

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA EM
SISTEMA DE TRATAMENTO DE BIOGÁS COM
ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE SULFETO

Marcela França Dias

Belo Horizonte

2015

**ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA EM
SISTEMA DE TRATAMENTO DE BIOGÁS COM
ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE SULFETO**

Marcela França Dias

Marcela França Dias

ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA EM SISTEMA DE TRATAMENTO DE BIOGÁS COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE SULFETO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientador: Prof^a Dr^a Juliana Calábria de Araújo

Coorientador: Prof. Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2015

Página com as assinaturas dos membros da banca examinadora, fornecida pelo Colegiado do Programa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer muito a todos que contribuíram para a conclusão dessa etapa e me apoiaram durante o processo: à minha querida família; ao Carlos, meu noivo; à minha orientadora, professora Juliana Calábria; ao meu coorientador, professor Carlos Chernicharo; à equipe da Methanum Engenharia Ltda.; aos colegas do Laboratório de Microbiologia da Escola de Engenharia da UFMG; aos professores e aos colegas do Programa PPGSMARH e do ICB; à equipe do CEBio; e às agências de fomento, CAPES, ANEEL e Cemig.

Obrigada a todos!

RESUMO

A vinhaça é o resíduo da primeira destilação no processo de produção do etanol e, quando tratada por digestão anaeróbia, gera um biogás com grandes concentrações de H_2S , um gás tóxico que pode levar à corrosão das estruturas de aproveitamento do biogás. Para o seu aproveitamento energético, o biogás deve ser, portanto, dessulfurizado. Neste trabalho, foi estudado um sistema, em escala piloto, que integra princípios físicos, químicos e biológicos para a remoção do H_2S contido no biogás oriundo da metanização da vinhaça. O sistema está localizado no município de Monte Belo (MG). Uma vez que as reações biológicas de oxidação do sulfeto são uma parte importante do processo, foram investigadas as alterações na comunidade microbiana, tanto aderida ao meio suporte quanto dispersa na fase líquida, em resposta a alterações na carga volumétrica aplicada de H_2S , que variou de 2 a 19 $kgH_2S.m^{-3}.d^{-1}$. Foram utilizadas as técnicas de DGGE e de sequenciamento de nova geração na plataforma Miseq. Os parâmetros físico-químicos foram monitorados no local. O sistema de dessulfurização apresentou alta eficiência de remoção de H_2S (superior a 99%), e as análises biológicas revelaram que a comunidade bacteriana é complexa e se manteve razoavelmente constante ao longo de todo o experimento. Foram observadas algumas diferenças entre as amostras do líquido de recirculação e da biomassa aderida, indicando que, apesar do contato entre o líquido e o biofilme, pode haver grupos específicos de cada local. A maior parte das sequências foi classificada como *Firmicutes* (52,4%) e *Proteobacteria* (14,2%), que somam 66,6% do total. Em menor proporção, foram encontrados os filos *Bacteroidetes* (7,5%), *Synergistetes* (4,4%) e *Chloroflexi* (4,3%). A abundância relativa dos táxons de bactérias sulfo-oxidantes foi baixa, no entanto, grupos envolvidos na oxidação de sulfeto podem estar entre as sequências não identificadas. Além disso, não foram identificadas UTOs relacionadas aos principais grupos de bactérias sulfurosas verdes e púrpuras. Análises estatísticas indicam que a DQO, assim como o oxigênio dissolvido, podem ser parâmetros importantes na estabilidade e na resistência do sistema a choques de carga.

ABSTRACT

Vinasse is the residue of the first distillation during the ethanol production and when treated by anaerobic digestion, produces a biogas with high concentrations of H₂S, a toxic gas which may lead to corrosion of biogas utilization structures. For energetic purposes, biogas should therefore be desulfurized. In this work, a system in pilot scale was studied, which integrates physical, chemical and biological principles for the removal of H₂S contained in the biogas derived from methanation of vinasse. The system is located in the city of Belo Monte (MG). Since the biological sulfide oxidation reactions are an important part of the process, changes in the microbial community, both adhered to the support medium and dispersed in the liquid phase, in response to changes in volumetric loading of H₂S, which ranged from 2 to 19 kgH₂S.m⁻³.d⁻¹, were investigated. Techniques of DGGE and next-generation sequencing in Miseq platform were used. The physical and chemical parameters were monitored on site. The desulfurization system showed H₂S high removal efficiency (above 99%) and biological analysis revealed that the bacterial community is complex and remained fairly constant throughout the experiment. Some differences were observed between the recirculating liquid and attached biomass samples, indicating that, despite the contact between the liquid and the biofilm, there may be specific groups for each site. Most of the sequences were classified as *Firmicutes* (52.4%) and *Proteobacteria* (14.2%), corresponding to 66.6% of the total. To a lesser extent, *Bacteroidetes* (7.5%), *Synergistetes* (4.4%) and *Chloroflexi* (4.3%) phyla were found. The relative abundance of taxa of sulfide-oxidizing bacteria was low, however, other groups involved in the oxidation of sulfide could be among unidentified sequences. In addition, there were no OTUs related to the main groups of green and purple sulfur bacteria. Statistical analysis indicate that the COD and dissolved oxygen can be very important parameters in the stability and shock resistance of the system.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	O BIOGÁS GERADO A PARTIR DA VINHAÇA.....	4
3.1.1	<i>A produção da vinhaça e seu potencial energético</i>	5
3.1.2	<i>O biogás e a problemática do sulfeto de hidrogênio</i>	9
3.2	O PAPEL DOS MICRORGANISMOS NO OXIDAÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS.	10
3.2.1	<i>Bactérias sulfurosas incolores</i>	13
3.2.2	<i>Bactérias sulfurosas verdes e púrpuras</i>	15
3.2.3	<i>Técnicas utilizadas no estudo de comunidades microbianas</i>	16
3.2.4	PROCESSOS DE DESSULFURIZAÇÃO DO BIOGÁS	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	APARATO EXPERIMENTAL.....	25
4.1.1	<i>Descrição dos sistemas de metanização e de dessulfurização</i>	25
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL	30
4.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	33
4.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTATÍSTICAS	33
4.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	35
4.5.1	<i>PCR e DGGE</i>	35
4.5.2	<i>Sequenciamento de nova geração</i>	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTATÍSTICAS	38
5.2	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	43
5.2.1	<i>Resultados gerais do DGGE e do SNG</i>	43
5.2.1	<i>Análise da comunidade microbiana a partir das técnicas de DGGE e SNG</i>	50
6	CONCLUSÕES	64
7	RECOMENDAÇÕES	66
8	REFERÊNCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Composição da matriz energética brasileira em 2013.....	4
Figura 3.2: Fluxograma simplificado do processo de obtenção do açúcar e do etanol.....	6
Figura 3.3: Ciclo do enxofre.....	12
Figura 4.1: Sistemas de metanização e de dessulfurização.....	26
Figura 4.2: Sistema de dessulfurização do biogás.	26
Figura 4.3: Torre de regeneração biológica da fase líquida.....	29
Figura 4.4: Foto dos fios de <i>nylon</i> no interior da Torre de regeneração biológica antes e após o início da operação do sistema de dessulfurização.	29
Figura 4.5: Fluxograma das etapas experimentais.....	31
Figura 5.1: Carga de H ₂ S aplicada versus a eficiência de remoção de H ₂ S.....	39
Figura 5.2: Variação da carga volumétrica aplicada de H ₂ S entre as etapas experimentais.	40
Figura 5.3: Concentrações de sulfato, sulfeto e DQO ao longo do tempo.....	42
Figura 5.4: Dendograma baseado no perfil de bandas do DGGE.....	44
Figura 5.5: Foto do gel de DGGE com os iniciadores 1055F/1392R-GC.....	46
Figura 5.6: Índices de diversidade- α baseados nos resultados do sequenciamento na plataforma MiSeq.....	48
Figura 5.7: Composição da comunidade microbiana em nível de filo.....	52
Figura 5.8: Concentrações de sulfato e sulfeto dissolvidos ao longo do tempo.	55
Figura 5.9: Abundância relativa de gêneros pertencentes ao filo <i>Firmicutes</i>	56
Figura 5.10: Abundância relativa de gêneros identificados do filo <i>Proteobacteria</i>	58
Figura 5.11: Composição da comunidade microbiana em nível de ordem.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Principais características da vinhaça e do esgoto sanitário	6
Tabela 3.2: Composição típica do biogás	9
Tabela 3.3: Estados de oxidação dos enxofre em diferentes compostos	11
Tabela 3.4: Diversidade metabólica de bactérias oxidadoras de enxofre	13
Tabela 3.5: Reações realizadas por bactérias sulfurosas incolores	14
Tabela 3.6: Plataformas de SNG de bancada e sequenciamento de Sanger	19
Tabela 3.7: Grupos microbianos encontrados em sistemas de dessulfurização microaerados	24
Tabela 4.1: Síntese das etapas experimentais	33
Tabela 4.2: Parâmetros físico-químicos analisados	34
Tabela 4.3: Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para DGGE	35
Tabela 4.4: Componentes da PCR para DGGE	36
Tabela 5.1: Médias dos parâmetros físico-químicos monitorados na Torre de regeneração biológica	38
Tabela 5. 2: Caracterização físico química do inóculo	38
Tabela 5.3: Carga volumétrica de H ₂ S aplicada	40
Tabela 5.4: Índices de diversidade- α das amostras calculados a partir dos dados do SNG	47
Tabela 5.5: Alinhamentos das sequências consenso com <i>RDP Classifier</i> e <i>Blastn</i>	50
Tabela 5.6: Bactérias oxidadoras de sulfeto identificadas no sistema	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
Bp	Pares de base, do inglês <i>base pairs</i> .
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DNA	Ácido desoxirribonucleico
16S	Subunidade 16S do gene do RNA ribossomal
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ETE	Estação de tratamento de esgoto
Gbp	Giga pares de base
GEE	Gases de efeito estufa
IPCC	<i>Intergovernment Panel on Climate Change</i>
Mtep	Milhões de toneladas equivalentes de petróleo
Nm	Nanômetros
Nox	Número de oxidação
OD	Oxigênio dissolvido
ORP	Potencial de oxirredução
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase
Q	Vazão
RNAr	RNA ribossomal
SNG	Sequenciamento de nova geração
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UTO	Unidade taxonômica operacional
ΔG°	Varição da energia livre de Gibbs padrão

1 INTRODUÇÃO

O biogás é uma mistura gasosa formada durante o processo de digestão anaeróbia da matéria orgânica, que é composta basicamente por metano (65-70%), dióxido de carbono (25 a 30%) e outras substâncias em menor concentração, tais como nitrogênio, sulfeto de hidrogênio e vapor d'água (METCALF; EDDY, 2013). Seu potencial energético é grande e, além da versatilidade, o seu uso gera um menor impacto ambiental comparado a outras fontes de energia, como o gás natural (WEILAND, 2010).

A qualidade do biogás depende do conteúdo de metano (CH_4), o qual determina seu poder calorífico e do grau de pureza. Um de seus principais contaminantes é o sulfeto de hidrogênio (H_2S), produzido pela degradação anaeróbia de compostos orgânicos sulfurados e pela redução de espécies de enxofre oxidadas (RAMOS *et al.*, 2013). O H_2S é um gás inflamável, tóxico e com odor de ovo podre, capaz de inibir a atividade microbiana em concentrações superiores a 200 mg.L^{-1} e de levar à corrosão das estruturas de aproveitamento do biogás (METCALF; EDDY, 2013). Assim, para que o biogás possa ser aproveitado como fonte de energia, é importante remover o H_2S , dentre outros contaminantes.

Dentre as tecnologias disponíveis para remover o H_2S do biogás (processo denominado dessulfurização), há alternativas físico-químicas e biológicas. Embora as primeiras sejam as mais utilizadas atualmente, os processos biológicos, baseados na oxidação do H_2S por bactérias sulfo-oxidantes, têm algumas vantagens, tais como menor necessidade de utilização de reagentes químicos e redução de custos (MANNUCCI *et al.*, 2012). Processos físico-químicos aliados a tratamentos biológicos também têm sido empregados com sucesso (HO *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013; GONZÁLEZ SÁNCHEZ *et al.*, 2014). Estes podem envolver uma etapa química de oxidação ou absorção/adsorção seguida por uma etapa biológica de regeneração de reagentes (HO *et al.*, 2013), como o estudado neste trabalho, ou alternativamente, uma etapa inicial de purificação biológica seguida de uma etapa química de polimento (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2008).

Em sistemas de dessulfurização que operam em condições alcalinas, como o estudado neste trabalho, a corrente de biogás rica em H_2S entra em contato com uma solução de NaOH ou KOH, e os íons OH^- presentes nessa solução são consumidos no processo de dissolução do $\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})}$ em bissulfeto (HS^-), conforme explicitado na Equação 1.1 (van den BOSCH, 2007).

Este é então oxidado biologicamente em condições de microaeração, a qual tem se mostrado uma alternativa promissora devido à elevada eficiência de remoção de H₂S e à simplicidade operacional (RAMOS *et al.*, 2013). A microaeração consiste na introdução controlada de ar atmosférico ou gás oxigênio na unidade onde será realizada a dessulfurização, a qual é predominantemente anaeróbia, de forma a promover a oxidação do HS⁻ a enxofre elementar (S^o) ou sulfato (SO₄²⁻) por bactérias sulfo-oxidantes. A formação de S^o é acoplada à regeneração de íons OH⁻, conforme mostrado na Equação 1.2 (van den BOSCH, 2007):



A digestão anaeróbia pode ser utilizada para o tratamento da vinhaça, um efluente com grande potencial poluidor, permitindo a recuperação de parte do seu conteúdo energético devido à geração de biogás. No entanto, durante a sua digestão anaeróbia, também são produzidas quantidades significativas de H₂S. Uma vez que, no processo de obtenção do etanol, são produzidos aproximadamente 13 litros de vinhaça por litro de álcool, o tratamento anaeróbio poderia gerar grandes quantidades de biogás (SALOMON; LORA, 2009). Assim, dado o potencial energético do biogás proveniente da vinhaça, é importante o estudo de tecnologias que favoreçam sua utilização e, no caso dos sistemas que empregam processos biológicos para a oxidação do H₂S, é preciso conhecer as características da biomassa e as condições propícias para o seu desenvolvimento, os quais são os objetivos deste projeto.

Este trabalho está inserido no projeto de doutorado intitulado “Desenvolvimento de um sistema de purificação do biogás visando à geração de energia elétrica a partir da metanização da vinhaça”, desenvolvido pelo aluno Luis Felipe Colturato no Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Escola de Engenharia da UFMG.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a comunidade microbiana em um sistema de dessulfurização do biogás proveniente da metanização da vinhaça, em escala piloto. Esta é produzida na destilaria da Usina de Monte Belo (MG) e encaminhada a um digestor anaeróbio para metanização. O biogás resultante da digestão possui altas concentrações de H₂S e é direcionado ao sistema de dessulfurização.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a comunidade microbiana presente no sistema de dessulfurização do biogás, contemplando tanto a biomassa dispersa na fase líquida quanto a aderida ao meio suporte, através de técnicas de biologia molecular;
- Avaliar o efeito da variação da carga de H₂S sobre a diversidade microbiana;
- Identificar as bactérias oxidadoras de sulfeto presentes no sistema de dessulfurização.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O biogás gerado a partir da vinhaça

A demanda global de energia vem crescendo rapidamente e aproximadamente 88% dela são supridos por combustíveis fósseis, os quais são uma fonte energética não renovável e altamente poluente (WEILAND, 2010). Embora muitos países tenham feito grandes progressos para aumentar a participação de fontes renováveis em suas matrizes energéticas, ainda há muitos desafios a serem superados. O Brasil possui um perfil diferenciado, uma vez que a demanda é em grande parte suprida por fontes renováveis, como a hidráulica, apesar da participação dos combustíveis fósseis ainda ser bastante significativa (PEREIRA *et al.*, 2013; EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2014). A energia obtida a partir da biomassa da cana-de-açúcar, por exemplo, corresponde a aproximadamente 16% do total, como pode ser observado na Figura 3.1, que apresenta a composição da matriz energética brasileira com base no ano de 2013 (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2014).

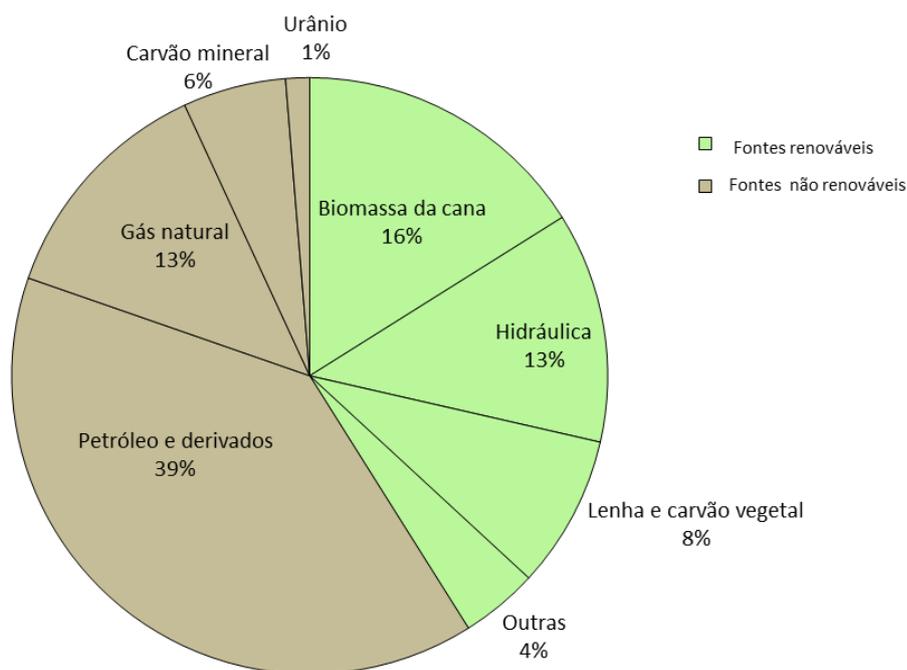


Figura 3.1: Composição da matriz energética brasileira em 2013.

O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é uma alternativa energética renovável e menos poluente comparado aos combustíveis fósseis. No entanto, os resíduos originados no processo muitas vezes não são devidamente aproveitados (MORAES *et al.*, 2014). Segundo van Haandel (2000), cerca de 50% da energia contida na cana permanecem no bagaço, 12%

são mantidos na vinhaça e apenas 38% são de fato convertidos em etanol. O bagaço, ao ser queimado, permite a recuperação de parte dessa energia, mas ainda assim, o seu potencial energético é subutilizado (van HAANDEL, 2005). O mesmo ocorre com a vinhaça, um subproduto do processo de produção do etanol rico em matéria orgânica biodegradável que, quando tratado por digestão anaeróbia, pode gerar grandes quantidades de biogás. Segundo Salomon e Lora (2009), o biogás já foi tratado como um subproduto da digestão anaeróbia sem valor comercial. No entanto, essa percepção tem mudado e hoje seu uso como fonte de energia tem sido objeto de pesquisas, pois além da versatilidade, a utilização do biogás possibilitaria a geração de energia descentralizada, lucros maiores para os produtores (oriundos da venda da energia gerada e da redução na demanda da rede elétrica) e a diminuição das emissões de metano para a atmosfera (SALOMON; LORA, 2009; RASI *et al.*, 2011). No entanto, há muitos desafios para a produção e utilização do biogás em larga escala no Brasil e mais pesquisas são necessárias para que o seu potencial energético possa ser aproveitado.

3.1.1 A produção da vinhaça e seu potencial energético

Resumidamente, a obtenção de etanol é baseada nos processos de fermentação da fonte de açúcar, como o caldo da cana, e de destilação da mistura alcóolica (FUESS; GARCIA, 2014). O produto da fermentação, chamado de “vinho” (mistura complexa que contém fermento e etanol), é centrifugado para que ocorra a separação do fermento, que pode ser reaproveitado. A mistura é então encaminhada para as colunas de destilação para separação do etanol. A vinhaça (ou vinhoto) é o efluente líquido gerado a partir da destilação do vinho (Figura 3.2). Apesar de ter consistência líquida, a vinhaça é considerada um resíduo sólido pela NBR 10.004 da ABNT (2004), uma vez que possui um enorme potencial poluidor (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2009) e é produzida em grandes quantidades; em média 13 litros de vinhaça para cada litro de etanol (SALOMON; LORA, 2009). Esse valor pode chegar a 20 litros, dependendo do teor alcoólico do vinho e de variações no processo de destilação (van HAANDEL, 2000). Como o Brasil é um grande produtor de etanol, a geração de vinhaça é, conseqüentemente, muito expressiva. Na safra de 2011/2012, foram produzidos mais de 22 bilhões de litros de etanol no país (MAPA, 2013), o que equivale a aproximadamente 286 bilhões de litros de vinhaça, adotando-se o valor médio de $13L_{\text{vinhaça}}/L_{\text{etanol}}$.

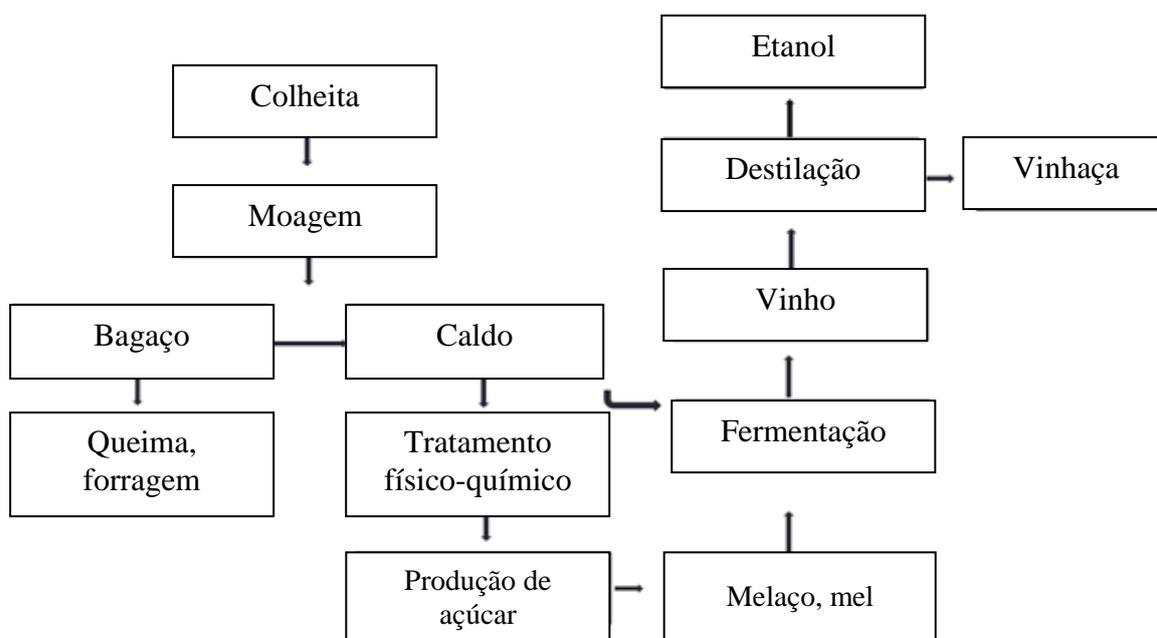


Figura 3.2: Fluxograma simplificado do processo de obtenção do açúcar e do etanol.

A vinhaça é um líquido de coloração marrom escura, caracterizado por elevadas temperatura e DQO, baixo pH e alto teor de sólidos em suspensão, além de grandes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e sulfato, entre outros compostos (van HAANDEL, 2000). Na Tabela 3.1 são apresentadas algumas das principais características físico-químicas da vinhaça e do esgoto sanitário, para fins de comparação. Vale observar que a referida tabela apresenta valores médios, porém a composição da vinhaça pode variar muito, dependendo do processo e do substrato utilizado na produção do etanol. Em relação à DQO, por exemplo, consta na tabela o valor de 24 g.L^{-1} , embora valores tão altos quanto 65 g.L^{-1} já tenham sido reportados (MORAES *et al.*, 2014).

Tabela 3.1: Principais características da vinhaça e do esgoto sanitário

Parâmetro	Unidade	Vinhaça ^a	Esgoto ^b
ST	mg.L^{-1}	33.000	1.100
STV	mg.L^{-1}	23.000	380
DBO ₅	mg.L^{-1}	15.000	300
DQO	mg.L^{-1}	24.000	600
pH	-	4,3	7,0
N:P:K	mg.L^{-1}	433:34:2206	35:6:16
SO ₄ ²⁻	mg.L^{-1}	1.150	36
Temperatura	°C	90	25

Fonte: adaptado de ^a: Ana (2009); ^b: von Sperling (2005); Metcalf e Eddy (2013).

A vinhaça é normalmente encaminhada para fertirrigação da lavoura de cana, com os objetivos de lhe dar uma destinação mais adequada do que o lançamento em corpos d'água e

áreas de sacrifício¹, além de melhorar as condições do solo, uma vez que é muito rica em nutrientes e sua aplicação permite reduzir os gastos com fertilizantes (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2009). No entanto, embora esta seja uma prática altamente difundida e permitida pela lei, há aspectos negativos que devem ser considerados, tais como a possibilidade de geração de maus odores e formação de compostos como monóxido de dinitrogênio (N₂O), resultantes da decomposição da matéria orgânica. O N₂O é um gás de efeito estufa com potencial 296 vezes maior que o do CO₂ e pode ser produzido em quantidades significativas após a fertirrigação com vinhaça (PAREDES *et al.*, 2013; MORAES *et al.*, 2014). Além disso, a deposição da vinhaça *in natura* oferece risco de salinização do solo ao longo do tempo, redução do seu teor de oxigênio, acidificação e contaminação por íons como cloreto e sulfato e até mesmo por metais pesados, os quais podem ser lixiviados e degradar a qualidade de águas subterrâneas (FUESS; GARCIA, 2014; MORAES *et al.*, 2014). Vale observar que o seu lançamento em coleções hídricas é proibido no país desde 1978 (Portaria MINTER nº 323/1978), embora a vinhaça muitas vezes chegue, direta ou indiretamente, às águas superficiais, tornando-as impróprias para consumo (van HAANDEL, 2000).

Além da fertirrigação, a vinhaça pode ter outras destinações, dentre as quais a digestão anaeróbia, que remove eficientemente a DBO e produz biogás. O seu alto teor de matéria orgânica biodegradável (DBO₅/DQO superior a 0,6, com base nos dados da Tabela 3.1) confere a esse efluente um grande potencial para a metanização. Segundo Moraes *et al.* (2014), uma vantagem adicional da digestão anaeróbia da vinhaça, da perspectiva da proteção do solo, é a redução do teor de sulfato (que é convertido em sulfeto), o que diminui os possíveis impactos causados pela sua disposição. Ou seja, a vinhaça tratada poderia ser utilizada para fertirrigação, com aproveitamento dos nutrientes e diminuição dos impactos negativos sobre o ambiente. No entanto, é importante destacar que nutrientes e sais, presentes na vinhaça em concentrações muito acima das desejáveis para a fertilização do solo, não são eficientemente removidos no processo de digestão anaeróbia. Consequentemente, é recomendável o pós-tratamento do efluente para que compostos potencialmente prejudiciais sejam removidos antes da fertirrigação (FUESS; GARCIA, 2014).

¹ A área cultivável destinada unicamente à disposição da vinhaça, com maiores riscos de lixiviação e contaminação de águas subterrâneas.

Além das vantagens mencionadas no parágrafo anterior, a digestão anaeróbia da vinhaça pode originar quantidades significativas de biogás e alcançar uma eficiência de remoção de DQO superior a 80%, o que equivale à produção de 100 kg de metano por m³ de etanol produzido (van HAANDEL, 2005). Segundo o autor, cada m³ de etanol pode gerar cerca de 500 kWh, se o metano for direcionado para a produção de energia elétrica (considerando uma eficiência de geração de 35 a 40%). O biogás pode então ser utilizado na cogeração de vapor e eletricidade, em motores de combustão interna e como gás veicular, de forma a suprir as necessidades energéticas da própria usina ou gerar lucros a partir de sua comercialização (MORAES *et al.*, 2014). Além dos benefícios advindos do aproveitamento energético de subprodutos ricos em energia, a digestão anaeróbia da vinhaça oferece a possibilidade de reciclagem dos nutrientes e diminuição das emissões de gases de efeito estufa (GEE), a qual é devida tanto à substituição de combustíveis fósseis por biogás quanto à redução de GEE advindos da decomposição da matéria orgânica, quando da sua aplicação *in natura* no solo. No estudo realizado por Moraes *et al.* (2014), o potencial de geração de energia do biogás pelas plantas brasileiras pode ser comparável à capacidade de algumas hidrelétricas (como Marimbondo, em Furnas), chegando a 7,5% da energia produzida em Itaipu, uma das maiores hidrelétricas do mundo, além de ser uma prática que permite ganhos adicionais oriundos da comercialização de créditos de carbono. O biogás já foi avaliado como uma das fontes de energia que oferecem menor impacto ambiental e mais benefícios em termos de eficiência de aproveitamento (FEHRENBACH *et al.*, 2008 *apud* WEILAND, 2010). No entanto, no tratamento anaeróbio de efluentes com alta concentração de SO₄²⁻, como a vinhaça, pode ocorrer a competição entre bactérias redutoras de sulfato e os microrganismos fermentadores, acetogênicos e metanogênicos. A relação DQO: SO₄²⁻ possui grande influência sobre essa dinâmica. Quando inferior a 7, pode ocorrer uma inibição acentuada da metanogênese, porém, quando a razão é superior a 10 (como é o caso da vinhaça, com base os valores da Tabela 3.1), grande parte do sulfeto gerado será removido da fase líquida, diminuindo seus efeitos tóxicos sobre a microbiota (CHERNICHARO, 2007).

Com base no que foi dito acima, conclui-se que o uso racional dos produtos gerados pela indústria sucroalcooleira pode trazer diversos benefícios, tanto do ponto de vista econômico, em termos do rendimento para as usinas, como ambiental, a partir da redução do uso de fontes de energia não renováveis e da emissão de GEEs, o que justifica pesquisas que visem à maior compreensão e à melhoria dos processos envolvidos na utilização desses recursos.

3.1.2 O biogás e a problemática do sulfeto de hidrogênio

O tratamento anaeróbio possui diversas vantagens, tais como baixos custos operacionais, menores requisitos de área e baixa produção de lodo, além de um significativo potencial energético devido à formação do biogás (CHERNICHARO, 2007). No entanto, no caso de efluentes com altas concentrações de sulfato (SO_4^{2-}), como é o caso da vinhaça, pode ocorrer uma geração expressiva de H_2S , devida à redução de SO_4^{2-} mediada por bactérias reductoras de sulfato, presentes no reator anaeróbio. Para o aproveitamento energético do biogás, esse contaminante precisa ser removido.

O biogás possui, em média, 65% de metano (CH_4) e 35% de CO_2 , além de diversos outros componentes em menores concentrações, tais como siloxanos, H_2S , NH_3 e compostos orgânicos voláteis, sendo o sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico (H_2S) o seu principal contaminante. A composição do biogás depende do tipo e da concentração da matéria orgânica e também das condições físico-químicas do reator anaeróbio (NOYOLA *et al.*, 2006). A Tabela 3.2 apresenta a composição do biogás a partir da digestão de diferentes resíduos orgânicos (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2008; SALOMON *et al.*, 2009). No caso do biogás proveniente da vinhaça, as concentrações de H_2S no podem alcançar valores muito superiores aos reportados na referida tabela, acima de 3% (dados não publicados), o que consiste em um grande desafio à sua utilização para fins energéticos.

Tabela 3.2: Composição típica do biogás

Componente	Concentração
CH_4	40 a 75 %
CO_2	25 a 40 %
H_2	1 a 3 %
N_2	0,5 a 2,5 %
O_2	0,1 a 1 %
H_2S	0,0001 a 1 %
NH_3	0,1 a 0,5 %
CO	0,0 a 0,1 %
H_2O	Variável
Siloxanos	0 a 50 mg/m^3

Fonte: adaptada de Deublein e Steinhauser (2008) e Salomon e Lora (2009).

O sulfeto de hidrogênio é um gás inflamável, tóxico, incolor e de odor repugnante (NOYOLA *et al.*, 2006). A meia-vida do H_2S no ar varia de 12 a 37 horas, porém variações de temperatura e a presença de certos poluentes podem alterar esses valores (WANG, 2012). Os sintomas de envenenamento por H_2S incluem dor de cabeça, tontura e debilidade

(MANAHAN, 2001), e concentrações superiores a 2.000 ppmv podem levar à morte por paralisia do sistema respiratório (NOYOLA *et al.*, 2006). Além dos seus efeitos tóxicos, que podem resultar inclusive na inibição dos microrganismos presentes no reator anaeróbio, o H₂S pode ser convertido a ácido sulfúrico (H₂SO₄), responsável pela corrosão das estruturas de aproveitamento do biogás, e também a dióxido de enxofre (SO₂), que é tóxico e está associado à chuva ácida (ABATZOGLOU; BOIVIN, 2009). O H₂S é um gás bastante solúvel em água (2650 mg.L⁻¹ a 35°C) e em solução, se comporta como um ácido fraco (ácido sulfídrico), que se dissocia parcialmente em HS⁻ e H⁺ em um processo altamente dependente do pH, conforme representado nas equações 3.1 e 3.2. Vale observar que o H₂S é mais tóxico do que suas formas ionizadas, de forma que a sua toxicidade também está relacionada ao pH, dentre outros fatores (METCALF; EDDY, 2013). A partir das equações abaixo, é possível depreender que a dissociação do H₂S em HS⁻, a uma determinada temperatura (30°C, no caso), é favorecida quando o pH é superior a 7. Assim, a quantidade de H₂S que passa para a fase líquida é maior quando o pH é mais básico, devido ao deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da formação de espécies dissociadas (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; REVAH, 2007):



Tais características são importantes quando se realiza a descontaminação do biogás através de tecnologias baseadas na solubilização do H₂S, como é o caso deste estudo. Além disso, nos processos biológicos de dessulfurização do biogás, os microrganismos que oxidam sulfeto possuem um papel de destaque, e são discutidos brevemente a seguir.

3.2 O papel dos microrganismos no oxidação de compostos sulfurados.

O enxofre é um dos elementos mais abundantes na Terra. Seu ciclo é bastante complexo, uma vez que possui diversos estados de oxidação (de -2 a +6) e pode ser observado nos estados sólido, líquido e gasoso à temperatura ambiente, embora seja mais frequentemente encontrado como pirita (FeS₂), gipsita (CaSO₄) e íon sulfato (SO₄²⁻) (HAO *et al.*, 2014). O enxofre também é um elemento essencial à vida, embora apenas uma pequena parte esteja incorporada à biomassa (cerca de 1% do peso seco dos organismos). Ele está presente na estrutura de aminoácidos (cisteína e metionina), de coenzimas (tais como biotina e tiamina) e de metaloproteínas (grupamentos S-Fe), entre outras moléculas (SIEVERT *et al.*, 2007; MAKI,

2013). As diversas transformações químicas e biológicas do ciclo do enxofre estão representadas na Figura 3.3 e os estados de oxidação do enxofre nos principais compostos sulfurados se encontram na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Estados de oxidação dos enxofre em diferentes compostos

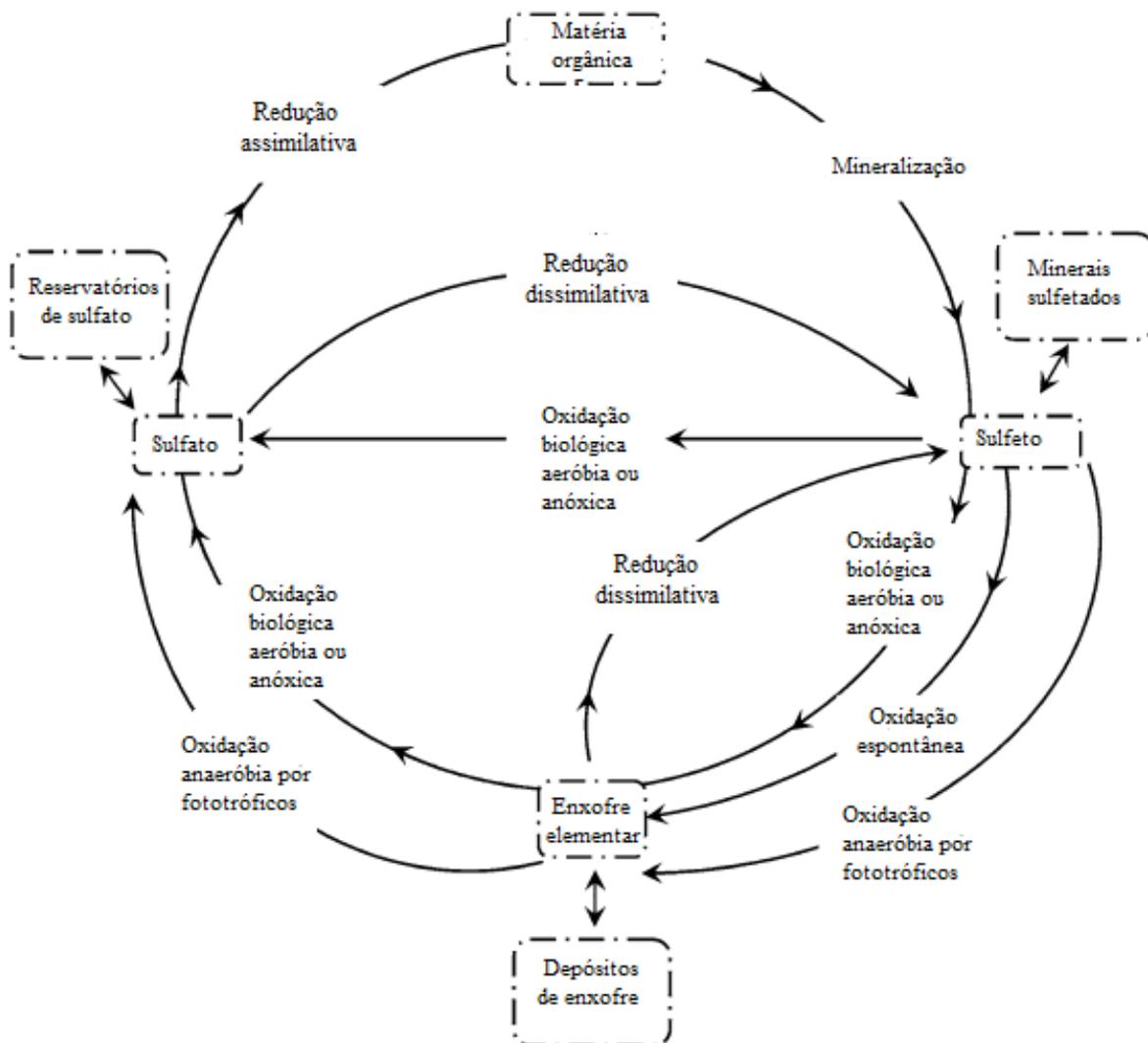
Composto	Estado de oxidação
Sulfeto (H ₂ S)	-2
Enxofre elementar (S ⁰)	0
Tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻)	+2
Dióxido de Enxofre (SO ₂)	+4
Sulfito (SO ₃ ²⁻)	+4
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	+6
Enxofre orgânico (grupo sulfidril ou R- SH)	-2

Fonte: Madigan *et al.* (2010).

Os microrganismos possuem um papel fundamental no ciclo do enxofre e podem utilizar compostos sulfurados inorgânicos para sintetizar moléculas orgânicas, em reações dependentes de energia, ou produzir energia a partir da oxidação desses compostos (SIEVERT *et al.*, 2007; WANG, 2012). Como ocorre com os demais elementos, o ciclo do enxofre possui reações oxidativas e redutivas. No entanto, o equilíbrio entre essas partes nem sempre acontece, levando ao acúmulo de espécies como o sulfeto de hidrogênio (MUYZER, KUENEN; ROBERTSON, 2013). As conversões são realizadas principalmente por bactérias, embora certas espécies de *Archaea* também sejam capazes de metabolizar alguns compostos de enxofre. Estas são, em sua maioria, hipertermofílicas e restritas a ambientes nos quais prevalecem altas temperaturas (SIEVERT *et al.*, 2007).

Segundo Wang (2012), as conversões redutivas podem ser divididas em processos denominados assimilativos e dissimilativos. Nos primeiros, compostos de enxofre oxidados são absorvidos pelas células e convertidos às formas mais reduzidas, que podem ser incorporadas a moléculas orgânicas. Já nos processos dissimilativos, ocorre a redução de compostos de enxofre oxidados a sulfeto (HS⁻/S²⁻), sem que este seja incorporado pelas células, como a respiração anaeróbia realizada por bactérias redutoras de sulfato (BRS). Este é um dos mais antigos processos de obtenção de energia no planeta e estima-se que mais de 50% da mineralização da matéria orgânica em sedimentos marinhos sejam devidos às reações de redução heterotrófica do sulfato; assim, é possível observar que o ciclo do enxofre está

intimamente relacionado aos ciclos de outros elementos, como o do carbono, mas também do fósforo, do nitrogênio e do ferro (MUYZER; STAMS, 2008; GREIN *et al.*, 2013).



Fonte: adaptada de Muyzer, Kuenen e Robertson (2013).

Figura 3.3: Ciclo do enxofre.

As reações de oxidação de compostos sulfurados reduzidos são realizadas pelas bactérias sulfo-oxidantes, as quais são classificadas, basicamente, em bactérias sulfurosas incolores, verdes e púrpuras. As primeiras são, de forma geral, quimioautótroficas e microaerofílicas (vivem em ambientes com concentrações limitadas de O_2); já as púrpuras e verdes são fotoautotróficas anaeróbias (GHOSH; DAM, 2009). Muitas bactérias sulfo-oxidantes são capazes de formar glóbulos de enxofre intra ou extracelulares, de acordo com a espécie, porém sua finalidade ainda não foi totalmente elucidada (MAKI, 2013). A Tabela 3.4 sintetiza

a diversidade metabólica encontrada entre as bactérias envolvidas na oxidação de compostos de enxofre.

Tabela 3.4: Diversidade metabólica de bactérias oxidadoras de enxofre

Grupo	Conversão de compostos sulfurados	Condições ambientais	Habitats	Gêneros
Bactérias incolores (Quimiolitotróficas)	$H_2S \rightarrow S^0$ $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ $S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$	Interface $H_2S - O_2$	Fendas hidrotermais, camadas de lodo lacustre, esgotos, sedimentos orgânicos ricos em matéria orgânica em decomposição.	<i>Thiobacillus</i> <i>Thiomicrospira</i> <i>Achromatium</i> <i>Beggiatoa</i> <i>Thiothrix</i>
Bactérias sulfurosas verdes e púrpuras (Fototróficas)	$H_2S \rightarrow S^0$ $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$	Anaeróbias, luz, H_2S	Regiões anóxicas iluminadas, lagos, fontes sulfurosas.	<i>Chlorobium</i> <i>Chlorobaculum</i> <i>Ectothiorhodospira</i> <i>Halorhodospira</i> <i>Chromatium</i>

Fonte: Madigan (2010).

Os principais grupos envolvidos na oxidação do sulfeto são discutidos nos próximos tópicos. É importante destacar que, uma vez que o sistema estudado neste trabalho não é diretamente exposto à luz, é esperada uma maior abundância das bactérias sulfurosas incolores, motivo pelo qual maior enfoque será dado a esse grupo.

3.2.1 Bactérias sulfurosas incolores

A denominação “bactérias sulfurosas incolores” se refere aos procariotos sem pigmentos fotossintetizantes, capazes de usar compostos sulfurados reduzidos para obter energia (entre as quais *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Sulfolobus*, *Beggiatoa*, *Thiobacterium* e *Achromatium*), e inclui espécies de *Bacteria* e de *Archaea*, em menor proporção. Há também aquelas que, embora não tenham sido originalmente integradas ao grupo, são capazes de crescer sobre compostos reduzidos de enxofre, tais como *Pseudomonas*, *Hydrogenobacter* e *Paracoccus*. Apesar do adjetivo “incolores”, o alto teor de citocromos presente nas células de algumas espécies pode conferir uma coloração rosada ou marrom às colônias. Trata-se de um grupo altamente heterogêneo morfológica, fisiológica e ecologicamente, e muitas vezes não há relações taxonômicas próximas entre as espécies (MUYZER, KUENEN; ROBERTSON, 2013). A maioria vive em pH neutro e em condições mesotérmicas, mas há exceções. *Thiobacillus ferrooxidans*, por exemplo, é capaz de crescer em condições extremamente

ácidas (pH em torno de 1). Ainda segundo os autores, quanto à fonte de carbono, há representantes autotróficos, facultativos e heterotróficos.

São conhecidos várias sistemas biológicos de oxidação de compostos de enxofre em microrganismos quimiolitotróficos (MADIGAN, 2010). Em alguns, o substrato inicial (H_2S , S° ou $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) é convertido a sulfeto (SO_3^{2-}), o qual é posteriormente oxidado a sulfato. Alternativamente, no sistema denominado *Sox*, encontrado em *Paracoccus pantotrophus* (dentre várias outras bactérias sulfo-oxidantes quimiolitotróficas e algumas fototróficas), o sulfeto é oxidado diretamente a sulfato. Os elétrons são então direcionados pela cadeia transportadora até o O_2 . A aparente similaridade nas rotas metabólicas disfarça o seu alto nível de variabilidade entre os táxons. Além dos compostos sulfurados, algumas espécies podem obter energia da oxidação de outros compostos inorgânicos, tais como ferro e hidrogênio. A variação entre os aceptores de elétrons também ocorre. A maioria das bactérias sulfurosas incolores é aeróbia, embora haja espécies capazes de crescer anaerobicamente utilizando aceptores de elétrons alternativos, como o nitrato. A Tabela 3.5 apresenta algumas das reações realizadas por essas bactérias.

Tabela 3.5: Reações realizadas por bactérias sulfurosas incolores

Reação	ΔG° (kJ/reação)
$\text{H}_2\text{S} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$	-798,2
$\text{H}_2\text{S} + 0,5\text{O}_2 \rightarrow \text{S}^\circ + \text{H}_2\text{O}$	-209,4
$\text{S}^\circ + 1,5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$	-587,1

Fonte: Tang (2009) e Muyzer, Kuenen e Robertson (2013).

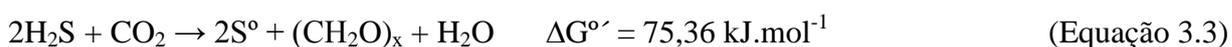
Apesar da ampla literatura disponível acerca de microrganismos sulfo-oxidantes em ambientes naturais, há necessidade de maior compreensão da dinâmica da população microbiana e de como a biomassa responde a correntes de gás com altas concentrações de H_2S (MAESTRE *et al.*, 2010). Estudos realizados em diferentes sistemas de dessulfurização biológica mostraram que a diversidade de bactérias nesse tipo de sistema é menor do que a observada em ambientes naturais ricos em compostos sulfurados e pode diminuir ao longo do tempo de operação (MAESTRE *et al.*, 2010). Alguns dos gêneros de bactérias sulfurosas incolores encontrados pelos autores através de clonagem do gene do rRNA 16S foram *Thiobacillus*, *Thiomonas*, *Sulfuricurvum*, *Thiothrix* e *Halothiobacillus* (o sistema estudado foi um biofiltro percolador tratando uma mistura gasosa sintética semelhante ao biogás). Em um estudo sobre a população de bactérias sulfo-oxidantes no *headspace* de um digestor

microaerado tratando lodo de ETE, foram encontradas, através de DGGE, bactérias dos gêneros *Arcobacter*, *Sulfuricurvum*, *Acidithiobacillus*, *Acinetobacter* e *Rhodococcus*, relacionadas à remoção de H₂S (RAMOS *et al.*, 2014).

Neste trabalho, é esperada a identificação de organismos frequentemente encontrados em sistemas de dessulfurização, como os dos gêneros citados anteriormente. Porém, condições operacionais particulares ao sistema investigado, tais como a possibilidade de um grande aumento da carga de H₂S, podem levar ao desenvolvimento de uma microbiota bastante específica, capaz de resistir a maiores concentrações de sulfeto. Uma vez que o desempenho de sistemas que utilizam processos de dessulfurização biológicos está diretamente relacionado à estrutura e à dinâmica da população de microrganismos, o estudo da comunidade microbiana é extremamente importante.

3.2.2 Bactérias sulfurosas verdes e púrpuras

As bactérias sulfurosas verdes e púrpuras² fazem fotossíntese anoxigênica, processo em que a oxidação de compostos inorgânicos reduzidos, como o H₂S, é acoplada à redução de moléculas de carbono inorgânicas, na ausência de O₂. O processo é representado na equação 3.7 (TANG *et al.*, 2009). Entre os seus principais representantes, estão os gêneros *Chromatium*, *Thiococcus*, *Thiospirillum*, e *Halorhodospira* (púrpuras) e *Chlorobium*, *Prosthecochloris*, *Pelodictyon*, *Ancalochloris* e *Chloroherpeton* (verdes).



Diferentemente da fotossíntese oxigênica, que produz O₂ a partir da oxidação da água, a fotossíntese anoxigênica, como o próprio nome diz, não libera oxigênio (MADIGAN *et al.*, 2010). O poder redutor necessário para a fixação do carbono nas bactérias sulfurosas púrpuras e verdes provém do H₂S, embora outros compostos de enxofre, tais como tiosulfato e enxofre elementar, também possam ser utilizados.

As bactérias verdes e púrpuras são semelhantes em relação às suas necessidades nutricionais, embora difiram em alguns aspectos, sobretudo em relação à natureza estritamente fototrófica, ao tipo de bacterioclorofila que possuem e às estruturas celulares relacionadas à captação de

² Há também bactérias verdes e púrpuras não sulfurosas, mas maior enfoque será dado às sulfurosas.

luz (GHOSH; DAM, 2009). As púrpuras possuem, em sua maioria, a bacterioclorofila *a* como pigmento fotossintético, o qual tem uma absorção máxima no intervalo de 800 a 925 nanômetros. Já as bactérias verdes possuem diferentes tipos de bacterioclorofilas, que atuam nos comprimentos de onda entre 705 e 755 nm (MADIGAN *et al.*, 2010). As bactérias púrpuras possuem maior flexibilidade metabólica, e algumas espécies, como *Allochromatium vinosum*, são capazes de realizar a oxidação aeróbia de compostos de enxofre reduzidos e crescer quimiotroficamente no escuro. No entanto, as bactérias verdes são capazes de captar a luz de forma mais eficiente (GHOSH; DAM, 2009).

Um terceiro grupo de microrganismos capazes de realizar fotossíntese anoxigênica são as cianobactérias. Apesar de seu metabolismo predominantemente aeróbio, na presença de luz e de sulfeto algumas espécies podem realizar a fotossíntese anoxigênica (COHEN *et al.*, 1986, *apud* STAL; MOEZELAAR, 1997).

Para estudar os microrganismos, há técnicas que envolvem cultivo e isolamento e técnicas independentes de cultivo. As últimas se baseiam frequentemente na análise do DNA de microrganismos presente em uma amostra ambiental, e incluem o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), e de forma cada vez mais presente, as técnicas baseadas em sequenciamento massivo paralelo, que são analisadas a seguir.

3.2.3 Técnicas utilizadas no estudo de comunidades microbianas

É reconhecido atualmente pelos microbiologistas que apenas uma pequena parcela da diversidade microbiana presente em um ambiente pode ser estudada através de métodos dependentes de cultivo. Dados da literatura apontam que apenas 1% dos microrganismos pode ser cultivado em laboratório, devido a diversos fatores, tais como desconhecimento acerca das suas necessidades nutricionais, características específicas do ambiente que não são reproduzíveis em laboratório e interação com outros organismos presentes naquele habitat (XU, 2006; SU *et al.*, 2012). Portanto, técnicas independentes de cultivo foram desenvolvidas para que a diversidade microbiana pudesse ser estudada de forma mais abrangente. Essas técnicas se baseiam em marcadores moleculares, por exemplo, variações na sequência do gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossomal, bastante informativo em termos da caracterização da diversidade microbiana (MADIGAN *et al.*, 2010). Uma vez que neste trabalho foram utilizadas as técnicas de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

(DGGE) e de sequenciamento massivo paralelo, uma breve descrição das mesmas é realizada a seguir.

3.2.3.1 DGGE

Dentre as técnicas independentes de cultivo, os *fingerprints* genéticos, que incluem a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) permitem a visualização de um padrão ou perfil da diversidade genética de uma amostra, com base em variações na sequência de DNA entre os microrganismos (MUYZER; SMALLA, 1998). No DGGE, os fragmentos de DNA migram através de um gel que possui uma concentração crescente de um agente químico desnaturante (como uma mistura de ureia e formamida), o qual altera a conformação da molécula de DNA rompendo as ligações de hidrogênio que mantém a dupla hélice unida. As regiões do fragmento em que ocorre a desnaturação (chamadas de *melting domains*) dependem da composição dos nucleotídeos: regiões ricas em A/T desnaturam mais facilmente que as regiões com maior conteúdo de G/C (BAKER; HARAYAMA, 2004). Assim, fragmentos de mesmo tamanho, porém com sequências diferentes, podem ser separados com base na mobilidade eletroforética³ reduzida de moléculas de DNA parcialmente desnaturadas, ou seja, variações nos nucleotídeos fazem com que fragmentos com sequências diferentes tenham sua migração interrompida em pontos distintos do gel (GREEN *et al.*, 2009). Embora organismos raros dificilmente sejam detectados através do DGGE, a técnica possui um bom poder de resolução, permite uma comparação rápida entre diversas amostras e é bastante utilizada no estudo da diversidade microbiana (van ELSAS; BOERSMA, 2011). Após a realização do DGGE, é possível analisar a imagem do gel em programas específicos, que permitem, por exemplo, a comparação entre as amostras com base no perfil das bandas. Também é possível excisar as bandas para posterior sequenciamento (determinação da sequência de nucleotídeos – A,G,T,C – em uma molécula de DNA) e identificação dos microrganismos.

3.2.3.2 Sequenciamento de nova geração

As técnicas da genômica (área de pesquisa destinada ao estudo e caracterização dos genomas⁴) aplicadas a amostras ambientais complexas vêm se tornando cada vez mais

³ Eletroforese: técnica para separação de moléculas, no caso o DNA, baseada na aplicação de um campo elétrico a uma matriz porosa (gel) contendo a molécula de interesse. O DNA, por possuir carga negativa, migra em direção ao pólo positivo. Os fragmentos de menor tamanho, ou no caso do DGGE, que não se desnaturaram, migram com maior velocidade, e são visualizados em regiões inferiores do gel.

⁴ O complemento básico de DNA, organizado em cromossomos, é em cada organismo, chamado de genoma.

importantes no estudo da biodiversidade. Como dito anteriormente, a maioria dos microrganismos não pode ser estudada através de métodos dependentes de cultivo, de forma que grande parte das pesquisas sobre diversidade microbiana atualmente são realizadas através de técnicas independentes de cultivo, como a análise de genes específicos. Essas técnicas foram significativamente favorecidas com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de DNA, as quais possibilitaram o estudo em larga escala da microbiota em um determinado ambiente, além de possuírem as mais variadas aplicações em diversas áreas da ciência (SHOKRALLA *et al.*, 2012). Uma breve contextualização sobre algumas dessas tecnologias é realizada a seguir.

O método convencional de sequenciamento, conhecido como método de Sanger, anunciado em 1977 por Sanger e colaboradores (SANGER *et al.*, 1977), foi a principal tecnologia de sequenciamento dentre as consideradas de “primeira geração”. Ainda hoje é muito utilizada, embora os instrumentos para sua realização tenham passado por muitas modificações e melhorias (LIU *et al.*, 2012). Essa técnica permite, por sua vez, o sequenciamento de sequências individuais, o que a torna cara e laboriosa quando aplicada a estudos nos quais se pretende analisar uma amostra composta por diversas espécies microbianas, que pode conter misturas de DNA de milhares de indivíduos.

Estudos de ecologia microbiana e diversas outras áreas foram significativamente otimizados com o desenvolvimento de tecnologias capazes de sequenciar o DNA de forma massivamente paralela, o que as tecnologias denominadas de sequenciamento de última geração ou de nova geração (SNG, do inglês NGS, *next generation sequencing*), introduzidas em 2005, têm feito com custos progressivamente menores (METZKER, 2010). Apesar de o termo “sequenciamento de última/nova geração” não ser preciso, uma vez que se refere genericamente a diferentes tecnologias desenvolvidas após o sequenciamento de Sanger, as quais são subdivididas em 2^a, 3^a e 4^a gerações, é um termo muito utilizado na literatura, motivo pelo qual será utilizado neste trabalho. Após o sequenciamento, a comparação das sequências obtidas (*reads*) com uma base de dados permite a identificação dos microrganismos presentes na amostra com um alto nível de confiança e de forma menos laboriosa do que as técnicas de genômica convencionais, como a clonagem. No entanto, devido à grande quantidade de dados gerada por essas técnicas, recursos computacionais significativos são necessários para analisar os resultados (SHOKRALLA *et al.*, 2012).

Atualmente, há diversas tecnologias de SNG disponíveis no mercado, desenvolvidas por diferentes empresas, tais como *Roche*, *Life Technologies* e *Illumina*, a qual tem dominado o mercado nos últimos anos (NIEDRINGHAUS *et al.*, 2011). As técnicas diferem em relação à química utilizada nas reações de sequenciamento, ao número e ao tamanho das sequências obtidas (*reads*), ao custo e à taxa de erros, entre outros fatores. Porém, de forma geral, todas elas compartilham duas etapas principais: a preparação das bibliotecas e a detecção dos nucleotídeos incorporados (SHOKRALLA *et al.*, 2012). A Tabela 3.6 apresenta uma comparação entre plataformas de SNG de bancada disponíveis atualmente e o método de Sanger (JÜNEMANN *et al.*, 2013; SHOKRALLA *et al.*, 2012;GLENN, 2011). É possível observar que a plataforma Miseq gera uma grande quantidade de dados com o menor custo relativo dentre as plataformas e kits analisados, motivo pelo qual foi escolhida neste trabalho.

Tabela 3.6: Plataformas de SNG de bancada e sequenciamento de Sanger

Empresa	Roche	Illumina	Life Technologies	Applied Biosystems
Sequenciador	454 GS Jr.	MiSeq (kit v3)	Ion Torrent-PGM (318 chip v2)	3.730 x 1
Bases/read	400	600	400	400-900
Output/corrida	~35 Mb	~ 15 Gb	~ 2 Gb	~60 Kb
Taxa de erro (%)	1	~0.1	~1	0,1-1
Custo médio dos reagentes por gigabase (USD)	19.540,00	109,24	460.00	2.307.692,31

Fontes: Glenn (2011⁵); Shokralla *et al.* (2012); Jünemann *et al.* (2013).

Estudos que objetivam realizar a identificação taxonômica de microrganismos podem utilizar o sequenciamento massivo de regiões específicas do genoma, como o gene da subunidade 16S do RNA ribossomal⁶ (no caso de procariotos), ou o sequenciamento global do material genético. No entanto, a última abordagem é mais comumente utilizada quando o propósito do sequenciamento é fazer uma análise funcional dos genes presentes na amostra.

3.2.4 Processos de dessulfurização do biogás

Há várias alternativas disponíveis para a remoção do H₂S do biogás, as quais são classificadas como físico-químicas ou biológicas (ABATZOGLOU; BOIVIN, 2009). A escolha da tecnologia mais apropriada para a remoção de um contaminante gasoso depende de vários

⁵ Dados atualizados com base no ano de 2014. Disponíveis em: <<http://www.molecularecologist.com/next-gen-fieldguide-2014/>>.

⁶ O gene do RNA ribossomal de procariotos é composto por 3 subunidades, quais sejam, 5S, 16S e 23S. A 16S é a mais utilizada na identificação de procariotos e é composta por 9 regiões hipervariáveis (V1 a V9), que permitem a identificação dos microrganismos.

fatores, tais como o uso previsto para o biogás, o tipo e a concentração do contaminante, a temperatura, a composição e o volume da corrente a ser tratada, além de critérios econômicos e ambientais (JENSEN; WEBB, 1995). Para caldeiras e motores de combustão interna, por exemplo, os requisitos de qualidade do biogás se referem sobretudo ao H_2S e a recomendação é que seu conteúdo não ultrapasse 1000 ppm_v. Já para utilização como gás veicular e injeção na rede de gás natural, os critérios são mais rigorosos. A concentração de H_2S nesses casos deve ser inferior à faixa de 4 a 17 ppm_v, de acordo com variações locais (RASI *et al.*, 2011). Tais exigências devem ser levadas em conta na escolha da tecnologia de dessulfurização. Vale reiterar que há diversos possíveis contaminantes no biogás, como NH_3 e siloxanos, porém o H_2S é foco deste trabalho.

Basicamente, os processos de dessulfurização envolvem a remoção do H_2S durante a digestão no interior do reator anaeróbio (através da adição de reagentes químicos ou da manutenção de condições propícias a sua oxidação) ou do biogás gerado após a digestão (RYCKEBOSCH *et al.*, 2011). Os primeiros são exemplificados pela introdução, no digestor, de oxigênio puro ou ar (microaeração) ou pela adição de cloreto de ferro. Já a dessulfurização após a digestão inclui, dentre os métodos físico-químicos, a separação por membranas, a absorção (como em solução de NaOH), a adsorção (com carvão ativado, por exemplo) e a oxidação catalítica com Fe (III), e dentre os métodos biológicos, os biofiltros, biofiltros percoladores e biodiscos. No sistema estudado neste trabalho, a dessulfurização é realizada após a digestão e é baseada em princípios físico-químicos e biológicos, os quais serão descritos posteriormente.

Para a remoção do H_2S , de forma geral, a purificação química é a tecnologia mais frequentemente empregada, devido ao curto tempo de contato, à alta eficiência e à capacidade de tratar cargas variáveis (MANNUCCI *et al.*, 2012). No entanto, são necessárias grandes quantidades de reagentes, o que aumenta os custos operacionais e gera resíduos que precisam de destinação adequada. Comparados aos métodos físico-químicos, os tratamentos biológicos possuem algumas vantagens, tais como maior simplicidade operacional, menores custos e geração reduzida de subprodutos indesejáveis (NOYOLA *et al.*, 2006). Estudos anteriores já reportaram redução de custos da ordem de 62% em sistemas de dessulfurização biológica quando comparados aos de absorção química (BURGESS *et al.*, 2001 *apud* RAMOS *et al.*, 2014). Porém, frequentemente um residual de H_2S persiste após o tratamento biológico (principalmente quando sua concentração é alta), além deste ocasionar uma diluição do biogás nos casos em que é realizada a introdução de ar (o oxigênio é necessário às reações

bioquímicas de oxidação do sulfeto⁷, realizadas pelas bactérias sulfurosas incolores). Dependendo do uso previsto para o biogás, essas impurezas podem demandar uma etapa adicional de tratamento, o que implica em maiores custos e geração de resíduos (RYCKEBOSCH *et al.*, 2011).

3.2.4.1 A microaeração

Embora o conceito apresente variações entre os autores, há um consenso de que microaeração se trata, basicamente, da introdução de certa quantidade de oxigênio em um sistema predominantemente anaeróbio, na forma de ar ou oxigênio puro, com o objetivo de promover a oxidação biológica do H₂S a S⁰ ou SO₄²⁻ por bactérias quimiolitotróficas (BOTHEJU; BAKKE, 2011, RAMOS *et al.*, 2013). A concentração de O₂ no ambiente pode ser controlada de forma a promover a oxidação completa (até sulfato) ou incompleta (a enxofre elementar) do H₂S por essas bactérias.

A microaeração pode ser realizada no próprio reator, conforme mencionado anteriormente, com o objetivo de reduzir a formação de H₂S, porém a introdução de oxigênio deve ser bastante controlada, de forma a não interferir no processo de digestão anaeróbia. Anaeróbios estritos necessitam de baixo potencial redox no meio para poderem se desenvolver adequadamente, e o O₂ pode elevar esse potencial. Por outro lado, a microaeração pode melhorar a performance de reatores anaeróbios (BOTHEJU; BAKKE, 2011). A presença controlada de oxigênio pode facilitar a degradação de compostos recalcitrantes e favorecer a hidrólise da matéria orgânica particulada, que devido à difícil solubilização, é frequentemente a etapa limitante da digestão anaeróbia (ZHU *et al.*, 2009; BOTHEJU; BAKKE, 2011).

Conforme colocado por Zitomer e Shrouf (1998) a partir de diversos estudos, alguns organismos anaeróbios podem tolerar determinadas concentrações de oxigênio por certos períodos de tempo e conviver com organismos aeróbios e facultativos. Isso é possível porque nos agregados microbianos, tais como biofilmes e grânulos, um acentuado gradiente de oxigênio é gerado devido às barreiras de difusão e ao consumo por organismos aeróbios e facultativos. Estes atuam como um “escudo” para os anaeróbios, normalmente localizados em regiões mais profundas desses agregados. Ainda segundo os autores, esses sistemas

⁷ Muitos microrganismos oxidadores de sulfeto são anaeróbios, porém os processos de dessulfurização biológica do biogás mais frequentemente utilizados empregam organismos aeróbios ou microaerófilos.

combinados podem ser energeticamente mais eficientes que os sistemas unicamente aeróbios e remover mais DBO do que os processos anaeróbios convencionais. A oxidação de sulfeto também é potencializada nessas condições, o que pode minimizar os efeitos tóxicos desse composto sobre a biomassa e inibir a geração de H₂S (van der ZEE *et al.*, 2007; BOTHEJU; BAKKE, 2011).

Deve-se destacar que a concentração de oxigênio na qual as conversões bioquímicas são estimuladas depende de diversos fatores, tais como a concentração da biomassa no reator e a composição do substrato (BOTHEJU *et al.*, 2009). Além disso, a microaeração deve ser feita cautelosamente, pois quando a concentração de metano se encontra entre 5 e 15% e a de oxigênio entre 3 e 11%, esses gases podem formar uma mistura explosiva (CAMPOS; PAGLIUSO, 1999). Assim, a microaeração realizada no próprio digestor é interessante e pode reduzir efetivamente a formação de H₂S no local de origem, porém há alguns aspectos negativos importantes que devem ser considerados. Entre eles, encontram-se a deposição de compostos de enxofre oxidados no interior do reator, que pode levar à colmatação do mesmo, a necessidade de um grande controle na mistura do O₂ com CH₄ e a possibilidade de diluição do biogás por compostos presentes no ar atmosférico (no caso de este ser a fonte de O₂).

Ramos *et al.* (2013) investigaram a viabilidade de dessulfurização em uma unidade de microaeração separada do digestor, com biogás proveniente da digestão anaeróbia do lodo de uma estação de tratamento de esgotos. Os autores concluíram que o sistema demonstrou alta eficiência de remoção (94%) e resistência às variações na carga de H₂S (de 0.22 a 0.35% v/v), além de possuir vantagens tais como menores requisitos de área, custos reduzidos e riscos de colmatação praticamente inexistentes. Apesar dos pontos positivos, ainda há poucos trabalhos sobre microaeração quando as concentrações de H₂S no biogás são muito altas, como é o caso deste estudo, em que o biogás possui aproximadamente 3% de H₂S (dados não publicados).

3.2.4.2 Processos físico-químicos e biológicos

Processos físico-químicos aliados a tratamentos biológicos têm sido bem sucedidos na dessulfurização do biogás (HO *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013; GONZÁLEZ SÁNCHEZ *et al.*, 2014). Os processos combinados podem utilizar uma etapa química de oxidação ou absorção/adsorção seguida por uma etapa biológica de regeneração de reagentes (HO *et al.*, 2013) ou alternativamente, uma etapa inicial de purificação biológica seguida de uma etapa química de polimento (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2008). No sistema estudado, o H₂S é

primeiramente solubilizado e posteriormente é biologicamente oxidado em condições de microaeração, conforme descrito a seguir.

Os métodos biológicos são baseados na oxidação do H₂S por microrganismos oxidadores de sulfeto, que pode ser realizada de diferentes formas. Bactérias fotossintetizantes anaeróbias, como as do gênero *Chlorobium*, ou quimiolitotróficas microaerófilas ou aeróbias, como *Thiobacillus*, alcançam alta eficiência de remoção de H₂S, e já são utilizadas em tecnologias patenteadas, as quais têm como vantagem adicional a possibilidade de recuperação do enxofre elementar (JENSEN; WEBB, 1995; CLINE *et al.*, 2003). O processo *Shell-Paques/THIOPAQ*TM, por exemplo, cuja primeira planta foi construída em 1993, utiliza *Thiobacillus* selecionados e atinge altíssima eficiência de remoção de sulfeto no biorreator. Nessa tecnologia, o teor de H₂S pode ser reduzido de 2.0 vol.% até 10 ppm_v, com 95 a 98% de conversão do mesmo em S⁰, através da adição controlada de oxigênio no biorreator (CLINE *et al.*, 2003).

As equações 3.3 e 3.4 representam a solubilização e a dissociação do H₂S em meio aquoso, processo facilitado pela presença de íons OH⁻ (hidroxila), que mantém o pH mais básico. As equações 3.5 e 3.6 representam a oxidação do HS⁻ realizada por microrganismos em condições de microaeração (van den BOSCH *et al.*, 2007; KRAYZELOVA *et al.*, 2014):



A partir das equações 3.5 e 3.6, é possível depreender que a menor disponibilidade de O₂ leva à oxidação parcial do sulfeto a enxofre elementar, o qual é acumulado em grânulos (sobretudo intracelulares, no caso das bactérias incolores) e pode ser então recuperado. Além disso, a formação do enxofre elementar é acoplada a regeneração dos íons OH⁻, o que é importante para a manutenção do processo representado pela equação 3.4. Já a oxidação completa ocorre quando há maior disponibilidade de O₂, e leva à formação de sulfato (Equação 3.6). Uma

síntese de alguns grupos microbianos que já foram encontrados em sistemas de dessulfurização em condições de microaeração é apresentada na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Grupos microbianos encontrados em sistemas de dessulfurização microaerados

Grupos	Condições do experimento	Referências
<i>Arcobacter</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Rhodococcus</i> sp. <i>Sulfuricurvum</i> sp. <i>Acidithiobacillus</i> sp.	Reatores anaeróbios (200 L) tratando lodo de esgoto	Ramos <i>et al.</i> (2014)
<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> <i>Sulfurimonas denitrificans</i>	Digestor anaeróbio (338 m ³) tratando dejetos bovinos	Kobayashi <i>et al.</i> (2012)
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Biofiltros percoladores (4,33 L) tratando uma mistura gasosa sintética	Ramírez <i>et al.</i> (2011)

Compostos de enxofre reduzidos, tais como o H₂S, são importantes doadores de elétrons para muitos microrganismos (MAKI, 2013). A compreensão sobre as espécies microbianas envolvidas na dessulfurização e capazes de resistir à tais concentrações de H₂S e sobre as condições ambientais que favorecem seu crescimento é, portanto, bastante relevante e pode subsidiar o aperfeiçoamento e a concepção de novas tecnologias de dessulfurização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

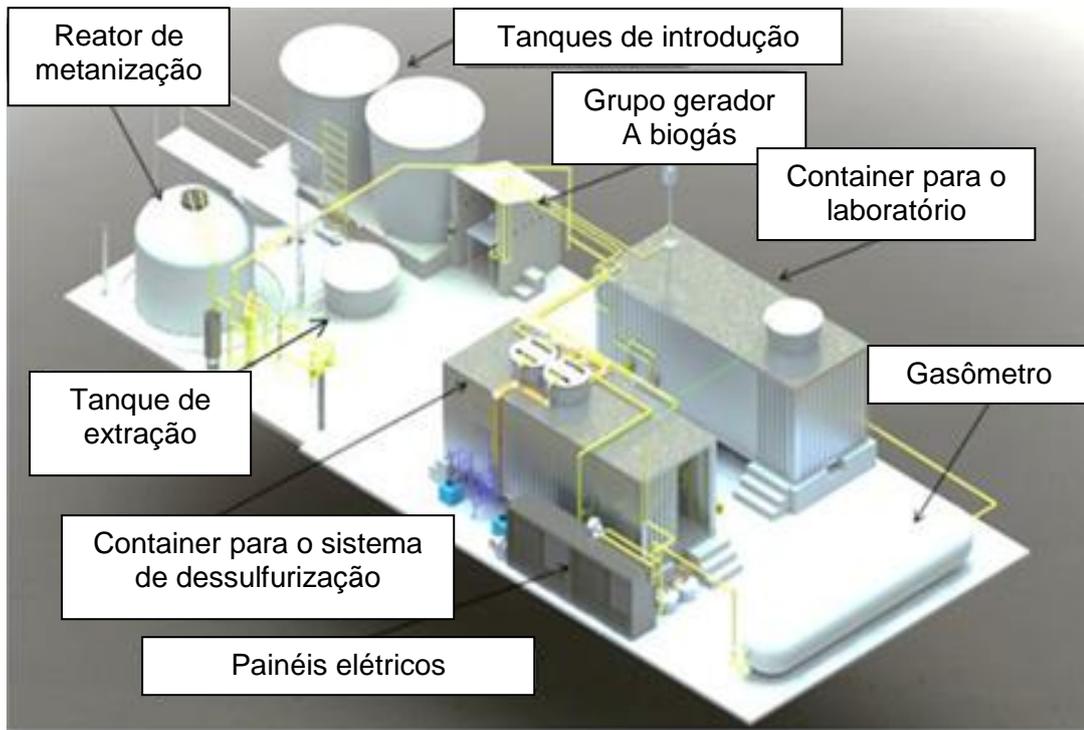
4.1 *Aparato experimental*

O sistema estudado é composto por um reator anaeróbio, o qual realiza a metanização da vinhaça, acoplado às unidades de dessulfurização, que removem o H₂S do biogás. A planta está localizada na Usina Monte Alegre, no município de Monte Belo (Minas Gerais). Este trabalho está inserido no projeto de doutorado intitulado “Desenvolvimento de um sistema de purificação do biogás visando à geração de energia elétrica a partir da metanização da vinhaça”, desenvolvido pelo aluno Luis Felipe Colturato no Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da UFMG.

4.1.1 **Descrição dos sistemas de metanização e de dessulfurização**

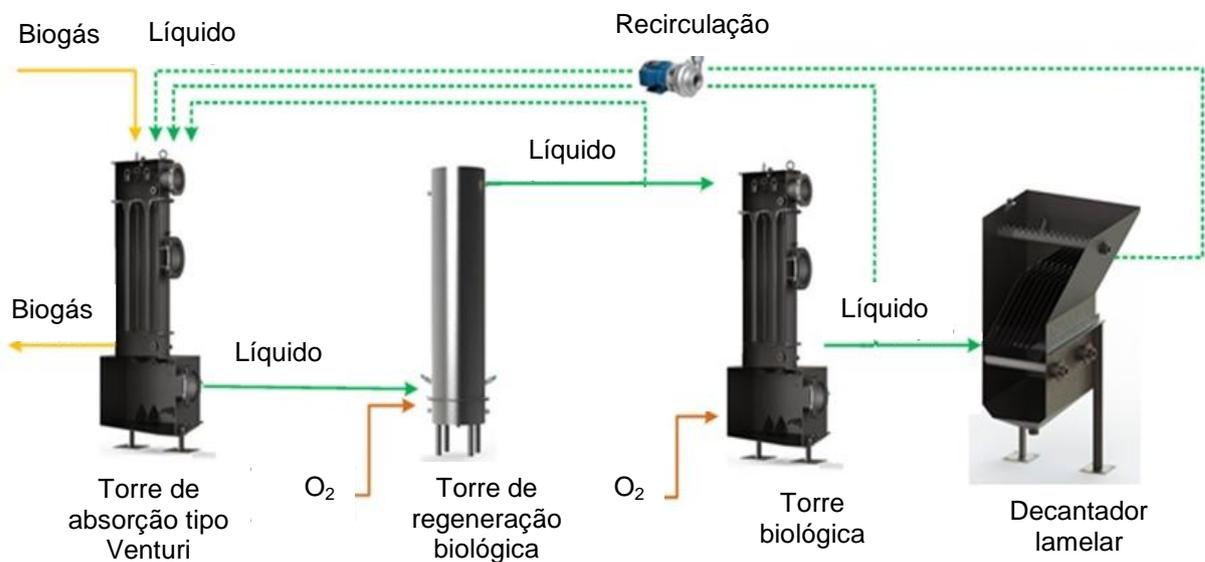
O sistema de metanização, em escala piloto, é constituído basicamente por dois tanques de introdução, os quais recebem a vinhaça produzida na usina, um reator anaeróbio e as estruturas anexas. Este possui 8,5 m³ de volume útil, é operado em condições mesofílicas (37°C) e com uma carga de orgânica média de 17,5 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. O reator é alimentado com a vinhaça armazenada nos tanques. Após a digestão, o efluente é direcionado a um reservatório (denominado tanque de extração), enquanto o biogás gerado no processo de tratamento é desumidificado e armazenado em um acumulador de gás. O sistema de metanização é composto, portanto, pelos tanques de introdução da vinhaça, o digestor anaeróbio, o tanque de extração e o acumulador de gás (Figura 4.1). Há um ponto de amostragem para monitoramento das concentrações de CH₄, CO₂, O₂ e H₂S, o qual é realizado com um analisador portátil (*Landtec GEMTM 5000 Plus*).

O sistema de dessulfurização, representando na Figura 4.2, consiste em 4 unidades que têm como objetivo promover a remoção do H₂S do biogás gerado durante a digestão anaeróbia da vinhaça. O biogás, previamente armazenado no acumulador de gás, é conduzido ao sistema de dessulfurização para tratamento. O efluente do digestor (que foi depositado no tanque de extração) é a origem do líquido que circula no sistema de dessulfurização. Portanto, o sistema de dessulfurização recebe, na fase gasosa, o biogás proveniente do acumulador, e na fase líquida, o efluente da digestão anaeróbia da vinhaça, que foi armazenado no tanque de extração, ou solução de hidróxido de sódio (NaOH), quando necessário.



Fonte: adaptada de Colturato, L.F. (acervo pessoal).

Figura 4.1: Sistemas de metanização e de dessulfurização.



Fonte: adaptada de Colturato, L.F. (acervo pessoal).

Figura 4.2: Sistema de dessulfurização do biogás.
As linhas verdes pontilhadas indicam rotas alternativas para o líquido de recirculação.

É importante destacar que as características físico-químicas do líquido de recirculação no sistema de dessulfurização são semelhantes àsquelas do líquido no tanque de extração, e que não foram utilizados meios de cultura sintéticos.

O sistema de dessulfurização, descrito com maiores detalhes a seguir, combina princípios físico-químicos e biológicos para promover a transferência do H_2S da fase gasosa para a líquida e a oxidação do sulfeto solubilizado (Figura 4.2). É constituído por uma Torre de absorção tipo Venturi (onde é realizada a transferência do sulfeto da fase gasosa para a fase líquida), uma Torre de regeneração biológica (cujo objetivo é promover a solubilização do O_2 na fase líquida, agora rica em sulfeto), uma Torre biológica (com estrutura semelhante a um biopercolador, foi concebida com o objetivo de proporcionar a regeneração de íons hidroxila, necessários para manter o pH na faixa ideal para a solubilização do H_2S) e um decantador lamelar (com a função de promover a precipitação do enxofre elementar gerado pela oxidação do sulfeto). No entanto, apesar de a oxidação de sulfeto e a regeneração de íons OH^- terem sido observadas durante os experimentos, não foi possível verificar, até o momento, a precipitação de enxofre elementar no decantador. É importante destacar que os aspectos estruturais e operacionais do sistema não são objeto de estudo deste trabalho e serão discutidos detalhadamente no projeto de doutorado citado anteriormente.

Conforme dito anteriormente, a Torre biológica foi planejada com o objetivo de proporcionar a regeneração de íons hidroxila, os quais mantêm o pH levemente básico (entre 7,2 e 9 no presente sistema). No entanto, a atividade de oxidação de sulfeto acoplada à regeneração de OH^- foi observada na unidade anterior, ou seja, na Torre de regeneração biológica. Portanto, optou-se por recolher as amostras biológicas da última e maior enfoque será dado a mesma.

4.1.1.1 Torre de absorção tipo Venturi

A torre de absorção tipo Venturi (Figura 4.2) foi construída em aço inoxidável e possui volume útil para reação de 1,2 litros, sendo dividida em três partes principais: cabeça, cilindro central, onde ocorre a reação, e o *plenum*, na parte inferior. O equipamento possui sensores de pressão, condutividade, pH, ORP e temperatura.

A entrada de biogás e de líquido acontece em fluxo concorrente por pontos localizados na lateral da cabeça. O líquido é introduzido na torre através de um bico ejetor, que possibilita o arraste do biogás, devido à alta pressão. O biogás lavado sai pela parte inferior da torre de reação, enquanto a fase líquida é direcionada às unidades subsequentes. O objetivo da Torre de

absorção tipo Venturi é, portanto, promover a transferência do H₂S da fase gasosa para a fase líquida, processo que está diretamente relacionado ao pH e conseqüentemente, à disponibilidade de íons hidroxila. Vale observar que o ar atmosférico não entra em contato direto com o biogás, o que previne a sua diluição e evita, dessa forma, uma etapa posterior de tratamento do mesmo. A purga, quando necessária, é realizada por pontos de saída localizados na face inferior do *plenum*.

A eficiência de remoção de H₂S do biogás foi calculada a partir da concentração de H₂S no biogás afluente e efluente à Torre de absorção, conforme a equação 4.1. Dessa forma, a concentração de sulfeto no líquido de recirculação não foi usada para cálculos de eficiência.

$$ER = \frac{C_{in} - C_{saida}}{C_{in}} \times 100 \quad (\text{Equação 4.1})$$

em que

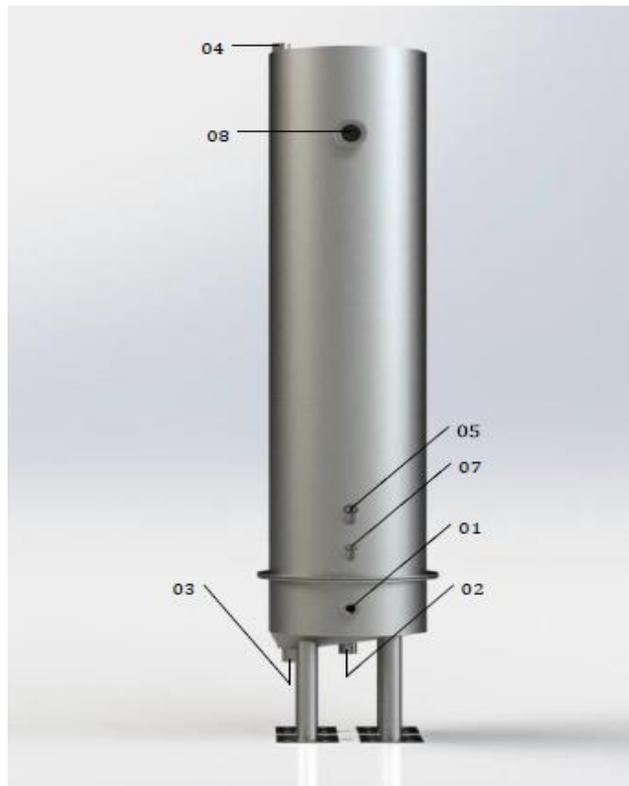
ER = Eficiência de Remoção (%);

C_{in} = concentração inicial de H₂S (kg/Nm³); e

C_{saída} = concentração final de H₂S (kg/Nm³).

4.1.1.2 Torre de regeneração biológica

A Torre de regeneração biológica, representada na Figura 4.3, foi feita em aço inoxidável e é dividida em *plenum* e torre de reação, com 96,4 L de volume útil. Essa unidade foi projetada com o objetivo de aumentar a concentração de oxigênio dissolvido no líquido de recirculação, de forma a otimizar a oxidação do sulfeto na etapa seguinte, realizada inicialmente pela Torre biológica. No entanto, a produção de íons hidroxila (OH⁻) acoplada à oxidação do sulfeto foi observada já na Torre de regeneração biológica, motivo pelo qual esta passou a ser a unidade principal de tratamento biológico e o local onde foram coletadas as amostras para as análises microbiológicas. Para promover a retenção da biomassa, fios de *nylon* de 0,1 mm de espessura e 1 m de comprimento foram instalados em seu interior (Figura 4.4). Através de um ponto de entrada (04) na face superior da torre de reação, uma chave de nível monitora o volume de líquido. Sensores de pH, ORP, temperatura e OD estão instalados na base da torre de reação (05 e 06, não mostrado). Pontos de entrada excedentes (07) permitem a inclusão de sensores adicionais, caso necessário. A saída do líquido se dá por uma abertura na parte superior da torre (08). O efluente desta unidade pode ser então direcionado à torre biológica ou reconduzido à Torre de absorção tipo Venturi.



Fonte: cedida por Colturato, L.F. (acervo pessoal).

Figura 4.3: Torre de regeneração biológica da fase líquida.



Fonte: cedida por Colturato, L.F. (acervo pessoal).

Figura 4.4: Foto dos fios de *nylon* no interior da Torre de regeneração biológica antes e após o início da operação do sistema de dessulfurização.

4.1.1.3. Torre biológica

A torre biológica (Figura 4.2), de aço inoxidável, foi projetada para realizar a oxidação do sulfeto acoplada à geração de íons OH^- e está dividida em cabeça, torre de reação e *plenum*. Externamente, é idêntica à Torre de absorção tipo Venturi (Figura 4.2), porém a parte interna é preenchida por fios de *nylon* que auxiliam na retenção da biomassa.

O oxigênio necessário aos microrganismos é introduzido por um ponto localizado no *plenum*, enquanto o líquido do sistema de recirculação é introduzido pela lateral da cabeça. O líquido efluente dessa unidade pode ser direcionado ao decantador lamelar, para recuperação do enxofre coloidal, ou reconduzido à Torre de absorção tipo Venturi, de modo a manter um circuito fechado sem comprometimento da eficiência do processo de regeneração das hidroxilas. Para monitoramento desta unidade, há uma chave de nível e sensores para medição de pressão, condutividade, pH, ORP e temperatura.

4.1.1.4 Decantador lamelar

O decantador lamelar (Figura 4.2) é composto por calha, lamelas, corpo e estrutura de sustentação. A função da calha é coletar o líquido sobrenadante e a das lamelas, promover a separação sólido/líquido. O corpo do decantador comporta as lamelas e a calha e a estrutura de sustentação suporta todo o equipamento.

O líquido contendo sólidos suspensos é introduzido por uma abertura na parte inferior do decantador e bombeado até a câmara, onde as lamelas promovem a precipitação dos sólidos para um poço de coleta. Sensores de pH, ORP e temperatura encontram-se na lateral do corpo do decantador. Uma chave de nível monitora os níveis mínimo e máximo do líquido. O decantador possui um fundo cônico para facilitar a limpeza, realizada através de um ponto de saída em sua base. O líquido tratado sai do decantador pela parte superior e é enviado a um reservatório, de onde pode ser reconduzido ao sistema.

4.2 Desenho experimental

A pesquisa foi dividida em seis etapas, conforme o fluxograma apresentado na Figura 4.5. As coletas foram feitas em quatro das seis etapas experimentais na Torre de regeneração biológica, conforme apresentado na Tabela 4.1. As amostras foram coletadas tanto do líquido de recirculação (identificadas pela letra 'L') como da biomassa aderida aos fios de *nylon* (identificadas pela letra 'B'). Também foram analisadas amostras do digestor (Di.1) e do tanque de extração, o qual armazena o efluente do digestor de vinhaça e de onde foi retirado o inóculo (In). A análise das amostras do digestor foi considerada relevante para a compreensão da microbiota na Torre de regeneração biológica, uma vez que a biomassa no sistema de dessulfurização provém do efluente do digestor, armazenado no tanque de extração.

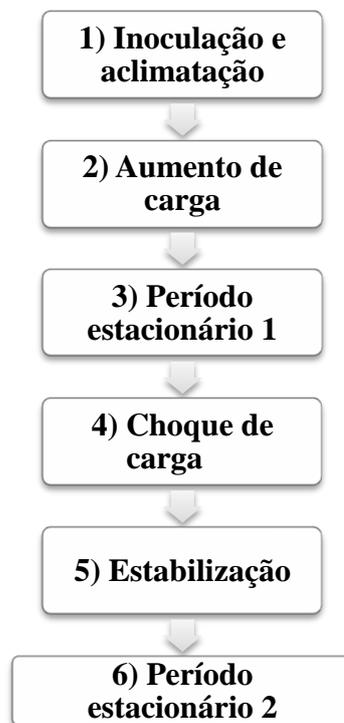


Figura 4.5: Fluxograma das etapas experimentais.

- 1) **Inoculação e aclimação:** O inóculo da torre de regeneração, proveniente do líquido armazenado no tanque de extração, foi preparado antes do início do experimento. Para tanto, foi injetado ar difuso no tanque de extração (volume de 2 m^3) durante 15 dias, a uma vazão de $4,5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Posteriormente, o inóculo foi submetido a pulsos diários de H_2S , com uma carga equivalente a $10 \text{ kg H}_2\text{S} \cdot \text{d}^{-1}$ durante um período de 10 dias. Após este procedimento, o inóculo foi transferido para o sistema de dessulfurização. Assim que a produção de biogás foi estabilizada (o que ocorreu após a finalização do período de entressafra), o sistema foi submetido à aeração através da injeção controlada de ar atmosférico com uma vazão de $4,5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ e carga volumétrica aplicada média de $2,2 \text{ kg H}_2\text{S} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ (esta é referente à carga de H_2S aplicada na Torre de absorção tipo Venturi e foi calculada previamente a partir de dados de vazão do biogás e concentração de H_2S no mesmo). A estabilização da corrente de biogás e, conseqüentemente, da carga de H_2S , foi considerada como o ponto inicial de monitoramento (dia 0). Portanto, as coletas das amostras do inóculo e da aclimação foram realizadas anteriormente ao dia 0.
- 2) **Aumento de carga:** a carga afluyente de H_2S foi ajustada até ser fixada em aproximadamente $7,6 \text{ kg H}_2\text{S} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, valor correspondente a maior carga obtida mantendo-se a eficiência de remoção superior a 99%.

- 3) **Período estacionário 1:** a carga afluyente de $7,5 \text{ kg H}_2\text{S} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, estabelecida na etapa anterior, foi mantida estável durante 15 dias.
- 4) **Choque de carga:** com o propósito de avaliar a robustez e a resiliência do sistema a choques de carga, foi aplicada uma carga média de $16,5 \text{ kg H}_2\text{S} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, superior ao dobro da adotada anteriormente durante 2 dias. No dia seguinte, foi realizada uma nova coleta.
- 5) **Estabilização:** a carga de H_2S afluyente foi reduzida para cerca de $3 \text{ kg H}_2\text{S} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ao fim do choque de carga e progressivamente aumentada, com o objetivo de reestabelecer as condições de estabilidade do período estacionário 1.
- 6) **Período estacionário 2:** Uma carga média de $8,1 \text{ kg H}_2\text{S} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ foi mantida durante um período de 13 dias. Na transição entre as etapas de estabilização e período estacionário 2, foi coletada a última amostra. No momento da coleta, a carga de H_2S aplicada e a eficiência de remoção já se encontravam muito mais próximas dos valores estabelecidos no período estacionário 2 do que no restante do período de estabilização, motivo pelo qual foi adotada a nomenclatura correspondente a este período.

As legendas adotadas para identificação das amostras nas análises moleculares são:

- In: Inóculo,
- Di.1: Amostra coletadas do digestor na etapa de aclimação,
- L.Ac: líquido de recirculação coletado na etapa de aclimação. A amostra da biomassa aderida aos fios na etapa de aclimação também foi coletada, porém a quantidade foi inferior à necessária para as análises seguintes (são necessários 0,25 gramas de lodo para a extração de DNA com o kit utilizado).
- L.Pe.1/B.Pe.1: líquido de recirculação e biomassa aderida coletados no período estacionário 1, respectivamente.
- L.Cc/B.Cc: líquido de recirculação e biomassa aderida coletados após o choque de carga, respectivamente.
- L.Pe.2/B.Pe.2: líquido de recirculação e biomassa aderida coletados entre a etapa de estabilização e o período estacionário 2.

Tabela 4.1: Síntese das etapas experimentais

Fase experimental	Carga aplicada de H ₂ S na Torre de absorção (kgH ₂ S.m ⁻³ .h ⁻¹)	Duração (dias)	Amostras coletadas
1) Inoculação e aclimação	Variável/2,2	4 (após a estabilização)	In (Inóculo) ⁸ , Di.1 e L.Ac
2) Aumento de carga	2,1-9,38	5 a 42	-
3) Período estacionário 1	7,5	43 a 56	L.Pe.1/B.Pe.1
4) Choque de carga	16,5	57 a 59	L.Cc/B.Cc
5) Estabilização	3,0-7,9	60 a 92	L.Pe.2/B.Pe.2
6) Período estacionário 2	8,1	93 a 105	

4.3 Processamento das amostras

Amostras da biomassa foram coletadas conforme descrito anteriormente. Com relação ao líquido de recirculação, foram coletadas duplicatas com 500 mL de volume cada na saída da Torre de regeneração; quanto à biomassa aderida, amostras dos fios de *nylon* foram coletadas em triplicata, a partir de pontos diferentes da mesma. Do digestor, foi coletado um volume de aproximadamente 2 litros de lodo, a partir de diferentes pontos de coleta localizados em sua base. Do efluente contido no tanque de extração, que foi utilizado como inóculo, foram coletados 500 mL, em triplicata.

As amostras foram encaminhadas em condições de refrigeração para o laboratório de Microbiologia do DESA (UFMG), onde foram processadas e armazenadas a -20°C conforme descrito por Garcia e Araújo (2010). Posteriormente, o DNA genômico foi extraído a partir de 0,25 g de todas as amostras com o kit de extração *PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, E.U.A.)*, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado em um fluorômetro Qubit[®] (*Life Technologies*) e a pureza (OD 260/280) aferida em um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (*Thermoscientific*).

4.4 Análises físico-químicas e estatísticas

Os parâmetros físico-químicos foram analisados no local onde está instalado o sistema de dessulfurização e os dados utilizados nas análises estão sintetizados na Tabela 4.2. Na fase gasosa, foram monitoradas a vazão do biogás (medidor de gás *LAO Industria, modelo G1,6* e

⁸ As coletas do inóculo, do digestor e da etapa de aclimação foram feitas anteriormente à estabilização da corrente de biogás e ao início do monitoramento (definido como dia 0).

G2,5), a temperatura e as concentrações de CH₄, CO₂, H₂S e O₂ (com os analisadores de gás portáteis *LandtecGEMTM5000Plus* para o biogás afluente e *Landtec GATM4000* para o biogás efluente ao sistema de dessulfurização). Foram utilizados neste trabalho os dados referentes à carga volumétrica aplicada de H₂S, calculada previamente a partir das informações sobre a vazão do biogás afluente à Torre de absorção tipo Venturi e a concentração de H₂S no mesmo.

Em relação à fase líquida, foram monitorados a temperatura, ORP e pH (transdutores combinados *Endress + Hauser*, modelo CPS16D-1009/0), oxigênio dissolvido (transdutor *Endress + Hauser*, modelo COS61D-1077/0) e também DQO, sulfeto e sulfato dissolvidos. A DQO foi determinada em amostras submetidas à 150°C por duas horas em um reator da marca Hach, modelo DQO DRB200. Em seguida, as amostras foram resfriadas e analisadas em um espectrofotômetro visível portátil (DR800, Hach), utilizando-se o reagente dicromato de potássio (CAT-21.259.25, faixa de detecção de 1.500 a 15.000mg.L⁻¹). As concentrações de sulfato e sulfeto também foram aferidas em um espectrofotômetro visível portátil (DR800, Hach), utilizando-se os reagentes SulfaVer (CAT-21067-69, Hach) para sulfato e sulfeto 1 (1816-32, Hach) e sulfeto 2 (1817-32, Hach) para análise de sulfeto. Todos os transdutores são acoplados a um sistema de automação e monitoramento, que armazena os dados para análises posteriores.

Tabela 4.2: Parâmetros físico-químicos analisados

Parâmetro	Método	Frequência média	Amostragem
pH	Sensor	<i>On-line</i>	Fase líquida
Temperatura	Sensor	<i>On-line</i>	Fase líquida/Biogás
ORP	Sensor	<i>On-line</i>	Fase líquida
OD	Sensor	<i>On-line</i>	Fase líquida
DQO	Colorimétrico	1 x por dia	Fase líquida
Sulfeto dissolvido	Colorimétrico	1 x por dia	Fase líquida
Sulfato dissolvido	Colorimétrico	1 x por dia	Fase líquida
Concentração de H ₂ S,Q	Analisadores de gás	5x na semana	Biogás

As análises estatísticas foram realizadas no programa R, com o objetivo de investigar a variação dos parâmetros físico-químicos entre as etapas experimentais, e assim compreender melhor sua influência sobre a diversidade de táxons encontrados nas amostras. Primeiramente, foi realizada a estatística descritiva dos dados, com cálculo das médias para todas as variáveis analisadas e também das medianas e desvios-padrão da carga volumétrica aplicada de H₂S para cada fase.

Em seguida, a normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro. Refutada a hipótese de normalidade, foram realizados testes não-paramétricos para verificar se a carga de H₂S apresentou variação significativa entre as etapas experimentais.

O teste de Kruskal – Wallis indicou a existência de diferenças significativas entre as mesmas (p<0,001). Para identificar quais etapas diferiram significativamente em relação à variável de interesse, foi utilizado o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni (esta visa a corrigir o nível de significância com base no número de comparações realizadas). O mesmo teste foi aplicado para as demais variáveis físico-químicas analisadas, com o objetivo de identificar alterações nas condições operacionais que pudessem estar associadas ao desenvolvimento de grupos microbianos resistentes ao choque de carga.

4.5 Análises microbiológicas

4.5.1 PCR e DGGE

Com o objetivo de preparar o DNA extraído para o DGGE, foi realizada uma PCR (do inglês *polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase) de todas as amostras com iniciadores universais que amplificam a região V8 do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal (1055F/1392R) de *Bacteria* (FERRIS *et al.*, 1996). Um grampo GC foi adicionado ao iniciador 1392R, com o objetivo de facilitar a separação das bandas durante a resolução eletroforética. Os iniciadores escolhidos foram utilizados com sucesso na amplificação de bactérias oxidadoras de sulfeto em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia do DESA, e suas sequências se encontram na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para DGGE

Iniciador	Sequência 5' - 3'
1055F	ATGGCTGTCGTCAGCT
1392R	ACGGGCGGTGTGTAC
Grampo GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCGCCCC

A PCR foi baseada no programa descrito por Ferris *et al.* (1996) e consistiu em 5 minutos de desnaturação inicial, seguidos por 1 minuto a 94°C, 1 minuto de anelamento e 3 minutos de extensão a 72°C. A primeira fase da reação consistiu em um *touchdown*, no qual a temperatura de anelamento foi diminuída de 53 para 43°C (1°C por ciclo, por 10 ciclos). Em

seguida, foram realizados 20 ciclos a 43°C e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. As concentrações dos reagentes utilizados nas reações são apresentadas na Tabela 4.4.

Após confirmada a amplificação em gel de agarose 1%, os produtos de PCR das respectivas duplicatas ou triplicatas de cada amostra foram agrupados. Para a quantificação, cada *pool* foi submetido à resolução por eletroforese em gel de agarose 2%, com solução de *GelRed* (*Biotium*), tampão 10x (*Phoneutria*) e marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (*Life Technologies*). A quantificação foi realizada através do *software ImageMagick* (*Thermoscientific*). Em sequência, 400 nanogramas de DNA de cada *pool* foram utilizados para o DGGE (*Dcode Universal Mutation Detection System, Bio-Rad Laboratories*), em um gel com 8% de poliacrilamida e gradiente desnaturante de 30 a 70%, durante 17 horas a 80 volts.

Tabela 4.4: Componentes da PCR para DGGE

Reagente	Marca	Concentração	Quantidade por reação (µL)
Água ultrapura	-	-	10,5
Pré-mix 2x	<i>Phoneutria</i>	2x	12,5
Iniciador 1055F	<i>Invitrogen</i>	25 pmol/µL	0,5
Iniciador 1392R-GC	<i>Invitrogen</i>	25 pmol/µL	0,5
DNA	-	-	1,0
Volume total	-	-	25,0

O gel foi corado com *SybrGold* (*Life Technologies*) por 25 minutos e visualizado em um transluminador *Nippon Genetics*. As bandas foram excisadas com o auxílio de um cortador de bandas, eluídas em 50 µL água ultra-pura e mantidas a 4°C da noite para o dia (GREEN *et al.*, 2009).

O DNA eluído foi novamente amplificado com os iniciadores 1055F/1392R, porém sem o grampo GC, nas mesmas condições da primeira reação. Os produtos da PCR foram quantificados (conforme descrito na primeira reação) e enviados para purificação e sequenciamento bidirecional (realizado pela empresa *Macrogen Inc.*, em um sequenciador 3730XL).

Os perfis de banda do DGGE foram analisados com o programa *Bionumerics 7.1* (*Applied Maths*) com o objetivo de verificar a similaridade entre as amostras. Os perfis foram comparados usando o coeficiente de similaridade Dice e o dendograma foi gerado através do método UPGMA (*Unweighted Pair Group with Mathematical Averages*).

As sequências diretas e reversas (*forward* e *reverse*) foram montadas e editadas com o programa *Geneious 8.0.4* (www.geneious.com, KEARSE *et al.*, 2012) e checadas em relação à presença de quimeras com o programa *Decipher* (WRIGHT *et al.*, 2012). As sequências consenso resultantes foram então comparadas às bases de dados do *Ribosomal Database Project* através do *RDP Classifier*, com um nível de confiança de 80% (WANG *et al.*, 2007) e do NCBI através do *Blastn* (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

4.5.2 Sequenciamento de nova geração

Com o objetivo de identificar, de forma mais ampla e detalhada, a diversidade microbiana presente no sistema de dessulfurização, foi realizada uma análise através da plataforma de sequenciamento de nova geração MiSeq (*Illumina*). O DNA extraído das amostras foi enviado para a empresa *Macrogen Inc.* para a construção das bibliotecas e sequenciamento.

Os iniciadores utilizados na reação de amplificação foram o 515F (GTGNCAGCMGCCGCGGTAA) e o 926R (CCGYCAATTYMTTTRAGTTT), os quais delimitam a região V4 e parte da região V5 da subunidade 16S do RNA ribossomal de *Archaea* e *Bacteria* (QUINCE *et al.*, 2011). A cobertura dos iniciadores foi avaliada através de um teste *in silico* com auxílio da ferramenta *TestPrime* (KLINDWORTH *et al.*, 2013).

As análises de bioinformática foram realizadas no Centro de Excelência em Bioinformática (CEBio), Instituto de Pesquisa René Rachou (Fundação Oswaldo Cruz) utilizando-se o programa *QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)* (CAPORASO *et al.*, 2010). Primeiramente, as sequências *forward* e *reverse* de cada amostra foram unidas, gerando sequências consenso. Estas foram processadas e filtradas em relação à qualidade, agrupadas em UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais, do inglês *Operational Taxonomic Units*) e checadas em relação à presença de quimeras (*USEARCH 7*). Uma vez selecionadas, as sequências foram classificadas em relação à base de dados do *Greengenes*, com limite de 97% de similaridade. Os índices Chao 1 e Simpson também foram calculados pelo programa QIIME.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químicas e estatísticas

Os parâmetros físico-químicos foram mensurados a partir de amostras do líquido de recirculação na saída da Torre de regeneração biológica e seus respectivos valores médios em cada uma das etapas experimentais se encontram na Tabela 5.1 (com exceção da temperatura, que não variou entre as etapas experimentais e foi mantida em torno de 30°C). O inóculo também foi caracterizado quanto aos principais aspectos físico-químicos, os quais se encontram na Tabela 5.2.

Tabela 5.1: Médias dos parâmetros físico-químicos monitorados na Torre de regeneração biológica

Etapa experimental/ Parâmetro	Carga de H ₂ S (kg.m ⁻³ .h ⁻¹)	HS ⁻ (μmol.L ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹)	DQO (mg.L ⁻¹)	ORP (mV)	pH	OD (mg.L ⁻¹)
1) Aclimação	2,2	42,5	52,0	3938,0	-208,3	7,8	2,4
2) Aumento de carga	7,55	93,11	1044,5	3660,0	-372,2	8,3	2,51
3) Período estacionário 1	7,5	60,4	1532,1	3442,0	-399,5	7,8	2,0
4) Choque de carga	16,5	95,5	1775,0	4150,0	-421,8	7,7	0,2
5) Estabilização	5,00	140,5	1912,4	4674,0	-419,3	7,6	0,73
6) Período estacionário 2	8,1	21,6	2593,9	1953,0	-425,7	7,4	1,3

Tabela 5. 2: Caracterização físico-química do inóculo

Parâmetro	Unidade	Valor
Temperatura	°C	29
pH		8,2
DQO	mg.L ⁻¹	2.100
Sulfato	mg.L ⁻¹	50
Sulfeto	μg.L ⁻¹	180
Nitrogênio total	mg.L ⁻¹	230
Nitrato	mg.L ⁻¹	Ausente
Nitrito	mg.L ⁻¹	Ausente
Fósforo total	mg.L ⁻¹	70

O sistema de dessulfurização apresentou alta eficiência de remoção, conforme pode ser visto na Figura 5.1. É importante reiterar que a eficiência de remoção de H₂S do biogás foi calculada previamente a partir da concentração de H₂S no biogás afluente e efluente à Torre de absorção, conforme descrito no tópico Material e Métodos. Para descartar a possibilidade

de oxidação química do H_2S , foram realizados experimentos prévios à inoculação. Nesses experimentos, descritos detalhadamente na tese desenvolvida pelo aluno Luis Felipe Colturato (DESA/UFGM), foi possível observar que não houve oxidação de sulfeto significativa na ausência de biomassa.

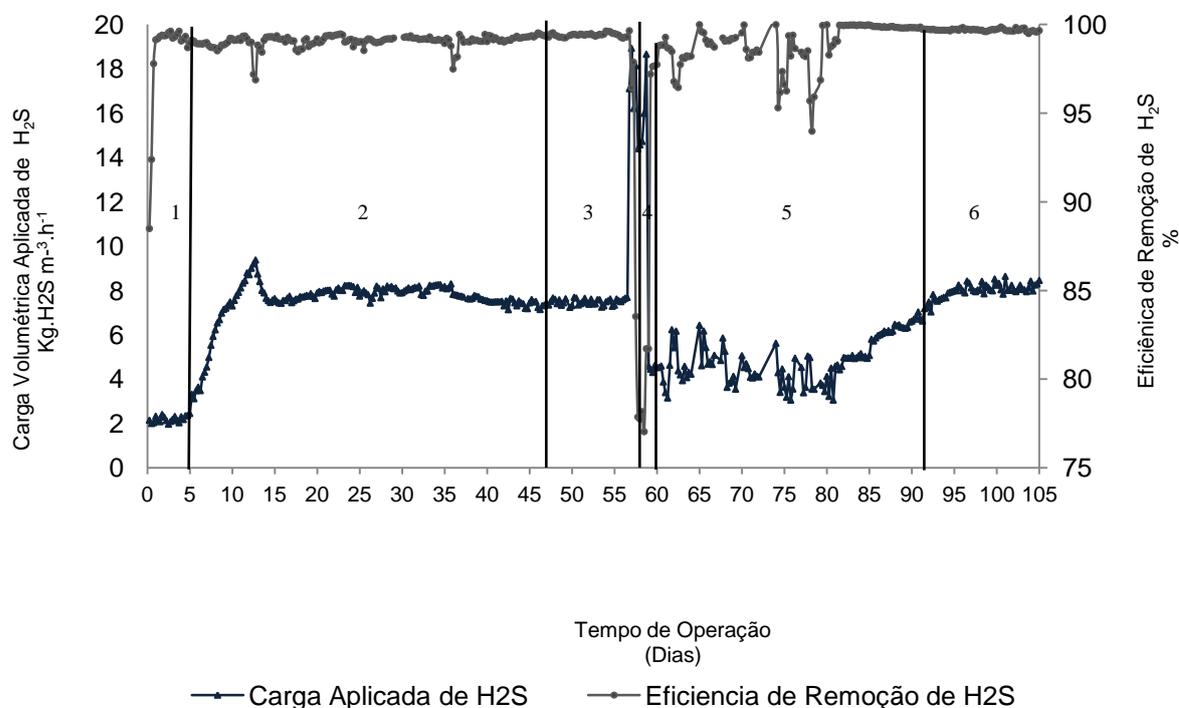


Figura 5.1: Carga de H_2S aplicada versus a eficiência de remoção de H_2S .

Os números na área do gráfico indicam as etapas experimentais correspondentes. 1: Aclimação, 2: Aumento de carga, 3: Período estacionário 1, 4: Choque de carga, 5: Estabilização, 6: Período estacionário 2.

O teste de Kruskal – Wallis indicou a existência de diferenças significativas entre as etapas experimentais para a variável carga volumétrica de H_2S aplicada ($p < 0,001$), como pode ser observado na Tabela 5.3, que também apresenta os valores de média, desvio padrão e a mediana para cada fase. A Figura 5.2 oferece uma visão mais informativa sobre a variação na carga volumétrica aplicada de H_2S ao longo do experimento. As etapas 2, 4 e 5 apresentaram maior variação, como esperado, enquanto nas etapas 1, 3 e 6 há maior estabilidade. As amostras biológicas foram coletadas nas etapas de aclimação, período estacionário 1, choque de carga e entre as etapas de estabilização e período estacionário 2, nomeadas na Figura 5.2 como etapas 1, 3, 4 e 5/6, respectivamente.

Tabela 5.3: Carga volumétrica de H₂S aplicada

Etapas experimentais	Número de medições	Média	Desvio-padrão	Mediana	Valor-P (Kruskal-Wallis)
1) Aclimatação	19	2,2	0,031	2,150	<0,001
2) Aumento de carga	152	7,6	0,092	7,790	
3) Período estacionário1	54	7,5	0,020	7,450	
4) Choque de carga	9	16,5	0,593	16,220	
5) Estabilização	118	5,0	0,105	4,825	
6) Período estacionário 2	49	8,1	0,034	8,030	

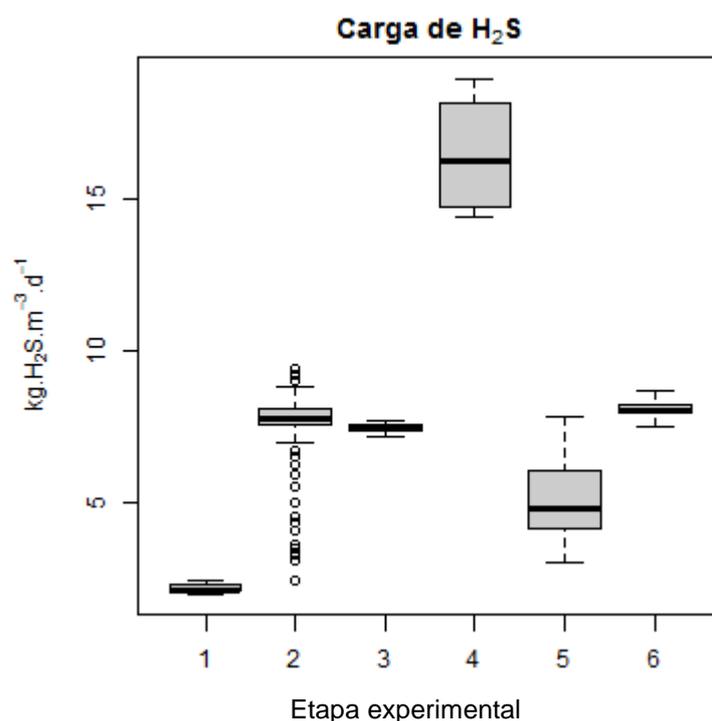


Figura 5.2: Variação da carga volumétrica aplicada de H₂S entre as etapas experimentais. Os números na área do gráfico indicam as etapas experimentais correspondentes. 1: Aclimatação, 2: Aumento de carga, 3: Período estacionário1, 4: Choque de carga, 5: Estabilização, 6: Período estacionário 2.

O teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni foi realizado para identificar quais as fases em que as diferenças na carga volumétrica aplicada de H₂S foram significativas ($p < 0,05$). Tais diferenças foram constatadas entre todas as etapas, incluindo entre o período estacionário e o período estacionário 2 (fases 3 e 6), o que não era esperado. Apesar do número de dados ser diferente entre as fases, o que pode ter influenciado o resultado dos testes, estes indicam que a variação na carga volumétrica aplicada de H₂S entre as etapas foi significativa.

Na etapa de aclimação (Fase 1) foi aplicada, a partir do momento de estabilização da corrente de biogás (dia 0), uma carga volumétrica média de H₂S de 2,2 kg H₂S.m⁻³.h⁻¹ e a eficiência de remoção variou de 88,5 a 99,6 %. Os altos valores de eficiência de remoção de sulfeto já nessa etapa podem ser explicados pelo fato de que a biomassa estava em processo de adaptação anteriormente ao início do fluxo estabilizado de biogás (correspondente ao dia 0), conforme descrito anteriormente.

No aumento de carga (Fase 2), a carga foi gradualmente aumentada, e então fixada em 7,5 kg H₂S.m⁻³.h⁻¹ no período estacionário 1 (Fase 3), na qual a eficiência de remoção de H₂S se manteve em torno de 99,3%.

Posteriormente, foi realizado um choque de carga (Fase 4), no qual a carga de H₂S aplicada foi aumentada em aproximadamente 220% (16,5 kg H₂S. m⁻³.h⁻¹ em média) em relação ao período anterior. Nessa etapa, a eficiência de remoção de H₂S caiu para 76,2%, e só retornou a valores superiores a 99% no terço final da etapa de estabilização (Fase 5).

A partir da Figura 5.3, é possível observar que ao choque de carga seguiu-se um aumento do sulfeto dissolvido e da DQO. Na etapa de estabilização (Fase 5), caracterizada por oscilações na eficiência de remoção de H₂S e acúmulo de sulfeto mesmo após a redução da carga de H₂S, foi observado um aumento pronunciado na concentração de sulfeto dissolvido no meio líquido entre os dias 61 e 70, a qual chegou a valores superiores a 600 µmol.L⁻¹. O aumento do sulfeto dissolvido poderia ser tóxico para os microrganismos, e assim, no dia 71 foi realizada uma diluição do líquido de recirculação com água proveniente de um poço de captação da Usina Monte Alegre. A diluição foi realizada até ser atingida uma concentração aproximada de sulfeto dissolvido de 100 µmol.L⁻¹, próxima a concentração nas fases anteriores ao choque de carga. Após a diluição, a eficiência de remoção de H₂S retornou a valores superiores a 99%. Ao final da etapa de estabilização e durante o período estacionário (Fases 5 e 6), a carga de H₂S aplicada foi progressivamente aumentada e finalmente estabilizada em 8,1 kg H₂S.m⁻³.h⁻¹, com eficiência de remoção de H₂S entre 99,4 a 99,7%.

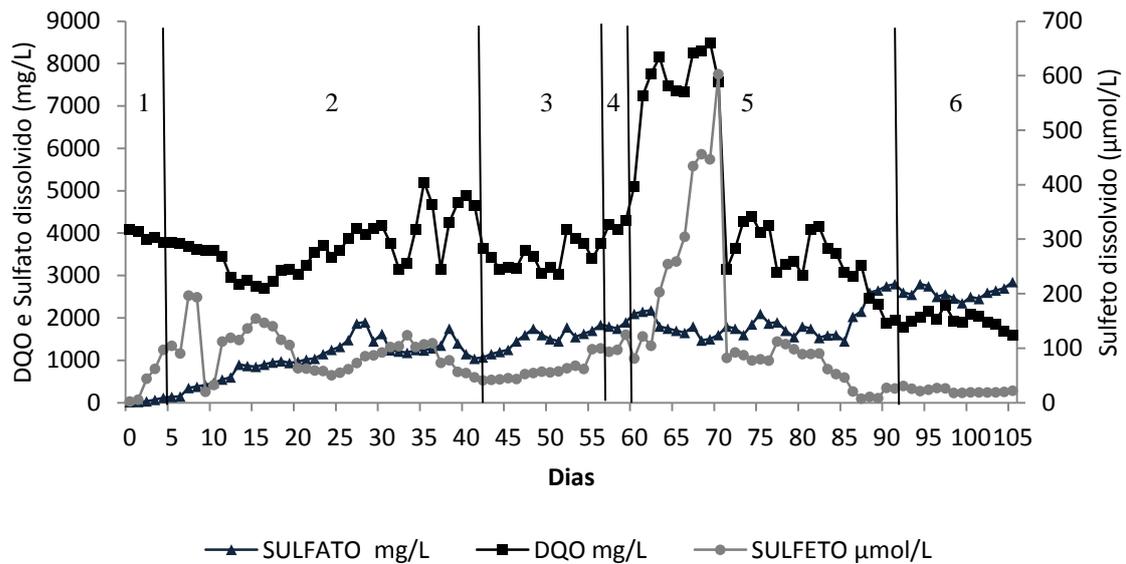


Figura 5.3: Concentrações de sulfato, sulfeto e DQO ao longo do tempo.

Os números na área do gráfico indicam as etapas experimentais correspondentes. 1: Aclimatação, 2: Aumento de carga, 3: Período estacionário 1, 4: Choque de carga, 5: Estabilização, 6: Período estacionário 2.

Uma vez que no período estacionário 2 foi alcançada a estabilidade com uma carga volumétrica de H_2S aplicada superior ao período estacionário 1, o teste de Mann-Whitney também foi realizado para as demais variáveis analisadas com o objetivo de fazer uma investigação preliminar sobre se as condições operacionais estabelecidas nessa etapa diferiram significativamente das demais. Os testes mostraram (com $p < 0,05$) que a única variável cuja diferença foi significativa no período estacionário 2 em relação às outras fases foi a DQO, com exceção do choque de carga (o que pode ser atribuído ao número de medições diferentes em cada etapa). Houve diferenças significativas de outras variáveis entre as fases, mas não especificamente para o período estacionário 2. Na Tabela 5.1, observa-se que a média da DQO no período estacionário 2 (1.953 mg.L^{-1}) foi sensivelmente menor do que nas demais e na Figura 5.3 são apresentados os valores de DQO, além de sulfato e sulfeto dissolvidos ao longo do tempo. No entanto, outras variáveis, como o OD, o qual diminuiu sensivelmente após o choque de carga (Tabela 5.1), podem ter tido grande influência sobre os microrganismos e o processo de dessulfurização. Esta passou de uma média superior a 2 mg.L^{-1} nas etapas anteriores para 0,2 durante o choque de carga e 0,73 na etapa de estabilização. O sistema voltou à estabilidade quando o OD atingiu valores superiores a 1 mg.L^{-1} , o que indica que a variação neste parâmetro provavelmente também está relacionada ao seu bom desempenho. Esse resultado é esperado, uma vez que o O_2 é o principal receptor de elétrons para a oxidação do sulfeto por bactérias sulfurosas incolores. A redução no OD pode

ser consequência da elevada DQO, uma vez que a oxidação dos compostos reduzidos de enxofre, por vias químicas ou bioquímicas, demanda oxigênio.

Na Figura 5.3, observa-se ainda que a concentração de sulfeto, ao final da etapa de estabilização, diminuiu e permaneceu baixa até o fim do experimento, enquanto a de sulfato aumentou – o que pode significar que o processo de oxidação de sulfeto se estabilizou, com a concomitante produção de sulfato. Não foi priorizada a formação de enxofre elementar durante o experimento, mas sim a manutenção de uma concentração de OD sempre superior a 1 mg.L^{-1} na saída da Torre de regeneração biológica, para não haver déficit de oxigênio.

A partir dos resultados analisados acima, é possível concluir que a interação entre as variáveis no sistema é bastante complexa e compreender como cada uma afeta a eficiência do processo e a comunidade microbiana demandaria outros experimentos. Portanto, a indicação de que a DQO e, conseqüentemente, o OD, são parâmetros muito relevantes, é um ponto de partida para investigações futuras.

5.2 Análises microbiológicas

5.2.1 Resultados gerais do DGGE e do SNG

A Figura 5.4 apresenta o dendograma baseado no perfil de bandas do DGGE, o qual foi analisado no programa *Bionumerics* (versão 7.1).

No dendograma, observa-se a existência de dois grupos básicos, que possuem 68,3% de similaridade e estão identificados por 2 retângulos. No primeiro grupo (retângulo azul), há uma segunda ramificação (com similaridade de 70%), na qual a parte superior é composta por 3 amostras: o inóculo (In) e o digestor (Di.1), que possuem 74,5% de similaridade; e o líquido de recirculação coletado na torre de regeneração biológica durante a fase de aclimação (L.Ac). Uma vez que o inóculo é proveniente do tanque de extração, o qual recebe o efluente do digestor, a similaridade entre as duas amostras era esperada. No entanto, as diferentes condições prevaletentes no tanque e no interior do digestor, notadamente a aerobiose na superfície do primeiro, podem ter favorecido alguma diferenciação da biomassa entre as duas unidades. Durante a etapa de aclimação (anterior ao dia 0) e o início da estabilização do fluxo de biogás (dias 0 a 4) ocorreu a adaptação da biomassa ao sistema. A baixa carga de sulfeto aplicada nessa fase pode ter propiciado a manutenção dos mesmos grupos

microbianos, uma vez que a amostra L.Ac (líquido de recirculação na etapa de aclimação) é similar às duas primeiras.

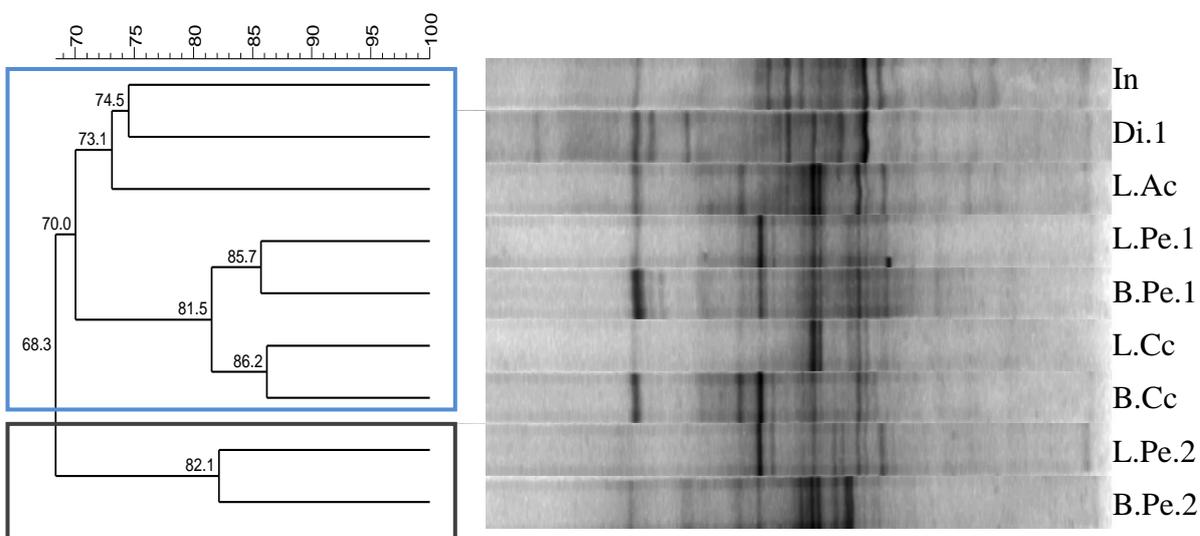


Figura 5.4: Dendrograma baseado no perfil de bandas do DGGE.

Os valores nos pontos de ramificação do dendrograma se referem à similaridade. Legenda: In: Inóculo, Di.1 = Digestor, L.Ac = Líquido de recirculação na etapa de aclimação, L.Pe.1 e B.Pe.1: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida no período estacionário 1, L.Cc e B.Cc: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida após o choque de carga, L.Pe.2 e B.Pe.2: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida entre a etapa de estabilização e o período estacionário 2.

O grupo na parte inferior do retângulo azul é composto por 4 amostras: L.Pe.1/B.Pe.1, L.Cc/B.Cc, que correspondem ao líquido de recirculação e à biomassa aderida ao meio suporte no período estacionário 1 e no choque de carga, respectivamente. Pode ser observado que as amostras do líquido e da biomassa aderida em cada uma dessas etapas apresentam alta similaridade entre si (85,7% entre L.Pe.1 e B.Pe.1, 86,2% entre L.Cc e B.c). Esse resultado era esperado, uma vez que o meio suporte fica em contato direto com o líquido de recirculação. No entanto, pode haver grupos mais característicos da biomassa aderida, o que foi observado através da técnica de SNG. Além da semelhança no perfil de bandas entre líquido e biomassa, o dendrograma mostra que as amostras do período estacionário 1 e do choque de carga também possuem grande similaridade (81,5%) entre si. O intervalo entre as coletas dessas amostras foi muito pequeno (6 dias), e ainda que o choque de carga tenha levado à uma alteração na microbiota do sistema, não foi possível observar grande diferenciação nos perfis das bandas entre as duas etapas.

Finalmente, o retângulo preto, na parte inferior do dendrograma, é composto pelas amostras L.Pe.2/B.Pe.2, correspondentes ao líquido de recirculação e à biomassa aderida entre a etapa

de estabilização e o período estacionário 2. Mais uma vez, as amostras apresentaram significativa similaridade entre si (82,1%), porém parece haver maior divergência destas em relação às demais (68,3% de similaridade entre os grupos nos retângulos azul e preto). Ainda que, de forma geral, seja possível depreender que a microbiota no sistema não variou amplamente entre as etapas experimentais, o agrupamento dessas amostras no dendograma aponta para uma maior diferenciação na comunidade microbiana estabelecida após o choque de carga. Além disso, embora as amostras do líquido de recirculação e da biomassa aderida possuam similaridade superior a 80% em todas as etapas, é possível observar algumas diferenças, as quais serão discutidas ao longo do texto.

Após o sequenciamento das bandas do DGGE, doze sequências consenso foram empregadas nas análises (Figura 5.5). Apesar do grande número de bandas no gel, muitas sequências não puderam ser utilizadas por que não foram aprovadas no controle de qualidade. Algumas bandas com a mesma classificação foram observadas em alturas distintas do gel (bandas 3 e 7, por exemplo) e também bandas na mesma altura com classificação diferente (bandas 2 e 5, por exemplo). Embora esses resultados não sejam esperados, o DGGE possui limitações que frequentemente são observadas na prática, uma vez que nem sempre as bandas se separam de forma ideal. Isso pode acontecer devido às características do gene escolhido (o gene do RNAr 16S) e a vieses inerentes à técnica. No primeiro caso, é sabido que muitos microrganismos possuem várias cópias do gene do RNAr 16S em seu genoma, e pode haver diferenças na sequência entre as cópias, de forma que bandas em alturas diferentes pertençam a organismos da mesma espécie. No segundo caso, bandas provenientes de grupos distintos de microrganismos podem interromper a migração eletroforética na mesma altura do gel ou não se separar adequadamente (BAKER; HARAYAMA, 2004). Tais vieses podem dificultar a interpretação dos resultados, que devem, por sua vez, ser analisados com certa cautela (van ELSAS; BOERSMA, 2011).

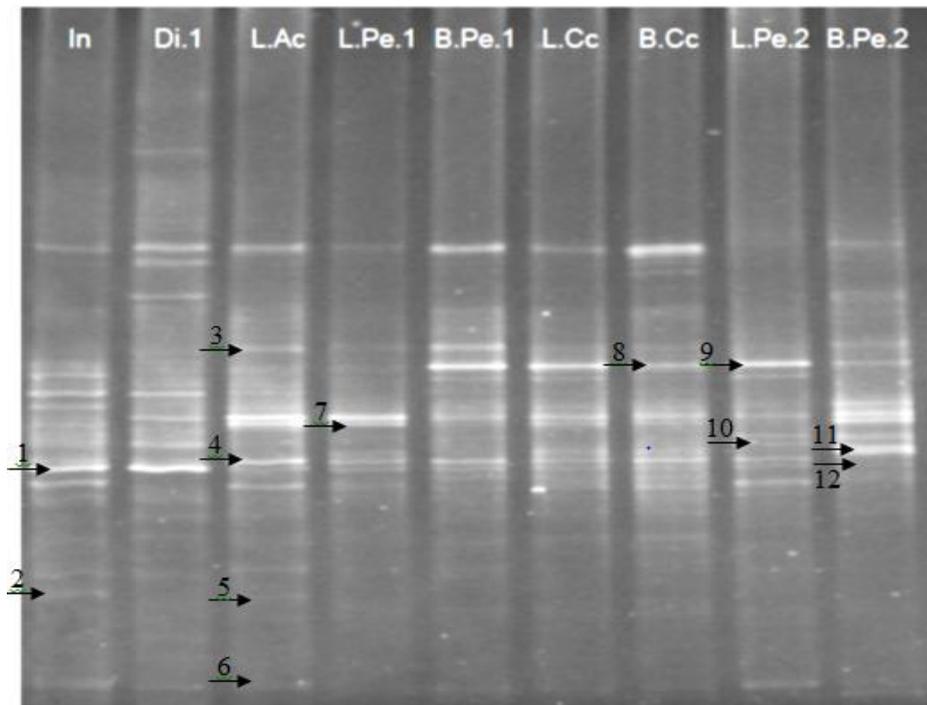


Figura 5.5: Foto do gel de DGGE com os iniciadores 1055F/1392R-GC.

Legenda: In: Inóculo, Di.1 = Digestor, L.Ac = Líquido de recirculação na etapa de aclimação, L.Pe.1 e B.Pe.1: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida no período estacionário 1, L.Cc e B.Cc: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida após o choque de carga, L.PE.2 e B.PE.2: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida entre a etapa de estabilização e o período estacionário 2.

Em relação ao SNG, foi realizado o sequenciamento das regiões V4 e V5 (parcialmente) da subunidade 16S do gene RNA ribossomal na plataforma MiSeq, o qual gerou uma média de 2.036.748 de *reads* por amostra. Após o processamento das sequências, esse número passou para 114.400 por amostra, com comprimento médio de 240 pares de base (pb). A Tabela 5.4 apresenta os índices de Chao1 e Simpson e o número de UTOs observadas em cada amostra (a partir das classificações integradas). O primeiro índice é um estimador de riqueza, que corrige o número de UTOs em relação às UTOs raras e não possui um intervalo definido. Já o índice de Simpson ($1 - D$) estima a diversidade e varia entre 0 e 1. Ambos são utilizados para estimar a diversidade- α , a qual se destina à compreensão da riqueza e das frequências relativas das UTOs em um determinado ambiente. Para ambos, quanto maior o valor, maior a riqueza e a diversidade da amostra, respectivamente.

Tabela 5.4: Índices de diversidade- α das amostras calculados a partir dos dados do SNG

Amostra	Chao1	Simpson	UTOs observadas
In	13735.2	0.979	141
Di.1	12467.5	0.971	139
L.Ac	14661.0	0.982	144
L.Pe.1	13413.3	0.948	142
B.Pe.1	15317.4	0.972	155
L.Cc	16296.1	0.976	154
B.Cc	15520.5	0.988	155
L.Pe.2	15501.5	0.972	155
B.Pe.2	10990.2	0.952	134

Os índices de diversidade- α calculados a partir dos dados do SNG indicam que a microbiota no sistema é bastante diversificada. É importante observar que, uma vez que os cálculos de α -diversidade baseados no perfil de bandas do DGGE podem ser muito influenciados pela migração não ideal das bandas (o que os resultados do sequenciamento indicam que possa ter ocorrido), os índices calculados a partir dos resultados do MiSeq foram considerados mais adequados para esta análise. Na Figura 5.6, que apresenta os índices Chao1 e Simpson obtidos a partir dos dados de SNG nas diferentes etapas experimentais, é possível perceber alguns pontos interessantes. Porém, antes de analisá-los, duas considerações devem ser feitas. A primeira é que o gráfico da Figura 5.6 não é uma série temporal, pois as amostras do líquido de recirculação e da biomassa aderida foram coletadas ao mesmo tempo, além disso, a amostra do digestor foi coletada posteriormente ao inóculo. A segunda é que os índices de Chao1 e de Simpson estimam variáveis diferentes – o primeiro é um indicador de riqueza (considera o número de espécies), enquanto o segundo é um índice de diversidade (avalia o número de espécies e a abundância relativa, embora dê mais ênfase à última).

A partir da Tabela 4.6 e da Figura 5.6, é possível observar que o índice de Simpson foi superior a 0,97 para todas as amostras, exceto L.Pe.1 e B.Pe.2. Para a última, o índice de Chao1 também apresenta o menor valor, o que indica que a diversidade nessa amostra foi inferior às demais. Além disso, os valores dos índices Chao1 e Simpson se distanciam na amostra L.Pe.1, indicando que apesar do número de espécies ser alto, a dominância também é maior. A Figura 5.7 corrobora essas informações, uma vez que nessa amostra o filo *Firmicutes* corresponde a mais de 60% da comunidade microbiana.

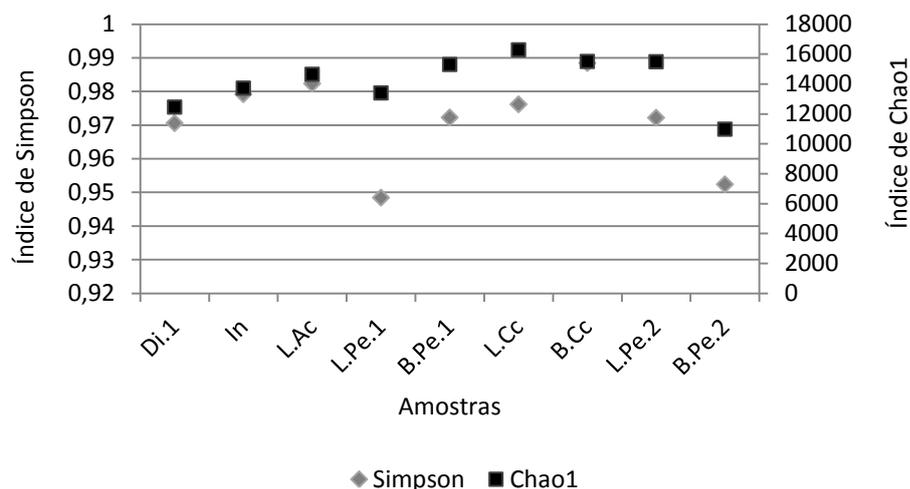


Figura 5.6: Índices de diversidade- α baseados nos resultados do sequenciamento na plataforma MiSeq.

Legenda: In: Inóculo, Di.1 = Digestor, L.Ac = Líquido de recirculação na etapa de aclimação, L.Pe.1 e B.Pe.1: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida no período estacionário 1, L.Cc e B.Cc: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida após o choque de carga, L.PE.2 e B.PE.2: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida entre a etapa de estabilização e o período estacionário 2.

É possível observar que o inóculo (In), proveniente do tanque de extração, apresenta maior diversidade do que a amostra do digestor. As condições prevalecentes no último – anaerobiose, altas concentrações de matéria orgânica e de outros componentes potencialmente tóxicos provenientes da vinhaça – são mais restritivas, enquanto no tanque de extração, o qual recebe o efluente do digestor e teve contato com O_2 – o desenvolvimento de outros grupos microbianos é favorecido.

O aumento dos índices na etapa do choque de carga pode refletir um processo de aclimação da biomassa ao sulfeto dissolvido durante o período anterior. Uma vez que o choque durou apenas 48 horas (quando foram recolhidas as amostras L.Cc e B.Cc), não houve tempo suficiente para que os efeitos do aumento abrupto da carga de H_2S sobre a comunidade microbiana pudessem ser detectados através das técnicas utilizadas.

Após o choque, o sistema passou por um período de oscilação até atingir a estabilidade, durante o qual a concentração de sulfeto dissolvido aumentou significativamente (Tabela 5.1). A etapa de estabilização durou 32 dias aproximadamente, e foi quando os efeitos do choque de carga sobre a comunidade microbiana foram mais pronunciados. O intervalo de tempo entre as coletas (B.Cc/L.Cc e B.Pe.2/L.Pe.2) também foi maior (29 dias), de forma que os efeitos desse aumento puderam ser observados. Conforme dito anteriormente, a concentração

de sulfeto dissolvido nessa etapa chegou a valores superiores a $600 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o que pode ter tido um efeito seletivo sobre a comunidade microbiana, uma vez que tanto a diversidade quanto a riqueza decresceram, chegando aos menores valores de todo o experimento para a biomassa aderida (B.Pe.2) em relação ao índice de Chao1 e ao segundo menor valor para o índice de Simpson. Uma explicação alternativa para esse resultado poderia ser a diminuição da concentração de O_2 , decorrente do aumento da DQO no líquido de recirculação durante o choque de carga e a parte da etapa de estabilização. Em outras palavras, a menor disponibilidade do aceptor de elétrons para a oxidação do sulfeto, decorrente de sua utilização por bactérias sulfo-oxidantes ou por outros microrganismos (heterotróficos, por exemplo) ou em outras reações químicas pode ter resultado em uma alteração na microbiota e na diminuição da eficiência de remoção durante o choque de carga e na etapa subsequente. Segundo Metcalf e Eddy (2013), concentrações de sulfeto superiores a 200mg.L^{-1} podem ser inibitórias aos microrganismos em sistemas anaeróbios. No entanto, este valor equivale a cerca de $6.000 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ou seja, muito acima do que foi encontrado na Torre de regeneração biológica (máximo de $600 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Assim, é possível que a diminuição da eficiência de remoção no sistema após o choque de carga tenha decorrido da aumento da DQO e da menor disponibilidade de oxigênio, e não do efeito tóxico do sulfeto sobre a biomassa.

Finalmente, é possível observar que há diferenças entre os índices calculados a partir do líquido de recirculação e da biomassa aderida, indicando que, apesar do contato entre o líquido e o biofilme, pode haver grupos específicos de cada local. No entanto, não foi possível concluir se essa diferença é realmente significativa a partir dos dados. O índice de Simpson, por exemplo, apresenta valores bem próximos para todas as amostras suspensas e aderidas, o que pode indicar que a microbiota no sistema é homogênea e variou pouco ao longo do experimento. Também é possível que a biomassa morta tenha permanecido no sistema por algum tempo, difundida no líquido de recirculação. Assim, seu DNA poderia estar presente no momento da coleta, de forma que a alteração nos índices entre a biomassa aderida e suspensa e entre as etapas não foi tão pronunciada.

A aparente estabilidade da microbiota ao longo do tempo pode ser um aspecto positivo, uma vez que a eficiência de remoção de sulfeto se manteve alta durante a maior parte do experimento. Ou seja, o consórcio microbiano estabelecido no sistema de dessulfurização aparentemente possui características favoráveis, como alta atividade de oxidação de sulfeto e resiliência. Os táxons encontrados são analisados com maiores detalhes a seguir.

5.2.1 Análise da comunidade microbiana a partir das técnicas de DGGE e SNG

A partir do sequenciamento das bandas extraídas do DGGE, foi observada a presença significativa de bactérias do filo *Proteobacteria* (10 entre 12), especificamente da classe *Gammaproteobacteria*. As subdivisões do Filo *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta* e *Epsilon*) são baseadas na análise filogenética do gene do RNAr 16S, porém compartilham muitas características fisiológicas e ecológicas (MADIGAN *et al.*, 2010). Na classe *Gammaproteobacteria*, estão incluídos muitos microrganismos oxidadores de enxofre, tais como *Halothiobacillus* e *Chromatium*. Além disso, também foram observados alinhamentos significativos com sequências pertencentes às classes *Beta* e *Deltaproteobacteria* e também aos Filos *Synergistetes* e *Chloroflexi*. A Tabela 5.5 apresenta a classificação das sequências obtidas a partir das bandas do DGGE com o *RDP Classifier* e o *Blastn*.

Tabela 5.5: Identificação das bandas do DGGE a partir do *RDP Classifier* e *Blastn*.

Banda	RDP Classifier	Blastn	Número de acesso	Identidade (Blastn - %)
1	Família <i>Anaerolineaceae</i>	<i>Chloroflexi</i> não cultivado	CU917991	100
2	<i>Desulfomicrobium</i> sp.	<i>Desulfomicrobium</i> sp.	JN828421	97,9
3	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.	JQ608323	99,4
4	<i>Pusillimonas</i> sp.	<i>Pusillimonas</i> sp.	JX448693	99,4
5	<i>Desulfovibrio</i> sp.	<i>D. legallii</i>	NR108301	100
6	Família <i>Synergistaceae</i>	<i>Synergistetes</i> não cultivado	CU926775	100
7	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A.soli</i>	KJ806407	99,3
8	<i>Thioalkalimicrobium</i> sp.	<i>Thioalkalimicrobium</i> sp.	GU735085	97,2
9	<i>Thioalkalimicrobium</i> sp.	<i>Thioalkalimicrobium</i> sp.	GU735085	97,2
10	Ordem <i>Chromatiales</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	KJ950456	96,8
11	<i>Oligella</i> sp.	<i>O. ureolytica</i>	CU927589	99,7
12	<i>Oligella</i> sp.	<i>O. ureolytica</i>	NR114553	100

Os táxons encontrados em ambas as técnicas (DGGE e SNG) serão discutidos em maiores detalhes juntamente com os dados de SNG. No entanto, alguns foram identificados apenas pelo DGGE, os quais correspondem às bandas 4, 8, 9, 11 e 12, e são analisados a seguir.

A banda 4 apresentou significativa similaridade com sequências de organismos do gênero *Pusillimonas* (classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*, família *Alcaligenaceae*), caracterizado por bactérias aeróbias e quimiorganotróficas (GARRITY, 2001). Esse gênero já foi descrito em sistema de dessulfurização (LI *et al.*, 2013), porém aparentemente não possui a habilidade de oxidar compostos de enxofre reduzidos.

As bandas 8 e 9 foram ambas afiliadas ao gênero *Thioalkalimicrobium* (classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Thiotrichales*, família *Piscirickettsiaceae*), o qual é composto por microrganismos quimiolitotróficos, aeróbios e microaerófilos capazes de oxidar sulfeto e tiosulfato (GARRITY, 2001, SOROKIN *et al.*, 2001). Essas bactérias já foram observadas em água e sedimentos de lagos alcalinos onde há produção de sulfeto. O pH ótimo para seu crescimento fica em torno de 9 (o pH mantido na Torre de regeneração biológica varia entre 7 e 9, aproximadamente). Bandas de mesma altura parecem estar presentes em todas as amostras, o que pode indicar a presença constante dessas bactérias no sistema, inclusive após o choque de carga. Curiosamente, o sistema de dessulfurização mostrou uma capacidade de auto-tamponamento (dados não publicados). Esse aspecto é muito relevante, pois uma vez que os próprios microrganismos auxiliam na manutenção do pH do meio, o consórcio microbiano aí estabelecido pode vir a ser utilizado para o tratamento de outros efluentes ricos em sulfeto, com menores custos e geração de resíduos. O gênero *Thioalkalimicrobium*, apesar de não ter sido identificado pela técnica de SNG, pode ser especialmente importante para a dinâmica estabelecida no sistema de dessulfurização. Estudos anteriores, como os realizados por González-Sánchez e Revah (2007) e Baquerizo *et al.* (2013), utilizaram com sucesso um consórcio bacteriano alcalifílico para a oxidação de sulfeto e tiosulfato, respectivamente.

As sequências das bandas 11 e 12 foram classificadas como pertencentes ao gênero *Oligella* (classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*, família *Alcaligenaceae*). Segundo o *Bergey's Manual* (2001), as duas espécies desse gênero (*Oligella ureolytica* e *Oligella urethralis*) são aeróbias (mas podem reduzir nitrito), quimiorganotróficas (utilizam alguns poucos ácidos orgânicos como fonte de carbono) e são observadas principalmente no trato genitourinário humano, sendo que *O. ureolytica* apresenta resultado fortemente positivo no teste da urease (GARRITY, 2001). No entanto, bactérias do gênero já foram observadas em ambientes distintos, como um reator tratando efluente de coqueria com alta concentração de fenol (FELFÖLDI *et al.*, 2010). Na planta de dessulfurização, a sua presença pode ser devida à alta concentração de compostos nitrogenados na vinhaça, uma vez que o lodo presente no sistema provém do efluente do digestor.

É importante destacar que a banda 10 apresentou resultados distintos a partir das duas ferramentas. Através do *RDP Classifier*, foi encontrada similaridade com sequências pertencentes a organismos da Ordem *Chromatiales* (Classe *Gammaproteobacteria*), que

contém bactérias púrpuras sulfurosas. Essas bactérias, como dito anteriormente, realizam fotossíntese anoxigênica utilizando compostos de sulfeto reduzidos como doadores de elétrons. Através da ferramenta *Blastn*, a sequência foi, por sua vez, classificada como *Pseudomonas* (ordem *Pseudomonadales*), de forma que a identidade da sequência, a partir do nível de classe, é inconclusiva.

A Figura 5.7 apresenta a composição dos filões (incluindo o domínio *Archaea*) a partir dos resultados do SNG. As UTOs com abundância inferior a 1% (em cada amostra) foram incluídas no grupo “Não identificadas/Outros” para facilitar a visualização dos dados. Os dados referentes aos níveis de classificação mais específicos serão discutidos no decorrer do texto, devido ao grande número de UTOs que dificultaria a apresentação gráfica.

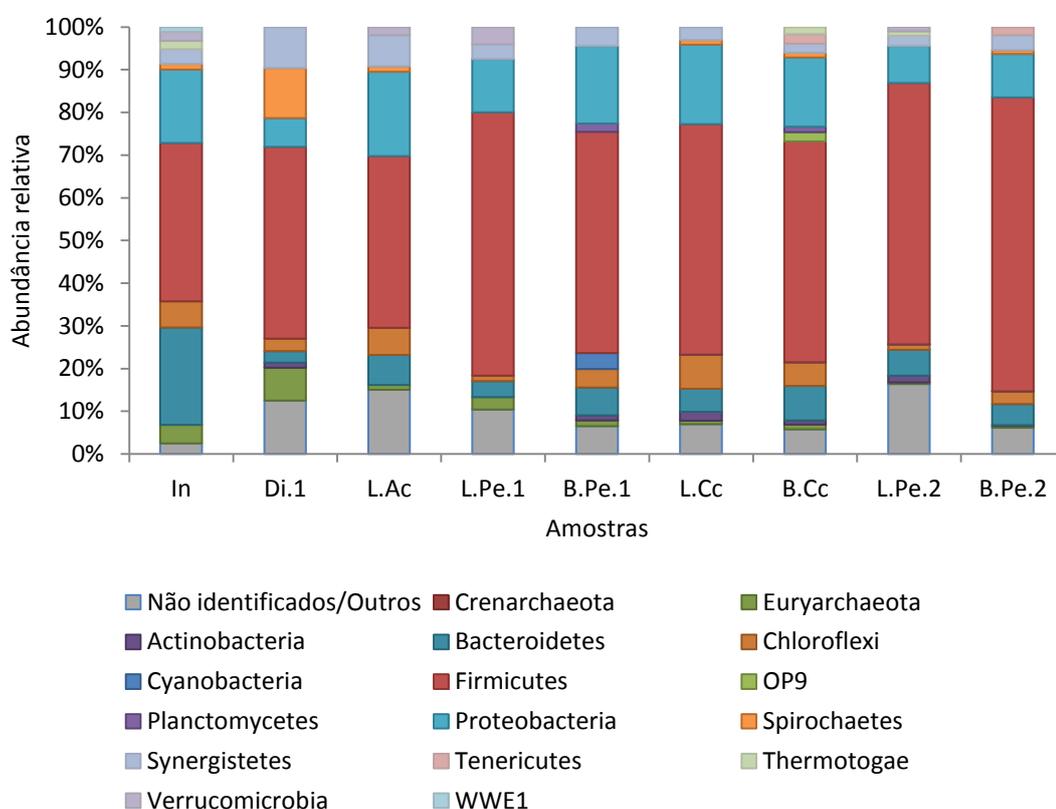


Figura 5.7: Composição da comunidade microbiana em nível de filo.

In: Inóculo, Di.1 = Digestor, L.Ac = Líquido de recirculação na etapa de aclimação, L.Pe.1 e B.Pe.1: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida no período estacionário 1, L.Cc e B.Cc: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida após o choque de carga, L.PE.2 e B.PE.2: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida ao fim entre a etapa de estabilização e o período estacionário 2.

Em relação a *Archaea*, o filo *Euryarchaeota* correspondeu a 2,2% do total (esse valor é uma média das abundâncias relativas do táxon em todas as amostras). Nesse filo, são encontrados procaríotos metanogênicos típicos de sistemas anaeróbios. Espécies de *Archaea* estão presentes no digestor (7,7% do total), como esperado, mas também em pequena proporção nas amostras coletadas em diferentes etapas experimentais. No período estacionário 2, por sua vez, o grupo não foi observado nem na biomassa aderida nem no líquido de recirculação (amostras L.Pe.2 e B.Pe.2), o que pode indicar que o choque de carga levou à supressão desses microrganismos.

Os principais filios do domínio *Bacteria* observados nas amostras foram, em média, *Firmicutes* (52,4%) e *Proteobacteria* (14,2%), que somam 66,6% do total. Em menor proporção, estão os filios *Bacteroidetes* (7,5%), *Synergistetes* (4,4%) e *Chloroflexi* (4,3%). Somados, os 5 filios representam 83% da diversidade encontrada em todas as amostras. Estudos em plantas de produção de biogás e reatores anaeróbios já encontraram resultados semelhantes. Em um trabalho realizado por Luo e Angelidaki (2014) em um sistema de metanização a partir da digestão anaeróbia de dejetos animais, *Firmicutes* representou a maior parte da comunidade bacteriana, seguido pelo filo *Proteobacteria*, e em menor proporção, *Synergistetes*. Krober *et al.* (2009) relataram a dominância de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em amostras de uma planta de produção de biogás a partir de silagem de milho, centeio e esterco líquido. Em uma análise da comunidade microbiana em 21 unidades de produção de biogás, Sundberg *et al.* (2013) relataram uma alta abundância relativa de *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes* e *Euryarchaeota* em reatores tratando lodo de esgoto, e de *Firmicutes* naqueles que realizavam codigestão de efluentes diversos (resíduos de matadouros, restaurantes, domésticos, vinhaça, estrume). Em um interessante estudo realizado por Nelson *et al.* (2011), bancos de dados com sequências da subunidade 16S do gene do RNA ribossomal obtidas da biomassa de digestores anaeróbios foram analisados. Os autores observaram que as UTOs mais abundantes, de forma geral, estavam relacionadas aos filios *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Chloroflexi*, nessa ordem. Embora a análise do reator anaeróbio não seja o foco deste trabalho, a biomassa presente no sistema de dessulfurização provém, em última análise, do digestor. Assim, é esperado que os grupos presentes no mesmo sejam encontrados em alguma proporção nas demais amostras (o líquido de recirculação e o inóculo são oriundos do tanque de extração, os quais provém do efluente digestor). De fato, os resultados do SNG confirmam essa afirmação para a maioria dos filios, como pode ser visto na Figura 5.7.

O filo *Firmicutes*, o mais abundante no sistema, é dividido em duas classes principais: *Clostridia* e *Bacilli* (a classe *Mollicutes*, antes incluída em *Firmicutes*, atualmente faz parte do filo *Tenericutes*). Esse filo contém cerca de 235 gêneros, incluindo muitos de importância médica, como *Bacillus* e *Clostridium*, e é composto por bactérias altamente diversificadas em termos de morfologia, fisiologia, ecologia e resposta ao teste de coloração de Gram (HAAKENSEN *et al.*, 2008). Membros desse filo são capazes de fermentar diversos substratos orgânicos e formar esporos, e já foram associados a contaminações em plantas de produção de etanol para fins energéticos e de bebidas (SKINNER; LEATHERS, 2004; HAAKENSEN *et al.*, 2008). A presença dessas bactérias durante a fermentação (sobretudo as do ácido lático, como *Lactobacillus*), pode prejudicar a eficiência do processo, uma vez que elas competem com as leveduras pelos substratos orgânicos, além de produzirem compostos inibitórios para as mesmas.

A presença de *Firmicutes* no sistema de dessulfurização é justificada, uma vez que o inóculo provém do digestor de vinhaça, a qual é produzida durante a etapa de destilação para obtenção do etanol. A Figura 5.7 mostra que essas bactérias são abundantes tanto na amostra do digestor como do inóculo, e que a partir do período estacionário 1, o filo *Firmicutes* correspondeu à maior parte da comunidade microbiana (abundância relativa superior a 50%) em todas as etapas restantes, chegando a compor mais de 65% da biomassa no período estacionário 2. No entanto, a classe *Bacilli* (que contém as supracitadas bactérias do ácido lático) correspondeu a apenas 1% do total, enquanto a grande maioria das UTOs foi classificada como *Clostridia* (51%), sobretudo da ordem *Clostridiales* (43,6%).

A classe *Clostridia* é bastante diversificada, com bactérias capazes de degradar proteínas, lipídeos e carboidratos complexos, e é frequentemente observada em reatores anaeróbios (KRÖBER *et al.*, 2009; SUNDBERG *et al.*, 2013, LUO; ANGELIDAKI, 2014). Gêneros capazes de reduzir sulfato, como *Desulfotomaculum* e *Pelotomaculum*, também estão incluídos nessa classe (MADIGAN *et al.*, 2010). Uma vez que as concentrações de sulfato e matéria orgânica no sistema de dessulfurização são altas, bactérias redutoras de sulfato (BRS) poderiam proliferar e gerar H₂S pela redução do sulfato presente no líquido de recirculação. Dessa forma, seria possível que, embora o processo de dessulfurização do biogás devido à lavagem na Torre de absorção mantivesse alta a eficiência de remoção, a geração indesejável de sulfeto na fase líquida também fosse significativa. No entanto, como pode ser observado na Figura 5.8, após a etapa de estabilização seguida ao choque de carga (na qual a concentração

de sulfeto no meio aumentou significativamente), o teor de sulfeto dissolvido permaneceu baixo, enquanto o de sulfato subiu. Portanto, é possível concluir que, após a estabilização, não houve produção indesejável de sulfeto no sistema de dessulfurização e que o processo dominante é a oxidação de compostos de enxofre reduzidos.

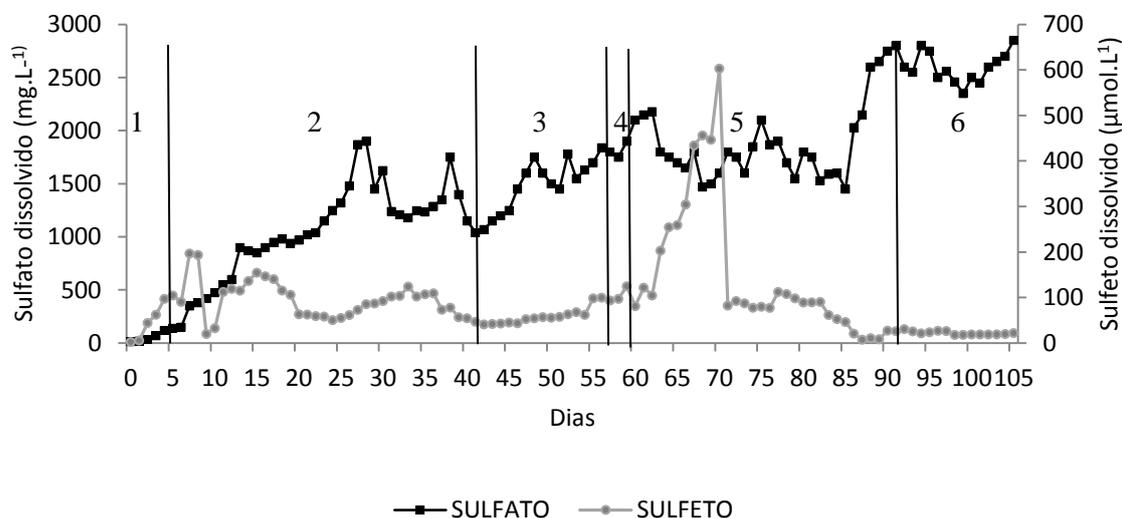


Figura 5.8: Concentrações de sulfato e sulfeto dissolvidos ao longo do tempo. Os números na área do gráfico indicam as etapas experimentais correspondentes. 1: Aclimação, 2: Aumento de carga, 3: Período estacionário1, 4: Choque de carga, 5: Estabilização, 6: Período estacionário 2.

O gênero mais abundante da ordem *Costridiales* e no sistema em geral foi, por sua vez, *Syntrophomonas* (3,7% do total). É importante destacar, no entanto, que este foi o mais abundante dentre as UTOs que foram identificadas até o nível de gênero, embora isso não signifique necessariamente que seja o mais abundante no sistema. O gênero *Syntrophomonas*, assim como outros membros da família *Syntrophomonadaceae*, formam um grupo filogenético distante dos outros membros de *Firmicutes* e são caracterizados por metabolizar ácidos graxos em associações com microrganismos que utilizam H_2 e formiato (ZHAO *et al.*, 1990; McINERNEY *et al.*, 2008 *apud* SIEBER *et al.*, 2010). Portanto, essas bactérias são, como o nome indica, sintróficas. A sintrofia ocorre quando dois organismos distintos se associam para degradar algum substrato que não seriam capazes de metabolizar individualmente (MADIGAN *et al.*, 2010). Como a vinhaça é rica em ácidos orgânicos – estudos anteriores já reportaram concentrações de ácidos graxos voláteis da ordem de 19 mg.L^{-1} em melão de cana (BAZÚA *et al.*, 1991 *apud* FUESS; GARCIA, 2014) – tais consórcios microbianos poderiam se beneficiar significativamente de sua degradação. A Figura 5.9 apresenta os gêneros do filo *Firmicutes* identificados no sistema. Os gêneros com

abundância relativa inferior a 1%, sem informação associada ou não identificados foram agrupados na categoria “Não identificados/Outros”.

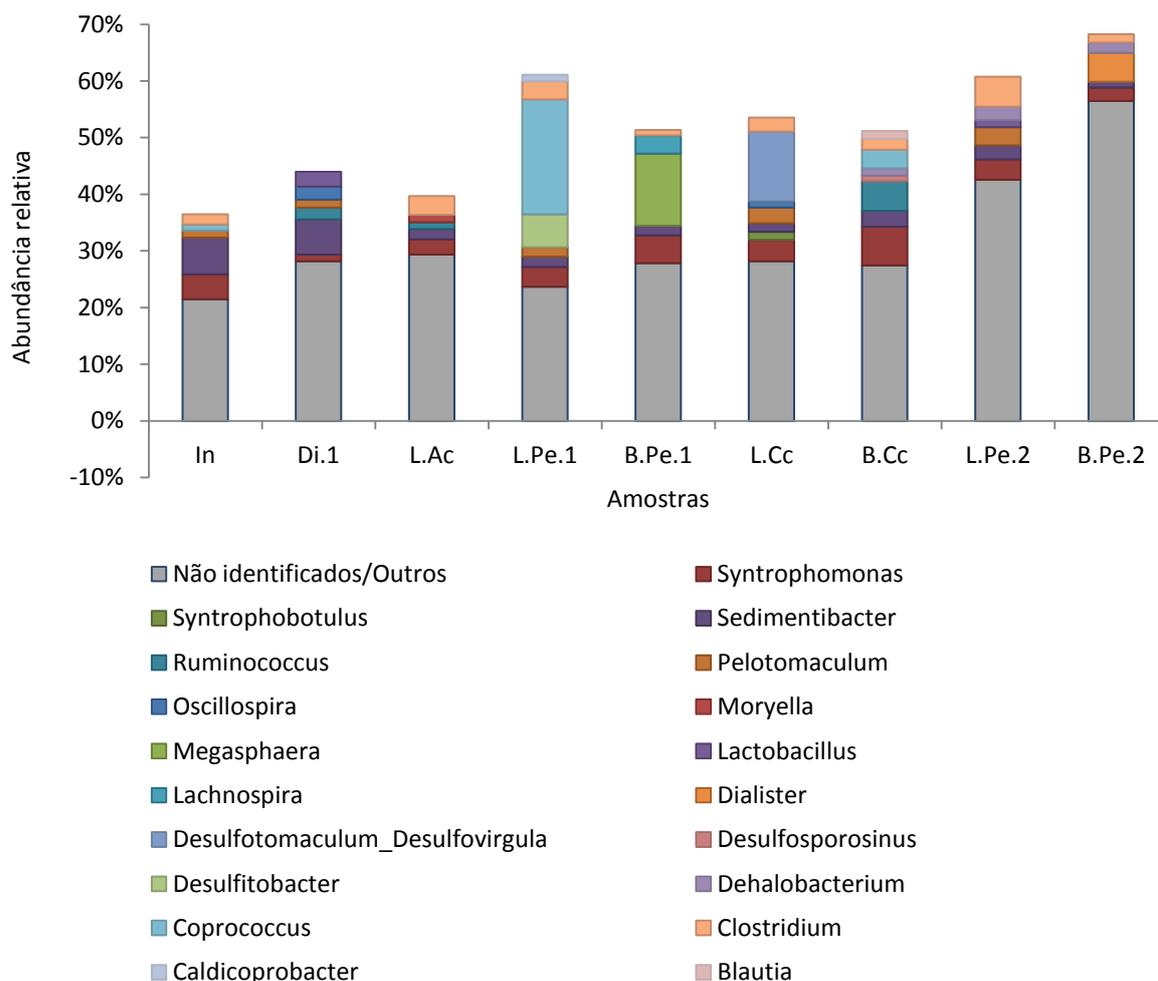


Figura 5.9: Abundância relativa de gêneros pertencentes ao filo *Firmicutes*.

In: Inóculo, Di.1 = Digestor, L.Ac = Líquido de recirculação na etapa de aclimação, L.Pe.1 e B.Pe.1: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida no período estacionário 1, L.Cc e B.Cc: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida após o choque de carga, L.PE.2 e B.PE.2: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida entre a etapa de estabilização e o período estacionário 2.

O gênero *Syntrophomonas* foi detectado em todas as amostras, assim como *Sedimentibacter* (2,9% do total) e *Clostridium* (2,3% do total, com exceção da amostra do digestor). *Clostridium* é formado por espécies anaeróbias (porém algumas são capazes de tolerar baixas concentrações de oxigênio) e com metabolismo diversificado. Muitas espécies são fermentadoras e produzem álcool e ácidos orgânicos, como os ácidos acético e butírico (DWORKIN, 2006). O gênero *Sedimentibacter* foi proposto como um táxon distinto na ordem *Clostridiales* em 2002. É composto por bactérias anaeróbias, capazes de fermentar piruvato e aminoácidos (BREITENSTEIN *et al.*, 2002). É interessante observar que, durante o período

estacionário 2, alguns gêneros que estavam presentes na etapa anterior não foram identificados, enquanto outros anteriormente ausentes foram detectados, como *Dialister*. Porém, nenhum desses gêneros está envolvido na oxidação de sulfeto, aparentemente. É importante destacar que muitas sequências não foram classificadas até o nível de gênero, de forma que esses resultados nesse nível taxonômico podem não refletir a verdadeira composição da microbiota.

O filo *Proteobacteria* é a maior e mais diversificada divisão do domínio *Bacteria*, e como dito anteriormente, possui cinco classes (*Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta* e *Epsilon*) (MADIGAN *et al.*, 2010). No sistema de dessulfurização foram encontrados representantes de todas as classes, porém as mais abundantes foram as *Deltaproteobacteria* (4,8% do total), *Gammaproteobacteria* (4,5%) e *Betaproteobacteria* (4,0%). A Figura 5.10 apresenta a distribuição dos gêneros pertencentes a esse filo (a escala do gráfico não corresponde a 100%, já que os valores plotados se referem ao total de gêneros encontrados e não apenas aos gêneros de *Proteobacteria*). Os gêneros identificados dentre as *Proteobacteria* apresentaram uma frequência baixa, de forma geral, por isso não foram retirados aqueles com abundância relativa inferior a 1% (muitas OTUs não foram identificadas). Os gêneros *Acinetobacter* (1,3%) e *Desulfomicrobium* (0,8%) foram os mais expressivos. Deve-se destacar que esses valores representam a média total, porém podem variar entre as amostras. Ambos foram identificados também através do DGGE. A sequências das bandas 2 e 5 foram classificadas respectivamente como *Desulfomicrobium* sp., *Desulfovibrio* sp, gêneros amplamente estudados dentre as BRS. Ambos pertencem à classe *Deltaproteobacteria*; são mesofílicos, anaeróbios e com capacidade de reduzir sulfato a sulfeto, porém incapazes de oxidar acetato. Embora pertençam a famílias distintas, esses gêneros possuem muitas características fisiológicas em comum. As principais diferenças entre eles estão relacionadas à morfologia, à ausência de um pigmento denominado desulfovirdina e à habilidade de oxidar determinados compostos orgânicos (GARRITY, 2001). As sequências das bandas 3 e 7 foram classificadas como pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, da família *Moraxellaceae*, ordem *Pseudomonadales* (classe *Gammaproteobacteria*). Esse gênero é caracterizado por bactérias anaeróbias estritas, frequentemente saprofíticas e com temperatura e pH de crescimento ótimo em torno de 34°C e 6,5, respectivamente. São amplamente distribuídas na natureza, e podem ser encontradas na água, no solo, em esgotos sanitários e até na pele e no trato respiratório humano, sendo potencialmente patogênicas. Além disso, são capazes de degradar compostos aromáticos, o que lhes confere potencial para biorremediação (GARRITY, 2001). Apesar de

normalmente não serem relacionadas à oxidação de compostos de enxofre, já foram descritas em sistemas de dessulfurização (OMRI *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2014) e há relatos de isolados identificados como *Acinetobacter* capazes de oxidar sulfeto (POTIVICHAYANON *et al.*, 2006, LEE *et al.*, 2013).

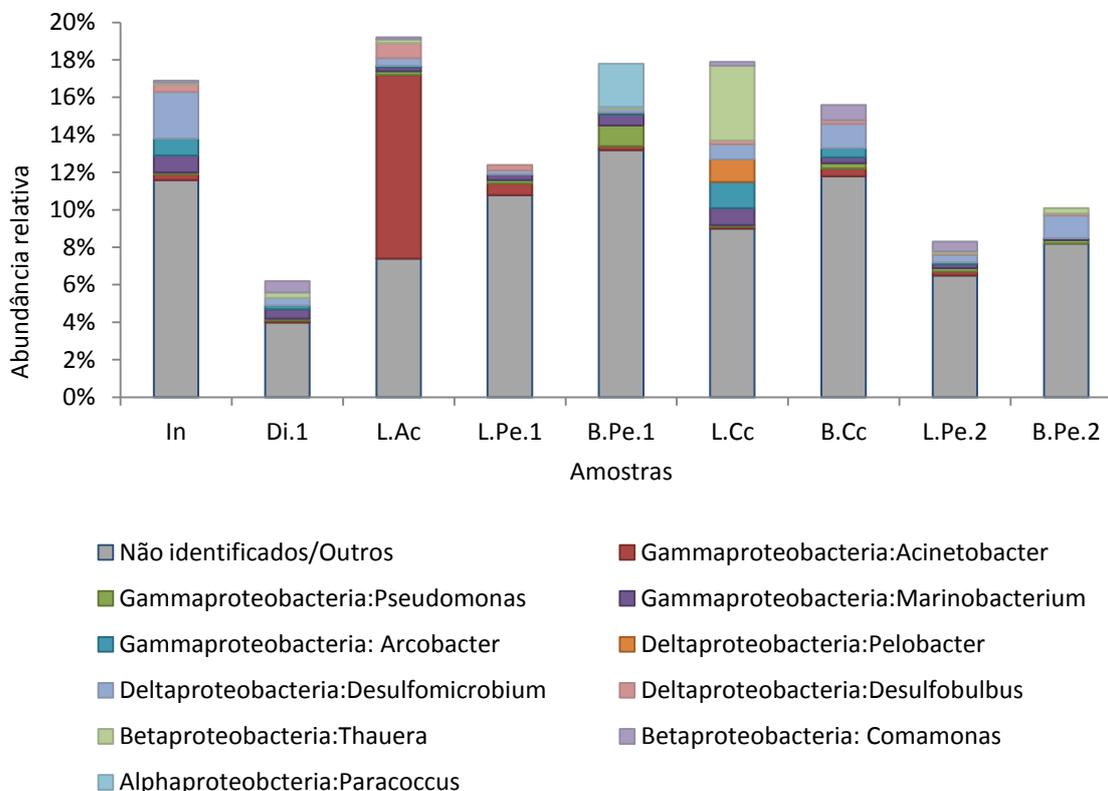


Figura 5.10: Abundância relativa de gêneros identificados do filo *Proteobacteria*.

In: Inóculo, Di.1 = Digestor, L.Ac = Líquido de recirculação na etapa de aclimação, L.Pe.1 e B.Pe.1: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida no período estacionário 1, L.Cc e B.Cc: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida após o choque de carga, L.PE.2 e B.PE.2: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida entre a etapa de estabilização e o período estacionário 2.

O filo *Bacteroidetes* é composto por bactérias envolvidas nas etapas de hidrólise e acidogênese da digestão anaeróbia e já foi observada a existência de uma correlação positiva na atividade hidrolítica em digestores anaeróbios e a porcentagem de *Bacteroidetes* (REGUEIRO *et al.*, 2012). Em concordância com estudos anteriores, o principal gênero de *Bacteroidetes* encontrado foi *Paludibacter*, o qual contém espécies capazes de produzir propionato e acetato como produtos primários da fermentação (NELSON *et al.*, 2011). Esse filo possui maior abundância relativa na amostra do inóculo e não do digestor, como seria esperado, porém foi encontrado em todas as amostras.

O filo *Synergistetes*, presente em maior proporção na amostra do digestor, é composto por anaeróbios estritos, capazes de degradar substratos ricos em proteínas e amplamente distribuídos (VARTOUKIAN *et al.*, 2007; JUMAS-BILAK *et al.*, 2009). É um filo criado recentemente e parece estar associado à etapa acidogênica durante a produção de metano (NELSON *et al.*, 2011). No DGGE, a sequência da banda 6 foi classificada como pertencente à Família *Synergistaceae* (filo *Synergistetes*). O grupo *Synergistes* (hoje um gênero do filo *Synergistetes*) é composto por anaeróbios estritos, capazes de degradar substratos ricos em proteínas e com ampla distribuição na natureza (VARTOUKIAN *et al.*, 2007; JUMAS-BILAK *et al.*, 2009).

O Filo *Chloroflexi*, anteriormente identificado com as bactérias verdes não sulfurosas, ainda é relativamente pouco estudado e inclui bactérias com metabolismo diversificado (fotoautotróficas, fermentadoras, aeróbias, anaeróbias...) (HUG *et al.*, 2013). A maior parte (4,2% do total) correspondeu à classe *Anaerolineae*, a qual também foi encontrada através do DGGE (banda 1). Essa subdivisão do filo *Chloroflexi* foi proposta formalmente em 2006, e é composta por bactérias anaeróbias e heterotróficas que já foram reportadas em diversos ambientes, inclusive em lodo de reatores anaeróbios (YAMADA *et al.*, 2006). Um estudo sobre a diversidade microbiana em fontes sulfurosas encontrou bactérias relacionadas a essa classe, porém ainda não há evidências definitivas de que esses microrganismos sejam capazes de utilizar compostos sulfurados em suas reações metabólicas (YOUSSEF *et al.*, 2012).

Outros filios de *Bacteria*, em menor proporção, foram *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Tenericutes* e *Thermotogae*. Há ainda uma porcentagem expressiva de táxons não identificados, os quais podem incluir bactérias sulfoxidantes. Assim, apesar do grande número de sequências obtidas, é possível que grupos importantes não tenham sido detectados, e novos estudos com iniciadores mais específicos para bactérias são recomendáveis, uma vez que podem trazer informações relevantes.

É interessante observar que alguns grupos microbianos identificados a partir do sequenciamento das bandas do DGGE (o qual detecta, em princípio, os microrganismos dominantes em uma comunidade), foram observados em baixíssima proporção ou não foram identificados nos resultados do sequenciamento na plataforma MiSeq. Entre eles estão os gêneros *Thioalkalimicrobium*, *Pusillimonas* e *Oligella*. Este é um exemplo da importância de se considerar, na interpretação dos resultados, as limitações inerentes a cada técnica. No

presente trabalho, é facilmente justificável que grupos encontrados pelo sequenciamento de nova geração estejam ausentes do DGGE, mas o que poderia explicar o inverso? Uma fonte significativa de ambiguidades em estudos que utilizam técnicas baseadas em amplificação DNA são, justamente, os vieses introduzidos na etapa de PCR (*polimerase chain reaction*). Diferenças no número de cópias de um gene, eficiência da reação, amplificação preferencial por um determinado DNA, concentração do DNA alvo, formação de sequências quiméricas (sequências formadas pela junção de fragmentos de DNA provenientes de microrganismos diferentes) e a especificidade dos iniciadores são alguns dos fatores que podem influenciar os resultados. Os perfis gerados através de PCR refletem, portanto, o *pool* de DNA amplificado na reação, e não a comunidade original (NOCKER *et al.*, 2007). Ainda assim, a análise de comunidades microbianas através de técnicas baseadas em amplificação é amplamente difundida e informativa. No presente estudo, o par de iniciadores utilizado no DGGE amplificou a região hipervariável V8 do Domínio *Bacteria*, enquanto o par do SNG foi direcionado à região V4-V5 da subunidade 16S do gene do RNA ribossomal de *Archaea* e *Bacteria* (experiências prévias e dados da literatura mostram que iniciadores degenerados não são adequados para o DGGE). Assim, as discrepâncias citadas anteriormente podem ser devidas à especificidade dos iniciadores usados em cada uma das técnicas.

Os resultados apontam para a existência de uma comunidade microbiana metabolicamente diversificada na Torre de regeneração biológica, com a presença de organismos aeróbios e anaeróbios, quimiolitotróficos e quimiorganotróficos (e, possivelmente, fototróficos também). Grupos relacionados à oxidação de compostos de enxofre reduzidos foram identificados, tais como as bactérias alcalifílicas do gênero *Thioalkalimicrobium*.

Uma vez que a grande parte das UTOs foi classificada até o nível de ordem, optou-se por realizar a análise também neste nível taxonômico (em média, 78,6% das UTOs foi classificada até família e 36,3% até gênero, excluindo-se as sequências não identificadas ou sem informação associada). A Figura 5.11 mostra a abundância relativa das UTOs do domínio *Bacteria* ao nível de ordem (aquelas com abundância relativa inferior a 1%, pertencentes ao domínio *Archaea* e as sequências sem informação associada ou não identificadas foram agrupadas na categoria “Não identificados/Outros”).

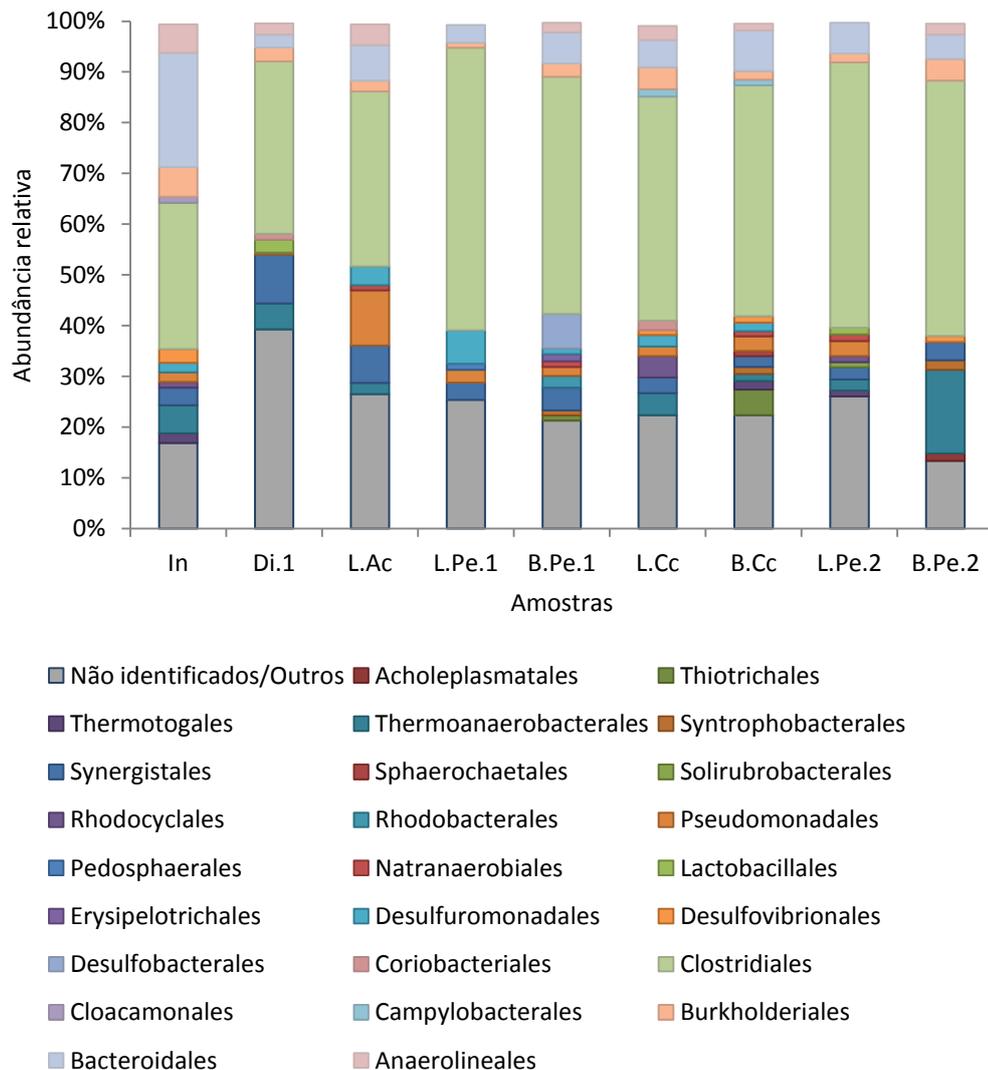


Figura 5.11: Composição da comunidade microbiana em nível de ordem.

Legenda: In: Inóculo, Di.1 = Digestor, L.Ac = Líquido de recirculação na etapa de aclimação, L.Pe.1 e B.Pe.1: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida no período estacionário 1, L.Cc e B.Cc: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida após o choque de carga, L.Pe.2 e B.Pe.2: respectivamente, Líquido de recirculação e Biomassa aderida ao fim da etapa de estabilização e início do período estacionário 2.

A composição geral dos filos se refletiu nas ordens, uma vez que a ordem *Clostridiales* (*Firmicutes*) foi a mais abundante (como em todas as amostras) e os outros principais filos, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Chloroflexi* e *Bacteroidetes* também foram observados. De forma geral, a microbiota parece ter variado pouco ao longo do experimento. Porém, há algumas diferenças, por exemplo, a ordem *Pseudomonadales*, possui abundância relativa alta na amostra L.Ac (10,9%) e bastante baixa na amostra B.Pe.2 (inferior a 1%). Os gêneros da ordem *Pseudomonadales* identificados foram *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Conforme dito anteriormente, bactérias do gênero *Acinetobacter* já foram descritas em sistemas de dessulfurização e parecem ser associadas à oxidação de sulfeto (POTIVICHAYANON *et al.*

2006; OMRI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2014). O gênero *Pseudomonas* inclui espécies que utilizam diversos de compostos orgânicos e inorgânicos e vivem em uma variedade de condições ambientais. São aeróbias, porém algumas são capazes de utilizar nitrato como acceptor de elétrons, em um processo acoplado à oxidação de sulfeto (MOORE *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2013). Além disso, nessa mesma amostra (B.Pe.2), há um aumento importante na abundância relativa de *Thermoanaerobacterales* (16,5%).

Poucas informações sobre a ordem *Thermoanaerobacterales* (classe *Clostridia*, filo *Firmicutes*) estão disponíveis na literatura e as UTOs relacionadas não foram, em sua maioria, classificadas até níveis taxonômicos mais específicos. No entanto, informações sobre outros membros desse grupo podem dar uma ideia geral de suas características. O gênero típico da ordem, *Thermoanaerobacter*, é composto por bactérias anaeróbias, fermentadoras e termofílicas, as quais vêm sendo estudadas devido à sua capacidade de converter açúcares em etanol (HEMME *et al.*, 2011; MADIGAN, 2010). A ordem também inclui um gênero, *Thermodesulfobium*, composto por espécies quimioautotróficas, capazes de reduzir sulfato a partir de da oxidação de H₂ e CO₂ (MORI *et al.*, 2003). O único gênero dessa ordem identificado no sistema, *Thermoacetogenium*, pertence à família *Thermoanaerobacteraceae* e foi encontrado em baixíssima abundância relativa no inóculo. É composto por bactérias anaeróbias, quimioautotróficas ou quimioheterotróficas, capazes de oxidar acetato utilizando sulfato ou tiosulfato como aceptores de elétrons ou em sintrofia com organismos hidrogenotróficos (HATTORI *et al.*, 2000). Aparentemente, o aumento da DQO concomitante aos altos níveis de sulfeto dissolvido pode ter favorecido a proliferação de bactérias fermentadoras, como as do gênero *Clostridium* e possivelmente, espécies pertencentes à ordem *Thermoanaerobacterales*. Algumas bactérias mostraram menor resistência ao sulfeto dissolvido, como *Acinetobacter* e *Pseudomonas*.

Outro aspecto da comunidade microbiana que deve ser destacado é que a ordem *Syntrophobacterales* teve abundância relativa superior ou igual a 1% somente nas amostras de biomassa aderida. Apesar de pertencer às *Proteobacteria*, o grupo não está presente na Figura 5.10, a qual apresenta os gêneros desse filo. Isso se deve ao fato de que, nesse nível de classificação, não foi possível identificar essa particularidade. Esse resultado pode ser um indício de que a microbiota da biomassa aderida e do líquido de recirculação possuem algumas diferenças.

As bactérias oxidadoras de sulfeto são o principal grupo de interesse neste trabalho, já que o propósito do sistema é promover a dessulfurização do biogás e a oxidação do sulfeto. A Tabela 5.6 sintetiza, a partir dos dados do DGGE e do SNG, os principais grupos que podem estar relacionados à oxidação de sulfeto na Torre de regeneração biológica.

Tabela 5.6: Bactérias oxidadoras de sulfeto identificadas no sistema

Filo	Táxons identificados	Técnica	L.Ac	L.Pe.1	B.Pe.1	L.Cc	B.Cc	L.Pe.2	B.Pe.2
<i>Proteobacteria</i>	<i>Paracoccus</i> sp.	SNG	0.0%	0.0%	2.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	DGGE/SNG	9.8%	0.6%	0.2%	0.1%	0.4%	0.2%	0.0%
<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	DGGE/SNG	0.2%	0.2%	1.1%	0.1%	0.3%	0.2%	0.2%
<i>Proteobacteria</i>	<i>Thiomicrospira</i> sp.	SNG	0.0%	0.0%	0.7%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
<i>Proteobacteria</i>	Outros da ordem <i>Thiotrichales</i>	SNG	0.5%	0.2%	1.0%	0.3%	5.0%	0.6%	0.1%
<i>Proteobacteria</i>	<i>Arcobacter</i> sp.	SNG	0.1%	0.0%	0.1%	1.4%	0.5%	0.1%	0.0%
<i>Proteobacteria</i>	<i>Sulfuricurvum</i> sp.	SNG	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%
<i>Cyanobacteria</i>	Não identificado	SNG	0.0%	0.0%	3.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Proteobacteria</i>	<i>Thioalkalimicrobium</i> sp.	DGGE	-	-	-	-	-	-	-

Observa-se que a abundância relativa das bactérias sulfo-oxidantes identificadas foi inferior a 10%, de forma geral. As amostras com maior proporção dos táxons apresentados na Tabela 5.6 foram L.Ac (10,6%), B.Pe.1 (9,2%) e B.Cc (6,8%). Nas demais, a abundância relativa desses grupos foi inferior a 2%, somando apenas 0,3 % em B.Pe.2. Os dados físico-químicos referentes a sulfeto dissolvido e eficiência de remoção de H₂S indicam, por sua vez, que apesar de a abundância relativa desses táxons ter sido baixa, aparentemente há uma alta atividade de oxidação de sulfeto. Táxons frequentemente associados à oxidação de sulfeto, como *Thiobacillus*, *Halothiobacillus* e *Beggiatoa* não foram observados. No entanto, isso não implica que esses táxons não estejam presentes no sistema, pois é possível que não tenham sido identificados.

Além disso, não foram identificadas UTOs relacionadas aos principais grupos de bactérias sulfurosas verdes e púrpuras, o que indica que a oxidação de sulfeto foi realizada sobretudo por bactérias incolores, como esperado, uma vez que a Torre de regeneração biológica não é iluminada. Há indícios de que as bactérias sulfurosas incolores sejam, por sua vez, mais adequadas a processos biotecnológicos de dessulfurização, pois possuem uma taxa de crescimento superior a das fototróficas (OH *et al.*, 1998 *apud* POKORNA; ZABRANSKA, 2015).

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões da pesquisa, baseadas nos dados do DGGE, do sequenciamento na plataforma MiSeq e das análises estatísticas são apresentadas a seguir.

A composição da comunidade microbiana no digestor e no sistema dessulfurização teve semelhanças com aquelas encontradas em estudos anteriores e os grupos encontrados foram sobretudo do Filo *Firmicutes* e *Proteobacteria*. O gênero mais abundante, de forma geral, foi *Syntrophomonas* (*Firmicutes*), composto por bactérias sintróficas frequentemente associadas a organismos que consomem H₂. Apesar da presença de bactérias redutoras de sulfato no sistema de dessulfurização, não foi observado um aumento da concentração de sulfeto; ao contrário, o sulfato dissolvido aumentou ao longo do tempo, indicando que o processo dominante no sistema é a oxidação e não a redução de compostos de enxofre. As UTOs relativas ao domínio *Archaea* não foram identificadas no período estacionário 2, o que pode significar que esses microrganismos são mais sensíveis às condições adversas resultantes do choque de carga. Embora tenham sido encontrados grupos distintos entre a biomassa aderida aos fios de *nylon* e a dispersa (exemplificado pela ordem *Syntrophobacterales*, mais abundante nas amostras de biomassa aderida), de forma geral a comunidade microbiana parece constante entre as amostras e ao longo do experimento.

Com relação ao efeito da variação da carga de H₂S sobre a diversidade microbiana, os dados do DGGE e do SNG indicam que a diversidade foi alta em todas as etapas experimentais, mesmo após o choque de carga. Embora a composição de alguns táxons tenha variado, sobretudo após o choque, não é possível afirmar que a concentração de sulfeto dissolvido foi a variável responsável pelas mudanças. Os altos valores de DQO, associada à diminuição do OD, podem ter influenciado sensivelmente a comunidade microbiana, e favorecido bactérias não diretamente relacionadas à oxidação de sulfeto, como as fermentadoras do gênero *Clostridium*. A diminuição da DQO e aumento do OD ao final da fase de estabilização parecem ter favorecido a recuperação do sistema, porém estudos posteriores são necessários para determinar de forma mais precisa qual é o efeito desses parâmetros sobre a estabilidade e a comunidade microbiana no sistema.

As bactérias sulfo-oxidantes encontradas pertencem, sobretudo, às *Proteobacteria*. Apesar da atividade de oxidação de sulfeto ter sido observada através dos dados físico-químicos, a abundância relativa dos táxons de bactérias relacionados a esse processo, a partir dos dados de

SNG, foi baixa. No entanto, esse fato não implica necessariamente que esses táxons não estejam presentes no sistema. A detecção, através do DGGE, de bactérias classificadas como *Thioalkalimicrobium*, por exemplo, indica que pode haver grupos de oxidadores de sulfeto não identificados. Além disso, não foram identificadas UTOs relacionadas aos principais grupos de bactérias sulfurosas verdes e púrpuras, o que indica que a oxidação de sulfeto é realizada por bactérias incolores.

7 RECOMENDAÇÕES

Após a análise dos resultados através das técnicas de DGGE, de sequenciamento de nova geração na plataforma MiSeq e de ferramentas estatísticas, são propostas algumas recomendações que poderão auxiliar na maior compreensão do sistema de dessulfurização:

- Incluir, no monitoramento dos parâmetros operacionais, a série de sólidos, a quantificação de espécies de enxofre com estado de oxidação intermediário entre sulfeto e sulfato, como tiosulfato, e também de ácidos orgânicos voláteis. Esses compostos tem grande importância biológica e com essas informações será possível compreender, de forma mais aprofundada, a dinâmica da oxirredução de compostos sulfurados e a diversidade de microrganismos no sistema;
- Realizar novos experimentos alterando, primeiramente, a DQO do líquido de recirculação, e posteriormente, a DQO e a carga volumétrica de H₂S aplicada, com o propósito de compreender como a variável DQO influencia a estabilidade do sistema. Amostras da microbiota deverão ser coletadas e analisadas nas diferentes etapas experimentais, possibilitando a identificação de alterações na comunidade microbiana;
- Investigar os efeitos da variação da concentração de oxigênio dissolvido, com o objetivo de compreender melhor os parâmetros que podem estar relacionados à resistência e à resiliência do sistema a condições operacionais extremas;
- Analisar a resistência do sistema ao aumento de carga de H₂S, porém de forma gradual. Uma vez que a diversidade microbiana aparentemente aumentou durante as primeiras etapas do experimento, é possível que, após um período de instabilidade, correspondente à aclimação da biomassa, cargas de H₂S superiores às obtidas neste experimento possam ser aplicadas.
- Realizar novas análises microbiológicas direcionadas especificamente aos genes envolvidos na oxidação de sulfeto, com o objetivo de identificar grupos de bactérias sulfo-oxidantes que não foram observados neste trabalho.

8 REFERÊNCIAS

ABATZOGLOU, N.; BOIVIN, S. A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, v. 3, n. 1, p. 42-71, 2009.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA. *Manual de conservação e reúso de água na agroindústria sucroenergética*. Vasa. Agência Nacional de Águas, 2009.

BAKER, P. W.; HARAYAMA, S. An analysis of microorganisms in environments using denaturing gradient gel electrophoresis. In: SPENCER, J. F. T.; RAGOUT DE SPENCER, A. L. (Ed.). *Methods in biotechnology*. Vol. 16: Environmental microbiology: methods and protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004. p. 323-338.

BAQUERIZO, G.; CHANEAC, A.; ARELLANO-GARCÍA, L.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; REVAH, S. Biological removal of high loads of thiosulfate using a trickling filter under alkaline conditions. *Mine Water and the Environment*, v. 32, n. 4, p. 278-284, 2013.

BARTON, L.; FAUQUE, G. D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. v. 68. p. 41-98, 2009.

BO, T.; ZHU, X.; ZHANG, L.; TAO, Y.; HE, X.; LI, D.; YAN, Z. A new upgraded biogas production process: Coupling microbial electrolysis cell and anaerobic digestion in single-chamber, barrel-shape stainless steel reactor. *Electrochemistry Communications*, v. 45, p. 67-70, 2014.

BOTHEJU, D.; LIE, B.; BAKKE, R. Oxygen effects in anaerobic digestion. *Modeling, Identification and Control*, v. 30, n. 4, p. 191-201, 2009.

BOTHEJU, D.; BAKKE, R. Oxygen effects in anaerobic digestion – A review. *The Open Waste Management Journal*, v. 4, p. 1-19, 2011.

BREITENSTEIN, A.; WIEGEL, J.; HAERTIG, C.; WEISS, N. Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as sedimentibacter hydroxybenzoicus gen. nov., comb. nov., and description of sedimentibacter *Saalensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 801-807, 2002.

CAMPOS, J. R.; PAGLIUSO, J. D. *Tratamento de gases gerados em reatores anaeróbios*. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. ABES: Rio de Janeiro, 1999. 464 p.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data *Nature Publishing Group*, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CHERNICHARO, C. A. L. *Princípio do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios*. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2007. 380 p.

CLINE, C.; HOKSBERG, A.; ABRY, R.; JANSSEN, A. Biological process for H₂S removal from gas streams: the SHELL-PAQUES/THIOPAQ™ gas desulfurization process. In: 53 RD LAURANCE REID GAS CONDITIONING CONFERENCE, 2003. *Conference Proceedings*. University of Oklahoma. College of Continuing Education. Engineering and Geosciences Programs, 2003.

DE VRIEZE, J.; GILDEMYN, S.; VILCHEZ-VARGAS, R.; JÁUREGUI, R.; PIEPER, D.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Inoculum selection is crucial to ensure operational stability in anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 1, p. 189-99, jan. 2015.

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. *Biogas from waste and renewable resources: an introduction*. 1. ed., John Wiley & Sons, 2008. p. 450.

DWORKIN, M. (Org.). *The Prokaryotes: Ecophysiology and Biochemistry*. Vol 2. Springer Science & Business Media, 2006.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. *Balanço energético nacional 2014: Relatório síntese - Ano base 2013, 2014*.

FELFÖLDI, T.; SZÉKELY, A.; GORÁL, R.; BARKÁCS, K.; SCHEIRICH, G.; ANDRÁS, J.; RÁCZ, A.; MÁRIALIGETI, K. Polyphasic bacterial community analysis of an aerobic activated sludge removing phenols and thiocyanate from coke plant effluent. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 10, p. 3406-14, 2010.

FERRIS, M.; MUYZER, G.; WARD, D. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental microbiology*, v. 62, n. 2, p. 340-6, 1996.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*, v. 145C, p. 210-229, 2014.

FULLER, C. W. *et al.* The challenges of sequencing by synthesis. *Nature biotechnology*, v. 27, n. 11, p. 1013-23, nov. 2009.

GARCIA, G. P.; ARAUJO, J. C. *Extração de dna de amostras de lodo, sedimento e espuma*. Procedimento operacional padrão da rede PROSAB microbiologia para o saneamento básico, 2010.

GARRITY, G.M. (Org.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. ed. New York: Springer US, 2001.

GHOSH, W.; DAM, B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 33, n. 6, p. 999-1043, 2009.

GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, v. 11, n. 5, p. 759-69, 2011.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; FLORES-MÁRQUEZ, T. E.; REVAH, S.; MORGAN-SAGASTUME, J. M. Enrichment and cultivation of a sulfide-oxidizing bacteria consortium for its deploying in full-scale biogas desulfurization. *Biomass and Bioenergy*, v. 66, p. 460-464, jul. 2014.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; REVAH, S. The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 2, p. 292-298, 2007.

GREEN, S. J.; LEIGH, M. B.; NEUFELD, J. D. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In: TIMMIS, K. N. (Org.). *Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds*. Vol. 1, Heidelberg: Springer Heidelberg, 2009. p. 4137-4158.

GREIN, F.; RAMOS, A. R.; VENCESLAU, S. S.; PEREIRA, I. Unifying concepts in anaerobic respiration: insights from dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1827, n. 2, p. 145-60, 2013.

GUO, H.; CHEN, C.; LEE, D.; WANG, A.; REN, N.; Sulfur – nitrogen – carbon removal of *Pseudomonas* sp . C27 under sulfide stress. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 53, n. 1, p. 6-12, 2013.

HAAKENSEN, M.; DOBSON, C. M.; DENEER, H.; ZIOLA, B. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *International Journal of Food Microbiology*, v. 125, n. 3, p. 236-41, 2008.

HAO, T.; XIANG, P.; MACKEY, H. R.; CHI, K.; LU, H.; CHUI, H.; van LOOSDRECHT, M. C.; CHEN, G. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. *Water Research*, v. 65C, p. 1-21, 2014.

HATTORI, S.; KAMAGATA, Y.; HANADA, S. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 1601-1609, 2000.

HEMME, C.; FIELDS, M.; HE, Q.; DENG, Y.; LIN, L.; TU, Q.; MOUTTAKI, H.; ZHOU, A.; FENG, X.; ZUO, Z.; RAMSAY, B.; HE, Z.; WU, L.; van NOSTRANDS, J.; XU, J.; TANG, Y.; WIEGEL, J.; PHELPS, T. Correlation of genomic and physiological traits of Thermoanaerobacter species with biofuel yields. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 22, p. 7998-008, 2011.

HO, K.; LIN, W.; CHUNG, Y.; CHEN, Y.; TSENG, C. Elimination of high concentration hydrogen sulfide and biogas purification by chemical – biological process. *Chemosphere*, v. 92, n. 10, p. 1396-1401, 2013.

HUG, L.; CASTELLE, C.; WRIGHTON, K.; THOMAS, B.; SHARON, I.; FRISCHKORN, K.; WILLIAMS, K.; TRINGE, S.; BANFIELD, J. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the *Chloroflexi* phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome*, v. 1, n. 1, p. 22, 2013.

JENSEN, A. B.; WEBB, C. Treatment of H₂S-containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, n. 1, p. 2-10, jan. 1995.

JUMAS-BILAK, E.; ROUDIÈRE, L.; MARCHANDIN, H. Description of “synergistetes” phyl. nov. and emended description of the phylum “Deferribacteres” and of the family Syntrophomonadaceae, phylum “Firmicutes”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 5, p. 1028-35, 2009.

JÜNEMANN, S.; SEDLAZECK, F.; PRIOR, K.; ALBERSMEIER, A.; JOHN, U.; KALINOWSKI, J.; MELLMANN, A.; GOESMANN, A.; VON HAESSELER, A.; STOYE, J. Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nature Biotechnology*, v. 31, n. 4, p. 294-296, 2013.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A. L.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1647-9, 2012.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLOCKNER, F. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 1, 2013.

KOBAYASHI, T.; LI, Y.; KUBOTA, K.; HARADA, H.; MAEDA, T.; YOU, H. Characterization of sulfide-oxidizing microbial mats developed inside a full-scale anaerobic digester employing biological desulfurization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 2, p. 847-57, 2012.

KRAYZELOVA, L.; BARTACEK, J.; KOLESAROVA, N.; JENICEK, P. Microaeration for hydrogen sulfide removal in UASB reactor. *Bioresource Technology*, v. 172, p. 297-302, 2014.

KRÖBER, M.; BEKEL, T.; DIAZ, N.; GOESMANN, A.; JAENICKE, S.; KRAUSE, L.; MILLER, D.; RUNTE, K.; VIEHOVER, P.; PUHLER, A.; SCHLUTER, A. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *Journal of Biotechnology*, v. 142, n. 1, p. 38-49, 2009.

KUNDU, K.; SHARMA, S.; SREEKRISHNAN, T. R. Changes in microbial communities in a hybrid anaerobic reactor with organic loading rate and temperature. *Bioresource Technology*, v. 129, p. 538-547, 2013.

LEE, D.; PAN, X.; WANG, A.; HO, K. Facultative autotrophic denitrifiers in denitrifying sulfide removal granules. *Bioresource Technology*, v. 132, p. 356-60, 2013.

LI, L.; HAN, Y.; YANM X.; LIU, J. H₂S removal and bacterial structure along a full-scale biofilter bed packed with polyurethane foam in a landfill site. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 52-8, 2013.

- LIN, W.; CHEN, Y.; TSENG, C. Pilot-scale chemical-biological system for efficient H₂S removal from biogas. *Bioresource technology*, v. 135, p. 283-91, 2013.
- LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, v. 2012, p. 251364, 2012.
- LUO, G.; ANGELIDAKI, I. Analysis of bacterial communities and bacterial pathogens in a biogas plant by the combination of ethidium monoazide, PCR and ion torrent sequencing. *Water Research*, v. 60, p. 156-63, 2014.
- LUO, G.; WANG, W.; ANGELIDAKI, I. Anaerobic digestion for simultaneous sewage sludge treatment and CO biomethanation: Process performance and microbial ecology. *Environmental Science and Technology*, v. 47, p. 10685-10693, 2013.
- MADIGAN, M. T. *et al. Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.
- MAGURRAN, A. E. *Measuring biological diversity*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.
- MAESTRE, J. P.; ROVIRA, R.; ÁLVAREZ-HORNOS, F. J.; FORTUNY, M.; LAFUENTE, J.; GAMISANS, X.; GABRIEL, D. Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach. *Chemosphere*, v. 80, n. 8, p. 872-80, ago. 2010.
- MAKI, J. S. Bacterial intracellular sulfur globules: structure and function. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 4-5, p. 270-80, 2013.
- MANAHAN, S. E. *Fundamentals of environmental chemistry*. 2. ed. Boca Ratón: CRC Press LLC, 2001.
- MANNUCCI, A.; MUNZ, G.; MORI, G.; LUBELLO, C. Biomass accumulation modelling in a highly loaded biotrickling filter for hydrogen sulphide removal. *Chemosphere*, v. 88, n. 6, p. 712-717, 2012.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). *Anuário estatístico da agroenergia*. 4. ed. Secretaria de Produção e Agroenergia. Brasília: MAPA/ACS, 2013. 284 p.
- METZKER, Michael L. Sequencing technologies - the next generation: EBSCOhost. *Nature Reviews. Genetics*, v. 11, n. 1, p. 31-46, jan. 2010.
- MORAES, B. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Applied Energy*, v. 113, p. 825-835, 2014.
- MORI, K.; KIM, H.; KAKEGAWA, T.; HANADA, S. A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles*, v. 7, p. 283-290, 2003.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, n. 1, p. 127-41, 1998.

MUYZER, G.; KUENEN, J.; ROBERTSON, L. Colorless sulfur bacteria. In: ROSENBERG, EUGENE *et al.* (Org.). *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 555-588.

MUYZER, G.; STAMS, A. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews - Microbiology*, v. 6, n. 6, p. 441-54, 2008.

NELSON, M. C; MORRISON, Mark; YU, Zhongtang. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 4, p. 3730-3739, 2011.

NIEDRINGHAUS, Thomas P. *et al.* Landscape of next-generation sequencing technologies. *Analytical Chemistry*, v. 83, n. 12, p. 4327-41, 2011.

NOCKER, Andreas; BURR, Mark; CAMPER, Anne K. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, v. 54, n. 2, p. 276-89, 2007.

NOYOLA, A.; MORGAN-SAGASTUME, J. M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. E. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy resource recovery. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 5, p. 94-114, 2006.

OMRI, Ilhem *et al.* H₂S gas biological removal efficiency and bacterial community diversity in biofilter treating wastewater odor. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 22, p. 10202-10209, 2011.

PAREDES, D.; LESSA, A. C. D. R.; DE SANT'ANNA, S. A.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. Nitrous oxide emission and ammonia volatilization induced by vinasse and N fertilizer application in a sugarcane crop at Rio de Janeiro, Brazil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 98, n. 1, p. 41-55, 21 dez. 2013.

PEREIRA, A. O.; COSTA, R. C.; COSTA, C. V.; MARRECO, J.; LA ROVERE, E. L. Perspectives for the expansion of new renewable energy sources in Brazil. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 24, p. 49-59, 2014.

PLUGGE, C. M.; ZHANG, W.; SCHOLTEN, J. C.; STAMS, A. J. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, n. May, p. 81, 2011.

POKORNA D., & ZABRANSKA, J. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnology Advances*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.007>. 2015.

POTIVICHAYANON, S.; POKETHITIYOOK, P.; KRUATRACHUE, M. Hydrogen sulfide removal by a novel fixed-film bioscrubber system. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 3, p. 708-715, mar. 2006.

- QUINCE, Christopher *et al.* Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics*, v. 12, n. 1, p. 38, 2011.
- RAMÍREZ, Martín *et al.* Biofiltration of reduced sulphur compounds and community analysis of sulphur-oxidizing bacteria. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 5, p. 4047-53, 2011.
- RAMOS, I.; PEREZ, R.; FDZ-POLANCO, M. Microaerobic desulphurisation unit: A new biological system for the removal of H₂S from biogas. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 644-40, 2013.
- RAMOS, I.; PÉREZ, R.; FDZ-POLANCO, M. The headspace of microaerobic reactors: Sulphide-oxidising population and the impact of cleaning on the efficiency of biogas desulphurisation. *Bioresource Technology*, v. 158, p. 63-73, 2014.
- RASI, S.; LÄNTELÄ, J.; RINTALA, J. Trace compounds affecting biogas energy utilisation – A review. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 12, p. 3369-3375, 2011.
- REGUEIRO, L.; VEIGA, P.; FIGUEROA, M.; ALONSO-GUTIERREZ, J.; STAMS, A. J.; LEMA, J. M.; CARBALLA, M. Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiological Research*, v. 167, n. 10, p. 581-589, 2012.
- RYCKEBOSCH, E.; DROUILLON, M.; VERVAEREN, H. Techniques for transformation of biogas to biomethane. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 5, p. 1633-1645, 2011.
- SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. *Biomass & Bioenergy*, v. 44, n. 9, p. 1101-1107, 2009.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SHOKRALLA, S.; SPALL, J. L.; GIBSON, J. F.; HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, v. 21, n. 8, p. 1794-1805, 2012.
- SIEBER, Jessica R *et al.* The genome of *Syntrophomonas wolfei*: new insights into syntrophic metabolism and biohydrogen production. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 8, p. 2289-301, 2010.
- SIEVERT, S. M.; KIENE, RONALD P.; SCHULZ-VOGT, Heide N. The sulfur cycle. *Oceanography*, v. 20, p. 117-123, 2007.
- SKINNER, K.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 31, n. 9, p. 401-8, out. 2004.
- SOROKIN, D. Y.; LYSENKO, A. M.; MITYUSHINA, L. L.; TOUROVA, T. P.; JONES, B. E.; RAINEY, F. A.; ROBERTSON, L.; KUENEN, G. J. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., novel and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing

bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 565-580, 2001.

STAL, Lucas J.; MOEZELAAR, Roy. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 21, n. 2, p. 179-211, 1997.

SU, C.; LEI, L.; DUAN, Y.; ZHANG, K. Q.; YANG, J. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 993-1003, 2012.

SUNDBERG, C.; AL-SOUD, W. A.; LARSSON, M.; ALM, E.; YEKTA, S. S.; SVENSSON, B. H.; KARLSSON, A. 454 Pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 85, n. 3, p. 612-26, set. 2013.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 1, p. 73-94, 2009.

TCHOBANOGLIOUS, G.; STENSEL, H. D.; TSUCHIHASHI, R.; BURTON, F. Metcalf & Eddy Inc. *Wastewater engineering: Treatment and resource recovery*. 5. ed. Columbus, OH: McGraw Hill Education, 2013. p. 2048

van den BOSCH, Pim L. F. *et al.* Sulfide oxidation at halo-alkaline conditions in a fed-batch bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 5, p. 1053-63, 2007.

van der ZEE, F. P. *et al.* Sulfide removal by moderate oxygenation of anaerobic sludge environments. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 518-524, 2007.

van ELSAS, J. D.; BOERSMA, F. G. H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, v. 47, n. 2, p. 77-87, 2011.

van HAANDEL, A. Aproveitamento dos subprodutos de destilarias de álcool para proteger o meio ambiente e aumentar a rentabilidade. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 27., Porto Alegre, 2000. *Anais... ABIS*: Rio de Janeiro, 2000.

van HAANDEL, A. C. Integrated energy production and reduction of the environmental impact at alcohol distillery plants. *Water Science and Technology*, v. 52, p. 49-57, 2005.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. The division "Synergistes". *Anaerobe*, v. 13, n. 3-4, p. 99-106, 2007.

von SPERLING, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. 452 p.

WANG, Q.; GARRITY, G.; TIEDJE, J.; COLE, J. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 16, p. 5261-7, 2007.

- WANG, R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*, v. 92, n. 2, p. 791-896, 2012.
- WEILAND, P. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 4, p. 849-860, 2010.
- WRIGHT, E. S.; YILMAZ, L. S.; NOGUERA, D. R. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 3, p. 717-25, 2012.
- XU, Jianping. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*, v. 15, n. 7, p. 1713-1731, 2006.
- YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. *Anaerolinea thermolimos* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. in the. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. Pt 6, p. 1331-40, 2006.
- YOUSSEF, N.; STEIDLEY, B. L.; ELSHAHED, M. S. Novel high-rank phylogenetic lineages within a sulfur spring (Zodletone Spring, Oklahoma), revealed using a combined pyrosequencing-sanger approach. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 8, p. 2677-88, 2012.
- ZHU, M.; LU, F.; HAO, L.; HE, P.; SHAO, L. Regulating the hydrolysis of organic wastes by micro-aeration and effluent recirculation. *Waste Management*, v. 29, n. 7, p. 2042-2050, 2009.
- ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA, A.; BANACH, A.; BACZA, T.; PIECZYKOLAN, M. Diversity and variability of methanogens during the shift from mesophilic to thermophilic conditions while biogas production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 12, p. 3047-3053, 2014.
- ZITOMER, D. H.; SHROUT, J. D. Feasibility and benefits of methanogenesis under oxygen-limited conditions. *Waste Management*, v. 18, p. 107-116, 1998.