREL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acid Research**, v.37, D141-D145, 2009.

COMPANHIA RIOGRANDENSE DE VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS (CRVR). **Central de tratamento de resíduos de São Leopoldo**. São Leopoldo, 2019. Disponível em: <http://crvr.com.br/area-de-atuacao/central-de-tratamento-de-residuos-de-sao-leopoldo/>. Acesso em: 15 mar. 2019.

_____. **Planilhas de recebimento de resíduos no aterro sanitário e operação das fases**. São Leopoldo, 2019b. Documento de uso exclusivo do setor de Meio Ambiente da empresa.

_____. **Licença de Operação Nº2408/2021**. São Leopoldo, 2019c. Documento de uso do setor de Meio Ambiente da empresa e disponível no site FEPAM-RS.

_____. **Controle de geração de biogás (outubro e novembro de 2019)**. São Leopoldo, 2022. Documento de uso exclusivo do setor de Meio Ambiente da empresa.

CONNEL, E.F.A. **Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbio**. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014, 159f.

COSTA, M.M. **Caracterização de Archaea cultivadas a partir de amostras de água doce de um aquário**. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana), Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2018, 72f.

COSTA, A.M., ALFAIA, R.G.S.M., CAMPOS, J.C. Landfill leachate treatment in Brazil – An overview. **Journal of Environmental Management**, v.232, p.110-116, 2019. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.006>. Acesso em: 1 jun. 2019.

COZANNET, M.; BORREL, G.; ROUSSEL, E.; MOALIC, Y.; ALLIOUX, M.; SANVOISIN, A.; TOFFIN, L.; ALAIN, K. New insights into the ecology and physiology of *Methanomassiliicoccales* from terrestrial and aquatic environments. **Microorganisms**, v.9, p.1-30, 2020.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O.E. Volatile acids by direct trititation. **Journal of water pollution control federation**, v.33, 356-365, 1961.

DAO, H.T.N.; NAKAHARA, N.; DANSHITA, T.; HATAMOTO, M.; YAMAGUCHI, T. 16S Rrna gene-based comprehensive analysis of microbial community compositions in a full-scale leachate treatment system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.122, p,708-715, 2016. DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.06.00

DUAN, J.; LIANG, J.; WANG, Y.; DU, W.; WANG, D. Kraft lignin biodegradation by *Dysgonomonas* sp. WJDL-Y1, a new anaerobic bacterial strain isolated from sludge of a pulp and paper mill. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.1765-1773, 2016. Doi: 10.4014/jmb.1602.02014.

EDUARDO, J. **Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas do lixiviado (chorume) no processo de tratamento do Aterro Metropolitano de Gramacho (RJ-Brasil)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2007, 98 f.

EHRIG, H.J. Quality and quantity of sanitary landfill leachate. **Waste Management & Research**, v.1, p.53-68, 1983.

_____. Leachate quality. In: CHRISTENSEN, T.H.; COSSU, R.; STEGMANN, R. (Eds.). **Sanitary landfilling: process, technology and environmental impact**. London: Academic Press, 1989. Cap. 4.2., p.213-229.

EL-FADEL, M.; BOU-ZEID, E.; CHAHINE, W.; ALAYLI, B. Temporal variation of leachate quality from pre-sorted and baled municipal solid waste with high organic and moisture content. **Waste Management**, v.22, p.269-282, 2002. Doi: 10.1016/s0956-053x(01)0004.

ELOE-FADROSH, E.A.; IVANOVA, N.N.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N.C. Metagenomics uncovers gaps in amplicon-based detection of microbial diversity. **Nature Microbiology**, v.1, p.1-4, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.32>. Acesso em: 30 ago. 2019

FARMER, T.D.; SHAW, P.J.; WILLIAMS, I.D. Destined for indecision? A critical analysis of waste management practices in England from 1996 to 2013. **Waste Management**, v. 39, p. 266-276, 2015. Doi: 10.1016/j.wasman.2015.02.023.

FARQUHAR, G.J. Leachate: production and characterization. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v.16, p.317-325, 1989. DOI: 10.1139/l89-057.

FARQUHAR, G. J., ROVERS, F.A. Gas production during refuse decomposition. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.2, p.483-495, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00585092>. Acesso em: 20 abr. 2019.

FEI, X., ZEKOS, D., RASKIN, L. An experimental setup for simultaneous physical, geotechnical, and biochemical characterization of municipal solid waste undergoing biodegradation in the laboratory. **Geotechnical Testing Journal**, v.37, p.1-12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1520/GTJ20130084>. Acesso em: 29 ago. 2019.

FENG, S.J., LU, S.F., CHEN, H.X., FU, W.D., LÜ, F. Three-dimensional modelling of coupled leachate and gas flow in bioreactor landfills. **Computers and Geotechnics**, v.84, p.138-151, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compgeo.2016.11.024>. Acesso em: 2 jun. 2019.

FERREIRA, A.G. **Estudo dos lixiviados das frações do aterro sanitário de São Carlos – SP por meio da caracterização físico-química**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010, 152 f.

GAO, J.; OLOIBIRI, V.; CHYS, M.; AUDENAERT, W.; DECOSTERE, B.; HE, Y.; LANGENHOVE, H.V.; DEMEESTERE, K.; VAN HULLE, S.W.H. The present status of landfill leachate treatment and its development trend from a technological point of view. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.14, p.93-122, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9349-z>. Acesso em 1 ago. 2019.

GARZA, D.R.; DUTILH, B. From cultured to uncultured genome sequences : metagenomics and modeling microbial ecosystems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.72, p.4287-4308, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2004-1>. Acesso em: 1 ago. 2019.

GERARDI, M.H. **Wastewater bacteria**. 1.ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006.

GHESLA, P.L.; GOMES, L.P.; CAETANO, M.O.; MIRANDA, L.A.S.; DAI-PRÁ, L.B. Municipal Solid Waste Management from the experience of São Leopoldo/Brazil and Zurich/Switzerland. **Sustainability**, v.10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su10103716>. Acesso em: 01 jan. 2020.

GIORDANO, G.; BARBOSA FILHO, O.; CARVALHO, R.J. **Processos físico-químicos para tratamento do chorume de aterro de resíduos sólidos urbanos**. 1ed, volume 4. Rio de Janeiro: COAMB/FEN/UERJ, 2011.

GOMES, L.P. **Avaliação da atividade bacteriana anaerobia celulolítica do chorume originado em sistemas de disposição de resíduos sólidos urbanos a céu aberto**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995, 210 f.

GOMES, N.A.; ALMEIDA, M.V.A.; MELO, M.C.; MONTEIRO, V.E.D.; OLIVEIRA, R. Influência de parâmetros físico-químicos na composição de constituintes tóxicos em lixiviado de aterro sanitário. **Revista Matéria**, v.23, 2018. Disponível em:

<https://revistas.ufrj.br/index.php/rm/article/view/22373/12446>. Acesso em: 1 dez. 2021.

GÓMEZ, M.; CORONA, F.; HIDALGO, M.D. Variations in the properties of leachate according to the landfill age. **Desalination and Water Treatment**, v.159, p.24-31, 2019. Disponível em: https://www.deswater.com/DWT_articles/vol_159_papers/159_2019_24.pdf. Acesso em: 10 jan. 2022.

GOOGLE Maps. Mountain View: Google, 2019. Disponível em: <https://goo.gl/maps/62gnJT9BbYmVmFK9>. Acesso em: 11 set. 2019.

GOUY, R.; BAURAIN, D.; PHILIPPE, H. Rooting the tree of life: The phylogenetic jury is still out. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.370, p.1-12, 2015. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0329>. Acesso em: 1 set. 2019.

GUPTA, R.S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, 367-402, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00547.x>. Acesso em: 20 nov. 2021

GUPTA, A., PAULRAJ, R. Leachate composition and toxicity assessment: an integrated approach correlating physicochemical parameters and toxicity of leachates from MSW landfill in Delhi. **Environmental Technology**, v.38, p.1599-1605, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1080/09593330.2016.1238515>. Acesso em: 20 maio 2019.

HANDELSMAN, J. Metagenomics application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, p.669-685, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>. Acesso em: 1 set. 2019.

HELDUND, B.P.; CHO, J.C.; DERRIEN, M.; COSTA, K.C. Phylum XXII, Lentisphaerae. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, second ed. Springer, New York, NY, 2010. pp.785–787.

HIRAOKA, S.; YANG, C.C; IWASAKI, W. Metagenomics and bioinformatics in microbial ecology: current status and beyond. **Microbes and Environments**, v.31, p.204-212, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME16024>. Acesso em: 1 set. 2019.

HO, J.; ADEOLU, M.; KHADKA, B.; GUPTA, R.S. Identification of distinctive molecular traits that are characteristic of phylum “Deinococcus-Thermus” and distinguish its main constituent groups. **Systematic and applied microbiology**, v.39, p. 453-463, 2016. Doi:10.1016/j.syapm

HOAI, S.; NGUYEN LAN, H.; THI VIET, N.T., NGUYEN HOANG, G.; KAWAMOTO, K. Characterizing Seasonal Variation in Landfill Leachate Using Leachate Pollution Index

(LPI) at Nam Son Solid Waste Landfill in Hanoi, Vietnam. **Environments**, v.8, 2021. DOI: 10.3390/environments803001

HUG, L.; BAKER, B.J.; ANANTHARAMAN, K.; BROWN, C.; PROBST, A.; CASTELLE, C.J.; BUTTERFIELD, C.N.; HERNSDORF, A.W.; AMANO, Y.; ISE, K.; SUZUKI, Y.; DUDEK, N.; RELMAN, D.A.; FINSTAD, K.M.; AMUNDSON, R.; THOMAS, B.; BANFIELD, J.F. A new view of the tree of life. **Nature Microbiology**, v.1, p.1-6, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>. Acesso em: 30 jul. 2019.

IDOWU, I., ATHERTON, W., HASHIM, K., KOT, P., ALKHADDAR, R., ALO, B.I., SHAW, A. An analyses of the status of landfill classification systems in developing countries: Sub Saharan Africa landfill experiences. **Waste Management**, v.87, p.761–771, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.011>. Acesso em: 10 jul. 2019.

IWAI, C. **Tratamento de chorume através de percolação em solos empregados como material de cobertura de aterros para resíduos sólidos urbanos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial), Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2005, 222f.

KAZA, S., YAO, L., BHADA-TATA, P., WOERDEN, F.V. **What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050**. Washington: World Bank, 2018. E-book. Disponível em: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317> License: CC BY 3.0 IGO. Acesso em: 4 jul. 2019.

KHANAL, S.K. **Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications**. ISBN-13: 978-0-8138-2346-1 Wiley-Blackwell, 2009.

KJELDGAARD, J.; JORGENSEN, K.; INGMER, H. Grow and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p.297-259, 2009. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009

KJELDSSEN, P.; BARLAZ, M. A.; ROOKER, A. P.; BAUN, A.; LEDIN, A.; CHRISTENSEN, T. H. Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 297–336, out. 2002.

KÖCHLING, T.; SANZ, J.L.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L. Analysis of microbial community structure and composition in leachates from a young landfill by 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.5657-5668. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6409-4>. Acesso em 27 ago. 2019.

LALLOUI-CARPENTIER, W.; LI, T.; VIGNERON, V.; MAZÉAS, L.; BOUCHEZ, T. Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.89, p.423-434, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9051-9>. Acesso em: 27 ago. 2019.

LANGE, L. C.; AMARAL, M. C. S. Geração e Características do Lixiviado. *In*: GOMES, L. P. (Coord.). **Resíduos Sólidos: Estudos de Caracterização e Tratabilidade de Lixiviados de Aterros Sanitários para as Condições Brasileiras**. 1. ed. Rio de Janeiro: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2009. p. 26–59.

LEITE, V.D.; FERNANDES, F.; JUCÁ, J.F.T.; GOMES, L.P.; LOPES, W.S.; SOUSA, J.T.; SILVA, F.M.S.; CAETANO, M.O. Estudo do processo de stripping de amônia de lixiviado de aterro sanitário. *In*: GOMES, L. P. (Coord.). **Resíduos Sólidos: Estudos de Caracterização e Tratabilidade de Lixiviados de Aterros Sanitários para as Condições Brasileiras**. 1. ed. Rio de Janeiro: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2009. p. 26–59.

LIU, J., WU, W., CHEN, C., SUN, F., CHEN, Y. Prokaryotic diversity, composition structure, and phylogenetic analysis of microbial communities in leachate sediment ecosystems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.91, p.1659-1675, 2011. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3354-8>. Acesso em: 2 ago. 2019.

LIU, C.; YUAN, X.; ZENG, G. Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Bioresource Technology**, v.99, p.882-888, 2008.

LOCEY, K., LENNON, J. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.113, p.5970-5975, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1521291113>. Acesso em: 1 set. 2019.

LUO, H.; ZENG, Y., CHENG, Y., HE, D.; PAN, X. Recent advances in municipal landfill leachate: a review focusing on its characteristics, treatment, and toxicity assessment. **Science of Total Environment**, v.703., 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019

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

MANNARINO, C.F.; FERREIRA, J.A.; GANDOLLA, M. Contribuições para a evolução do gerenciamento de resíduos sólidos urbanos no Brasil com base na experiência Européia. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.21, p. 379-385. DOI: 10.1590/s1413-415220161464

MATSAKAS, L.; GAO, Q.; JANSSON, S.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. Green conversion of municipal solid wastes into fuels and chemicals. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.26, p.69-83, 2017. DOI: 10.1016/j.ejbt.2017.01.004

McBEAN, E. A.; ROVERS, F. A.; FARQUHAR, G. J. **Solid Waste Landfill Engineering and Design**. Prentice Hall, 1995.

McMURDIE, P.J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS One**, v.8, p. e61217, 2013.

METCALF, L.; EDDY, H.P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

MEYER-DOMBARD, D.R.; BOGNER, J.E.; MALAS, J. A review of landfill microbiology and ecology: a call for modernization with 'next generation' technology. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01127>

MIGUEL, M.G., PAIXÃO FILHO, J.L., BENATTI, J.C.B., LEME, M.A.G. Gravimetric composition of municipal solid waste disposed in a large-scale experimental cell in Southeastern Brazil. **International Journal of Environment and Waste Management**, v.17, p.128-145, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1504/IJEWM.2016.076758>. Acesso em: 29 ago. 2019.

MOJIRI, A.; AZIZ, H.A.; ZAMAN, N.Q.; AZIZ, S.Q.; ZAHED, M.A. Metals removal from municipal landfill leachate and wastewater using asorbents combined with biological method. **Desalination and Water Treatment**, v.57, p.2819-2833, 2014. DOI: 10.1080/19443994.2014.98318.

MONTEIRO, J.H.P. *et al.* **Manual de Gerenciamento Integrado de Resíduos Sólidos**. 15. ed. Rio de Janeiro: IBAM, 2001. E-book. Disponível em: <http://197.249.65.74:8080/biblioteca/bitstream/123456789/573/1/manual.pdf>. Acesso em 5 abr. 2019.

MONTEIRO, V.E.D., MELO, M.C., JUCÁ, J.F.T. Biological degradation analysis in Muribeca solid waste landfill associated with local climate - Recife, Brazil. *In*: 4th INTERNATIONAL CONGRESS ON ENVIRONMENTAL GEOTECHNICS, 2002, Rio de Janeiro.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2006. E-book disponível em: http://www.esalq.usp.br/departamentos/lso/arquivos_aula/LSO_400%20Livro%20-%20Microbiologia%20e%20bioquimica%20do%20solo.pdf. Acesso em 10 nov. 2021.

OSPANBAYEVA, A.; WANG, S. Cost-benefit analysis of rehabilitating old landfills: a case of Beiyangqiao landfill, Wuhan, China. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 70, p. 522-531, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/10962247.2020.1744488>.

NAVEEN, B.P.; MAHAPATRA, D.M.; SITHARAM, T.G.; SIVAPULLAIAH, P.V.; RAMACHANDRA, T.V. Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate. **Environmental Pollution**, v.220, p.1-12, 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.002>. Acesso em: 20 maio 2019.

NAKAYAMA, C.R. **Degradação anaeróbia da pentaclorofenol (PCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCP) e 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do Sistema Estuarino Santos e São Vicente**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005, 187 f.

NAKAYAMA, C.R; PENTEADO, E.D.; DUARTE, R.T.D.; GIACHINI, A.J.; SAIA, F.T. Improved Methanogenic Communities for Biogas Production. *In: TREICHEL, H.; FONGARO, G., (Coord.). Technological Challenges, Alternatives Sources, Future Developments*, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-10516-7_4. Acesso em 1 jul. 2019.

NELSON, M.C.; MORRISON, M.; YU, Z. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, v.102, p.3730-3739, 2011.

NESME, J. CHOUAK, W.; AGATHOS, S.; BAILEY, M.; BALDRIAN, P.; BRUNEL, D.; FROSTGARD, A.; HEULIN, T.; JANSSON, J.; JURKEVITCH, E.; KRUIUS, K.; KOWALCHUK, G.; LAGARES, A.; LAPPIN-SCOTT, H.; LEMANCEAU, P.; LE PASLIER, D.; MANDIC-MULEC, I.; MURRELL, J.; MYROLD, D.; NALIN, R.; NANNIPIERI, P.; NEUFELD, J.; O'GARA, F.; PARNELL, J.; PÜHLER, A.; PYLRO, V.; RAMOS, J.; ROESCH, L.; SCHLOTER, M.; SCHLEPER, C.; SCZYRBA, A.; SESSITSCH, A.; SJÖLING, S.; SORENSEN, J.; SORENSEN, S.; TEBBE, C.; TOPP, E.; TSIAMIS, G.; VAN ELSAS, J.; VAN KEULEN, G.; WIDMER, F.; WAGNER, M.; ZHANG, T.; ZHANG, X.; ZHAO, L.; ZHU, Y.; VOGEL, T.; SIMONET, P. Back to the future of soil metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, v.7, p.1-5, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00073>. Acesso em: 20 ago. 2019.

OLES, A. **BiocStyle: Standard styles for vignettes and other Bioconductor documents**. R package version 2.22.0 (2021). Disponível em: <https://github.com/Bioconductor/BiocStyle>.

OSPANBAYEVA, A.; WANG, S. Cost-benefit analysis of rehabilitating old landfills: A case of Beiyangqiao landfill, Wuhan, China. *Journal of the Air & Waste Management Association*, v.70, p. 522-531. DOI: 10.1080/10962247.2020.1744

OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G.A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPOULOS, I. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9, 2015. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4137/BBI.S12462>. Acesso em: 29 jun. 2019.

PASSARINI, M.; MOREIRA, J.; GOMEZ, J.A.; BONUGLI-SANTOS, R.C. DNA Metabarcoding of the leachate microbiota from sanitary landfill: potential for bioremediation process. *Archives of Microbiology*, v.203, p.4847-4858, 2021. DOI: 10.21203/rs.3.rs-170197/v1.

PAZINATO, J.M. **Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental**. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2007, 187f.

POHLAND, F.; HARPER, S. **Critical review and summary of leachate and gas production from landfills**. Washington: EPA, 1985. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/20007KHC.PDF?Dockey=20007KHC.PDF>. Acesso em: 04 out. 2021.

QUINTAES, B.R.; CAMPOS, J.C.; MIGUEL, M.A.L.; LEITE, A.M.O.; HINOJOSA, M.A.G. Uso de Ferramentas Moleculares para Estudos de Comunidades Microbianas em Lixiviado de Aterro de Resíduos Sólidos Urbanos. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n.31, p.30-43, 2014. Disponível em: http://rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes_RBCIAMB/article/view/257. Acesso em: 20 abr. 2019.

RANJAN, R.; RANI, A.; METWALLY, A.; McGEE, H.S.; PERKINS, D.L. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.469, p.967-977, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083>. Acesso em: 1 set. 2019.

RASHID, M.; STINGL, U. Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.33, p.1755-1773, 2015. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.09.005>. Acesso em: 30 ago. 2019.

RENOU, S.; GIVAUDAN, J. G.; POULAIN, S.; DIRASSOUYAN, F.; MOULIN, P. Landfill leachate treatment: Review and opportunity. **Journal of Hazardous Materials**, v.150, p.468-493, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.077>. Acesso em: 20 abr. 2019.

RIBEIRO, L.S.; GOMES, N.A.; ALMEIDA, M.V.A.; PAIVA, W. Análise da relação de indicadores físico-químicos do lixiviado gerado em um aterro no semiárido brasileiro. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, v.17, p.36-42, 2021. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/acsa/index.php/ACSA/article/view/1309>. Acesso em: 5 dez. 2021.

ROEHRS, G.; BENOITT, L.A.; MALLMANN, R.A.; MALLMANN, A.C. Avaliação do tratamento de chorume do aterro sanitário de Lajeado, utilizando sistema físico-químico e osmose reversa. 10^o Fórum Internacional de Resíduos Sólidos. João Pessoa, 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/pamel/AppData/Local/Temp/1717-Texto%20do%20artigo-5909-1-10-20191029.pdf>. Acesso em: 14 de mar. 2021.

RUPPERT, K.M.; KLINE, R.J.; RAHMAN, M.S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. **Global Ecology and Conservation**, v.17, p. e00547, 2019.

RUSSO, M.A.T. **Avaliação dos processos de transformação de resíduos sólidos urbanos em aterro sanitário**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Universidade do Minho, Braga, 2005, 320f.

SANT'ANNA JR, G.L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2010. 418p.

SANTOS, A. L. **Diversidade molecular microbiana de lixiviados de aterro**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2010, 98f.

SAUK, A. **Exploring microbial diversity across a Southern Ontario landfill**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade de Waterloo, Ontario (Canadá), 2019, 105f.

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. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109, p.130-137, 2010. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.07.020>. Acesso em: 1 set. 2019.

SCHADT, E.E.; TURNER, S.; KASARSKIS, A. A window into third-generation sequencing. **Human Molecular Genetics**, v.19, p.227-240, 2010. Acesso em: <https://doi.org/10.1093/hmg%2Fddq416>. Acesso em: 1 set. 2019.

SCHNÜRER, A.; JARVIS, A. **Microbiological Handbook for Biogas Plants**. Swedish Waste Management, Swedish Gas Centre Report 207: Sweden, 2010. Disponível em: http://www.eac107quality.net/fileadmin/eac_quality/user_documents/3_pdf/Microbiological_handbook_for_biogas_plants.pdf. Acesso em: 10 set. 2019.

SEKHOHOLA-DLAMINI, L., TEKERE, M. Microbiology of municipal solid waste landfills: a review of microbial dynamics and ecological influences in waste bioprocessing. **Biodegradation**, v.31, p.1-21, 2019. DOI: 10.1007/s10532-019-09890-x.

SILVEIRA, J. **Influência da precipitação nas características do lixiviado e biogás gerados no aterro sanitário de São Leopoldo**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2021, 76f.

SONG, L.; WANG, Y.; ZHAO, H.; LONG, D. Composition of bacterial and archaeal communities during landfill refuse decomposition processes. **Microbiological Research**, v. 181, p.105-111, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.04.009>. Acesso em: 1 set. 2019.

SOUTO, G.B. **Lixiviado de aterros sanitários brasileiros – estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar (“stripping”)**. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009, 371 f.

SOUTO, G.B.; POVINELLI, J. Características de lixiviados de aterros sanitários no Brasil. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24., 2007, Belo Horizonte. **Anais eletrônicos** [...] Curitiba: ABES, 2007.

STALEY, C.; SADOWSKY, M.J. Practical considerations for sampling and data analysis in contemporary metagenomics-based environmental studies. **Journal of Microbiological Methods**, 154, p.14-18, 2018. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.020>. Acesso em: 2 set. 2018.

STALEY, B.F.; DE LOS REYES III, F.L., WANG, L.; BARLAZ, M. Microbial ecological succession during municipal solid waste decomposition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, p.5721-5740, 2010. DOI: 10.1007/s00253-018-9014-5.

STAMPS, B.; LYLES, C.N.; SUFLITA, J.M.; MASONER, J.R.; COZZARELLI, I.M.; KOLPIN, D.W.; STEVENSON, B.S. Municipal solid waste landfills harbor distinct microbiomes. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00534>. Acesso em: 2 set. 2019.

STOLZ, A.; BUSSE, H.J.; KAMPFER, P. *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n.3 p. 572–576, 2007.

TAHON, G.; GEESINK, P.; ETTEMA, T.J.G. Expanding Archaeal Diversity and Phylogeny: Past, Present and Future. **Annual Review of Microbiology**, v.75, p.359-381, 2021.

TCHOBANOGLIOUS, G.; THEISEN, H.; VIGIL, S.A. **Integrated Solid Waste Management: Engineering Principle and Management Issue**. New York: McGraw Hill Companies Incorporated, 1993.

TEAM, R. Core (2018) R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2021.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics: a guide from sampling to data analysis Aquarium Microbiome Project View project MG-RAST View Project. **Microbial Informatics and Experimentation**, v.2, p.1-12, 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>. Acesso em: 1 set. 2019.

TONGE, D.P.; PASHLEY, C.H.; GANT, T.W. Correction: Amplicon Based Metagenomic Analysis of Mixed Fungal Samples Using Proton Release Amplicon Sequencing. **PLoS ONE**, v.9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106021>. Acesso em: 29 ago. 2019.

UEKI, A.; AKASAKA, H.; SUZUKI, D.; UEKI, K. *Paludibacter propionigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, p.39-44, 2006. Doi: 10.1099/ijs.0.63896-0

VACCARI, M.; TUDOR, T.; VINTI, G. Characteristics of leachate from landfills and dumpsites in Asia, Africa and Latin America: an overview. **Waste Management**, v.95, p.416-431, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.06.032>. Acesso em: 24 ago. 2019.

VARSHNEY, R.K.; NAYAK, S.N.; MAY, G.D.; JACKSON, S.A. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. **Trends in biotechnology**, v.27, p.552-530, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.006>. Acesso em: 1 set. 2019.

VAZOLLER, R. F. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas**. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995, 259 f.

VERMA, S. **Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Terrestres), Columbia University, Nova Iorque, 2002, 50f.

VICH, D.V. Comunidade microbiana e produção de metano em reator anaeróbio em batelada com metilamina como fonte de carbono. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010, 148f.

WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, 2007.

WANG, K.; LI, L.; TAN, F.; WU, D. Treatment of landfill leachate using activated sludge technology: a review. **Archaea**, p.1-10, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/327431448_Treatment_of_Landfill_Leachate_Using_Activated_Sludge_Technology_A_Review. Acesso em 01 set. 2021.

WANG, X.; CAO, A.; ZHAO, G.; ZHOU, C.; XU, R. Microbial Community structure and diversity in a municipal solid waste landfill. **Waste Management**, v. 66, p.79-87, 2017. DOI: 10.1016/j.wasman.2017.04.0.

WEATHERSPARK. **Condições meteorológicas de São Leopoldo**. Excelsior, 2019. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/y/29690/Clima-caracter%C3%ADstico-em-S%C3%A3o-Leopoldo-Brasil-durante-o-ano>. Acesso em 10 set. 2019.

WELCH, R.A. **The Genus *Escherichia***. In: Dworking M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer, K.H., Stackebrandt E. (eds). *The Prokaryotes: Proteobacteria, Gamma Subclass*, v.6. Ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006.

WOOLEY, J.C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A primer on metagenomics. **PLoS Computational Biology**, v.6, p.1-13, 2010. Disponível em: doi:10.1371/journal.pcbi.1000667. Acesso em: 1 set. 2019.

XIE, M.Y. Package 'knitr', 2016.

ZAINUN, M.Y.; SIMARANI, K. Metagenomics profiling for assessing microbial diversity in both active and closed landfills. **Science of the Total Environment**, v.616-617, p.269-278, 2018. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.266>. Acesso em 21 ago. 2019.

ZELTER, F.; LETTI, M.S.; ZANINI, D. **Atlas socioambiental de São Leopoldo**. São Leopoldo: Oikos, 2012.

ZEPEDA, A.E, LEÓN, A.V.P., FLORES, A.S. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v.6, p.340, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00348>. Acesso em: 5 set. 2019.

APÊNDICE A – PREPARO DO MEIO E DAS SOLUÇÕES DE SUPLEMENTAÇÃO

Solução indicadora de resazurina 0,10% (m/v): é uma solução indicadora do potencial de oxirredução do meio de cultivo, ou seja, indicadora de anaerobiose. O Quadro 9 apresenta a formulação da solução, os materiais necessários e o modo de preparo.

Quadro 9 - Preparo da solução de resazurina 0,10% (m/v)

Reagentes e soluções estoque	Quantidade
Resazurina	0,1 g
Água Milli-Q q.s.p	100 mL
Vidrarias e equipamentos	Quantidade
Balão volumétrico de 100 mL	1
Béquer	1
Frasco âmbar	1
Modo de preparo	
<ul style="list-style-type: none"> - Dissolver a resazurina em 80 mL de água Milli –Q. - Verter a solução em balão volumétrico e completar o volume para 100 mL. - Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração. - Não necessita esterilização. 	

Solução traço de metais: o Quadro 10 apresenta a formulação da solução, os materiais necessários e o modo de preparo da solução de metais.

Quadro 10 - Preparo da solução traço de metais

Reagentes e soluções estoque	Quantidade
NTA – ácido nitrilotriacético ($C_6H_9NO_6$)	4,5 g
Sulfato de ferro II heptaidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,556 g
Sulfato de manganês II monoidratado ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0,086 g
Cloreto de cobalto II hexaidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,17 g
Sulfato de zinco heptaidratado $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,21 g
Ácido bórico H_3BO_3	0,19 g
Cloreto de níquel II ($NiCl_2$)	0,02 g

Molibdato de sódio (Na_2MoO_4)	0,01 g
Solução hidróxido de potássio (KOH) 10 mol/L	Até pH neutro
Água Milli-Q q.s.p.	1000 mL
Vidrarias e equipamentos	Quantidade
Béquer 50 mL	8
Bastão de vidro	8
Erlenmeyer 2000 mL	1
Balão volumétrico de 1 L	1
Sistema de distribuição de gases	1
Potenciômetro	1
Modo de preparo	
<ul style="list-style-type: none"> - Pesar todos os componentes em béqueres de 50 mL. - Dissolver com 600 mL de água Milli-Q. - Ajustar o pH para 7,0 com solução de hidróxido de potássio 10 mol/L. A solução apresentará a coloração amarela. - Avolumar em balão volumétrico de 1000 mL. - Fluxionar nitrogênio (100%) na solução preparada por 20 minutos. - Guardar a solução em frasco âmbar escura sob refrigeração até o momento da utilização. 	

Meio Zinder: o meio basal Zinder foi utilizado nos ensaios de enriquecimento em meio líquido e sólido. O Quadro 11 apresenta a formulação do meio, os materiais necessários e o modo de preparo.

Quadro 11 - Preparo do meio Zinder

Reagentes e soluções estoque	Quantidade
Cloreto de amônio (NH_4Cl_2)	0,50 g
Fosfato de potássio di básico anidro (K_2HPO_4)	0,40 g
Cloreto de magnésio hexaidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,05 g
Resazurina 0,10%	1,0 mL
Solução traço de metais	10,0 mL
Água Milli-Q q.s.p.	1000,00 mL
Vidrarias e equipamentos	Quantidade

Becker 50 mL	4
Bastão de vidro	4
Erlenmeyer 2000 mL	1
Balão volumétrico de 1 L	1
Frascos de antibiótico 30 mL	100
Sistema de distribuição de gases	1
Autoclave	1
Modo de preparo	
<p>- Verter 500 mL da água em um balão volumétrico de 1000 mL e dissolver os sais e reagentes na ordem descrita na tabela acima.</p> <p>- Completar o volume para 1000 mL em balão volumétrico, transferir para erlenmeyer de 2000 mL e borbulhar com nitrogênio (100%) por 30 minutos.</p> <p>- Distribuir o meio nos frascos de cultura sob fluxo de nitrogênio, fechar com a tampa de borracha revestida de Teflon ou de borracha de butila e lacrar.</p> <p>- Autoclavar os frascos por 20 min, a 120 °C e 15 psi.</p> <p>- Armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.</p> <p>- Antes da inoculação, trocar a atmosfera dos frascos para nitrogênio : dióxido de carbono (70:30) e adicionar alíquotas das soluções estoque de bicarbonato de sódio, vitaminas, fontes orgânicas e redutora, utilizando seringa com agulha de insulina.</p>	

Solução de vitaminas: O Quadro 12 apresenta a formulação da solução, os materiais necessários e o modo de preparo da solução de vitaminas.

Quadro 12 - Preparo da solução de vitaminas

Reagentes e soluções estoque	Quantidade
Biotina (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S) – Vitamina B7	0,002 g
Ácido fólico (C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆) – Vitamina B9	0,002 g
Tiamina HCl (C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS · HCl) – Vitamina B1	0,005 g
Riboflavina (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆) – Vitamina B2	0,005 g
Ácido nicotínico (C ₆ H ₅ NO ₂) – Vitamina B3	0,005 g
Pantotenato de cálcio (C ₉ H ₁₇ NO ₅) – Vitamina B5	0,005 g
Piridoxina.HCl (C ₈ H ₁₁ NO ₃) – Vitamina B6	0,01 g
Cobalamina (C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P) – Vitamina B12	0,0001 g
Ácido Lipóico (C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂)	0,005 g

Água Milli-Q q.s.p	1000 mL
Vidrarias e equipamentos	Quantidade
Becker 50 mL	9
Bastão de vidro	9
Erlenmeyer 2000 mL	1
Becker 1 L	1
Sistema Milipore	1
Frasco de antibiótico 30 mL	100
Sistema de distribuição de gases	1
Modo de preparo	
<ul style="list-style-type: none"> - Esterilizar a vidraria e o sistema Milipore a ser utilizar em autoclave a 120°C por 20 minutos. - Para 1 L de solução, pesar os componentes sólidos descritos na lista de reagentes em recipientes separados (béquer de 50 mL ou vidro relógio). - Dissolver as vitaminas em 600 mL de água Milli-Q. - Completar o volume para 1000 mL com água Milli-Q - Esterilizar a solução por filtração através de sistema Millipore com membrana de 0,22 µm. - Borbulhar com nitrogênio por 20 minutos. - Após a solução de vitaminas estar preparada, distribuir em frascos de antibióticos. Utilizar o sistema de distribuição de gases. - Lacrar os frascos. - Envolver os frascos em papel alumínio e armazená-los sob refrigeração a 4 °C. 	

Solução de tamponamento: a solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v) foi utilizada como solução de tamponamento. Em virtude da sensibilidade as altas temperaturas, a solução foi esterilizada a frio por filtração rápida pelo sistema Millipore em membrana de 0,22 µm de porosidade, em condições de assepsia. Os materiais utilizados no preparo foram previamente esterilizados por autoclavagem a 120 °C durante 20 minutos. O Quadro 13 apresenta a formulação da solução, os materiais necessários e o modo de preparo.

Quadro 13 - Preparo da solução de tamponamento

Reagentes e soluções estoque	Quantidade
Bicarbonato de sódio	10 g

Água Milli-Q q.s.p	100 mL
Vidrarias e equipamentos	Quantidade
Balão volumétrico de 100 mL	1
Béquer	1
Erlenmeyer de 250 mL	1
Sistema Millipore	1
Frascos de antibiótico de 30 mL	6
Modo de preparo	
<ul style="list-style-type: none"> - Esterilizar a vidraria e o sistema Milipore a ser utilizar em autoclave a 120°C por 20 minutos. - Dissolver o sal com um pouco da água Milli-Q. Caso a dissolução esteja difícil, aquecer a mistura, mas sem deixar ferver, pois o bicarbonato de sódio precipita. - Completar o volume com o restante da água Milli-Q em balão volumétrico de 100 mL. - Esterilizar a solução por filtração em membrana. - Borbulhar com nitrogênio (100%) por 20 minutos. - Distribuir 15 ou 25 mL da solução em frascos de antibiótico de 30 ou 50 mL respectivamente, sob fluxo de nitrogênio (100%), fechar com batoques de butila, ainda sob fluxo do gás e lacrar com anéis de alumínio. - Etiquetar e armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. 	

Solução redutora: o Quadro 14 apresenta a formulação da solução, os materiais necessários e o modo de preparo da solução de sulfeto de sódio nonaidratado.

Quadro 14 - Preparo da solução redutora

Reagentes e soluções estoque	Quantidade
Sulfeto de sódio nonaidratado ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	5 g
Água Milli-Q q.s.p	100 mL
Vidrarias e equipamentos	Quantidade
Erlenmeyer – 250 mL	1
Frascos de antibiótico – 30 mL	6
Sistema de distribuição de gases	1
Autoclave	1
Sistema Millipore	1
Modo de preparo	

- Esterilizar a vidraria, o sistema Millipore, pinça, os frascos e as tampas de borracha.
- Lavar os cristais de sulfeto de sódio.
- Secar os cristais.
- Quebrar os cristais.
- Pesar 5 g de sulfeto em vidro de relógio.
- Medir em 100 mL de água Milli-Q.
- Mistura o sal em água.
- Fluxionar a solução em nitrogênio por 20 minutos.
- Filtrar a solução em sistema Millipore, já estéril.
- Distribuir, sob fluxo de nitrogênio, 10 mL de solução em frascos de antibióticos, os quais foram previamente esterilizados.
- Fechar com tampas de borracha de butila e lacrar com lacres de alumínio.
- Armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Solução de extrato de levedura 2% (m/v): dissolver 2 g de extrato de levedura em béquer de 100 mL, transferir e avolumar em balão volumétrico de 100 mL. Fluxionar a solução por 20 minutos e distribuir em frascos de antibióticos. Esterilizar por autoclavagem (120°C por 20 minutos). Armazenar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Solução de acetato de sódio 16,4% (m/v): dissolver 16,4 g de extrato de acetato em béquer com 100 mL de água destilada previamente fervida. Fluxionar a solução por gás nitrogênio (100%) por 20 minutos e distribuir alíquotas de 20 mL em frascos de antibiótico de 50 mL, também sob fluxo de nitrogênio (100%). Os frascos devem ser tampados com tampas de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio, esterilizadas por autoclavagem (120°C por 20 minutos) e armazenados a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Solução de formiato de sódio 5,19% (m/v): dissolver 5,19 g de formiato de sódios em béquer com 50 mL de água destilada. Fluxionar a solução por gás nitrogênio (100%) por 20 minutos e distribuir alíquotas de 10 mL em frascos de antibiótico de 30 mL, também sob fluxo de nitrogênio (100%). Os frascos devem ser tampados com tampas de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio,

esterilizadas por autoclavagem (120°C por 20 minutos) e armazenados a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Solução de metanol 20% (m/v): adicionar 20 mL de metanol (99,9%) em béquer com 100 mL de água destilada. Fluxionar previamente a água destilada com gás nitrogênio (100%) por 15 minutos e distribuir alíquotas de 9,2 mL em frascos de antibiótico de 30 mL. Fluxionar previamente o metanol com gás nitrogênio (100%) por 3 minutos. Lacrar ambos os frascos e esterilizar por autoclavagem (120°C), durante 20 minutos. Após a esterilização, transferir alíquotas de 0,8 mL de metanol para os frascos contendo a água destilada, armazenar a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

APÊNDICE B – PRODUÇÃO DE TRABALHOS

Neste apêndice encontram-se relacionados os artigos produzidos durante o doutorado, sendo que os temas não são somente específicos ao da tese, mas sim ao trabalho desenvolvido junto ao Grupo de Pesquisa em Saneamento Ambiental da Unisinos.

- Artigo 1 Municipal Solid Waste Management from the Experience of São Leopoldo/Brazil and Zurich/Switzerland.
Status Publicado na revista Sustainability
- Artigo 2 Estudo das propriedades geotécnicas de Resíduos Sólidos Urbanos recém descartados e aterrados em Aterro Sanitário localizado na região Sul do Brasil.
Status Publicado na revista DAE
- Artigo 3 Compostagem de lodos ativados em estação de tratamento de esgoto empregando aeração forçada positiva.
Status Submitido à revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental
- Artigo 4 Qualidade da água para reuso pós-tratamento de efluente sanitário no sistema UNI, em uma indústria.
Status Em avaliação para ressubmissão.
- Artigo 5 Avaliação do gerenciamento dos resíduos sólidos urbanos nas cooperativas de materiais recicláveis localizadas na região metropolitana de Porto Alegre/RS.
Status Publicado no e-book Gestão e tecnologias para o meio ambiente: visões e ações interdisciplinares
- Artigo 6 Viabilidade de instalação de central de triagem de resíduos sólidos urbanos em aterro sanitário em operação.
Status Em avaliação para ressubmissão.
- Artigo 7 Metodologia e ferramentas de estudo e aplicação da sustentabilidade no ensino superior: uma revisão sistemática da literatura
Status Em revisão para a revista Journal of Cleaner Production
- Artigo 8 Degradação de RSU em diferentes fases de um aterro sanitário
Status Em produção
- Artigo 9 Diversidade microbiana presente nos lixiviados gerados em cinco fases distintas de aterramento
Status Em produção